



Høgskulen  
på Vestlandet

# BACHELOROPPGAVE

PCR-diagnostikk for alvorlige  
halsbetennelser

PCR diagnostics for severe tonsillitis

Kristine Lunde Flotve, Tale Sæbø Austbø, Hakimullah  
Mohammad Naim

Bachelor i Bioingeniørfag

Fakultet for ingeniør- og naturvitenskap

Veiledere: Professor Karl Albert Brokstad (HVL) og  
professor Karl-Henning Kalland (HUS)

22. mai 2023

Vi bekrefter at arbeidet er selvstendig utarbeidet, og at referanser/kildehenvisninger til alle kilder som er brukt i arbeidet er oppgitt, jf. Forskrift om studium og eksamen ved Høgskulen på Vestlandet, § 12-1

## Sammendrag

**Introduksjon:** Rask og sensitiv mikrobiologisk diagnostikk kan bidra til bedre pasientbehandling og redusere unødig antibiotikabruk. Vår oppgave var å undersøke nytten av PCR-diagnostikk ved tonsillitter, og vurdere om det er hensiktsmessig å inkludere flere agens i rutinediagnostikken.

**Metode:** Vi inkluderte penselprøver fra tonsillene fra 223 pasienter med mistanke om tonsillitt. 154 av prøvene kom fra sykehusinnlagte pasienter og 69 av prøvene var fra ambulante pasienter. I tillegg inkluderte vi 20 prøver fra friske personer. Hver prøve ble undersøkt med sanntids-PCR for *S. pyogenes*, *F. necrophorum*, adenovirus, *A. haemolyticum*, *F. nucleatum* og *F. massiliense*. Dyrkningsresultat for *S. pyogenes* og *S. dysgalactiae* ble også vurdert.

**Resultat og diskusjon:** Det ble funnet 54 positive prøver for *S. pyogenes*, 23 for *F. necrophorum*, 17 for adenovirus, 2 for *A. haemolyticum*, 214 for *F. nucleatum* og 40 for *F. massiliense*. Dyrkning av *S. pyogenes* gav en sensitivitet på 61 %. Vi fant ingen holdepunkt for at *F. nucleatum* eller *F. massiliense* er knyttet til tonsillitt.

**Konklusjon:** PCR-diagnostikk bør erstatte dyrkningsbasert diagnostikk for tonsillitter i både allmennpraksis og på sykehus, og bør utvides til å inkludere adenovirus og sannsynligvis *S. dysgalactiae* etter videre uttesting med PCR.

**Nøkkelord:** Tonsillitt, sanntids-PCR, TaqMan, adenovirus, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Fusobacterium necrophorum*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium massiliense*

## Abstract

**Introduction:** Fast and sensitive diagnostics contributes to more accurate treatment and can reduce unnecessary use of antibiotics. Our task was to examine whether cultivation should be replaced with PCR, and whether it would be useful to include several microorganisms in the diagnosis of tonsillitis.

**Method:** 223 samples from the tonsils were collected from hospitalized patients (154) and patients from general practice (69) with suspected tonsillitis. Each sample was analyzed using TaqMan real-time PCR. The following pathogens were included: *S. pyogenes*, *F. necrophorum*, adenovirus, *A. haemolyticum*, *F. nucleatum* and *F. massiliense*. Also, results from cultivation of *S. pyogenes* and *S. dysgalactiae* were evaluated.

**Results and discussion:** There were 54 positive tests for *S. pyogenes*, 23 for *F. necrophorum*, 17 for adenovirus, 2 for *A. haemolyticum*, 214 for *F. nucleatum* and 40 for *F. massiliense*. Cultivation of *S. pyogenes* had an estimated sensitivity of 61 %. There was no indication that *F. nucleatum* or *F. massiliense* is associated with tonsillitis.

**Conclusion:** PCR-based diagnostics should replace cultivation both for inpatients and hospitalized patients. Also, our findings indicate that PCR analyses of adenovirus and *S. dysgalactiae* should be included. However, PCR of *S. dysgalactiae* needs further testing.

**Keywords:** Tonsillitis, real-time PCR, TaqMan, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Fusobacterium necrophorum*, adenovirus, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium massiliense*

## Forord

Bachelorprosjektet er et resultat av et 3-årig profesjonsstudium ved bioingeniørutdanningen ved Høgskulen på Vestlandet. Prosjektet ble utført i samarbeid med molekylærbiologisk seksjon ved Mikrobiologisk avdeling (MIA) på Haukeland universitetssykehus, og Høgskulen på Vestlandet. Bakgrunnen for prosjektet var et ønske om å forbedre diagnostikken for akutte tonsillitter.

Vi vil gi en stor takk til vår veileder på laboratoriet, Sølvi Kristine Øyen Hareide, for god opplæring innen instrument og metodikk, samt god veiledning under det praktiske laboriearbeidet. Vår interne veileder, professor Karl Albert Brokstad, vil vi takke for gode råd og jevnlig oppfølging under oppgaveskriving. Professor Karl-Henning Kalland, vår eksterne veileder, har kommet med gode teoretiske råd under skriveprosessen, og overlege Øyvind Kommedal har vært til stor hjelp under tolkning av resultat, og har gitt gode besvarelser av spørsmål knyttet til prosjektet. Til slutt ønsker vi å takke alle ansatte ved Mikrobiologisk avdeling på Haukeland for at de har tatt godt imot oss, og bidratt til en trivelig hverdag.

Prosessen har vært lærerik, både ved at vi har fått ny kunnskap innen PCR-diagnostikk, og at vi har fått utfordret og utviklet oss selv gjennom selvstendig arbeid, tverrprofesjonelt samarbeid og tolkning av resultater. Vi håper leseren vil finne studien interessant, og vil sitte igjen med ny og god kunnskap innen temaet.

Bergen, 22.05.2023



Kristine Lunde Flotve



Hakimullah Mohammad Naim



Tale Sæbø Austbø

# Innholdsfortegnelse

Sammendrag .....	2
Abstract .....	3
Forord .....	4
1.0 Forkortelser og ordforklaringer .....	9
2.0 Innledning.....	10
3.0 Bakgrunn .....	12
3.1 Tonsillene.....	12
3.2 Tonsillitt.....	13
3.3 Normalflora.....	15
3.4 Bakterier.....	16
3.4.1 Streptokokker .....	17
3.4.1.1 Streptococcus pyogenes.....	18
3.4.1.2 Streptococcus dysgalactiae .....	20
3.4.2 Fusobacterium.....	21
3.4.2.1 Fusobacterium necrophorum .....	21
3.4.2.2 Fusobacterium nucleatum.....	21
3.4.2.3 Fusobacterium massiliense .....	22
3.4.3.1 Arcanobacterium haemolyticum.....	22
3.5 Virus.....	23
3.5.1 Adenovirus .....	23

3.6 Analyseprinsipp .....	25
3.6.1 Ekstraksjon av DNA .....	25
3.6.2 Sanntids-PCR.....	26
3.6.3 Tolkning av PCR resultat .....	28
3.6.4 Faktorer som kan påvirke analysen .....	29
4.0 Materiale og metode.....	30
4.1 Prøvemateriale .....	30
4.1.1 Pasientprøver .....	30
4.1.2 Etske betraktninger.....	32
4.2 Reagens og kontroller .....	32
4.2.1 Tillaging av kontrollmateriale .....	34
4.2.2 Oppløsning av primere og prober .....	35
4.3 Instrument og utstyr .....	35
4.4 Ekstraksjon av prøvemateriale .....	36
4.5 PCR-analyse.....	37
4.5.1 PCR av <i>S. pyogenes</i> .....	40
4.5.2 PCR <i>F. necrophorum</i> .....	42
4.5.3 PCR av adenovirus .....	43
4.5.4 PCR av <i>A. haemolyticum</i> .....	45
4.5.5 PCR av <i>F. nucleatum</i> og <i>F. massiliense</i> .....	47
4.6 Dyrkning .....	50

4.7 Sammenligning av dyrkningsbasert diagnostikk og PCR.....	50
4.8 Analyser og statistikk.....	50
4.8.1 Statistiske beregninger.....	50
4.8.2 Diagram .....	51
5.0 Resultat.....	52
5.1 PCR resultat .....	52
5.1.1 Kontroller.....	52
5.1.2 Pasientprøver .....	52
5.1.3 Pasientgrupper .....	55
5.1.4 Monoinfeksjoner.....	56
5.1.5 Kombinasjon av agens.....	56
5.2 Dyrkningsresultat for <i>S. pyogenes</i> .....	57
5.3 Dyrkningsresultat for <i>S. dysgalactiae</i> .....	58
5.4 PCR av friske personer .....	58
6.0 Diskusjon.....	59
6.1 Prøvemateriale .....	59
6.2 Kontrollmateriale .....	60
6.3 PCR- og dyrkningsresultat.....	60
6.4 Feilkilder .....	63
7.0 Konklusjon .....	65
8 Referanser.....	66

9.0 Vedlegg ..... 74



## 1.0 Forkortelser og ordforklaringer

ATCC	American Type Culture Collection
BHQ-1	Black hole quencher 1
Bp	DNA basepar
CRP	C-reaktivt protein
Ct	Cycle threshold
CV%	Variasjonskoeffisient %
DNA	Deoksyribonukleinsyre
EB	Elueringsbuffer
FAM	Fluorescein amidities, en fluorofor
FP	Forward primer
FRET	Förster (fluorescence) resonance energy transfer
GAS	Gruppe A streptokokker
GenBank	NIH genetiske sekvensdatabase, International Nucleotide Sequence Database Collaboration
HUS	Haukeland universitetssykehus
MIA	Mikrobiologisk avdeling ved Haukeland universitetssykehus
MGB	Minor groove binder
MPC	MagNA Pure Compact
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsyre
RP	Reverse primer
ROX	Rox Reference Dye II (karboksyrhodamin), et internt fluorescerende fargestoff
VIC	Victoria (fluorescerende stoff)

## 2.0 Innledning

Akutt tonsillitt er en inflammasjon i mandlene (tonsillene) og er en svært vanlig tilstand. Tonsillitt er årsaken til ca. 1,3 % av legekonsultasjoner hos fastlegen [1]. Rundt 70 % av tilfellene skyldes virus. Bakteriell tonsillitt skyldes i hovedsak infeksjon med *Streptococcus pyogenes* [2]. *Fusobacterium necrophorum* er også en velkjent årsak til bakteriell tonsillitt, særlig hos unge voksne. Symptomer på bakteriell tonsillitt er kraftige svelgsmerter, feber og hovne tonsiller med hvite eller gulaktige pusspropper [3]. Flere virale infeksjoner kan gi et lignende sykdomsbilde, men de fleste uten pusspropper i tonsillene. Epstein-Barr-virus er en vanlig årsak til akutt tonsillitt med belegg på mandlene ved akutt mononukleose ("kyssesyken"). Infeksjon med adenovirus kan også gi slike pusspropper og kan dermed feiltolkes som en bakteriell tonsillitt. I klinisk praksis er det ofte vanskelig å skille mellom bakteriell og virologisk årsak til akutt tonsillitt, og laboratorieanalyser, samt tilgjengelige hurtigitest for enkelte agens, er nødvendig for avklaring av infeksjonsårsak. Ved mistanke om tonsillitt pga. Epstein-Barr-virus, er en hurtigitest basert på påvisning av såkalte heterofile antistoff i serum eller i en bloddråpe fra fingertuppen en nyttig test som finnes på mange fastlegekontor og legevakter, og også i mikrobiologiske laboratorier. Antistoff i serum kan vanligvis påvises først flere dager etter akutt sykdomsdebut. Motsatt er tester som påviser agens eller deler av dette, mest sensitive rundt sykdomsdebut [4].

En antigen hurtigitest kan gi en rask indikasjon på om infeksjonen skyldes streptokokker. Slike tester har en sensitivitet på rundt 90 % og en spesifisitet på over 95 %, men kan gi falske negative svar [3]. *S. pyogenes* kan også være en del av normalfloraen og gi positivt testresultat selv om det ikke er årsaken til infeksjonen. Ved Mikrobiologisk avdeling (MIA), Haukeland Universitetssykehus undersøkes prøver fra ambulante pasienter kun for *S. pyogenes* gjennom dyrkning. Prøver fra ambulante pasienter dyrkes ikke for *F. necrophorum*. Dette er en anaerob bakterie som er vanskelig å holde i live under transport og som krever anaerobe vekstforhold i laboratoriet. For sykehusinnlagte pasienter mellom 10 og 40 år analyseres per i dag penselprøver fra tonsillene med PCR for *S. pyogenes* og *F. necrophorum*.

I denne oppgaven ble penselprøver tatt fra tonsillene hos ambulante pasienter og pasienter fra sykehus analysert for *S. pyogenes*, *F. necrophorum*, adenovirus og *Arcanobacterium haemolyticum* med PCR. Resultatene for *S. pyogenes* ble sammenlignet med resultater fra

dyrkning. Dyrkningsresultat for *Streptococcus dysgalactiae* ble også vurdert. *S. pyogenes* og *F. necrophorum* er blant de vanligste bakterielle årsakene til tonsillitt. *S. dysgalactiae* er og en kjent årsak til tonsillitt, og detekteres kun ved dyrkning. Bakterien har samme kliniske betydning som *S. pyogenes* [3].

Adenovirus kan gi et lignende sykdomsbilde som bakterielle infeksjoner med pusspropper. Dersom adenovirus kan påvises som årsak til tonsillitt, kan en redusere unødvendig bruk av antibiotika. Dermed ønsket vi å undersøke om det kunne være aktuelt å inkludere en adenovirus-PCR i diagnostikken av bakterielle tonsillitter, og samtidig vurdere om det er hensiktsmessig å erstatte dyrkningsbasert diagnostikk med PCR. *A. haemolyticum* er en kjent, men sjelden årsak til halsbetennelse, men ettersom denne ikke testes for er det uvisst hvor utbredt den er [5].

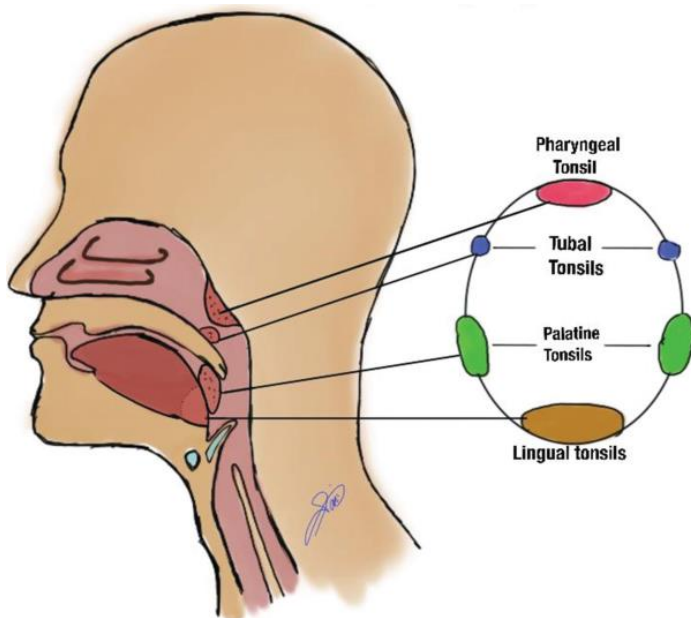
I tillegg ønsket vi også å undersøke forekomsten av bakteriene *Fusobacterium massiliense* og *Fusobacterium nucleatum* ved PCR, som det i dag ikke undersøkes for ved diagnostikk av tonsillitter. *F. massiliense* ble først beskrevet av Mailhe et al. i 2017 etter at den ble isolert fra duodenum [6], og ble senere funnet i en penselprøve fra tonsillene hos en person med tonsillitt ved HUS. Dette er en bakterie som er i slekt med *F. necrophorum*, men som man fremdeles vet lite om. *F. nucleatum* er en anaerob bakterie som kan gi infeksjoner i hode-/halsområdet som gingivitt og periodontitt [7]. Det ville derfor være interessant å se om også denne bakterien kunne knyttes til tilfeller av tonsillitt.

PCR-metoden som ble benyttet var TaqMan-assay, en type sanntids-PCR som allerede er etablert ved laboratoriet, men hvor primere, prober og analysebetingelser ble tilpasset den enkelte agens. Sanntids-PCR kan spesifikt identifisere smittestoff med svært høy sensitivitet i lite prøvemateriale.

## 3.0 Bakgrunn

### 3.1 Tonsillene

Tonsillene (mandlene) er lymfekjertler lokalisert i en krans (Waldeyers ring) rundt svelgområdet [8]. De palatine mandlene, ofte referert til som mandler, er de største og ligger på hver sin side av svelgåpningen. Svelgmandelen (tonsilla pharyngea) er lokalisert bak nesehulen, mens tungetonsillene (tonsilla lingualis) finnes bakerst på tungen. Tonsilla tubaria ligger ved den nedre åpningen til øretubene som er en kanal som går fra mellomøret til nesen [9].



Figur 1: Waldeyers ring [9].

Waldeyers ring (figur 1) har en viktig rolle i å bekjempe infeksjon. Mandlene består av lymfatisk vev, og er dermed en del av lymfesystemet. Som alt annet lymfoid vev spiller mandlene en viktig rolle i immunitet og kroppens forsvar mot fremmedlegemer. De fleste patogener entrer kroppen gjennom øvre luftveier (munn og nese). Når et antigen inhaleres, er organiseringen av mandlene optimalt plassert for å fange det opp, noe som fører til utvikling av lymfokiner, signalstoff dannet av T-celler, og immunoglobuliner [10].

På slimhinnene i de øvre luftveiene og i det underliggende bindevevet finnes det dendrittiske celler, B-celler og T-celler. Antigenpresenterende celler fanger opp fremmede antigen og presenterer dem for T-hjelperceller som aktiverer B-celler i mandlene og det utløses en

immunrespons [11]. Når B-cellene stimuleres, beveger de seg i de germinale områdene av mandlene. Et germinalområde er en lymfoid follikkel der det foregår immunrespons, og det dannes B-minneceller som lagres for aktivering ved gjentatt eksponering av samme antigen. I tillegg differensieres B-celler til plasmaceller som produserer IgA, som er et viktig antistoff i slimhinnens immunfunksjon [10].

Palatinmandlene er dekket av flerlaget plateepitel som strekker seg ut i omtrent 15 dype, noe forgrenede tonsillekrypter, som gir et stort indre overflateareal. Epitelet er ikke ensartet, men består av et komplisert nettverk av kanaler med ulike typer epitel og varierende strukturer rundt kanalene. Kryptene er også en del av immunsystemet, og ses normalt som små sprekker. Dersom mat eller luftbåren smitte samler seg i kryptene, kan det medføre hevelse og infeksjon. Kryptene har lave nivå av oksygen, og miljøet fremmer dermed vekst også av anaerobe bakterier [12].

### 3.2 Tonsillitt

Tonsillitt er en inflammasjon og opphovning av mandlene (de palatine mandlene). En inflammasjon er en prosess der immunsystemet settes i gang for å beskytte kroppen mot patogene agens, og målet er å fjerne det skadelige stimuliet. De fem kardinalsymptomene på inflammasjon er varme, rødhet, hevelse, smerte, og tap av funksjon [13].

Flere forskjellige deler av immunsystemet er involvert under en inflammasjonsprosess. Det frigjøres flere stoffer, blant annet hormonene bradykinin og histamin, som fører til utvidelse av de små blodårene. Som følge av dette øker blodstrømmen til skadet vev, og området blir varmt og rødt. Den økte blodstrømmen gjør det mulig å frakte flere hvite blodlegemer til skadestedet, der de hjelper til å bekjempe skadelig stimuli. Cellene fører til at mer væske kommer inn i betent vev, som igjen medfører hevelse. Hormonene irriterer også nerver, som forårsaker smertesignal som sendes til hjernen. Dette fører også til at en beskytter det berørte området når en kjenner smerte [14].

Tonsillitt kan skyldes en infeksjon med virus eller bakterier, og kan være både akutt og kronisk. Tonsillitt betegnes vanligvis som kronisk når symptomene vedvarer over en lengre periode, men det er ingen klar definisjon på dette.

Akutt tonsillitt er i opptil 70 % av tilfellene forårsaket av virus. De vanligste virusene som kan forårsake tonsillitt inkluderer rhinovirus, adenovirus, respiratorisk syncytialt virus (RSV), influensavirus, Epstein-Barr-virus og herpes simplex-virus [2]. Humant herpesvirus 6 (HHV-6) og 7 (HHV-7) kan også forårsake tonsillitt, spesielt hos barn. Disse virusene er vanligvis assosiert med en type tonsillitt sammen med utslett og feber. HIV (humant immunsviktivirus) kan også føre til tonsillitt. Det er imidlertid verdt å merke seg at HIV ikke er en vanlig årsak til tonsillitt, og testing bør helst gjøres på grunnlag av opplysning om risikoatferd eller tilleggssymptomer utover tonsillitt.

Bakterielle infeksjoner starter ofte med en virusinfeksjon som gir en svekkelse av immunforsvaret. Den vanligste årsaken til bakteriell tonsillitt er *S. pyogenes*, men også andre bakterier som *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* og *Haemophilus influenza* kan gi sykdommen [2].

Forekomsten av halsinfeksjon øker sent på vinter og tidlig på vår [15]. Symptomer på tonsillitt er røde, hovne mandler, smerter i svelget, feber, hodepine, hovne lymfeknuter og hvite eller gulaktige pusspropper i mandlene, sistnevnte særlig ved bakteriell tonsillitt [2].

Tonsillitt kan gi komplikasjoner som bihulebetennelse, ørebetennelse, skarlagensfeber, tonsillær cellulitt og peritonsillær abscess. Tonsillitt forårsaket av streptokokker kan også i sjeldne tilfeller føre til blodforgiftning, nekrotisk fasciitt, glomerulonefritt og giktfeber. Lemierres syndrom er en alvorlig tilstand som kan oppstå ved infeksjon hovedsakelig med bakterier i *Fusobacterium*-slekten [16].

### Påvisning

Det kan være vanskelig å differensiere mellom bakteriologisk og virologisk tonsillitt basert på pasientens symptomer. Streptokokkinfeksjon vurderes som klinisk sannsynlig ved fravær av rennende nese, hoste og heshet samt minst fire av fem av følgende kriterier: forstørrede tonsiller, tonsillene er rødere enn bakre svelgvegg, tonsillene har belegg, temperatur er over 38,5 °C og de fremre cervikale lymfeknutene er hovne og ømme [17]. Hurtigtester som tester for streptokokkantigen er nyttig i tvilstilfeller for å se om antibiotikabehandling er aktuelt. Ifølge Norsk Elektronisk Legehåndbok har slike antigenester en sensitivitet på over 90 %, men en negativ test utelukker ikke en streptokokkinfeksjon [3]. CRP kan også være til hjelp for å skille virale og bakterielle infeksjoner, da bakterielle infeksjoner vil gi en høyere CRP-

verdi enn virale. Ved mistanke om bakteriell infeksjon dyrkes per i dag tonsillittprøver fra primærhelsetjenesten i Helse Bergen for *S. pyogenes* på HUS. For sykehusinnlagte pasienter utføres det også PCR-analyse for *S. pyogenes* og *F. necrophorum*.

### Behandling

Lette til moderate tilfeller av tonsillitt behandles med smertestillende og febernedsettende midler. Ved høy feber, nedsatt allmenntilstand, svelgebesvær over 3-5 dager, eller kjent bakteriologisk årsak anbefales antibiotika. Antibiotika reduserer lengden på sykdomsforløpet med et halvt døgn, gir symptomlindring, reduserer smittsomheten, og reduserer risikoen for alvorlige komplikasjoner. Førstevalget er behandling med fenoksymetylpenicillin i 5 dager. Ved penicillinallergi brukes erytromycin [2]. Virale infeksjoner skal ikke behandles med antibiotika. Ved residiverende eller kroniske infeksjoner eller utvikling av peritonsillær abscess kan tonsillektomi være aktuelt [2].

### 3.3 Normalflora

Menneskelig normalflora består av hele spekteret av mikroorganismer som lever på kroppens overflater både utvendig og innvendig, og inkluderer bakterier, archaea, sopp, protozoer og virus. Av disse agensene utgjør bakteriene den største delen av normalfloraen hos mennesket (75-200 billioner).

Forholdet mellom bakterie og vert kan enten være til gjensidig nyttig for begge parter (mutualisme), eller kun til fordel for bakterien uten noe spesifikk nytte for verten (kommensialisme). Flere av bakteriene i normalfloraen lever i mutualisme med verten og er gunstige for mennesket ved at de produserer stoffer vi trenger og beskytter mot infeksjon av sykdomsfremkallende mikrober. Til gjengjeld får bakterien optimale leveforhold og tilgang til næring. Imidlertid finnes det mikrober i normalfloraen som er nært beslektet med patogene organismer, eller som selv er i stand til å bli patogene (opportunistiske bakterier) [18]. Opportunister forårsaker normalt ikke sykdom, men kan gi infeksjoner dersom den normale bakteriefloraen blir forstyrret, eller ved immunsuppresjon eller immunsvekkelse [19].

Normalfloraen er ikke lik for alle mennesker, og det er flere faktorer som spiller inn på dens sammensetning. Populasjonsbaserte studier har identifisert flere faktorer som kan spille inn på variasjon i menneskelig normalflora. Disse inkluderer kroppsdel, alder, miljøeksponeringer,

sykdomstilstander, genetikk, kjønn, bosted, sosioøkonomisk status, svangerskap, og ikke minst kosthold [20].

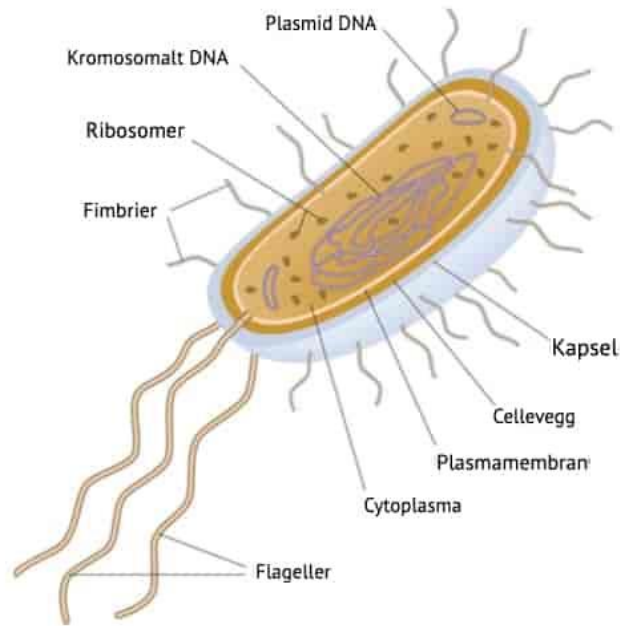
Ulike kroppsdelar har normalflora med varierende mikrobiell sammensetning og funksjon [20]. Den største mikrobielle biomassen finnes i mage-tarm kanalen. Andre steder der det finnes normalflora, er slimhinner i luftveier, munnhule og urogenitalt [21]. Munnhulen inneholder en rekke habitat til mikrobielle samfunn, inkludert tenner, tunge, kinn, leppe, mandler, svelg og spiserør. Munnhulen er en sentral inngang til menneskekroppen, og mikrober som koloniserer seg her kan gi en lokal infeksjon som for eksempel tonsillitt eller spres via epiteloverflater til andre kroppsdelar som mage, tarm, luftrør og lunger [22].

### 3.4 Bakterier

Bakterier er encellede prokaryote organismer, og finnes over alt i naturen som miljøbakterier og som normalflora hos både mennesker og dyr.

Prokaryote celler mangler cellekjerne, og arvematerialet ligger derfor fritt i cellens cytoplasma (figur 2). Noen prokaryote celler kan i tillegg til sitt spesifikke kromosom også inneholde ekstrakromosomalt DNA i form av plasmider eller bakteriofager som er plukket opp fra det ytre miljøet. Plasmid er små, sirkulære DNA-biter som kan inneholde gener som kan gi bakterien en fordel, blant annet når det kommer til antibiotikaresistens. Den prokaryote cellen har også ribosomer som er nødvendig for proteinsyntese, men mangler membranklede organeller. Cytoplasma er omgitt av en ytre cellevegg og en indre cellemembran. Noen bakterier kan også ha en kapsel utenpå celleveggen. Lange, tynne trådlignende strukturer, kalt fimbrier, dekker ofte overflaten til bakterien. Disse har som funksjon å feste bakterien til overflater. Noen bakterier har en flagella som gjør at bakterien kan bevege seg mot næringsstoffer eller bort fra skadelige stoff (kjemotakse) [23].





Figur 2: Oppbygging av den prokaryote cellen [24].

Bakterier inndeles i ulike grupper basert på form og egenskaper. Bakterier kan forekomme i henholdsvis fem ulike former; kokker (kuleformede), staver (stavformede), vibrioner (kommaformede), spirocheter (skrueformede), og spiriller (spiralformede) [23].

Bakterier kategoriseres også i grampositive og gramnegative etter celleveggens sammensetning. De to typene cellevegg lar seg identifisere ved gramfarging [23]. De inndeles igjen i aerob, anaerob, eller fakultativt anaerob etter om de vokser i miljø med oksygen, uten oksygen, eller under begge forhold. Fakultativt anaerobe bakterier trives best med tilgang på oksygen, men kan også leve under anaerobe forhold. Obligate anaerobe kan kun leve under anaerobe forhold [25].

### 3.4.1 Streptokokker

Streptokokker er grampositive og katalasenegative kokker som finnes i kjeder eller par. Streptokokker er inndelt i tre undergrupper etter hvilken grad av hemolyse de gir på blodagar: beta-hemolytisk (fullstendig hemolyse), alfa-hemolytisk (delvis hemolyse), og gamma-hemolytisk (ingen hemolyse) [26]. Lancefield grupperingsystem deler streptokokker i 20 serogrupper (A-T) på grunnlag av antigener i celleveggen. De mest sentrale humanpatogene streptokokkene finnes i gruppe A-G, og av disse er gruppe A og gruppe B viktigst [27].

### 3.4.1.1 *Streptococcus pyogenes*

#### *Etiologi*

*Streptococcus pyogenes* er en oksidase-negativ, beta-hemolytisk og bacitracin-sensitiv streptokokk. Bakterien er fakultativt anaerob, og vokser best i 5-10 % karbondioksid. *S. pyogenes* er den dominerende arten i Lancefield gruppe A-antigen, og kalles derfor ofte gruppe A streptokokker (GAS). Når gruppe A streptokokker dyrkes på blodagarskål, dannes det små kolonier (1-2 mm) med beta-hemolyse. I tillegg til A-antigen, er M-antigen dominerende på bakteriens cellevegg. Basert på egenskapene av antigen M, er bakterien igjen delt inn i over 100 ulike serotyper [15].

#### *Smittemåte, inkubasjonstid, og symptomer*

*S. pyogenes* finnes som normalflora i hals og er en opportunistisk bakterie. *S. pyogenes* er et viktig menneske-spesifikt patogen som kan forårsake alt fra milde, lokale infeksjoner til livstruende invasive infeksjoner [26]. Bakterien koloniserer svelg, anus, og kjønns slimhinner. *S. pyogenes* smitter normalt ved dråpesmitte eller ved direkte og indirekte kontakt, og er svært smittsomme [15].

Bakterien kan penetrere slimhinner i øvre luftveger, og vil da kunne gi opphav til tonsillitt, faryngitt, mellomørebetennelse, bihulebetennelse, og pneumoni. Ubehandlet kan bakterien spres videre til hjernen og gi meningitt. *S. pyogenes* kan også penetrere sår og rifter i huden og gi lokale infeksjoner, samt spres til lymfebaner og gi alvorlige infeksjoner som sepsis og toksisk sjokksyndrom [28].

*S. pyogenes* har et stort antall virulensfaktorer, både på cellevegg og utskilte toksiner, som bidrar til patogenese av infeksjon. *S. pyogenes* har en kapsel som består av hyaluronsyre som gir beskyttelse mot fagocytose fra vertens immunsystem. M-protein bidrar til at bakterien kan feste seg til vertsceller, i tillegg til å hemme opsonisering. *S. pyogenes* produserer også eksotoksiner, som kan medføre utslett ved skarlagensfeber og toksisk sjokksyndrom.

Bakterien skiller også ut flere streptokinase-enzym som bryter opp fibrin og fibrinogen, som bidrar til invasjon av vev [26].

### *Epidemiologi*

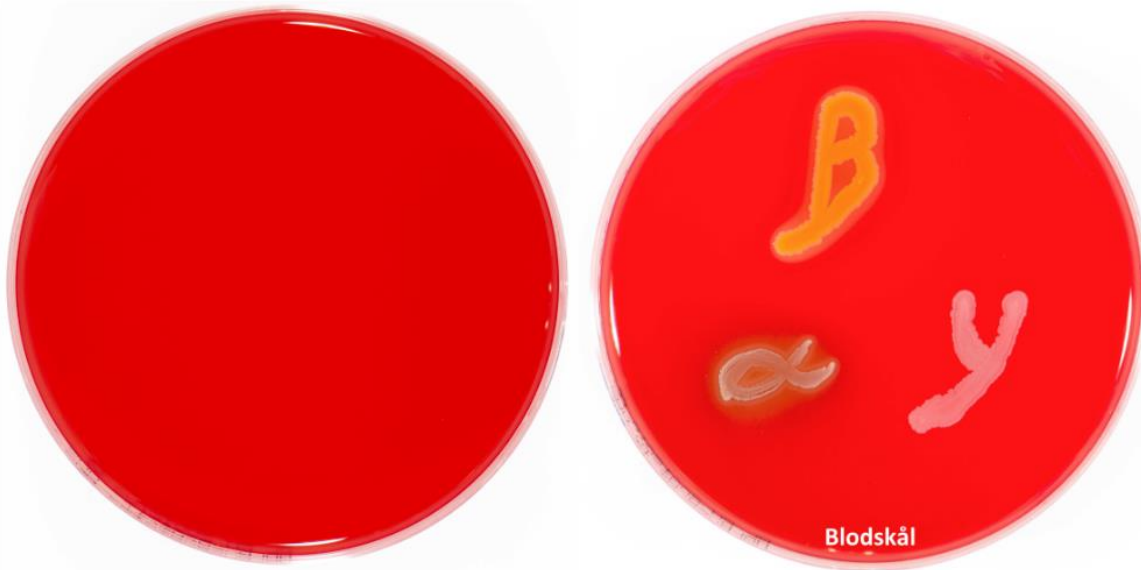
GAS har alltid vært assosiert med høy sykkelighet og dødelighet. På verdensbasis forekommer omtrent 2 millioner tilfeller med alvorlige GAS-infeksjoner årlig. Dette omfatter både revmatisk hjertesykdom, halsinfeksjon, revmatisk feber, hudinfeksjon, impetigo, og invasiv sykdom. Globalt skyldes over 600 millioner tilfeller av halsinfeksjon *S. pyogenes* [15].

Siden 1980-tallet har GAS-epidemiologien forandret seg i mange vestlige land, og studier viser at GAS serotype M1 endret seg med opptak av nye virulensfaktorer. I Norge ble det sett en økende forekomst og alvorlighetsgrad i årene 1984-1988, og flere unge ble rammet enn tidligere. Fra 1989-1993 var det en nedgang i systemisk GAS-infeksjon, før det igjen ble rapportert en økning i alvorlige invasive og systematiske tilfeller av GAS frem til 2005 [29]. I dag utgjør serotypene GAS M1 og M89 den største andelen av infeksjoner. Dette er serotyper som har sterke assosiasjoner til halsinfeksjon. Andre serotyper finnes fremdeles, men ikke i like stor grad som tidligere [29].

Det ble i 2022 registrert en økning i forekomst av GAS infeksjon hos barn i flere europeiske land, sammenlignet med tiden før koronapandemien. Dette innebærer både halsinfeksjon, skarlagensfeber og alvorlige invasive infeksjoner. I Norge er det derimot ikke blitt observert en sikker økning [29].

### *Diagnostikk og behandling*

Streptokokker dyrkes vanligvis på blodagarskål, som består av buljong, agar, og 7,5 % fullblod. Blodagar er et generelt dyrkningsmedium som fremmer vekst av flere bakteriearter. Denne teknikken lar en observere betahemolyse, som skyldes bakterier som produserer hemolysin (figur 3). Betahemolyse er kjent for en rekke streptokokker inkludert serogruppe A, B, C, F, og G, og gir dermed godt grunnlag for videre identifisering [30].



Figur 3:  $\alpha$ -hemolyse,  $\beta$ -hemolyse, og  $\gamma$ -hemolyse på blodagar. *S. pyogenes* gir små kolonier (1-2 mm) med  $\beta$ -hemolyse. Dette sees som en oppklaring rundt en koloni [31].

Dersom betahemolyse observeres på blodagar, gjennomføres Lancefield gruppebestemmelse. IgG rettet mot Lancefield antigenene A, B, C, D, F og G er koblet til latexpartikler. Ved positivt utslag på A, tyder det på gruppe A streptokokker. Ved positivt utslag på *S. pyogenes* testes det også for antibiotikaresistens [30].

#### 3.4.1.2 *Streptococcus dysgalactiae*

*Streptococcus dysgalactiae* er en grampositiv, betahemolytisk streptokokk i Lancefield gruppe C og G. *S. dysgalactia* er delt inn i underartene *S. dysgalactiae equisimilis* (EDSE) og *S. dysgalactiae dysgalactiae* (SDSD). SDSE er i størst grad assosiert med menneskelig sykdom, mens SDSD er hovedsakelig knyttet opp til sykdom hos dyr. *S. dysgalactiae* er en del av normalfloraen, og koloniserer svelg, hud, mage-tarmkanal, og kjønnsorgan.

Bakterien kan gi alt fra milde hudinfeksjoner og betennelse i mandlene, til mer alvorlige tilstander som nekrotiserende fasciitt og bakteriemi [32].

*S. dysgalactiae* gir i stor grad opphav til samme sykdommer og sykdomsbilde som *S. pyogenes*. Bakterien skiller seg derimot fra *S. pyogenes* ved at den er bacitracin-resistent [33]. *S. dysgalactiae* dyrkes på blodagar, og etter 24 timer inkubasjon dannes det store kolonier (> 0,5 cm) [34].

### 3.4.2 Fusobacterium

Slekten *Fusobacterium* består av 20 arter som finnes i munnhule og fordøyelseskanalen hos mennesker og dyr. Det er en gruppe gramnegative, anaerobe, ikke-sporedannende og ikke-bevegelige bakterier. Bakteriene er stavformede med avsmalnende ender. I denne gruppen er *Fusobacterium nucleatum* den hyppigst isolerte bakterien fra mennesker [7]. Fusobakteriene smitter gjennom kontakt med slimhinner, inokulering og kontakt med kroppsvæsker.

#### 3.4.2.1 *Fusobacterium necrophorum*

*Fusobacterium necrophorum* finnes i normalfloraen hos mennesker og dyr i de øvre luftveiene. *F. necrophorum* har i lang tid vært en velkjent årsak til flere sykdommer, blant annet Lemierres syndrom og peritonsillær abscess. I dag er det også kjent at bakterien er den nest vanligste årsaken til bakteriell tonsillitt etter gruppe A streptokokker, særlig hos ungdom og voksne [35].

Lemierres syndrom ble først beskrevet av André Lemierre i 1936. Sykdommen rammer vanligvis unge voksne, og skyldes hovedsakelig bakterien *F. necrophorum*. Lemierre syndrom forekommer sjeldent. Det utvikles i de fleste tilfeller som en komplikasjon etter en halsbetennelse, der infeksjon har medført dannelse av peritonsillær abscess, som er en opphopning av puss på mandlene. Inne i denne abscessen ligger forholdene til rette for vekst av anaerobe bakterier. Betennelsen kan spres via en blodåre på halsen (vena jugularis interna), og på den måten gi anaerob sepsis. Det er en invasiv sykdom som kan spres til flere organer, derav lunger, hjerteposen, nyrer, og hjerne, og i verste fall resultere i død [36].

#### 3.4.2.2 *Fusobacterium nucleatum*

*Fusobacterium nucleatum* finnes i normalfloraen i munn og tarmslimhinnen. Bakterien kan typisk forårsake abscesser i hjernen, lunge, abdomen og i bukhulen sammen med andre anaerobiske og fakultative bakterier. *F. nucleatum* gir også hode- og halsinfeksjoner som tannkjøttbetennelse, peritonsillær abscess og er sammen med *F. necrophorum* den vanligste årsaken til Lemierres syndrom. Bakterien er også assosiert med en rekke andre sykdommer som appendisitt, inflammatorisk tarmsykdom, kardiovaskulære sykdommer, og mistenkes å ha en rolle i utvikling av tykktarmskreft [7].

#### 3.4.2.3 *Fusobacterium massiliense*

*Fusobacterium massiliense* er en lite omtalt bakterie med kun svært få publikasjoner. I 2016 ble *F. massiliense* funnet i duodenum hos en 60 år gammel mann med jernmangel. Prøven ble tatt fra en øvre endoskopi, og umiddelbart inkubert i en anaerob blodkulturflaske. Den første veksten av stammen *F. massiliense* ble oppnådd etter 1 døgn inkubasjon i blodkulturflaske, og etter 1 dag inkubasjon på Columbia-agar med 5 % saueblod.

Fenotypisk analyse viste at bakterien hadde optimal vekst etter 48 timer inkubasjon ved 37 °C og pH 7 på Columbia-agar med 5 % saueblod under anaerobe forhold. Koloniene som ble funnet var 0,6-0,8 mm i diameter, hvite og sirkulære. Bakterien var gramnegativ, ikke-bevegelig, og ikke-sporedannede. Katalase-test og oksidase-test var negativ [6].

#### 3.4.3 *Arcanobacterium*

*Arcanobacterium* er en slekt av bakterier som først ble beskrevet av Collins et al. i 1983. Bakteriene finnes i naturen og i normalflora hos mennesker og dyr. De er grampositive, ikke-bevegelige, fakultativt anaerobe, og ikke-sporedannede. Bakteriens optimale vekst er i 37 °C med 5-10 % CO<sub>2</sub> [37].

##### 3.4.3.1 *Arcanobacterium haemolyticum*

*Arcanobacterium haemolyticum* er en katalasenegativ bakterie. Det finnes to subtyper av bakterien; glatt og grov type. Glatt type kategoriseres ved at den er beta-hemolytisk, beta-glukuronidase negativ og gjærer sukrose og trehalose. Grov type er ikke-hemolytisk, beta-glukuronidase positiv og gjærer ikke sukrose og trehalose [38].

*A. haemolyticum* er en opportunistisk bakterie som kan påvises som en del av normalflora i hud og svelg. De første tilfellene av patogenet ble beskrevet i 1946, hvor den var årsak til faryngitt, samt gav ulcerøse hudlesjoner hos amerikanske soldater på Stillehavsoyene [38]. I dag er infeksjoner med *A. haemolyticum* sjeldne, men ses som årsak til faryngitt hos ungdom, og hud og bløtvevsinfeksjon hos personer med nedsatt immunforsvar. Grov type påvises oftest ved halsinfeksjoner, mens glatt type hovedsakelig ses ved bløtvevsinfeksjoner. Systemiske infeksjoner forårsaket av bakterien er sjeldne.

En studie gjort av Mackenzie et al. viser at forekomsten er størst hos unge mellom 15 og 18 år [39]. Symptomene ligner halsinfeksjon forårsaket av *S. pyogenes* med feber, sår hals og hovne

lymfekjertler. I tillegg er det observert utslett i forbindelse med infeksjon [38].

Når det gjelder bløtvevsinfeksjoner hos eldre, er det observert en sammenheng med diabetes. En studie viste at 72 % av pasienter med bløtvevsinfeksjon forårsaket av *A. haemolyticum* også hadde diabetes mellitus. Disse pasientene hadde også en høyere risiko for sepsis. Bakterien er sensitiv for alle klasser av antibiotika, med unntak av trimetoprim/sulfametazin [38].

### 3.5 Virus

Et virus består av en proteinkapsel (kapsid) som inneholder arvestoff. Arvestoffet kan være enkelttrådig eller dobbeltrådig DNA eller RNA. Det er tre hovedstrukturer av viruskapsid: ikosaedere, spiralformede (heliske) og komplekse virus. Noen virus, kappeklede virus, har i tillegg rundt kapsidet en ytre membran som består av et dobbelt lipidlag med glykoproteiner og andre proteiner, og er avsnørt fra vertscellen sin cellemembran i det siste steg av den virale livssyklus i vertscellen. Virus uten ytre kappe kalles nakne virus. Generelt er kappeklede (membranklede) virus mindre motstandsdyktige mot organiske løsningsmidler og fysisk påvirkning enn nakne virus som er avgrenset utad av et ikosaedrisk proteinkapsid. Virus er obligate, intracellulære parasitter og avhengige av en vertscelle for å formere seg. Virus kan ikke replikere i alle celletyper. Tropismen til en virusart er definert som de vertsceller der virus kan gjennomføre en produktiv livssyklus [40].

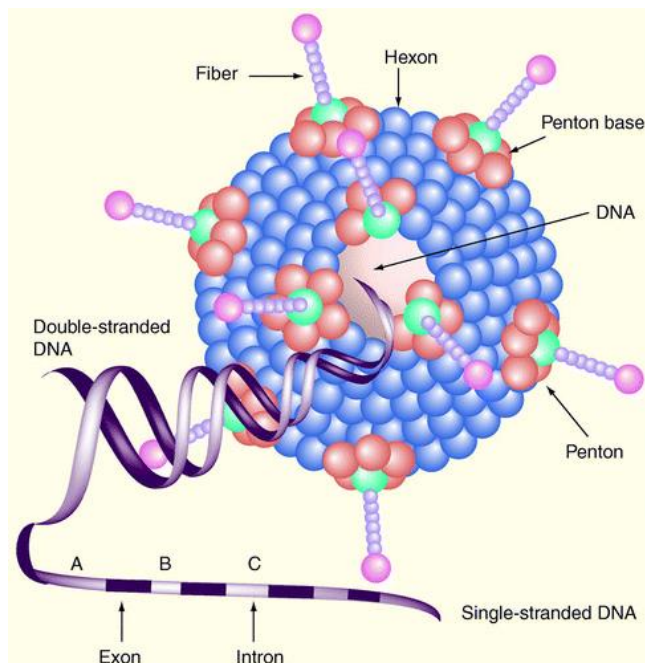
Det finnes få, men stadig flere, antivirale midler sammenlignet med bakterielle. En årsak er at det er vanskelig å lage midler som er spesifikke for virus, da disse benytter seg av cellenes egne mekanismer for replikasjon. I tillegg replikerer viruset i inkubasjonstiden slik at viruset i stor grad har spredd seg rundt i kroppen før symptomdebut. Antivirale midler bygger typisk på detaljert innsikt i molekylære interaksjoner mellom virus og vertscelle og angriper presise deler av den virale livssyklus i vertscellen [40].

#### 3.5.1 Adenovirus

Adenoviruset ble først isolert fra humant adenoid vev av Wallace Rowe i 1953 [41]. Viruset gir ofte milde luftveissymptomer, men kan også forårsake konjunktivitt, lungebetennelse, keratokonjunktivitt, hemorrhagisk (blødende) blærebetennelse og gastroenteritt [42]. Viruset smitter gjennom dråpesmitte, fekalt-oralt og ved direkte kontakt med konjunktiva [43]. Smitte

er vanligst hos barn og unge, og det er også en kjent årsak til smitteutbrudd i militære leire [42].

Viruset tilhører familien Adenoviridae og består av et ikosaedrisk nukleokapsid på 70-100 nm med dobbeltrådig DNA som arvestoff (figur 4). Kapsidet består av 252 kapsomerer, der 240 av disse er heksoner som utgjør sidene i nukleokapsidet. De tolv kantene av ikosaederet består av pentoner med utstikkende fibre [42]. Disse fibrene er unike for adenoviruset, og er viktig for patogenesen og virusets evne til å binde seg til vertsceller. Kjerneproteinene til viruset er polypeptid V, polypeptid VII, Mu og et terminalt protein bundet til 5'-endene av DNA-et [42].



Figur 4: Strukturen til adenovirus [44].

Fibrene på pentonene binder til CAR-reseptorer på humane vertsceller. En interaksjon mellom pentonproteinet og integriner gjør at viruset kan entre cellen ved å feste seg til membranen og danne vesikler. Det virale DNA-et entrer deretter cellekjernen. DNA-et blir transkribert av RNA-polymerasen til vertscellen og virale partikler dannes. Det virale genomet kan deles inn i early (E), intermediate (I) og late (L) regioner. I E-regionen koder for proteiner som er involvert i viral replikasjon. I-regionen har en rolle i hekson-interaksjoner, DNA-pakking og



dannelse av nye virionpartikler. L-regionen har områder som bidrar til modningen av virionpartiklene. Virionene aktiverer en inflammasjonsprosess og hindrer produksjonen av makromolekyler slik at celler mister sin funksjon [41].

Det finnes over 100 serotyper av viruset, og 67 humane serotyper er identifisert [41]. Det er særlig serotype 3, 4, 7 og 21 som forårsaker infeksjon i luftveiene. Immunitet oppnås etter infeksjon gjennom produksjon av antistoffer og immuniteten er serotype-spesifikk og livsvarig [40].

Adenovirus kan bli værende i mandlene og andre lymfoide vev i lang tid etter en infeksjon og viralt DNA kan derfor påvises selv uten en aktiv infeksjon [42].

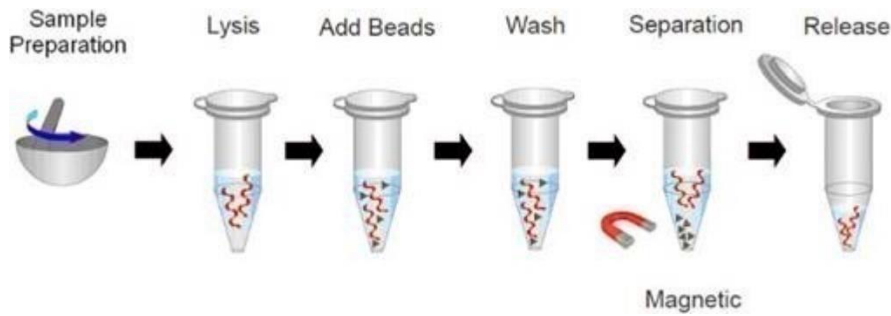
Infeksjon med adenovirus kan påvises ved å observere en økning i antistoff-titer, ved PCR eller ved deteksjon av selve viruset i cellekultur gjennom en cytopatisk effekt. De fleste infeksjonene med adenovirus er milde og krever ingen behandling. Det finnes ingen antiviral behandling mot viruset. Vaksinerer er lite brukt fordi adenovirus er assosiert med tumorgenese hos dyr. Dette er imidlertid ikke blitt observert i mennesker. Rekombinante vaksiner er under utvikling [42].

### 3.6 Analyseprinsipp

#### 3.6.1 Ekstraksjon av DNA

Ekstraksjon er prosessen der nukleinsyrer (DNA/RNA) hentes ut fra pasientprøven, og skilles fra øvrig biologisk materiale i prøven [45].

Prinsipp for isolering av nukleinsyre er basert på MagNA Pure Magnetic glasspartikkelteknologi (figur 5). Prøvematerialet lyses ved hjelp av lyserings-/bindingsbuffer. Nukleinsyrer (DNA/RNA) blir frigjort, og nukleaser blir destruert av Proteinase K. Nukleinsyrene binder seg så til silikonoverflaten av tilsatte magnetiske glasspartikler (MGP) på grunn av de kaotropiske saltforholdene og den høye ionestyrken til lyserings-/bindingsbufferen. MGP som er bundet med nukleinsyrer, blir separert magnetisk fra resten av prøven. Ubundne stoffer, som celleavfall med lipider og proteiner, og potensielle PCR-hemmere, blir fjernet gjennom flere vasketrinn. Renset nukleinsyre elueres fra MGPe ved hjelp av elueringsbuffer [46].

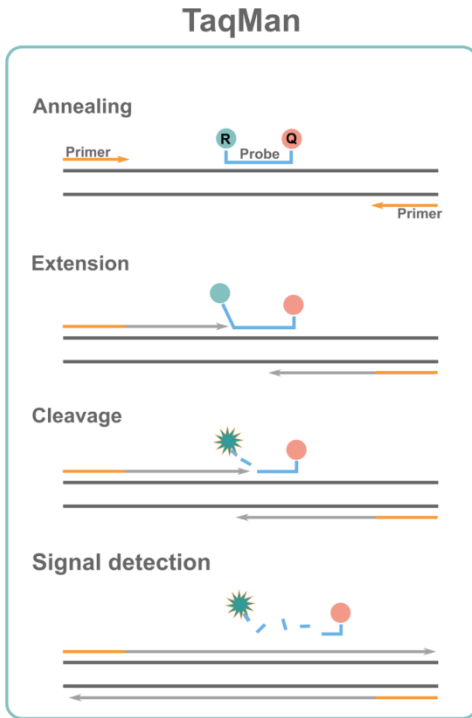


Figur 5: Ekstraksjon av DNA [47]

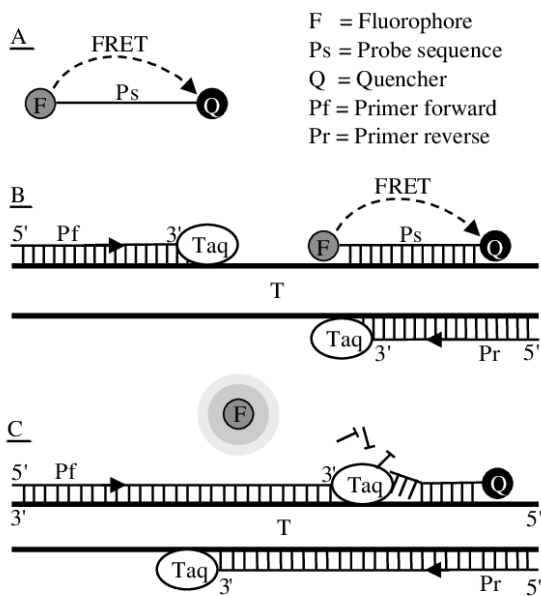
### 3.6.2 Sanntids-PCR

Sanntids-PCR er en type PCR-metodikk der amplifikasjonen kan overvåkes underveis mens PCR-reaksjonen foregår. Sanntids-PCR kan benyttes til deteksjon og/eller kvantifisering av nukleinsyrer. Her brukes det til påvisning av patogener gjennom kvalitativ deteksjon av sekvenser som er spesifikke for de ulike agensene.

En vanlig metode for deteksjon er fluorescens som interkalerer i dobbeltrådig DNA (f.eks. SYBR Green I) samt fluorescerende prober. Ved TaqMan assay benyttes varmestabil Taq DNA polymerase, buffer, probe(r), forward primer(e) og revers primer(e) (figur 6). En probe er en oligonukleotidsekvens som er komplementær til en sekvens som ligger mellom primerne. En reporter er en fluorofor (f.eks. FAM eller VIC) som er kovalent bundet til 5'-enden av proben. En quencher (f.eks. BHQ1 eller TAMRA) er bundet til 3'-enden og stilner ("quencher") signalet fra fluoroforen gjennom FRET-teknologi (fluorescence resonance energy transfer) der energien overføres fra reporteren til quencheren (figur 7) [48].



Figur 6: I TaqMan-prinsippet benyttes det en probe med en reporter på 5'-enden og en quencher på 3'-enden. Når polymerasen syntetiserer den nye tråden ødelegges proben på grunn av Taq-polymerasens eksonuklease-aktivitet, og det avgis fluorescens [49].



Figur 7: Skjematisk figur av FRET. Når proben er intakt, overføres eksitasjonsenergien fra reporteren til quencheren. Dette krever at reporteren og quencheren ligger nært hverandre (1-10 nm) (1 basepar utgjør ca. 0,34 nm). Taq-polymerasens eksonukleaseaktivitet ødelegger proben slik at reporteren og quencheren skilles fra hverandre, og reporteren avgir fluorescens [50].

Ved oppvarming til ca. 95 °C denatureres DNA ved at hydrogenbindingene brytes og DNA-et blir enkelttrådet. Temperaturen senkes deretter slik at primerne og proben binder seg til de komplementære sekvensene på DNA-tråden. Polymerasen fester seg til primeren og begynner å syntetisere en komplementær tråd. Når polymerasen kommer til stedet hvor proben er festet kløyves proben, og polymerasen fortsetter å syntetisere den nye DNA-tråden. Når proben kløyves, separeres reporteren og quencheren som er festet til proben. Det gjør at reporteren avgir fluorescens som detekteres. Fluorescenssignalet som avgis er proporsjonalt med antall amplikon. Etter hvert som mer DNA kopieres opp, blir signalet sterkere. Dersom prøven er negativ, vil ikke primerne eller proben feste seg. Proben forblir dermed intakt og quencheren hindrer at det avgis et fluorescenssignal [48].

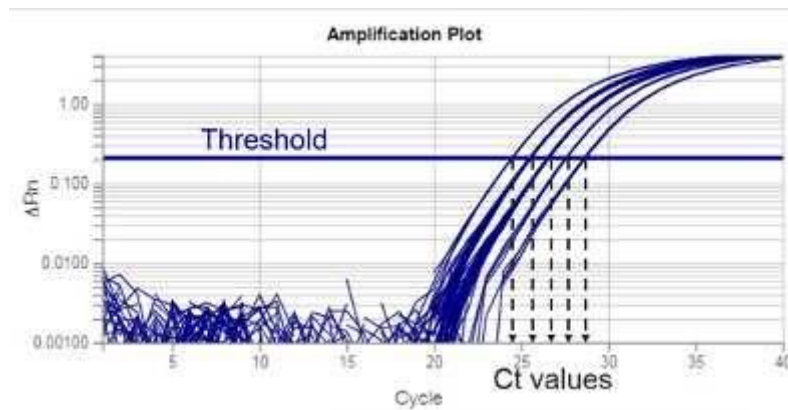
### *3.6.3 Tolkning av PCR resultat*

Sanntids-PCR-data kan presenteres i et amplifikasjonsplott, der x-aksen viser til antall sykluser, og y-aksen viser til fluorescens (se figur 8). Ct står for "cycle threshold", og verdien angir antall cykler det tar før et resultat blir positivt (altså krysser "threshold-linjen", grenselinjen for signalstyrke). Å sette en fast threshold for en analytt gjør at en lettere kan sammenligne Ct-verdier fra oppsett til oppsett. Hvor en setter denne thresholden vurderes fra metode til metode. Det er viktig at denne ikke blir satt for høyt slik at en kan gå glipp av reelt positive prøver, og ikke for lavt slik at en får med unødvendig bakgrunnsstøy.

Alle kurver som krysser threshold-linjen får en Ct-verdi. Dersom prøven inneholder mange kopier av et agens, vil man få kurve over threshold etter få sykluser, og Ct-verdien blir lav. Tilsvarende vil en prøve med lite målsekvens få en høy Ct-verdi. Ved reell deteksjon av et agens i en prøve vil Ct-verdien ofte ligge mellom 18 og 30. Ct-verdier over 34 er i økende grad assosiert med usikkert resultat på grunn av kontaminasjon eller amplifikasjonsartefakt. Kurver med Ct-verdi over 40 blir vanligvis ansett som negative.

Dess høyere Ct-verdi, dess større er risikoen for falske positivt svar. Ct-verdien må dermed alltid vurderes sammen med formen på kurven. For at en prøve skal tolkes som positiv bør også kurven ha en sigmoid form og skille seg fra bakgrunnen. Dersom man får en høy Ct-verdi og en kurve som ikke er sigmoid, må en stille spørsmål om resultatet er gyldig.

Probedegradering kan gi Ct-verdi selv om prøven er negativ. Kurven vil da ofte vise seg mot slutten av reaksjonen. Støy vil kunne vise seg nede ved baselinjen. Dersom det er usikkerhet om en prøve er positiv kan et tiltak være å reanalysere prøven i flere paralleller. Et annet tiltak vil være å prøve å sekvensere det amplifiserte materialet [51].



Figur 8: Amplifikasjonsplot for PCR. Kurvene med tydelig stigning som skiller seg godt fra bakgrunnen og krysser threshold-linjen anses som positive [51].

#### 3.6.4 Faktorer som kan påvirke analysen

Det finnes flere preanalytiske feilkilder ved PCR, og både falske positive og falske negative svar kan oppstå. Ved PCR-analyser som baseres på amplifikasjon og deteksjon av nukleinsyrer (RNA/DNA) vil kontaminasjon kunne forekomme, som igjen kan medføre falske positive svar. Nukleinsyrekontaminasjon kan skje dersom nukleinsyrer kommer i kontakt med prøvemateriale, utstyr, eller reagens som benyttes i analysen. For å unngå kontaminasjon er det viktig med gode arbeidsrutiner og adskilte soner innenfor laboratoriet.

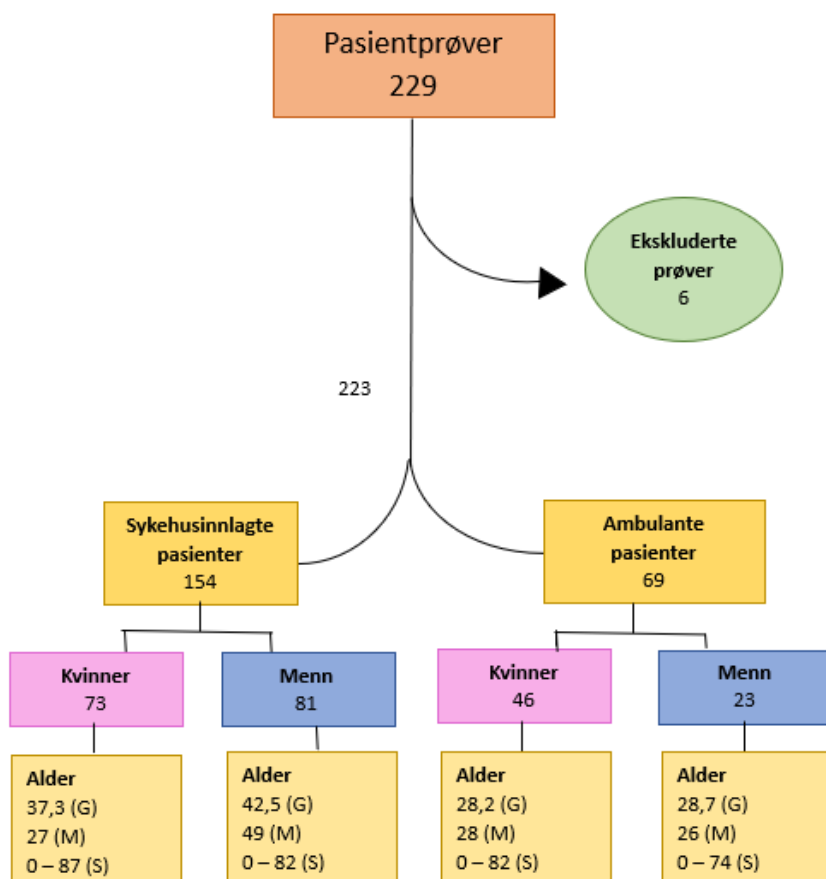
Falske negative resultat kan komme av degradert prøvemateriale. Det kan også være et resultat av feil prøvetakning, forurensing med inhibitor fra miljøet, dårlig designet PCR, feil ved reagens og utstyr, eller feil under prøvebehandling [52].

Ved å bruke inhibisjonskontroll i PCR-reaksjonene undersøker man for tilstedeværelse av eventuelle faktorer som hemmer reaksjonen ved DNA-ekstrahering. Inhibisjonskontroller brukes vanligvis bare ved kvantitative analyser, og ettersom dette er et sjeldent problem har inhibisjonskontroller ikke blitt inkludert i disse oppsettene.

## 4.0 Materiale og metode

### 4.1 Prøvemateriale

#### 4.1.1 Pasientprøver



Figur 9: Flytskjema for pasientgrupper. 229 prøver ble totalt samlet inn. 6 prøver ble ekskludert. Skjemaet viser inndeling av sykehusinnlagte og ambulante pasienter, og videre inndeling i kjønn. Gjennomsnittsalder (G), medianalder (M), og aldersspredning (S) er oppgitt for menn og kvinner i de ulike pasientgruppene.

Det ble totalt samlet inn 229 penselprøver fra tonsillene hos personer med mistanke om tonsillitt (figur 9). 6 prøver ble ekskludert. En prøve hadde ikke nok eluat (88), for to prøver var det mistanke om forbyting (88 og 90), og to andre prøver inneholdt feil prøvemateriale (177 og 192) og den siste ble ekskludert grunnet feil pipettering og forurensing av prøvemateriale (151). Klinisk indikasjon for slike penselprøver er mistanke om streptokokktonsillitt med negativ hurtigtest for GAS eller andre, mer uvanlige årsaker til tonsillitt [53]. Prøvene ble tatt av helsepersonell og samlet inn fortløpende fra ambulante og fra innleggende pasienter på HUS. Pasientenes symptomer, sykdomshistorikk og detaljer om

hvordan prøven er tatt er ikke kjent.

I tillegg ble det samlet inn 20 tonsilleprøver fra friske personer. Disse prøvene ble tatt av testpersonene selv. Prøvene ble oppbevart i kjøleskap frem til analyse.

Alle penselprøver ble tatt på Copan Liquid Amies Elution Swab (ESwab) innsamlings- og transportrør (figur 10), med unntak av en prøve som ble tatt på Copan Amies Charcoal Gel Swab. ESwab er det som vanligvis brukes for å samle sekret ved infeksjon i de øvre luftveiene. For virus, inkludert adenovirus, benyttes oftest virus transportmedium som UTM-RT (Copan), men ESwab er også egnet.

ESwab innsamlings- og transportrør består av et flytende transportmedium som opprettholder levedyktigheten til en rekke aerobe, anaerobe, og mer kravfulle bakterier under transport til laboratoriet. ESwab transportmedium består av fosfatbuffer, kalsium, magnesiumsalter, og natriumklorid med et redusert miljø grunnet tilstedeværelsen av natriumtioglykolat. Når prøven er tatt, skal penselen umiddelbart plasseres i røret. Prøver som skal analyseres ved PCR er holdbare i 5 døgn i romtemperatur (20-25°C), eller 7 døgn i kjøleskap (4-8°C). Prøver til dyrkning er holdbare i 48 timer i kjøleskapstemperatur (4-8°C), mens prøver med anaerobe bakterier er holdbare i 24 timer i kjøleskap [54].



*Figur 10: ESwab innsamling- og transportrør med tilhørende prøvetakingspensel [55].*

Copan Amies Charcoal Gel Swab inneholder natriumklorid, kaliumklorid, kalsiumklorid, magnesiumklorid, kalium dihydrogenfosfat, dinatriumhydrogenfosfat, natriumtioglykolat og kull. Prøvene må lysbeskyttes og oppbevares ved temperaturer under 8°C [56].

#### 4.1.2 Etiske betraktninger

Bachelorprosjektet er et ledd i laboratoriets kvalitetssikring, der det er ønskelig å undersøke om det er hensiktsmessig å inkludere en adenovirus-PCR i diagnostikken av bakterielle tonsillitter, og om en kan erstatte dyrkningsbasert diagnostikk av *S. pyogenes* med PCR. I tillegg har prøvene blitt undersøkt for tilstedeværelse av *F. necrophorum*, *A. haemolyticum*, *F. nucleatum* og *F. massiliense*. Hensikten med prosjektet er å undersøke om det er mulig å forbedre dagens diagnostikk ved tonsillitter. For pasienten kan det bety raskere diagnostikk og oppstart av behandling, og redusert morbiditet. For laboratoriet kan det gi mer presis diagnostikk, økt effektivitet, og reduserte kostnader.

Ettersom oppgaven går under kvalitetssikring er den ikke søknadspliktig gjennom regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) [57]. Alle prøver blir aidentifiserte, og koblingsnøkkel lagres på sikker lagring. Aidentifisering innebærer at navn og personnummer erstattes med en unik kode, og koblingsnøkkelen er fysisk adskilt [58]. Her lagres koblingsnøkkelen på sikker lagring. I oppgaven behandles informasjon om alder og kjønn. Dette er informasjon som ikke kan knyttes direkte opp til enkeltpersoner, og regnes derfor ikke som personopplysninger ifølge Sikt. Dermed er ikke forskningsprosjektet meldepliktig til Sikt [59].

#### 4.2 Reagens og kontroller

Tabell 1: Reagens benyttet til ekstraksjon og PCR. Utstyr med manglende lot- og referansenummer merkes med ikke aktuell (i.a).

Reagens	Lot nr.	Ref. nr.	Utløpsdato	Oppbevaring	Leverandør
LightCycler 480 Probes Master	68710620	04887301001	2023-10- 31	I kjøleskap.	Roche
eSwab	2219572	4E0535.A	2024-02- 07	I romtemperatur og lysbeskyttet.	Copan
Buljong	270223	i.a.	2023-05- 13	I kjøleskap.	Produksjonslab
Lysing matrix tube	163132	6914100	2031-10- 31	I romtemperatur (15- 30 °C).	MP Bio



MagNA Pure 96 DNA og Viral NA Volume kit	63697820	06374891001	2023-07- 31	Lagres i +15°C- +24°C. Kittet skal holdes borte fra lys og magneter.	Roche
Premix Ex Taq (Perfect Real Time)	AM61652A	SD2216 Cat# RR039	08-2024	I kjøleskap.	TaKaRa
	ALE1697A	SD2216 Cat# RR039	01-2024		
Rox Reference Dye II	AL70684A	SD0384	i.a.	I kjøleskap. > 6 mnd: -20°C	TaKaRa
	AL31503A	SD0384	i.a.		
Elution Buffer	172033029	19086	i.a. Åpnet 17/2-23	I romtemperatur.	Qiagen (Tyskland)

Positiv og negativ kontroll skal alltid inkluderes i hvert PCR-oppsett. Som negativ kontroll benyttes ekstrahert transportmedium fra ESwab. Denne prøven inneholder ikke DNA. Positiv kontroll inneholder DNA fra det aktuelle agenset og kan bidra til å avsløre falske negative resultater. Positive kontroller benyttet her er laget internt på MIA og oppbevart ved -20 °C (tabell 2). I oppsettet benyttes positiv, kituavhengig kontroll kun som et positivt referansemateriale. Det er ikke satt krav til det positive referansematerialet annet enn at det skal bli positivt for den aktuelle analytten, og ha en tydelig sigmoid kurve som skiller seg godt fra bakgrunnen. I en kvantitativ analyse må Ct-verdien for den positive kontrollen ligge innenfor en bestemt variasjonskoeffisient (CV) for analysen. I tillegg benyttes housekeeping-gener ved kvantifisering. Dette er gener hvor genuttrykket er forventet å være stabilt, og disse brukes for å normalisere mengden nukleinsyrer i de ulike prøvene [60]. Analysene som ble utført i dette prosjektet kan kun sies å være kvalitative, ettersom Ct-verdien kun til en viss grad sier noe om hvor sterk en positiv prøve er [61].

Tabell 2: Positive kontroller ved PCR-analyse. Det ble ikke inkludert positiv kontroll for *F. massiliense*. Det blir ikke gjennomført PCR-analyse av *A. haemolyticum* i rutine på laboratoriet. Kontrollen ble laget spesifikt for å benyttes i studien, og har dermed ikke navn og lot.

Agens	Navn på kontroll	Produsent	Lot	Dato løst
-------	------------------	-----------	-----	-----------

S. pyog. F. necr.	TONS	MIA	220926	26/09-22
Adenov.	ADV	MIA	221207, 23423	07/12-22, 23/4-23
A. haem.	-	MIA	-	17/3-23
F. nucl.	EMP1	MIA	221111, 230202	11/11-22, 02/02-23
F. mass.	-	-	-	-

#### 4.2.1 Tillaging av kontrollmateriale

Positive kontroller for *A. haemolyticum* ble laget fra kontrollstammer oppbevart på laboratoriet. 900 µL buljong (tabell 2) ble tilsatt i en Lysing Matrix Tube. Bakteriekolonier fra en kontrollstamme dyrket på blodagarskål ble løst i røret. Mekanisk lysering ble utført med MagNA Lyser (Roche) ved 6500 speed i 45 sekunder x 2. Kontrollprøvene ble så sentrifugert ved 16060 rpm (G-verdi 21954) i 5 minutter i Mikro 185 sentrifuge (Hettich).

Positive kontroller for *S. pyogenes*, *F. necrophorum*, og *F. nucleatum* ble laget fra ATCC-stammer (levert fra American Type Culture Collection). Se vedlegg 2 for oversikt over ATCC-stammer. Bakteriene ble dyrket på blodskål. Det ble hentet kolonier fra dyrket bakterie, som ble knust med septifastkuler. Adenovirus ble isolert fra en pasientprøve, og dyrket i cellekultur. Alle kontroller ble ekstrahert på MPC, og fortynnet i EB-buffer. For *F. massiliense* foreligger det ikke kontrollstammer, og dermed benyttes kun negativ kontroll i analysen.

Tabell 3: Buljongløsning

Stoff	Mengde
RO-vann (revers osmose)	1000 mL
Gjærekstrakt	0,5 g
Lab Lemco Powder	2,4 g
Dinatriumhydrogen fosfat dihydrat	0,99 g
Natriumklorid	5 g
Bacteriological peptone	10 g

#### 4.2.2 Oppløsning av primere og prøber

Primerne og probene til de ulike agensene leveres som tørrstoff og ble løst i PCR-grad-vann (DNA-fritt) til en konsentrasjon på 10 µM.

#### 4.3 Instrument og utstyr

MagNA Pure 96 (Roche) ble brukt for ekstraksjon av DNA fra prøvene. Det ble brukt fire instrument av typen QuantStudio 5 (ThermoFisher) til PCR-analyser. Både ekstraksjonsinstrumentet og PCR-instrumentet har en kapasitet på 96 prøver. Instrumenter og sentrifuger som er benyttet er listet opp i tabell 4.

Tabell 4: Instrumenter og sentrifuger.

Instrument	Ref. nr.	Leverandør	Produsentland
Mikro 185 Sentrifuge	123-16031- 20060283	Hettich	Tyskland
Microplate Centrifuge C2002-E	123-16031- 20060283	Fisherbrand	China
MagNA Pure 96	Serienummer: 5403	Roche	Tyskland
Quantstudio 5	Serienummer: 272512115	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific	Singapor
	Serienummer: 272512075		
	Serienummer: 272511595		
	Serienummer: 272511487		

Tabell 5 viser utstyr med tilhørende lot-numre som ble benyttet under prøveprepareringen.

Tabell 5: Forbruksmateriell.

Utstyr	Ref. nr.	Lot nr.	Leverandør	Produsentland
MagNA Pure 96 Processing Cartridge	(240)06241603001	(10)22280431	Roche	Tyskland
MagNA Pure 96 Output Plate	06241611001	21576432 (utløpsdato 2024- 02-29)	Roche	Tyskland
MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate with barcode (0,1 mL)	4346906	I16K1 QR23	Applied biosystems® by life technologies™	Kina
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	4311971	33DYE3 (utløpsdato 2023- 04-15)	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific	USA
MagNA Pure 96 Sealing Foil	06241638001	22014435 (utløpsdato 2025- 05)	Roche	Tyskland
Micro tube 2 mL	72.694.006	1081222 (utløpsdato 2024- 03-31)	Sarstedt	Tyskland
Micro tube 1,5 mL	72.692.005	1080421	Sarstedt	Tyskland

#### 4.4 Ekstraksjon av prøvemateriale

500 µL prøvemateriale ble pipettert i et 96-brønnsbrett (MagNA Pure 96 Processing Cartridge). Ved lite prøvemateriale ble prøven fortynnet til 500 µL med væske fra ESwab. Væske fra ESwab ble også brukt som negativ kontroll. Benyttet program: Pathogen 500 Universal med kitet DNA/Viral NA LV 2.0 med input volum 500µL og elueringsvolum 50

µL. Tabellen under viser alle reagenser som inngår i et MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Volume Kit [62].

Tabell 6: Innhold i MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Volume Kit

Reagens	Innhold	Funksjon
Vaskebuffer I	160 mL < 6 M guanidin hydroklorid < 50% EtOH < 30 mM Tris HCl	Fjerne urenheter
Vaskebuffer II	80 mL < 6 M guanidin hydroklorid < 50% EtOH < 30 mM Tris HCl	Fjerne urenheter
Lyserings- /bindingsbuffer	80 mL < 6M Guanidin tiocyanat < 30 % Triton X-100 < 60 mM Tris HCl	Lysering av celler/virus og binding av nukleinsyrer til MGP
Proteinase K	15 mL 2 % Proteinase K 50 % glyserol	Nedbrytning av proteiner
Elueringsbuffer	80 mL < 60 mM Tris-HCl buffer	Elureing av nukleinsyrer
Vaske buffer III	160 mL < 20 mM Na-acetatbuffer	Fjerne urenheter
Magnetiske glasspartikler	6 flasker, 18 mL per MGP suspensjon med isopropanol	Binde nukleinsyrer

#### 4.5 PCR-analyse

I sone 1 «DNA-fritt rom» ble amplifikasjonsmiks tillaget for hvert agens. I sone 2 «ekstraksjon og PCR-oppsett» ble deretter amplifikasjonsmiks og ekstrahert prøve applisert til 96-brønnsplater (MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate with barcode) (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific). Brønnene ble forseglet med MicroAmp™ Optical

Adhesive Film (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), og sentrifugert i 20 sekunder i Microplate Centrifuge C2002-E (Fisherbrand). Selve amplifiseringen ble utført på PCR-instrumentet QuantStudio 5 (ThermoFisher) i sone 3 «PCR-sone». I hvert oppsett ble 47 prøver analysert, i tillegg til en positiv kontroll og en negativ kontroll. Alle analysene ble utført som singleplex-analyser. Det vil si at det ble gjort en separat PCR-analyse for hvert agens. Singleplex-analyser er mer sensitive enn multiplex-analyser, da et sterkt representert agens kan utkonkurrere mindre tallrike dersom flere agens er til stede, ved at komponentene som inngår i PCR-reaksjonen i en multiplex-analyse blir oppbrukt.

Betingelser og grenseverdi (threshold/terskel) for PCR-analysene ble lagt inn manuelt på tilkoblede datamaskiner. Threshold ble vurdert og valgt etter at PCRen var ferdig for å lettere kunne sammenligne Ct-verdier for kontroller og prøver fra oppsett til oppsett. Alle agens ble analysert ved TaqMan sanntids-PCR med primere og prober som er designet for å være komplementære til nukleotidsekvenser som er spesifikke for de ulike patogenene. Primerne binder til en målsekvens i et gen som kun den aktuelle bakterien eller viruset har, eller et gen mange har, men som varierer fra art til art. Instrumentet QuantStudio 5 har OptiFlex-teknologi med fem kanaler og eksiterer ved hjelp av et hvitt LED-lys [63]. Kanalen som ble benyttet i alle analysene var FAM-kanalen. FAM (6-carboxyfluorescein) er et fluorescerende grønt stoff som har en absorpsjonstopp ved 493 nm og emisjonstopp ved 517 nm og fungerer som reporter [64]. BHQ-1 (black hole quencher) kan benyttes som quencher ved bølgelengder mellom 480-580 nm, og har en absorpsjonstopp ved 534 nm [65]. FAM og BHQ-1 ble brukt for alle agens med unntak av adenovirus. For adenovirus er reporteren FAM og MGB-NFQ er oppgitt som quencher. NFQ (non-fluorescent quencher) er en samlebetegnelse for quencherer som ikke avgir fluorescens, og BHQ-1 er et eksempel på en slik quencher. Nøyaktig hvilken quencher som benyttes for adenovirus er altså ikke spesifisert av leverandør (ThermoFisher). Proben er også bundet til et MGB-molekyl (minor-groove binder) som stabiliserer bindingen til den komplementære tråden. MGB-molekylet gjør at probens lengde kan reduseres [66].

Den valgte threshold-verdien for hver singleplex-analyse er listet i tabell 7. Informasjon om probe/primer og betingelser for hvert agens er presentert under i påfølgende avsnitt.

I studien ble det brukt to typer mastermikser; LightCycler 480 Probes Master (Roche) og Premix Ex Taq (TaKaRa). LightCycler 480 Probes Master inneholder Taq polymerase,

reaksjonsbuffer, dNTP mix, og 6,4 mM MgCl<sub>2</sub> [67]. Premix Ex Taq består av Taq-polymeraseblanding, Ex Taq- reaksjonsbuffer (Mg<sup>2+</sup>) og dNTP mix [68].

Ved bruk av TaKaRa på ABI-instrument (Applied Biosystems) er det anbefalt å tilsette ROX i amplifikasjonsmiksen [69]. ROX Reference Dye II (karboksyrhodamin) er et internt fluorescerende fargestoff. I motsetning til reporterfargestoffet i sanntids-PCR, er ROX et passivt fargestoff da det fluorescerende signalet forblir stabilt gjennom hele PCR-prosessen, og ikke er relatert til mengde templat. Nytt med å ha med ROX i en PCR-reaksjon er at det normaliserer fluorescerende signal, og på den måten bidrar til høyere presisjon av analysen. Små variasjoner mellom brønnene, eksempel forskjeller i reaksjonsvolum, kan påvirke det fluorescerende signalet. I stedet for å kontrollere mengde templat i prøven, normaliserer ROX for forskjeller i volum, luftbobler, fordampning og lignende. For å normalisere det fluorescerende signalet, deles signal fra reporterfargen med signalet fra ROX [70]:

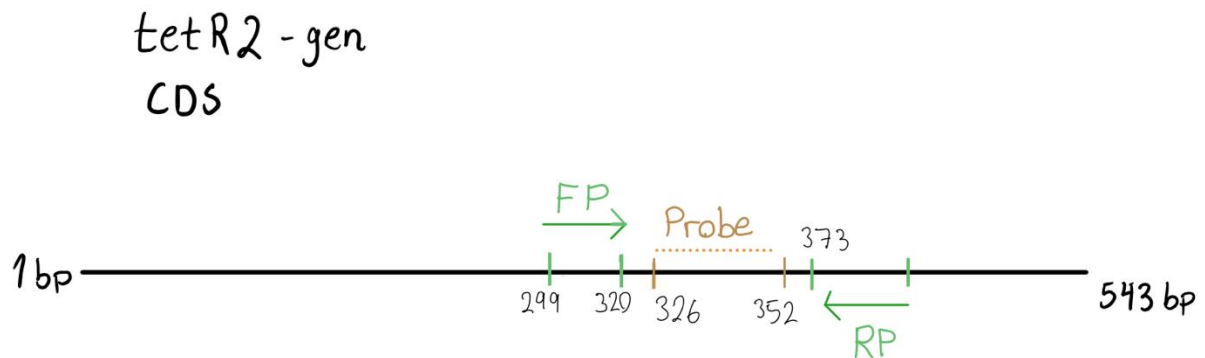
$$\text{Normalisert reporter verdi} = \frac{\text{Reporterfarge}}{\text{Passiv farge}} \quad \text{Formel 1 [70]}$$

Tabell 7: Valgte threshold-verdier ved avlesning for de ulike agensene

Agens	Threshold-verdi
S. pyog.	90 000
F. necr.	150 000
Adenov.	40 000
A. haem.	200 000
F. nucl.	0,04
F. mass.	0,1

#### 4.5.1 PCR av *S. pyogenes*

Målområdet er en region på 93 bp av *tetR-2*-genet hos *Streptococcus pyogenes* (se figur 11 og tabell 8). *TetR-2* koder for et regulatorisk protein (bacterial regulatory s) bygget opp av 180 aminosyrer (*GenBank: SQF17789.1*).



Figur 11: *tetR2*-genet hos *S. pyogenes* med målområdet for primerne og proben

Tabell 8: Positiv kontroll, primere og probe benyttet i PCR-analyse av *S. pyogenes*

Innhold	Navn	Produsent	Lot	Sekvens (5` - 3`)	Dato løst
Forward primer	Spyogen es-F	TibMolBiol	2187718	TCgCTACTATTTCTTACCT CAA	15/12-22
Reverse primer	Spyogen es-R	TibMolBiol	2187716	gTCACAATgTCTTggAAAC C	15/12-22
Probe	Spyogen es-Pb	TibMolBiol	2175070	FAMCgCAACTCATCAAggA TTTCTgTTACC- BHQ1	15/12-22

Tabellen under viser reagens og mengde som benyttes i tillaging av amplifikasjonsmiks.

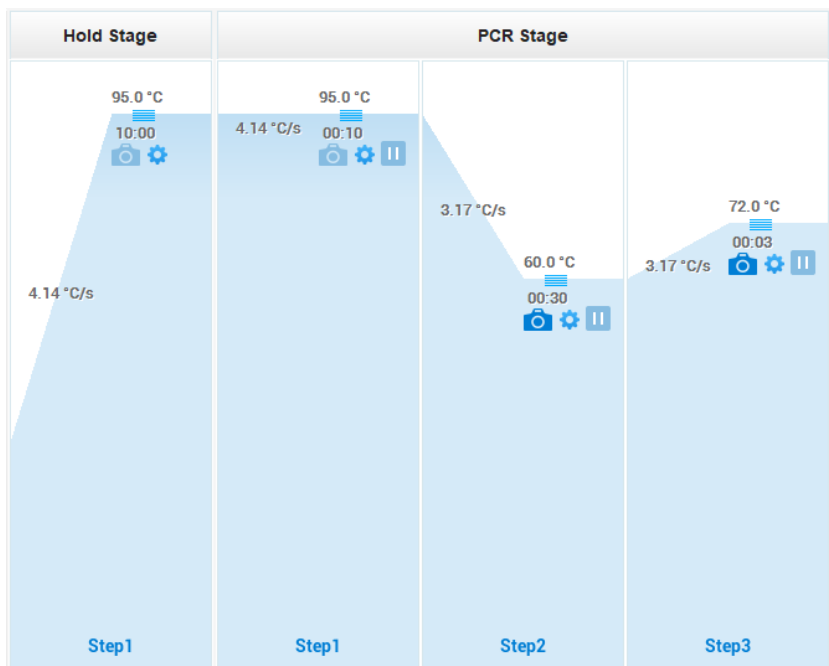
Tabell 9: Innhold i hver PCR-brønn for *S. pyogenes*

Reagens	Volum per prøve (µL)	Konsentrasjon (µM)
LightCycler480 Probes Master	12,5	
Vann	5	



Spyogenes-F	1	0,4
Spyogenes-R	1	0,4
Spyogenes-Pb	0,5	0,2
Templat	5	
Totalt volum	20	

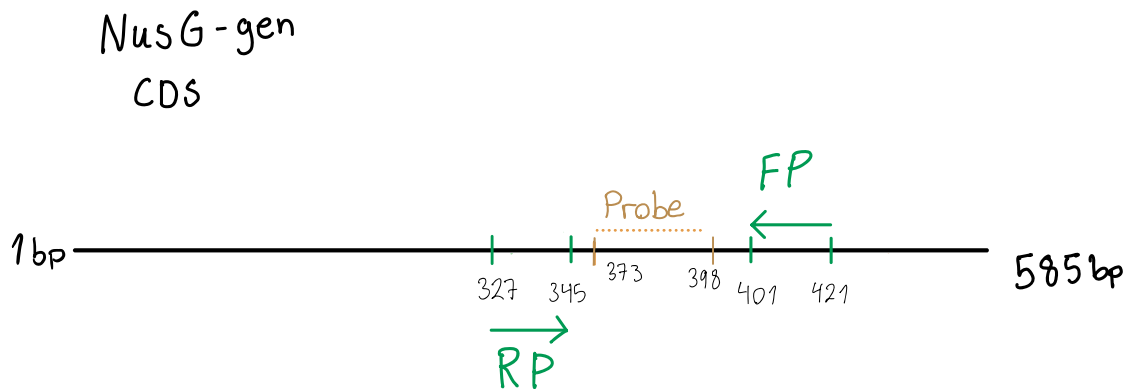
20 µL amplifikasjonsmiks og 5 µL ekstrahert DNA/kontroll ble pipettert i 96-brønnsplate. PCR-templatet for *S. pyogenes* benytter et reaksjonsvolum på 25 µL til å utføre en kvalitativ deteksjon av *tetR-2* genet i *Streptococcus pyogenes* (figur 12).



Figur 12: PCR-templat for *S. pyogenes* og *F. necrophorum* (45 sykluser).

#### 4.5.2 PCR *F. necrophorum*

Målområdet er en region på 94 nukleotider i *nusG*-genet hos *Fusobacterium necrophorum* (figur 13 og tabell 10). *NusG* koder for et transkripsjonsterminering- og antitermineringsprotein som består av 194 aminosyrer (*GenBank: AYV94196.1*). Proteinet er involvert i elongering, terminering og antiterminering ved transkripsjon.



Figur 13: NusG-genet hos *F. necrophorum* med målområdet for primerne og proben

Tabell 10: Positiv kontroll, primere og probe benyttet i PCR-analyse av *F. necrophorum*

Innhold	Navn	Produsent	Lot	Sekvens (5' - 3')	Dato løst
Forward primer	FuNecr1-F	TibMolBiol	1980376	AATCCGCTTTATGAAATTCTC	15/12-22
			2187721		14/04-23
Reverse primer	FuNecr1-R	TibMolBiol	2187710	GTCTGATCCGATTCCTATG	15/12-22
			1980377		14/04-23
Probe	FuNecr1-Pb	TibMolBiol	2229344	FAM - ACTTCCTgCTCATAgCCTAT CACACg - BHQ1	13/3-23

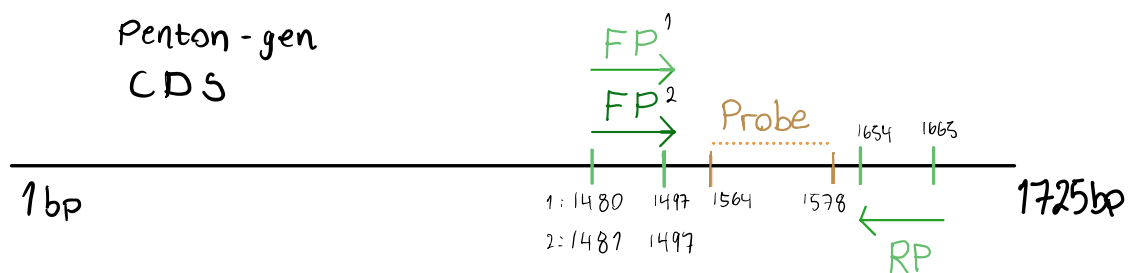
Reagens og tilhørende mengde som benyttes i tillaging av amplifikasjonsmiks er presentert i tabell 11. 20 µL amplifikasjonsmiks og 5 µL ekstrahert DNA/kontroll ble pipettert i 96-brønnsplate. PCR-templatet er det samme som for *S. pyogenes* (figur 12).

Tabell 11: Innhold i hver PCR-brønn for *F. necrophorum*

Reagens	Volum per prøve (µL)	Konsentrasjon (µM)
LightCycler480 Probes Master	12,5	
Vann	5	
FuNecr1-F	1	0,4
FuNecr1-R	1	0,4
FuNecr1-Pb	0,5	0,2
Templat	5	
<b>Totalt volum</b>	<b>25</b>	

#### 4.5.3 PCR av adenovirus

For adenovirus benyttes det to ulike forward primere (1 og 2) for å dekke flere serotyper (figur 14). Metoden er tilpasset identifikasjon av alle kjente humane adenovirus, med unntak av serotype 40 og 41, og dermed er sensitiviteten betraktelig mindre for disse. Målområdet er en region på 185 bp av pentongeniet som koder for pentonproteinene i adenoviruskapsidet (figur 14 og tabell 12). Pentongeniet har en lengde på 574 aminosyrer (*GenBank: WEG81136.1*).



Figur 14: Pentongeniet med målområdet for primere og probe hos adenovirus. Metoden bruker to forward primere.

Tabell 12: Positiv kontroll, primere og prober benyttet i PCR-analyse av adenovirus

Innhold	Navn	Produsent	Lot	Sekvens (5`- 3`)	Dato løst
Forward primer 1	Adv-ACtaq-F	TibMolBiol	2221281	ACGTGTTYAATCGCT TTC	06/03-23
Forward primer 2	Adv-BDtaq-F	TibMolBiol	2221284/2221282	CGTCTTCAACCGCTT YC	06/03-23
Reverse primer	Adv-R	TibMolBiol	2067693/2145514	TGT AVA CGT AGG GRC AGG	06/03-23
Probe	Adv1b-Pb	TibMolBiol	7997463/8017571	FAM – CYCTYACAGATCAC G – MGB-NFQ	06/03-23

Tabellen under viser reagens og tilhørende mengde som ble benyttet i PCR-reaksjonen. 15 µL amplifikasjonsmiks og 5 µL ekstrahert DNA/kontroll ble pipettert i 96-brønnsplate. PCR-templatet for adenovirus benytter et reaksjonsvolum på 20 µL (se figur 15).

Tabell 13: Innhold i hver PCR-brønn for adenovirus

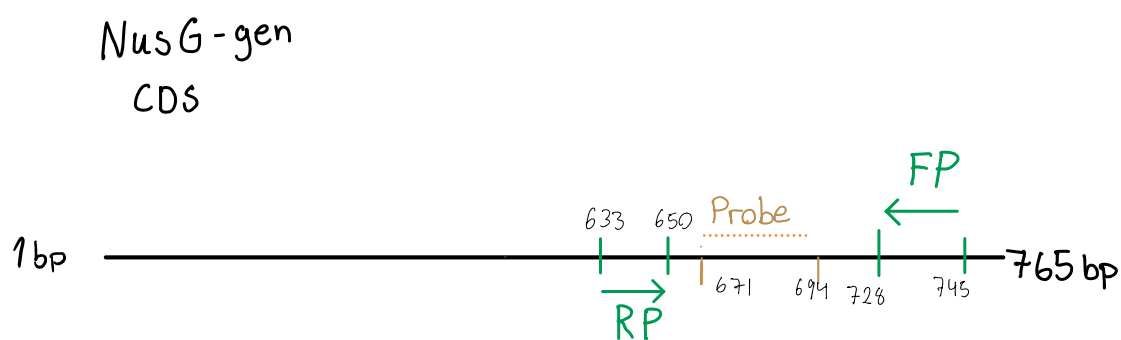
Reagens	Volum per prøve (µL)	Konsentrasjon i brønn (µM)
LightCycler480 Probes Master	10	
Vann	4,56	
Adv-ACtaq-F	0,1	0,5
Adv-BDtaq-F	0,15	0,75
Adv-R	0,15	0,75
Adv1b-Pb	0,04	0,2
Templat	5	
Totalt volum	20	



Figur 15: PCR-templat for adenovirus (45 sykluser).

#### 4.5.4 PCR av *A. haemolyticum*

Målområdet på *A. haemolyticum* er 112 bp langt og befinner seg på *nusG*-genet som koder for et transkripsjonsterminerings- og antitermineringsprotein på 254 aminosyrer (*GenBank: QCX47595.1*) (figur 16 og tabell 14). 20  $\mu$ L amplifikasjonsmiks (se tabell 15) og 5  $\mu$ L DNA ble tilsatt i hver brønn. Se figur 17 for PCR-templat.



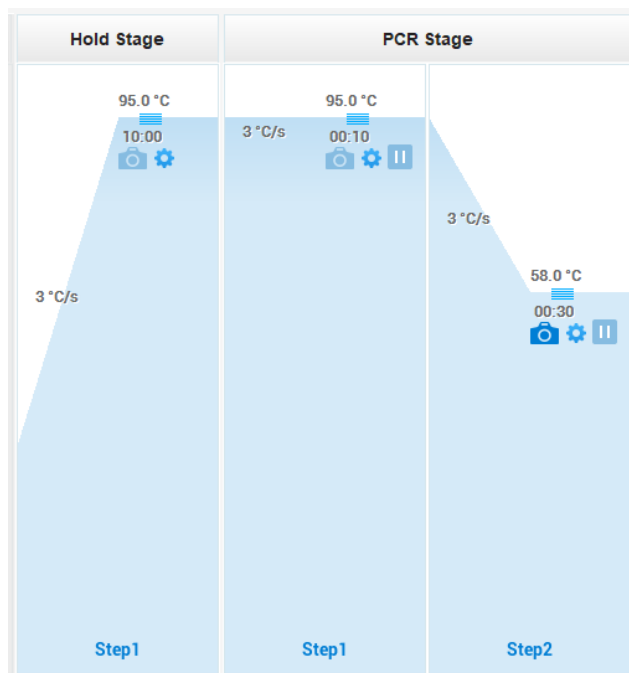
Figur 16: NusG-genet hos *A. haemolyticum* og målområdet for primerne og proben

Tabell 14: Positiv kontroll, primere og probe for PCR-analyse av *A. haemolyticum*

Innhold	Navn	Sekvens (5` - 3`)	Lot	Dato løst
Forward primer	Arhaem-F	CCTTgAAgATgAgACCAC	2231531	17/3-23
Reverse primer	Arhaem-R	gAgCTTCAATCACgAgAg	2231533	17/3-23
Probe	Arhaem-Pb	FAM - TCCTCAgTAgATTCgCCTTCgTCg - BHQ1	2231532	17/3-23

Tabell 15: Innhold i hver PCR-brønn for *A. haemolyticum*

Reagens	Volum per prøve (µL)	Konsentrasjon (µM)
LightCycler480 Probes Master	12,5	
Vann	5	
Arhaem-F	1	0,4
Arhaem-R	1	0,4
Arhaem-Pb	0,5	0,2
Templat	5	
Totalt volum	25	



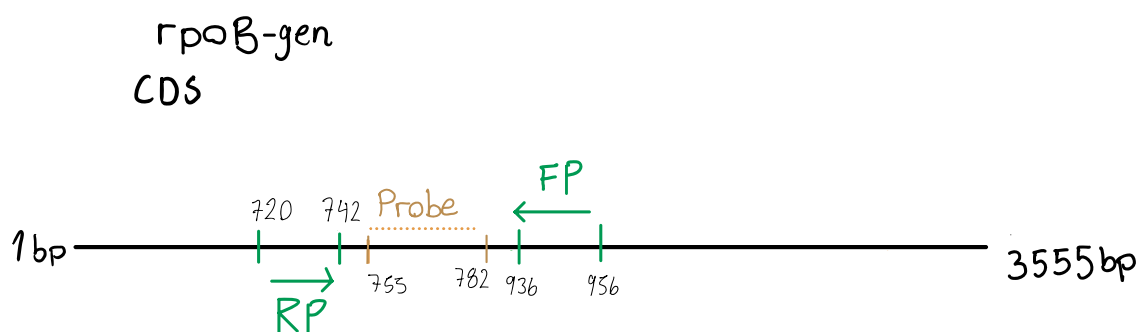
Figur 17: PCR-templat for *A. haemolyticum* (45 sykluser).

#### 4.5.5 PCR av *F. nucleatum* og *F. massiliense*

For *F. nucleatum* er målområdet en region på 236 aminosyrer på *rpoB*-genet. *rpoB*-genet koder for DNA-avhengig RNA polymerase subenhet beta (*GenBank: QJX51473.1*) som består av 1184 aminosyrer (figur 18 og tabell 16). 23  $\mu$ L amplifikasjonsmiks (tabell 15) og 2  $\mu$ L DNA ble tilsatt i hver brønn.

Målområdet for *F. massiliense* ligger på *nusG*-genet (193 aminosyrer) og er 109 bp langt (*GenBank: WP\_074016298.1*) (se figur 20 og tabell 18).

Analysene av *F. nucleatum* og *F. massiliense* benytter samme PCR-templat (figur 19).



Figur 18: rpoB-genet hos *F. nucleatum* og målområdet for primerne og proben

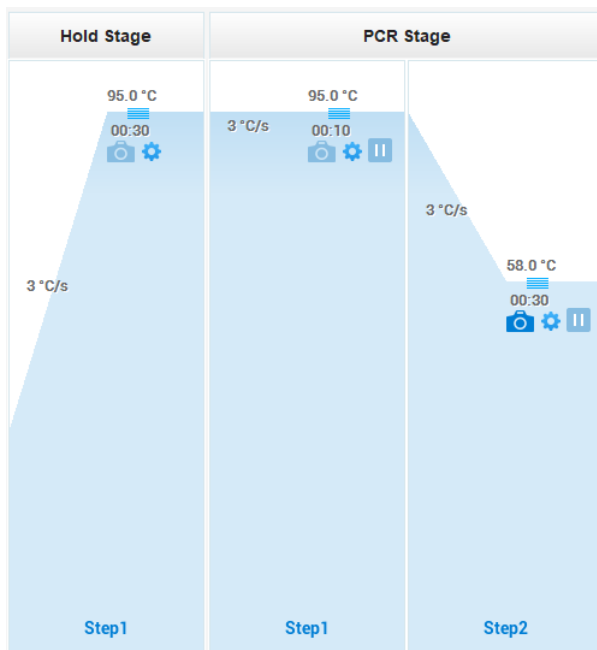
Tabell 16: Positiv kontroll, primere og probe for PCR-analyse av *F. nucleatum*

Innhold	Navn	Produsent	Lot	Sekvens (5' - 3')	Dato løst
Forward primer	Fnucl-F	TibMolBiol	2120996	CATCACTTACTATGCCWCATG	30/8-22
Reverse primer	Fnucl-R	TibMolBiol	2120995	CTAAGTGWGTTCCATCTKCTA AG	30/8-22
Probe	Fnucl-Pb	TibMolBiol	2210213	FAM - TCTGCWGGTAATACTCTTGAA ACAACCC - BHQ1	2/2-23

Tabell 17: Innhold i hver PCR-brønn for *F. nucleatum* og *F. massiliense*

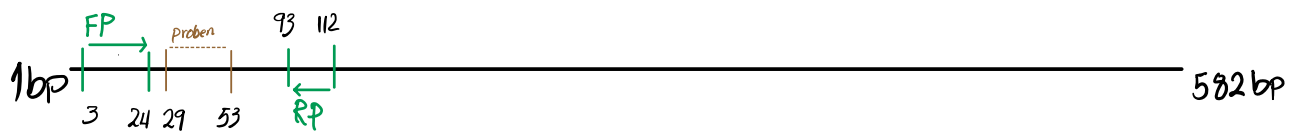
Reagens	Volum per prøve (µL)	Konsentrasjon (µM)
Premix Ex Taq (Perfect Real Time)	12,5	
Vann	7,5	
Fnucl-F / Fumass-F	1	0,4
Fnucl-R / Fumass-R	1	0,4
Fnucl-Pb / Fumass-Pb	0,5	0,2
Reference Dye II	0,5	
Templat	2	
Totalt volum	25	





Figur 19: PCR-templat for *F. nucleatum* og *F. massiliense* (45 sykluser).

Nus6 - gen  
 CDs



Figur 20: NusG-genet hos *F.massiliense* og målområdet for primerne og proben.

Tabell 18: Primere og probe for PCR-analyse av *F. massiliense*

Innhold	Navn	Produsent	Lot	Sekvens (5` - 3`)	Dato løst
Forward primer	Fumass-F	TibMolBiol	2229341	ACACCTTTAAAACACTGTCTAC	13/3-23
Reverse primer	Fumass-R	TibMolBiol	2229342	AGGACAAATAGCAGAAATCG	13/3-23
Probe	Fumass-Pb	TibMolBiol	2229343	FAM – ACTTCAACAGGCGTCATTCT TCCAA - BHQ1	13/3-23

#### 4.6 Dyrkning

Alle prøver var på forhånd dyrket med hensikt å undersøke for *Streptococcus pyogenes*. Alle prøvene ble sådd ut på blodagarskål, og det ble undersøkt for beta-hemolyse. Noen pasienter ble i rutinen ved MIA òg sådd ut på andre medier ut ifra gjeldende retningslinjer.

Pasientprøver med opplysning om kreft ble f.eks. dyrket på sjokoladeskål.

#### 4.7 Sammenligning av dyrkningsbasert diagnostikk og PCR

Egne resultat fra PCR av *S. pyogenes* ble sammenlignet med tidligere dyrkningsresultat hentet fra Unilab.

#### 4.8 Analyser og statistikk

##### 4.8.1 Statistiske beregninger

I studien ble det utført deskriptiv statistikk for å vurdere og sammenligne datasett.

Pasientgrupper ble sammenlignet ved å beregne gjennomsnitt ( $\bar{x}$ ), median, og aldersspredning. Kvaliteten av dyrkning ble undersøkt ved å beregne sensitivitet og negativ prediktiv verdi. Positive kontroller ble vurdert ved å beregne standardavvik (SD) og variasjonskoeffisient (CV).

#### Sensitivitet

Formel 2 [71]

$$\text{Sensitivitet} = \frac{SP}{(SP+FN)}$$

SP = sann positiv

FN = falsk negativ

**Negativ prediktiv verdi**

Formel 3 [71]

$$\text{Negativ prediktiv verdi} = \frac{SN}{(SN+FN)}$$

SN = sann negativ

FN = falsk negativ

**Standardavvik**

Formel 4 [72]

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}}$$

x = ett utvalg

 $\bar{x}$  = utvalgsgjennomsnitt

n = utvalgsstørrelse

**CV%**

Formel 5 [73]

$$CV\% = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

SD = standardavvik

 $\bar{x}$  = gjennomsnitt**4.8.2 Diagram**

For å fremstille resultat ble det laget stolpediagram i Excel og Venn-diagram i R-studio.

Stolpediagram ble laget for å vise fordelingen av agens på pasientgrupper (sykehusinnlagte og ambulante). Venn-diagram ble laget med formål om å vise kombinasjon av agens i prøvene.

Se vedlegg 15 for R-script.

## 5.0 Resultat

### 5.1 PCR resultat

#### 5.1.1 Kontroller

Alle kontroller ble godkjent. Negative kontroller fikk ingen kurve og ingen Ct-verdi. Beregnet gjennomsnitt, standardavvik, og CV% for positive kontroller for hver analytt er presentert i tabell 19..

Tabell 19: Gjennomsnitt, standardavvik, og CV% for positive kontroller for hver analytt. *F. massiliense* hadde ingen positiv kontroll.

	S. pyog.	F. necr.	Adenov.	A. haem.	F. nucl.	F. mass.
Gj. snitt	30,35	31,27	30,86	26,549	29,32	-
Standardavvik	1,49	0,23	0,12	0,05	0,18	-
CV%	4,91	0,74	0,38	0,19	0,61	-

#### 5.1.2 Pasientprøver

Det var totalt 99 positive (44,4 %) av 223 analyserte prøver. Resultatene er fremstilt ved hjelp av Ct-verdi og amplifikasjonsplott (figur 21-26). Rød horisontallinje viser terskel (threshold). Det ble utført 5 kjøring for hver analytt (A-E). Kjøring E inneholder kontrollprøver, fra både pasienter og friske personer, bortsett fra for *F. nucleatum*. PCR-analyse av *F. nucleatum* hos friske ble utført separat (vedlegg 8).

Antall positive prøver for hvert agens er listet i tabell 20 og sortert etter Ct-verdi i tabell 21. *F. nucleatum* var den hyppigst detekterte bakterien, og ble funnet i 96,0 % av prøvene. Ettersom nesten alle prøvene var positive for *F. nucleatum* utelates denne bakterien fra påfølgende resultater. *S. pyogenes* er detektert i nest flest prøver (24,2 %). Det ble observert omtrent 3 ganger flere positive utslag på *S. pyogenes* enn adenovirus. *A. haemolyticum* ble observert i to prøver, mens den lite omtalte bakterien *F. massiliense* ble funnet i 17,9 % av alle prøver.

Tabell 20: Antall positive prøvesvar ved kvalitativ PCR-analyse av adenovirus, *S. pyogenes*, *F. necrophorum*, *F. massiliense* og *A. haemolyticum*. Tabellen viser både absolutte og relative verdier.

	Antall positive	Andel positive (%)
S. pyog.	54	24,22
F. necr.	23 (1*)	10,31
Adenov.	17	7,62
A. haem.	2 (7*)	0,90
F. nucl.	214	95,96
F. mass.	40	17,94

\*) Tall i parentes representerer prøver med inkonklusivt svar. Disse prøvene har en sigmoid kurve, men har Ct-verdi > 40. De kan derfor ikke ansees som positive.

De sterkeste positive prøvene ble observert for adenovirus (tabell 21). *S. pyogenes* ble funnet med både lave og høye Ct-verdier, men flertallet av prøvene hadde Ct-verdier på 19-28. For *F. necrophorum* var det en jevn fordeling av sterke og svake Ct-verdier. *F. nucleatum* ga sterke utslag i de fleste prøvene. To prøver var positive for *A. haemolyticum*. Åtte prøver var svært svake (Ct > 40), og regnes som inkonklusive.

Tabell 21: Positive prøver sortert etter Ct-verdier

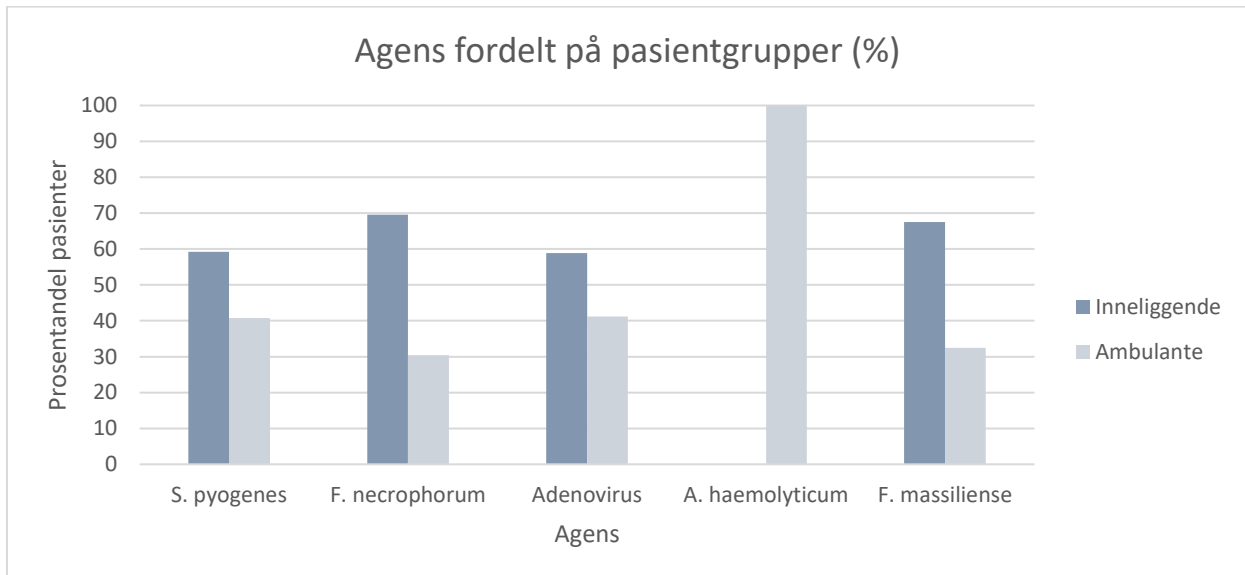
Ct-verdier	S. pyog.	F. necr.	Adenov.	A. haem.	F. nucl.	F. mass.
10-13		1				
13-16	4	2	8			1
16-19	6	4	2		9	
19-22	9	2	1	1	53	
22-25	15	1		1	62	1
25-28	8	3	2		51	4
28-31	3	4			21	8
31-34	5	2	2		10	12
34-37	4	1			3	9
37-40		3	2		5	5
40-43		(1*)		(7*)		

\*) Tall i parentes representerer prøver med inkonklusivt svar. Disse prøvene har en sigmoid kurve, men Ct-verdi > 40. De kan derfor ikke ansees som positive.



### 5.1.3 Pasientgrupper

*F. necrophorum* og *F. massiliense* er i større grad påvist hos sykehusinnlagte pasienter, sammenlignet med de andre agensene som har en mer jevn fordeling (figur 27).



Figur 27: Agens fordelt i pasientgrupper (%). Vertikal akse er prosentandel pasienter og horisontal akse er type agens. Mørkeblå søyle viser til sykehusinnlagte pasienter, og lyseblå søyle viser ambulante.

Beregninger viser at gjennomsnittsalder på smittede er unge voksne mellom 18 og 26 år for alle agens (tabell 22). Medianalder er noe lavere (16,5-22). De fleste agensene ble i størst grad funnet hos unge voksne (10-40 år), med unntak av adenovirus som viste seg hyppigst hos barn under 10 år. *F. necrophorum* opptrådte sjelden i prøver hos barn under 10 år, men yngste pasient var 4 år.

Tabell 22: Aldersfordeling av pasienter for hvert agens.

	S. pyog.	F. necr.	Adenov.	A. haem.	F. mass.
Gj.snittsalder	18,6	25,9	18,3	22	18,2
Medianalder	19	19	16,5	22	17
Aldersspredning	0-66	7-82	0-41	22-22	1-65
Pasienter fordelt i aldersgrupper					
>10 år	22	3	9	0	15
10- 40 år	25	18	7	2	20
<40 år		3	1	0	4

#### 5.1.4 Monoinfeksjoner

Alle agens med unntak av *A. haemolyticum* opptrådte som eneste agens i et varierende antall prøver. Tabell 23 viser antall positive prøver der kun et agens er påvist, og deres fordeling etter Ct-verdi. *F. necrophorum* er bakterien som oftest ble funnet alene (65,22 %). Prøver som kun er positive for adenovirus var sterke, mens *F. massiliense* gav relativt svake utslag når den opptrådte alene.

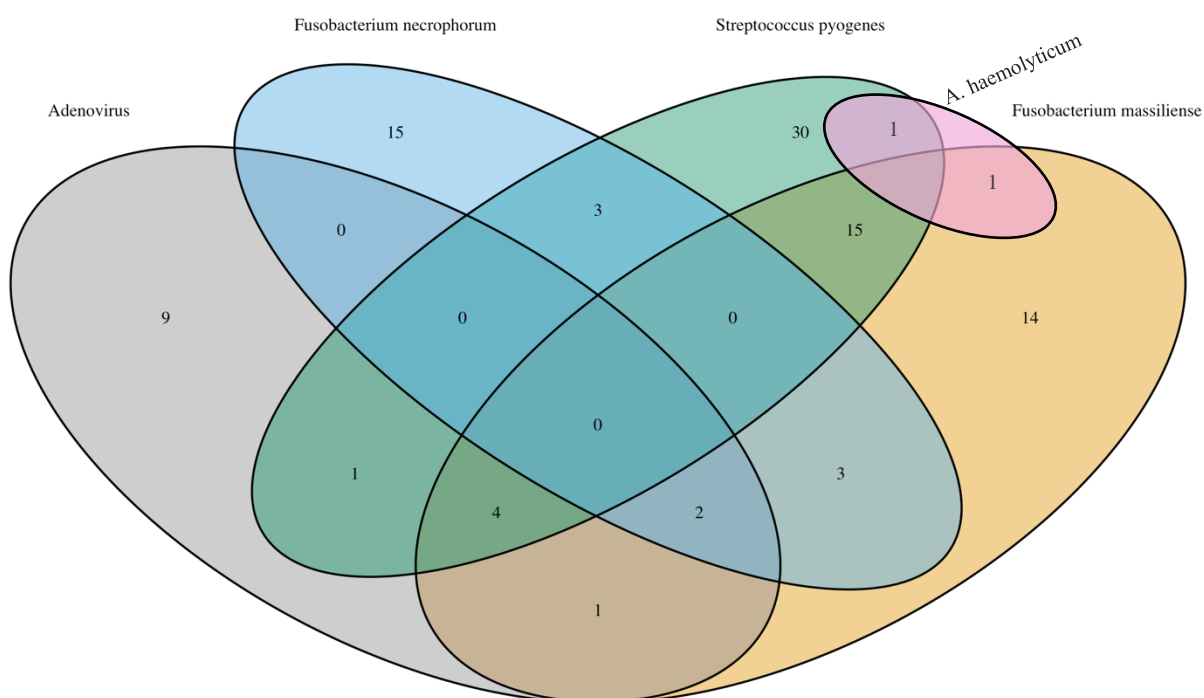
Tabell 23: Prøver som består av kun et agens. Prøvene er fordelt etter Ct-verdi.

	S. pyog.	F. necr.	Adenov.	A. haem.	F. mass.
Totalt	30	15	9	0	14
%	55,56	65,22	52,94	0	35
Fordelt etter Ct-verdier					
10-13		1			
13-16		1	5		
16-19	2	3	1		
19-22	5	1			
22-25	5				
25-28	8	2	1		2
28-31	3	2			3
31-34	1	2	1		3
34-37	4				2
37-40	2	2	1		4

#### 5.1.5 Kombinasjon av agens

Den vanligste kombinasjonen av agens hos pasientene med mistanke om tonsillitt er *S. pyogenes* og *F. massiliense* (figur 28). Denne kombinasjonen finnes i 15 prøver. I to prøver ble det funnet *A. haemolyticum*, og i disse prøvene opptrådte bakterien henholdsvis sammen med *F. massiliense*, og *S. pyogenes*.





Figur 28: Venndiagram som viser kombinasjonen av agens i hver prøve

## 5.2 Dyrkningsresultat for *S. pyogenes*

PCR-metoden plukket opp flere prøver som er positive for *S. pyogenes* enn dyrkning (tabell 24). Alle de 33 prøvene som var positive på dyrkning var også positive ved PCR. I tillegg var 21 prøver kun positive ved PCR. I tabell 25 er Ct-verdiene for disse 21 prøvene oppgitt. Sensitiviteten ved dyrkning ble beregnet til å være 61 % (formel 2), og negativ prediktiv verdi er 89 % (formel 3).

Tabell 24: Sammenligning av dyrkningsresultater og PCR-resultater for *S. pyogenes*

	Dyrkning	PCR
Positive prøver	33	54
Totalt	223	223

Tabell 25: Prøver som er negative for *S. pyogenes* ved dyrkning, men positive ved PCR

	Ct-verdier						
	19-22	22-25	25-28	28-31	31-34	34-37	37-40
Antall prøver	2	0	2	6	2	5	4

### 5.3 Dyrkningsresultat for *S. dysgalactiae*

Positive dyrkningsresultat for *Streptococcus dysgalactiae* er listet opp i tabellen under. Fem prøver var kun positive for *S. dysgalactiae*.

Tabell 16: Funn i prøver som var positive for *S. dysgalactiae* ved dyrkning.

Prøve	S. dysg.	S. pyog.	F. necr.	Adenov.	A. haem.	F. mass.
6	rikelig	-	-	-	-	-
58	middels rikelig	-	-	-	22,568	29,045
72	rikelig	-	-	-	-	-
87	middels rikelig	-	-	-	-	-
145	rikelig	-	-	-	-	-
157	rikelig	-	-	-	-	-
171	rikelig	-	-	-	-	39,254
178	rikelig	-	25,986	-	-	-
187	rikelig	-	15,654	-	-	-
202	rikelig	19,229	-	-	-	-
206	middels rikelig	-	16,939	-	-	35,752

### 5.4 PCR av friske personer

Adenovirus, *S. pyogenes*, og *A. haemolyticum* ble ikke funnet hos kontrollgruppen (tabell 27). *F. nucleatum* ble funnet i middels rikelig mengde i alle 20 prøver. *F. massiliense* ble observert relativt svakt i fire prøver, mens *F. necrophorum* ble funnet svakt i én prøve. Det henvises til vedlegg 14 for Ct-verdier.

Tabell 27: Funn hos friske personer (n = 20).

	Antall positive	Andel positive (%)
S. pyog.	-	0
F. necr.	1	5
Adenov.	-	0
A. haem.	- (1*)	0
F. nucl.	20	100
F. mass.	4	20

\*) Tall i parentes representerer prøver med inkonklusivt svar. Denne prøven har en sigmoid kurve, men har Ct-verdi > 40. Den kan derfor ikke ansees som positiv.

## 6.0 Diskusjon

Hovedmålet med prosjektet var å undersøke om den allerede eksisterende diagnostikken for alvorlige tonsillitter kan forbedres. Dette innebar å sammenligne dyrkningsresultater for *S. pyogenes* med PCR-resultater, i tillegg til å undersøke om det er hensiktsmessig å inkludere andre agens (adenovirus, *S. dysgalactiae*, *F. nucleatum*, *F. massiliense* og/eller *A. haemolyticum*) i den nåværende PCR diagnostikken med *S. pyogenes* og *F. necrophorum*.

### 6.1 Prøvemateriale

Det ble totalt samlet inn 229 pasientprøver hvorav 6 prøver ble ekskludert. Blant de resterende 223 prøvene, var 154 fra sykehusinnlagte pasienter og 69 prøver var fra ambulante pasienter. Rekvirerende lege får svar på om GAS er til stede i prøven eller ikke. Det tas derfor sannsynligvis prøve dersom GAS mistenkes, men hvis sannsynligheten regnes som stor, er det mulig at legen vurderer at det ikke er nødvendig å ta en prøve. Det samme gjelder dersom det er en sterk klinisk mistanke om viral tonsillitt.

I tillegg ble det samlet inn 20 tonsilleprøver fra friske personer i alderen 20-50 år. Prøvene fra kontrollgruppen ble brukt for å kunne sammenligne forekomsten av de ukjente bakteriene. Størrelsen på studiegruppen vil påvirke presisjonen på analysene. Ideelt sett burde kontrollgruppen vært større og inkludert flere aldersgrupper for å ha et bedre sammenligningsgrunnlag, særlig for agens med lav forekomst. På grunn av oppgavens

tidsbegrensning ble det ikke aktuelt å øke denne i dette tilfellet. Resultatene kan likevel gi en indikasjon [74].

## 6.2 Kontrollmateriale

Alle kontroller ble godkjent. De negative kontrollene fikk ingen kurver og var helt negative. Krav til de positive kontrollene var her kun at de skulle være positive, og de positive kontrollene ble godkjent ved at de hadde en tydelig sigmoid kurve som skilte seg godt fra bakgrunnen. For de positive kontrollene ble i tillegg Ct-verdi notert og det ble beregnet gjennomsnitt, standardavvik og CV% for hver analytt (presentert i tabell 19), for å få en pekepinn på variasjon. Ved videre validering av metodene ved MIA, vil det være viktig å analysere repeterbarhet og reproduserbarhet for positiv kontroll, og videre sette tydeligere grenser for de positive kontrollene ved bruk i rutinen ved avdelingen.

Positiv kontroll for *S. pyogenes* for prøve 142-188 fikk en lavere Ct-verdi enn de øvrige kontrollene. Dette medførte en høyere CV% sammenlignet med kontrollene for de andre agensene. I praksis vil dette kunne resultere i at pasientprøver får en falsk lav Ct-verdi. Hadde kontrollen derimot hatt høyere Ct-verdi kunne det ført til at svake prøver gikk tapt, og reanalysering burde blitt vurdert.

Positiv kontroll for *A. haemolyticum* for prøve 1-47 ble ikke inkludert i beregning av CV%, da kontrollmaterialet ble fortynnet 1:100 000 i etterkant av første PCR-analyse. For hver 10-fold-fortynning blir Ct-verdi ca. 3 sykluser svakere [75].

Det forelå ingen positiv kontroll for *F. massiliense*, og bakterien ble dermed analysert blindt. Det er derfor en viss usikkerhet knyttet til resultatene for *F. massiliense*, og ingen garanti for at det ikke er større variasjoner fra oppsett til oppsett. Mangel på positiv kontroll gjør også at det er vanskeligere å fange opp om noe er galt med amplifikasjonsmiksen. Det vil si at en kan miste positive prøver.

## 6.3 PCR- og dyrkningsresultat

*S. pyogenes* blir per dags dato, sammen med *S. dysgalactiae*, påvist ved dyrkningsbasert diagnostikk for sykehusinnlagte og ambulante pasienter ved Haukeland Universitetssykehus. I

tillegg blir det utført PCR av *S. pyogenes* og *F. necrophorum* for sykehusinnlagte pasienter mellom 10 og 40 år.

Av 223 pasienter testet 54 positivt for *S. pyogenes* (24,2 %) ved PCR. Alle prøver som var positive for *S. pyogenes* ved dyrkning, var også positive ved PCR. PCR er imidlertid mer sensitiv enn dyrkning og fanger opp flere positive prøver. Kun 33 prøver var positive for *S. pyogenes* ved dyrkning. Det vil si at 21 prøver var falskt negative ved dyrkning som tilsvarer hele 39,9 % av prøvene.

Mange av disse er svake prøver med høye Ct-verdier, og kan komme av at *S. pyogenes* er en del av normalfloraen hos disse pasientene [42]. Samtidig er det flere middels sterke og sterke prøver som ikke påvises ved dyrkning. Etersom åtte av disse prøvene er fra ambulante pasienter, og fem av prøvene fra sykehusinnlagte pasienter er utenfor aldersgruppen 10-40, vil det medføre at disse tilfellene av *S. pyogenes* ikke vil bli oppdaget. Dette viser at dyrkning har for dårlig sensitivitet. Sensitiviteten ved dyrkning av *S. pyogenes* er beregnet til å være 61 % fra dataene i tabell 24, og har dermed betraktelig lavere sensitivitet enn hurtigtestene [3]. Negativ prediktiv verdi, som er sannsynligheten for at en pasient er frisk gitt et negativt dyrkningsresultat, er 89 %. Dette viser at dyrkningen er for lite sensitiv og at det vil være hensiktsmessig å tilby PCR-diagnostikk til alle pasienter.

Et annet argument for å gå over til PCR-basert diagnostikk er tidsbruk. Dyrkning tar vanligvis ca. ett døgn, og totalt tre døgn med resistensbestemmelse, mens PCR-undersøkelsen har svartid på 24 timer. Det vil gjøre at pasienten kan få riktig behandling tidligere, og risikoen for alvorlig sykdom reduseres. Svartiden bør være så rask at pasienten kan avvente oppstart av behandling, og svaret så pålitelig at rekvirerende lege stoler på resultatet.

Ved dyrkning har man derimot fordelene av at det er mulig å resistensbestemme den sykdomsfremkallende bakterien [29]. En annen fordel er at en ved dyrkning finner alle bakterier som har evne til å vokse under de gitte forholdene mens en ved PCR kun finner det en leter etter.

*Streptococcus dysgalactiae* ble funnet ved dyrkning i elleve prøver (figur 25). I fem av prøvene ble det kun påvist *S. dysgalactiae*. I de øvrige prøvene er det ingen tydelige mønster når det gjelder hvilke bakterier den opptrer sammen med. Den relativt høye forekomsten og

den lave sensitiviteten ved dyrkning tyder på at det kan være nyttig å inkludere *S. dysgalactiae* i en PCR-analyse.

*F. necrophorum* er den nest vanligste årsaken til halsbetennelse hos ungdom og voksne, etter gruppe A streptokokker [76]. Bakterien ble i denne studien funnet i 10,3 % av prøvene. Medianalder til pasientene var 19 år. Aldersspennet var fra 4 til 82 år, og bakterien skiller seg dermed fra de andre agensene som i større grad ble funnet hos yngre pasienter. Syv av de positive prøvene er fra ambulante pasienter. Blant de sykehusinnlagte er fire pasienter utenfor aldersgruppen som blir tilbudt PCR-diagnostikk av *F. necrophorum*. Det vil si at 11 av prøvene hvor *F. necrophorum* er påvist ikke ville blitt detektert med dagens metode, noe som utgjør hele 47,8 % av tilfellene. Flere av disse prøvene har høy Ct-verdi, og vil ikke være klinisk signifikant, da bakterien også opptrer som en del av normalflora i de øvre luftveiene [35]. I andre tilfeller er derimot Ct-verdien lav hos de gruppene det i dag ikke tilbys PCR til. Infeksjon med *F. necrophorum* kan dessuten spre seg og gi den alvorlige tilstanden Lemierres syndrom, og effektiv antibiotikabehandling reduserer risikoen for denne komplikasjonen. Dette viser at det vil være hensiktsmessig å utvide PCR-diagnostikken for *F. necrophorum* til å inkludere ambulante pasienter, samt øke aldersspennet for de sykehusinnlagte pasientene.

Når det gjelder adenovirus er det kjent at DNA-et kan detekteres i en viss tid etter gjennomgått infeksjon [42]. Svakt positive prøver kan derfor skyldes en tidligere gjennomgått infeksjon. For at en prøve skal anses som positiv for adenovirus bør derfor Ct-verdien være lav. Her er adenovirus sterkt påvist i et utvalg prøver (tabell 21). De fleste pasientene er under 10 år. Infeksjon gir livslang serotype-spesifikk immunitet og er sannsynligvis en viktig årsak til den ujevne aldersfordelingen [40]. Asymptomatisk utskillelse av adenovirus ser ut til å ha liten påvirkning på analysen. Analysen vil derfor være aktuell å inkludere i en PCR-diagnostikk av tonsillitter. Samtidig er mange ambulante pasienter positive for adenovirus, noe som viser at en overgang fra dyrkningsbasert diagnostikk til PCR for ambulante pasienter er fordelaktig.

*Arcanobacterium haemolyticum* er med sikkerhet påvist i to prøver (0,9 %). Ettersom Ct-verdien er lav i begge prøvene er det rimelig å anta at *A. haemolyticum* er årsaken til tonsillitt hos disse pasientene. Dagens litteratur om *A. haemolyticum* og tonsillitt er dårlig dokumentert, og alle nye studier bygger på gammel forskning fra 1946, en tid da PCR-diagnostikk ikke eksisterte [77]. I tillegg opptrer *A. haemolyticum* kun sammen med andre agens. I den ene av

disse prøvene fikk man i tillegg en positiv PCR for *S. dysgalactiae*, og i den andre fikk man positiv PCR for *S. pyogenes*. Dette er de mest dokumenterte bakterielle årsakene til tonsillitt, og det er dermed tvilsomt om *A. haemolyticum* er hensiktsmessig å inkludere i PCR-diagnostikk.

Analysen som er utført gir også flere kurver med Ct-verdi over 40 (Vedlegg 6, BDE). Dette kan være lavgradige bærere eller støy, men har ingen betydning for en eventuell tonsillitt. For at disse skal vurderes som positive, bør reanalyse av de aktuelle prøvene i triplett gi Ct-verdier under 38 i alle tilfeller. På grunn av de uspesifikke kurvene bør også metoden videreutvikles før analysen kan vurderes å bli tatt i bruk.

*F. nucleatum* forekommer hyppig både hos pasienter med mistanke om tonsillitt (96,0 %) og den friske befolkningen (100 %). Det viser at denne bakterien er en del av normalfloraen hos de fleste mennesker. Det er derfor ikke hensiktsmessig å inkludere en PCR-analyse av *F. nucleatum* hos pasienter med mistanke om tonsillitt.

*Fusobacterium massiliense* ble funnet i 17,9 % av prøvene. I prøver hvor *F. massiliense* opptrer alene er Ct-verdiene noe høyere enn dersom en ser på alle prøvene samlet (tabell 23). Etersom denne bakterien er lite studert er forekomsten av den ikke kjent, men bakterien ble funnet i tilsvarende grad hos friske (20 %). Størrelsen på kontrollgruppen er liten, men resultatene tyder likevel på at bakterien er en del av halsens normalflora og ikke er assosiert med tonsillitt. Det er derfor ikke aktuelt å inkludere denne i PCR-diagnostikken.

#### 6.4 Feilkilder

Det er uvisst om prøvetakingen er blitt utført på en tilfredsstillende måte. Prøvetakingen bør følge visse retningslinjer for å kunne gi et pålitelig resultat. Ved mistanke om tonsillitt skal penselen gnis kraftig mot tonsillene [17]. Puss dreper bakterier, og dersom overflaten kun berøres lett kan en risikere at levende bakterier, som er i overgangen til friskt vev, ikke kommer med. Bakterien vil fortsatt detekteres med PCR, men dyrkningen kan bli negativ, et mønster som er blitt observert for flere prøver i studien. Ved dårlig prøvetaking kan også penselen bli kontaminert av normalflora fra andre områder i munnhulen.

I noen tilfeller kan prøven bli tatt etter oppstart av antibiotikabehandling. Det kan føre til at patogenet som forårsaket sykdommen ikke blir detektert ved dyrkning [78]. PCR vil likevel kunne gi en sterkt positiv prøve, da en ikke er avhengig av levende bakterier.

Ved PCR-oppsett av prøve nummer 142 til 181 ble det gjort en feil slik at alle prøvene ble tilsatt 5 µL amplifikasjonsmiks for *F. necrophorum* før prøvematerialet ble pipettert over i PCR-brettet. Det kan være forklaringen til at resultatene for PCR-analyse av *A. haemolyticum*, adenovirus og *F. necrophorum* for disse prøvene inneholder noe mer støy rundt baselinjen og kan ha påvirket prøveresultatene. Dette kan teoretisk gi falske positive prøver eller sterkere signal dersom prøven er positiv for *F. necrophorum* da alle PCR-analysene benytter FAM-kanalen. Påvirkningen er imidlertid liten ettersom kun en svært liten mengde primere og prober til *F. necrophorum* vil komme med i hver brønn. Kun en prøve er positiv for både *F. necrophorum* og et av de øvrige agensene. Det gjelder prøve 161 som er så sterkt positiv for adenovirus (Ct 16,97) at den vil være positiv uavhengig av kontamineringen. PCR-analysene av de øvrige agensene ble utført før feilen skjedde og er derfor ikke påvirket av dette.

Dette er en begrenset studie som kun tar for seg noen få av agensene som kan forårsake tonsillitt. Disse ble valgt med formål om å undersøke og forbedre nåværende diagnostikk. Tidlig og riktig diagnose er viktig for å få unngå unødvendig antibiotikabruk, og eventuelt gi pasienten tidlig behandling for å unngå alvorlige komplikasjoner som kan forekomme ved enkelte bakterielle infeksjoner. Regjeringen har et politisk mål om å redusere bruk av antibiotika, og havne blant topp tre land i Europa som bruker minst antibiotika ved behandling av mennesker [79]. Faren med å bruke for mye antibiotika er at risikoen øker for at bakteriene blir resistente, slik at antibiotikumet blir mindre effektivt mot bakterietypen.

Samtidig kan flere bakterietyper kan ubehandlet medføre alvorlige komplikasjoner. *Fusobacterium necrophorum* kan gi Lemierre syndrom, som er en livstruende komplikasjon av tonsillitt. Studier viser en stor forbedring av prognose for tilstanden etter innføring av antimikrobiell behandling [80].

Dette viser at riktig diagnostikk av tonsillitt er viktig. En PCR-analyse som inkluderer flere mulige sykdomsfremkallende bakterier vil gi en mer presis diagnostikk slik at antibiotikabehandling kan startes opp dersom disse påvises som sannsynlig årsak til



tonsillitten. Ved å samtidig inkludere adenovirus-PCR i diagnostikken, kan man også unngå unødvendig antibiotika bruk.

## 7.0 Konklusjon

Basert på våre analyser vil det være hensiktsmessig å erstatte dyrkningsbasert diagnostikk med PCR-diagnostikk for tonsillitter. Dyrkningens sensitivitet er lav (72 %) og fører til en rekke falske negative prøvesvar for *S. pyogenes* og sannsynligvis *S. dysgalactiae*. Adenovirus ga få men sterkt positive prøvesvar. *F. necrophorum* ble funnet hos flere ambulante pasienter, samt flere sykehusinnlagte pasienter utenfor aldersgruppen 10-40 år, som medfører at flere tilfeller ikke detekteres med nåværende retningslinje.

*Arcanobacterium haemolyticum* sin rolle i tonsillitt er dårlig dokumentert og det er tvilsomt om det vil være hensiktsmessig å inkludere den i diagnostikken. Det må gjøres flere studier før en eventuelt ny vurdering kan tas. Våre funn tyder også på at verken *F. nucleatum* eller *F. massiliense* har en klar sammenheng med tonsillitt.

På bakgrunn av dette konkluderes det med at dyrkning bør erstattes med PCR for alle pasienter. Å tilby PCR også til ambulante vil føre til en vesentlig forbedring av tonsillitt-diagnostikken. Dersom man går over til PCR-diagnostikk, bør adenovirus inkluderes og sannsynligvis også *Streptococcus dysgalactiae* etter uttesting.

## 8.0 Referanser

1. Anderson J, Paterek E. Tonsillitis [Internet]. StatPearls. National Library of Medicine; 2019 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544342/>
2. Norsk elektronisk legehåndbok. Tonsillitt, akutt [Internet]. NEL - Norsk Elektronisk Legehåndbok. 2023 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://legehandboka.no/handboken/kliniske-kapitler/ore-nese-hals/tilstander-og-sykdommer/svelget-midtre-del/tonsillitt-akutt>
3. Norsk elektronisk legehåndbok. Streptokokk halsinfeksjon [Internet]. NEL - Norsk Elektronisk Legehåndbok. 2023 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://legehandboka.no/handboken/kliniske-kapitler/ore-nese-hals/tilstander-og-sykdommer/svelget-midtre-del/streptokokkhalsinfeksjon#sammendrag>
4. Folkehelseinstituttet. Epstein-Barr-virusinfeksjon (mononukleose) [Internet]. FHI. 2010 [cited 2023 May 22]. Available from: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/mononukleose/>
5. Volante M, Corina L, Contucci AM, Calò L, Artuso A. Arcanobacterium haemolyticum: two case reports. Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale [Internet]. 2008 [cited 2023 May 21];28(3):144–6. PMID. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2644988>
6. Mailhe M, Ricaboni D, Vitton V, Benezech A, Dubourg G, Michelle C, et al. Noncontiguous finished genome sequence and description of Fusobacterium massiliense sp. nov. isolated from human duodenum. New Microbes and New Infections [Internet]. 2016 Dec 9 [cited 2023 Mar 28];16:3–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5225283/>
7. Han YW. Fusobacterium nucleatum: a commensal-turned pathogen. Current Opinion in Microbiology [Internet]. 2015 Feb [cited 2023 May 21];23:141–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4323942/>
8. Hellings P, Jorissen M, Ceuppens JL. The Waldeyer's ring. Acta Oto-Rhino-Laryngologica Belgica [Internet]. 2000 [cited 2023 May 21];54(3):237–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11082757/>.
9. Elhakeem AA. Adenoid and Tonsils. In: Al-Qanthi A, Haidar H, Larem A, editors. Textbook of Clinical Otolaryngology [Internet]. Springer International Publishing; 2021 [cited 2023 May 21]. p. 647–54. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-54088-3\\_56](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-54088-3_56)
10. Masters KG, Lasrado S. Anatomy, Head and Neck, Tonsils [Internet]. Nih.gov. StatPearls Publishing; 2022 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539792/>

11. Mescher A. Junqueira's Basic Histology. Indiana: McGraw Hill. ; 2010.
12. Perry ME. The specialised structure of crypt epithelium in the human palatine tonsil and its functional significance. Journal of Anatomy [Internet]. 1994 Aug [cited 2023 May 21];185(Pt 1):111–27. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1166820/>
13. Norsk helseinformatikk AS. Inflammasjon [Internet]. NHI.no. NHI; 2022 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://nhi.no/sykdommer/hud/diverse/inflammasjon/?page=1>
14. Institute for Quality and Efficiency in Health Care. What is an inflammation? [Internet]. Nih.gov. Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2010 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279298/>
15. Kanwal S, Vaitla P. Streptococcus pyogenes [Internet]. Nih.gov. StatPearls Publishing; 2022 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430685/>
16. Mayo Clinic. Tonsillitis - Symptoms and causes [Internet]. Mayo Clinic. 2018. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/tonsillitis/symptoms-causes/syc-20378479>
17. Legevakt håndboken. Akutt faryngotonsillitt [Internet]. Lvh.no. Gyldendal Akademisk; 2021 [cited 2023 May 22]. Available from: [https://lvh.no/symptomer\\_og\\_sykdommer/ovre\\_luftveier/svelg\\_farynks/akutt\\_faryngotonsillitt](https://lvh.no/symptomer_og_sykdommer/ovre_luftveier/svelg_farynks/akutt_faryngotonsillitt)
18. Rogers K. Human microbiome. In: Encyclopædia Britannica [Internet]. 2022 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.britannica.com/science/human-microbiome>
19. Peloux Y. [Opportunistic bacteria]. Annales De Biologie Clinique [Internet]. 1985 [cited 2023 May 21];43(2):153–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4073607/>
20. National Academies of Sciences E, Studies D on E and L, Sciences B on L, Toxicology B on ES and, Microbiome C on AU of the I of ECI with the H. Microbiome Variation [Internet]. www.ncbi.nlm.nih.gov. National Academies Press (US); 2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK481567/>
21. Ogunrinola GA, Oyewale JO, Oshamika OO, Olasehinde GI. The Human Microbiome and Its Impacts on Health. International Journal of Microbiology [Internet]. 2020 Jun 12 [cited 2023 May 21];2020:1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7306068/>

22. Bach LL, Ram A, Ijaz UZ, Evans TJ, Lindström J. A Longitudinal Study of the Human Oropharynx Microbiota Over Time Reveals a Common Core and Significant Variations With Self-Reported Disease. *Frontiers in Microbiology*. 2021 Jan 21;11.
23. Vidyasagar A. What Are Bacteria? [Internet]. Live Science. Live Science; 2019. Available from: <https://www.livescience.com/51641-bacteria.html>
24. Sirevåg R. bakteriegenetikk [Internet]. Store norske leksikon. 2020. Available from: <https://sml.snl.no/bakteriegenetikk>
25. Hentges DJ. Chapter 17: Anaerobes: General Characteristics. In: *Medical Microbiology 4th edition* [Internet]. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7638/>
26. Patterson MJ. Chapter 13: Streptococcus. In: *Medical Microbiology 4th edition* [Internet]. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7611/>
27. MSD Manual. Table: Lancefield Classification\* [Internet]. MSD Manual Professional Edition. Available from: <https://www.msdmanuals.com/professional/multimedia/table/lancefield-classification>
28. Universitetet i Oslo. Streptococcus pyogenes [Internet]. studmed.uio.no. Available from: <https://studmed.uio.no/elaring/lcms16/indremedisin/infeksjonsmedisin/nl-streptococcus-pyogenes.xml?menuItemIndex=18>
29. Oppdatert P. Streptokokk gruppe A-infeksjon [Internet]. Folkehelseinstituttet. 2010. Available from: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/streptokokk-gruppe-a-infeksjon---ve/>
30. Spellerberg B, Brandt C. Laboratory Diagnosis of Streptococcus pyogenes (group A streptococci) [Internet]. Nih.gov. University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343617/>
31. Universitetet i Oslo. Studmed.uio.no. [cited 2023 May 21]. Available from: [https://studmed.uio.no/elaring/fag/mikrobiologi/kurs/bakgrunn/dokumenter/dyrkningsmedier\\_.html](https://studmed.uio.no/elaring/fag/mikrobiologi/kurs/bakgrunn/dokumenter/dyrkningsmedier_.html)
32. Yung L, Rashid M, Bräu N. Group C Streptococcus dysgalactiae subsp.equisimilis (SDSE) Endocarditis with Endogenous Endophthalmitis and Aortic Root Abscess. *IDCases* [Internet]. 2019 [cited 2023 May 21];15:e00513. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6409387/>
33. Hughes JM, Brandt Claudia M, Spellerberg B, Spellerberg B. Human Infections Due to Streptococcus dysgalactiae Subspeciesequisimilis. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2023 May 22];49(5):766–72. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/49/5/766/309241?login=true>

34. Jensen A, Kilian M. Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, Its Subspecies, and Its Clinical and Phylogenetic Relationship to *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2012 Jan [cited 2023 May 22];50(1):113–26. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3256718/>
35. Amess JA, O’neill W, Giollariabhaigh N, Dytrych JK. A six-month audit of the isolation of *Fusobacterium necrophorum* from patients with sore throat in a district general hospital. *British Journal of Biomedical Science* [Internet]. 2007 Feb 22 [cited 2023 May 21];64(2):63–5. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09674845.2007.11732757>
36. Allen BW, Bentley TP. Lemierre Syndrome [Internet]. PubMed. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499846/>
37. Collins MD, Jones D, Schofield GM. Reclassification of “*Corynebacterium haemolyticum*” (MacLean, Liebow & Rosenberg) in the Genus *Arcanobacterium* gen.nov. as *Arcanobacterium haemolyticum* nom.rev., comb.nov.. *Microbiology* [Internet]. 1982 Jun 1 [cited 2023 May 22];128(6):1279–81. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-128-6-1279>
38. Vu MLD, Rajnik M. *Arcanobacterium Haemolyticum* [Internet]. PubMed. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560927/>
39. Mackenzie A, Fuite LA, Chan FTH, King J, Allen U, MacDonald N, et al. Incidence and Pathogenicity of *Arcanobacterium haemolyticum* During a 2-Year Study in Ottawa. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 1995 Jul 1 [cited 2020 Nov 23];21(1):177–81. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560927>
40. Levinson W. *Medical Microbiology and Immunology*. Twelfth edition. USA: McGraw-Hill Companies; 2012.
41. Crenshaw BJ, Jones LB, Bell CR, Kumar S, Matthews QL. Perspective on Adenoviruses: Epidemiology, Pathogenicity, and Gene Therapy. *Biomedicines* [Internet]. 2019 Aug 19;7(3):61. Available from: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fbiomedicines7030061>
42. Doerfler W. Chapter 67: Adenoviruses. In: *Medical Microbiology* 4th edition [Internet]. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8503/>
43. Gompf SG. Adenovirus: Background, Pathophysiology, Epidemiology. *Bronze MS*, editor. *eMedicine* [Internet]. 2021 Apr 15 [cited 2023 May 21]; Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/211738-overview>

44. Rein DT, Breidenbach M, Curiel DT. Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy. *Future Oncology* [Internet]. 2006 Feb [cited 2020 Jan 12];2(1):137–43. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1781528/>
45. Oslo universitetssykehus. DNA-analyser [Internet]. Oslo universitetssykehus. 2019 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://oslo-universitetssykehus.no/seksjon/avdeling-for-rechtsmedisinske-fag/Sider/DNA-analyser-Seksjon-for-rechtsgenetikk.aspx>
46. Roche Molecular Systems, Inc. MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit. Version 10 [Internet]. MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit. Tyskland: Roche; 2021 Aug [cited 2023 May 21] p. s. 3. Available from: <https://www.n-genetics.com/products/1295/1023/16532.pdf>
47. Biotech E. The basic principle of DNA/RNA extraction [Internet]. EPRUI Biotech. 2021. Available from: <https://www.epruibiotech.com/nano-wiki/the-basic-principle-of-dna-rna-extraction/>
48. Butler JM. DNA Quantitation [Internet]. www.sciencedirect.com. 2012 [cited 2023 May 22]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/taqman>
49. Mészáros É. qPCR: How SYBR Green and TaqMan assays work | INTEGRA [Internet]. www.integra-biosciences.com. INTEGRA Biosciences AG; 2022 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.integra-biosciences.com/japan/en/blog/article/qpcr-how-sybr-green-and-taqman-real-time-pcr-assays-work>
50. Nigro F. TaqMan [Internet]. 2004 [cited 2023 May 22]. Available from: [https://www.researchgate.net/figure/TaqMan-This-system-consists-of-a-single-stranded-sequence-probe-sequence-with-a\\_fig1\\_226477138](https://www.researchgate.net/figure/TaqMan-This-system-consists-of-a-single-stranded-sequence-probe-sequence-with-a_fig1_226477138)
51. Pfeifer J. Understanding Ct Values in Real-Time PCR [Internet]. ThermoFisher. ThermoFisher; 2022 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/understanding-ct-values/>
52. Leech S. Preventing False Positive and False Negative PCR Results [Internet]. Today's Clinical Lab. 2022 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.clinicallab.com/trends/molecular-diagnostics/preventing-false-positive-and-false-negative-pcr-results-26261>
53. Mellgren G. Bakteriologisk undersøkning - øvre luftvegar inkludert auge [Internet]. Analyseoversikten. Helse Bergen HF Haukeland universitetssjukehus; 2022 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://analyseoversikten.no/analyser/377>

54. Copan. Package insert and How to use guide [Internet]. 2017 Jul [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.copanusa.com/wp-content/uploads/2020/11/ESwab-Package-Insert.pdf>
55. Copan. ESwab™ [Internet]. COPAN Diagnostics Inc. [cited 2023 May 22]. Available from: <https://www.copanusa.com/sample-collection-transport-processing/eswab/>
56. Sigma-Aldrich. Sigmaaldrich.com [Internet]. A0590 Amies Transport Medium with Charcoal. [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/406/834/a0590dat.pdf>
57. REK. [Internet]. rekportalen.no [cited 2023 May 21]. Available from: [https://rekportalen.no/#hjem/s%C3%B8ke\\_REK](https://rekportalen.no/#hjem/s%C3%B8ke_REK)
58. Oslomet. Anonyme, anonymiserte eller aidentifiserte data [Internet]. ansatt.oslomet. Oslomet; 2021 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://ansatt.oslomet.no/anonyme-anonymiserte-eller-avidentifiserte-data>
59. Sikt. Hva er personopplysninger [Internet]. sikt.no. [cited 2023 May 21]. Available from: <https://sikt.no/hva-er-personopplysninger>
60. Silver N, Best S, Jiang J, Thein S. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*. 2006;7(1):33.
61. Juanola-Falgarona M, Peñarrubia L, Jiménez-Guzmán S, Porco R, Congost-Teixidor C, Varo-Velázquez M, et al. Ct values as a diagnostic tool for monitoring SARS-CoV-2 viral load using the QIAstat-Dx® Respiratory SARS-CoV-2 Panel. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2022 Sep [cited 2023 May 22];122:930–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9273520/>
62. Roche Molecular Systems, Inc. MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit. Version 10 [Internet]. Tyskland: Roche; 2021 Aug [cited 2023 May 21] p. s. 3. Available from: <https://www.n-genetics.com/products/1295/1023/16532.pdf>
63. Applied biosystems. Proven qPCR performance is now within reach Real-time PCR instruments [Internet]. gene-quantification.de. Life Technologies Corporation; 2012 [cited 2023 May 22]. Available from: <https://www.gene-quantification.de/life-technologies-real-time-pcr-portfolio.pdf>
64. AAT Bioquest. Spectrum [FAM (Carboxyfluorescein)] | AAT Bioquest [Internet]. www.aatbio.com. AAT Bioquest; [cited 2023 May 21]. Available from:



[https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/fam\\_carboxyfluorescein](https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/fam_carboxyfluorescein)

65. BHQ®-1 [Internet]. [www.metabion.com](http://www.metabion.com). metabion international AG; [cited 2023 May 22]. Available from: <https://www.metabion.com/learning-platform/modifications/quenchers/bhq-1/>
66. ThermoFischer. TaqMan™ MGB Probe [Internet]. [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com). [cited 2023 May 22]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4316034>
67. Roche. LightCycler® 480 Probes Master Ready-to-use hot start reaction mix for PCR with the LightCycler® 480 System Store the kit at 15 to 25°C [Internet]. [biochimie.umontreal.ca](http://biochimie.umontreal.ca). 2005 Jun [cited 2023 May 22]. Available from: <https://biochimie.umontreal.ca/wp-content/uploads/sites/37/2015/11/LC480ProbesMasterguide.pdf>
68. TaKaRa. Ex Taq Premix [Internet]. [takarabio](http://takarabio.com). [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.takarabio.com/products/pcr/pcr-master-mixes/diverse-samples/ex-taq-premix>
69. TaKaRa. v201903Da. Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) For Research Use v201903Da [Internet]. [cited 2023 May 21]. Available from: [https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/RR039A\\_e.v1903Da-a\\_117064.pdf](https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/RR039A_e.v1903Da-a_117064.pdf)
70. Signagen. What Is ROX And Why Use It In qPCR? [Internet]. [signagen](http://signagen.com). [cited 2023 May 21]. Available from: <https://signagen.com/blog/2019/05/20/what-is-rox-and-why-use-it-in-qpcr/>
71. Folkehelseinstituttet. Diagnostikk [Internet]. Folkehelseinstituttet. 2023 [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.fhi.no/nettpub/metodeboka/diagnostikk/diagnostikk/#:~:text=Negativ%20Prediktiv%20verdi%20TN%2F>
72. Bolann BJ, Åsberg, A. Riktig svar på biokjemiske analyser: Praktisk veileder i kvalitetskontroll for medisinske laboratorier. 1. utg. Oslo: Cappelen Damm AS; 2020. 139 s.
73. Oslo universitetssykehus. PS 20 Beregning av måleusikkerhet, Hlab [Internet]. [ehandboken.ous-hf.no](http://ehandboken.ous-hf.no). [cited 2023 May 21]. Available from: <https://ehandboken.ous-hf.no/document/37025>
74. Martínez-Mesa J, González-Chica DA, Bastos JL, Bonamigo RR, Duquia RP. Sample size: how many participants do I need in my research? *Anais Brasileiros de Dermatologia* [Internet]. 2014 Jul [cited 2023 May 21];89(4):609–15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4148275/>



75. Čepin U. Understanding qPCR Efficiency and Why It Exceeds 100% [Internet]. biosistemika.com. 2017 [cited 2023 May 22]. Available from: <https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100>
76. Van TT, Cox LM, Cox ME, Dien Bard J. Prevalence of *Fusobacterium necrophorum* in Children Presenting with Pharyngitis. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2023 May 21];55(4):1147–53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5377842/>
77. Cheriyaedath S. History of Polymerase Chain Reaction (PCR) [Internet]. News-Medical.net. 2018 [cited 2023 May 21]. Available from: [https://www.news-medical.net/life-sciences/History-of-Polymerase-Chain-Reaction-\(PCR\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/History-of-Polymerase-Chain-Reaction-(PCR).aspx)
78. Harris AM, Bramley AM, Jain S, Arnold SR, Ampofo K, Self WH, et al. Influence of Antibiotics on the Detection of Bacteria by Culture-Based and Culture-Independent Diagnostic Tests in Patients Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia. *Open Forum Infectious Diseases* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2023 May 22];4(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5414111/>
79. Regjeringen. Antibiotikaresistens [Internet]. Regjeringen.no. [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.regjeringen.no/no/tema/mat-fiske-og-landbruk/dyr/antibiotika/id2629059/>
80. Riordan T. Human Infection with *Fusobacterium necrophorum* (Necrobacillosis), with a Focus on Lemierre's Syndrome. *Clinical Microbiology Reviews* [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2023 May 22];20(4):622–59. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2176048/>

## 9.0 Vedlegg

Vedlegg 1: Skjema for etikk og personsikkerhet

# Etikk og Personsikkerhet

## Bioingeniørutdanningen intern

KAB 01.03.2023

Prosjektleder/veileder er ansvarlig for at prosjektet foregår innenfor etiske og lovbestemte rammer FØR arbeidet starter. Studentene skal undersøke at alle sider ved prosjektet er dekket og arbeidet skjer innenfor lovlige rammer FØR arbeidet starter.

Prosjekttittel:

**PCR-diagnostikk for alvorlige halsbetennelser**

Studenter/Stipendiater:

**Kristine Lunde Flotve, Tale Sæbø Austbø, Naim Hakimullah Mohammad**

Prosjektleder/Veileder(e)

**Karl Albert Brogstad / Karl-Henning Kalland**

Arbeidssted:

**Laboratorieklinikken HUS, MIA**

HVLs forskningsetiske sider

<https://www.hvl.no/forskning/forskingsetikk/>

Personvern og personopplysninger i forskning

<https://www.hvl.no/forskning/forskingsetikk/personvern/>

Håndtering av forskningsdata

<https://www.hvl.no/forskning/forskingsetikk/datahandtering/>

## Etisk søknad

REK vurderer prosjekter som undersøker humane prøver og person-informasjon. Må prosjektet søke REK godkjenning?

**Dette er en kvalitetssikringsoppgave på sykehuset og er i følge §10 i helseforskningsloven ikke søknadspliktig.**

Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK)

<https://rekportalen.no/#hjem/home>

Lov om medisinsk og helsefaglig forskning (helseforskningsloven)

<https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2008-06-20-44>

---

## Utprøving av legemidler

Innebærer prosjektet utprøving av nye eller godkjente legemidler?  
Må prosjektet søke Statens Legemiddelverket?

**Ikke aktuelt**

REK KULMU står for Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk ved komiteene for klinisk utprøving av legemidler og medisinsk utstyr.

[https://rekportalen.no/#omrek/REK\\_KULMU](https://rekportalen.no/#omrek/REK_KULMU)

Legemiddelverket

<https://legemiddelverket.no>

Lov om legemidler m.v. (legemiddeloven)

<https://lovdata.no/dokument/NL/lov/1992-12-04-132>

Hvis utprøvende behandling kan det være nødvendig å kontakte jurist på institusjon (HVL/UiB/HUS) og forsikringsselskap.

## Personopplysninger

Skal det samles inn, lagre og behandle personopplysninger?  
Må prosjektet søke SIKT?

Nei

Sikt – Kunnskapssektorens tjenesteleverandør  
(NSD - Norsk senter for forskningsdata)  
<https://sikt.no>

---

## Forsøksdyr

Skal forsøksdyr brukes i prosjektet?  
Dyreforsøk skal godkjennes av mattilsynet.

Nei

Mattilsynet  
[https://www.mattilsynet.no/dyr\\_og\\_dyrehold/dyrevelferd/forsoksdyr/](https://www.mattilsynet.no/dyr_og_dyrehold/dyrevelferd/forsoksdyr/)

Forskrift om bruk av dyr i forsøk  
<https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2015-06-18-761>

---

## Genmodifiserte Organismer (GMO)

GMO er planter, dyr og mikroorganismer hvor den genetiske sammensetningen er endret gjennom gen- eller celleteknologi.  
Er nødvendige godkjenninger innhentet?

Ikke aktuelt

Bioteknologirådet / gen (GMO)  
<https://www.bioteknologiradet.no>

Miljødirektoratet  
<https://www.miljodirektoratet.no/ansvarsomrader/arter-naturtyper/gmo/genmodifiserte-organismer/>

Lov om framstilling og bruk av genmodifiserte organismer m.m. (genteknologiloven)

<https://lovdata.no/dokument/NL/lov/1993-04-02-38>

---

### Personopplysninger og sikkerhet

<https://www.hvl.no/forskning/forskingsetikk/>

General Data Protection Regulation (GDPR)

<https://gdpr-info.eu>

Vil person-informasjon behandles i prosjektet?

Nei

Må skriftlig/informert godkjenning innhentes og er det mulighet for å trekke seg fra studien?

Ikke aktuelt

Hvordan skal person-informasjon behandles?  
(Aidentifisert/anonymt/åpent)

Prøvene aidentifiseres.

Alle prøver blir aidentifiseres, og koblingsnøkkel lagres på sikker lagring. I oppgaven behandles informasjon om alder og kjønn. Dette er informasjon som ikke kan knyttes direkte opp til enkeltpersoner, og regnes derfor ikke som personopplysninger ifølge Sikt. Dermed er ikke forskningsprosjektet meldepliktig til Sikt.

Hvilke data/informasjon skal kobles til person?

Ingen

Hvor skal data lagres?  
Sikker lagring? På HVL maskin, privat PC ?

Data skal lagres på sikker lagring ved laboratoriet. Kun uidentifiserte prøvesvar lagres på privat PC.

### Sikker lagring

<https://www.hvl.no/student/it-hjelp/it-reglement/lagring-av-data-ved-hvl/>

<https://www.hvl.no/student/it-hjelp/it-reglement/lagring-av-data-ved-hvl/lagringsguide/>

Hvordan og når skal informasjon/data og prøver slettes?

**Prøvene destrueres når de er oppbrukt, går ut på dato eller når studien/utprøvingen er over. Rådata vil bli slettet etter fullført studie eller etter 5år. Behandlet/Prosessert data vil følge oppgaven.**

Hvordan skal resultatene presenteres/publiseres/brukes og fortsatt være i henhold til GDPR?

**Dataene skal presenteres i en bachelor oppgave. Ingen personinformasjon vil være knyttet til resultatene og det er ingen konflikt med GDPR.**

Er prosjektet innenfor rammene som er gitt godkjenning for?

**Ikke aktuelt, siden ingen godkjenning er nødvendig.**

Diskuter Etikk; Fordeler og ulemper med prosjektet, for deltagere, for forskning/utvikling/behandling og for samfunnet.

Det vil ikke være noen ulemper for de som har donert prøver, siden ingen informasjon vil koblet opp mot person.

Prosjektet gir fordeler for både pasient og laboratoriet. Hensikten med oppgaven er å undersøke om det er mulig å bedre dagens diagnostikk. For pasient vil dette bety raskere diagnostikk, og dermed raskere oppstart på evt behandling. For laboratoriet gir det fordelen med at diagnostikken blir mer presis, økt effektivitet, og redusert tidsbruk og kostnad.

Sted og dato;

Bergen, 12.03.23

Signerens; studenter og prosjektleder/veileder

Hakim Muin Tale Sobør Avstø Kristine L. Flotø  
Karl A. Brønsch

Når skjema er utfylt og godkjent, kan det refereres til i BSc/MSc/PhD oppgavene/avhandlingene at denne interne sjekklisen er gjennomført. Skjemaet kan også inkluderes som et vedlegg.

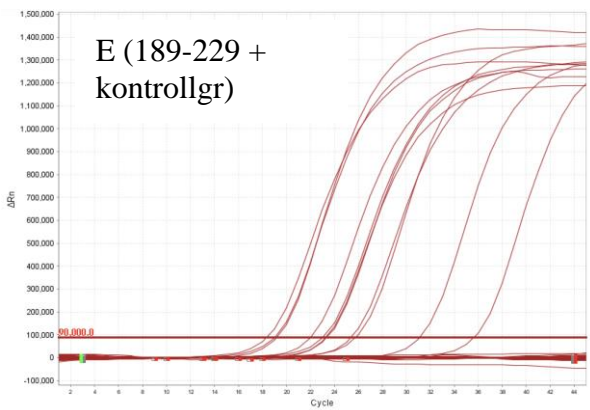
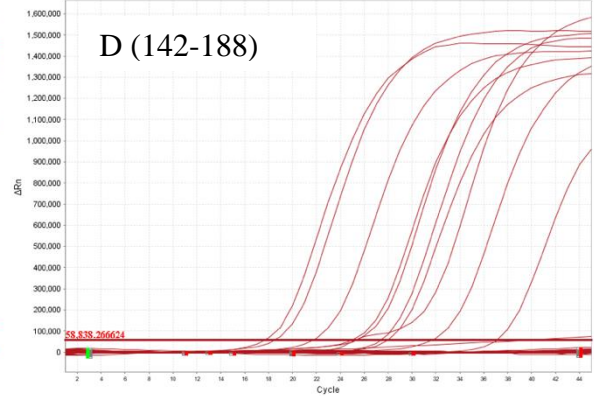
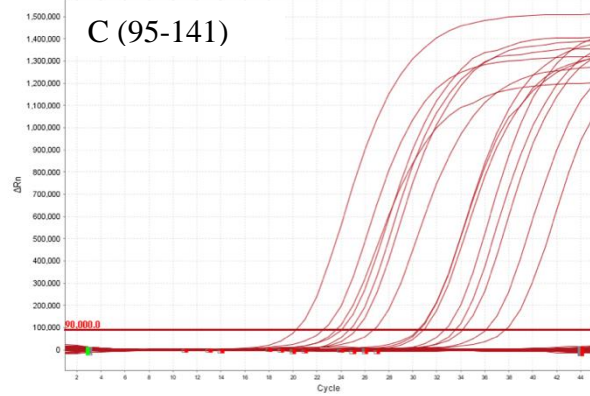
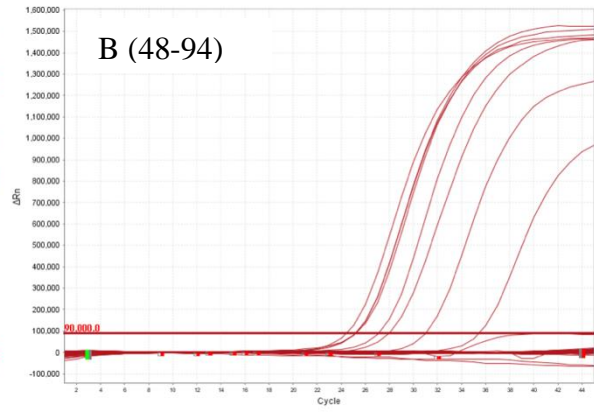
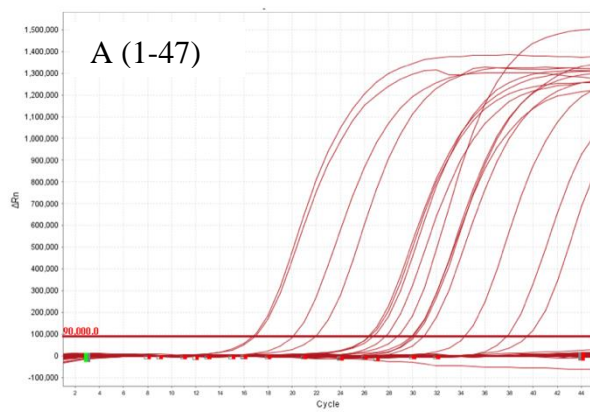
Andre forhold som kan være relevant; Skal det utføres genetiske analyser på mennesker? Hvordan skal informasjon deles mellom forskningsgrupper? Skal prøver eller resultater sendes utenlands? Slike forhold er søknadspliktig.



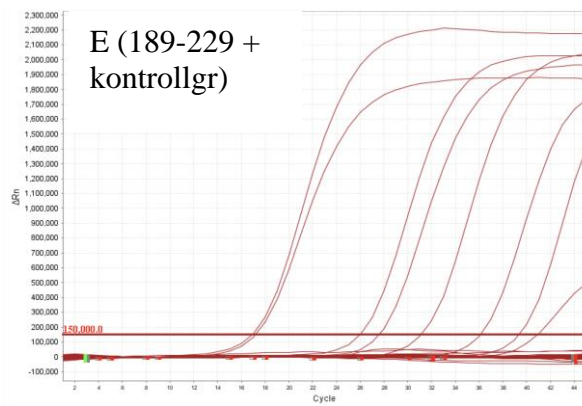
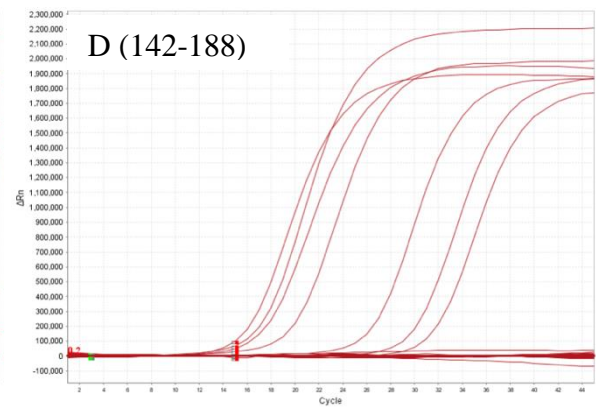
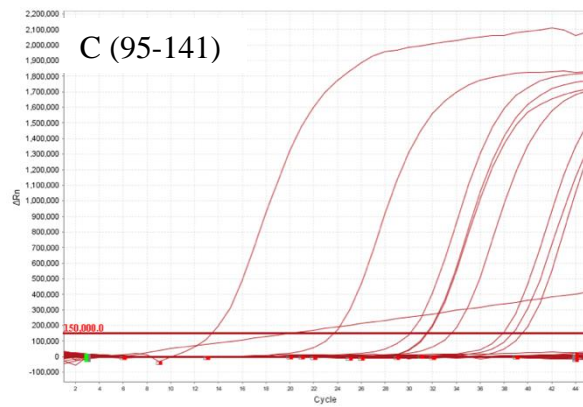
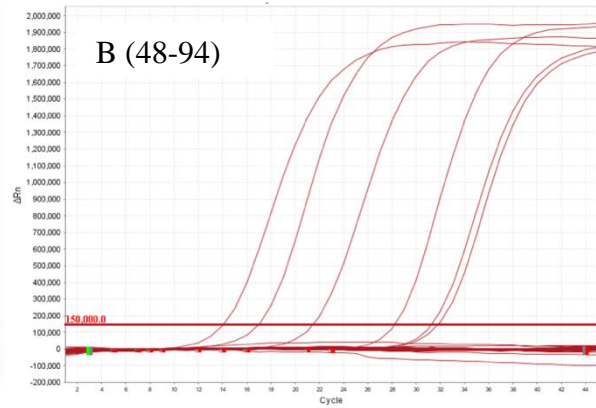
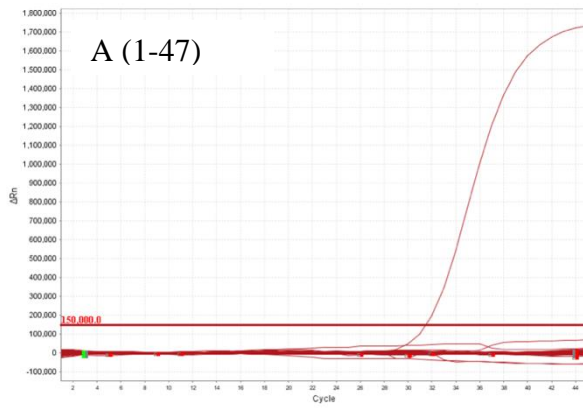
Vedlegg 2: ATCC-stammer for *S. pyogenes*, *F. necrophorum* og *F. nucleatum*

Bakterie	ATCC-nr.
<i>S. pyogenes</i>	19615
<i>F. necrophorum</i>	51357
<i>F. nucleatum</i>	25586

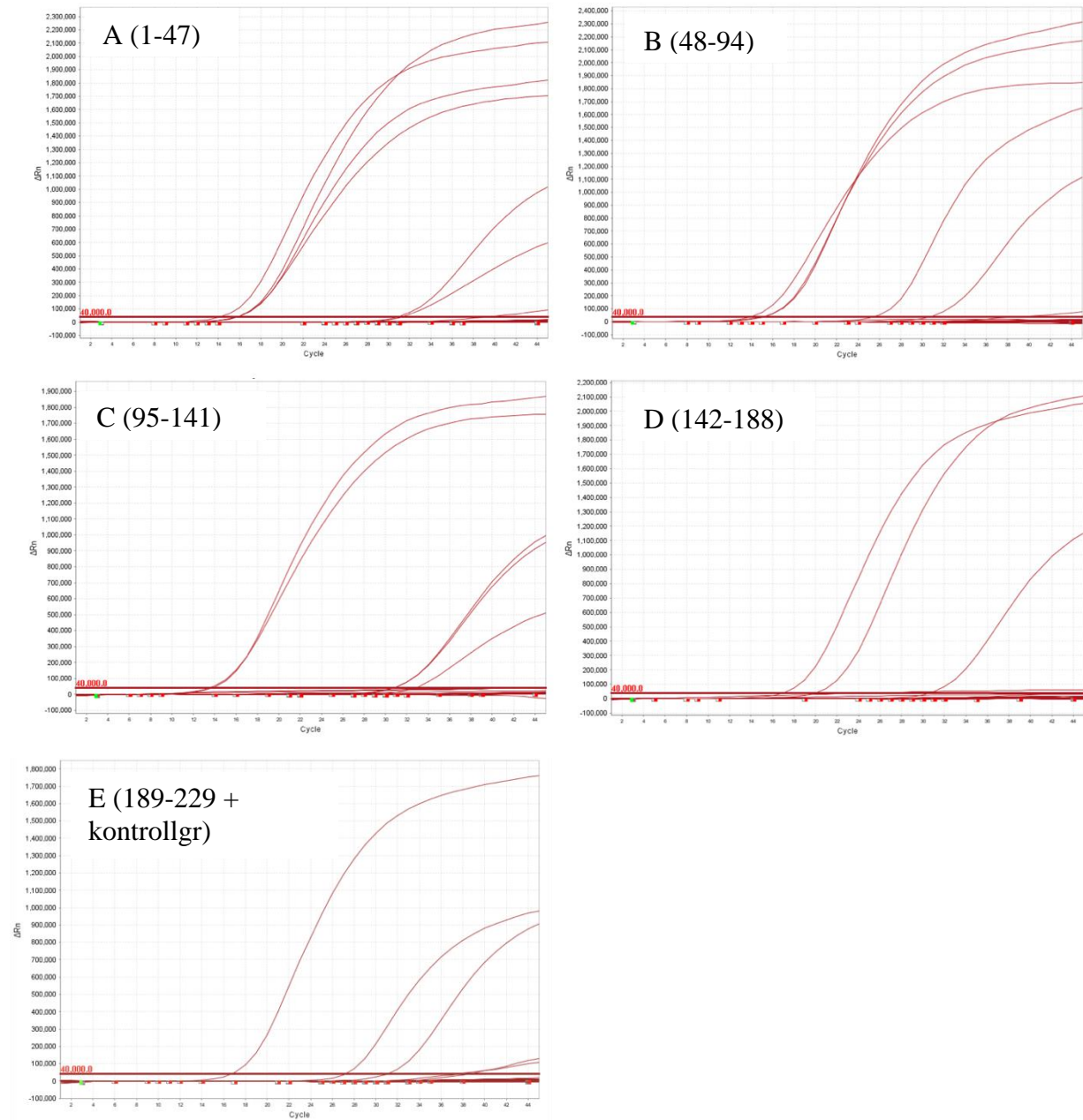
Vedlegg 3: Amplifikasjonsplott for PCR-analyse av *S. pyogenes* for pasientprøver. Kurve E inkluderer også PCR av kontrollgruppe.



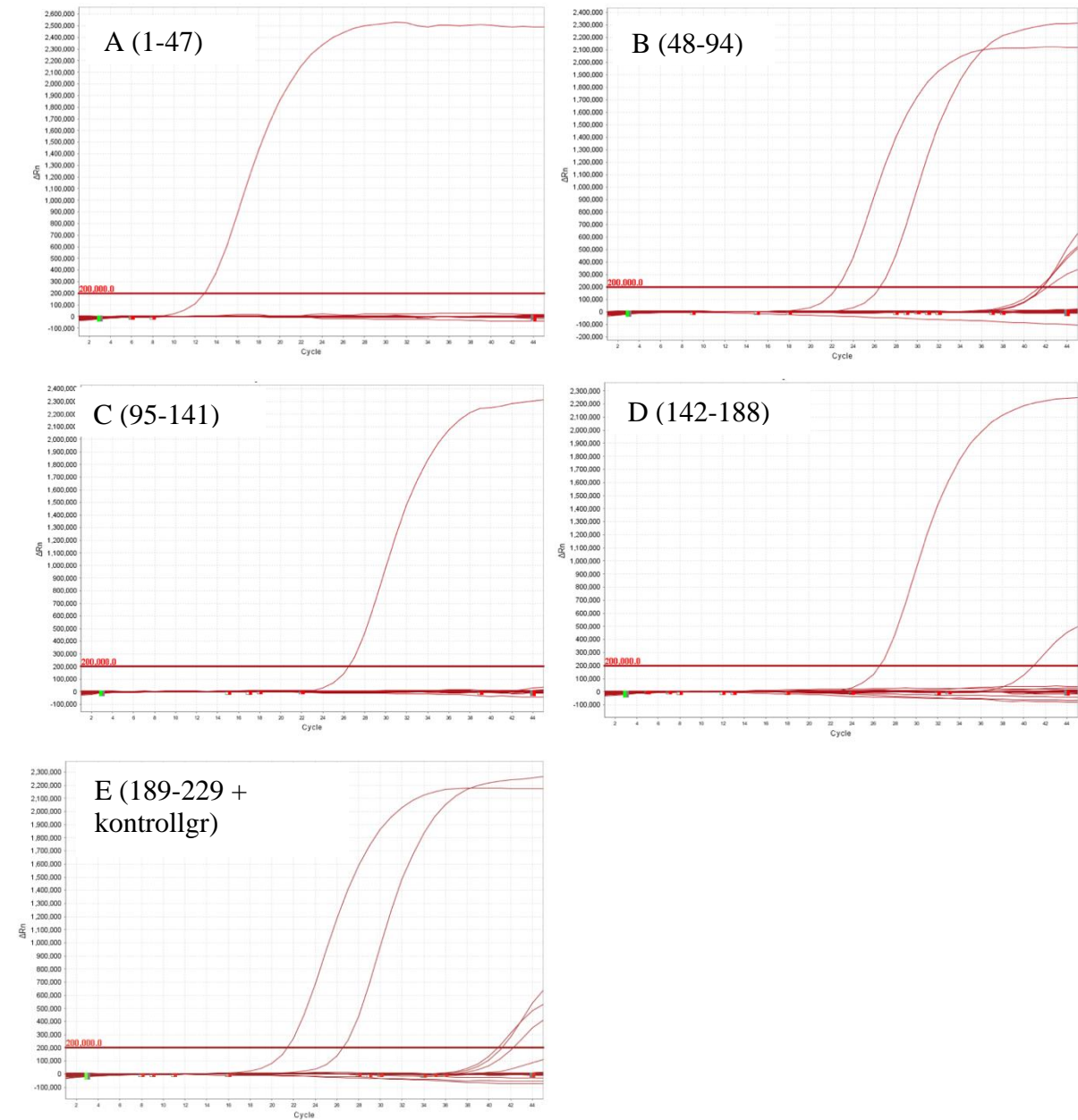
Vedlegg 4: Amplifikasjonsplott for PCR-analyse av *F. necrophorum* for pasientprøver. Kurve E inkluderer også PCR av kontrollgruppe.



Vedlegg 5: Amplifikasjonsplott for PCR-analyse av adenovirus for pasientprøver. Kurve E inkluderer også PCR av kontrollgruppe.

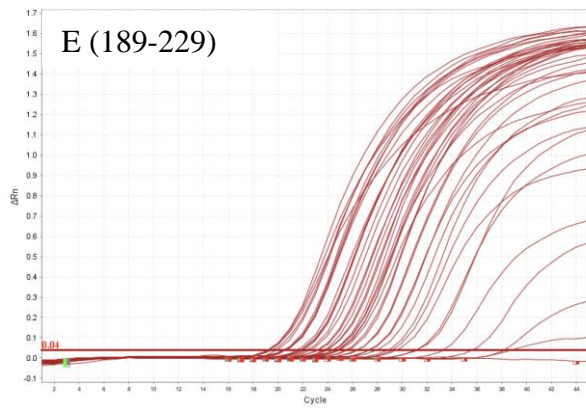
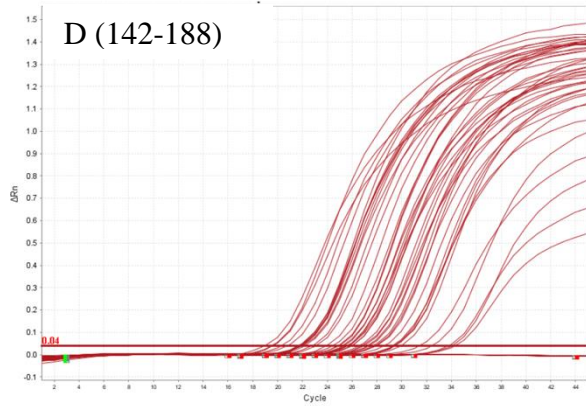
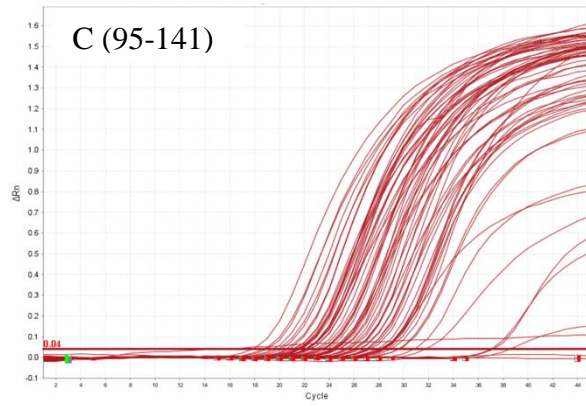
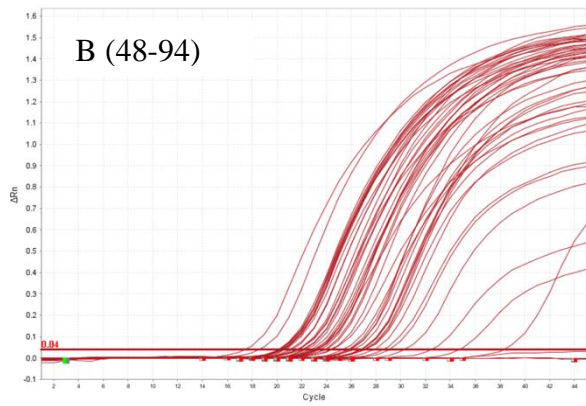
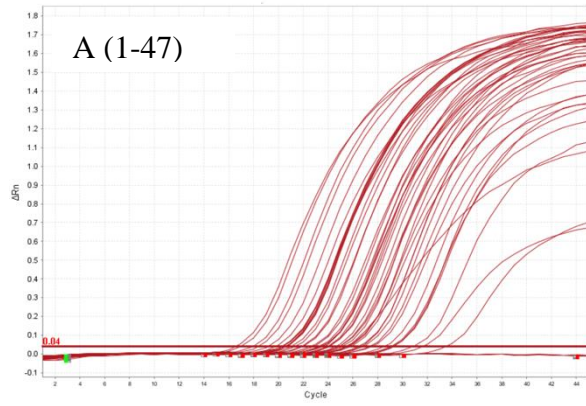


Vedlegg 6: Amplifikasjonsplott for PCR-analyse av *A. haemolyticum* for pasientprøver. Kurve E inkluderer også PCR av kontrollgruppe.

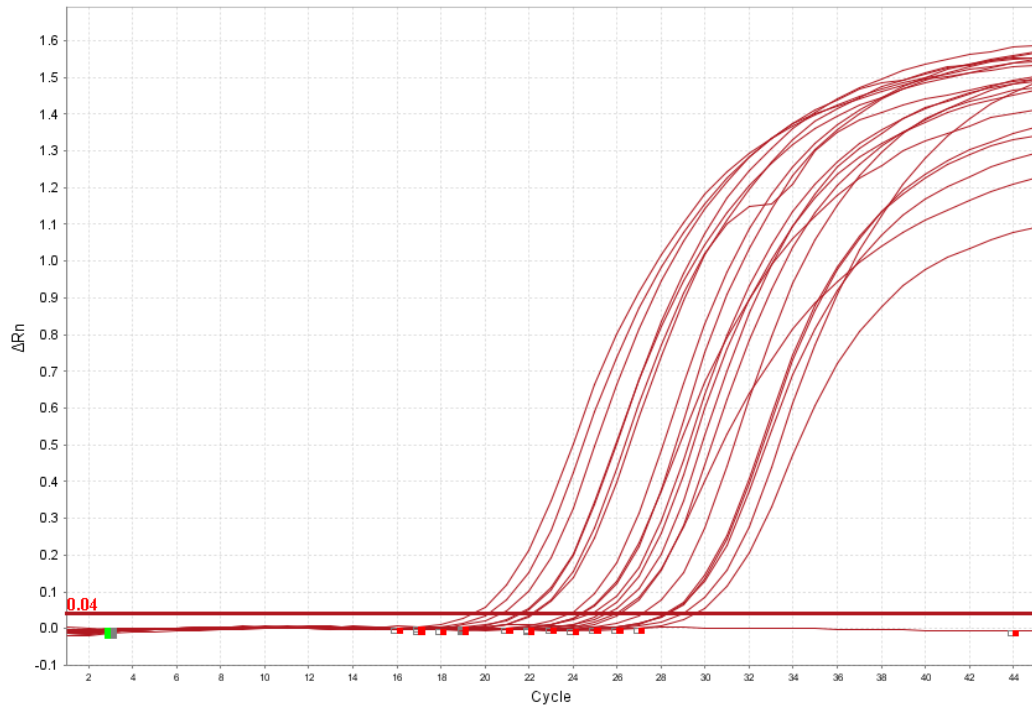




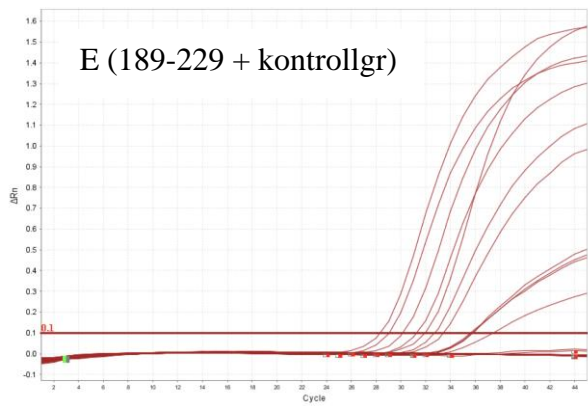
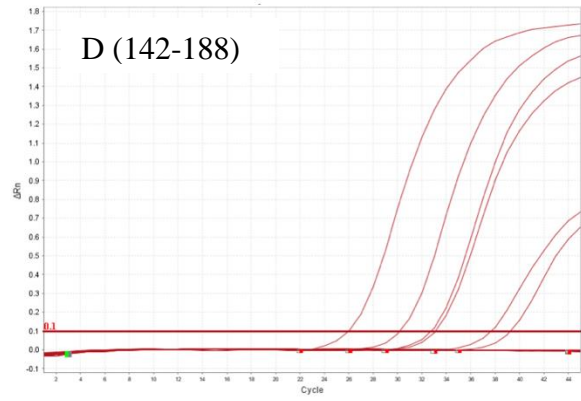
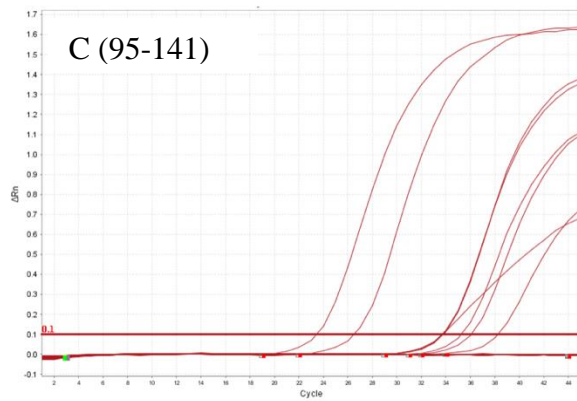
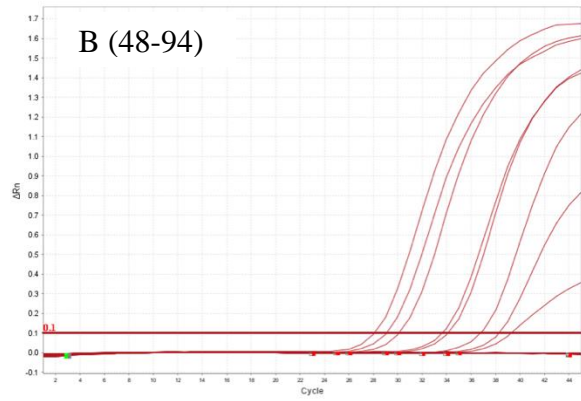
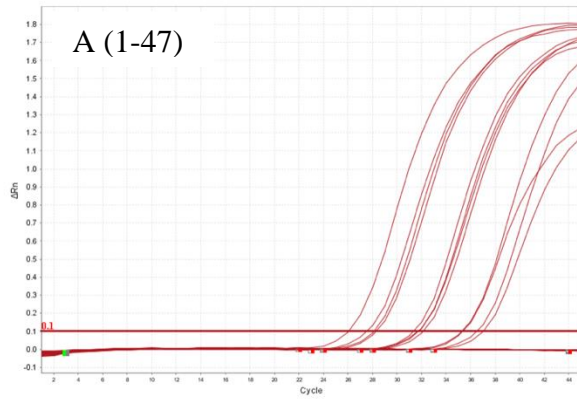
Vedlegg 7: Amplifikasjonsplott for PCR-analyse av *F. nucleatum* for pasientprøver.



Vedlegg 8: Amplifikasjonsplott for PCR-analyse av *F. nucleatum* for kontrollgruppe



Vedlegg 9: Amplifikasjonsplott for PCR-analyse av *F. massiliense* for pasientprøver. Kurve E inkluderer også PCR av kontrollgruppe.





## Vedlegg 10: PCR-resultat, kontroller

### Kontrollresultat, prøve 1-47

	Adenov.	F. necr.	F. nucl.	S. pyog.	F. mass.	A. haem.
Positiv kontroll	30,915	31,542	29,351	30,95	-	12,899*
Negativ kontroll	0	0	0	0	0	0

\*) Kontrollen ble fortynnet ytterligere etter PCR-analysen

### Kontrollresultat, prøve 48-95

	Adenov.	F. necr.	F. nucl.	S. pyog.	F. mass.	A. haem.
Positiv kontroll	30,838	31,329	29,117	31,005	-	26,531
Negativ kontroll	0	0	0	0	0	0

### Kontrollresultat, prøve 95-141

	Adenov.	F. necr.	F. nucl.	S. pyog.	F. mass.	A. haem.
Positiv kontroll	30,785	30,939	29,595	30,942	-	26,49
Negativ kontroll	0	0	0	0	0	0

### Kontrollresultat, prøve 142-188

	Adenov.	F. necr.	F. nucl.	S. pyog.	F. mass.	A. haem.
Positiv kontroll	30,722	31,39	29,32	27,687	-	26,606
Negativ kontroll	0	0	0	0	0	0

### Kontrollresultat, prøve 189-229

	Adenov.	F. necr.	F. nucl.	S. pyog.	F. mass.	A. haem.
Positiv kontroll	31,022	31,167	29,219	31,164	-	26,569
Negativ kontroll	0	0	0	0	0	0

Vedlegg 11: PCR-resultat for pasientprøver for *S. pyogenes*, *F. necrophorum*, adenovirus, *A. haemolyticum*, *F. nucleatum* og *F. massiliense*

PCR resultater										Dyrking resultater fra Unilab			Kommentarer av dyrking fra Unilab
Prove	Adenov.	A. haem.	F. nucl.	F. mass.	F. necr.	S. pyog.	Vekst på blodagar	Mikrobe	Betahemolytisk strep.	Kommentar			
1	15,832	0	21,054	13,758	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist				
2	0	0	25,45	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål med bacitracin			
3	0	0	24,123	0	0	16,754	Ja	<i>S. pyogenes</i> (rikelig)	Påvist				
4	0	0	30,934	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Ingen vekst på sjokoladeskål med bacitracin. Middels rikelig <i>C. albicans</i> , sparsomt <i>S. aureus</i> (inngår i normalflora)			
5	0	0	25,605	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål med bacitracin			
6	0	0	24,178	0	0	0	Ja	<i>S. dysgalactiae</i> (rikelig)	Påvist				
7	0	0	23,479	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist				
8	0	0	33,606	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist				
9	0	0	20,366	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål med bacitracin			
10	0	0	22,009	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist				
11	0	0	27,607	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist				
12	0	0	20,67	35,424	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist				
13	0	0	24,914	0	0	28,805	Ja	Normalflora	Ikke påvist				
14	0	0	25,729	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist				
15	14,315	0	17,009	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist				
16	0	0	25,877	0	0	0	Ja	<i>C. albicans</i> (sparsomt)	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål			
17	0	0	26,856	0	0	26,355	Ja	<i>S. pyogenes</i> (rikelig)	Påvist				
18	0	0	0	0	0	0	Ja	<i>C. albicans</i> (middels rikelig)	Ikke påvist	Ingen vekst på sjokoladeskål			

Prove	Adenov.	A. haem.	F. nucl.	F. mass.	F. necr.	S. pyog.	Vekst på blodagar	Mikrobe	Betahemolytisk strep.	Kommentar
19	0	0	22,844	31,411	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
20	0	0	23,629	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
21	0	0	29,142	0	0	0	Ja	C. albicans (middels rikelig)	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
22	0	0	26,661	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
23	0	0	23,511	0	0	37,83	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
24	0	0	20,35	0	0	27,759	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	
25	0	0	20,598	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
26	0	0	22,705	0	0	20,094	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
27	0	0	0	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
28	0	0	18,002	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
29	0	0	20,661	31,78	0	26,481	Ja	S. pyogenes (middels rikelig)	Påvist	
30	0	0	31,685	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
31	0	0	23,331	28,342	0	21,955	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	
32	15,802	0	18,407	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
33	0	0	20,319	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
34	0	0	27,383	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
35	15,79	0	19,202	28,113	0	29,956	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
36	0	0	20,651	26,036	0	26,763	Ja	S. pyogenes (middels rikelig)	Påvist	
37	0	0	24,696	0	0	34,324	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
38	0	0	25,225	36,999	0	39,575	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
39	0	0	24,946	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
40	0	0	28,566	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Ingen vekst på sjokoladeskål
41	31,263	0	23,967	27,588	0	30,172	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	
42	0	0	19,809	36,552	0	16,928	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	
43	0	0	21,45	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
44	0	0	29,276	35,361	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	

Prøve	Adenov.	A. haem.	F. nucl.	F. mass.	F. necr.	S. pyog.	Vekst på blodagar	Mikrobe	Betahemolytisk strep.	Kommentar
45	0	0	16,598	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
46	0	0	21,907	32,146	0	30,022	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
47	0	0	26,552	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
48	0	0	20,609	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
49	0	0	23,351	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
50	0	0	21,346	0	0	25,187	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
51	0	0	26,915	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
52	0	41,443	21,728	34,136	0	27,987	Ja	S. pyogenes (middels rikelig)	Påvist	
53	0	0	20,248	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
54	0	0	23,986	0	0	25,199	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	Vekst g+ mikrober
55	0	0	20,248	39,258	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
56	0	0	27,136	0	0	35,454	Ja	Normalflora	Ikke påvist	S. pyogenes påvist på PCR (37,93), F. necrophorum ikke påvist
57	0	0	26,069	0	21,542	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	F. necrophorum påvist på PCR (20,89), S. pyogenes ikke påvist
58	0	22,568	23,296	29,045	0	0	Ja	Strep dysgal. (middels rikelig)	Påvist	Vekst av grampositive mikrober
59	0	0	28,602	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
60	0	0	22,281	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
61	0	0	23,09	28,085	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
62	0	0	34,781	0	0	25,254	Ja	S. pyogenes	Ikke påvist	
63	0	0	25,453	0	0	0	Ja	C. albicans (middels rikelig)	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål. Sabourskål, og CHROM soppskål (grønn koloni)
64	0	0	27,875	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
65	0	0	27,223	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
66	25,663	0	20,471	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
67	0	0	26,274	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
68	0	0	25,827	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
69	0	0	23,561	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	

Prøve	Adenov.	A. haem.	F. nucl.	F. mass.	F. necr.	S. pyog.	Vekst på blodagar	Mikrobe	Betahemolytisk strep.	Kommentar
70	0	41,659	32,534	0	28,251	0	Ja	Prevotella melaninogen (middels), Prevotella histiocola (middels), Veillonella atypica (rikelig)	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål, FAA skål. Og KV skål. Vekst på anaerob dyrkning (F. necrophorum ikke påvist). Ikke vekst på laktoseskål. F. necrophorum påvist på PCR (28,41)
71	0	42,169	22,136	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
72	0	0	22,786	0	0	0	Ja	S. dysgalactiae (rikelig)	Påvist	
73	14,104	0	0	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
74	15,294	0	17,538	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
75	0	0	22,989	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
76	0	0	23,256	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
77	0	0	21,161	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
78	0	0	18,656	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
79	0	0	20,174	33,696	14,095	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
80	0	0	20,26	30,099	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
81	0	0	24,422	0	16,975	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	F. necrophorum påvist på PCR (20,02), S. pyogenes ikke påvist
82	0	0	30,404	0	0	0	Ja	C. albicans (rikelig)	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
83	0	0	24,535	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
84	0	0	21,824	0	0	27,099	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	
85	0	0	26,808	38,231	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
86	0	0	25,913	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
87	0	0	21,712	0	0	0	Ja	S. dysgalactiae (middels rikelig)	Påvist	
88	EKSKLUDERT									
89	EKSKLUDERT									

Prøve	Adenov.	A. haem.	F. nucl.	F. mass.	F. necr.	S. pyog.	Vekst på blodagar	Mikrobe	Betahemolytisk strep.	Kommentar
90							EKSKLUDERT			
91	0	0	23,877	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum)
92	15,319	0	20,382	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum)
93	0	0	26,815	0	31,872	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
94	0	41,709	27,246	0	0	0	Ja	S. aureus (rikelig), C. albicans (rikelig)	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål. Usikker om klinisk betydning da det finnes mye i hals.
95	0	0	26,521	0	0	0	Ja	S. aureus (middels rikelig)	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
96	0	0	29,642	0	0	25,252	Ja	S. pyogenes (middels rikelig)	Påvist	
97	0	0	21,605	0	0	24,735	Ja	S. pyogenes (middels rikelig)	Påvist	
98	0	0	22,243	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
99	0	0	18,974	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
100	0	0	27,366	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
101	0	0	28,072	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
102	0	0	25,985	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
103	0	0	21,167	26,536	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
104	0	0	24,183	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
105	0	0	25,446	0	37,896	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
106	0	0	21,448	33,824	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
107	0	0	27,01	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
108	0	0	0*	0	0	0	Ja	S. aureus (rikelig)	Ikke påvist	
109	0	0	37,2	0	37,119	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	S. pyogenes ikke påvist, inkonklusiv på F. necrophorum
110	0	0	23,572	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
111	0	0	38,468	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
112	0	0	24,181	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
113	0	0	24,831	0	30,845	33,375	Ja	S. pyogenes (middels rikelig)	Påvist	

Prove	Adenov.	A. haem.	F. nucl.	F. mass.	F. necr.	S. pyog.	Vekst på blodagar	Mikrobe	Betahemolytisk strep.	Kommentar
114	32,728	0	36,965	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
115	0	0	24,243	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
116	0	0	26,939	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
117	13,502	0	21,771	36,018	29,228	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
118	0	0	20,594	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
119	0	0	22,46	33,74	0	30,598	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
120	0	0	24,578	0	32,705	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
121	0	0	23,226	0	38,826	32,709	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
122	0	0	22,952	35,246	0	30,48	Ja	Normalflora	Ikke påvist	S. pyogenes påvist på PCR (29,79), F. necrophorum ikke påvist
123	0	0	23,536	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
124	0	0	28,43	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
125	0	0	22,572	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
126	0	0	23,459	0	0	0	Ja	mikrobe (middels rikelig)	Ikke påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum)
127	0	0	19,856	0	12,617	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	F. necrophorum påvist på PCR (15,32), S. pyogenes ikke påvist
128	0	0	21,262	0	22,827	26,74	Ja	Streptokokk, betahemolytisk (rikelig)	Påvist	
129	0	0	27,881	0	0	34,137	Ja	Normalflora	Ikke påvist	S. pyogenes påvist på PCR (34,37), F. necrophorum ikke påvist
130	0	0	18,723	0	0	36,079	Ja	Normalflora	Ikke påvist	S. pyogenes påvist på PCR (36,2), F. necrophorum ikke påvist
131	0	0	17,862	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
132	0	0	30,865	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
133	0	0	22,094	0	0	23,619	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	S. pyogenes påvist på PCR (18,8), F. necrophorum ikke påvist
134	0	0	31,785	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
135	0	0	22,182	23,469	0	24,004	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	
136	0	0	28,658	38,223	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum)
137	0	0	21,568	0	0	20,306	Ja	Gram pos kokk (rikelig)	Påvist	S. pyogenes påvist på PCR (22,16), F. necrophorum ikke påvist

Prøve	Adenov.	A. haem.	F. nucl.	F. mass.	F. necr.	S. pyog.	Vekst på blodagar	Mikrobe	Betahemolytisk strep.	Kommentar	
138	0	0	28,276	0	0	37,761	Ja	Normalflora	Ikke påvist	S. pyogenes påvist på PCR (37,19), F. necrophorum ikke påvist	
139	0	0	0	33,731	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum)	
140	0	0	26,45	0	0	22,581	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	S. pyogenes påvist på PCR (20,95), F. necrophorum ikke påvist	
141	0	0	22,298	0	0*	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist		
142	0	0	26,875	0	0	32,568	Ja	Normalflora	Ikke påvist	S. pyogenes påvist på PCR (ingen Ct-verdi oppgitt), F. necrophorum ikke påvist	
143	0	0	31,472	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Ingen vekst på sjokoladeskål	
144	0	0	23,973	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist		
145	0	0	24,997	0	0	0	Ja	S. dysgalactiae (rikelig)	Påvist		
146	0	0	27,031	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist		
147	0	0	0	25,996	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist		
148	0	0	25,422	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist		
149	0	0	22,092	0	0	18,513	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	S. pyogenes påvist på PCR (19,72), F. necrophorum ikke påvist	
150	0	0	27,928	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist		
151	EKSKLUDERT										
152	0	0	0	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist		
153	0	0	21,984	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist		
154	0	0	26,03	0	0	0	Ja	S. aureus (middels rikelig, usikker klinisk betydning), Candida tropicalis (middels rikelig), Candida albicans (middels rikelig)	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål	
155	0	0	0	0	0	0	Ja	Candida species (rikelig)	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål	
156	0	0	20,862	33,092	0	26,367	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist		



Prøve	Adenov.	A. haem.	F. nucl.	F. mass.	F. necr.	S. pyog.	Vekst på blodagar	Mikrobe	Betahemolytisk strep.	Kommentar
157	0	0	25,798	0	0	0	Ja	S. dysgalactiae (rikelig)	Påvist	
158	0	0	29,52	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Ingen vekst på sjokoladeskål
159	0	0	29,962	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum)
160	0	0	19,692	0	0	19,31	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	
161	16,97	0	21,941	32,794	19,249	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	F. necrophorum påvist på PCR (22,73), S. pyogenes ikke påvist
162	0	0	27,307	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
163	0	0	33,802	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum)
164	0	0	25,315	0	0	28,664	Ja	Normalflora	Ikke påvist	S. pyogenes påvist på PCR (30,63), F. necrophorum ikke påvist
165	0	0	19,624	0	0	0	Ja	Strep. agalact (rikelig)	Påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum)
166	0	0	26,667	0	29,677	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum)
167	0	0	28,087	0	0	28,065	Ja	S. pyogenes (middels rikelig)	Påvist	S. pyogenes påvist på PCR (26,96), F. necrophorum ikke påvist
168	0	0	22,268	0	16,487	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	F. necrophorum påvist på PCR (17,56), S. pyogenes ikke påvist
169	0	0	34,301	0	0	0	Ja	C. albicans (middels rikelig)	Ikke påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum), vekst på sjokoladeskål
170	0	0	29,503	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum)
171	0	0	25,698	39,254	0	0	Ja	S. dysgalactiae (rikelig)	Påvist	
172	0	0	23,085	37,671	0	22,575	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	
173	0	0	32,507	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
174	0	0	21,962	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum)
175	0	0	22,826	30,218	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum)
176	0	0	29,492	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	

Prøve	Adenov.	A. haem.	F. nucl.	F. mass.	F. necr.	S. pyog.	Vekst på blodagar	Mikrobe	Betahemolytisk strep.	Kommentar
177										
EKSKLUDERT										
178	0	0	24,925	0	25,986	0	Ja	S. dysgalactiae (rikelig)	Påvist	F. necrophorum påvist på PCR (26,57), S. pyogenes ikke påvist
179	0	0	34,076	0	0	0	Ingen vekst	Ingen vekst	Ikke påvist	
180	0	0	27,455	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Neg PCR (S. pyogenes, F. necrophorum)
181	0	40,909	28,654	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
182	20,051	0	27,758	0	0	37,75	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
183	0	0	25,647	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
184	0	0	21,737	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
185	0	0	25,998	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
186	0	0	21,877	0	0	25,97	Ja	S. pyogenes (middels rikelig)	Påvist	
187	0	0	20,38	0	15,654	0	Ja	S. dysgalactiae (rikelig)	Påvist	F. necrophorum påvist på PCR (15,34), S. pyogenes ikke påvist
188	0	0	0	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Ingen vekst på sjokoladeskål
189	0	0	23,231	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
190	0	0	23,358	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
191	0	0	31,31	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
EKSKLUDERT										
193	0	41,162	23,74	0	36,105	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
194	0	0	21,625	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
195	0	0	20,011	0	40,893	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
196	38,355	0	24,941	28,33	0	23,394	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	
197	0	0	25,727	0	0	23,05	Ja	S. pyogenes (middels rikelig)	Påvist	
198	0	0	31,229	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål, påvist candida albicans (rikelig)
199	0	0	24,548	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
200	0	0	20,764	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
201	0	0	28,057	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	

Prove	Adenov.	A. haem.	F. nucl.	F. mass.	F. necr.	S. pyog.	Vekst på blodagar	Mikrobe	Betahemolytisk strep.	Kommentar
202	0	0	22,109	0	0	19,229	Ja	S. dysgalactiae (rikelig)	Påvist	S. pyogenes påvist på PCR (18,06), F. necrophorum ikke påvist
203	0	0	21,938	35,758	25,994	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
204	0	40,771	28,916	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
205	0	21,439	19,271	0	0	18,406	ja	S. pyogenes (rikelig)	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
206	0	0	24,499	35,752	16,939	0	Ja	S. dysgalactiae (middels rikelig)	påvist	F. necrophorum påvist på PCR (23,91), S. pyogenes ikke påvist
207	0	0	38,838	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
208	0	0	24,584	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
209	0	0	24,058	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	Vekst på sjokoladeskål
210	16,718	0	20,7	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
211	0	0	38,121	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
212	0	0	25,544	30,152	0	25,433	Ja	S. pyogenes (middels rikelig)	Påvist	
213	0	0	25,079	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
214	0	0	27,443	0	27,616	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	F. necrophorum påvist på PCR (27,93), S. pyogenes ikke påvist
215	0	0	24,82	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
216	0	0	27,454	0	17,182	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	F. necrophorum påvist på PCR (20,02), S. pyogenes ikke påvist
217	37,522	0	26,503	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
218	0	0	20,632	32,712	0	35,709	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
219	0	0	19,355	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
220	0	0	19,222	33,4	0	22,048	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	S. pyogenes påvist på PCR (23,47), F. necrophorum ikke påvist
221	0	0	19,612	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
222	0	0	22,66	0	0	19,025	Ja	S. pyogenes (rikelig)	Påvist	
223	0	0	21,876	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
224	0	0	26,471	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
225	27,116	0	22,45	31,284	0	25,796	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
226	0	0	20,571	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	

Prøve	Adenov.	A. haem.	F. nucl.	F. mass.	F. necr.	S. pyog.	Vekst på blodagar	Mikrobe	Betahemolytisk strep.	Kommentar
227	0	0	33,319	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	
228	0	0	23,904	0	0	23,309	Ja	S. pyogenes (middels rikelig)	Påvist	
229	0	0	29,634	0	0	0	Ja	Normalflora	Ikke påvist	

## Vedlegg 12: Demografisk tabell av pasienter

### Prøve 1- 58

Prøve	Alder	Kjønn	Innlagt	Kreft	Prøve	Alder	Kjønn	Innlagt	Kreft
1	3	mann	ja	nei	30	72	kvinne	ja	nei
2	15	kvinne	ja	nei	31	2	mann	ja	nei
3	35	kvinne	nei	nei	32	33	kvinne	nei	nei
4	76	kvinne	ja	ja	33	26	kvinne	ja	nei
5	43	kvinne	ja	ja	34	43	mann	nei	nei
6	17	kvinne	nei	nei	35	41	mann	nei	nei
7	63	mann	nei	nei	36	3	kvinne	ja	nei
8	31	kvinne	nei	nei	37	22	mann	ja	nei
9	60	mann	ja	ja	38	29	mann	nei	nei
10	19	mann	ja	nei	39	30	kvinne	nei	nei
11	22	kvinne	nei	nei	40	82	mann	ja	ja
12	33	kvinne	ja	nei	41	2	kvinne	nei	nei
13	5	kvinne	nei	nei	42	23	kvinne	ja	nei
14	28	kvinne	nei	nei	43	11	kvinne	ja	nei
15	33	kvinne	ja	nei	44	31	mann	ja	nei
16	71	mann	ja	ja	45	21	kvinne	ja	nei
17	42	kvinne	nei	nei	46	4	kvinne	nei	nei
18	55	mann	ja	ja	47	47	mann	nei	nei
19	26	mann	ja	nei	48	28	kvinne	nei	nei
20	71	kvinne	ja	ja	49	62	kvinne	ja	ja
21	76	mann	ja	ja	50	25	mann	nei	nei
22	43	kvinne	nei	nei	51	38	kvinne	ja	ja
23	29	kvinne	nei	nei	52	46	mann	ja	nei
24	5	mann	ja	nei	53	2	mann	nei	nei
25	21	kvinne	ja	nei	54	41	kvinne	nei	nei
26	42	kvinne	nei	nei	55	23	kvinne	nei	nei
27	0	mann	ja	nei	56	41	kvinne	nei	nei
28	24	mann	ja	nei	57	15	mann	nei	nei
29	1	kvinne	nei	nei	58	22	kvinne	nei	nei

## Prøve 59- 116

Prøve	Alder	Kjønn	Innlagt	Kreft	Prøve	Alder	Kjønn	Innlagt	Kreft
59	67	mann	ja	ja	88	Ekskludert			
60	79	kvinne	ja	ja	89	Ekskludert			
61	22	kvinne	ja	nei	90	Ekskludert			
62	66	kvinne	ja	nei	91	10	mann	ja	nei
63	49	mann	ja	ja	92	26	mann	nei	nei
64	54	kvinne	nei	nei	93	82	kvinne	nei	nei
65	24	kvinne	nei	nei	94	68	mann	ja	ja
66	39	mann	nei	nei	95	76	mann	ja	ja
67	20	kvinne	ja	nei	96	5	mann	ja	nei
68	28	kvinne	nei	nei	97	5	mann	nei	nei
69	9	kvinne	ja	nei	98	16	kvinne	nei	nei
70	18	kvinne	ja	nei	99	22	kvinne	nei	nei
71	75	mann	ja	ja	100	87	kvinne	ja	ja
72	17	kvinne	nei	nei	101	65	kvinne	ja	ja
73	2	kvinne	ja	nei	102	16	mann	nei	nei
74	26	mann	ja	nei	103	32	kvinne	nei	nei
75	27	kvinne	ja	nei	104	74	mann	ja	ja
76	26	kvinne	nei	nei	105	18	mann	nei	nei
77	74	mann	ja	ja	106	65	mann	ja	ja
78	26	mann	ja	nei	107	29	mann	ja	nei
79	27	kvinne	nei	nei	108	69	mann	ja	ja
80	13	mann	ja	nei	109	18	kvinne	ja	nei
81	18	mann	nei	nei	110	52	kvinne	ja	ja
82	47	mann	ja	ja	111	31	kvinne	nei	nei
83	72	kvinne	ja	ja	112	52	kvinne	nei	nei
84	10	mann	nei	nei	113	28	mann	nei	nei
85	44	kvinne	nei	nei	114	0	kvinne	nei	nei
86	60	mann	ja	ja	115	66	kvinne	ja	ja
87	0	kvinne	ja	nei	116	80	kvinne	ja	ja

## Prøve 117- 176

Prøve	Alder	Kjønn	Innlagt	Kreft	Prøve	Alder	Kjønn	Innlagt	Kreft
117	7	mann	ja	nei	147	1	mann	ja	nei
118	63	kvinne	nei	nei	148	63	mann	ja	ja
119	1	mann	ja	nei	149	17	kvinne	ja	nei
120	61	kvinne	ja	ja	150	66	mann	ja	ja
121	4	mann	ja	nei	151	Ekskludert			
122	34	kvinne	ja	nei	152	82	mann	ja	nei
123	60	mann	ja	ja	153	57	mann	ja	ja
124	59	mann	ja	ja	154	62	mann	ja	ja
125	9	kvinne	nei	nei	155	76	mann	ja	ja
126	38	kvinne	ja	ja	156	7	kvinne	ja	nei
127	19	kvinne	ja	nei	157	48	kvinne	nei	nei
128	19	kvinne	nei	nei	158	37	mann	ja	ja
129	20	kvinne	ja	nei	159	37	mann	ja	ja
130	17	kvinne	ja	nei	160	6	mann	ja	nei
131	74	mann	ja	ja	161	37	mann	ja	nei
132	26	mann	ja	ja	162	76	kvinne	ja	ja
133	31	mann	ja	nei	163	0	mann	ja	nei
134	65	kvinne	ja	ja	164	26	kvinne	ja	nei
135	4	mann	ja	nei	165	49	mann	ja	nei
136	19	kvinne	nei	nei	166	11	mann	ja	nei
137	23	kvinne	ja	nei	167	37	kvinne	ja	nei
138	20	kvinne	ja	nei	168	25	kvinne	ja	nei
139	24	kvinne	ja	nei	169	32	mann	ja	ja
140	19	mann	ja	nei	170	26	kvinne	ja	nei
141	64	mann	ja	ja	171	15	kvinne	ja	nei
142	26	kvinne	ja	nei	172	12	kvinne	nei	nei
143	45	kvinne	ja	ja	173	39	mann	nei	nei
144	74	mann	ja	ja	174	28	kvinne	ja	nei
145	17	kvinne	nei	nei	175	15	kvinne	ja	nei
146	77	mann	ja	ja	176	30	kvinne	nei	nei

**Prøve 177- 229**

Prøve	Alder	Kjønn	Innlagt	Kreft	Prøve	Alder	Kjønn	Innlagt	Kreft
177	Ekskludert				205	22	kvinne	nei	nei
178	20	kvinne	ja	nei	206	21	kvinne	ja	nei
179	66	kvinne	ja	nei	207	69	mann	ja	ja
180	45	kvinne	ja	ja	208	32	kvinne	nei	nei
181	60	mann	ja	ja	209	38	kvinne	ja	ja
182	7	kvinne	ja	nei	210	33	mann	ja	nei
183	66	kvinne	ja	ja	211	76	kvinne	ja	ja
184	52	kvinne	ja	ja	212	1	mann	ja	nei
185	72	mann	ja	ja	213	45	mann	nei	nei
186	3	mann	ja	nei	214	15	kvinne	ja	nei
187	15	kvinne	ja	nei	215	91	kvinne	ja	ja
188	59	mann	ja	ja	216	15	mann	ja	nei
189	75	mann	ja	ja	217	2	kvinne	ja	nei
190	72	mann	ja	ja	218	2	mann	ja	nei
191	75	mann	ja	ja	219	1	mann	nei	nei
192	Ekskludert				220	27	mann	ja	nei
193	79	mann	ja	ja	221	68	mann	nei	nei
194	3	mann	ja	nei	222	8	mann	nei	nei
195	65	mann	ja	ja	223	74	mann	nei	nei
196	0	mann	nei	nei	224	63	mann	ja	ja
197	5	kvinne	ja	nei	225	2	mann	ja	nei
198	78	kvinne	ja	ja	226	27	kvinne	ja	nei
199	63	mann	ja	ja	227	59	mann	ja	ja
200	18	kvinne	nei	nei	228	35	kvinne	nei	nei
201	57	kvinne	ja	ja	229	71	kvinne	ja	nei
202	23	kvinne	ja	nei					
203	7	kvinne	ja	nei					
204	74	mann	ja	ja					



Vedlegg 13: Positiv og negativ kontroll for PCR av frisk kontrollgruppe

	Adenov.	F. necr.	F. nucl.	S. pyog.	F. mass.	A. hem.
Positiv kontroll	31,022	31,167	29,595	31,164	-	26,569
Negativ kontroll	0	0	0	0	0	0

Vedlegg 14: PCR- resultat av frisk kontrollgruppe

Prøve	F. nucl.	Adenov.	S. pyog.	F. necr.	A. haem.	F. mass.
1	24,501	0	0	0	0	0
2	28,307	0	0	39,399	0	0
3	23,853	0	0	0	0	0
4	28,243	0	0	0	0	0
5	27,164	0	0	0	0	0
6	28,359	0	0	0	0	0
7	22,257	0	0	0	0	0
8	25,605	0	0	0	0	0
9	24,408	0	0	0	0	37,411
10	20,791	0	0	0	0	0
11	21,626	0	0	0	0	31,943
12	25,308	0	0	0	0	29,001
13	24,84	0	0	0	0	0
14	28,997	0	0	0	0	0
15	21,719	0	0	0	0	0
16	26,186	0	0	0	0	0
17	22,207	0	0	0	42,166	35,645
18	25,969	0	0	0	0	0
19	19,518	0	0	0	0	0
20	20,135	0	0	0	0	0

## Vedlegg 15: R-skript for Venn-diagram

```
# Venn-diagram

install.packages("VennDiagram")
library(VennDiagram)

# hjelpefunksjon

display_venn <- function(x, ...){
  library(VennDiagram)
  grid.newpage()
  venn_object <- venn.diagram(x, filename = NULL, ...)
  grid.draw(venn_object)
}

# liste

x <-
list('Adenovirus'=c(1,15,32,35,41,66,73,74,92,114,117,161,182,
196,210,217,225), 'Fusobacterium
massiliense'=c(1,12,19,29,31,35,36,38,41,42,44,46,52,55,61,79,
80,85,103,106,117,119,122,135,136,139,147,156,161,171,172,175,
196,203,206,212,218,220,225), 'Fusobacterium
necrophorum'=c(57,70,79,81,93,105,109,113,117,120,121,127,128,
161,166,168,178,187,193,203,206,214,216), 'Streptococcus
pyogenes'=c(3,13,17,23,24,26,29,31,35,36,37,38,41,42,46,50,52,
54,56,62,84,96,97,113,119,121,122,128,129,130,133,135,137,138,
140,142,149,156,160,164,167,172,182,186,196,197,202,212,218,22
0,222,225,228))

# farger

display_venn(
  x,
  category.names = c("Adenovirus" , "Fusobacterium
massiliense" , "Fusobacterium necrophorum", "Streptococcus
pyogenes"),
  fill = c("#999999", "#E69F00", "#56B4E9", "#009E73")
)

# vis Venn-diagram

display_venn(x)
```