

Henriette Krohg Stabell
Renate Hovde

Etablering av supplerende real-time PCR for diagnostikk av *Toxoplasma gondii*

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Wenche Slettahjell Prestvik
Medveileder: Janne Fossum Malmring, An-Magritt Stjern Flakne,
Kåre Bergh
Mai 2023

Henriette Krohg Stabell
Renate Hovde

Etablering av supplerende real-time PCR for diagnostikk av *Toxoplasma gondii*

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Wenche Slettahjell Prestvik
Medveileder: Janne Fossum Malmring, An-Magritt Stjern Flakne, Kåre
Bergh
Mai 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Dette bachelorprosjektet ble gitt av Avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs Hospital i Trondheim. Oppgaven avslutter siste del av bioingeniørutdanningen ved Institutt for Bioingeniørfag ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU).

Underveis i bachelorprosjektet har vi fått god hjelp av de faglige veilederne våre ved AMM; spesialbioingeniør Janne Fossum Malmring, fagansvarlig bioingeniør An-Magritt Stjern Flakne og overlege og professor Kåre Bergh. Vi ønsker å takke for at dere har delt av deres kunnskap og erfaring, og for at dere under hele perioden har vært imøtekommende, støttende og tålmodige. Vi har også satt pris på det inkluderende arbeidsmiljøet ved avdelingen, og de ansatte som var behjelpelige underveis.

En stor takk rettes også til førsteamanuensis Wenche Slettahjell Prestvik, vår prosessveileder ved utdanningen. Vi har hatt stor nytte av dine tilbakemeldinger og innspill, og ønsker å takke for at du har vært støttende, oppmuntrende og positiv gjennom hele skriveprosessen.

Trondheim, 20. mai 2023

Renate Hovde

Renate Hovde, Bioingeniørstudent

Henriette Krohg Stabell

Henriette Krohg Stabell, Bioingeniørstudent

Sammendrag

Toxoplasma gondii er en parasitt som forårsaker sykdommen toxoplasmose. Sykdommen er sjelden klinisk alvorlig blant friske individer, men for immunsupprimerte og gravide kan sykdommen være kritisk. Korrekt diagnostisering er derfor viktig. *Toxoplasma gondii* kan detekteres ved real-time PCR med to ulike målseter; multikopisekvensen Rep529 og multikopigenet B1. Ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs Hospital, utføres real-time PCR av *Toxoplasma gondii* med primere rettet mot Rep529-sekvensen. Formålet med denne bacheloroppgaven var å undersøke to ulike primerpar, rettet mot B1-genet, for å finne et som er anvendelig til supplerende real-time PCR for deteksjon av parasitten.

To PCR-assay, «T. gondii B1 AMM» og «T. gondii B1 Gomez», med to ulike primersett rettet mot B1-genet, ble testet. Til deteksjon ble TaqMan-prober benyttet. Det ble undersøkt hvilken annealingtemperatur som var mest optimal for de ulike PCR-assayene, og PCR-produktene ble analysert ved kapillærelektroforese for å detektere eventuelle uspesifikke PCR-produkter. Det ble dessuten gjennomført effektivitetsanalyse, og spesifisitetsanalyse ved hjelp av et bakteriepanel, samt bestemmelse av PCR-assayenes deteksjonsgrense. Femten positive pasientprøver ble analysert. I tillegg ble pasientprøver negative for *Toxoplasma gondii* analysert, for å se om humant DNA kan innvirke på effektiviteten til PCR-analysen. Til slutt ble assayene analysert på et QCMD-kontrollpanel for å undersøke assayenes evne til å utgi korrekte resultater.

Resultatene viste at begge assayene detekterte parasitten, og spesifisiteten var god. Det ble vist at AMM-assayet ga uspesifikke PCR-produkt med humant DNA til stede. Begge assayene hadde god effektivitet, og ved analyse ble det vist at Gomez-assayet hadde en lavere deteksjonsgrense enn AMM-assayet. Ved analyse av QCMD-panel ga assayene alt i alt svært like resultater, mens resultatene fra analyse av positive pasientprøver viste at AMM-assayet ga flere falske negative resultater enn Gomez-assayet.

Basert på våre resultater må det utføres flere analyser før et av PCR-assayene kan tas i bruk i diagnostikken.

Abstract

Toxoplasma gondii is a parasite of which causes the disease called toxoplasmosis. The disease is rarely clinically severe among healthy individuals. However, the disease may be critical for immunosuppressed patients and pregnant women. Therefore, it is important to diagnose correctly. *Toxoplasma gondii* can be detected by real-time PCR, with two different target seats; the multicopy sequence Rep529 and the multicopy gene B1. At the Department of Medical Microbiology at St. Olavs Hospital, real-time PCR is performed with primers directed against the Rep529-sequence. The purpose of this bachelor's thesis was to try out two, new primer pairs, targeting the B1-gene, to find an applicable pair for supplementary real-time PCR for detection of the parasite.

Two PCR-assays titled "T. gondii B1 AMM" and "T. gondii B1 Gomez", with two different primer pairs directed against the B1-gene, were tested. TaqMan probes were used for detection. The optimal annealing temperature of the assays was tested, and the PCR-products were analyzed by capillary electrophoresis, to detect any non-specific PCR products. Furthermore, an investigation of the effectiveness of the assays was carried out, and a bacterial panel was examined to look at the specificity of the assays. Determination of the assays' detection limit was also carried out. Fifteen positive patient samples were analyzed. Additionally, patient samples negative for *Toxoplasma gondii* were analyzed to see if human DNA can affect the efficiency of the PCR reaction. Finally, the assays were analyzed on a QCMD control panel to investigate the assays' ability to produce correct results.

The results from the analyses showed that both assays detected the parasite, and the specificity was good. It was shown that the AMM-assay formed non-specific bonds when human DNA is present. Both assays showed good efficiency, and the Gomez-assay showed a lower detection limit than the AMM-assay. The assays' results on the QCMD-panel were quite similar, while the analyzing of positive patient samples showed that the AMM-assay produced more false negative results than the Gomez-assay.

Based on our results, several analyzes must be performed before one of the PCR assays can be used in diagnostics.

Innholdsfortegnelse

Forord	
Sammendrag	i
Abstract	ii
Innholdsfortegnelse	iii
Forkortelser	v
1 Innledning	1
1.1 Toxoplasma gondii	1
1.2 Diagnostikk av Toxoplasma gondii	2
1.2.1 Serologisk diagnostikk	2
1.2.2 PCR-diagnostikk	3
1.3 Optimalisering av en real-time PCR-analyse	6
1.3.1 Egenskaper til primere og prober	6
1.3.2 Optimalisering av annealingtemperatur	7
1.3.3 Effektivitet.....	7
1.3.4 Sensitivitet og spesifisitet.....	8
1.4 Måsekvenser ved PCR-diagnostikk av Toxoplasma gondii	8
1.5 Hensikt med bacheloroppgaven	9
2 Materialer og metode	10
2.1 Pasientprøver	10
2.2 Kontroller	10
2.2.1 Eksterne kvalitetskontroller (QCMD-panel)	11
2.3 Primere og prober	12
2.4 Reaksjonsmiks til PCR	13
2.5 Kontroll av PCR-produkt	13
2.6 Første PCR-analyse ved bruk av nye primerpar og prober	14
2.7 Optimalisering av annealingtemperatur	15
2.8 Negative pasientprøver analysert med annealingtemperatur på 55 °C	15
2.9 Negative pasientprøver analysert med annealingtemperatur på 58°C og 60 °C	15
2.9.1 Videre undersøkelse av uspesifikke bånd.....	15
2.10 Effektivitetsanalyse	16
2.11 Undersøkelse av sensitivitet	17
2.12 Bakteriepanel til spesifisitetsundersøkelse	18
2.13 Eksterne kvalitetskontroller (QCMD-panel)	18
2.14 Analyse av positive pasientprøver	18
3 Resultater	19
3.1 Første PCR-analyse av T. gondii ved bruk av de nye real-time PCR-assayene	19
3.2 Optimalisering av annealingtemperatur	20

3.3	Negative pasientprøver analysert ved 55°C, 58°C og 60°C	22
3.3.1	Undersøkelse av uspesifikke bånd.....	25
3.4	Effektivitetsanalyse	26
3.5	Undersøkelse av sensitivitet.....	27
3.6	Bakteriepanel til spesifisitetsundersøkelse.....	28
3.7	Eksterne kvalitetskontroller (QCMD-panel)	28
3.8	Analyse av positive pasientprøver	29
4	<i>Diskusjon</i>.....	31
4.1	Første PCR-analyse av <i>T. gondii</i> ved bruk av de nye real-time PCR-assayene	31
4.2	Optimalisering av annealingtemperatur og undersøkelse av negative pasientprøver	31
4.2.1	Undersøkelse av uspesifikke bånd.....	32
4.3	Effektivitetsanalyse	33
4.4	Undersøkelse av sensitivitet.....	33
4.5	Bakteriepanel til spesifisitetsundersøkelse.....	34
4.6	Eksterne kvalitetskontroller (QCMD-panel)	34
4.7	Analyse av positive pasientprøver	35
4.8	Konklusjon.....	35
5	<i>Referanser</i>	37
6	<i>Vedlegg</i>.....	40

Forkortelser

AMM – Avdeling for medisinsk mikrobiologi

ATCC – American Type Culture Collection

B1-genet – Glycerol-3-phosphate dehydrogenase-genet

CCUG – Culture Collection University of Gothenburg

Ct – Cycle threshold

DMSO – Dimetylsulfoksid

KI – Konfidensintervall

MGW – Molecular Grade Water

PCR – Polymerase Chain Reaction

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

T.gondii – *Toxoplasma gondii*

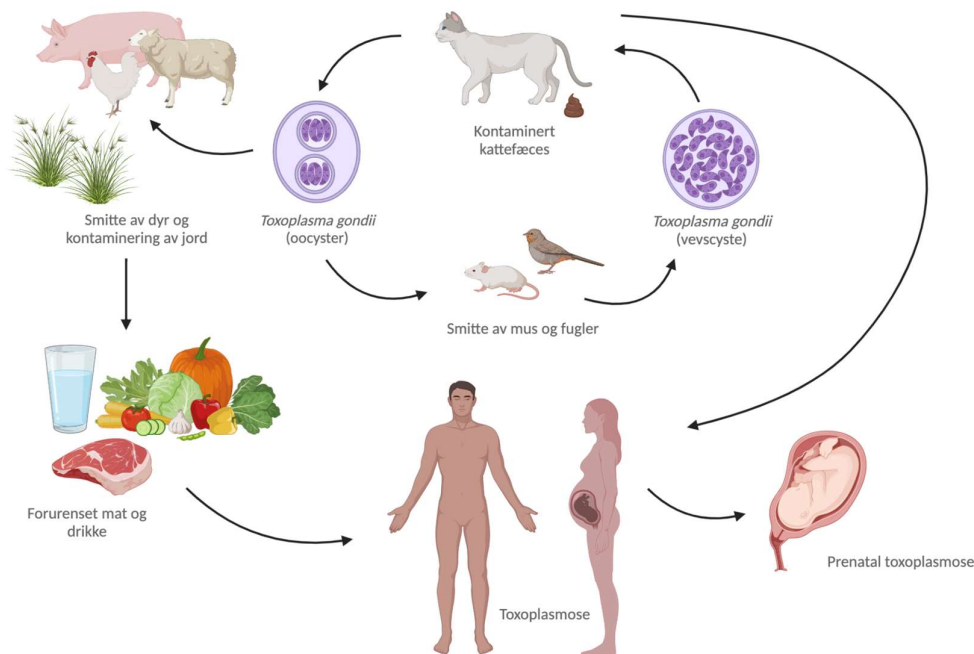
QCMD – Quality Control for Molecular Diagnostics

1 Innledning

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) er en protozo, en encellet parasitt, som forårsaker sykdommen toxoplasmose. Parasitten er obligat intracellulær, og tilhører familien Sarcocystidae. Protozoen skiller seg fra andre arter i familien basert på innholdet av organeller i cellens spisse ende, og det er disse organellene som benyttes for å invadere vertscellen (1).

Hovedverten for *T. gondii* er katter. I kattens tarmepitel vil parasitten reprodusere seg, og skilles ut som «oocyster» gjennom kattefæces (2). Mennesker kan smittes av parasitten gjennom flere smitekilder, der smitteoverføringen oftest skjer oralt (3). De vanligste smitekildene vises i Figur 1, som illustrerer smitteoverføringen av *T. gondii*. Disse omfatter direkte kontakt med kattefæces, forurenset jord eller vann, samt inntak av kjøtt som ikke er tilstrekkelig varmebehandlet, eller rå frukt og grønnsaker som er forurenset med parasittens oocyster (4).



Figur 1: Smitteoverføring av *T. gondii*. Hovedvert for parasitten er katter, som kan smitte dyr og mennesker med parasittens oocyster i kattefæces. Kontaminering av jord og smitte av dyr vil gi forurensning av ubehandlet mat og drikke. Toxoplasmose vil kunne oppstå ved inntak av forurenset mat og drikke, eller direkte kontakt med kattefæces. Gravide kvinner vil i tillegg kunne overføre infeksjonen videre til fosteret. Figuren er laget i BioRender.com.

Toxoplasmose vil normalt være asymptomatisk og er sjelden klinisk alvorlig. Derimot vil immunsupprimerte pasienter og gravide ha et langt mer alvorlig sykdomsbilde. I disse tilfellene er klinisk identifikasjon svært viktig. For immunsupprimerte pasienter vil sykdomsbildet avhenge blant annet av hvilken immunsuppresjon det gjelder. For gravide vil det mest risikable være primærinfeksjon under graviditet. Dette kan videre smitte fosteret og føre til at det utvikler alvorlig sykdom, avhengig av når i svangerskapet fosteret infiseres (4).

Prevalensen av toxoplasmose er relativt lav i Norge og Nord-Europa generelt. Toxoplasmose er derimot mer vanlig i milde og fuktige områder lengre sør i Europa. I de sørlige, europeiske landene er risikoen for smitte omtrent 20 ganger større enn i de nordlige (3). I Frankrike vil gravide kvinner som er seronegative, og da mangler antistoffer mot parasitten i blodet, overvåkes ved å gjennomføre månedlig serologisk testing (5). Dette utføres på bakgrunn av en høyere prevalens av toxoplasmose i landet. Basert på parasittens patogenitet overfor immunsupprimerte og gravide, vil det likevel være viktig å detektere *T. gondii* med stor sikkerhet, til tross for dens lave forekomst i Norge.

1.2 Diagnostikk av *Toxoplasma gondii*

Diagnostikk av *T. gondii* kan utføres ved hjelp av blant annet serologi og PCR. Serologi benyttes som den primære rutineundersøkelse dersom det er mistanke om infeksjon med parasitten, og PCR benyttes dersom det er behov for ytterligere diagnostikk i spesielle tilfeller. PCR tas i bruk blant annet for å kunne diagnostisere en infeksjon prenatalt, eller for å avdekke om en tidligere infeksjon hos pasienter med nedsatt immunforsvar har blitt reaktivert (6). En PCR-analyse er hensiktsmessig i disse tilfellene, da deteksjon av parasitten er nødvendig for å avdekke om den er til stede eller ikke. Serologisk diagnostikk vil ikke nødvendigvis kunne gi et sikkert svar ved slike problemstillinger.

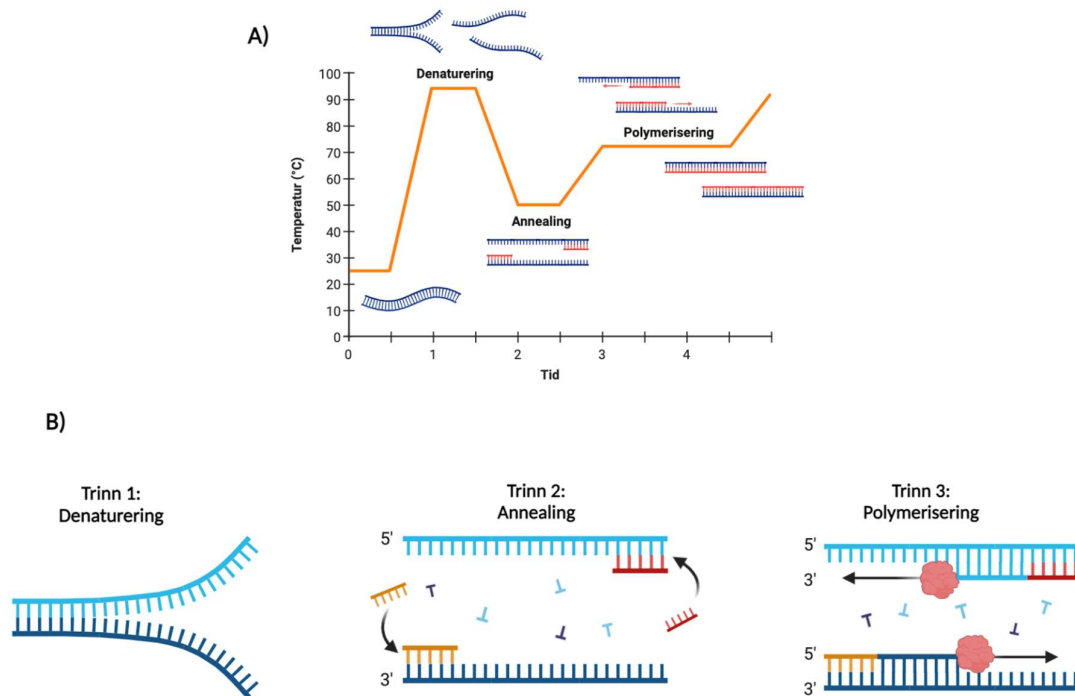
1.2.1 Serologisk diagnostikk

Ved serologisk diagnostikk benyttes påvisning av antistoffer mot *T.gondii*. IgM-antistoffet er en tidlig og sensitiv diagnostisk markør, ettersom det kan detekteres en uke etter infeksjon. IgM kan være til stede flere måneder og år etter infeksjonen, og det er derfor vanskelig å skille mellom en aktiv eller tidligere gjennomgått infeksjon. Ved en graviditet er det viktig å vite om infeksjonen var aktiv før eller etter innledende graviditet, for å vite om det kan gi konsekvenser for fosteret eller ikke. IgG-antistoffet benyttes som diagnostisk markør for

gjennomgåtte infeksjoner. Antistoffet kan detekteres en til to uker etter en infeksjon, og vil være på sitt høyeste etter en til to måneder, før den så avtar og eksisterer videre hos individet i små mengder. Ettersom IgG forblir i individet, kan også dette antistoffet gjøre det vanskelig å skille mellom en aktiv eller tidligere gjennomgått infeksjon. Metoder for identifisering av IgE og IgA har også blitt etablert, da disse antistoffene produseres i løpet av de første ukene av infeksjonen, og vil så forsvinne tidlig (7).

1.2.2 PCR-diagnostikk

Mikrobiologisk PCR-diagnostikk baserer seg på amplifisering og deteksjon av en eller flere sekvenser i en mikrobes genom. En PCR-analyse krever en varmestabil DNA-polymerase, deoksynukleotider av hver base, magnesium, primere og templat i form av DNA (8). Ekstraksjon av DNA fra prøvematerialet er en forutsetning for å kunne utføre PCR-diagnostikk. PCR-analysen omfatter en prosess hvor en sekvens av templat-DNA oppkopieres, ved å gjennomgå 20-40 repetisjoner av tre trinn, som illustrert i Figur 2 (8). De tre repetitive trinnene er 1) denaturering, 2) annealing og 3) polymerisering. Denaturering av dobbeltrådet DNA utføres ved å øke temperaturen i PCR-instrumentet opp mot 94-97 °C. Hensikten er å splitte dobbeltrådet DNA til enkelttrådet DNA, slik at primernes målseter blir tilgjengelige. Etter denaturering av DNA vil løsningen avkjøles til omkring 50-65 °C. Deretter begynner annealingfasen, hvor primere i et stort overskudd vil binde seg spesifikt til sine målseter på DNA-tråden. Etter at primerne har bundet seg til målsetene, vil DNA-polymerasen begynne å forlenge den komplementære DNA-tråden fra primernes 3'ende (8). PCR-analysen kan også omtales som en to-trinns analyse, dersom annealing og polymerisering foregår ved samme temperatur. Temperaturen vil da oftest være mellom 50-70 °C. Repetisjon av de tre trinnene gir en eksponentiell økning av målsekvens i løsningen (8).



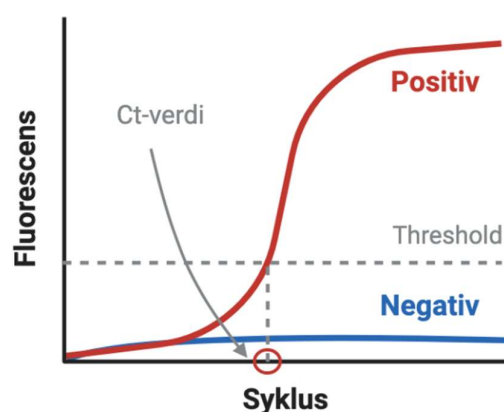
Figur 2: De ulike trinnene av en tre-trinns real-time PCR-analyse. A) Denaturering, annealing og polymerisering foregår ved ulike temperaturer i PCR-analysen. B) Trinn 1 illustrerer denatureringen, hvor dobbeltrådet DNA splittes til enkeltrådet DNA. Trinn 2 viser annealingfasen, med primere som bindes til den aktuelle målsekvensen i enkeltrådet DNA. Trinn 3 illustrerer polymeriseringen, hvor DNA-polymerase forlenger den komplementære DNA-tråden fra primernes 3'ende. Figuren er laget i BioRender.com.

1.2.2.1 Real-time PCR

Real-time PCR baserer seg på de samme prinsippene som konvensjonell PCR. Hovedforskjellen er at ved real-time PCR benyttes fluorescerende molekyler, som gjør at mengde PCR-produkt kan registreres etter hver syklus (8). Når signalet øker nok til at PCR-kurven krysser en satt linje, kalt threshold, vil krysningpunktet gi en Cycle threshold-verdi (Ct-verdi). Threshold-linjen skiller reelle fluorescens-signaler fra bakgrunnsstøy i PCR-reaksjonen. Ct-verdien har en omvendt proporsjonalitet med mengden mål-DNA i prøven (8). Dette betyr at lave Ct-verdier angir høye konsentrasjoner av mål-DNA, og høye Ct-verdier angir lave konsentrasjoner av mål-DNA.

En prøve regnes som positiv når fluorescens-signalet krysser threshold-linjen i PCR-reaksjonen. Positive prøver former typisk en sigmoid, S-formet kurve. Et slikt resultat indikerer at målsekvensen er til stede i den aktuelle prøven, og at sekvensen har blitt

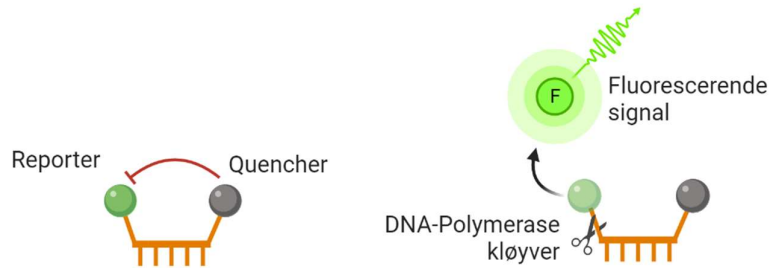
amplifisert (8). En prøve regnes derimot som negativ når fluorescens-signalet forblir lavt i bakgrunnen. Dette indikerer at målsekvensen er fraværende, og vil ikke bli amplifisert (8). Figur 3 illustrerer en positiv og negativ amplifiseringskurve, med threshold-linje og registrert punkt for Ct-verdi. Det vil være nødvendig med en positiv og negativ kontroll i oppsettet, for å utelukke henholdsvis potensielle inhibitorer, kontaminasjon eller uspesifikke signaler (8).



Figur 3: Amplifiseringskurver fra en real-time PCR-analyse. Positive prøver gir et tydelig fluorescens-signal, krysser threshold-linjen, og former en sigmoid, S-formet kurve. Negative prøver forblir under threshold-linjen, og kan registreres som støy med lite til ingen fluorescens. Ct-verdien har en omvendt proporsjonalitet med mengden mål-DNA i prøven. Figuren er laget i BioRender.com.

1.2.2.2 TaqMan-probe

Det er flere måter å detektere PCR-produkter på i real-time PCR, blant annet ved hjelp av TaqMan-prober. En probe, i dette tilfellet, er en kort DNA-sekvens som er laget slik at den binder seg komplementært til en målsekvens mellom de to primerne. TaqMan-proben, illustrert i Figur 4, er merket med to molekyler; en fluorescerende «reporter» (R) og en «quencher» (Q). De er festet på hver sin ende av proben, henholdsvis 5'enden og 3'enden. Når proben er intakt vil lysenergien som avgis fra R absorberes av Q og ingen fluorescens vil detekteres. Dette skjer kun når R og Q er svært nærme hverandre. DNA-polymerasen som benyttes ved polymerisering av DNA-templatet har 5'eksonuklease-aktivitet, som gjør at polymerasen er i stand til å fjerne nukleotider fra 5'-enden av et DNA-molekyl. Når DNA-polymerasen støter på proben som er bundet til DNA-templatet, vil proben degraderes. Etter degradering vil avstanden mellom R og Q bli stor nok til at fluorescenssignal fra R detekteres (9).



Figur 4: TaqMan-proben med to molekyler festet til hver sin ende; en reporter (R) og en quencher (Q). Når begge molekylerne er bundet til proben, er avstanden mellom dem så kort at fluorescensen til R blir absorbert av Q. Når DNA-polymerasen bryter ned proben, blir avstanden mellom R og Q stor nok til at det fluorescerende signalet til R blir detektert. Figuren er laget i BioRender.com.

1.2.2.3 Størrelsesundersøkelse av PCR-produkt

Kapillærelektroforese kan benyttes for å bestemme nøyaktig størrelse av PCR-produkt. Kapillærelektroforese benytter DNA-fragmentenes negative ladning til separasjon, ved at de vandrer gjennom kapillærer mot positiv pol i et elektrisk felt. De korte DNA-fragmentene beveger seg raskere enn de lengre DNA-fragmentene, ved hjelp av en separasjonsmatriks på innsiden av kapillærene. Fragmentene blir så detektert med laseroptikk. For å bestemme lengden på de ulike fragmentene benyttes en intern størrelsesmarkør, med kjente lengder, for hver prøve (10).

1.3 Optimalisering av en real-time PCR-analyse

For etablering av real-time PCR, vil optimalisering av analysen utgjøre den største delen av etableringsprosessen. Optimalisering vil kunne påvirke og forbedre ytelsen til en PCR-analyse, og har dermed noe å si for amplifisering og deteksjon av aktuell(e) målsekvens(er).

1.3.1 Egenskaper til primere og prober

For at assayet skal være best mulig, er det et par egenskaper primere og prober bør ha. Primerens lengde bør være på mellom 18-30 nukleotider (11). Dersom primeren er for kort kan det føre til uspesifikk binding og gi dårligere spesifisitet (12), samtidig som en for lang primer vil bruke lengre tid på å binde seg (13). Selv om en lengre primer vil passe bedre med målsekvensen, kan det samtidig føre til dårligere effektivitet (12). I tillegg bør repetering av en base eller en dinukleotide mer enn fire ganger unngås, da dette kan føre til at polymerasen tilsetter feil antall av den repeterende basen (11).

Det er viktig å unngå at primeren binder seg til seg selv, og danner en såkalt hårnål, eller at primerne binder seg til hverandre (primer-dimere). Danning av primer-dimer og hårnål kan føre til forlengelse og hybridisering av primeren og ikke målsekvensen, og kan interferere med hybridiseringstrinnet. Det er også viktig å unngå uspesifikk binding ved 3'enden av primeren, da det er her DNA-polymerasen vil begynne å forlenge DNA-tråden (12).

Egenskapene til proben er flere av de samme som for primerne. Probens lengde bør være mellom 15-30 nukleotider. Det er også viktig å unngå at proben binder seg til primeren, da det kan skape interferens på lik måte som primer-dimere og hårnåler. Dette unngås ved å påse at proben ikke er komplementær til primerne. I tillegg er det viktig at proben er modifisert i 3'enden, for å unngå polymerisering av proben (12).

1.3.2 Optimalisering av annealingtemperatur

Annealingtemperatur er den temperaturen der PCR-primerne binder seg til DNA-templatet. Vanligvis kan annealingtemperaturen variere mellom 50 og 65°C (8). Høyere annealingtemperatur resulterer oftest i mindre uspesifikk binding av primerne til målsetet. Lavere annealingtemperatur vil derimot kunne resultere i mer uspesifikk binding, der en primer kan binde seg til en sekvens på DNA-templatet som ikke passer fullstendig (15). Dersom primeren binder seg uspesifikt til templatet vil feil sekvens oppkopieres, og komponenter i PCR-analysen blir unødvendig brukt opp, som resulterer i dårligere effektivitet. Det er primerens basesammensetning og lengden på sekvensen som avgjør hvilken annealingtemperatur som er mest optimal.

1.3.3 Effektivitet

Effektiviteten til en PCR-metode beskriver dens evne til amplifisering, og avhenger av primere, temperaturforhold, samt tilstedeværelse av eventuelle inhibitorer eller interfererende komponenter. I de første syklene av analysen vil mengden amplifisert produkt gi en eksponentiell vekst, før effektiviteten deretter avtar og amplifiseringskurven flater ut. Effektiviteten avtar som følge av at komponentene i PCR-miksen brukes opp eller oppnår maksimal kapasitet (8).

For å vurdere PCR-assayets effektivitet, settes det opp en fortynningsrekke. PCR-resultatene kan plottes med logaritmen av fortynning på x-aksen og tilhørende Ct-verdi på y-aksen, og det kan genereres en standardkurve. Effektiviteten, E , beregnes da ut fra standardkurven ved hjelp av følgende formel:

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{slope}}\right)} \quad (1)$$

Formelen kan gjøres om til prosent effektivitet slik:

$$\% \text{ Effektivitet} = (E - 1) \times 100\% \quad (2)$$

Når PCR-assayet som benyttes fungerer godt og pipetteringen er nøyaktig, vil den genererte kurven vise at amplifikasjonsproduktet dobles etter hver syklus, der $E = 2$, og % effektivitet blir 100%. Det vil være vanskelig å få % effektivitet på nøyaktig 100%, men resultater på mellom 90-105% er ønskelig (16).

1.3.4 Sensitivitet og spesifisitet

Det er viktig med god analytisk sensitivitet og spesifisitet for et nøyaktig PCR-assay. Analytisk spesifisitet angir PCR-assayets evne til å kun binde seg til ønsket målsekvens (16). Deteksjonsgrensen sier noe om PCR-metodens sensitivitet. Deteksjonsgrensen er den laveste mengden kopier det er mulig å detektere i en PCR-analyse, som vil kunne gi et positivt PCR-resultat i minst 95% av alle testede prøver (17). For å finne deteksjonsgrensen for et PCR-assay, tilsettes positivt materiale i negative prøver (spikes) til ulike konsentrasjoner, som det så blir gjort en PCR-analyse på (17).

1.4 Målsekvenser ved PCR-diagnostikk av *Toxoplasma gondii*

PCR-diagnostikk av *T. gondii* utføres ofte ved deteksjon av to multikopisekvenser i genomet til parasitten. Et multikopigen for glycerol-3-phosphate dehydrogenase, kalt B1-genet, er et godt bevart gen hos *T. gondii*. B1-genet utgjør omkring 30-35 kopier per genom, noe som gjør genet gunstig å benytte ved PCR-deteksjon, da det gir økt analytisk og klinisk sensitivitet (18). Genet har over lengre tid blitt benyttet som et målsete for deteksjon av *T. gondii* ved PCR-diagnostikk. I slutten av 1999 ble det oppdaget en repetitiv, ikke-kodende sekvens i parasittens genom, som kunne benyttes som et nytt målsete ved PCR-diagnostikk (19). Denne sekvensen, kalt Rep529, er en sekvens med omkring 200-300 kopier per genom (18). Funnet

av denne multikopisekvensen muliggjorde etablering av et ytterligere deteksjonsmål for diagnostikk av *T. gondii*, og ble raskt et førstevalg i europeiske laboratorier på starten av 2000-tallet (6). Årsaken var hovedsakelig en høyere analytisk og klinisk sensitivitet i en rekke prøvematerialer (18). Sammenlignet med Rep529 vil B1-genet utgjøre færre kopier av genomet til *T. gondii*, og vil ved PCR-analyse gi en høyere Ct-verdi. Real-time PCR med B1-genet som målsete vil ofte gi en Ct-verdi på omkring 3 sykler høyere enn med Rep529 (6).

1.5 Hensikt med bacheloroppgaven

I mange medisinske laboratorier benyttes både Rep529 og B1-genet som målseter ved PCR-analyse av *T. gondii*. Utnyttelse av to eller flere ulike målseter ved PCR gir en sikrere påvisning av en aktuell mikrobe, og flere målseter gjør analysen mer robust dersom det skulle oppstå forandringer i mikrobens genom. Ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) på St. Olavs Hospital, utføres real-time PCR av *T. gondii* med primere rettet mot Rep529. Hensikten med bacheloroppgaven var å etablere en supplerende real-time PCR-analyse for diagnostikk av *T. gondii*, med B1-genet som målsete. Et primerpar og probe for B1-genet designet ved AMM, ble testet og sammenlignet med et primerpar og probe for B1-genet beskrevet i en studie om intraokulære infeksjoner med *T. gondii* (18).

2 Materialer og metode

2.1 Pasientprøver

Det ble analysert både negative og positive pasientprøver for *T. gondii* i utprøving av real-time PCR med de nye primerne og probene. De positive prøvene var hentet fra både St. Olavs Hospital og Rikshospitalet. Det nasjonale referanselaboratoriet for toxoplasmose befinner seg på Rikshospitalet, noe som gir sykehuset større tilgang på positive pasientprøver.

Pasientprøver fra Rikshospitalet ble sendt som opprinnelig prøvemateriale, og DNA-ekstraksjon av disse prøvene ble gjort ved AMM, St. Olavs Hospital. Totalt fem positive prøver fra St. Olavs Hospital og ti positive prøver fra Rikshospitalet, ble analysert.

Pasientprøvenes opprinnelige Ct-verdier er fremstilt i Vedlegg 1, og er basert på real-time PCR med Rep529 som målsete. Anonymiserte pasientprøver med kun prosjektnummer ble benyttet, av hensyn til personvern.

Negative pasientprøver ble analysert med den hensikt å undersøke om det kunne oppstå uspesifikke bindinger av primere til humant DNA. Prøvene ble analysert både alene og i en «pool» der flere negative prøver ble slått sammen (heretter kalt pasientpool). De negative eluatene var tidligere analysert ved St. Olavs Hospital, i perioden september 2022 til mars 2023. Opprinnelig prøvemateriale i de negative eluatene var blant annet fostervann, fullblod, hjerteblod, abscessinnhold, leddvæske, spinalvæske, post-mortalt vev, placentavev, bronkialskyllvæske, perikardvæske, pleuravæske og spytt.

2.2 Kontroller

Det ble benyttet to positive kontroller av typen «Amplirun toxoplasma gondii DNA control», fra Vircell, med ulike lot-nummer. DNA ble levert i frysetørret form og resuspendert i DNase-, RNase- og proteasefritt vann (heretter kalt MGW; Molecular Grade Water), til sluttkonsentrasjoner på 15 000 kopier/ μ l og 10 050 kopier/ μ l. Kontrollen med lavest konsentrasjon ble benyttet som positiv kontroll i alle oppsettene. Kontrollen med høyest konsentrasjon ble benyttet til effektivitetsanalyse og undersøkelse av deteksjonsgrense. Informasjon om begge kontrollene er oppgitt i Vedlegg 2 og Vedlegg 3.

For å undersøke om PCR-assayene ville avdekke kun *T. gondii*, og ikke andre humanpatogene mikroorganismer, ble det analysert et bakteriepanel til spesifisitetsundersøkelse. Majoriteten av bakteriestammene var identifisert ved og kjøpt fra Culture Collection University of

Gothenburg (CCUG), med unntak av én stamme. Denne var identifisert ved og kjøpt fra American Type Culture Collection (ATCC). Bakteriestammene var dyrket og ekstrahert ved AMM. Se Tabell 1 for oversikt over de ulike bakterieartene, samt deres respektive stammenummer.

Tabell 1: Oversikt over bakteriestammene som ble brukt i spesifisitetsundersøkelse for *T. gondii*.

Bakterieart	Stammenummer
<i>S. aureus</i>	CCUG 15915
<i>S. pyogenes</i>	CCUG 33061
<i>S. agalactiae</i>	CCUG 4208
<i>H. influenzae</i>	CCUG 33775
<i>C. albicans</i>	CCUG 32723
<i>S. pneumoniae</i>	CCUG 33638
<i>E. coli</i>	CCUG 37382
<i>K. pneumoniae</i>	CCUG 56233
<i>E. cloacae</i>	CCUG 6323T
<i>P. aeruginosa</i>	CCUG 17619
<i>E. faecalis</i>	CCUG 9997
<i>S. anginosus</i>	CCUG 223
<i>S. epidermidis</i>	CCUG 23118
<i>N. meningitidis (gr. B)</i>	CCUG 23101
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 25177
<i>L. pneumophila</i>	CCUG 33058
<i>Bacillus cereus</i>	CCUG 36925
<i>Clostridium perfringens</i>	CCUG 1795T
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	CCUG 9994T

2.2.1 Eksterne kvalitetskontroller (QCMD-panel)

Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) er et eksternt kvalitetskontroll-program som benyttes for å kvalitetssikre ulike laboratoriers analysemetoder. Et QCMD-panel blir sendt ut til en rekke laboratorier, og blir analysert i laboratoriets rutine med standard prosedyre. Resultatene fra analysen blir sendt tilbake til QCMD, som vurderer om oppnådde resultater kan godkjennes. Avhengig av hvilken kategori de ulike kontrollprøvene tilhører, vil

et negativt resultat på en panelprøve ha ulik betydning. Kategorien «Core» omfatter prøver som må detekteres for å få godkjent kvalitetsvurdering. Prøver i kategorien «Educational» er med som en utfordring, og er til læring for laboratoriet. Det er dermed ikke et krav at «Educational»-prøver skal ha blitt detektert for å få godkjent kvalitetsvurderingen.

Ved etablering av nytt PCR-assay ble det benyttet seks QCMD-panel fra årene 2020, 2021 og 2022. De ulike prøvene bestod av plasma og fostervann. Se Vedlegg 4 for tabell med oversikt over de ulike QCMD-prøvene, og deres opprinnelig analyserte Ct-verdier ved AMM.

2.3 Primere og prober

Primere og prober for tre ulike PCR-assay ble undersøkt ved etablering av nytt real-time PCR-assay. Det allerede etablerte PCR-assayet som benyttes ved AMM er designet ved avdelingen, og navngis her som «T. gondii Rep529». De to PCR-assayene som ble vurdert som mulige, nye PCR-assay navngis «T. gondii B1 AMM» og «T. gondii B1 Gomez». T. gondii B1 AMM ble designet ved avdelingen, ved hjelp av programmet OLIGO Primer Analysis Software, Version 7, og T. gondii B1 Gomez ble hentet fra en artikkel om intraokulære infeksjoner med *T. gondii* (18). Informasjon om de ulike primerne og probene er oppgitt i Tabell 2. Reporter-fluoroforene som ble benyttet i analysene var FAM (520 nm) i PCR-assayet for Rep529-sekvensen, og Texas Red (603 nm) for B1-genet.

Tabell 2: Ulike PCR-assay for *T. gondii*, som ble undersøkt ved etablering av nytt real-time PCR-assay.

Tabellen gir opplysninger om PCR-assayenes målsete, primer- og probenavn, gensekvens, merking av proben og forventet lengde på PCR-produkt. F = forward primer, R = reverse primer, TM = TaqMan probe, BHQ2 = ikke-fluorescerende molekyl (Quencher). Forventet lengde på PCR-produkt er oppgitt i antall basepar (bp).

PCR	Målsete	Primere/ Probe	Sekvens 5'-3'	Merking	Forventet lengde på PCR- produkt
T. gondii Rep529	Rep529	ToxoF	TCAGGACTGTAGATGAAGG		
		ToxoR	CCATCACCACGAGGAAAG		
		ToxoTM	TCGTCTAGATCGCATTCCGGT	5'FAM 3'BHQ2	
AMM- assay	B1	ToxoB1_F	GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG		153 bp
		ToxoB1_R	CTATCGATTGCAGGCGACCA		
		ToxoB1_TM	TGCATAGGTTGCAGTCACTGACGAG	5'TEX 3'BHQ2	
Gomez- assay	B1	GZ_B1_F	GAAAGCCATGAGGCATTCCA		71 bp
		GZ_B1_R	TTCACCCGGACCGTTTAGC		
		GZ_B1_TM	CGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGATACA	5'TEX 3'BHQ2	

Tillaging av stockløsninger (100 μ M) med primere og probe for PCR-assayene er beskrevet i Vedlegg 5 og Vedlegg 6. Disse ble fortynnet med MGW, til bruksløsninger på 12 μ M for primerne og 8 μ M for probene.

2.4 Reaksjonsmiks til PCR

Reaksjonsmiks til PCR-oppsettene ble laget ved å blande PCR-miks, MGW, primere og probe. PCR-miksen som ble benyttet var «Custom Multiplex PCR SuperMix, UNG» fra Quantabio. PCR-miksen inneholder magnesiumklorid, nukleotider og DNA-polymerase. Disse komponentene kreves i tillegg til primere og probe, for å kunne gjennomføre en PCR-analyse. Volum av de ulike komponentene for tillaging av reaksjonsmiks til én prøve er vist i tabell 3.

Tabell 3: Tabellen viser mengde (μ l) tilsatt PCR-miks, MGW, primer forward (F), primer reverse (R) og probe for å lage reaksjonsmiks for én prøve.

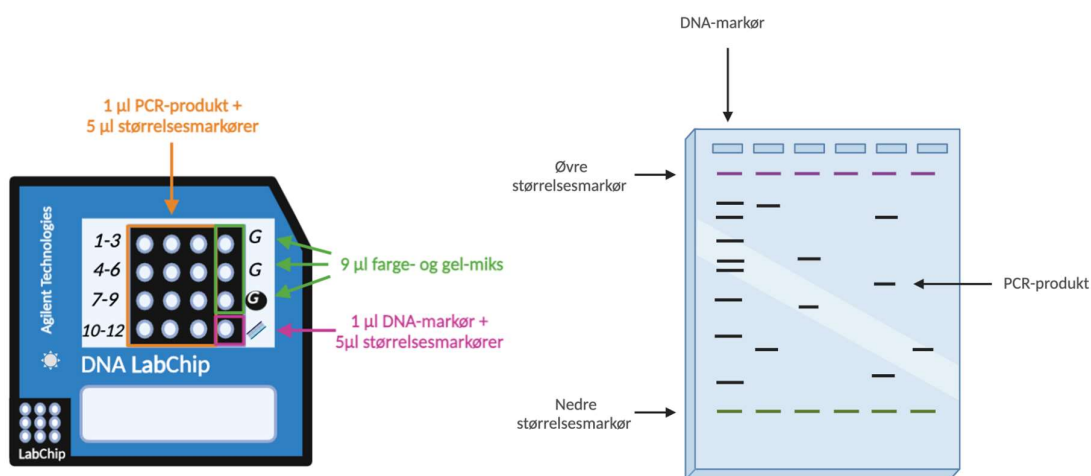
PCR-miks	MGW	Primer (F)	Primer (R)	Probe
10 μ l	3,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l

I hver brønn i PCR-platen ble det tilsatt 5 μ l prøvemateriale og 15 μ l reaksjonsmiks. Sluttkonsentrasjon av primere for PCR-assayene var 0,3 μ M og sluttkonsentrasjon av prober for de samme assayene var 0,2 μ M. I oppsettet benyttes også MGW som en negativ kontroll, og Vircell-kontroll i fortynning 1:100 som en positiv kontroll. Ved analysering av de to nye PCR-assayene, ble dette standard oppsettet benyttet. PCR-analysene ble gjennomført på instrumentet CFX96 TM Real-Time system. Protokoll for de ulike programmene som ble benyttet for analysering er oppgitt i Vedlegg 7.

2.5 Kontroll av PCR-produkt

Analyseinstrumentet «Agilent 2100 Bioanalyzer» ble benyttet til å bestemme størrelse på PCR-produkt. Instrumentet bruker en DNA 7500 LabChip med tilhørende reagens-kit for analysering. Reagensene som tilhører analysen er en farge- og gel-miks, en øvre og nedre størrelsesmarkør og en DNA-markør. Farge- og gel-miks og øvre og nedre størrelsesmarkør, ble tilsatt i de aktuelle brønnene på gel-chipen. Prøvemateriale og kontroller, i form av PCR-produkt, ble deretter tilsatt i separate brønner. Gel-chipen inneholder en respektiv brønn for DNA-markøren, som sørger for en presis størrelsesbestemmelse og kvantitering av PCR-produkt. Denne ble tilsatt i en avmerket brønn, alene uten PCR-produkt. Analysen ble fullført

etter omkring 30 minutter, og resultatet ble fremstilt i et digitalt bilde på tilkoblet datamaskin. Reagenser og volum tilsatt i de ulike brønnene på gel-chipen, samt eksempel på utført kapillærelektroforese, er illustrert i Figur 5.



Figur 5: Illustrasjon av gel-chip og eksempel på utført kapillærelektroforese. Gel-chipen illustrerer de 12 ulike brønnene i et oppsett, med tilsatt volum av reagenser og PCR-produkt. Eksempel på kapillærelektroforese illustrerer øvre og nedre størrelsesmarkører, DNA-markør og PCR-produkt. Reelle resultater leses ikke direkte av gelen, men fremstilles i et digitalt bilde på tilkoblet datamaskin. Figurene er laget i BioRender.com.

2.6 Første PCR-analyse ved bruk av nye primerpar og prober

Ved denne analysen ble det undersøkt om real-time PCR-assayene ville binde seg til sitt respektive målsete på B1-genet. For å undersøke dette ble Vircell-kontrollen analysert i to ulike fortyntninger. De to fortyntningene på henholdsvis 1:100 og 1:1000, ble analysert i triplerter. Ved bruk av en kontroll i to ulike fortyntninger er det mulig å undersøke om avstanden i Ct-verdi blir som forventet. Avstanden i Ct-verdi kan beregnes slik, der n er antall sykler mellom hver Ct-verdi:

$$2^n = \text{fortynningsfaktor} \quad (3)$$

I en ti-folds fortyntningsrekke, der fortyntningsfaktoren er 10, vil likningen bli $2^n = 10$, og $n = 3,32$, altså vil Ct-verdiene ha intervaller på cirka 3,32 for hver fortyntning (16).

Det ble også benyttet en negativ kontroll med MGW. Prøvene ble analysert på CFX96 med programmet «Perfecta 2-step TM55». Perfecta 2-step TM55 er et standard program de fleste PCR-analysene ved AMM utføres på, og ble derfor benyttet som et utgangspunkt for denne analysen.

2.7 Optimalisering av annealingtemperatur

PCR-assayets optimale annealingtemperatur ble undersøkt ved hjelp av et standardisert gradientprogram på CFX96. Gradientprogrammet analyserer tilsatte prøver på ulike temperaturer mellom 50°C og 60°C. Analysen ble gjennomført med to fortyninger av den positive Vircell-kontrollen, på henholdsvis 1:100 og 1:1000, i tillegg til MGW som en negativ kontroll. Denne ble tilsatt i en brønn der temperaturen ville være cirka 55 °C. Kontrollene ble analysert på CFX96 med programmet «Gradient50-60 Perfecta 2-step». Analysen ble utført hver for seg på de to real-time PCR-assayene rettet mot B1-genet.

2.8 Negative pasientprøver analysert med annealingtemperatur på 55 °C

Etter undersøkelse av optimal annealingtemperatur, ble det gjort PCR-analyse på pasientprøver ved 55 °C, da denne temperaturen var mest optimal. For hvert av de to assayene ble henholdsvis ti og åtte ulike negative pasientprøver analysert etter standard prosedyre. Prøvene ble så analysert på CFX96 med programmet «Perfecta 2-step TM55». Etter endt PCR-analyse ble prøvene analysert videre på Agilent 2100 Bioanalyzer.

2.9 Negative pasientprøver analysert med annealingtemperatur på 58°C og 60 °C

Resultatene fra gel for analysen utført med annealingtemperatur på 55 °C, viste at det var nødvendig å undersøke forbedringspotensialet i analysen ved å benytte en høyere annealingtemperatur. Temperaturer på henholdsvis 58°C og 60 °C ble undersøkt. Det ble utført en ny analyse med fire av de negative prøvene det var noe igjen av. Prøvene ble analysert på CFX96 med programmet «Perfecta 2-step TM58» og «Perfecta 2-step TM60». Etter endt PCR-analyse ble PCR-produktet analysert videre på Agilent 2100 Bioanalyzer.

2.9.1 Videre undersøkelse av uspesifikke bånd

For videre undersøkelse av de observerte uspesifikke båndene, ble det både analysert spikede negative pasientprøver (negative pasientprøver tilsatt positivt materiale) og prøver med tilsetning av dimetylsulfoksid (DMSO). DMSO har vist seg å kunne ha god effekt på PCR-analyser der uspesifikke bindinger dannes, da det hindrer danning av sekundære strukturer. Dette ble kun analysert på AMM-assayet, da de uspesifikke båndene var mest fremtredende her.

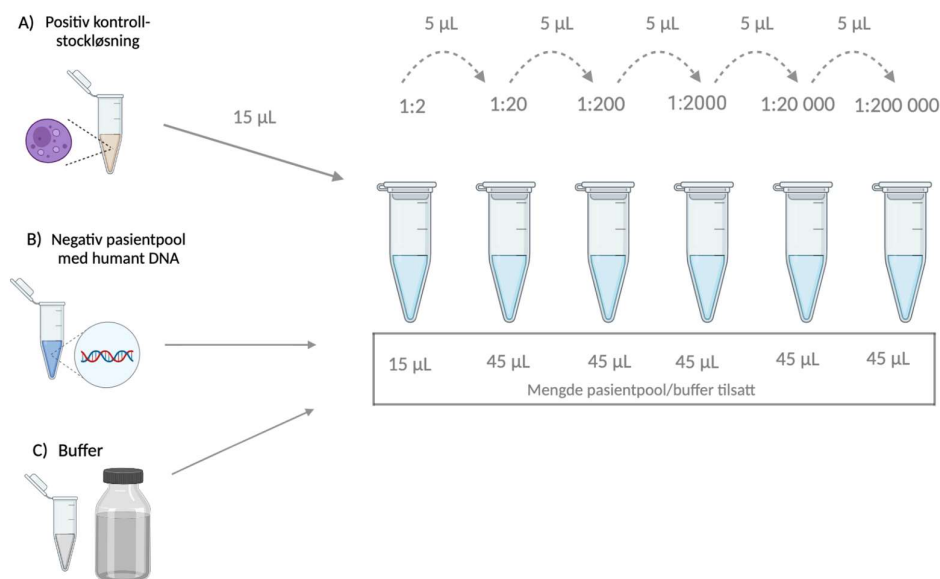
Negativ pasientpool med prøver fra bronkialsyllevæske, fosterhinne, post mortem vev og hjerteblod, ble spiket med positiv kontroll til to ulike konsentrasjoner. Dette ble gjort for å se hvilken effekt ulike mengde positivt materiale ville ha å si for tilstedeværelsen av de uspesifikke båndene. Spiket pool med konsentrasjon 1:100 ble laget ved å tilsette 18µl negativ pool og 2µl positiv kontroll med konsentrasjon 1:10. Spiket pool med konsentrasjon 1:1000 ble laget ved å tilsette 18µl negativ pool og 2µl positiv kontroll med konsentrasjon 1:100. Prøvene ble analysert på CFX96 programmet «Perfecta 2-step TM55». Etter endt PCR-analyse ble PCR-produktet analysert på Agilent 2100 Bioanalyser.

Spikede pasientpools av ulike fortyning ble i en annen analyse tilsatt DMSO. Det ble benyttet DMSO fra Sigma-Aldrich for analysering av disse prøvene. Det ble laget en miks med 5% DMSO, der 7µl av MGW ble byttet ut med 7µl DMSO, slik at DMSO utgjorde 5% av totalvolumet, inkludert prøvemateriale. Det ble benyttet spikede pasientpools med fortyninger på 1:100, 1:1000 og 1:10 000. Prøvene ble analysert på CFX96 programmet «Perfecta 2-step TM55». Etter endt PCR-analyse ble PCR-produktet analysert på Agilent 2100 Bioanalyser.

2.10 Effektivitetsanalyse

Effektiviteten til PCR-assayene ble undersøkt ved å analysere positiv kontroll i ulike fortyninger, både i pasientpool og elueringsbuffer. Elueringsbufferen ble benyttet for å avdekke uspesifikk binding av primere til humant DNA, eller andre komponenter i eluat fra pasientprøver, som kan ha innvirkning på effektiviteten. Elueringsbufferen er et godt bevaringsmiddel for ekstraherte nukleinsyrer, og er gunstig å benytte da det ikke inneholder humant materiale. Elueringsbufferen som ble benyttet tilhørte NUCLISENS easyMAG.

Det ble laget en ti-folds fortyningsrekke av den positive Vircell-kontrollen. Ti-folds fortyningsrekken hadde utgangspunkt i en ren stockløsning, og ble fortynt til 1:200 000 både i pasientpool og elueringsbuffer. Oppsettet er vist i Figur 6. I den første fortyningen, 1:2 fortyning, ble det tilsatt 15µl stockløsning og 15µl av pasientpool eller buffer. Ut fra 1:2 fortyningen ble det laget en ti-folds fortyningsrekke, der det ble pipettert ut 5µl fortyning, som ble tilsatt i 45µl pasientpool eller buffer. Det ble pipettert ut 5µl fra den foregående fortyningen, til en endelig fortyning på 1:200 000 ble nådd.



Figur 6: Figuren viser oppsett av en ti-folds fortynningsrekke ut fra 1:2 fortykning av den positive stockløsningen. 15 µL stockløsning fra positiv Vircell-kontroll ble tilsatt sammen med 15 µL negativ pasientpool eller buffer, og dette utgjorde en 1:2 fortykning. Videre ble det pipettert ut 5 µL fortykning, og tilsatt 45 µL negativ pasientpool eller buffer, som ble repetert til fortyningen nådde 1:200 000. Figuren er laget i BioRender.com.

Pasientpoolen som ble benyttet i effektivitetsanalysen for analyse med AMM-assayet, inneholdt negative prøver fra abscessinnhold, leddvæske, spinalvæske, post mortalt vev og fostervann. Poolen som ble benyttet for analyse med Gomez-assayet inneholdt fostervann, fullblod, post mortalt vev, placentavev og bronkialsyllevæske.

Pasientpool og elueringsbuffer med ulike fortyninger ble analysert i tripler på CFX96, med programmet «Perfecta 2-step TM55».

2.11 Undersøkelse av sensitivitet

For å undersøke analysens deteksjonsgrense ble det benyttet en pasientpool og elueringsbuffer spiket med positiv kontroll, der løsningene ble fortennet til tre ulike konsentrasjoner.

Fortynning på 1:2000 av pasientpool og elueringsbuffer, fra oppsett for effektivitetsanalyse, ble benyttet som utgangspunkt for å lage fortyninger av pasientpool og elueringsbuffer. Ut ifra resultatene fra effektivitetsanalysen, ble deteksjonsgrensen undersøkt med fortyninger på 1:20 000, 1:100 000 og 1:200 000 for AMM-assayet. For Gomez-assayet ble

deteksjonsgrensen undersøkt med fortyninger på 1:10 000, 1:20 000 og 1:100 000. For å kunne fastslå en deteksjonsgrense er det ønskelig med minst 20 paralleller av hver konsentrasjon, for å få et best mulig gjennomsnitt. Prøvene som allerede var analysert i effektivitetsanalysen ble regnet med i analysering av deteksjonsgrensen som tre av de tjue prøvene. Fortyningene ble analysert på CFX96 med programmet «Perfecta 2-step TM55».

2.12 Bakteriepanel til spesifisitetsundersøkelse

For analysens spesifisitet er det viktig at hvert PCR-assay kun binder seg spesifikt til sin respektive målsekvens. Til å undersøke dette ble det benyttet et bakteriepanel med en rekke kjente bakterier, for å se om primere og probe bandt seg uspesifikt til disse eller ikke. Tabell 1 viser en oversikt over de 19 bakterieartene som ble benyttet ved spesifisitetsanalysen. Prøvene ble analysert på CFX96 med programmet «Perfecta 2-step TM55».

2.13 Eksterne kvalitetskontroller (QCMD-panel)

Som en kontroll på om PCR-assayene ga ønsket Ct-verdi, ble de to PCR-assayene analysert på seks QCMD-panel. QCMD-panelene var allerede testet på *T.gondii* Rep529-assayet, da dette er assayet som benyttes i rutinen og derfor jevnlig gjennomgår slike tester. På bakgrunn av noen litt eldre daterte test-panel, ble *T.gondii* Rep529-assayet analysert på nytt for å se om test-panelenes verdi hadde endret seg ved lagring i frys. Se Vedlegg 4 for tabell med oversikt over QCMD-prøvene og deres Ct-verdier. Prøvene ble analysert på CFX96 med programmet «Perfecta 2-step TM55».

2.14 Analyse av positive pasientprøver

Som en siste analyse ved undersøkelse av primerne og probe, ble det gjennomført PCR av positive pasientprøver på CFX96, med programmet «Perfecta 2-step TM55». Analysen ble utført på alle de tre PCR-assayene. Grunnet sparsomme mengder med positivt prøvemateriale for *T. gondii* ved St. Olavs Hospital, ble også prøver tilsendt fra Rikshospitalet, analysert.

3 Resultater

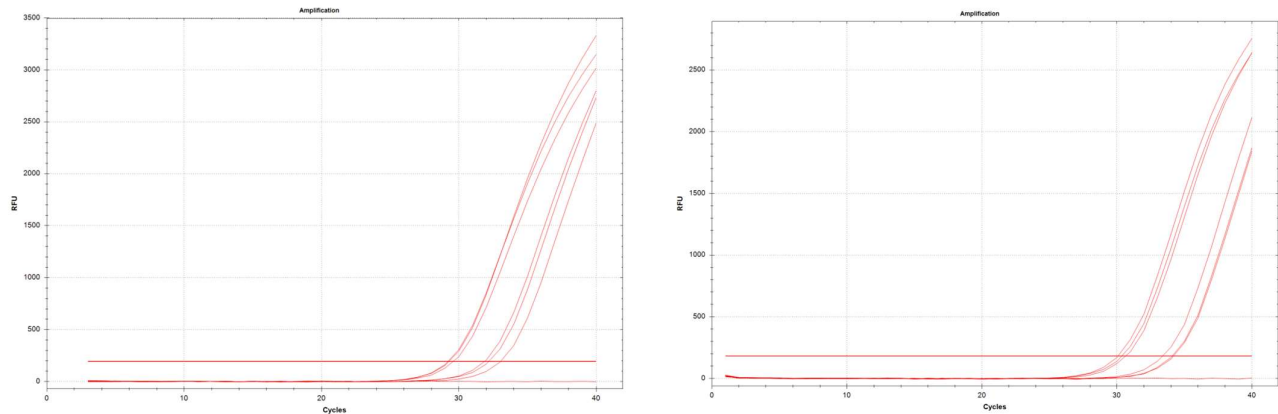
3.1 Første PCR-analyse av *T. gondii* ved bruk av de nye real-time PCR-assayene

Hensikten med å utføre den første PCR-analysen av de nye PCR-assayene, var å se om tilstedeværelse av *T. gondii* i en prøve ble detektert. Det ble undersøkt om de ulike primerne og probene kunne binde seg til sitt respektive målsete. Analysen ble gjort på to positive kontroller med ulik fortynning, og MGW som negativ kontroll, ved å følge standard oppsett for PCR. Det ble benyttet en standardisert Perfecta-miks for begge assayene. Programmet som ble benyttet var «Perfecta 2-step TM55», med en annealingtemperatur på 55°C og Texas Red som fluorofor.

Etter endt analysering viste reaksjonskurvene at begge assayene gir kurver med sigmoid form. Den negative kontrollen ble negativ for begge assayene. Reaksjonskurver for assayene er vist i Figur 7. Tabell 4 viser en oversikt over gjennomsnittlig Ct-verdi på kontrollene analysert med begge PCR-assayene, samt differanse i Ct-verdi mellom kontrollene.

Tabell 4: Gjennomsnittlige Ct-verdier for positiv Vircell-kontroll i to ulike fortynninger (1:100 og 1:1000) analysert med *T. gondii* B1 AMM og *T. gondii* B1 Gomez, samt differansen i Ct-verdi mellom de to kontrollene.

	Fortynnet kontroll	Gjennomsnittlig Ct-verdi i tripllettene	Differanse mellom de to kontrollene
T.gondii B1 AMM	1:100	29,35	3,01
	1:1000	32,36	
T.gondii B1 Gomez	1:100	30,64	3,25
	1:1000	33,89	

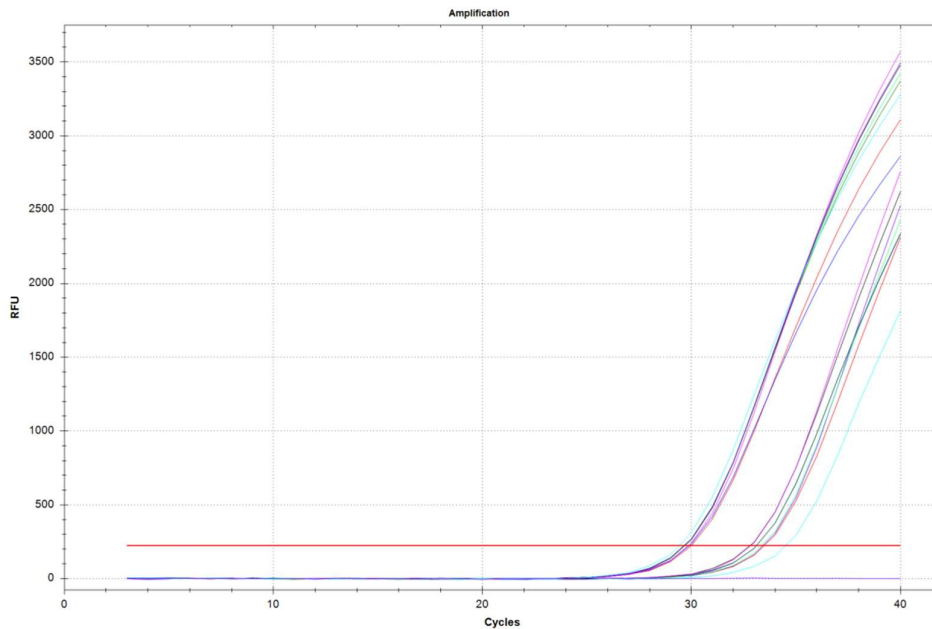


Figur 7: Til venstre: Reaksjonskurver for *T. gondii* B1 AMM assay på CFX96. Til høyre: Reaksjonskurver for *T. gondii* B1 Gomez assay på CFX96. For begge assayene er kurvene med lavest Ct-verdier, tripler av kontrollen med fortykning 1:100. Kurvene med høyest Ct-verdier er tripler av kontrollen med fortykning 1:1000. Den negative kontrollen er den nederste rette linjen, som ikke har fått noen økning i signal.

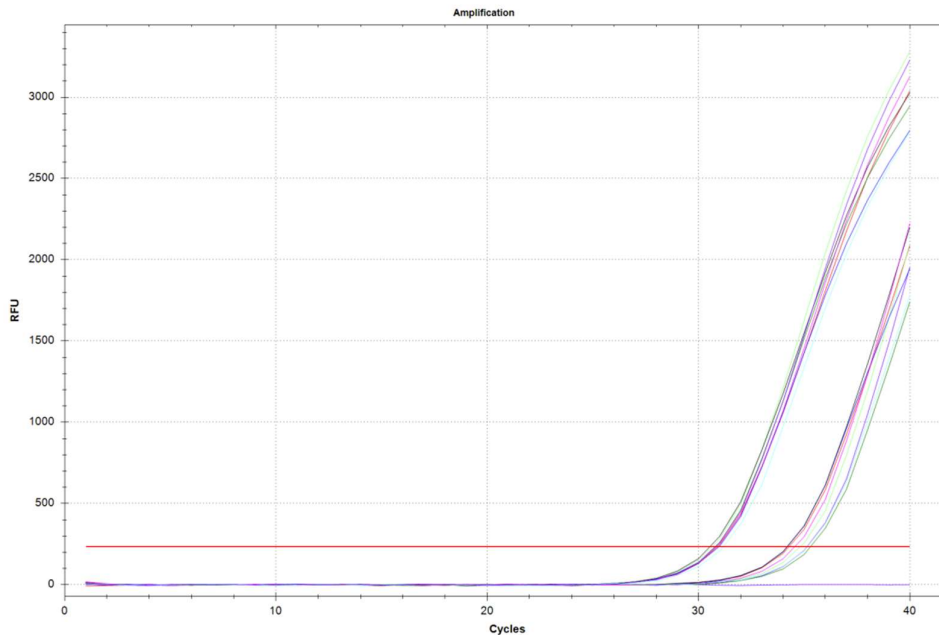
3.2 Optimalisering av annealingtemperatur

Det er ønskelig å finne en annealingtemperatur hvor primerne binder seg til kun målsekvensen. Ved å undersøke optimal annealingtemperatur for de nye real-time PCR-assayene, ble det vurdert ved hvilken temperatur analysen gir best resultat. Analysen ble utført ved å benytte to positive kontroller av ulik fortykning, og analysere disse på det egendefinerte programmet «Gradient50-60 Perfecta 2-step» på CFX96. Etter endt analysing viser resultatene for AMM-assayet at Ct-verdiene jevnt over var tilnærmet like, uavhengig av temperatur for hver av de to fortykningene. Likevel hadde 1:1000-kontrollen som ble analysert på 50,7°C, illustrert som den turkise kurven, en noe høyere Ct-verdi. Gomez-assayet fikk også tilnærmet like Ct-verdier for hver av de to kontrollene ved de ulike temperatuene. Reaksjonskurver for de to assayene er vist i Figur 8 og 9.

Ut fra disse resultatene ser det ut til at alle temperaturer er mulige å benytte for begge assayene. Ettersom 55°C benyttes i rutinen, er dette temperaturen det ble analysert videre på.



Figur 8: Resultater fra undersøkelse av optimal annealingtemperatur på CFX96 for *T. gondii* B1 AMM. To kontroller med fortynning på 1:100 og 1:1000 ble analysert på temperaturer mellom 50°C og 60°. Kurvene for de to kontrollene ved de ulike temperatuene er samlet. Et unntak er kurven med høyest Ct-verdi (turkis kurve) for AMM-assayet, der 1:1000-kontrollen er analysert med annealingtemperatur på 50,7°C.

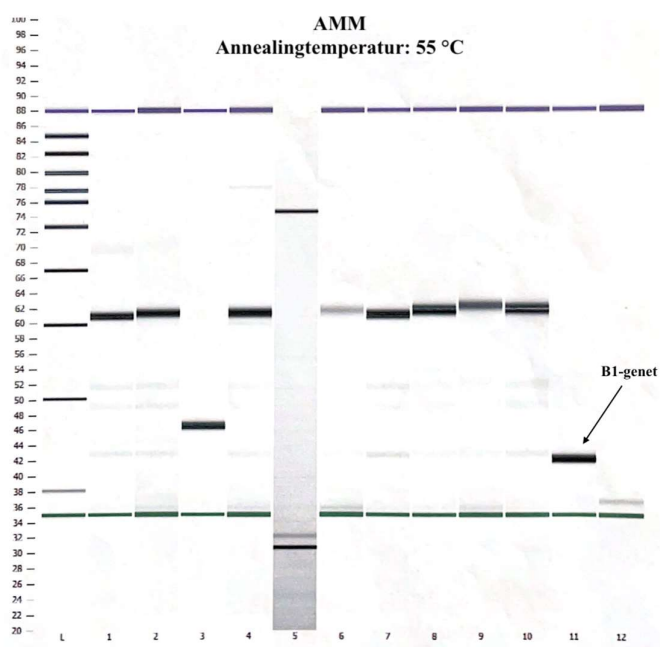


Figur 9: Resultater fra undersøkelse av optimal annealingtemperatur på CFX96 for *T. gondii* B1 Gomez. To kontroller med fortynning på 1:100 og 1:1000 ble analysert på temperaturer mellom 50°C og 60°C. Kurvene for de to kontrollene ved de ulike temperatuene er samlet

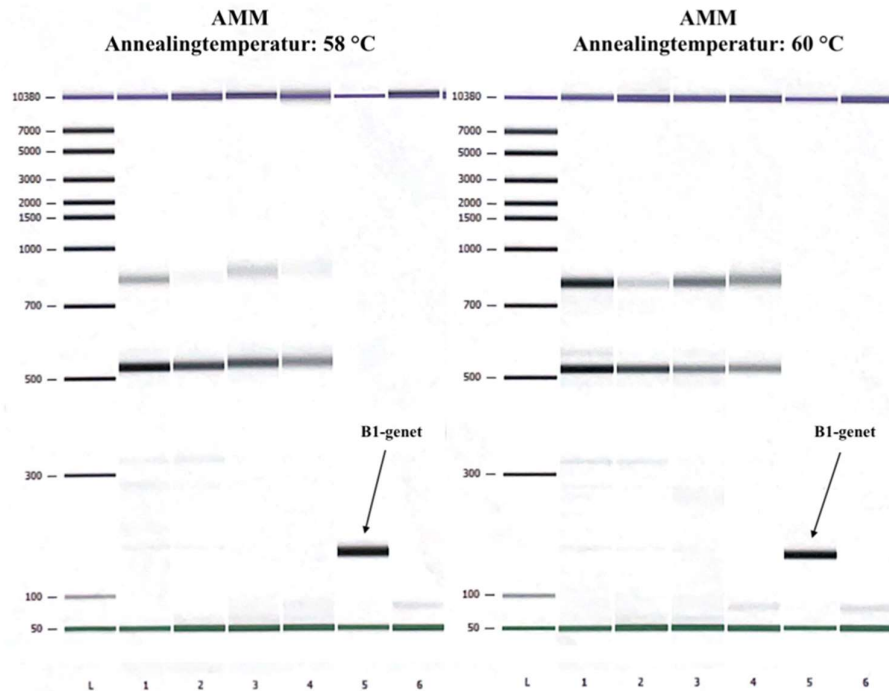
3.3 Negative pasientprøver analysert ved 55°C, 58°C og 60°C

Hensikten med å analysere negative pasientprøver var å undersøke om de ulike assayenes primere og prober ville binde seg spesifikt til målsekvensen, og ikke uspesifikt til humant DNA. Analysen ble utført ved 55°C, 58°C og 60°C. Etter endt analysering på både CFX96 og Bioanalyser, ble reaksjonskurve, Ct-verdier og gel-resultater vurdert.

Resultatene fra analysering på CFX96 viser at kun den positive kontrollen i oppsettene ble detektert, mens de negative prøvene og den negative kontrollen forble negative. Resultater fra analysering av AMM-assayet på Bioanalyser, vist i Figur 10 og Figur 11, viser et tydelig bånd for den positive kontrollen ved alle temperaturer, med en lengde som forventet. Med økende temperaturer ble dette båndet kraftigere. Det observeres i tillegg kraftige, uspesifikke bånd på de negative pasientprøvene, med lengder på cirka 240 og 540 basepar. Med økende temperatur blir også de uspesifikke båndene kraftigere. Ved 60°C har enkelte prøver doble, uspesifikke bånd, med lengder på omkring 525 og 820 basepar. Den negative kontrollen har fått et svakt, uspesifikt bånd på omtrent 75 basepar, ved alle temperaturene for AMM-assayet.

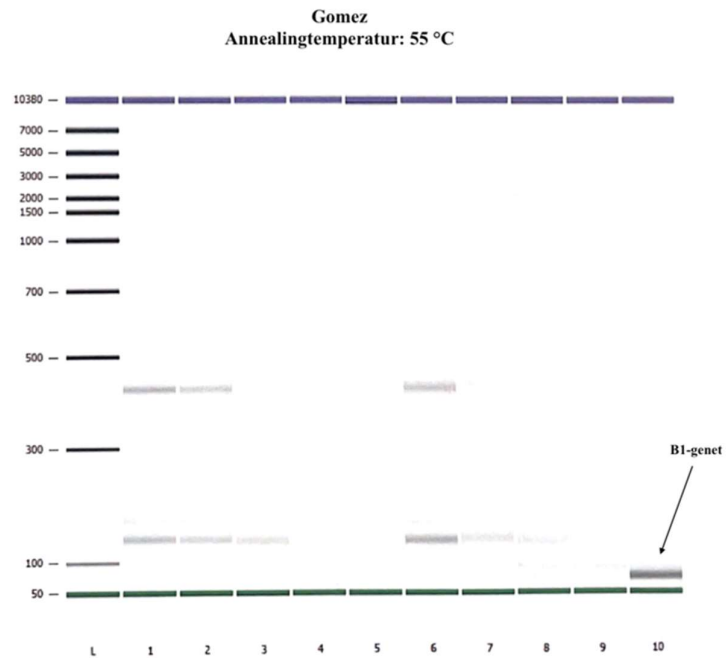


Figur 10: Resultat fra Bioanalyser for analyse av AMM-assay, med en annealingtemperatur på 55 °C. Baseparstørrelsen er ikke angitt som måleenhet her, grunnet problemer med å finne øvre og nedre størrelsesmarkør i brønn 5 på gel-chipen. Baseparstørrelse er derfor erstattet med sekunder. Negative prøver er tilsatt i brønnene 1-10, positiv kontroll i brønn 11 og negativ kontroll i brønn 12. Brønnen merket «L» er tilsatt DNA-markør.

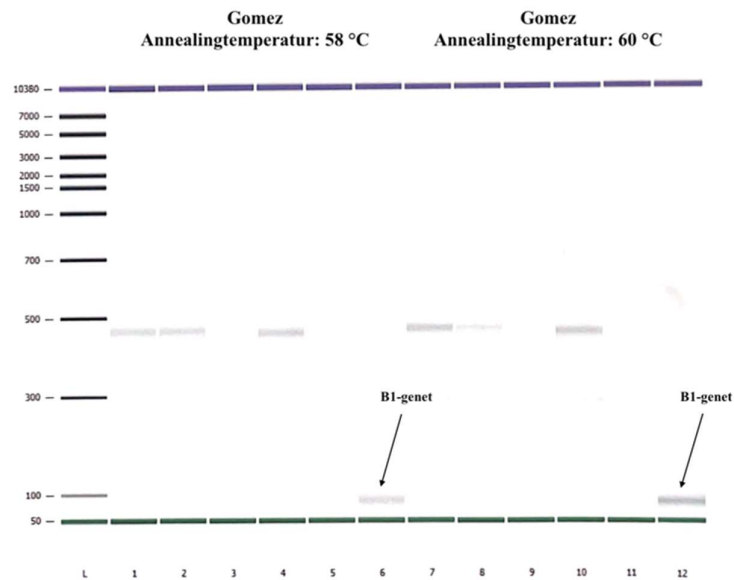


Figur 11: Resultater fra Bioanalyser for analyse av AMM-assay, med annealingtemperaturer på 58 °C og 60 °C. Baseparstørrelsen er angitt som måleenhet for størrelse på PCR-produktene. Negative prøver er tilsatt i brønnene 1-4, positiv kontroll i brønn 5 og negativ kontroll i brønn 6. Brønnen merket «L» er tilsatt DNA-markør.

Analysering av Gomez-assayet med en annealingtemperatur på 55°C, vist i Figur 12, ga et tydelig bånd for den positive kontrollen, med en lengde som forventet. Ved samme analyse på 58°C er kontrollens bånd svakere, men blir kraftigere igjen ved 60°C, vist i Figur 13. De negative pasientprøvene får kun veldig svake, uspesifikke bånd på cirka 140 og 430 basepar, og temperaturendringene påvirker ikke de uspesifikke båndene i noen særlig grad. Den negative kontrollen får ingen bånd ved noen av temperaturene ved analysering av Gomez-assayet.



Figur 12: Resultat fra Bioanalyser for analyse av Gomez-assay, med en annealingtemperatur på 55 °C. Baseparstørrelsen er angitt som måleenhet for størrelse på PCR-produktene. Negative prøver er tilsatt i brønnene 1-8, positiv kontroll i brønn 10 og negativ kontroll i brønn 9. Brønnen merket «L» er tilsatt DNA-markør.

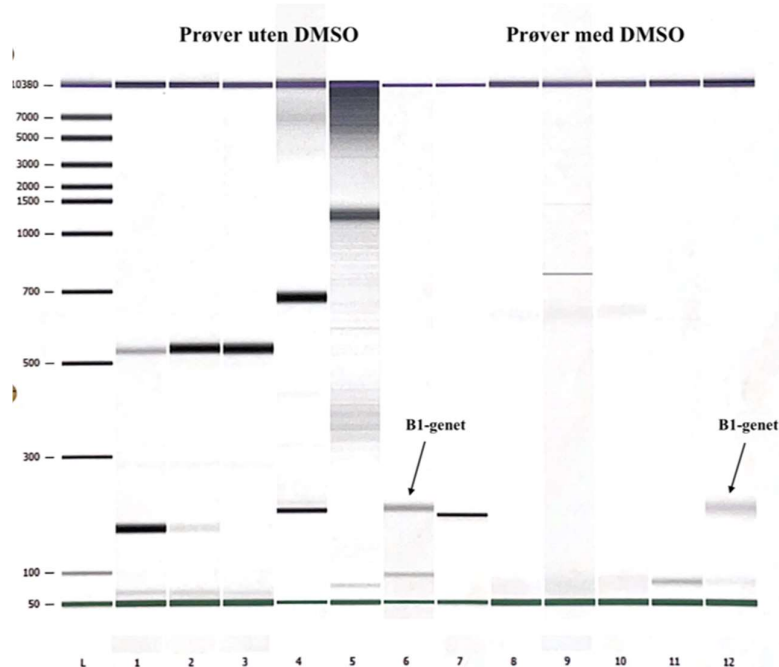


Figur 13: Resultat fra Bioanalyser for analyse av Gomez-assay, med en annealingtemperatur på 58 °C og 60 °C. Baseparstørrelsen er angitt som måleenhet for størrelse på PCR-produktene. Negative prøver er tilsatt i brønnene 1-4 og 7-10, positiv kontroll i brønn 6 og 12, samt negativ kontroll i brønn 5 og 11. Brønnen merket «L» er tilsatt DNA-markør.

3.3.1 Undersøkelse av uspesifikke bånd

Hensikten med å analysere spikede pasientprøver var å undersøke om uspesifikke bånd også ville dannes i positive prøver, og om det ville ha noe å si for deteksjon av B1-genet i AMM-assayet. For denne analysen ble det benyttet spikede pasientpools, med fortyntninger på 1:10 og 1:100. I tillegg ble PCR-produktet analysert på Bioanalyser. Resultater fra analysering på CFX96 og Bioanalyser viser at alle positive prøver ble detektert. Analysen på Bioanalyser viser at uspesifikke bånd var til stede i alle de spikede prøvene, men at disse båndene var kraftigere i prøver med lavere konsentrasjon.

Hensikten med å tilsette DMSO i spikede pasientpools, var å undersøke om dette ville redusere uspesifikke bindinger i analysen. PCR-miks med DMSO ble tilsatt sammen med tre fortyntninger av spikede pasientprøver, henholdsvis på 1:100, 1:1000 og 1:10 000. Resultatene fra CFX96 viser at alle de positive prøvene ble detektert. Analysen på Bioanalyser viser at ved tilsetning av DMSO fikk kun den sterkeste positive prøven et bånd, og at båndet for den positive kontrollen var svakt. I tillegg er det etter tilsetning av DMSO, minimalt med uspesifikke bånd for de spikede prøvene, vist i Figur 14.



Figur 14: Resultat fra Bioanalyser for analyse av spikede pasientpools med og uten tilsatt DMSO ved PCR-analyse. PCR-analysen ble utført med en annealingtemperatur på 55 °C. Baseparstørrelsen er angitt som måleenhet for størrelse på PCR-produktene. For oppsett uten tilsatt DMSO, ble spikede pasientpools tilsatt i

brønn 1-3, negativ pasientpool i brønn 4, negativ kontroll i brønn 5 og positiv kontroll i brønn 6. For oppsett med tilsatt DMSO, ble spikede pasientpooler tilsatt i brønn 7-9, negativ pasientpool i brønn 10, negativ kontroll i brønn 11 og positiv kontroll i brønn 12. Brønnen merket «L» er tilsatt DNA-markør.

3.4 Effektivitetsanalyse

Til effektivitetsanalyse av PCR-assayene, *T. gondii* B1 AMM og *T. gondii* B1 Gomez, ble to ti-folds fortynningsrekker av den sterkeste Vircell-kontrollen analysert. Effektiviteten til assayene ble undersøkt i en pasientpool og i en elueringsbuffer, derav to separate ti-folds fortynningsrekker. Hensikten med å undersøke to fortynningsrekker i materiale med og uten humant DNA, var å undersøke om potensiell, uspesifikk binding av primere til humant DNA ville gi en dårligere effektivitet. Fortynninger på 1:2, 1:20, 1:200, 1:2000, 1:20 000 og 1:200 000, ble analysert i tripletter for begge PCR-assayene, på programmet «Perfecta 2-step TM55».

Ut fra Ct-verdiene til fortynningenes tripletter, ble det framstilt en standardkurve ved hjelp av lineær regresjon i brukerprogrammet til CFX96. Standardkurver tilhørende de to fortynningsrekkene, analysert for begge PCR-assayene, er tilgjengelig i Vedlegg 8 og Vedlegg 9. Standardkurvene avhenger av punktene de ulike fortynningenes Ct-verdier danner, og vil påvirkes av differansen mellom punktene i tripllettene. Effektivitetsanalysene for begge assayene ga manglende signal for enkelte paralleller i fortynningene 1:20 000 og 1:200 000. Standardkurvene som ble generert er derfor basert på et mindre antall punkter enn det som regnes som ideelt. Resultatene for begge PCR-assayene er presentert i Tabell 5.

Tabell 5: Effektivitet, slope og korrelasjon funnet for assayene *T. gondii* B1 AMM og *T. gondii* B1 Gomez, i pasientpool og elueringsbuffer.

		Pasientpool av negative eluater	Elueringsbuffer
T. gondii B1 AMM-assay	Effektivitet (%)	91,0 %	102,2 %
	Slope	-3,556	-3,271
	Korrelasjon (r)	0,986	0,997
T. gondii B1 Gomez-assay	Effektivitet (%)	94,0 %	88,1 %
	Slope	-3,474	-3,644
	Korrelasjon (r)	0,995	0,995

3.5 Undersøkelse av sensitivitet

Basert på resultater fra effektivitetsanalysen, ble deteksjonsgrensen for de to, nye PCR-assayene forsøkt funnet. For AMM-assayet ble fortynninger på 1:20 000, 1:100 000 og 1:200 000 analysert videre, og fortynninger på 1:10 000, 1:20 000 og 1:100 000 ble analysert videre for Gomez-assayet. Tabell 6 viser en oversikt over antall positive paralleller for de ulike fortynningene. For å undersøke om humant materiale hadde betydning for assayenes sensitivitet, ble paralleller i de tre analyserte fortynningene også undersøkt i elueringsbuffer.

Tabell 6: Oversikt over antall positive paralleller, etter spiking, for hver fortynning i pasientpool og i elueringsbuffer, ved undersøkelse av deteksjonsgrense for PCR-assayene.

		Spiking i negativ pasientpool	Spiking i elueringsbuffer
T. gondii B1 AMM-assay	Antall positive 1:20 000	9/20	15/20
	Antall positive 1:100 000	8/20	10/20
	Antall positive 1:200 000	1/20	2/20
T. gondii B1 Gomez-assay	Antall positive 1:10 000	20/20	20/20
	Antall positive 1:20 000	15/20	15/20
	Antall positive 1:100 000	18/20	7/20

Resultater fra deteksjonsgrenseforsøket ble analysert med Probit i programmet SPSS. Verdier benyttet til beregningene er oppgitt i Vedlegg 10 og Vedlegg 11. Deteksjonsgrenser for begge assay i pasientpool av negative prøver og elueringsbuffer, er presentert med et konfidensnivå på 95% i Tabell 7.

Tabell 7: Deteksjonsgrenser funnet i pasientpool av negative prøver og elueringsbuffer, for assayene T. gondii B1 AMM og T. gondii B1 Gomez. Deteksjonsgrensene er funnet med et konfidensnivå på 95%, og oppgitt med deres 95% konfidensintervall (95% KI).

	Pasientpool av negative eluater	Elueringsbuffer
T. gondii B1 AMM-assay	36 kopier/PCR 95% KI: 12-1654 kopier/PCR	12 kopier/PCR 95% KI: 6-80 kopier/PCR
T. gondii B1 Gomez-assay	7 kopier/PCR 95% KI: 4-127 kopier/PCR	6,874 kopier/PCR 95% KI: 4-51 kopier/PCR

3.6 Bakteriepanel til spesifisitetsundersøkelse

Spesifisitetsundersøkelse med prøver av ulike bakteriestammer, listet opp i Tabell 1, ble utført på CFX96 med programmet «Perfecta 2-step TM55». Hensikten med analysen var å undersøke hvorvidt primere og prober ville binde seg spesifikt til *T. gondii*, og ikke til andre humanpatogene mikrober. Resultater for begge PCR-assayene viste ingen amplifisering av bakterielt DNA fra de ulike bakteriestammene, kun negative resultater. Positiv kontroll ble positiv for begge assayene, og genererte de eneste amplifiseringskurvene i analysen. Negativ kontroll ga negativt resultat for begge assayene.

3.7 Eksterne kvalitetskontroller (QCMD-panel)

Analyse av seks QCMD-paneler ble utført som en kontroll på assayenes evne til å angi korrekte resultater på positive og negative prøver for *T. gondii*. I tillegg til analyse av assayene *T. gondii* B1 AMM og *T. gondii* B1 Gomez, ble også *T. gondii* Rep529 reanalyisert. Dette ble utført for å undersøke om Ct-verdiene hadde endret seg fra opprinnelig analysering.

Både positive og negative prøver inngår normalt i QCMD-panelene. Alle negative prøver i de seks analyserte panelene ga et negativt resultat. Blant alle de positive prøvene var høye Ct-verdier et gjennomgående trekk, og ni av prøvene fikk et falskt negativt resultat for ett eller flere assay. Prøver med falske negative resultater er oppgitt i Tabell 8, og finnes også gjengitt i Vedlegg 4, med resterende Ct-verdier for alle prøvene og assayene.

Tabell 8: Prøver med falskt negativt resultat på ett eller flere assay, og spesifisering av kategori prøvene tilhører. Prøvenummerets tall angir tiåret QCMD-panelene ble sendt ut til og analysert ved laboratoriene.

Prøvenr.	T. gondii Rep529	T. gondii B1 AMM	T. gondii B1 Gomez	Kategori
20A	37,44	N/A	35,7	Educational
20D	37,99	N/A	N/A	Educational
20E	37,56	38,48	N/A	Educational
21C	39,25	N/A	35,54	Educational
21D	35,9	N/A	37,96	Educational
21E	N/A	N/A	N/A	Educational
22C	35,16	36,07	N/A	Core
22H	36,31	38,91	N/A	Educational
22I	37,52	N/A	35,56	Educational
Antall falskt negative	1	6	5	---

3.8 Analyse av positive pasientprøver

Analyse av positive pasientprøver ble utført på totalt fem prøver fra St. Olavs Hospital og ti prøver fra Rikshospitalet. Opprinnelige Ct-verdier for disse pasientprøvene er fremstilt i Vedlegg 1, analysert med Rep529 som målsete. Analyse av de positive prøvene ble utført med alle de tre assayene; T. gondii Rep529, T. gondii B1 AMM og T. gondii Gomez. Hensikten med denne analysen var å undersøke eventuelle forskjeller i Ct-verdi, og å se om *T. gondii* ble detektert i alle prøvene, uavhengig av assay. Resultatene viser at ingen av assayene detekterte *T.gondii* i prøve 2. I tillegg ble ikke parasitten detektert i prøve 10, 11 eller 15 ved analysering med AMM-assayet. Ct-verdier for prøvene analysert med de ulike assayene er gitt i Tabell 9.

Tabell 9: Ct-verdier for positive prøver fra Rikshospitalet og St.Olavs Hospital, analysert med tre ulike assay: T. gondii Rep529, T. gondii B1 AMM og T. gondii Gomez.

Prøve nr.	Prøvemateriale	T.gondii Rep529	T.gondii B1 AMM	T.gondii B1 Gomez
1	Buffycoat fra sentrifugert fullblod	30,63	33,17	32,14
2	Buffycoat fra sentrifugert fullblod	N/A	N/A	N/A
3	Vev Lymfeknute	34,11	34,09	33,88
4	Vev Placenta	31,32	34,75	32,09
5	Corpus Vitreum	21,51	24,21	22,04
6	Eluat - Corpus Vitreum	29,22	31,49	28,17
7	Eluat - Corpus Vitreum (fortynnet)	26,03	28,96	26,12
8	Corpus Vitreum	31,46	33,71	29,86
9	Corpus Vitreum	33,08	36,99	33,01
10	Corpus Vitreum	36,30	N/A	35,46
11	Vev Placenta	34,34	N/A	36,15
12	Eluat Spinalvæske	17,94	21,65	20,22
13	Vev Lymfeknute	32,58	36,75	33,72
14	Vev	18,21	19,30	18,79
15	Eluat Spinalvæske	39,65	N/A	34,04
Antall falskt negative		1	4	1

4 Diskusjon

Hensikten med denne oppgaven var å etablere en supplerende real-time PCR-analyse for diagnostikk av *T. gondii*, med B1-genet som målsete. I dette kapittelet blir resultatene diskutert og vurdert med hensyn på oppgavens formål. Enhver av analysene vil kunne føre med seg potensielle feilkilder, og resultatets gyldighet vil påvirkes av disse. Dermed er også feilkilder diskutert i dette kapittelet.

4.1 Første PCR-analyse av *T. gondii* ved bruk av de nye real-time PCR-assayene

For i det hele tatt å kunne vurdere om et assay kan benyttes for diagnostikk, er det nødvendig å vite om primere og probe binder seg til ønsket målsete. De genererte reaksjonskurvene for de to assayene viste at primerpar og probe festet seg til ønsket målsete i kontrollprøvene, og viste derfor at begge PCR-assayene for B1-genet kan detektere *T.gondii*.

De to kontrollene som ble analysert hadde en fortynningsfaktor på 10, og ut fra Formel 3 forventes en differanse i Ct-verdi på cirka 3,32 mellom disse. For AMM-assayet var differansen 3,01 og for Gomez-assayet var differansen 3,25, altså som forventet, og kan antyde en effektivitet nær 100%.

4.2 Optimalisering av annealingtemperatur og undersøkelse av negative pasientprøver

Gradientanalysen av de to assayene viste at alle temperaturer mellom 50°C og 60°C kan benyttes. En høyere Ct-verdi ved 50,7°C for den høyeste fortynningen i AMM-assayet, kan potensielt skyldes pipetteringsfeil, eventuelt mer interferens med humant DNA. I rutinen ved avdelingen benyttes 55°C oftest som et standard oppsett. Etersom begge assayene egnet seg like godt ved denne temperaturen, ble de analysert videre ved 55°C.

Etter undersøkelse av optimal annealingtemperatur, valgte vi å gå videre med en temperatur på 55°C. Derfra ønsket vi å undersøke om de to assayene kunne binde seg uspesifikt til humant DNA i pasientprøver ved denne temperaturen. Resultatene av analysen på CFX96 viste at pasientprøvene ble negative, og dette tyder på at probene ikke binder seg uspesifikt til humant DNA. Assayene vil, ut ifra denne analysen, ikke gi falskt positive resultater som følge av uspesifikk binding av probene.

Resultater av negative pasientprøver analysert på Bioanalyser, viste derimot flere uspesifikke bånd ved begge assayene. De uspesifikke båndene tyder på at primerne bandt seg uspesifikt, sannsynligvis til humant DNA, og ført til at andre sekvenser enn målsekvensen ble oppkopierte. Uspesifikke bindinger er ikke ønskelig, da dette tar opp kapasiteten i assayet og gjør at komponenter i PCR-miksen blir brukt opp. En konsekvens av dette kan være at svakt positive prøver ikke vil bli detektert. Dette kan skje ved at det ikke vil kopieres opp nok av målsekvensen, og signal fra proben vil ikke bli sterkt nok til å generere en positiv kurve. For AMM-assayet fikk også den negative kontrollen et svakt bånd med lengde rundt 75 basepar ved analyse i gel. Dette kan skyldes dannelse av primer-dimere.

Som følge av de observerte uspesifikke båndene ved 55°C, ble negative pasientprøver også analysert på 58°C og 60°C. Høyere annealingtemperatur skal resultere i mer spesifikk binding av primer til målsekvens, og føre til at kun målsekvensen blir kopiert opp. For AMM-assayet førte derimot økt annealingtemperatur til sterkere og doble uspesifikke bånd, altså uspesifikk binding til flere sekvenser. Resultatet viste altså det motsatte av det som var forventet, og er et resultat som ikke kan forklares. Analysen burde dermed, ideelt sett, gjennomføres på nytt. Dette ble ikke utført, da tid var en begrensende faktor. For Gomez-assayet var de uspesifikke båndene relativt svake ved 55°C, og økt annealingtemperatur resulterte fortsatt i tilstedeværelse av svake, uspesifikke bånd.

4.2.1 Undersøkelse av uspesifikke bånd

Ved analysering av spikede pasientprøver med ulike fortynninger, ble det også observert uspesifikke bånd. De positive prøvene ble detektert, men de uspesifikke båndene som var til stede viste at analysens kapasitet også kan ha blitt brukt opp på uspesifikke bindinger til humant DNA. Disse uspesifikke bindingene vil kunne redusere analysens effektivitet. Selv om de positive prøvene ble detektert, kan de uspesifikke bindingene utfordre deteksjon av veldig svake prøver, og medføre en risiko for feildiagnostisering.

Det ble utført et forsøk med 5% DMSO tilsatt i spikede pasientpooler av ulik fortynning, for å fjerne interferens fra humant DNA i prøver som viste sterke, uspesifikke bånd i gel. Dette ga et positivt resultat, med tydelig reduksjon av de uspesifikke båndene. Forsøket ble likevel ikke gått videre med, delvis på grunn av mangel på tid, samt at det ble konkludert med at tilsetning av dette reagenset er ugunstig for rutinen i den vanlige driften. Det er uønsket i rutinedrift fordi det avviker fra vanlig prosedyre og kan dermed øke sjansen for feil. I tillegg

har reagenset vist å ha ugunstige effekter for helse, miljø og sikkerhet. Det ble derfor ikke gjennomført noen supplerende forsøk med endret konsentrasjon. Ved videre undersøkelser ville dette vært nødvendig, da reagenset eliminerte en rekke uspesifikke bånd, men samtidig reduserte intensiteten til bånd som representerer B1-genet.

4.3 Effektivitetsanalyse

Utført effektivitetsanalyse for AMM-assayet ga resultater som viste at effektiviteten var bedre i elueringsbuffer, kontra poolen med negative pasientprøver. Et slikt resultat var sannsynlig, om ikke forventet, med tanke på uspesifikk binding til humant DNA i negativ pasientpool. Effektivitetsanalysen for Gomez-assayet ga derimot bedre resultater i den negative pasientpoolen enn i elueringsbufferen. Dette resultatet har ingen logisk forklaring, annet enn at det trolig kan skyldes feilkilder som pipetteringsfeil eller bruk av for lave konsentrasjoner ved fortykningene. For effektivitetsanalysene ble det generert standardkurver basert på et færre antall punkter enn optimalt, som følge av at de analyserte konsentrasjonene lå nært deteksjonsgrensene. Analysen burde av denne årsaken blitt repetert på nytt, med en positiv kontroll av høyere konsentrasjon enn den som ble benyttet i disse forsøkene. Det ble ikke benyttet en høyere konsentrasjon i disse analysene, da det ikke var tilgjengelig på laboratoriet.

4.4 Undersøkelse av sensitivitet

AMM-assayet detekterte flere av parallellene i elueringsbufferen enn i pasientpoolen, men viste ikke en betydelig forskjell med hensyn på antallet paralleller som ble analysert. Tabell 7 viser likevel at deteksjonsgrensen i pasientpoolen ble funnet til å være tre ganger høyere enn i elueringsbufferen, og vil kunne indikere en dårligere sensitivitet ved humant DNA til stede i analyse materialet. Deteksjon av paralleller for Gomez-assayet viste seg å være helt lik med og uten humant DNA til stede, frem til den laveste konsentrasjonen. For den laveste konsentrasjonen ble flere paralleller positive i den negative pasientpoolen enn i elueringsbufferen. Heller ikke her har resultatet for Gomez-assayet en logisk forklaring, men vil høyst sannsynlig skyldes feilkilder som har med pipetteringsarbeidet å gjøre. I tillegg er det flere positive paralleller for den laveste konsentrasjonen i pasientpoolen, enn i den nest laveste konsentrasjonen i pasientpoolen, som også er et uventet resultat. Beregnet deteksjonsgrense i pasientpool og elueringsbuffer for Gomez-assayet ble likevel funnet til å være svært like.

4.5 Bakteriepanel til spesifisitetsundersøkelse

Resultatene av spesifisitetsanalysen på bakteriepanelet viste at parasitten vil kunne detekteres spesifikt blant mange humanpatogene mikroorganismer, og indikerer en god spesifisitet. Selv om forekomsten av toxoplasmose er relativt lav i Norge, vil spesifikk deteksjon av parasitten være avgjørende for enkelte pasienter, og av stor betydning for eventuell videre behandling. Laboratoriet skal kunne gi ut korrekte prøvesvar med en høy grad av sikkerhet, og spesifisitetsundersøkelsen bidrar til dette ved å sikre at korrekt mikrobe blir detektert.

4.6 Eksterne kvalitetskontroller (QCMD-panel)

Hensikten med å analysere flere QCMD-panel, var å undersøke assayenes evne til å gi korrekte resultater på positive og negative prøver for *T. gondii*. Av de 30 prøvene som ble analysert, fikk Rep529-assayet 29 korrekte resultater, AMM-assayet fikk 24 korrekte resultater og Gomez-assayet fikk 25 korrekte resultater, mens et par av prøvene ble angitt som falskt negative. Prøve 21E ble negativ i alle assayene, noe som potensielt kan forklares med degradering og tap av DNA ved lagring. Opprinnelig Ct-verdi var dessuten relativt høy, slik at små endringer kan være avgjørende for om resultatet blir positivt eller negativt. Prøvenes resultater i Vedlegg 4, viser at det jevnt over er nokså like Ct-verdier for *T. gondii* Rep529 ved reanalysering, selv om det er tydelig at et par av Ct-verdiene er blitt høyere. Trolig vil også dette kunne skyldes degradering og tap av DNA ved lagring.

Resultatene viser at seks prøver ble falskt negative for AMM-assayet og fem falskt negative for Gomez-assayet. Alle de falske negative prøvene for AMM-assayet er innenfor kategorien «Educational», og det er derfor ikke nødvendig at disse må analyseres riktig for at testen skal godkjennes. Gomez-assayet analyserte en av prøvene i kategorien «Core» feil, og dette er en prøve det er viktigere å få et korrekt resultat på. Falskt negative prøver kan begrunnes i unøyaktig pipettering, som kunne vært unngått dersom prøvene hadde blitt analysert i trippletter. Ut ifra disse resultatene kan det ikke konkluderes med hvilket av de to B1-assayene som er best, da de jevnt over viser relativt like resultater.

4.7 Analyse av positive pasientprøver

De positive pasientprøvene som ble benyttet var allerede analysert i rutinen ved Rikshospitalet og St. Olavs Hospital. Etersom mulige endringer i Ct-verdi kan skyldes holdbarhet og feilkilder ved ekstraksjon, vurderes kun resultatene fra analysene vi gjennomførte. Disse vurderes mot hverandre for å kunne vurdere variasjon mellom de ulike assayene.

Ingen av assayene detekterte prøve 2, som potensielt kan skyldes prøvematerialet som ble analysert. Prøvematerialet for denne prøven var «buffy coat», som er et seigt prøvemateriale det kan være vanskelig å ekstrahere DNA fra. Dårlig produkt fra ekstraheringen kan potensielt ha resultert i at prøve 2 kun har fått negative resultater. Feil i ekstraheringen kunne blitt avslørt ved å analysere en kvalitetskontroll-PCR laboratoriet bruker, som påviser et husholdningsgen i humant DNA.

AMM-assayet detekterte ikke *T. gondii* i prøve 10, 11 og 15. Disse prøvene fikk svært høye Ct-verdier for Rep529-assayet og Gomez-assayet. Dette kan tyde på at deteksjonsgrensen til AMM-assayet ikke er like lav som for de andre assayene. Her kan likevel en mulig feilkilde være at prøvene ikke ble analysert i tripletter, og at pipetteringen kan ha vært unøyaktig.

4.8 Konklusjon

De ulike analysene som er gjennomført i dette bachelorprosjektet gir ikke et godt nok grunnlag for å konkludere med hvilket av assayene, *T. gondii* B1 AMM eller *T. gondii* B1 Gomez, som egner seg best for deteksjon av *T. gondii*. Analysene viser jevnt over svært like resultater for assayene. Det kan se ut til at Gomez-assayet oppnår litt bedre resultater, ettersom primerne gir minimalt med uspesifikke bindinger til humant DNA, og deteksjonsgrensen er lavere. Ut ifra QCMD-analysen og analysen av positive pasientprøver ga også dette assayet bedre resultater enn AMM-assayet. Dette kan skyldes svakheter i flere av analysene, som gjør at AMM-assayet oppnår dårligere resultater, som det er nødvendig å rette opp i for å kunne konkludere på et bedre grunnlag.

Til videre arbeid vil det være nødvendig å analysere både QCMD-panelet og de positive pasientprøvene i tripletter, for å unngå tilfeldige feil. I tillegg er det ønskelig at analysene for optimalisering av annealingtemperatur gjennomføres på nytt, da resultatene fra analyse av

AMM-assayet ikke ga forklarlige resultater. Effektivitetsanalysen burde repeteres med en kontroll av høyere konsentrasjon, for å få generert en standardkurve med flere punkter. Til slutt vil det være nødvendig å gjennomføre analyse av deteksjonsgrensen igjen, for å utelukke eventuelle pipetteringsfeil.

5 Referanser

1. Kochanowsky JA, Koshy AA. *Toxoplasma gondii*. *Curr Biol*. 23. juli 2018;28(14):R770–1.
2. Prevention CC for DC and. CDC - Toxoplasmosis - Biology [Internett]. 2020 [sitert 18. mai 2023]. Tilgjengelig på:
<https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>
3. Oppdatert P. Toksoplasmose [Internett]. Folkehelseinstituttet. 2010 [sitert 3. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/toksoplasrose---veileder-for-helsep/>
4. Halvor Rollag, Fredrik Müller, Tone Tønjum. *Medisinsk mikrobiologi*. 4. utgave. Gyldendal Norsk Forlag; 2019. 368 s.
5. Belaz S, Gangneux JP, Dupretz P, Guiguen C, Robert-Gangneux F. A 10-Year Retrospective Comparison of Two Target Sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* Detection by Quantitative PCR. *J Clin Microbiol*. april 2015;53(4):1294–300.
6. Pomares C, Estran R, Press CJ, Bera A, Ramirez R, Montoya JG, mfl. Is Real-Time PCR Targeting Rep 529 Suitable for Diagnosis of Toxoplasmosis in Patients Infected with Non-Type II Strains in North America? *J Clin Microbiol*. 28. januar 2020;58(2):e01223-19.
7. Ybañez RHD, Ybañez AP, Nishikawa Y. Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans. *Front Cell Infect Microbiol* [Internett]. 2020 [sitert 22. mars 2023];10. Tilgjengelig på:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00204>
8. Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Eighth Edition. Saunders; 2019. 1088 s.

9. John M. Butler. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. 25 Wyman Street, Waltham, MA 02451, USA 525 B Street, Suite 1800, San Diego, California 92101-4495, USA 84 Theobald's Road, London WC1X 8RR, UK: Academic Press; 2012.
10. DNA-analyser [Internett]. Oslo universitetssykehus. [siteret 21. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://oslo-universitetssykehus.no/fag-og-forskning/nasjonale-og-regionale-tjenester/rechtsmedisinske-fag/straffesaker/dna-analyser>
11. Staff BTB. PCR Primer Design Tips [Internett]. Behind the Bench. 2019 [siteret 22. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/>
12. Rodríguez A, Rodríguez M, Córdoba JJ, Andrade MJ. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. I: Basu C, redaktør. *PCR Primer Design* [Internett]. New York, NY: Springer; 2015 [siteret 11. april 2023]. s. 31–56. (Methods in Molecular Biology). Tilgjengelig på: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
13. Addgene: Protocol - How to Design Primers [Internett]. [siteret 22. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.addgene.org/protocols/primer-design/>
14. Obradovic J, Jurisic V, Tosic N, Mrdjanovic J, Perin B, Pavlovic S, mfl. Optimization of PCR Conditions for Amplification of GC-Rich EGFR Promoter Sequence. *J Clin Lab Anal*. 11. november 2013;27(6):487–93.
15. Michael McPherson, Simon Møller. *PCR*. Second Edition. Taylor & Francis Group; 2006.
16. Johnson G, Nolan T, Bustin SA. Real-Time Quantitative PCR, Pathogen Detection and MIQE. I: Wilks M, redaktør. *PCR Detection of Microbial Pathogens* [Internett]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [siteret 19. april 2023]. s. 1–16. (Methods in Molecular Biology). Tilgjengelig på: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_1
17. Kralik P, Ricchi M. *A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics*:

Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol* [Internett]. 2017 [sitert 19. april 2023];8. Tilgjengelig på:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00108>

18. Gomez CA, Sahoo MK, Kahn GY, Zhong L, Montoya JG, Pinsky BA, mfl. Dual-target, real-time PCR for the diagnosis of intraocular *Toxoplasma gondii* infections. *Br J Ophthalmol*. 1. april 2019;103(4):569–72.
19. Homan WL, Vercammen M, Braekeleer JD, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCRp. *Int J Parasitol*. 2000;

6 Vedlegg

Vedlegg 1: Oversikt over positive prøver fra Rikshospitalet og St. Olavs Hospital med tilhørende Ct-verdier (s. 41)

Vedlegg 2: Reagensvedlegg for høy kontroll (s. 42)

Vedlegg 3: Reagensvedlegg for lav kontroll (s. 43)

Vedlegg 4: Oversikt over QCMD-prøver fra 2020, 2021 og 2022 (s. 44)

Vedlegg 5: Reagensvedlegg for primere (Forward og Revers) og probe (TaqMan) tilhørende assayet T. gondii B1 AMM. (s. 45-48)

Vedlegg 6: Reagensvedlegg for primere (Forward og Revers) og probe (TaqMan) tilhørende assayet T. gondii B1 Gomez. (s. 49-52)

Vedlegg 7: Protokoll for CFX96-program (s. 53)

Vedlegg 8: Standardkurve generert ved effektivitetsanalysen av T. gondii B1 AMM for pasientpool og elueringsbuffer (s. 54)

Vedlegg 9: Standardkurve generert ved effektivitetsanalysen av T. gondii B1 Gomez for pasientpool og elueringsbuffer (s. 55)

Vedlegg 10: Beregning for deteksjonsgrense av AMM-assayet (s. 56)

Vedlegg 11: Beregning for deteksjonsgrense av Gomez-assayet (s. 57)

Vedlegg 1

Oversikt over positive pasientprøver fra St. Olavs Hospital og Rikshospitalet, med tilhørende Ct-verdier fra real-time PCR med Rep529 som målsete. Ct-verdien for prøve nummer 6 og 15 er ikke oppgitt, men er bekreftet positive.

Prøvenummer	Ct-verdi fra opprinnelig analyse	Prøvemateriale	Prøve fra
1	23,7	Buffycoat fra sentrifugert fullblod	Rikshospitalet
2	25	Buffycoat fra sentrifugert fullblod	Rikshospitalet
3	25,5	Vev Lymfeknute	Rikshospitalet
4	15,7	Vev Placenta	Rikshospitalet
5	9,4	Corpus Vitreum	Rikshospitalet
6	Pos.	Eluat - Corpus Vitreum	Rikshospitalet
7	14,2	Eluat - Corpus Vitreum (fortynnet)	Rikshospitalet
8	20	Corpus Vitreum	Rikshospitalet
9	21	Corpus Vitreum	Rikshospitalet
10	25	Corpus Vitreum	Rikshospitalet
11	33,07	Vev Placenta	St. Olavs Hospital
12	19,13	Eluat Spinalvæske	St. Olavs Hospital
13	31,86	Vev Lymfeknute	St. Olavs Hospital
14	18,79	Vev	St. Olavs Hospital
15	Pos.	Eluat Spinalvæske	St. Olavs Hospital

Vedlegg 2

Reagensvedlegg for kontrollstockløsning høy konsentrasjon



CE 0318

EN

AMPLIRUN® TOXOPLASMA GONDII DNA CONTROL

For *in vitro* diagnostic use

MBC047: Purified DNA of *Toxoplasma gondii* to be used to control *in vitro* diagnosis techniques based in nucleic acids amplification.

INTRODUCTION:

Toxoplasma gondii is a protozoan that presents three stages in its developmental life cycle: oocyst, tachyzoite and bradyzoite. While only members of the family Felidae can be definitive hosts of the parasite, a great variety of animals can harbour the tissue cysts. Although consuming contaminated food is the most common way of becoming infected, transplacental infection may occur. The disease is normally benign, but central nervous system disease may appear in immunocompromised patients and the newborn.

CHARACTERISTICS:

The lyophilized nucleic acid is included in a thermo-sealed foil pouch containing a silica gel bag. It is necessary to reconstitute it before use (refer to "Preparation of reagents").

Preparation: Grown in MRC-5 infected cells

Extract preparation: Commercial genomic DNA extraction method.

KIT CONTENTS:

1 VIRCELL TGO DNA CONTROL: 1 vial with lyophilized DNA of *Toxoplasma gondii*, (RH strain), (10000-20000 copies/ μ l once reconstituted (see Table 1)). DNA quantification has been performed by real-time PCR.

2 VIRCELL CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION: 500 μ l of molecular biology grade water, DNase, RNase free.

Lot number	22MBC047002-C
Concentration	copies/ μ l 15000

Table 1.

Materials required but not supplied:

Additional diagnosis kit.

STORAGE REQUIREMENTS:

Special transport conditions not required. Store the lyophilized vial at 2-8°C inside the foil pouch. Once the pouch is opened, reconstitute the lyophilized vial immediately and store between -5°C and -40°C after reconstitution (temperature indicated on the label).

STABILITY AND HANDLING OF REAGENTS:

Handle reagents in aseptic conditions to avoid microbial contaminations.

Use only the amount of reagent required for the test.

After control resuspension DNA solution should be aliquoted in order to avoid multiple freeze-thaw cycles. The product is stable until the expiry date indicated in the label, if the instructions for use are followed.

VIRCELL, S.L. does not accept responsibility for the mishandling of the reagents included in the kit.

RECOMMENDATIONS AND PRECAUTIONS:

1. This product is for *in vitro* diagnosis use only and for professional qualified staff.
2. Sterile tips with aerosol barrier are essential to prevent contamination.
3. Specimens should be handled as in the case of infectious samples using safety laboratory procedures. Thoroughly clean and disinfect all work surfaces with a freshly prepared solution of 0.5% sodium hypochlorite in deionized or distilled water.
4. In order to perform the test it is essential to have separate working areas.
5. Dispose of unused reagents and waste in accordance with all applicable regulations.
6. The component VIRCELL DNA CONTROL could include genetic material or substances of animal and/or human origin. VIRCELL DNA CONTROL could contain inactivated *Toxoplasma gondii* antigen. VIRCELL DNA CONTROL contains purified nucleic acids obtained from inactivated microorganism, nevertheless, it should be considered potentially infectious and handled with care. No present method can offer complete assurance that these or other infectious agents are absent. All materials should be handled and disposed as of potentially infectious. Observe the local regulations for clinical waste disposal.
7. Dilutions below 1000 copies/ μ l should be made immediately before use. Freezing of product dilutions containing less than 1000 copies/ μ l is not recommended as partial DNA degradation might occur.

PREPARATION OF THE REAGENTS:

1. Tear the foil pouch containing VIRCELL DNA CONTROL 1.
2. Centrifuge VIRCELL DNA CONTROL 1 1 minute at 1000 g.
3. Add 100 μ l of VIRCELL CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION 2 and mix until completely reconstituted. The concentration will be 10000-20000 copies/ μ l once reconstituted (see Table 1).
4. Shake with vortex for 30 seconds to dissolve and homogenize completely.
5. It is recommended to prepare VIRCELL DNA CONTROL aliquots. In case dilutions were to be prepared use VIRCELL CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION 2 for this purpose.

TEST PROCEDURE:

Once nucleic acid is reconstituted, use it according to indications of additional diagnosis kit. Use resuspended VIRCELL CONTROL as an extracted clinical sample adding it directly to amplification reagents.

INTERNAL QUALITY CONTROL:

Each batch is subjected to internal quality control testing before releasing. Quality control analysis is performed by real-time PCR. Final quality control results for each particular lot are available.

INTERPRETATION OF RESULTS AND VALIDATION PROTOCOL FOR USERS:

Refer to indications of additional diagnosis kit.

Vedlegg 3

Reagensvedlegg for kontrollstockløsning høy konsentrasjon



CE 0318

Notat
Før 24/10-14
1st opp

EN
1

AMPLIRUN® TOXOPLASMA GONDII DNA CONTROL

MBC047: Purified DNA of *Toxoplasma gondii* for use to control *in vitro* diagnosis techniques based in nucleic acids amplification.

INTRODUCTION:

Toxoplasma gondii is a protozoan that presents three stages in its developmental life cycle: oocyst, tachyzoite and bradyzoite. While only members of the family Felidae can be definitive hosts of the parasite, a great variety of animals can harbour the tissue cysts. Although consuming contaminated food is the most common way of becoming infected, transplacental infection may occur. The disease is normally benign, but central nervous system disease may appear in immunocompromised patients and the newborn.

CHARACTERISTICS:

The nucleic acid is lyophilized. It is necessary to reconstitute it before use (refer to "Preparation of reagents").

Preparation: Grown in MRC-5 infected cells.
Extract preparation: Commercial genomic DNA extraction method.

KIT CONTENTS:

1 VIRCELL TGO DNA CONTROL: 1 vial with lyophilized DNA of *Toxoplasma gondii*, (RH strain), (10000-20000 copies/μl once reconstituted (see Table 1)). DNA quantification has been performed with real-time PCR instrument from Stratagene (ref. Mx3005P).

2 VIRCELL CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION: 500 μl of molecular biology grade water, DNase, RNase free.

Lot number	13MBC047002
Concentration	copies/μl 10050

Table 1.

Materials required but not supplied:
Additional diagnosis kit.

STORAGE REQUIREMENTS:

Special transport conditions not required. Store the lyophilized vial at 2-8°C. Store between -5°C and -40°C after reconstitution (temperature indicated on the label).

STABILITY AND HANDLING OF REAGENTS:

Handle reagents in aseptic conditions to avoid microbial contaminations. Use only the amount of reagent required for the test.

After control resuspension DNA solution should be aliquoted in order to avoid multiple freeze-thaw cycles. The product is stable until the expiry date indicated in the label, if the instructions for use are followed.

VIRCELL, S.L. does not accept responsibility for the mishandling of the reagents included in the kit.

RECOMMENDATIONS AND PRECAUTIONS:

1. This product is for *in vitro* diagnosis use only and for professional qualified staff.
2. Sterile tips with aerosol barrier are essential to prevent contamination.
3. Specimens should be handled as in the case of infectious samples using safety laboratory procedures. Thoroughly clean and disinfect all work surfaces with a freshly prepared solution of 0.5% sodium hypochlorite in deionized or distilled water.

4. In order to perform the test it is essential to have separate working areas.
5. Dispose of unused reagents and waste in accordance with all applicable regulations.
6. The component VIRCELL DNA CONTROL could include genetic material or substances of animal and/or human origin. VIRCELL DNA CONTROL could contain inactivated *Toxoplasma gondii* antigen. VIRCELL DNA CONTROL contains purified nucleic acids obtained from inactivated microorganism, nevertheless, it should be considered potentially infectious and handled with care. No present method can offer complete assurance that these or other infectious agents are absent. All materials should be handled and disposed as of potentially infectious. Observe the local regulations for clinical waste disposal.
7. Dilutions below 1000 copies/μl should be made immediately before use. Freezing of product dilutions containing less than 1000 copies/μl is not recommended as partial DNA degradation might occur.

PREPARATION OF THE REAGENTS:

- 1.-Centrifuge VIRCELL DNA CONTROL 1 minute at 1000 g.
- 2.-Add 100 μl of VIRCELL CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION 2 and mix until completely reconstituted. The concentration will be 10000-20000 copies/μl once reconstituted (see Table 1).
- 3.-Shake with vortex for 30 seconds to dissolve and homogenize completely.
- 4.-It is recommended to prepare VIRCELL DNA CONTROL aliquots. In case dilutions were to be prepared use VIRCELL CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION 2 for this purpose.

TEST PROCEDURE:

Once nucleic acid is reconstituted, use it according to indications of additional diagnosis kit. Use resuspended VIRCELL CONTROL as an extracted clinical sample adding it directly to amplification reagents.

INTERNAL QUALITY CONTROL:

Each batch is subjected to internal quality control testing before releasing. Quality control analysis is performed by real-time PCR run in a LightCycler[®]480 (Roche). Final quality control results for each particular lot are available.

INTERPRETATION OF RESULTS AND VALIDATION PROTOCOL FOR USERS:

Refer to indications of additional diagnosis kit.

LIMITATIONS OF METHOD:

- 1.-This reagent is intended to be used with methods of human diagnosis. This test has not been verified with other methods.
- 2.-The user of this kit is advised to read carefully and understand the package insert. Strict adherence to the protocol is necessary to obtain reliable test results.
- 3.-Use of this product should be limited only to personnel trained in molecular techniques.
- 4.-The identity test was carried out with some specific primers according to publicly available sequences of the microorganism. Changes in the sequences of the primers of the reaction may produce a range of different sizes or may not display product amplification.
- 5.-This control does not substitute internal diagnostic kit controls.
- 6.-The quantification was carried out by own brand qPCR against a standard used as a calibrator. Results may vary with the amplification conditions of the end user.

PERFORMANCE:

IDENTITY TEST

PCR analysis of DNA control: PCR analysis was performed with a specific oligo pair on purified *Toxoplasma gondii* DNA. The reaction

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

Manufacturer: VIRCELL, S.L. Pza. Dominguez Ortiz 1. Poligono Industrial Dos de Octubre. 18320 Santa Fe *GRANADA* SPAIN* Tel.+34.958.441264* Fax+34.958.510712
<http://www.vircell.com>

Vedlegg 4

Oversikt over QCMD-prøver fra 2020, 2021 og 2022 med to QCMD-panel for hvert år.

Prøve	T.gondii Rep529	T.gondii B1 AMM	Ct-verdi	T.gondii B1 Gomez	Beakernr	QCMD nr.	Oppr./res Rep529	Prøvemateriale	Fasit	Kategori
20A	37,44	N/A	N/A	35,7	245M0399	20C1-01	37,36	Fostervann		Educational
20B	33,98	35,75	N/A	35	245M0400	20C1-02	32,54	Plasma		Core
20C	N/A	N/A	N/A	N/A	245M0401	20C1-03	neg	Plasma		Core
20D	37,99	N/A	N/A	N/A	245M402	20C1-04	38,73	Fostervann		Educational
20E	37,56	38,48	N/A	N/A	245M403	20C1-05	37,08	Fostervann		Educational
20F	34,14	34,9	N/A	33,87	308M1405	20C2-01	33,55	Fostervann		Core
20G	N/A	N/A	N/A	N/A	308M1406	20C2-02	neg	Plasma		Core
20H	35,72	36,25	N/A	34,23	308M1407	20C2-03	33,36	Plasma		Core
20I	32,76	34,16	36,4	32,85	308M1409	20C2-04	31,05	Plasma		Core
20J	34,41	36,4	36,4	36,41	308M1410	20C2-05	34,28	Syntetisk fostervann		Core
21A	32,79	34	N/A	34,11	97M0077	TGDNA C1-01	32,48	Plasma		Toxoplasma gondii (Type II)
21B	N/A	N/A	N/A	N/A	97M0078	TGDNA C1-02	0	Plasma	Negativ	Core
21C	39,25	N/A	N/A	35,54	97M0082	TGDNA C1-03	37	Fostervann		Toxoplasma gondii (Type II)
21D	35,9	N/A	N/A	37,96	97M0085	TGDNA C1-04	37,12	Fostervann		Toxoplasma gondii (Type II)
21E	N/A	N/A	N/A	N/A	97M0087	TGDNA C1-05	37,92	Fostervann		Toxoplasma gondii (Type II)
21F	37,19	37,14	37,14	34,77	280M0328	TGDNA C2-01	33,62	Syntetisk fostervann		Toxoplasma gondii (Type II)
21G	34,02	35,01	N/A	34,06	280M0336	TGDNA C2-02	32,26	Fostervann		Toxoplasma gondii (Type II)
21H	34,17	33,78	33,78	33,74	280M0338	TGDNA C2-03	32,22	Plasma		Toxoplasma gondii (Type II)
21I	N/A	N/A	N/A	N/A	280M0339	TGDNA C2-04	0	Plasma	Negativ	Core
21J	32,33	34,12	34,12	33,64	280M0340	TGDNA C2-05	30,45	Plasma		Toxoplasma gondii (Type II)
22A	32,74	34,17	34,17	33,01	109M0274	TGDNA22C-01	30,83	Plasma		Toxoplasma gondii (Type II)
22B	33,63	38,87	38,87	37,58	109M0275	TGDNA22C-02	31,36	Plasma		Toxoplasma gondii (Type II)
22C	35,16	36,07	36,07	N/A	109M0276	TGDNA22C-03	31,45	Syntetisk fostervann		Toxoplasma gondii (Type II)
22D	N/A	N/A	N/A	N/A	109M0277	TGDNA22C-04	0	Plasma	Negativ	Core
22E	34,62	38,7	38,7	35,02	109M0278	TGDNA22C-05	32,37	Plasma		Toxoplasma gondii (Type II)
22F	N/A	N/A	N/A	N/A	276M0116	TGDNA22C2-01	0	Plasma	Negativ	Core
22G	35,23	36,47	36,47	34,26	276M0123	TGDNA22C2-02	33,85	Fostervann		Toxoplasma gondii (Type II)
22H	36,31	38,91	38,91	N/A	276M0127	TGDNA22C2-03	36,44	Fostervann		Toxoplasma gondii (Type II)
22I	37,52	N/A	N/A	35,56	276M0130	TGDNA22C2-04	34,26	Fostervann		Toxoplasma gondii (Type II)
22J	36,89	37,6	37,6	36,52	276M0132	TGDNA22C2-05	35,56	Fostervann		Toxoplasma gondii (Type II)
Neg. ktr	N/A	N/A	N/A	N/A						
Pos. ktr 1:100	29,11	31,06	31,06	30,03			0			
Falsk negative	1	6	6	5			0			

Vedlegg 5

Reagensvedlegg for primere (Forward og Revers) og probe (TaqMan) tilhørende assayet T. gondii B1 AMM.

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany
Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
WWW.TIB-MOLBIOL.COM



TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of
Medical Microbiology MRSA
St. Olavs Hospital
LAB3VEST
Sidsel Krokstad -
Erling Skjalgssons gate 1
N-7030 Trondheim
Norge



Billing address:

St. Olavs Hospital
Fakturamottak
Box 2622
N-6405 Molde
Norge

Orders, quotes
dna@tib-molbiol.de

Consultation
design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
service@tib-molbiol.de

Packing list: 22113170

Date: 20.09.2022

Page 1 of 1

P.O. number: RESH-ID 106655

Invoice No.: 22808451

Shipping: DHL 9528640376

Seq. No. 2198600	Name: ToxoB1_F	Length: 21 mer		
ggAACTgCATCCgTTCATgAg				
Synthesis Scale: 0.01 µmol	Condition: Primer 1.0 OD	Purification: GSF	Amount in OD: 1,00	
Seq. No. 2198601	Name: ToxoB1_R	Length: 20 mer		
CTATCgATTgCAggCgACCA				
Synthesis Scale: 0.01 µmol	Condition: Primer 1.0 OD	Purification: GSF	Amount in OD: 1,00	
Seq. No. 2198602	Name: ToxoB1_TM	Length: 25 mer		
TEX-TgCATAggTTgCAgTCACTgACgAg--BHQ2				
Synthesis Scale: ---	Condition: TME 1.0 OD ly	Purification: HPLC	Amount in OD: 1,00	
1 x Weekend price (Friday discount)				
1 x Shipping ECX 3 DHL EU >300g				

Goods received:
Date, Signature

Kindly note changed bank details – bitte beachten Sie unsere geänderte Bankverbindung

We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.



Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Drooge
Handelsregister HRB 93163 B
Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT-No.: DE 814 018 770 | IHS code: 2934 9990 / for kits 3822 1900
DUNS no. 312829815 | IIN 4260159330007 | EORI-No. DE 4806433

Deutsche Bank, Senser Platz 2, 79539 Lörrach
IBAN DE76 6837 0034 0018 7880 00
SWIFT/BIC DEUTDE33

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St. Olavs Hospital
 LAB3VEST
 attn. Sidsel Krokstad
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 2198600 **ToxoB1_F**
 TIB reference no : 022113170 21-mer 20.09.2022

5' - ggAACTgCATCCgTTCATgAg

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

4,4 nmol / 4,4 µM
 Synthesis: 0,01 µmol Purification: GSF Condition: Primer 1.0 OD
 no
 A: 5 G: 6 C: 5 T: 5 total 21
 Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 52.4 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ 225310 l / mol cm
 Molecular weight ammonium salt NH₄ 6786,9 g / mol
 Molecular weight free acid : 6446,3 g / mol
 Picomoles per OD₂₆₀ 4438,3 pmol / OD
 Micrograms per OD₂₆₀ 30,1 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀ 1,0 OD
 Molar amount : 4,4 nmol
 Amount in µg mass units : 30,1 µg
 Molar concentration when delivered in 1 ml solution : 4,4 µM (pmol / µl)
 20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of : 222 µl
 50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of : 89 µl (To prepare stock solutions of
 100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of : 44 µl different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml : 0,030 µg / µl
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml : 1 : 60 dilution factor from a 1 ml solution
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in : 301 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 58,2 °C
 Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 54,7 °C
 Melting point G/C-content rule 64,0 °C
 56,8 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$ -149.9 / -633.9 / -1624.0 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.
 W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thio

Kindly note changed bank details – bitte beachten Sie unsere geänderte Bankverbindung
 We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.



Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Droege
 Handelsregister HRB 93163 B
 Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT-No.: DE 814 018 770 | IIS code: 2934 9990 / for kits 3822 1900
 DUNS no. 312829815 | ILN 4260159330007 | EORI-No. DE 4806433

Deutsche Bank, Senner Platz 2, 79539 Lörrach
 IBAN DE76 6837 0034 0018 7880 00
 SWIFT/BIC DEUTDE33

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St. Olavs Hospital
 LAB3VEST
 attn. Sidsel Krokstad
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 2198601 **ToxoB1_R**
 TIB reference no : 022113170 20 - mer 20.09.2022

5' - CTATCgATTgCAggCgACCA

Amount / Concentration for product of 1 ml
 Synthesis scale and purification :
 5'-Modifications :
 Number of bases :
 Wobble bases and GC content :

4,7 nmol / 4,7 µM
 Synthesis: 0,01 µmol Purification: GSF Condition: Primer 1.0 OD
 no
 A : 5 G : 5 C : 6 T : 4 total 20
 Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 55,0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ 211950 l / mol cm
 Molecular weight ammonium salt NH₄ 6425,7 g / mol
 Molecular weight free acid : 6102,1 g / mol
 Picomoles per OD₂₆₀ 4718,1 pmol / OD
 Micrograms per OD₂₆₀ 30,3 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀ 1,0 OD
 Molar amount : 4,7 nmol
 Amount in µg mass units : 30,3 µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution :
 20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of : 236 µl
 50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of : 94 µl (To prepare stock solutions of
 100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of : 47 µl different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml : 0,030 µg / µl
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml : 1 : 61 dilution factor from a 1 ml solution
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in : 303 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 59,6 °C
 Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 56,1 °C
 Melting point G/C-content rule 62,0 °C
 56,3 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

Δ G / Δ H / Δ S -153,6 / -642,1 / -1639,2 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.
 W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thio

Kindly note changed bank details – bitte beachten Sie unsere geänderte Bankverbindung
 We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.



Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Droege
 Handelsregister HRB 93163 B
 Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT No.: DE 814 018 770 | IIS code: 2934 9990 / for kits 3822 1900
 DUNS no. 312829815 | ILN 4260159330007 | EORI-No. DE 4806433

Deutsche Bank, Senner Platz 2, 79539 Lürbach
 IBAN DE76 6837 0034 0018 7880 00
 SWIFT/BIC DEUTDE66F683

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St. Olavs Hospital
 LAB3VEST
 attn. Sidsel Krokstad
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 2198602 ToxoB1_TM
 TIB reference no : 022113170 25 - mer 20.09.2022

5' - TEX-TgCATAggTTgCAgTCACtGACgAg--BHQ2

Amount / Concentration for product of 1 ml
 Synthesis scale and purification : 3,7 nmol / 3,7 µM
 Synthesis: 0,00 µmol Purification: HPLC Condition: TME 1.0 OD by no
 5'-Modifications :
 Number of bases : A : 6 G : 8 C : 5 T : 6 total 25
 Wobble bases and GC content : Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 52.0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ 272930 l / mol cm
 Molecular weight ammonium salt NH₄ 8130,9 g / mol
 Molecular weight free acid : 7722,1 g / mol
 Picomoles per OD₂₆₀ 3663,9 pmol / OD
 Micrograms per OD₂₆₀ 29,8 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀ 1,0 OD
 Molar amount : 3,7 nmol
 Amount in µg mass units : 29,8 µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution :
 20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of : 183 µl
 50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of : 73 µl (To prepare stock solutions of
 100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of : 37 µl different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml : 0,030 µg / µl
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml : 1 : 60 dilution factor from a 1 ml solution
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in : 298 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 63,6 °C
 Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 60,1 °C
 Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 76,0 °C
 Melting point G/C-content rule 61,8 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$ -175.9 / -738.8 / -1888.9 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.
 W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thio
 Kindly note changed bank details – bitte beachten Sie unsere geänderte Bankverbindung

We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.



Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Droege VAT-No.: DE 814 018 770 | HS code: 2934 9990 / for kits 3822 1900 Deutsche Bank, Senser Platz 2, 79539 Lörrach
 Handelsregister HRB 93163 B DUNS no. 312829815 | ILN 4260159330007 | EORI-No. DE 4806433 IBAN DE76 6837 0034 0018 7880 00
 Registergericht Berlin Charlottenburg SWIFT/BIC DEUTDE6683

Vedlegg 6

Reagensvedlegg for primere (Forward og Revers) og probe (TaqMan) tilhørende assayet T. gondii B1 Gomez.

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of
 Medical Microbiology MRSA
 St. Olavs Hospital
 LAB3VES, Labororiesenteret
 Sidsel Krokstad -
 Erling Skjalgssons gate 1
N-7030 Trondheim
 Norge



Billing address:

St. Olavs Hospital
 Fakturamottak
 Box 2622

N-6405 Molde
 Norge

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Packing list: 23104161

Date: 04.04.2023

Page 1 of 1

P.O. number: RESH: 106655

Invoice No.: 23802508

Shipping: DHL 5819006174

Seq. No. 2235820	Name: GZ_B1_F	Length: 20 mer	
gAAAgCCATgAggCACTCCA			
Synthesis Scale: 0.20 µmol	Condition: Primer lyo	Purification: GSF	Amount in OD: 29,07
Seq. No. 2235821	Name: GZ_B1_R	Length: 19 mer	
TTCAcccggACCgTTTAgC			
Synthesis Scale: 0.20 µmol	Condition: Primer lyo	Purification: GSF	Amount in OD: 23,50
Seq. No. 2235822	Name: GZ_B1_TM	Length: 27 mer	
TEX-CgggCgAgTAgCACCTgAggAgATACA--BHQ2			
Synthesis Scale: ---	Condition: TME 5.0 OD ly	Purification: HPLC	Amount in OD: 5,00
1 x Weekend price (Friday discount)			
1 x Shipping ECX 3 DHL EU >300g			

Goods received: Date, Signature

Kindly note changed bank details – bitte beachten Sie unsere geänderte Bankverbindung

We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.



Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Droegge
 Handelsregister HRB 93163 B
 Postfach 100121 Berlin, Charlothenburg

VAT-No.: DE 814 018 770 | IHS code: 2954 9990 / for kits 3822 1900
 DUNS no. 312829815 | U.N. id 260159330007 | EORI No. DE 4806433

Deutsche Bank, Senefelder Platz 2, 79539 Lörrach
 IBAN DE76 6857 0034 0018 7880 00
 SWIFT/BIC: DEUTDE33HAN30

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St. Olavs Hospital
 LAB3VES, Labororiesenteret
 attn. Sidsel Krokstad
 Erling Skjalgssons gate 1
N-7030 Trondheim
 Norge

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 2235820 **GZ_B1_F**
 TIB reference no : 023104161 20 - mer 04.04.2023

5' - gAAAgCCATgAggCACTCCA

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5'-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

128,9 nmol / 128,9 µM

Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo

no

A : 7 G : 5 C : 6 T : 2 total 20

Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 55,0 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ	225550 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄	6443,7 g / mol
Molecular weight free acid :	6120,2 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	4433,6 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	28,6 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	29,1 OD
Molar amount :	128,9 nmol
Amount in µg mass units :	830,5 µg
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>	128,9 µM (pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	6444 µl
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	2578 µl (To prepare stock solutions of
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	1289 µl different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,830 µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 1661 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :	8305 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

	59,2 °C
Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	55,7 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	62,0 °C
Melting point G/C-content rule	56,3 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

Δ G / Δ H / Δ S	-149,1 / -622,8 / -1589,6 kJ / mol
-----------------	------------------------------------

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.
 W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thio

Kindly note changed bank details – bitte beachten Sie unsere geänderte Bankverbindung

We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.



Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Drooge
 Handelsregister HRB 93163 B
 Postfach 10101 Berlin, Deutschland

VAF-No.: DE 814 018 770 1 HS code: 2934 9990 / for kits 3822 1900
 DUNS no. 312820815 1. UN 4260150330007 1. EORI No. DE 4806433

Deutsche Bank, Senser Platz 2, 79539 Lörrach
 IBAN DE76 6837 0034 0018 7880 00
 SWIFT/BIC DEUT33HAN33

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St. Olavs Hospital
 LAB3VES, Laboratoriesenteret
 attn. Sidsel Krokstad
 Erling Skjalgssons gate 1
N-7030 Trondheim
 Norge

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 2235821 **GZ_B1_R**
 TIB reference no : 023104161 19 - mer 04.04.2023

5' - TTCACCCggACCgTTTAgC

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

127,0 nmol / 127,0 µM

Synthesis: 0,20 µmol Purification: GSF Condition: Primer lyo

no

A : 3 G : 4 C : 7 T : 5 total 19

Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 57.9 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ	184990 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH ₄ ⁺	6046,4 g / mol
Molecular weight free acid :	5739,8 g / mol
Picomoles per OD ₂₆₀	5405,7 pmol / OD
Micrograms per OD ₂₆₀	32,7 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD ₂₆₀	23,5 OD
Molar amount :	127,0 nmol
Amount in µg mass units :	768,1 µg
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution :</u>	127,0 µM (pmol / µl)
20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of :	6352 µl
50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of :	2541 µl (To prepare stock solutions of different concentration)
100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of :	1270 µl

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml :	0,768 µg / µl
Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml :	1 : 1536 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :	7681 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	59,7 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	56,2 °C
Melting point G/C-content rule	60,0 °C
	55,7 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

Δ G / Δ H / Δ S	-151.7 / -641.7 / -1644.1 kJ / mol
-----------------	------------------------------------

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.

W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thio

Kindly note changed bank details – bitte beachten Sie unsere geänderte Bankverbindung

We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.



Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Droege
 Handelsregister HRB 93163 B

VAT-No.: DE 814 018 770 | IIS code: 2934 9990 / for kits 3822 1900
 DUNS no. 312829815 | I.I.N. 4260159330007 | FORI-No. DE 4806433

Deutsche Bank, Sauer Platz 2, 79539 Lörrach
 IBAN DE76 6837 0034 0018 7880 00
 SWIFT/BIC DEUTDE33

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St. Olavs Hospital
 LAB3VES, Laboratorienteseret
 attn. Sidsel Krokstad
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Product Description no. 2235822 **GZ_B1_TM**
 TIB reference no.: 023104161 27 - mer 04.04.2023

5' - TEX-CgggCgAgTAgCACCTgAggAgATACA--BHQ2

Amount / Concentration for product of 1 ml
 Synthesis scale and purification: 16,2 nmol / 16,2 µM
 Synthesis: 0,00 µmol Purification: HPLC Condition: TME 5.0 OD ly
 no
 5'-Modifications: A: 8 G: 10 C: 6 T: 3 total 27
 Number of bases: Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 59.3 %
 Wobble bases and GC content:

Chemical properties and constant factors of the product:

Molar extinction coefficient ϵ 309200 l / mol cm
 Molecular weight ammonium salt NH₄ 8826,4 g / mol
 Molecular weight free acid: 8383,6 g / mol
 Picomoles per OD₂₆₀ 3234,2 pmol / OD
 Micrograms per OD₂₆₀ 28,5 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀ 5,0 OD
 Molar amount: 16,2 nmol
 Amount in µg mass units: 142,8 µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution:
 20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of: 16,2 µM (pmol / µl)
 50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of: 809 µl
 100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of: 323 µl (To prepare stock solutions of
 162 µl different concentration)

Mass concentration (for hybridization):

Concentration, if dissolved in 1 ml: 0,143 µg / µl
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml: 1 : 286 dilution factor from a 1 ml solution
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in: 1428 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 68,8 °C
 Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 65,3 °C
 Melting point G/C-content rule 86,0 °C
 66,8 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid:

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$ -206.5 / -852.8 / -2168.9 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions [UB Code])

S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.
 W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thio

Kindly note changed bank details – bitte beachten Sie unsere geänderte Bankverbindung

We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.



Vedlegg 7

Protokoll for 55 grader: «Perfecta 2-step TM55».

Protocol

- 1: 45,0°C for 5:00
- 2: 95,0°C for 3:00
- 3: 95,0°C for 0:05
- 4: 55,0°C for 0:30
Plate Read
- 5: GOTO 3, 39 more times

Protokoll for 58 grader: «Perfecta 2-step TM58».

Protocol

- 1: 45,0°C for 5:00
- 2: 95,0°C for 3:00
- 3: 95,0°C for 0:05
- 4: 58,0°C for 0:30
Plate Read
- 5: GOTO 3, 39 more times

Protokoll for 60 grader: «Perfecta 2-step TM60».

Protocol

- 1: 45,0°C for 5:00
- 2: 95,0°C for 3:00
- 3: 95,0°C for 0:05
- 4: 60,0°C for 0:30
Plate Read
- 5: GOTO 3, 39 more times

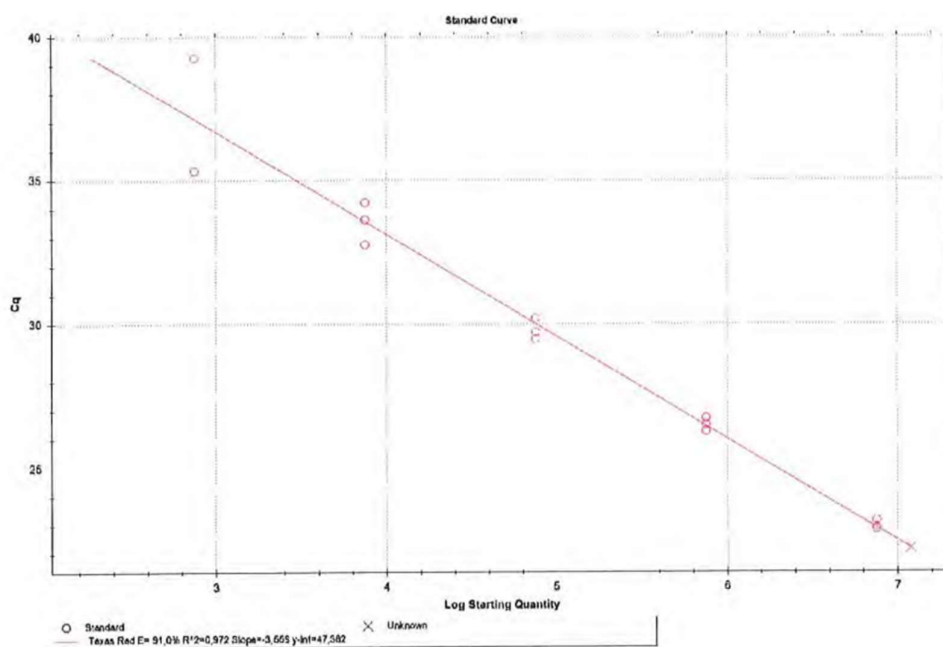
Protokoll for gradient: «Gradient50-60 Perfecta 2-step»

Protocol

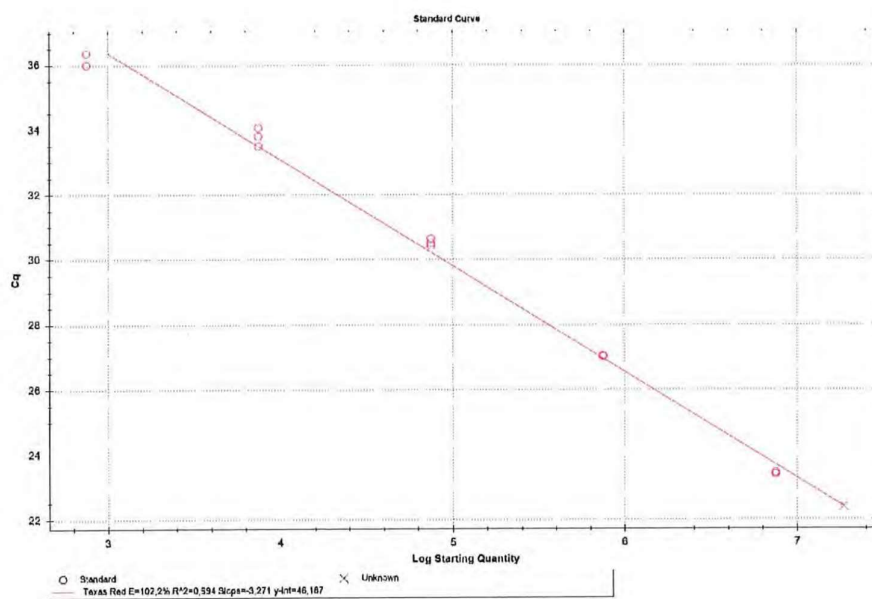
- 1: 45,0°C for 5:00
- 2: 95,0°C for 3:00
- 3: 95,0°C for 0:05
- 4: Gradient 50,0°C / 60,0°C for 0:30
Plate Read
- 5: GOTO 3, 39 more times

Vedlegg 8

Standardkurve generert ved effektivitetsanalysen av T. gondii B1 AMM for pasientpool og elueringsbuffer, Figur 15 og Figur 16.



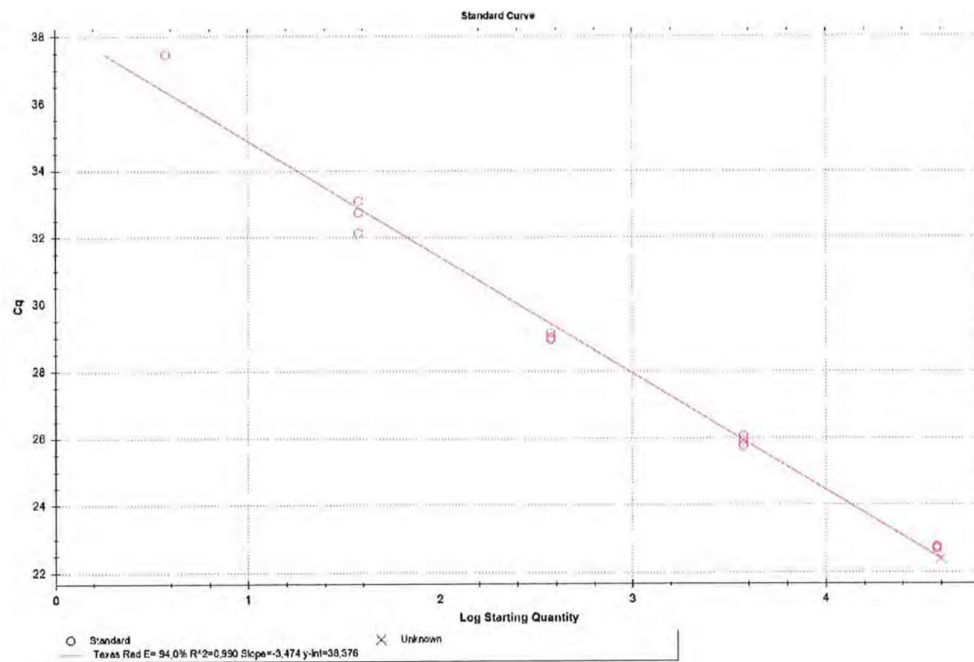
Figur 15: Standardkurve som illustrerer effektiviteten i T. gondii B1 AMM-assayet i pasientpool



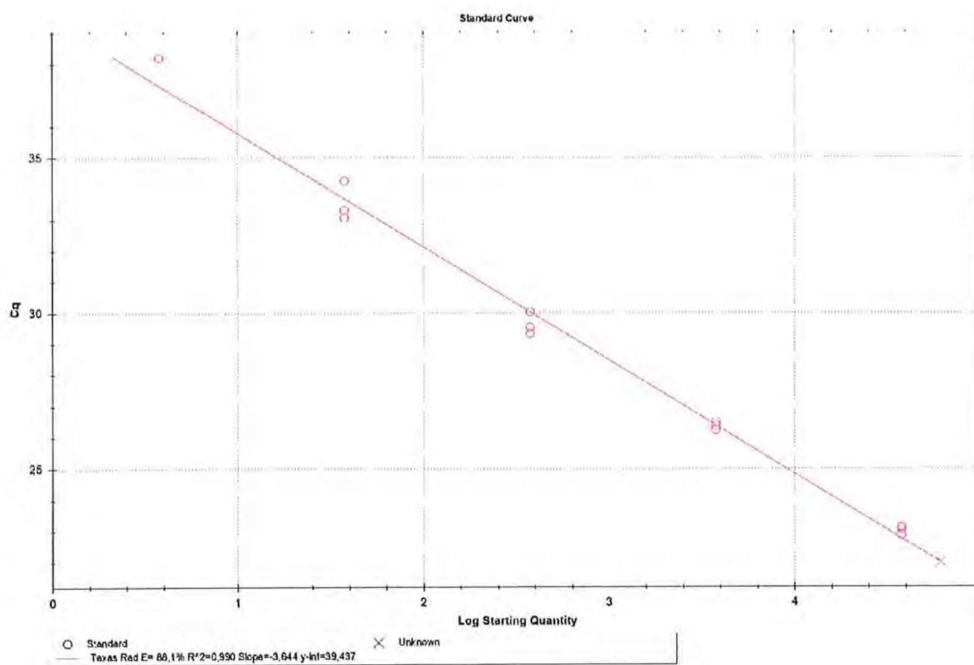
Figur 16: Standardkurve som illustrerer effektiviteten i T. gondii B1 AMM-assayet i elueringsbuffer

Vedlegg 9

Standardkurve generert ved effektivitetsanalysen av T. gondii B1 Gomez for pasientpool og elueringsbuffer, Figur 17 og Figur 18



Figur 17: Standardkurve som illustrerer effektiviteten i T. gondii B1 Gomez-assayet i pasientpool



Figur 18: Standardkurve som illustrerer effektiviteten i T. gondii B1 Gomez-assayet i elueringsbuffer

Vedlegg 10

Verdier benyttet for utregning av deteksjonsgrense for AMM-assayet. Alle forsøk utført på Vircell kontroll MBC47 lot: 22MBC047002-C, konsentrasjon: kopier/ μ l 15000. Fortynning 1:2 av kontrollen er utgangspunkt for ti-folds fortynningsrekken. Fortynning 1:10 i disse tabellene vil derfor tilsvare 1:20 fortynning, som omtalt i oppgaveteksten.

Fortynningsrekke i pasientmateriale				
Antall replikater	Antall positive	Fortynning	kopier/ml	kopier/PCR
3	3	Vircell MBC47	1 875 000	37 500
3	3	1:10	187 500	3750
3	3	1:100	18 750	375
3	3	1:1000	1875	37,5
20	9	1:10000	187,5	3,75
20	8	1:50000	93,75	1,875
20	1	1:100000	17,75	0,375
Kopier/ml på 95% konfidensnivå: 1897 kopier/ml (konf. intervall 606-100530 Kopier/ μ l på 95% konfidensnivå: 36 kopier/PCR (konf. intervall: 12-1654 kopier/PCR)				

Fortynningsrekke i buffer				
Antall replikater	Antall positive	Fortynning	kopier/ml	kopier/PCR
3	3	Vircell MBC47	1 875 000	37 500
3	3	1:10	187 500	3750
3	3	1:100	18 750	375
3	3	1:1000	1875	37,5
20	15	1:10000	187,5	3,75
20	10	1:50000	93,75	1,875
20	2	1:100000	17,75	0,375
Kopier/ml på 95% konfidensnivå: 633 kopier/ml (konf. intervall 301-4293 Kopier/ μ l på 95% konfidensnivå: 12 kopier/PCR (konf. intervall: 6-80 kopier/PCR)				

Vedlegg 11

Verdier benyttet for utregning av deteksjonsgrense for Gomez-assayet. Alle forsøk utført på Vircell kontroll MBC47 lot: 22MBC047002-C, konsentrasjon: kopier/ μ l 15000. Fortynning 1:2 av kontrollen er utgangspunkt for ti-folds fortynningsrekken. Fortynning 1:10 i disse tabellene vil derfor tilsvare 1:20 fortynning, som omtalt i oppgaveteksten.

Fortynningsrekke i pasientmateriale				
Antall replikater	Antall positive	Fortynning	kopier/ml	kopier/PCR
3	3	Vircell MBC47	1 875 000	37 500
3	3	1:10	187 500	3750
3	3	1:100	18 750	375
3	3	1:1000	1875	37,5
20	20	1:5000	937,5	18,75
20	15	1:10000	187,5	3,75
20	18	1:50000	93,75	1,875
3	0	1:100000	17,75	0,375
Kopier/ml på 95% konfidensnivå: 357 kopier/ml (konf. intervall 191-6198 kopier/ml)				
Kopier/ μ l på 95% konfidensnivå: 7 kopier/PCR (konf. intervall: 4-127 kopier/PCR)				

Fortynningsrekke i buffer				
Antall replikater	Antall positive	Fortynning	kopier/ml	kopier/PCR
3	3	Vircell MBC47	1 875 000	37 500
3	3	1:10	187 500	3750
3	3	1:100	18 750	375
3	3	1:1000	1875	37,5
20	20	1:5000	937,5	18,75
20	15	1:10000	187,5	3,75
20	7	1:50000	93,75	1,875
3	0	1:100000	17,75	0,375
Kopier/ml på 95% konfidensnivå: 344 kopier/ml (konf. intervall 222 - 2626 kopier/ml)				
Kopier/ μ l på 95% konfidensnivå: 6,874 kopier/PCR (konf. intervall: 4-51 kopier/PCR)				

