Bacheloroppgave

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

Trine Utklev & Jana Jensen

Forbedret tularemidiagnostikk med real-time PCR for *Francisella tularensis*

Improved tularemia diagnostics with real-time PCR for *Francisella tularensis*

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Mai 2022

NTNU
Kunnskap for en bedre verden

Trine Utklev & Jana Jensen

Forbedret tularemidiagnostikk med real-time PCR for *Francisella tularensis*

Improved tularemia diagnostics with real-time PCR for *Francisella tularensis*

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Mai 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

NTNU
Kunnskap for en bedre verden

NTNU

FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

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

Forbedret tularemidiagnostikk med real-time PCR for *Francisella tularensis*

Improved tularemia diagnostics with real-time PCR for *Francisella tularensis*

Av / by

Trine Utklev & Jana Jensen

Trondheim, 2022

Forord

Denne bacheloroppgaven ble gitt av Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Seksjon diagnostikk ved St. Olavs Hospital i Trondheim. Oppgaven tilhører emnet HBIO3001 Bacheloroppgave i bioingeniørfag, og ble skrevet ved Institutt for Bioingeniørfag ved Fakultet for Naturvitenskap ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.

Det endelige resultatet av dette prosjektet krevde mye veiledning og assistanse fra mange mennesker, og vi er privilegerte som har fått all nødvendig hjelp underveis i dette prosjektet. Først vil vi rette en takk til Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Seksjon diagnostikk ved St. Olavs Hospital, for at vi fikk benytte deres lokaler, utstyr og materiale. En stor takk til faglige veiledere fagansvarlig bioingeniør An-Magritt Stjern Flakne, bioingeniør Emilie Tungseth Bruun og bioingeniør Inger Jean Cooper Kjønnøy for god veiledning under laboratoriearbeidet og hjelp til forståelse av fagfeltet. Videre vil vi takke spesialbioingeniør Sidsel Krokstad for god assistanse ved vurdering av analyseresultater. En spesiell takk til overlege Kåre Bergh for stort engasjement, god oppfølging, faglig veiledning og hjelp til fremgang av prosjektet. Vi vil også takke prosessveileder Lise Falk-Larssen Lorentsen for god veiledning, gode råd og forslag til strukturelle endringer. Hver og en av dere har bidratt med kunnskapen som var nødvendig for å komme i mål med prosjektet. Til slutt vil vi takke familie og venner for støtte, hjelp og motivasjon til prosjektet.

Trondheim, 20. mai 2022

Trine Utklev og Jana Jensen

Sammendrag

Francisella tularensis er en bakterie som kan føre til en potensielt alvorlig zoonose. Bakterien formerer seg effektivt i ulike vertsceller, og kan på denne måten infisere store deler av kroppen. *Francisella tularensis* er en kravstor bakterie, og kan derfor være vanskelig å få vekst av på dyrkingsmedier. Grunnet dette regnes Polymerase Chain Reaction (PCR) som en bedre deteksjonsmetode. Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Seksjon diagnostikk ved St. Olavs Hospital ønsket å undersøke mulighetene for å etablere en mer sensitiv diagnostikk for påvisning av *Francisella tularensis*, sammenliknet med PCR-metoden avdelingen har benyttet i flere år. Dette ble gjort ved å undersøke nye sett med primere og prober, som var 4Pan1, B2 og ISFtu. Primere og prober ble valgt basert på tidligere forskning beskrevet i de publiserte artiklene «Differentiation of *Francisella tularensis* Subspecies and Subtypes» (1), og «Development of a Multitarget Real-Time TaqMan PCR Assay for Enhanced Detection of *Francisella tularensis* in Complex Specimens» (2).

Ulike Real-Time PCR-analyser av eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu ble utført for å sammenlikne metodene og undersøke deres sensitivitet. Det ble utført analyse av effektivitet, gradient, optimalisering av primer og probe, og spesifisitet. Dette for å optimalisere metodenes reaksjonsbetingelser og undersøke eventuelle interfererende bakteriearter. Videre ble analyse av *Francisella*-stammer, deteksjonsgrense og prøvemateriale utført for å avdekke en mulig tendens til bedre sensitivitet for enkelte metoder.

Resultatene viste god effektivitet og en annealingtemperatur på 55ºC ble valgt for samtlige metoder. Det ble ved analyse av optimalisering av primer og probe valgt å benytte PCR-miks 5 for eksisterende metode og 4Pan1, og PCR-miks 9 for B2 og ISFtu. Videre viste resultatene god spesifisitet for alle metodene. Det ble utført analyse av ulike *Francisella*-stammer der resultatene viste at 4Pan1 og eksisterende metode detekterte underartene *holarctica*, *tularensis*, *novicida* og *mediasiatica*. ISFtu detekterte også disse, i tillegg til *Francisella philomiragia*. B2 påviste kun *holarctica*. Deteksjonsgrensen til ISFtu ble bestemt til <0,55 kopier av bakteriegenet per PCR-reaksjon. Analyse av prøvemateriale viste at ISFtu ga omtrent 4-5 lavere Ct-verdier enn de resterende metodene. Det ble konkludert med at ISFtu viste en tendens til bedre sensitivitet enn resterende metoder. Imidlertid er det nødvendig med videre arbeid før en ny metode kan implementeres ved avdelingen.

Abstract

Francisella tularensis is a bacterium that can lead to a potentially serious zoonosis. The bacterium multiplies efficiently in various host cells and can in this way infect large parts of the body. *Francisella tularensis* is a demanding bacterium and can accordingly be difficult to grow on culture media. Polymerase Chain Reaction (PCR) is therefore considered as a better detection method. Department of Medical Microbiology, Section Diagnostics at St. Olav's Hospital wanted to investigate the possibilities of establishing a more sensitive diagnostics for the detection of *Francisella tularensis,* compared to the PCR method currently in use. This was done by examining new sets of primers and probes, which were 4Pan1, B2 and ISFtu. Primers and probes were selected based on previous research described in the published articles "Differentiation of *Francisella tularensis* Subspecies and Subtypes" (1), and "Development of a Multitarget Real-Time TaqMan PCR Assay for Enhanced Detection of *Francisella tularensis* in Complex Specimens" (2).

Various Real-Time PCR analyses of existing method, 4Pan1, B2 and ISFtu were carried out to compare the methods and examine their sensitivity. Analysis of efficiency, gradient, primer and probe optimization, and specificity were performed. The purpose of this was to optimize the reaction conditions of the methods and investigate eventually interfering bacterial species. Furthermore, analysis of *Francisella* strains, detection limit and sample material were performed to investigate a possible tendency for better sensitivity for certain methods.

The results showed good efficiency and an annealing temperature of 55°C was chosen for all methods. When analyzing primer and probe optimization, PCR mix 5 was chosen for existing method and 4Pan1, and PCR mix 9 for B2 and ISFtu. Furthermore, the results showed good specificity for all methods. Analysis of various *Francisella* strains was performed where the results showed that 4Pan1 and existing method detected the subspecies *holarctica*, *tularensis*, *novicida* and *mediasiatica*. ISFtu also detected these, in addition to *Francisella philomiragia*. B2 detected only *holarctica*. The limit of detection of ISFtu was determined to be <0.55 copies of the bacterial gene per PCR reaction. Analysis of sample material showed that ISFtu gave approximately 4-5 Ct values lower than the remaining methods. It was concluded that ISFtu showed a tendency for better sensitivity than the remaining methods. Further work is needed before a new method can be implemented at the department.

Innholdsfortegnelse

Forord ..... **I**

Sammendrag ..... **II**

Abstract ..... **III**

1.0 Innledning **1**

1.1. Om Francisella tularensis *1*

1.2 Tularemi *2*

1.2.1 Smittemåte 3

1.2.2 Forekomst og utbrudd av tularemi i Norge 4

1.2.3 Forekomst av tularemi på verdensbasis 4

1.3 Hvorfor er bakterien smittsom? *5*

1.4 PCR *5*

1.4.1 Konvensjonell PCR 5

1.4.2 Real-time PCR 6

1.4.3 Primere og prober 6

1.4.5 Reaksjonstrinn, sykluser og Ct-verdi 7

1.5 Formålet med oppgaven *9*

1.6 Problemstilling *9*

2.0 Materiale og metode **10**

2.1 Materiale *10*

2.1.1 Prøvemateriale 10

2.1.2 Kontrollmateriale 10

2.1.3 Primere og prober 11

2.1.4 Spesifisitet 12

2.1.5 Analyse av bakteriestammer 14

2.1.6 Reagenser 14

2.2 Metode *15*

2.2.1 Tillaging av PCR-miks 15

2.2.2. PCR-analyse 16

2.2.3 Prøvepreparering 16

2.2.4 Effektivitet 17

2.2.5 Gradientanalyse 17

2.2.6 Optimalisering av primere og probe 17

2.2.7 Spesifisitetstesting 18

2.2.8 Analyse av bakteriestammer 18
2.2.9 Deteksjonsgrense 18
2.2.10 Analyse av prøvemateriale 19

3. 0 Resultater 20

3.1 Effektivitet 20

3.2 Gradientanalyse 21

3.3 Optimalisering av primer og probe 21

3.4 Spesifisitet 22

3.5 Analyse av bakteriestammer 23

3.6 Deteksjonsgrense 23

3.7 Analyse av prøvemateriale 24

4.0 Diskusjon 25

4.1 Effektivitet 25

4.2 Gradientanalyse 25

4.3 Optimalisering av primer og probe 26

4.4 Analyse av bakteriestammer 28

4.5 Deteksjonsgrense 29

4.6 Analyse av prøvemateriale 30

4.7 Svakheter ved prosjektet 31

4.8 Videre arbeid 32

5.0 Konklusjon 33

6.0 Referanser 34

7.0 Vedlegg 36

Vedlegg 1 36
7.1 Effektivitet 36

Vedlegg 2 40
7.2 Gradientanalyse 40

Vedlegg 3 42
7.3 Optimalisering av primer og probe 42

Vedlegg 4 47

4.1 Analyse av bakteriestammer 47

Vedlegg 5 ..... *48*

5.1 Deteksjonsgrense 48

Vedlegg 6 ..... *50*

6.1 Prøvemateriale 50

1.0 Innledning

I følgende kapittel blir bakterien *Francisella tularensis* presentert. Kapittelet gir et innblikk i hvordan bakterien opptrer, bakteriens utbredelse, smittemåte og hvordan den kan detekteres.

1.1. Om Francisella tularensis

Francisella tularensis er en gramnegativ, stavformet bakterie. Den er liten og ubevegelig, og opptrer som fakultativ intracellulær. Bakterien er strikt aerob og kan være vanskelig å få vekst av på dyrkingsmedier, da den er kravstor (3). *Francisella tularensis* kan detekteres på ulike måter, som dyrkning, serologi og Polymerase Chain Reaction (PCR). Bakterien er inndelt i fire underarter som har noe ulik geografisk utbredelse, og underartene varierer i grad av patogenisitet hos mennesker (4).

Tabell 1: Oversikt over inndeling av Francisella tularensis i ulike underarter og i hvilke geografiske områder de ulike underartene forekommer.

Underart	Forekomst
Francisella tularensis subsp. tularensis (type A)	Nord Amerika (Canada og USA)
Francisella tularensis subsp. holarctica (type B)	Europa, Asia, Nord Amerika og Australia.
Francisella tularensis subsp. mediasiatica	Kazakhstan og Turkmenistan.
Francisella tularensis subsp. novicida	USA, Canada, Australia og Spania

Francisella tularensis er vidt utbredt på den nordlige halvkule og er i stand til å infisere hundrevis av forskjellige virveldyr og virvelløse dyr (5). Eksempelvis er *Francisella tularensis* en svært virulent bakterie for mennesker og en rekke dyr, som hare, kanin og andre gnagere. Som følge av bakteriens virulensfaktorer kan den bidra til å skape epidemier (6). Et så lavt antall som 10 kolonidannende enheter (CFU) kan være nok til å skape en alvorlig infeksjon hos mennesker (7). Til tross for at bakterien ikke smitter mellom mennesker kan det lett oppstå en epidemi, ettersom det skal et så lavt bakterieantall til for å bli smittet.

Francisella tularensis subsp. holarctica (type B) og *Francisella tularensis subsp. tularensis* (type A) gir oftest sykdom hos mennesker. Av disse underartene gir *tularensis* mer alvorlig sykdom. Underarten *Francisella tularensis subsp. tularensis* (type A) er inndelt i to undertyper, A.I og A.II, hvor disse undertypene varierer betydelig i virulens, der type A.I er

den mest virulente (1). *F. tularensis* A.I stammene er blant de mest patogene bakteriene som er kjent (8).

F. tularensis subsp. holarctica forårsaker mindre alvorlig sykdom enn *subsp tularensis*, men denne underarten har derimot flere kjente habitater og verter. Det kreves i tillegg en større dose CFU for at denne underarten skal smitte. Til tross for dette er bakterien generelt mer utbredt i verden og det forekommer flere smittetilfeller av *holarctica* sammenliknet med andre underarter av bakterien (9).

Underarten *mediasiatica* har kun blitt isolert i Kazakhstan og Turkmenistan, og en har foreløpig lite kunnskap om denne underarten. Tidligere forskning viser likevel at *mediasiatica* har en moderat virulens sammenlignet med underarten *holarctica* (6). Denne underarten gir sjeldent sykdom hos mennesker, og er nærmere beslektet med *holarctica* enn *tularensis*. Underarten *novicida* fører også sjeldent til sykdom hos mennesker, og tilfeller som forekommer er assosiert med pasienter med nedsatt immunforsvar eller andre underliggende helseproblemer. Selv om underartene *tularensis* og *novicida* ikke har de samme egenskapene til å gi sykdom, er de omtrent 97% like på gennivå (10). *Novicida* ble for første gang isolert i 1951 fra vannprøver i Utah i USA, og medførte tularemi hos minst 4 pasienter. Tre av pasientene hadde underliggende helseproblemer (11).

1.2 Tularemi

Tularemi kalles også «harepest» og er en sjelden, men potensielt alvorlig, zoonose som kan smitte fra dyr til mennesker. Zoonosen er forårsaket av bakterien *Francisella tularensis*, og det er underartene *tularensis* og *holarctica* som i flest tilfeller forårsaker tularemi hos mennesker. Primært forekommer tularemi hos ville dyr, spesielt harer og smågnagere. Inkubasjonstiden for tularemi er kort, ofte mellom 3 til 5 dager og 2 uker. Smittede kan tidlig i forløpet kjenne på influensa-lignende symptomer som feber, frysninger, hodepine, muskelverk og stive ledd (12).

1.2.1 Smittemåte

Selv om sykdommen ikke smitter direkte fra person til person finnes det flere kjente smitteveier. Smitte hos mennesker kan forekomme ved kontaktsmitte fra syke, døde eller smittebærende dyr, gjennom bitt av smittebærende dyr, ved inhalasjon av støv som er infisert med ekskrementer eller urin og gjennom infisert vann. Mennesker kan også smittes gjennom mygg og flått som overfører smitte fra dyr. Rovdyr og katter som jakter på gnagere vil kunne få bakterien i munnhulen og kan dermed representere en viss risiko for smitte (4). Smitte på laboratorium kan i sjeldne tilfeller oppstå, og det forekommer som oftest gjennom inhalasjon og hudkontakt. Sykdommen kan opptre på 6 ulike måter (tabell 2), avhengig av hvordan bakterien har kommet seg inn i kroppen (4).

Tabell 2: Tabellen viser en oversikt over de 6 ulike sykdomsforløpene som kan oppstå ved tularemi. Første kolonne gir informasjon om type forløp, videre forklarer andre kolonne smittemåte ved de ulike forløpene. Siste kolonne viser symptomer ved de ulike forløpene (4).

Type forløp	Smittemåte	Symptomer
Orofaryngealt forløp	Matvarer og drikkevann	Smertefull og sår hals, svelg eller mandler. Lokal lymfeknutehevelse kan oppstå
Ulceroglandulært forløp	Kontakt med smittede dyr eller insektsstikk og flåttbitt	Sår og utslett på hender og lokal lymfeknutehevelse
Glandulært forløp	Kontakt med smittede dyr eller insektsstikk og flåttbitt	Lokal lymfeknutehevelse uten sårdannelse
Pneumonisk forløp	Innånding	Lungebetennelse
Intestinalt forløp	Matvarer og drikkevann	Magesmerter, oppkast og diaré
Tyføst forløp	Matvarer og drikkevann	Febril sykdom uten fokale symptomer

1.2.2 Forekomst og utbrudd av tularemi i Norge

Tularemi er ingen utbredt sykdom blant mennesker, og i Norge observeres det rundt 50 tilfeller per år. Det forekommer likevel noen tilfeller av utbrudd med bakterien i Norge, som i flest tilfeller skyldes orofaryngealt-, intestinalt- eller tyføst forløp. Til tross for lav forekomst av sykdommen, observeres det en økning i antall tilfeller per år. Det er foreløpig ikke sett store utbrudd av tularemi i Norge, men lokale utbrudd av sykdommen har blitt rapportert fra ulike deler av landet (4).

Tabell 3: Tabellen viser en oversikt over noen rapporterte utbrudd av tularemi i Norge, med årstall, antall smittede, smittekilde og område for utbrudd (13).

Årstall	Antall smittede	Smittekilde	Område for utbrudd
2002	11	Forurenset brønnvann (lemenkadaver).	Midtre Gauldal
2007	20	Forurenset brønnvann hvor *Francisella tularensis* ble påvist i minst en av drikkevannskildene.	Nordland (Andøy, Hadsel, Kvæfjord og Tielslund)
2008	17	Forurenset privat vannkilde.	Meldal
2011	50	Forurenset brønnvann.	Midt- Norge
2019	34	Primær: Forurenset vann fra naturen. Mistenkt smittemåte i tillegg: insekter, kontakt med smittet hare og gnageravføring.	Østlandet (Engerdal, Tynset, Hamar, Ringsaker, Løten og Stange kommune)

1.2.3 Forekomst av tularemi på verdensbasis

Tularemi er en endemisk sykdom i store deler av verden, som betyr at den til stadighet opptrer i et bestemt område. Sykdommen forekommer i Europa, Nord-Amerika, Asia, Nord-Afrika og Australia, men det er flest utbrudd på den nordlige halvkule i Europa og Nord-Amerika. Det ble i 2017 rapportert 413 tularemi-tilfeller fra EU/EØS-området, der flest tilfeller per 100 000 innbygger ble rapportert fra Norge, Sverige, Tsjekkia og Finland. Store utbrudd som har funnet sted i Sverige og Finland har ikke blitt observert i Norge. Dette kan skyldes at tendensen for smitte gjennom insektsstikk spiller en betydelig større rolle i Sverige og Finland sammenliknet med Norge (4).

1.3 Hvorfor er bakterien smittsom?

Francisella tularensis mangler flere av de kjente virulensfaktorene som foreligger hos patogene mikrober, og dette fører til mildere grad av immunrespons hos verten. *Francisella tularensis* mangler eksotoksin og dens lipopolysakkarider i endotoksinet gir liten grad av inflammasjon. Endotoksiner er lipopolysakkarider, og endotoksiner er en type bakterieprodusert giftstoff som finnes i bakteriens cellevegg og blir frigjort når bakterien dør eller går i oppløsning (14).

Bakterien er fakultativ intracellulær, og kan følgelig være både intracellulær og ekstracellulær. Bakterien benytter seg av fagocytose og endocytose til å komme seg inn i verten. Bakterien formerer seg effektivt i ulike vertsceller, hovedsakelig i makrofager. Det antas at makrofager er hovedreservoaret til *Francisella tularensis*, men bakterien kan også infisere andre vertsceller som epitelceller, hepatocytter, muskelceller og nøytrofile granulocytter (5). De viktigste virulensfaktorene til bakterien er evnen til å overleve og formere seg intracellulært, og den dupliserte *Francisella* patogenisitetsøya. Bakteriegenomet består av en duplisert *Francisella* patogenisitetsøy som er assosiert med bakteriell virulens. Definisjonen på patogenisitetsøy er ansamlinger av gener som gir virulens i bakterier. Disse øyene kan ha mange gener som blant annet lager toksiner, løser opp vev og dermed gir vevsskade (15). Bakteriens evne til å formere seg intracellulært fører til at den har evne til å unnslippe drapsmekanismene i fagocyttene, og bakterien har mulighet til å nå mange av kroppens organer. I tillegg har enkelte antibiotikum vanskeligheter for å fungere intracellulært og dette gjelder eksempelvis betalaktam-antibiotikum, som penicilliner (9).

1.4 PCR

PCR er en sensitiv metode for diagnostikk der nukleinsyrer blir kopiert opp til store mengder, slik at bestemte bakterier og virus kan påvises (16). PCR er en metode som kan benyttes til deteksjon av *Francisella tularensis*.

1.4.1 Konvensjonell PCR

Konvensjonell PCR var den første typen PCR-metodikk som ble beskrevet. Metoden krever et PCR-instrument og består av repeterende sykluser av oppvarming og nedkjøling av en reaksjonsblanding. Blandingen inneholder DNA-templat, DNA-polymerase, primere og nukleotider. Templat-DNA er det DNA-et som tilsvarer målsekvensen. Primere er korte

sekvenser av nukleotider som lokaliserer målsekvensen, og binder seg til denne basert på at primerne er komplementære til målsekvensen. Primere fungerer som startpunkt for DNA-polymerase, som er et enzym som danner nye DNA-tråder som er komplementære til målsekvensen. Hver syklus i PCR-reaksjonen består av de tre trinnene denaturering, annealing og amplifikasjon. Etter hver passerte syklus, øker mengden av målsekvensen eksponentielt. For at PCR-produktet skal bli visualisert, må det utføres en gelelektroforese. En gelelektroforese separerer DNA-produkter basert på deres størrelse og ladning. DNA-molekyler er negativt ladde og vil vandre mot positiv elektrode. De minste fragmentene vil vandre lengst, mens de større fragmentene blir hindret av gelen og vandrer derfor kortest. Etter elektroforesen, må PCR-produktet synliggjøres ved hjelp av en fluorescerende forbindelse. På denne måten er det mulig å se hvor stor den oppkopierte sekvensen er, omtrentlig hvor mye det er av sekvensen og om den rette sekvensen har blitt oppkopiert (17).

1.4.2 Real-time PCR

I Real-time PCR, er det mulig å følge med på dannelsen av PCR-produkt under selve reaksjonen. I motsetning til konvensjonell PCR, der PCR-produktet krever etterarbeid før det kan synliggjøres. Denne prosessen foregår ved hjelp av instrumenter egnet for Real-time PCR, som er utstyrt med en optisk deteksjonsmodul for å måle fluorescenssignalet som genereres under hver amplifikasjonssyklus når fluoroforen binder seg til målsekvensen (18). For å kunne registrere PCR-produktene underveis i reaksjonen er det nødvendig med DNA-prober som inneholder fluorescensmerkede nukleotider, eventuelt fluorokromer som uspesifikt binder seg til dobbelttrådet DNA (19). Det er fluorescens fra disse som brukes til å påvise målsekvensen, der fluorescensen tilsvarer mengde PCR-produkt i PCR-reaksjonen (19).

1.4.3 Primere og prober

Real-Time PCR fører til eksponentiell syntese av en spesifikk DNA-sekvens ved hjelp av primere. Primere er små DNA-fragmenter som er spesialdesignet slik at de er komplementære til deres målsekvenser. Før primere kan binde seg til målsekvensene, må DNA denatureres slik at det blir enkelttrådet. Primerne danner de terminale endene av sekvensen som skal amplifiseres under PCR. For at en amplifikasjon skal finne sted er det nødvendig med primere, da det er plasseringen til disse som bestemmer lengden av PCR-produktet. Grunnet kopiering av både den kodende og den ikke kodende DNA-tråden i prøvemateriale er det

behov for en primer til hver av de to trådene. De to primerne kalles forward og reverse primer. Forward primeren tilhørende kodende tråd i DNA fester seg nærmest startkodonet i målsekvensen, og reverse primer tilhørende ikke kodende DNA-tråd fester seg nærmest stopkodonet i målsekvensen. Under reaksjonsforløpet vil primerne på denne måten bidra til å danne nye kopier av målsekvensen. Primere er mer spesifikt startpunktet for initiering av DNA-syntese, da DNA-polymerase trenger primere for å begynne syntesen av nytt DNA (20).

Prober er i tillegg en viktig del av PCR-reaksjonen, og er DNA-sekvenser som er merket med en fluorofor og quencher. FAM benyttes ofte som fluorofor, og Black Hole Quencher (BHQ) som quencher. Proben er designet slik at den binder seg til de amplifiserte sekvensene, og fører til at det er mulig å måle DNA-mengde i form av intensiteten til fluorescensen som dannes under reaksjonen. Det dannes ingen fluorescens når fluoroforen og quencheren på proben ligger nærme hverandre i løsning, altså før de er bundet til DNA. Det dannes heller ingen fluorescens når proben har bundet seg til templat-DNA. DNA-polymerasen har et enzym som spalter nukleotider en etter en, exonuklease, bundet til seg. Exonukleasen kan spalte av nukleotider fra proben. På denne måten kan fluoroforen og quencheren skilles fra hverandre, og når de ikke er bundet til hverandre vil det dannes fluorescens som kan detekteres (20).

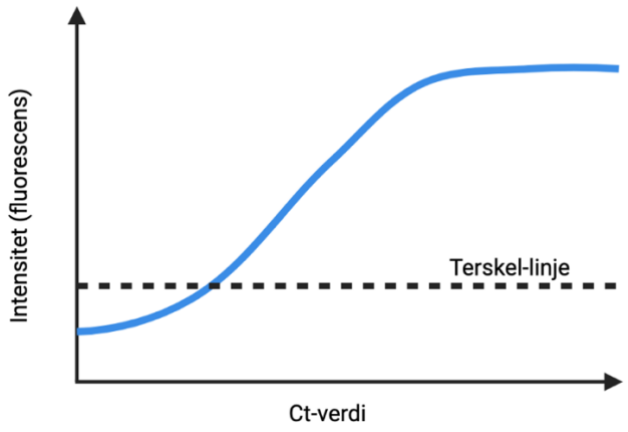
1.4.5 Reaksjonstrinn, sykluser og Ct-verdi

PCR-reaksjonen kan foregå i 2 trinn som gjentas i sykluser, og kalles totrinns-PCR. Totrinns-PCR består av denaturering etterfulgt av et kombinert annealing- og amplifikasjonstrinn. For hver gang denaturering, annealing og amplifikasjon induseres, starter også en ny syklus. Denatureringen innebærer at dobbelttrådet DNA blir til enkelttrådet DNA ved høy temperatur. Primere kan ikke binde seg til DNA med mindre det er enkelttrådet. Annealing betyr at primere finner sin plass på DNA som skal kopieres ved at temperaturen senkes. Amplifikasjon tilsvarer selve dannelsen av ny DNA-tråd ut ifra primere med templat-DNA som mal.

De to innledende trinnene i PCR-reaksjonen gir optimale betingelser for at reaksjonen skal finne sted, samt denaturering av hele genomet. Disse trinnene gjentas ikke. De neste trinnene er derimot trinn som gjentas i sykluser, slik at det kan dannes nok kopier av målsekvensen for at deteksjon skal finne sted. Etter at målsekvensen er kopiert, varmes reaksjonen opp igjen

slik at oppkopiert dobbelttrådet DNA deles i enkelttråder og hele prosessen gjentas. For hver syklus som går, vil mengden DNA-kopier dobles og mengden av målsekvensen øker eksponentielt. Reaksjonen varmes opp igjen ved hjelp av PCR-instrumenter som programmeres slik at temperaturen og varigheten av hvert trinn kan justeres (16). Reaksjonen gjentas vanligvis i omtrent 25-35 sykluser.

Fluorescens som blir dannet under en PCR-reaksjon kan plottes inn i en amplifikasjonsgraf på PCR-instrumentet, med Ct-verdi på X-aksen og fluorescensen på Y-aksen (figur 1). Denne grafen har en terskel-linje som indikerer bakgrunnsfluorescens. Når fluorescensen øker over en gitt terskelverdi, kan avlesning av resultat i Real-time PCR finne sted. Denne verdien gjenspeiler syklusnummeret der fluorescensen som dannes i PCR-reaksjonen er større enn bakgrunnsfluorescensen. Syklusen der fluorescensen overgår terskelen kalles Ct-verdi, og er der målsekvensen er detekterbar i prøven (21). Dersom pasientprøven inneholder mange kopier av målsekvensen, trenger ikke PCR-instrumentet å analysere mange sykluser før målsekvensen kan påvises i prøven. Ct-verdien blir dermed lav. Om pasientprøven derimot inneholder få kopier av målsekvensen, tar det lengre tid før målsekvensen kan detekteres og det kreves flere sykluser. Ct-verdien blir dermed høyere.



Figur 1: Figuren viser et eksempel på en PCR-amplifikasjonsgraf med beskrivelse av aksene. Figuren ble laget ved hjelp av BioRender.

1.5 Formålet med oppgaven

Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi ved St. Olavs Hospital er nasjonalt referanselaboratorium for diagnostikk av *Francisella tularensis* i Norge. Av den grunn mottar avdelingen pasientprøver og bakteriestammer fra hele landet. Det benyttes ulike analysemetoder for å undersøke bakteriestammene, slik som dyrkning, PCR-metodikk og serologi. Det er viktig at disse metodene har best mulig kvalitet og sensitivitet for å unngå feilaktige resultater. Denne bacheloroppgaven undersøker muligheter for å etablere en mer sensitiv PCR-diagnostikk for påvisning av *Francisella tularensis*. Dette fordi avdelingens eksisterende metode for deteksjon av bakterien har forbedringspotensial. For å undersøke om sensitiviteten til deteksjonen av bakterien kan forbedres, blir 3 alternative PCR-metoder basert på utvalgte og publiserte primere og prober utprøvd.

Tabell 4: Tabellen viser en oversikt over utvalgte sett med primere og prober som skal utprøves basert på tidligere forskning. Kolonne 1 viser navn på sett med primere og prober. Kolonne 2 viser hvilke underarter de ulike settene kan detektere, basert på publiserte artikler i kolonne 3.

Sett med primere og prober til utprøving	Underarter av *Francisella* som kan detekteres (basert på tidligere forskning, artikler i kolonne til høyre)	Utprøves basert på artikkel
4Pan1	*Tularensis, holarctica, mediasiatica* og *novicida*	(1)
B2	*Holarctica*	(1)
ISFtu	*Tularensis, holarctica, novicida, mediasiatica* og *philomiragia*	(2)

1.6 Problemstilling

Er det mulig å forbedre sensitiviteten til diagnostikken av *Francisella tularensis* ved å ta i bruk nye sett med primere og prober?

2.0 Materiale og metode

2.1 Materiale

Følgende kapittel presenterer materiale som ble undersøkt i forbindelse med dette prosjektet. Det ble benyttet prøvemateriale, kontrollmateriale, primere og prober, paneler til spesifisitet, *Francisella*-stammer, samt reagenser.

2.1.1 Prøvemateriale

Prøvematerialet som ble benyttet var eluat fra *Francisella tularensis*-positive pasientprøver og eluat fra oppvekstkulturer. Disse var lagret ved -20 og -80ºC på Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Seksjon diagnostikk ved St. Olavs Hospital. Det ble tatt i bruk 19 oppvekstkulturer og 50 pasientprøver. En pasientprøve defineres som en penselprøve fra eksempelvis sår eller hals, og oppvekstkultur som en utsådd og dyrket prøve. Ettersom oppvekstkulturer dyrkes opp, er det flere bakterier til stede sammenliknet med en pasientprøve.

2.1.2 Kontrollmateriale

Kontrollmaterialet som ble benyttet var en intern kvalitetskontroll bestående av ekstrahert DNA fra klinisk isolat av en *Francisella tularensis* stamme med stammenummer CCUG 17299. Dette var en stamme bestilt fra den eksterne leverandøren Culture Collection University Of Gothenburg. Stammen ble brukt som positiv kontroll, og betegnes som dette videre i oppgaven. Ved avdelingen ble kontrollen fortynnet med NUCLISENS® easyMAG® Extraction Buffer 3 (bioMérieux) slik at Ct-verdien ble mellom 24 og 28. Hensikten med dette var å sikre deteksjon av svake positive prøver ved bruk av avdelingens Real-time PCR-instrument. Det skapte en sikkerhet for deteksjonen da 24-28 lå mellom det svake og sterke området av Ct-verdier som kunne oppnås. Basert på dette var en Ct-verdi på 24-28 for positiv kontroll ideell, noe som ble besluttet av avdelingen. I tillegg ville en kontroll med Ct-verdi 24-28 holde seg stabil ved oppbevaring sammenlignet med kontrollmateriale som ga høyere Ct-verdier. Det ble i forbindelse med dette prosjektet benyttet ulike fortynninger av positiv kontroll, som ga ulike Ct-verdier.

Det ble også anvendt AMPLIRUN® FRANCISELLA TULARENSIS DNA CONTROL (Vircell Microbiologists) til bestemmelse av deteksjonsgrense. Vircell-kontrollen bestod av 2

beholdere med innhold av DNA fra *Francisella tularensis*, samt DNase og RNase fritt vann. Konsentrasjonen til kontrollen var oppgitt til 14000 kopier av bakteriegenet per µL. Siden det ble benyttet 5 µL prøvemateriale per PCR-reaksjon, ble 14000 multiplisert med 5, og Vircell kontrollen hadde da et innhold på 70000 kopier av bakteriegenet per PCR-reaksjon.

Molecular Grade Water (MGW) (GBiosciences) ble benyttet som negativ kontroll.

2.1.3 Primere og prober

PCR-primere og -prober benyttet under prosjektet ble valgt basert på tidligere forskning. Primere og prober beskrevet i de publiserte artiklene «Differentiation of *Francisella tularensis* Subspecies and Subtypes» (1), og «Development of a Multitarget Real-Time TaqMan PCR Assay for Enhanced Detection of *Francisella tularensis* in Complex Specimens» (2), er brukt som utgangspunkt for valget av 3 nye sett med primere og prober. De publiserte artiklene beskriver mulighetene ved å ta i bruk 4Pan1, B2 og ISFtu til deteksjon av *Francisella tularensis*.

Primere og prober for 4Pan1, B2 og ISFtu ble bestilt fra selskapet TIB MOLBIOL, og ble mottatt som tørrstoff. Disse ble fortynnet til 100 µM med MGW. Videre ble fortynningene igjen fortynnet til bruksfortynninger med konsentrasjonene 12 µM for primere og 8 µM for prober med MGW. Dette ble utført av spesialbioingeniør og fagansvarlig bioingeniør ved avdelingen.

Tabell 53: Tabellen viser en oversikt over primere og probe for den eksisterende metoden som benyttes i rutinearbeidet ved avdelingen. Type primer og probe, samt baserekkefølgen til disse kan leses av i kolonne 2 og 3.

Navn	Primer/probe	Baserekkefølge (5' til 3')
FTUP_F	Forward primer	GTT AGG TGG CTC TGA TGA TG
FTUP_R	Reverse primer	CTT ACA CTT CCT TGT GGG TTA
FTUP_TM	TaqMan™ probe	CTA CTA CTG AGC AAG CTG CTG CTG

Tabell 64: Tabellen viser en oversikt over primere og probe for 4Pan1. Type primer og probe, samt baserekkefølgen til disse kan leses av i kolonne 2 og 3.

Navn	Primer/probe	Baserekkefølge (5' til 3')
4Pan1_F	Forward primer	5' – CAY CCT AGA CTA TTC TAT ACT TAC
4Pan1_R	Reverse primer	5' – GTA AAT CTA TTT ACT TGA AAC ATC TGC
4Pan1_TM	TaqMan™ probe	5' – 6FAM-CCG TAC CAA GAT CAA ACA AAT ATA CC--BHQ1

Tabell 75: Tabellen viser en oversikt over primere og probe for B2. Type primer og probe, samt baserekkefølgen til disse kan leses av i kolonne 2 og 3.

Navn	Primer/probe	Baserekkefølge (5' til 3')
B2_F	Forward primer	5' – CCT ATC CAA TAC TCC GAG TTA GT
B2_R	Reverse primer	5' – AAA TCA AAA GAA GAG TTA AAA CAA GC
B2_TM	TaqMan™ probe	5' – 6FAM-CTC TGG CCA GTT ATT TTT ATC AAA GCC AG—BHQ1

Tabell 86: Tabellen viser en oversikt over primere og probe for ISFtu. Type primer og probe, samt baserekkefølgen til disse kan leses av i kolonne 2 og 3.

Navn	Primer/probe	Baserekkefølge (5' til 3')
ISFtu2F	Forward primer	5' - TTGGTAGATCAGTTGGTGGGATAAC
ISFtu2R	Reverse primer	5' - TGAGTTTTACCTTCTGACAACAATATTTC
ISFtu2P	TaqMan™ probe	5' – 6FAM-AAAATCCATGCTATGACTGATGCTTTAGGTAATCCA—BHQ1

2.1.4 Spesifisitet

Til analyse av spesifisitet ble det benyttet generelt bakteriepanel og luftveispanel. Panelene var satt sammen av 23 ulike bakteriearter som kunne opptre som både normal- og patogenflora i pasientprøver. Valg av bakteriearter som inngår i panelene ble utført av en spesialbioingeniør ved avdelingen. Bakterieartene ble bestilt av eksterne leverandører. Tabell 9 nedenfor viser en oversikt over bakteriearter i panelene og tilhørende stammenummer. Stammenummer merket med «CCUG» ble bestilt fra leverandøren Culture Collection University Of Gothenburg, og stammenummer merket med «MBC» fra Vircell Microbiologists.

Tabell 97: Tabellen viser en oversikt over generelt bakteriepanel og luftveispanel som ble benyttet til spesifisitetstesting av eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Bakterieart kan leses av i kolonnen til venstre, og stammenummeret kan leses av i kolonnen til høyre.

Generelt bakteriepanel	
Bakterieart	**Stammenummer**
Streptococcus pyogenes	CCUG 15915
Streptococcus agalacticae	CCUG 33061
Haemophilus influenzae	CCUG 4208
Candida albicans	CCUG 33775
Streptococcus pneumoniae	CCUG 19915
Escherichia coli	CCUG 33638
Klebsiella pneumoniae	CCUG 37382
Enterobacter cloacae	CCUG 56233
Pseudomonas aeruginosa	CCUG 6323T
Enterococcus faecalis	CCUG 17619
Streptococcus anginosus	CCUG 9997
Staphylococcus epidermidis	CCUG 223
Neisseria meningitidis (gr.B)	CCUG 23118
Mycobacterium tuberculosis	CCUG 23101
Legionella pneumophila	CCUG 25177
Bacillus cereus	CCUG 33058
Clostridium perfringens	CCUG 36925
Fusobacterium necrophorum	CCUG 1795T
Streptococcus pyogenes	CCUG 9994T
Luftveispanel	
Bakterieart	**Stammenummer**
Mycoplasma pneumoniae	CCUG 33638
Chlamydia pneumoniae	MBC011
Bordetella pertussis	MBC008
Moraxella catarrhalis	CCUG 353

2.1.5 Analyse av bakteriestammer

Til analyse av bakteriestammer ble det benyttet ulike stammer av *Francisella*. Disse stammene var lagret ved avdelingen, og ble utsådd av en bioingeniør på tuberkulose-laboratoriet, som er et P3 laboratorium. Stammene ble videre inaktivert av bioingeniøren slik at DNA ekstraksjon og PCR-analyse kunne utføres. Samtlige underarter av *Francisella tularensis*, altså *holarctica*, *tularensis*, *novicida* og *mediasiatica* ble benyttet, inkludert en vaksinestamme av *holarctica*. En stamme av *Francisella philomiragia* ble også tatt i bruk. Stammenummer merket med «CCUG» ble bestilt fra leverandøren Culture Collection University Of Gothenburg, og stammenummer merket med «ATCC» fra American Type Culture Collection.

Tabell 108: Tabellen viser en oversikt over prøvemateriale til analyse av ulike Francisella-stammer. Kolonnen til venstre viser navn på Francisella- stamme, og kolonnen til høyre gir informasjon om stammenummeret til de tilhørende stammene.

Navn på Francisella-stamme	Stammenummer
Francisella tularensis holarctica	Vaksinestamme
Francisella tularensis mediasiatica	Ikke oppgitt
Francisella tularensis novicida	ATCC 15482
Francisella tularensis holarctica	CCUG 17299
Francisella tularensis tularensis	CCUG 2112
Francisella philomiragia	ATCC 25015

2.1.6 Reagenser

PerfeCTa™ Multiplex qPCR SuperMix (Quanta BioSciences) ble benyttet til prosjektet. Reagenset er en reaksjonsbuffer som består av optimale konsentrasjoner av $MgCl_2$, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), AccuStart Taq DNA-polymerase og stabilisatorer. PerfeCTa™ Multiplex qPCR SuperMix ble tatt i bruk ved tillaging av PCR-miks. Dette er reaksjonsmiksen som trengs for å utføre en PCR-analyse.

Det ble videre benyttet NUCLISENS® easyMAG® Extraction Buffer 3 (bioMérieux). Dette er en elueringsbuffer som ble brukt til fortynning av Vircell-kontroll.

MGW ble benyttet til fortynning ved tillaging av fortynningsrekker, samt ved tillaging av PCR-miks.

2.2 Metode

Følgende kapittel beskriver metoder som har blitt anvendt i forbindelse med oppgaven. Ved hjelp av PCR-analyse har det blitt utført analyse av effektivitet, gradient, optimalisering av primer og probe, spesifisitet, bakteriestammer, deteksjonsgrense og pasientmateriale for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu.

2.2.1 Tillaging av PCR-miks

Det kreves PCR-miks, som inneholder primere, prober, DNA-polymerase og $MgCl_2$, for å utføre en PCR-analyse. Eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu har ulike primere og prober, og det må derfor lages egen miks til hver av de nevnte metodene. Miksene tillages på tilsvarende måte.

Tillaging av PCR-miks ble utført ved hjelp av PerfeCTa™ Multiplex qPCR SuperMix, forward primer, reverse primer, probe og MGW. Mengde PerfeCTa™ Multiplex qPCR SuperMix, forward primer, reverse primer, probe og MGW som ble tilsatt var avhengig av hvor mye PCR-miks som skulle lages og konsentrasjonen som ble benyttet av primere og prober.

Det har blitt undersøkt ulike konsentrasjoner av primere og prober for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu under prosjektet. Hver utprøvde miks med sin unike konsentrasjon av primere og probe ble nummerert fra 1-9. Miks 5 tilsvarer primer- og probekonsentrasjon for eksisterende metode.

*Tabell 11: Tabellen viser hvordan miks 1-9 har blitt laget. Anvendt primer- og probekonsentrasjon kan leses av i kolonne 2 og 3. Kolonne 4-8 viser mengde brukt av de ulike komponentene i µL. Mengden PerfeCTa™ Multiplex qPCR SuperMix (Quanta BioSciences), forward primer, reverse primer, probe og MGW i tabellen gir nok PCR-miks til 5 prøver. Når det skulle lages miks til mer enn 5 prøver, ble alle volumene multiplisert. Da det eksempelvis ble laget miks til 70 prøver, ble volumene multiplisert med 14 (14*5=70).*

Miks	Primer-konsentrasjon (nM)	Probe-konsentrasjon (nM)	PerfeCTa™ Multiplex qPCR SuperMix (Quanta BioSciences), (µL)	Forward primer (µL)	Reverse primer (µL)	Probe (µL)	MGW (GBiosciences) (µL)
1	100	100	50	1,50	1,50	1,25	20,75
2	300	100	50	2,50	2,50	1,25	18,75
3	500	100	50	4,00	4,00	1,25	15,75
4	100	200	50	1,50	1,50	2,50	19,50
5	300	200	50	2,50	2,50	2,50	17,50
6	500	200	50	4,00	4,00	2,50	14,5
7	100	250	50	1,50	1,50	3,00	19,00
8	300	250	50	2,50	2,50	3,00	17,00
9	500	250	50	4,00	4,00	3,00	14,00

2.2.2. PCR-analyse

PCR-analyse ble utført ved hjelp av instrumentet CFX96™ Real-Time System (BIORAD, USA, California). Programmene som ble benyttet på instrumentet var Perfecta 2-step TM 55 og Gradient 50-60 Perfecta 2-step. Disse programmene ble brukt til utprøvingen av de nye PCR-metodene og eksisterende metode for å påvise *Francisella tularensis*. FAM ble benyttet som fluorofor.

2.2.3 Prøvepreparering

Tillaget PCR-miks, samt prøvemateriale og kontrollmateriale, ble tilsatt i PCR Plate, 96-well, low profile, skirted (Thermo Scientific), omtales videre som PCR-brett, før analyse. PCR-miks ble pipettert i brønnene først. Det ble tilsatt PCR-miks i like mange brønner som prøver som skulle pipetteres i brønnene, inkludert en brønn til positiv kontroll og en brønn til negativ kontroll. Etter at PCR-miks ble tilsatt, ble prøvemateriale og kontrollmateriale tilsatt i sine respektive brønner, der PCR-miks allerede var tilsatt.

Etter tilsats av PCR-miks, samt prøvemateriale eller kontrollmateriale, ble brønnene med innhold forseglet ved hjelp av Optically clear flat 8 Cap Strips (Thermo Scientific). PCR-brett ble deretter sentrifugert ved 750 g i omtrent 20 sekunder på sentrifugen Eppendorf Centrifuge 5804 R (VWR International, Norge, Oslo).

2.2.4 Effektivitet

En analyse av metodenes effektivitet ble utført for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Dette ble gjennomført på PCR-instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet var Perfecta 2-Step TM55, med FAM som fluorofor. Det ble tatt i bruk PCR-miks for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Positiv kontroll ble brukt som prøvemateriale og MGW som negativ kontroll. Det ble laget en ti-folds fortynningsrekke med totalt 5 løsninger, der første løsning var positiv kontroll med fortynning på $1:10^3$ eller $1:10^5$. Følgende trinn ble utført på identisk vis for de fire metodene. PCR-miks og kontrollmateriale ble pipettert i reaksjonsbrønner på et PCR-brett. Hver fortynning av positiv kontroll ble tilsatt som paralleller i tripletter. Parallellene ble definert som standarder på instrumentet etter at prøvene var satt på, slik at det ble mulig å lese av en standardkurve etter endt analyse. Ettersom det ble benyttet 5 ulike fortynninger, ble det definert 5 standarder på instrumentet.

2.2.5 Gradientanalyse

En gradientanalyse ble utført for 4Pan1, B2 og ISFtu. Dette ble gjennomført på PCR-instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet var Gradient 50-60 Perfecta 2-Step, med FAM som fluorofor. Gradient 50-60 Perfecta 2-Step anvendte temperaturer mellom 50 og 60°C. Det ble benyttet PCR-miks for 4Pan1, B2 og ISFtu. Positiv kontroll med fortynning $1:10^4$ ble tatt i bruk som prøvemateriale og MGW som negativ kontroll. PCR-miks og kontrollmateriale ble pipettert i reaksjonsbrønner på et PCR-brett.

2.2.6 Optimalisering av primere og probe

En analyse av optimalisering av primer og probe ble utført for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Dette ble gjennomført på PCR-instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet var Perfecta 2-Step TM55, med FAM som fluorofor. Det ble tatt i bruk PCR-miks for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Positiv kontroll ble brukt som prøvemateriale og MGW som negativ kontroll.

Det ble laget 9 ulike mikser til eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu, som inneholdt ulike konsentrasjoner av primere og probe (tabell 11). Alle miksene ble undersøkt med 7 ulike fortynninger av den positive kontrollen. Fortynningene var tillaget som ti-fold fortynninger hvor startkonsentrasjonen var 1:10, og konsentrasjonen minket med 10 x frem til siste fortynning som var $1:10^7$. Disse fortynningene ble videre benyttet til alle 9 miksene tilhørende eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. PCR-miks og kontrollmateriale ble pipettert i reaksjonsbrønner på et PCR-brett.

2.2.7 Spesifisitetstesting

En analyse av spesifisitet ble utført for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Dette ble gjennomført på PCR-instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet var Perfecta 2-Step TM55, med FAM som fluorofor. Det ble tatt i bruk PCR-miks for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Prøvematerialet som ble anvendt var generelt bakteriepanel og luftveispanel. Positiv kontroll med fortynning $1:10^5$ og MGW som negativ kontroll ble benyttet. PCR-miks, prøvemateriale og kontrollmateriale ble pipettert i reaksjonsbrønner på et PCR-brett.

2.2.8 Analyse av bakteriestammer

En analyse av bakteriestammer ble utført for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Dette ble utført på PCR-instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet var Perfecta 2-Step TM55, med FAM som fluorofor. Det ble utsådd ulike stammer av *Francisella* (tabell 10) til oppvekst av en bioingeniør på tuberkulose-laboratoriet ved avdelingen slik at stammene som vokste opp videre kunne bli inaktivert og analysert. Det ble anvendt PCR-miks for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Prøvematerialet som ble tatt i bruk var ulike *Francisella*-stammer. Positiv kontroll med fortynning $1:10^5$ og MGW som negativ kontroll ble benyttet. PCR-miks, prøvemateriale og kontrollmateriale ble pipettert i reaksjonsbrønner på et PCR-brett.

2.2.9 Deteksjonsgrense

En analyse av deteksjonsgrense ble utført for metoden ISFtu. Det ble gjennomført på instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet var Perfecta 2-step TM55, med FAM som fluorofor. Det ble tatt i bruk PCR-miks for 4Pan1, B2 og ISFtu. Prøvematerialet som ble anvendt var en kjøpt Vircell-kontroll med kjent konsentrasjon. MGW

ble brukt som negativ kontroll. Bestemmelsen ble gjort ved 3 separate analyser på instrumentet.

Vircell-kontrollen ble først fortynnet 1:10, den hadde da et innhold på 7000 kopier av bakteriegenet per PCR-reaksjon. Med utgangspunkt i disse opplysningene, ble det satt opp en analyse av Vircell-kontrollen med PCR-miks for både 4Pan1, B2 og ISFtu for å bestemme Ct-verdier ved fortynnet Vircell-kontroll på 1:10 og $1:10^2$. PCR-miks og kontrollmateriale ble pipettert i reaksjonsbrønner på et PCR-brett.

Det ble laget en ti-folds fortynningsrekke ved bruk av Vircell-kontroll med fortynninger på 1:10, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$ og $1:10^6$. Det ble benyttet PCR-miks for ISFtu. Hver fortynning av Vircell-kontroll ble tilsatt som paralleller i tripletter. PCR-miks og kontrollmateriale ble pipettert i reaksjonsbrønner på et PCR-brett.

Avslutningsvis ble det laget en to-folds fortynningsrekke basert på fortynningen på $1:10^3$ fra ti-folds fortynningsrekken av Vircell-kontrollen. Det ble til sammen laget 8 fortynninger, der den første var $1:10^3$, og hadde et innhold av 70 kopier av bakteriegenet per PCR-reaksjon. De videre fortynningene hadde et innhold av henholdsvis 35.00, 17.5, 8.75, 4.38, 2.19, 1.09 og 0.55 kopier av bakteriegenet per PCR-reaksjon. Det ble benyttet PCR-miks for ISFtu. PCR-miks og kontrollmateriale ble pipettert i reaksjonsbrønner på et PCR-brett.

2.2.10 Analyse av prøvemateriale

En analyse av prøvemateriale ble utført for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Dette ble gjennomført på PCR-instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet var Perfecta 2-Step TM55, med FAM som fluorofor. Det ble tatt i bruk PCR-miks for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Eluat fra *Francisella*-positive pasientprøver og eluat fra oppvekstkulturer ble brukt som prøvemateriale. Positiv kontroll med fortynning $1:10^5$ og MGW som negativ kontroll ble benyttet. PCR-miks og kontrollmateriale ble pipettert i reaksjonsbrønner på et PCR-brett.

3. 0 Resultater

I følgende kapittel presenteres de sentrale resultatene som har blitt oppnådd ved analyse av effektivitet, gradient, optimalisering av primer og probe, spesifisitet, bakteriestammer, deteksjonsgrense og prøvemateriale. Dette ble utført for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu i forbindelse med deteksjon av *Francisella tularensis*.

3.1 Effektivitet

En analyse av alle metodenes effektivitet ble utført. Formålet med dette var å undersøke om metodene hadde oppnådd den ønskede effektiviteten mellom 90 og 110%. Det er viktig å undersøke effektiviteten til en PCR-metode fordi det er mulig å justere flere ulike faktorer når det blir jobbet med optimalisering av en PCR-metode. Dette vil kunne gjenspeiles i effektivitetsresultatet, og det kan oppdages hvorvidt justeringene har vært effektive.

Effektiviteten ble bestemt ved å utføre en PCR-analyse på et utvalg av 5 ulike fortynninger av positiv kontroll. Disse ble analysert i tripletter med fortynninger på $1:10^3$ eller $1:10^5$ som utgangspunkt. Det ble satt opp en ti-folds fortynningsrekke, der hver fortynning optimalt skulle ligge 3,32 fra hverandre i Ct-verdi etter endt analyse, noe som var basert på 100% effektivitet i en PCR-reaksjon ($2^{3,32} = 10$). MGW ble benyttet som negativ kontroll. Analysen ble utført på instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet var Perfecta 2-step TM55, med FAM som fluorofor. En standardkurve ble laget ved at parallellene ble definert som standarder på instrumentet.

Effektiviteten til eksisterende metode, 4Pan1 og ISFtu er innenfor det optimale området for effektivitet (vedlegg 1), og det kan konkluderes med at metodene har god kvalitet. Analyse av effektivitet for eksisterende metode ble utført av fagansvarlig bioingeniør ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Seksjon diagnostikk ved St. Olavs Hospital. Effektiviteten til B2 var rett over det optimale området for effektivitet (110,5%), men det kan til tross for dette konkluderes med at metoden har god kvalitet.

3.2 Gradientanalyse

En analyse av gradient ble utført for metodene 4Pan1, B2 og ISFtu. Hensikten med dette var å optimalisere annealingtemperaturen til metodene ved PCR-reaksjon. Temperaturen har stor betydning for hvordan primerne binder seg til DNA-tråden og dermed sluttproduktet av PCR-reaksjonen.

Annealingtemperaturen ble bestemt ved å utføre en PCR-analyse på 8 paralleller av positiv kontroll, der det ble benyttet ulike temperaturer mellom 50 og 60ºC for analyse av hver parallell. MGW ble anvendt som negativ kontroll. Analysen ble utført på instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet var Gradient 50-60 Perfecta 2-step, med FAM som fluorofor.

En annealingtemperatur på 55ºC ble først og fremst utprøvd for alle metodene, men det var ønskelig å undersøke om denne var hensiktsmessig å endre for å optimalisere reaksjonsbetingelsene. Det ble derimot bestemt å beholde 55ºC som annealingtemperatur for alle metodene. Det ble ikke benyttet 55ºC som en egen temperatur ved analysen, men 55ºC ligger mellom 53,9 og 56,3ºC, og disse to temperaturene ga kurver med et optimalt utseende, og lavere Ct-verdier enn ved høyere temperaturer (vedlegg 2). Derfor ble det valgt å beholde 55ºC som annealingtemperatur for samtlige metoder.

3.3 Optimalisering av primer og probe

En optimalisering av primer og probe ble utført for alle metodene (vedlegg 3). Hensikten med analysen var å avdekke den beste konsentrasjonen av primer og probe for metodene, og på denne måten finne den PCR-miksen som ga høyest intensitet og best utseende på PCR-kurvene.

Optimalisering av primer og probe ble gjort ved tillaging av 9 ulike PCR-mikser for hver av metodene, der hver miks hadde ulik konsentrasjon av primer og probe (tabell 11). PCR-miksene ble analysert med 7 ulike fortynninger av positiv kontroll ved hjelp av PCR-analyse. MGW ble benyttet som negativ kontroll. Analysen ble utført på instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet var Perfecta 2-step TM55, med FAM som fluorofor.

Resultatet av intensitet for eksisterende metode ved de ulike konsentrasjonene av primer og probe, viste at høyeste intensitet ble målt til 2500 relative fluorescence units (RFU) ved bruk av miks 6 og 9. Den laveste intensiteten for denne metoden ble derimot registrert til 900 RFU ved bruk av miks 1. Intensiteten for miks 5 hadde en verdi på 2000 RFU, i tillegg hadde tilhørende kurve det mest optimale utseendet. For 4Pan1 ga miks 8 høyest intensitet, målt til 1600 RFU. Miks 5 ga også relativt høy intensitet, og PCR-kurvenes utseende ble mest optimal ved bruk av denne. Resultatene viste at miks 8 og 9 ga høyest intensitet ved bruk av metoden B2, og PCR-kurvenes utseende ble mest optimale ved bruk av miks 9. De best mulige PCR-miksene for ISFtu var miks 3, 6 og 9. Miks 3 hadde en intensitet på 500 RFU, miks 6 på 1000 RFU, og miks 9 på 900 RFU. Det var miks 3 og 9 som ga den mest ønskelige formen på PCR-kurvene.

Det benyttes samme konsentrasjoner av primer og probe for eksisterende metode i rutinearbeidet på avdelingen som tillaget PCR-miks 5 inneholder. Det ble valgt å beholde PCR-miks 5 for eksisterende metode. I tillegg ble det besluttet å benytte PCR-miks 5 videre for 4Pan1. PCR-miks 9 ble videre valgt for B2 og ISFtu. Valg av PCR-miks er basert på PCR-kurvens utseende og intensitet.

3.4 Spesifisitet

En analyse av alle metodenes spesifisitet ble utført. Formålet med analysen var å undersøke om noen bakteriearter som opptrer som både normal- og patogenflora i kroppen ville interferere med primere og prober som benyttes for deteksjonen av *Francisella tularensis*.

Det ble benyttet generelt bakteriepanel og luftveispanel som prøvemateriale. Analysen ble utført på instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet var Perfecta 2-step TM55, med FAM som fluorofor.

Ingen av de benyttede bakterieartene interfererte med primere og prober for eksisterende metode, 4Pan1, B2 eller ISFtu, og det kan konkluderes med at alle metodene har god spesifisitet.

3.5 Analyse av bakteriestammer

En analyse av bakteriestammer ble utført. Formålet med dette var å undersøke hvilke *Francisella*-arter og -subspecies som kunne detekteres ved hjelp av eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Til å begynne med i forbindelse med denne oppgaven, var det spørsmål om den eksisterende metoden kunne detektere alle fire underarter av *Francisella tularensis*. Det var derfor interessant med en analyse for å undersøke hvilke bakteriestammer metoden ville detektere.

Analyse av bakteriestammer ble gjennomført ved å analysere 6 bakteriestammer. Analysen ble utført på instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet var Perfecta 2-step TM55, med FAM som fluorofor.

Resultatene viste at eksisterende metode, vist i vedlegg 4, var sensitiv for alle fire underarter av *Francisella tularensis*, altså *tularensis, holarctica, novicida og mediasiatica.* Ved hjelp av 4Pan1 kunne også underartene *holarctica, tularensis, novicida* og *mediasiatica* detekteres. B2 detekterte kun underarten *holarctica*. Bruk av ISFtu gjorde det mulig å detektere alle underartene av *Francisella tularensis*, i tillegg til *Francisella philomiragia.* Det kan konkluderes med at B2 er spesifikk for underarten *holarctica*, samtidig som ISFtu har best evne til å detektere de ulike *Francisella*-stammene av alle metodene.

3.6 Deteksjonsgrense

En analyse av deteksjonsgrense ble utført for metoden ISFtu. Analyse av deteksjonsgrense er en viktig og tidkrevende analyse for å avdekke hvor lav konsentrasjon av bakterien en kan ha, før analysen resulterer i et negativt resultat. Hensikten med analysen var å finne den laveste konsentrasjonen av *Francisella tularensis* som kunne detekteres ved en PCR-analyse. Denne analysen ble ikke utført for eksisterende metode, da analysen allerede var utført ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Seksjon diagnostikk ved St. Olavs hospital. Resultatet ble oppgitt til 42 kopier per PCR-reaksjon. Gjennom en eliminasjonsprosess, ble det besluttet å ikke gå videre med 4Pan1 og B2, og fullstendig bestemmelse av deteksjonsgrense ble derfor ikke utført for disse metodene.

Bestemmelse av deteksjonsgrense ble gjort for ISFtu ved utførelse av en PCR-analyse. Det ble laget fortynningsrekker og analysert flere paralleller av hver fortynning. Prøvematerialet

som ble benyttet var Vircell-kontroll med kjent konsentrasjon. Analysen ble utført på instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet er Perfecta 2-step TM55, med FAM som fluorofor. Deteksjonsgrensen ble satt til å være der 95% av parallellene fremdeles var positive ved PCR-analyse.

Alle paralleller ble positive ved analyse av den siste fortynningen i fortynningsrekken, som hadde et innhold på 0,55 kopier av bakteriegenet per PCR-reaksjon (vedlegg 5). Deteksjonsgrensen til ISFtu ble derfor bestemt til <0,55 kopier per PCR-reaksjon.

3.7 Analyse av prøvemateriale

En analyse av prøvemateriale ble utført for alle metodene. Hensikten med analyse av prøvemateriale var å sammenligne metodenes Ct-verdier og videre undersøke deres sensitivitet. Ønskelig resultat var at alt prøvemateriale skulle gi positivt resultat ved bruk av alle metodene.

Prøvemateriale ble analysert ved å utføre en PCR-analyse. Det ble utført analyse av prøvemateriale av eluat fra *Francisella tularensis* positive pasientprøver og eluat fra oppvekstkulturer. Analysen ble utført på instrumentet CFX96™ Real-Time System. Programmet som ble benyttet var Perfecta 2-step TM55, med FAM som fluorofor.

Ved bruk av eksisterende metode til analyse av prøvemateriale ble 3 pasientprøver negative ved PCR-reaksjon. Etter repetisjon ble den ene prøven positiv. Dette er ikke et optimalt resultat, da alt prøvemateriale var forventet å gi et positivt resultat. Alt prøvemateriale ble positivt ved bruk av 4Pan1 som metode. Både B2 og ISFtu ga negativt resultat for 1 prøve, men resterende prøver ble imidlertid positive for begge metodene. Det kan videre konkluderes med at ISFtu ga de laveste Ct-verdiene sammenliknet med de øvrige metodene, og 4Pan1 ga de nest laveste Ct-verdiene. B2 og eksisterende metode ga omtrent de samme Ct-verdiene. For å tydeliggjøre de viktigste funnene, ble det beregnet gjennomsnitt av Ct-verdier fra analyse av prøvemateriale for hver av metodene. Beregningene (vedlegg 6) viste at ISFtu ga omtrent 4-5 lavere Ct-verdier sammenliknet med de resterende metodene. Dette kan være en indikasjon på at ISFtu er mer sensitiv enn eksisterende metode, 4Pan1 og B2.

4.0 Diskusjon

I følgende kapittel diskuteres de betydningsfulle resultatene og funnene fra PCR-analyse av effektivitet, gradient, optimalisering av primer og probe, bakteriestammer, deteksjonsgrense og prøvemateriale for alle metodene.

4.1 Effektivitet

Resultatene viste at effektiviteten til B2 havnet rett utenfor det optimale området for effektivitet. Ettersom effektiviteten ligger på grensen av dette området, ble resultatet ansett som godt nok i forbindelse med prosjektet. Det hadde likevel vært gunstig å utføre analysen på nytt for å forsøke å oppnå en effektivitet innenfor det optimale området. En ny analyse av effektivitet for B2 bør utføres ved avdelingen ved en senere anledning hvis metoden skal tas i bruk i rutinearbeidet. Dersom effektiviteten havner utenfor det optimale området ved repetisjon av analysen, bør en endring i reaksjonsbetingelsene vurderes. Dette kan være endringer av primer- og probekonsentrasjon eller en justering av annealingtemperatur.

4.2 Gradientanalyse

Resultatene fra gradientanalysen viser at en annealingtemperatur på 55ºC er mest gunstig for alle utprøvde metoder. Det å beholde 55ºC som temperatur er en fordel basert på at det er ved denne temperaturen PCR-kurven ser best ut. Av praktiske årsaker for avdelingen, er det også gunstig å beholde 55ºC, da flere andre programmer i rutinen benytter denne temperaturen. Det gir mulighet til å analysere flere agens på samme brett og program, noe som bidrar til bedre utnyttelse av instrumentene.

Resultatene viste at laveste Ct-verdi oppnådd for 4Pan1, B2 og ISFtu ved gradientanalyse var ved 53,9°C. Det kan dermed argumenteres for at denne temperaturen hadde vært hensiktsmessig å benytte som annealingtemperatur. Når kurvene derimot ble tatt i betraktning, viste resultatet seg bedre mellom 56,3 og 53,9°C. Dette gir grunnlaget til å argumentere for å beholde nåværende temperatur til metodene. Alle temperaturer med unntak av de tre høyeste kunne potensielt vært brukt som annealingtemperatur. På bakgrunn av dette blir de praktiske årsakene vektlagt ved valget av annealingtemperatur. Det kunne imidlertid vært nyttig å ha 55ºC som en egen temperatur ved gradientanalysen for å visualisere at denne temperaturen faktisk var den best mulige.

Annealingtemperatur har stor betydning for hvordan primerne binder seg til DNA-tråden og dermed sluttproduktet av PCR-reaksjonen. Dersom annealingtemperatur er for høy vil det føre til færre PCR-produkt, da primere ikke klarer å binde seg til DNA-tråden. På den andre siden, hvis temperaturen er for lav, vil det kunne oppstå uspesifikke bindinger som fører til falske PCR-produkter i tillegg. Dersom en annealingtemperatur på 60ºC hadde blitt valgt, kunne det resultert i at det ikke ble dannet tilstrekkelig mengde PCR-produkt. Det kunne medført tolkning av positive pasientprøver som falske negative. Et mulig utfall kunne vært feil diagnostikk og manglende behandling av pasient. Om en for lav temperatur derimot hadde blitt benyttet, kunne det medført tolkning av negative pasientprøver som falske positive basert på dannelse av uspesifikke PCR-produkter. Dette kunne ført til feil diagnostikk og unødvendig behandling av pasient.

Hvis en annen annealingtemperatur enn 55ºC hadde blitt valgt for de utprøvde metodene, er det mulighet for at arbeidet ville blitt mindre effektivt og mer ressurskrevende, noe som er lite gunstig for både avdelingen og pasienten. Dersom hver av metodene krevde ulike annealingtemperaturer, måtte det blitt brukt 4 separate PCR-brett og PCR-instrumenter til analyse av prøvemateriale. Dette poengterer gunstigheten ved å benytte samme annealingtemperatur for deteksjon av *Francisella tularensis* som andre PCR-analyser ved avdelingen. På grunn av begrenset tilgang til PCR-instrumenter, er det ønskelig å analysere flere agens på samme oppsett og instrument, med forbehold om at samme analyseprogram kan brukes. I slike tilfeller er det mulig å utnytte instrumentene i større grad. På denne måten kan pasienten med relativt stor sannsynlighet få raskere prøvesvar. Når prøvesvar foreligger kort tid etter at prøven er mottatt på laboratoriet, er det nyttig for pasienten ved at eventuell behandling kan begynne tidlig i forløpet.

4.3 Optimalisering av primer og probe

Resultatene fra analyse av optimalisering av primer og probe viste at PCR-miks 5 var det beste valget for eksisterende metode og 4Pan1, samtidig som PCR-miks 9 var det beste valget for B2 og ISFtu.

Kurvene for eksisterende metode, 4Pan1 og B2 har et relativt fint utseende, derimot varierer intensiteten noe mer. Ved bruk av miks 1 for 4Pan1 oppnår analysen laveste intensitet i kontrast til miks 8 hvor analysen oppnår høyeste intensitet. Dersom valget av optimal primer-

og probe konsentrasjon drøftes kun på grunnlag av intensitet burde miks 8 blitt valgt for 4Pan1, da høyest mulig intensitet er ønskelig. Imidlertid hadde ikke miks 8 et optimalt utseende på PCR-kurvene. Formen på kurven er viktig, og derfor velges ikke miks 8 for 4Pan1. Det samme gjelder eksisterende metode.

Hvis en PCR-miks med dårlig utseende på PCR-kurvene hadde blitt valgt, kunne falske resultater forekommet. Ved analyse av sterke positive prøver med PCR-miks som ikke gir optimale PCR-kurver, kan kurven flate ut tidlig og resultatet kan bli tolket som negativt. Dette er lite gunstig for både avdelingen og pasienten, og det er derfor viktig å vektlegge PCR-kurvenes form. Selv om intensiteten er høy, er det ikke tilstrekkelig å ta et valg utelukkende basert på dette.

Etter gjennomført analyse av ISFtu, var det miks 3, 6 og 9 som ga de beste resultatene. Disse miksene inneholder høyeste konsentrasjon av primere blant alle utprøvde mikser. Den eneste variasjonen blant disse miksene er konsentrasjonen av probe, som gradvis øker. Miks 3 har den laveste utprøvde probekonsentrasjonen, samtidig som miks 9 har den høyeste. Hvis intensitet vektlegges, har miks 3 halvparten så lav intensitet som miks 6 og 9. Basert på dette, kan det argumenteres for å velge miks 6 eller 9. Når PCR-kurvenes form blir tatt i betraktning, har både miks 3 og 9 en bedre form på kurvene enn miks 6. Ut ifra disse observasjonene, velges det å gå videre med miks 9, da den både gir en fin form på kurvene og relativt høy intensitet.

For laboratoriet kan det være gunstig å ha mest mulig like konsentrasjoner av primer og probe for flere metoder. Dette gjør arbeidet mer effektivt og praktisk. Til tross for dette, er det viktig å etablere en optimal metode, selv om det skulle gå på bekostning av effektivt og praktisk arbeid. Eksempelvis ble miks 9 valgt for B2 og ISFtu, da resultatene ved bruk av miks 9 ble betydelig bedre enn ved bruk av miks 5. Siden *Francisella tularensis* høyst sannsynlig består av et flerkopi-gen for insersjonselementet, vil det være gunstig å bruke høyere konsentrasjoner, og ikke minske mengden primer og probe når gode resultater først er oppnådd.

4.4 Analyse av bakteriestammer

Videre ble det utført analyse av ulike bakteriestammer. Det undersøkes hvorvidt metoden detekterer underartene av bakterien den er ment for. Resultatet viser at både 4Pan1 og eksisterende metode detekterer alle 4 underarter av *Francisella tularensis*. Videre viser resultatene at metodene er forholdsvis lik hverandre. Dette var en interessant analyse da det fra start av prosjektet var tvil rundt den eksisterende metoden sine egenskaper til å detektere de ulike underartene. Ved dette punktet i prosjektet kunne det fort vært oppdaget en metode som mulig var bedre, dersom resultatet hadde vært som forventet, at metoden kun detekterte underartene *F.tularensis subsp tularensis* og *F. tularensis subsp holarctica*, ville 4Pan1 vist en klar bedring ved å detektere alle fire underartene av bakteriearten. Likevel resulterte ikke analysen i disse resultatene, og den eksisterende metoden og 4Pan1 viste seg å likne hverandre, der begge metoder detekterte alle fire underartene av *Francisella tularensis.*

Resultatene viste også at B2 kun detekterte underarten *holarctica*, noe som umiddelbart kanskje kan tolkes som et dårlig resultat da det kun forekommer deteksjon av en underart. Likevel er ikke dette tilfellet, da den kan brukes som en supplerende metode til å undersøke om pasienter er smittet av underarten *holarctica*, og dermed eliminere muligheten for at det kan være en av de andre underartene av bakterien.

Analysene indikerer at kun ISFtu har bedre evne til å detektere *Francisella*-stammer enn eksisterende metode. Basert på dette kan det derfor være gunstig å ta i bruk ISFtu. Siden 4Pan1 detekterer de samme underartene som eksisterende metode, er det mindre grunnlag for å erstatte eksisterende metode med 4Pan1. Resultatene viser en tendens til likhet mellom eksisterende metode og 4Pan1, og erstatning av eksisterende metode kan medføre liten gevinst i forhold til arbeidsmengden som må gjøres av avdelingen ved implementering av en ny metode.

B2, som kun detekterer holarctica, kan som nevnt benyttes som en supplerende metode til eksisterende metode, 4Pan1 eller ISFtu, men mest sannsynlig ikke benyttes som eneste metode på grunnlag av dårligere evne til å detektere *Francisella*-stammer.

4.5 Deteksjonsgrense

Resultatene fra innledende undersøkelse av deteksjonsgrense for 4Pan1 og B2 viser forholdsvis høyere Ct-verdier sammenliknet med ISFtu. Det velges på bakgrunn av tidligere resultater og de gjentagende lavere Ct-verdiene til ISFtu, sammenliknet med resterende metoder å ikke gå videre med full undersøkelse av deteksjonsgrense for 4Pan1 og B2. Grunnen til at lave Ct-verdier vektlegges med slik tyngde er fordi det gjenspeiler sensitiviteten av metoden. De gjentagende lavere Ct-verdiene viser at ISFtu har en bedre evne til å detektere bakterien tidligere i analysen. Når en lav Ct-verdi forekommer, betyr dette at det skal få sykluser til i en PCR-reaksjon før det er nok PCR-produkt til en deteksjon. Lavest oppnådde Ct-verdier for ISFtu indikerer at det er en mer sensitiv metode sammenlignet med 4Pan1 og B2. Dette er et viktig funn i henhold til problemstillingen i prosjektet, da målet var å finne en mer sensitiv metode til diagnostikk av *Francisella tularensis*.

I henhold til deteksjonsgrense, kan det argumenteres for at det er mer hensiktsmessig å innføre ISFtu som metode på avdelingen fremfor å beholde eksisterende metode, da ISFtu har lavere deteksjonsgrense enn det eksisterende metode har. Ved å bruke ISFtu som metode til analyse av pasientprøver, kreves det færre kopier av *Francisella*-genet i prøvematerialet for at det skal kunne detekteres enn det gjør ved bruk av eksisterende metode. Lavere deteksjonsgrense tyder på at metoden er mer sensitiv. En høyere deteksjonsgrense for eksisterende metode kan føre til en større sannsynlighet for at resultatet havner under deteksjonsgrensen og således feiltolkes. Ved å ta i bruk en mer sensitiv metode, gagner det pasienten gjennom sikrere analyseresultater. Dette bidrar til en lavere sannsynlighet for å få falske negative resultater. I tillegg gir dette gevinst i form av at pasienten får den eventuelle behandlingen som er nødvendig.

For å danne det beste sammenlikningsgrunnlaget for prosjektet, ville det vært optimalt å undersøke deteksjonsgrensen til alle metodene. Dette kan være en mulig feilkilde ved valg av den beste metoden, da det ikke er undersøkt i praksis ved laboratoriearbeid hvordan deteksjonsgrensen til alle metodene ligger i forhold til hverandre. Dersom prosjektets tidsaspekt hadde vært lenger, ville deteksjonsgrensen til resterende metoder blitt undersøkt.

4.6 Analyse av prøvemateriale

Etter analyse av prøvemateriale, er det mulig å sammenlikne Ct-verdiene til alle utprøvde metodene da analysen er utført med samme betingelser og prøvemateriale. Resultater og funn fra analyse av deteksjonsgrense ga en indikasjon på at ISFtu hadde de laveste Ct-verdiene av metodene. Når analyse av prøvemateriale ble gjennomført viste resultatene en tydeligere tendens til lavere Ct-verdier for ISFtu. For å synliggjøre denne tendensen ble det utført beregninger av gjennomsnitt for Ct-verdier, som viste seg å være markant lavere enn resterende metoder. Dette er et viktig funn som kan fange interesse og motivasjon for videre utprøving av metoden. Årsaken til dette er at et laboratorium ønsker å oppnå best mulig sensitivitet innenfor sin diagnostikk. De lavere Ct-verdiene gjenspeiler en tendens til bedre sensitivitet. Det kan med noe større sikkerhet hevdes at ISFtu er mer sensitiv enn eksisterende metode, 4Pan1 og B2. Dersom det er mulighet for å etablere en mer sensitiv metode, vil det være en stor fordel for både pasienten og avdelingen da de kan forvente sikrere analyseresultater. Dette gir mer tillitt til analysen.

Alt prøvemateriale fikk positivt resultat ved bruk av 4Pan1, samtidig som 1 prøve ble negativ ved bruk av ISFtu. Dette var et uforventet resultat på bakgrunn av tidligere analyser som viste gjentagende lavere Ct-verdier for ISFtu sammenlignet med 4Pan1. Det var predikert at ISFtu hadde en bedre evne enn 4Pan1 til å detektere færre kopier av bakteriegenet per PCR-reaksjon. Det var derfor grunn til å tro at alt prøvemateriale skulle gitt positivt resultat ved bruk av ISFtu. Basert på følgende funn, hadde det vært ønskelig å kjenne til deteksjonsgrensen for 4Pan1. Dette ville gitt et bedre sammenlikningsgrunnlag og en mulighet for bedre forståelse av det uforventede funnet. Det hadde vært ønskelig å analysere en større mengde prøvemateriale for å undersøke om dette var en gjentagende tendens eller kun et tilfeldig funn. Dersom det viste seg å være en gjentagende tendens, ville det vært mer tvil om at ISFtu er metoden med best sensitivitet. På den andre siden, dersom det var et tilfeldig funn, styrker dette tendensen til at ISFtu er mest sensitiv.

Det er en mulighet å benytte B2 som supplerende metode til diagnostikk av *Francisella tularensis* dersom det ikke blir ønskelig å gjøre endringer av eksisterende metode. Dette er en fordel for pasienten, da det gir mulighet for å eventuelt bekrefte at sykdom skyldes underarten *holarctica*. Videre er dette fordelaktig fordi underarten *holarctica* er mest utbredt i Norge. Det kan gi pasienten en trygghet å vite hvilken underart sykdom skyldes. Underartene har ulik grad av patogenisitet, og pasienten kan få et større innblikk i eget sykdomsforløp. Fra et

epidemiologisk perspektiv er det også fordelaktig å spesifikt bestemme hvilken underart som forårsaker sykdom i Norge. Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Seksjon diagnostikk ved St. Olavs Hospital har allerede en metode for å bekrefte eller avkrefte funn av underarten *tularensis* i prøvemateriale. Ved å ta i bruk B2 som supplerende metode, kan funn av både *tularensis* og *holarctica* bekreftes eller avkreftes. Dersom prøvemateriale blir positivt ved bruk av eksisterende metode, men negativt ved følgende supplerende analyser, kan det tyde på at *mediasiatica* eller *novicida* er detektert og har spredt seg til Norge.

4.7 Svakheter ved prosjektet

Analyse av effektivitet for eksisterende metode ble utført av fagansvarlig bioingeniør ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Seksjon diagnostikk ved St. Olavs Hospital. Det kan være vanskelig å stille eksisterende metode og resterende metoder konkret til sammenlikning da effektivitetsanalysene ikke er utført av like kvalifiserte personer. Optimalt burde alle effektivitetsanalysene vært utført av samme person. Fagansvarlig bioingeniør har mer erfaring og kompetanse enn bioingeniørstudentene som utførte det resterende arbeidet i forbindelse med dette prosjektet. På grunnlag av ulik erfaring, vil presisjon og oppnådde resultater til en viss grad avvike fra hverandre. Dersom effektivitetsanalysen av eksisterende metode hadde blitt utført av bioingeniørstudentene, ville mulighetene for feilkilder vært større. Som følge av dette, kunne det vært en mulighet å få resultater utenfor eller på grensen av det optimale området for metodens effektivitet. Dersom dette var tilfellet, ville det vært en grunn til å tenke at reaksjonsbetingelsene til metoden ikke var optimale. På den andre siden, har avdelingen ved innføring av metoden utført analyse av effektivitet, som resulterte i at den ble innført. Mer spesifikt var det allerede en viten om at metoden skulle ha et resultat innenfor det optimale området for effektivitetsanalysen.

Hvis resultat fra effektivitetsanalyse utført av fagansvarlig bioingeniør og bioingeniørstudentene sammenliknes, vises det en tendens til et større sprik mellom parallellene i studentenes analyser. Som en sikkerhet burde det blitt utført repetisjon av analysen for å prøve og forbedre pipetteringen. Det er derfor grunn til å tro at resultatene ville blitt noe ulike. Det er en mulighet for at resultat for resterende metoder ville blitt noe annerledes ved utførelse av fagansvarlig bioingeniør, men sannsynlig innenfor det optimale området av metodenes effektivitet. Det er begrenset med tid til et slikt prosjekt og det ble ikke lagt vekt på at analysene ikke er utført av samme person. Siden studentene oppnådde

resultater innenfor det optimale området for effektivitet av resterende metoder, kunne resultatene sammenlignes med resultater fra effektivitetsanalyse utført av fagansvarlig bioingeniør, da ulikheter i presisjon var akseptable.

Det ble ikke utført analyse av deteksjonsgrense for 4Pan1 og B2. Dersom prosjektets tidsaspekt hadde vært lenger ville deteksjonsgrensen til 4Pan1 og B2 blitt undersøkt. På grunn av tidsrammen ble det ikke mulighet for dette, og det ble valgt å gå videre med metoden ISFtu, der oppnådde resultater viste en tendens til bedre sensitivitet enn resterende utprøvde metoder. En analyse av deteksjonsgrense for 4Pan1 og B2 ville styrket prosjektet ved at alle metodene ble sammenlignbare i en større grad.

4.8 Videre arbeid

Funn i prosjektet kan ha praktisk verdi, men videre arbeid er nødvendig før en ny metode eventuelt kan implementeres ved avdelingen. Dersom 4Pan1 eller B2 skal bli tatt i bruk til diagnostikk av *Francisella tularensis*, må bestemmelse av deteksjonsgrense utføres ved avdelingen ved et senere tidspunkt.

En analyse av prøvemateriale ble utført ved å analysere til sammen 69 eluat fra *Francisella tularensis* positive pasientprøver og eluat fra oppvekstkulturer for alle metodene. For å fastsette en metodes sensitivitet, bør ytterligere analyser av større mengder prøvemateriale utføres. Ved analyse av en større mengde prøvemateriale kan tilfeldige funn utelukkes.

Som følge av resultater fra inneværende prosjekt, kan det også være fordeler med metoden B2, da denne kun detekterer underarten *holarctica*. Av den grunn kan B2 være interessant å undersøke videre ved en senere anledning, da *holarctica* er det som forekommer mest i Norge. B2 kan brukes som en supplerende analyse til nåværende diagnostikk, eventuelt til ISFtu som ser ut til å være mer sensitiv enn eksisterende metode, for å undersøke om en positiv PCR-reaksjon faktisk skyldes underarten *holarctica* og ikke en av de andre 3 underartene. Det kreves ytterligere undersøkelser av metoden for å kunne bekrefte at denne vil være gunstig for avdelingen, men resultater i prosjektet indikerer at det vil være et nyttig diagnostisk verktøy for avdelingen.

5.0 Konklusjon

I løpet av prosjektet har det blitt utført flere analyser med hensikt om å etablere en mer sensitiv diagnostikk for *Francisella tularensis*. Det har blitt undersøkt ulike primere og prober under optimale betingelser for å få et mest mulig riktig innblikk i egenskapene til eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Resultater fra analyser utført i løpet av prosjektet har vist en tendens til bedre sensitivitet for metoden ISFtu enn eksisterende metode, samt at B2 er spesifikk for underarten *holarctica*. Med utgangspunkt i dette er det interessant å videre undersøke muligheter for en eventuell implementering av ISFtu som ny metode, eventuelt i kombinasjon med B2.

6.0 Referanser

1. Larson MA, Sayood K, Bartling AM, Meyer JR, Starr C, Baldwin J, mfl. Differentiation of Francisella tularensis Subspecies and Subtypes. J Clin Microbiol. 58(4):e01495-19.
2. Versage JL, Severin DDM, Chu MC, Petersen JM. Development of a Multitarget Real-Time TaqMan PCR Assay for Enhanced Detection of Francisella tularensis in Complex Specimens. J Clin Microbiol. desember 2003;41(12):5492–9.
3. Bergh K, Steinbakk M. Medisinsk mikrobiologi. 4. utg. Rollag H, Müller F, Tønjum T, redaktører. Gyldendal akademisk; 2020. 216–218 s.
4. Oppdatert P. Tularemi (harepest) [Internett]. Folkehelseinstituttet. [sitert 29. mars 2022]. Tilgjengelig på: https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/tularemi---veileder-for-helseperson/
5. McLendon MK, Apicella MA, Allen LAH. Francisella tularensis: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a Potential Agent of Biowarfare. Annu Rev Microbiol. 2006;60:167–85.
6. World Health Organization. WHO Guidelines on tularaemia. 2007;115.
7. Gyuranecz M. Bacteria: Francisella tularensis. I: Motarjemi Y, redaktør. Encyclopedia of Food Safety [Internett]. Waltham: Academic Press; 2014 [sitert 18. mai 2022]. s. 442–5. Tilgjengelig på: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786128000998
8. Molins CR, Delorey MJ, Yockey BM, Young JW, Belisle JT, Schriefer ME, mfl. Virulence difference between the prototypic Schu S4 strain (A1a) and Francisella tularensis A1a, A1b, A2 and type B strains in a murine model of infection. BMC Infect Dis. 6. februar 2014;14:67.
9. Berg K. Internundervisning om Francisella tularensis ved AMM. 2022 mar 15; Trondheim.
10. Frontiers | Comparative review of Francisella tularensis and Francisella novicida | Cellular and Infection Microbiology [Internett]. [sitert 29. mars 2022]. Tilgjengelig på: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2014.00035/full
11. Whitehouse C a., Kesterson K e., Duncan D d., Eshoo M w., Wolcott M. Identification and characterization of Francisella species from natural warm springs in Utah, USA. Lett Appl Microbiol. 2012;54(4):313–24.
12. Maurin M, Gyuranecz M. Tularaemia: clinical aspects in Europe. Lancet Infect Dis. 1.

januar 2016;16(1):113–24.
13. Oppdatert P. Utbrudd av tularemi i Norge [Internett]. Folkehelseinstituttet. [sitert 29. mars 2022]. Tilgjengelig på: https://www.fhi.no/sv/utbrudd/oversikt-over-storre-utbrudd/utbrudd-av-tularemi-i-norge/
14. endotoksin – Store medisinske leksikon [Internett]. [sitert 29. mars 2022]. Tilgjengelig på: https://sml.snl.no/endotoksin
15. Karaolis DKR. Pathogenicity Islands. I: Brenner S, Miller JH, redaktører. Encyclopedia of Genetics [Internett]. New York: Academic Press; 2001 [sitert 18. mai 2022]. s. 1422–4. Tilgjengelig på: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122270800016463
16. Fossum S, Dissen E. PCR – polymerasekjedereaksjon. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2021 [sitert 27. april 2022]. Tilgjengelig på: http://sml.snl.no/PCR_-_polymerasekjedereaksjon
17. Jalali M, Zaborowska J, Jalali M. Chapter 1 - The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. I: Jalali M, Saldanha FYL, Jalali M, redaktører. Basic Science Methods for Clinical Researchers [Internett]. Boston: Academic Press; 2017 [sitert 12. mai 2022]. s. 1–18. Tilgjengelig på: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128030776000011
18. What is Real-Time PCR (qPCR)? [Internett]. Bio-Rad Laboratories. [sitert 12. mai 2022]. Tilgjengelig på: https://www.bio-rad.com/en-no/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU
19. institutt for biovitenskap (UIO). PCR - Institutt for biovitenskap [Internett]. Universitetet i Oslo. [sitert 3. mai 2022]. Tilgjengelig på: https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html
20. van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification [Internett]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2008 [sitert 12. mai 2022]. 1–7 s. Tilgjengelig på: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6241-4
21. Adams PS. Real-time PCR. Dorak MT, redaktør. Taylor & Francis Group; 2006. 39–52 s.

7.0 Vedlegg

Vedlegg 1

7.1 Effektivitet

7.1.1 Eksisterende metode

Tabell 12: Tabellen viser resultater oppnådd ved effektivitetsanalyse for eksisterende metode ved avdelingen. PCR-miks 5 er benyttet. Analysen ble utført av fagansvarlig bioingeniør på avdelingen. Effektiviteten er lik 94,3% og slope er lik -3,466.

Prøve-ID	Fortynning	Ct-verdi	Middelverdi	Differanse mellom hver fortynning
		Eksisterende metode		
Std-01	$1:10^3$	22,92	22,89	-
Std-01	$1:10^3$	22,78		
Std-01	$1:10^3$	22,98		
Std-02	$1:10^4$	26,23	26,24	3,35
Std-02	$1:10^4$	26,20		
Std-02	$1:10^4$	26,29		
Std-03	$1:10^5$	29,75	29,59	3,35
Std-03	$1:10^5$	29,51		
Std-03	$1:10^5$	29,52		
Std-04	$1:10^6$	32,97	32,94	3,35
Std-04	$1:10^6$	32,88		
Std-04	$1:10^6$	32,97		
Std-05	$1:10^7$	36,30	36,87	3,93
Std-05	$1:10^7$	37,22		
Std-05	$1:10^7$	37,10		
Negativ kontroll	-	0,00	0,00	-

7.1.2 4Pan1

Tabell 13: Tabellen viser resultater oppnådd ved effektivitetsanalyse for 4Pan1. PCR-miks 5 er benyttet. Effektiviteten er lik 103,9% og slope er lik -3,232.

Prøve-ID	Fortynning	Ct-verdi 4Pan1	Middelverdi	Differanse mellom hver fortynning
Std-01	$1:10^5$	27,12	27,05	-
Std-01	$1:10^5$	27,11		
Std-01	$1:10^5$	26,93		
Std-02	$1:10^6$	30,35	30,30	3,25
Std-02	$1:10^6$	30,47		
Std-02	$1:10^6$	30,07		
Std-03	$1:10^7$	33,55	33,51	3,21
Std-03	$1:10^7$	33,48		
Std-03	$1:10^7$	33,48		
Std-04	$1:10^8$	38,63	37,35	3,84
Std-04	$1:10^8$	37,05		
Std-04	$1:10^8$	36,38		
Std-05	$1:10^9$	39,79	39,51	2,16
Std-05	$1:10^9$	0,00		
Std-05	$1:10^9$	39,23		
Negativ kontroll	-	0,00	0,00	-

7.1.3 B2

Tabell 14: Tabellen viser resultater oppnådd ved effektivitetsanalyse for B2. PCR-miks 9 er benyttet. Effektiviteten er lik 110,5% og slope er lik -3,093.

Prøve-ID	Fortynning	Ct-verdi B2	Middelverdi	Differanse mellom hver fortynning
Std-01	$1:10^5$	28,07	28,07	-
Std-01	$1:10^5$	28,11		
Std-01	$1:10^5$	28,03		
Std-02	$1:10^6$	31,1	31,16	3,09
Std-02	$1:10^6$	31,18		
Std-02	$1:10^6$	31,19		
Std-03	$1:10^7$	34,49	34,62	3,46
Std-03	$1:10^7$	34,53		
Std-03	$1:10^7$	34,84		
Std-04	$1:10^8$	0,00	36,87	2,25
Std-04	$1:10^8$	0,00		
Std-04	$1:10^8$	36,87		
Std-05	$1:10^9$	0,00	0,00	-
Std-05	$1:10^9$	0,00		
Std-05	$1:10^9$	0,00		
Negativ kontroll	-	0,00	0,00	-

7.1.4 ISFtu

Tabell 15: Tabellen viser resultater oppnådd ved effektivitetsanalyse for ISFtu. PCR-miks 9 er benyttet. Effektiviteten er lik 90,6% og slope er lik –3,569.

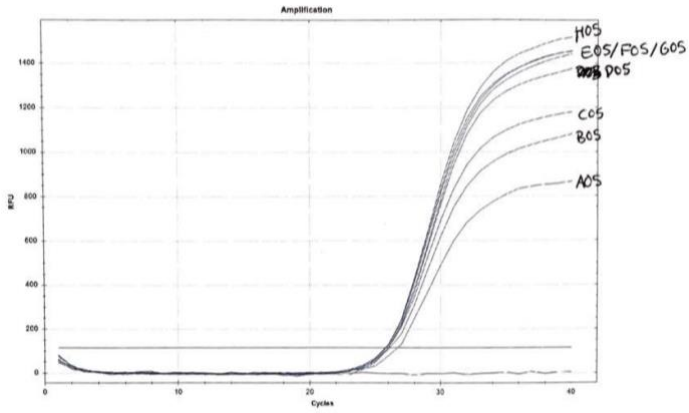
Prøve-ID	Fortynning	Ct-verdi ISFtu	Middelverdi	Differanse mellom hver fortynning
Std-01	$1:10^5$	23,01	22,96	-
Std-01	$1:10^5$	22,86		
Std-01	$1:10^5$	23,05		
Std-02	$1:10^6$	25,91	25,90	2,94
Std-02	$1:10^6$	26,19		
Std-02	$1:10^6$	25,59		
Std-03	$1:10^7$	29,22	29,38	3,48
Std-03	$1:10^7$	29,71		
Std-03	$1:10^7$	29,23		
Std-04	$1:10^8$	32,96	32,77	3,39
Std-04	$1:10^8$	32,7		
Std-04	$1:10^8$	32,64		
Std-05	$1:10^9$	35,91	37,37	4,6
Std-05	$1:10^9$	38,09		
Std-05	$1:10^9$	38,12		
Negativ kontroll	-	0	0,00	-

Vedlegg 2

7.2 Gradientanalyse

Tabell 16: Tabellen viser resultater oppnådd ved gradientanalyse for 4Pan1, B2 og ISFtu for å undersøke optimal annealingtemperatur. Kolonne 2 viser de ulike temperaturene mellom 50 og 60ºC som ble benyttet.

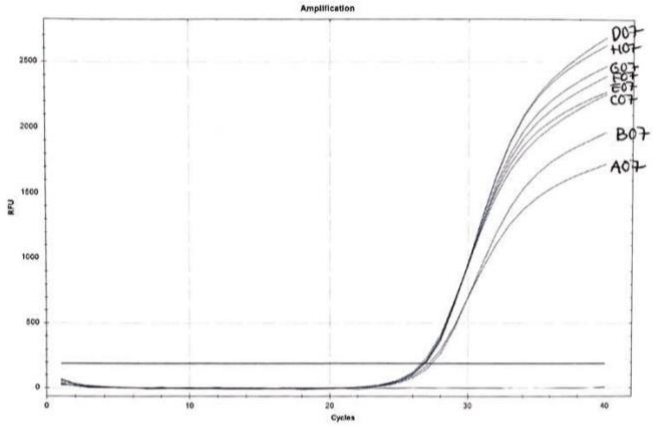
Prøve-ID	Temperatur	Ct-verdi		
	(ºC)	4Pan1	B2	ISFtu
Positiv kontroll	60	26,70	27,17	20,49
Positiv kontroll	59,4	26,10	27,36	20,10
Positiv kontroll	58,3	26,00	26,60	19,91
Negativ kontroll	56,3	0,00	0,00	0,00
Positiv kontroll	56,3	26,01	26,86	19,96
Positiv kontroll	53,9	25,75	26,72	19,68
Positiv kontroll	52,0	25,82	26,75	19,89
Positiv kontroll	50,7	25,98	26,79	20,45
Positiv kontroll	50,0	25,80	26,89	20,34



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Set Point
A05	FAM	PAN1	Unkn		26,70	26,70	0,000	60,0
B05	FAM	PAN1	Unkn		26,10	26,10	0,000	59,4
C05	FAM	PAN1	Unkn		26,00	26,00	0,000	58,3
D03	FAM	PAN1	Neg Ctrl		N/A	0,00	0,000	56,3
D05	FAM	PAN1	Unkn		26,01	26,01	0,000	56,3
E05	FAM	PAN1	Unkn		25,75	25,75	0,000	53,9
F05	FAM	PAN1	Unkn		25,82	25,82	0,000	52,0
G05	FAM	PAN1	Unkn		25,98	25,98	0,000	50,7
H05	FAM	PAN1	Unkn		25,80	25,80	0,000	50,0

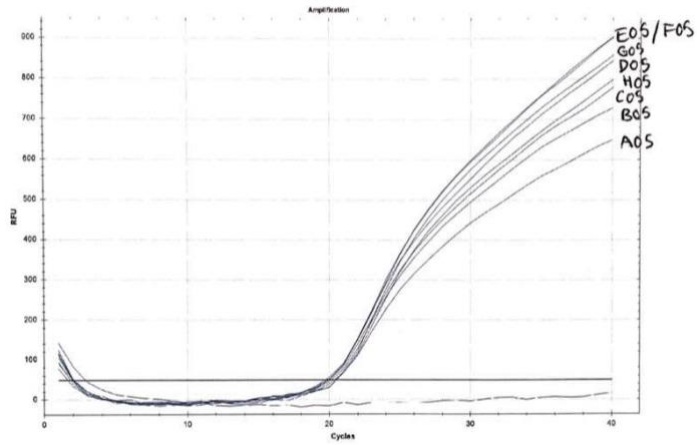
Figur 2: Amplifikasjonskurve fra analyse av gradient for 4Pan1.



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Set Point
A07	FAM	B2	Unkn		27,17	27,17	0,000	60,0
B07	FAM	B2	Unkn		27,36	27,36	0,000	59,4
C07	FAM	B2	Unkn		26,60	26,60	0,000	58,3
D07	FAM	B2	Unkn		26,86	26,86	0,000	56,3
D09	FAM	B2	Neg Ctrl		N/A	0,00	0,000	56,3
E07	FAM	B2	Unkn		26,72	26,72	0,000	53,9
F07	FAM	B2	Unkn		26,75	26,75	0,000	52,0
G07	FAM	B2	Unkn		26,79	26,79	0,000	50,7
H07	FAM	B2	Unkn		26,89	26,89	0,000	50,0

Figur 3: Amplifikasjonskurve fra analyse av gradient for B2.



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Set Point
A05	FAM	ISFtu	Unkn		20,49	20,49	0,000	60,0
B05	FAM	ISFtu	Unkn		20,10	20,10	0,000	59,4
C05	FAM	ISFtu	Unkn		19,91	19,91	0,000	58,3
D04	FAM	ISFtu	Neg Ctrl		N/A	0,00	0,000	56,3
D05	FAM	ISFtu	Unkn		19,96	19,96	0,000	56,3
E05	FAM	ISFtu	Unkn		19,68	19,68	0,000	53,9
F05	FAM	ISFtu	Unkn		19,89	19,89	0,000	52,0
G05	FAM	ISFtu	Unkn		20,45	20,45	0,000	50,7
H05	FAM	ISFtu	Unkn		20,34	20,34	0,000	50,0

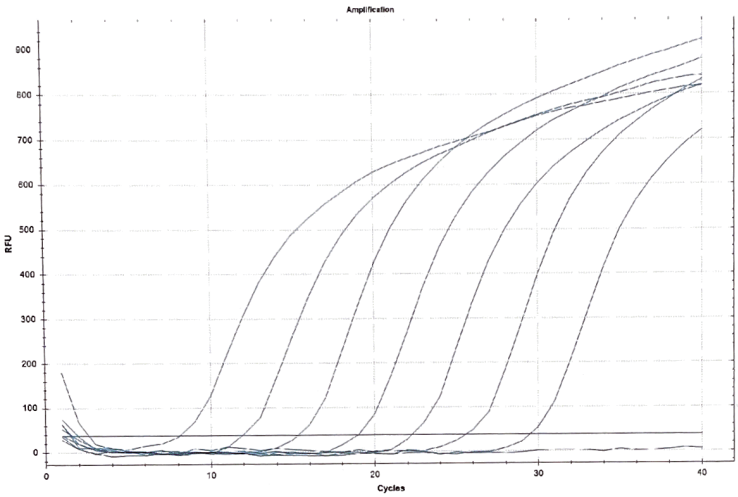
Figur 4: Amplifikasjonskurve fra analyse av gradient for ISFtu.

Vedlegg 3

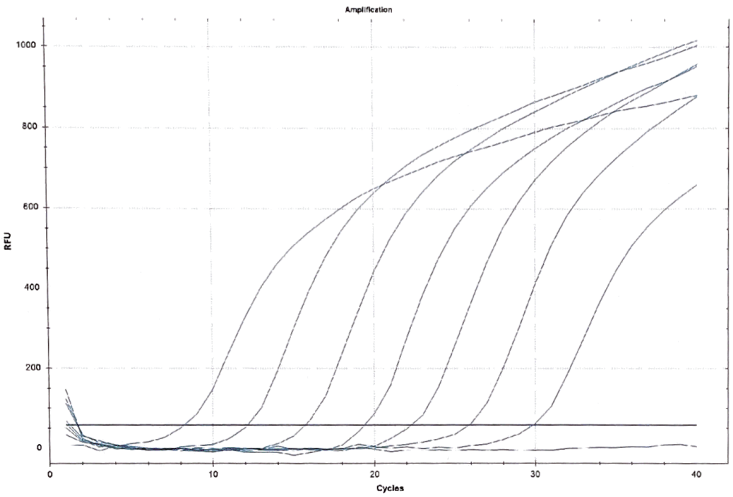
7.3 Optimalisering av primer og probe

Tabell 17: Denne tabellen viser resultater for analysen optimalisering av primere og probe for eksisterende metode, 4Pan1, B2 og ISFtu. Resultatene for de ulike metodene er fremstilt i hver sin kolonne nedover i tabellen. De viktigste funnene som brukes videre i prosjektet er uthevd ved rød tekst.

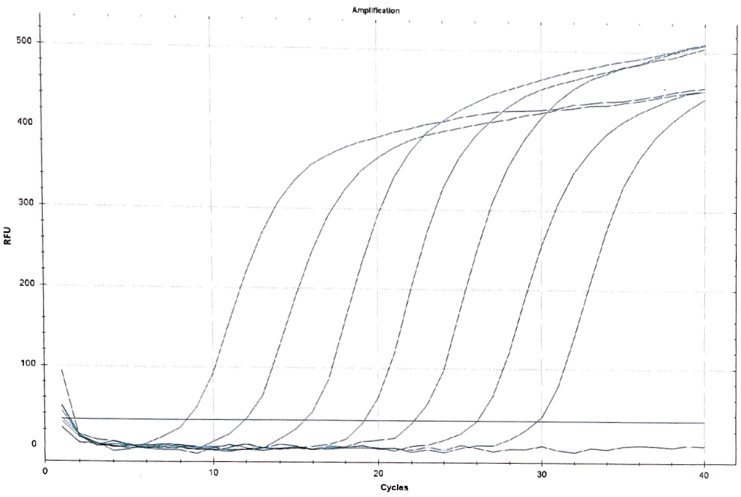
Prøve-ID	Fortynning	Ct-verdi Eksisterende metode	Ct-verdi 4Pan1	Ct-verdi B2	Ct-verdi ISFtu
Miks 5	1:10	15,89	14,03	14,44	8,85
	$1:10^2$	19,10	16,74	17,58	12,23
	$1:10^3$	22,76	20,16	20,75	15,18
	$1:10^4$	25,68	23,44	24,36	18,69
	$1:10^5$	29,15	26,80	27,41	22,19
	$1:10^6$	32,52	30,29	30,66	25,81
	$1:10^7$	36,52	33,59	34,26	30,10
	Negativ kontroll	0,00	0,00	0,00	0,00
Miks 9	1:10	16,45	14,14	14,82	8,08
	$1:10^2$	20,31	17,40	18,15	11,89
	$1:10^3$	23,49	20,47	21,27	15,28
	$1:10^4$	26,04	23,63	24,57	18,95
	$1:10^5$	29,49	27,02	27,94	22,25
	$1:10^6$	32,50	30,25	31,23	25,54
	$1:10^7$	36,03	33,86	34,78	29,48
	Negativ kontroll	0,00	0,00	0,00	0,00



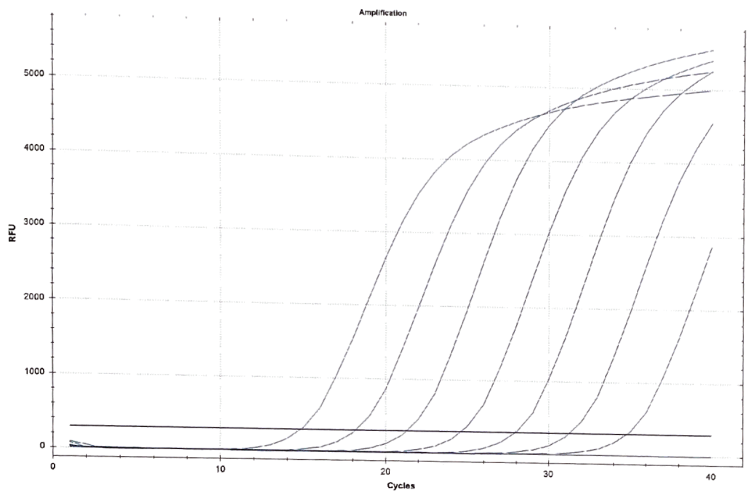
Figur 5:Figuren viser PCR-kurve tilhørende optimalisering av primer og probe for ISFtu miks 9 med intensitet på 900 RFU.



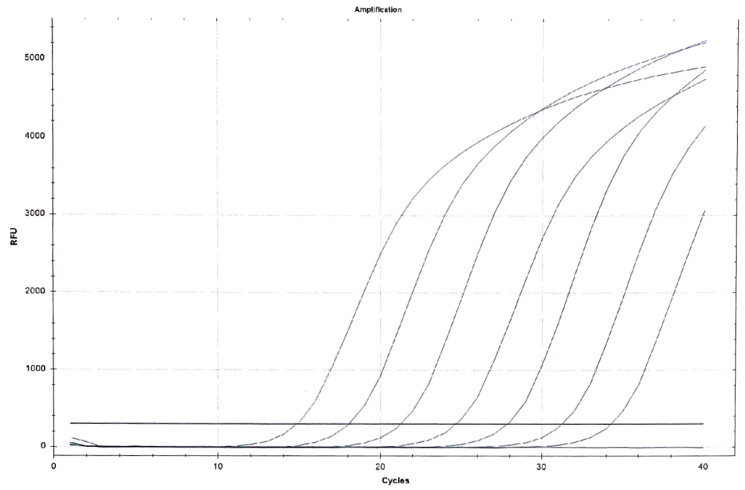
Figur 6:Figuren viser PCR-kurve tilhørende optimalisering av primer og probe for ISFtu miks 6 med intensitet på 1000 RFU.



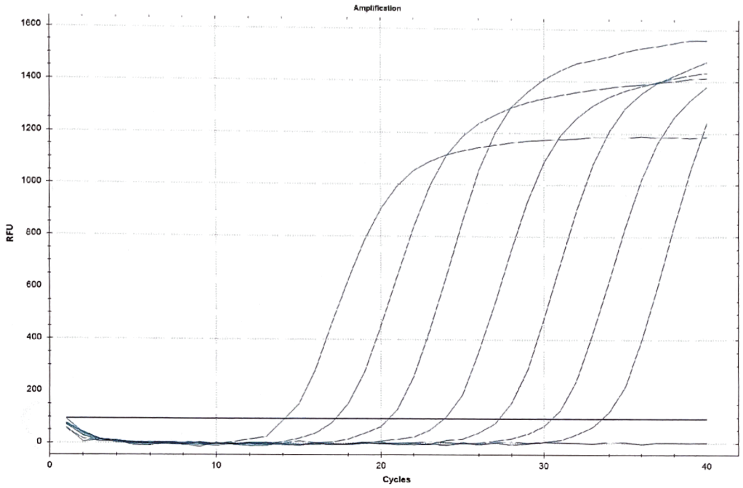
Figur 7:Figuren viser PCR-kurve tilhørende optimalisering av primer og probe for ISFtu miks 3 med intensitet på 500 RFU.



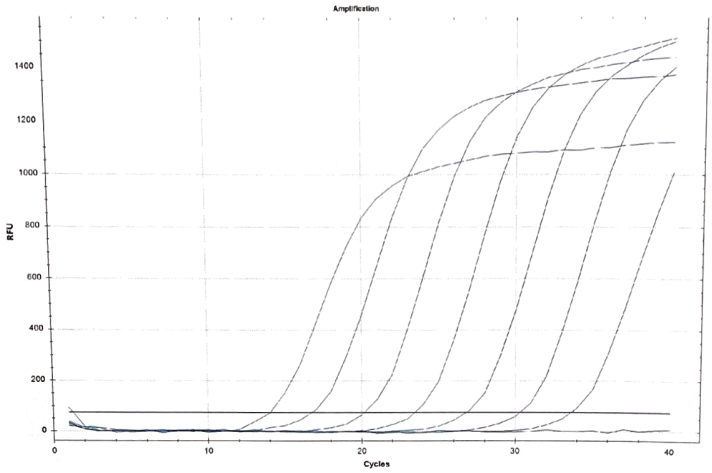
Figur 8:Figuren viser PCR-kurve tilhørende optimalisering av primer og probe for B2 miks 9 med intensitet på 5000 RFU.



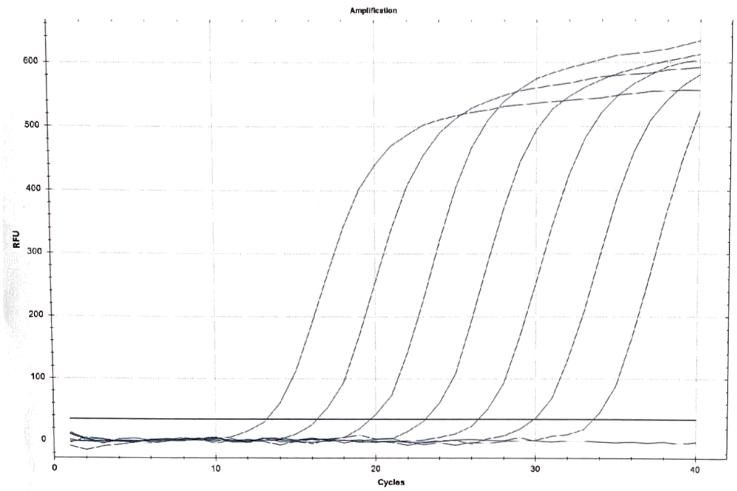
Figur 9:Figuren viser PCR-kurve tilhørende optimalisering av primer og probe for B2 miks 8 med intensitet på 5000 RFU .



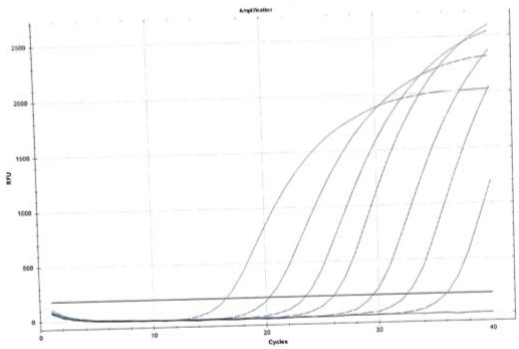
Figur 10:Figuren viser PCR-kurve tilhørende optimalisering av primer og probe for 4Pan1 miks 8 med intensitet på 1600 RFU.



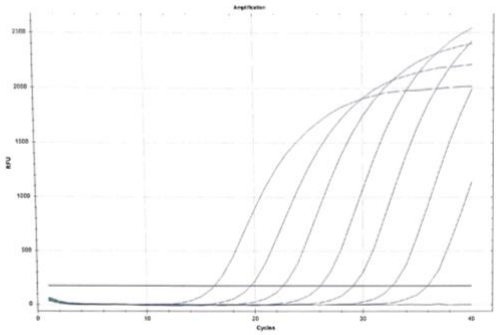
Figur 11:Figuren viser PCR-kurve tilhørende optimalisering av primer og probe for 4Pan1 miks 5 med intensitet på 1400 RFU..



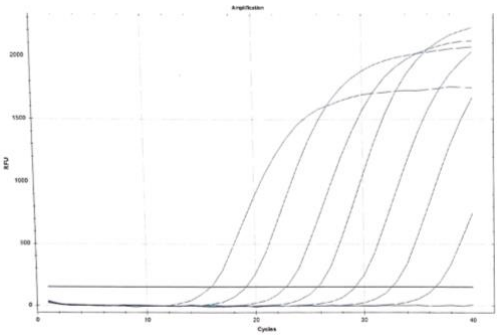
Figur 12:Figuren viser PCR-kurve tilhørende optimalisering av primer og probe for 4Pan1 miks 1 med intensitet på 600 RFU.



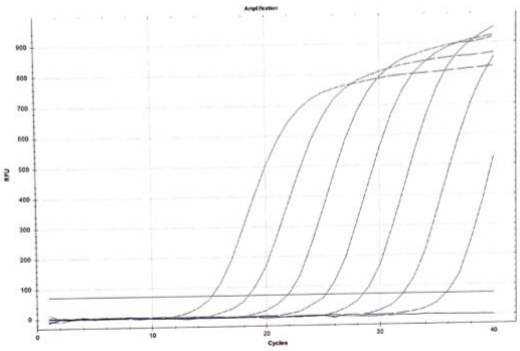
Figur 13:Figuren viser PCR-kurve tilhørende optimalisering av primer og probe for eksisterende metode miks 9 med intensitet på 2500 RFU.



Figur 14:Figuren viser PCR-kurve tilhørende optimalisering av primer og probe for eksisterende metode miks 6 med intensitet på 2500 RFU.



Figur 15:Figuren viser PCR-kurve tilhørende optimalisering av primer og probe for eksisterende metode miks 5 med intensitet på 2000 RFU.



Figur 16:Figuren viser PCR-kurve tilhørende optimalisering av primer og probe for eksisterende metode miks 1 med intensitet på 900 RFU..

Vedlegg 4

4.1 Analyse av bakteriestammer

Tabell 18: Tabellen viser resultater for analyse av ulike bakteriearter og underarter av Francisella med optimal miks for metodene, altså miks 5 for eksisterende metode og 4Pan1, og miks 9 for B2 og ISFtu.

Fortynning	Bakteriestamme	Ct-verdi			
		Eksisterende metode	**4Pan1**	**B2**	**ISFtu**
1:10	*Francisella philomiragira*	0,00	0,00	0,00	28,96
1:10	*Francisella tularensis tularensis*	15,68	15,43	0,00	8,71
1:10	*Francisella tularensis holarctica*	15,54	14,15	15,39	6,67
1:10	*Francisella tularensis novicida*	15,49	15,38	0,00	9,11
1:10	*Francisella tularensis mediaasiatica*	15,84	15,42	0,00	7,67
1:10	*Francisella tularensis holarctica* (vaksinestamme)	16,24	14,9	15,99	7,13
$1:10^5$	Positiv kontroll	29,60	28,09	29,16	23,25
-	Negativ kontroll	0,00	0,00	0,00	0,00

Vedlegg 5

5.1 Deteksjonsgrense

Tabell 19: Tabellen viser resultater fra test av Ct-verdier for Vircell-kontroll. Dette var en innledende undersøkelse før deteksjonsgrense kunne bestemmes.

Fortynning	Antall bakterier per PCR-reaksjon	Ct-verdi			
		Eksisterende metode	4Pan1	B2	ISFtu
1:10	7000	28,54	27,23	27,99	22,40
$1:10^2$	700	31,72	30,86	31,17	25,96

Tabell 20: Tabellen viser Ct-verdier for oppsett av grovfortynningsrekke med Vircell-kontroll og ISFtu miks 9. Dette var en innledende undersøkelse før deteksjonsgrense kunne bestemmes.

Fortynning	Ct-verdi
	ISFtu
1:10	22,35
$1:10^2$	25,64
$1:10^3$	28,98
$1:10^4$	32,33
$1:10^5$	39,20
$1:10^5$	38,32
$1:10^5$	38,13
$1:10^6$	38,63
$1:10^6$	0,00
$1:10^6$	0,00
Negativ kontroll	0,00

Tabell 21: Tabellen viser Ct-verdier for 8 ulike fortynninger av Vircell-kontroll med ISFtu miks 9. Det ble satt opp en to-folds fortynningsrekke til bestemmelse av deteksjonsgrense for ISFtu.

Parallell	Ct-verdi for fortynning 1-8							
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
1	29,49	29,44	30,77	31,38	33,63	36,14	34,33	38,38
2	29,07	29,74	29,82	32,26	32,02	33,46	37,84	37,7
3	-	30,07	31,56	31,95	32,52	34,03	38,04	37,32
4	-	30,74	31,14	32,07	33,53	33,27	35,56	38,26
5	-	29,83	30,94	31,66	34,03	35,05	39,28	38,15
6	-	29,74	30,88	31,76	32,58	34,05	37,62	39,88
7	-	31,27	30,87	32,43	32,06	35,58	34,63	38,1
8	-	30,5	31,38	32,06	33,84	34,27	37,85	35,63
9	-	30,3	30,75	31,82	32,52	35,16	37,68	38,35
10	-	30,29	31,72	32,01	32,94	34,29	35,05	38,32
11	-	30,2	32,39	32,59	33,02	34,16	37,83	37,62
12	-	30,12	31,44	32,31	33,33	33,71	37,66	37,52
Middelverdi	29,28	30,19	31,14	32,03	33,00	34,43	36,95	37,94

Vedlegg 6

6.1 Prøvemateriale

*Tabell 22: Tabellen viser resultater fra analyse av Francisella-positivt prøvemateriale lagret på avdelingen ved bruk av PCR-miks for hver av de 4 metodene. *: En pasientprøve som først ble tolket som negativ i rutinen, men som ble kjørt om igjen og da ble positiv med en Ct-verdi på omtrentlig 33. Nederste rad i tabellen viser beregninger av Ct-verdienes gjennomsnitt.*

Prøvenummer	Materiale	Ct-verdi			
		Eksisterende metode	4Pan1	B2	ISFtu
1	Eluat - pasientprøve	27,49	26,92	27,67	23,17
2	Eluat - pasientprøve	28,04	27,4	28,07	23,41
3	Eluat - pasientprøve	23,1	20,4	21,88	18,13
4	Eluat - pasientprøve	35,24	34,9	34,68	31,17
5	Eluat - pasientprøve	26,36	26,01	26,58	21,74
6	Eluat - pasientprøve	27,48	26,89	27,51	22,83
7	Eluat - pasientprøve	27,76	27,21	27,9	23,65
8	Eluat - pasientprøve	30,09	30,34	30,89	26,14
9	Eluat - pasientprøve	0 (ved repetisjon: 38,61)	37,31	36,28	32,97
10	Eluat - pasientprøve	35,76	34,87	35,98	31,26
11	Eluat - pasientprøve	24,96	24,03	24,83	19,7
12	Eluat - pasientprøve	33	32,2	33,15	28,49
13	Eluat - pasientprøve	26,53	26,03	26,73	21,72
14	Eluat - pasientprøve	33,86	32,73	33,32	29,64
15	Eluat - pasientprøve	0*	39,1*	0*	0*
16	Eluat - pasientprøve	25,32	24,38	25,44	20,28
17	Eluat - kultur	10,04	11,36	12,54	5,94
18	Eluat - pasientprøve	24,44	24,23	24,94	19,98
19	Eluat - pasientprøve	35,73	35,21	35,09	31,62
20	Eluat - pasientprøve	28,12	27,75	28,3	23,73
21	Eluat - pasientprøve	30,19	29,58	30,09	25,7
22	Eluat - pasientprøve	0	32,74	32,65	29,23
23	Eluat - pasientprøve	28,36	27,45	28,18	23,08
24	Eluat - pasientprøve	29,77	29,02	29,49	25,45
25	Eluat - pasientprøve	36,01	33,26	32,35	27,76

26	Eluat - pasientprøve	28,14	27,22	28,01	22,5
27	Eluat - pasientprøve	29,28	29,18	28,57	24,05
28	Eluat - pasientprøve	39,4	33,17	33,77	29,53
29	Eluat - pasientprøve	30,33	28,67	29,46	24,5
30	Eluat - pasientprøve	29,2	30,94	29,82	24,73
31	Eluat - pasientprøve	27,74	28,51	29,13	24,22
32	Eluat - pasientprøve	30,07	28,5	29,87	24,47
33	Eluat - pasientprøve	28,59	28,03	29,22	24,13
34	Eluat - pasientprøve	29,64	29,32	30,27	25,68
35	Eluat - pasientprøve	21,65	21,48	22,56	17,22
36	Eluat - pasientprøve	32,03	31,63	31,66	27,73
37	Eluat - pasientprøve	26,14	25,69	27,01	21,69
38	Eluat - pasientprøve	33,06	33,5	35,7	30,76
39	Eluat - pasientprøve	25,02	24,28	25,45	19,98
40	Eluat - pasientprøve	32,67	32,2	32,8	28,28
41	Eluat - pasientprøve	24,39	23,37	24,34	19,38
42	Eluat - pasientprøve	26,07	25,18	26,32	21,18
43	Eluat - pasientprøve	37,72	33,12	34,45	28,94
44	Eluat - pasientprøve	28,5	28,26	29,4	24,46
45	Eluat - pasientprøve	31,78	30,92	31,56	26,78
46	Eluat - pasientprøve	27,27	26,29	27,5	22,57
47	Eluat - pasientprøve	32,4	31,43	32,76	28,18
48	Eluat - kultur	11,52	11,31	11,97	3,91
49	Eluat - pasientprøve	31,48	30,48	32,1	26,92
50	Eluat - pasientprøve	33,03	32,6	33,55	28,04
51	Eluat - pasientprøve	22,31	22,37	23,01	17,68
52	Eluat - pasientprøve	30,89	30,04	31,14	26,31
53	Eluat - kultur	16,3	14,89	16,22	10,15
54	Eluat - kultur	15,88	14,51	15,97	10,21
55	Eluat - kultur	15,14	13,45	15,03	9,26
56	Eluat - kultur	15,13	13,69	15,01	8,23
57	Eluat - kultur	17,1	15,76	17,06	11,36
58	Eluat - kultur	20,28	18,64	20,05	14,7
59	Eluat - kultur	16,18	14,42	15,74	10,24
60	Eluat - kultur	15,66	13,77	15,07	6,83

61	Eluat - kultur	19,47	17,67	18,88	13,64
62	Eluat - kultur	15,54	14,07	15,16	10,01
63	Eluat - kultur	15,95	14,57	15,88	11,06
64	Eluat - kultur	16,28	14,87	15,88	9,77
65	Eluat - kultur	16,39	14,06	15,64	9,55
66	Eluat - kultur	16,29	14,59	16,01	9,61
67	Eluat - kultur	16,28	14,58	16,44	9,52
68	Eluat - kultur	18,82	14,92	16,33	8,44
69	Eluat - kultur	17,29	15,53	16,96	11,02
Positiv kontroll	Positiv kontroll	28,4	27,46	28,16	22,34
Negativ kontroll	Negativ kontroll	0	0	0	37,47 (ved repetisjon:0,00)
Gjennomsnitt	-	26,27	25,15	26,02	20,95

NTNU

Kunnskap for en bedre verden