



# Enterovirus genotyping

Masteroppgave

Marie Sekse

Masterprogram i helsevitenskap - Bioingeniør

Institutt for global helse og samfunnsmedisin

Det medisinske fakultet

UNIVERSITETET I BERGEN

Vår 2020

## Forord

Prosjektet ble gjennomført på molekylærbiologisk laboratorium ved Mikrobiologisk avdeling ved Haukeland universitetssjukehus. Jeg er svært takknemlig for at jeg fikk gjennomføre mastergradsprosjektet ved avdelingen. En stor takk rettes til ledelsen ved avdelingen for å være åpne for et studentsamarbeid og dermed gjøre dette mulig.

Tusen takk til seksjonsoverlege Gro Njølstad som har vært min hovedveileder og som hadde ideen til studien. Jeg setter stor pris på oppfølgingen jeg har fått, og hvordan hun har veiledet, inspirert og motivert meg gjennom hele prosjektet. Jeg vil også gi en stor takk til biveileder Øyvind Kommedal (seksjonsoverlege og førsteamanuensis) for gode diskusjoner og råd underveis i arbeidet. Jeg føler meg svært heldig som har hatt så flinke og engasjerte veiledere.

Ved prosjektets oppstart hadde jeg svært lite erfaring med molekylærbiologiske metoder. Spesialbioingeniør Birgitte Bargård Madsen fortjener en stor takk for å ha gitt meg en god og grundig opplæring i de ulike analysemetodene. Jeg ønsker også å takke bioingeniørene ved molekylærbiologisk seksjon for å være svært hjelpsomme når jeg har støtt på utfordringer på laboratoriet underveis i arbeidet. Det har vært inspirerende å arbeide med så flinke folk rundt meg.

Da koronapandemien førte til stengte lesesaler måtte store deler av masteroppgaven skrives hjemme. Jeg ønsker å takke mine foreldre Margareth og Tor Håvard for at jeg har fått bo hos dem i Tananger så mye jeg ville for å få ro til å arbeide med oppgaven. Jeg vil også takke min samboer Stian for at han har støttet og motivert meg hele veien og vært forståelsesfull for at jeg har vært så mye i Tananger.

Bergen, 11. mai 2020

Marie Sekse

# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>2</b>
<b>Innholdsfortegnelse</b> .....	<b>3</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>6</b>
<b>Forkortelser</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
1.1 Bakgrunn .....	1
1.2 Revers transkriptase polymerase kjedereaksjon (RT-PCR) .....	4
1.3 DNA-sekvensering ved Sanger-metoden .....	6
1.4 Primere .....	8
1.5 Hensikt og problemstilling .....	9
1.5.1 Hensikt .....	9
1.5.2 Problemstillinger .....	9
<b>2. Materiale og metode</b> .....	<b>10</b>
2.1 Valg av forskningsdesign og metode .....	10
2.2 Utvalg .....	10
2.3 Innsamling og analyse av datamaterialet .....	11
2.3.1 Ekstraksjon .....	12
2.3.2 RT-PCR .....	12
2.3.3 Nested PCR .....	14
2.3.4 Rens av PCR-produkt med ExoSAP-IT .....	14
2.3.5 Sanger-sekvensering .....	15
2.3.6 Tolkning av sekvenser .....	16
2.3.7 Sanntids-PCR av Ribonuklease P-genet .....	16
2.3.8 Statistiske beregninger .....	16
2.4 Valg av primere og instrument .....	17
2.4.1 Utprøving av nye primere til enterovirus A71 .....	19
2.5 Etske hensyn .....	20

<b>3. Resultat</b> .....	<b>21</b>
3.1 Valg av primere og instrument.....	21
3.2 Typing i pasientprøver.....	22
3.2.1 Prøver der virus ikke kunne typebestemmes.....	23
3.2.2 Flere prøver fra samme pasient .....	24
3.2.3 Sammenheng mellom genotype og type prøvemateriale.....	26
3.2.4 Enterovirus-positive prøver fra 2019 .....	26
3.3 Mulige påvirkninger av metodens sensitivitet .....	28
3.3.1 CT-verdi .....	28
3.3.2 Type prøvemateriale .....	29
3.3.3 Analyse av Ribonuklease P (RNase P).....	31
3.4 SLP-panel.....	33
3.5 Utprøving av nye primere som matchet enterovirus A71 .....	36
3.5.1 Typebestemmelse av enterovirus A71 med nye primere .....	37
3.5.2 Typing av SLP-typepanel med nye primere .....	38
<b>4. Diskusjon</b> .....	<b>39</b>
4.1 Valg av primere og instrument.....	39
4.2 Sekvenser og BLAST-søk .....	40
4.3 Metodens sensitivitet og mulige påvirkninger .....	42
4.3.1 CT-verdi ved enterovirus-PCR.....	43
4.3.2 Type prøvemateriale .....	44
4.3.3 Innhold av RNase P i prøvene.....	45
4.3.4 Sensitivitet ved deteksjon av ulike genotyper.....	46
4.4 Genotyper detektert.....	47
4.4.1 Genotyper og klinikk .....	48
4.4.2 Enterovirus-positive prøver fra 2019 .....	49
4.5 Utprøving av nye primere med hensyn til enterovirus A71 .....	50
4.5.1 Typebestemmelse av prøver ved modifisert metode .....	51
4.6 Metodediskusjon .....	53
<b>5. Konklusjon</b> .....	<b>55</b>
<b>6. Referanser</b> .....	<b>56</b>

## Sammendrag

En molekylærbiologisk metode for typebestemmelse av enterovirus er under utprøving og skal etter hvert etableres på Mikrobiologisk avdeling ved Haukeland universitetssjukehus. Før etablering av metoden skal den være i stand til å identifisere de klinisk relevante enterovirus genotypene. Prøver som hadde testet positivt for enterovirus ved laboratoriet fra midten av 2018 til Januar 2020 ble forsøkt genotypet ved metoden. Metoden var en to-trinns revers transkriptase polymerase kjedereaksjon og en nested polymerase kjedereaksjon, etterfulgt av Sanger-sekvensering. Metodens sensitivitet og mulige påvirkninger på sensitiviteten ble undersøkt. Ved å analysere alle enterovirus-positive prøver fra 2019 fikk man i tillegg en periodisk oversikt.

Av 120 prøver ble 99 typet (82,5%), fordelt på 15 ulike genotyper. Mulige påvirkninger på metodens sensitivitet ble undersøkt, og konsentrasjon av enterovirus i prøvene viste seg å være den viktigste. En korrelasjonstest viste en signifikant sammenheng mellom virusinnhold og mulighet for typing, hvor viruset i prøvene med lav konsentrasjon av enterovirus var vanskeligst å type.

Av de 77 prøvene fra 2019 ble 55 typebestemt (77,5%), og coxsackievirus A6 ble detektert i 52,1% grunnet et utbrudd av hånd-, fot- og munnsyke. Coxsackievirus A6 ble detektert i flest sår- og blemmesekret, men også i spinalvæske i ett tilfelle.

Problemer med deteksjon av enterovirus A71 førte til at metoden ble endret mot slutten av prosjektet. Nye primere ble utprøvd, og den modifiserte metoden ga langt bedre resultater ved deteksjon av denne genotypen. Vi fikk ikke anledning til å prøve ut de modifiserte primerne fullstendig, slik at videre utprøving er nødvendig.

Nøkkelord: Enterovirus, RT-PCR, Sanger-sekvensering, genotyping, metodeutvikling

## Abstract

A molecular method for enterovirus typing is under developing and will eventually be established at the microbiological laboratory at Haukeland University Hospital. Before establishment of the method it must be able to identify all the clinically relevant genotypes of enterovirus. Enterovirus positive samples tested at the laboratory from mid 2018 to January 2020 were analyzed in the project. The method used was a two-step reverse transcription polymerase chain reaction and a nested polymerase chain reaction followed by Sanger-sequencing. The sensitivity of the method and possible impacts on the sensitivity were investigated. Analyzing all enterovirus positive samples from 2019 gave a periodic overview as well.

Of 120 samples 99 were typed (82,5%), divided into 15 different genotypes. Possible impacts on the sensitivity of the method were investigated, and virus concentration turned out to be the most important. A correlation test showed a significant relationship between the concentration of enterovirus in the samples and the possibility for typing. The samples containing the lowest concentration of the virus were also the hardest to type.

Of the 77 samples from 2019, 55 were typed (77,5%), and coxsackievirus A6 was detected in 52,1% due to an outbreak of hand- foot- and mouth disease. Coxsackievirus A6 was mostly detected in swabs from wounds and vesicles, but also in cerebrospinal fluid in one case.

Problems detecting enterovirus A71 lead to a modification of the method by the end of the project. New primers were designed, and the modified method gave much better results detecting the genotype. We did not get the chance to completely test the modified primers, which means further testing is necessary.

Key words: Enterovirus, RT-PCR, Sanger-sequencing, genotyping, method development

## Forkortelser

BLAST – basic local assignment search tool

cDNA – complementary DNA (komplementært DNA).

CT-verdi – threshold cycle (terskelverdi). Antall sykluser i en PCR-reaksjon som må til for at avlest signal når terskelverdien

DNA – deoksyribonukleinsyre

HUS – Haukeland universitetssjukehus

LNA – locked nucleic acid

MIA – Mikrobiologisk avdeling

NCBI – National Center for Biotechnology Information

PCR – polymerase chain reaction (polymerase kjedereaksjon)

RNA – ribonukleinsyre

RT – revers transkriptase

SLP – sammenlignende laboratorieprøving

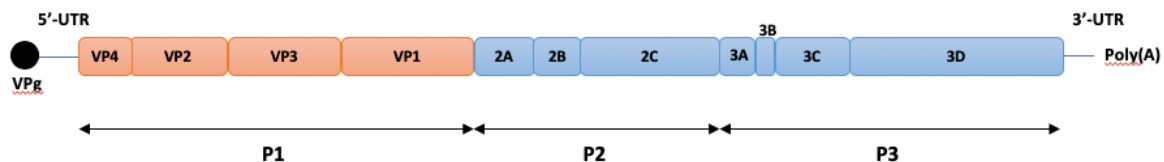
VP – viral protein (virusprotein)

# 1. Introduksjon

## 1.1 Bakgrunn

Enterovirus er en gruppe virus tilhørende familien picornaviridae. Viruset infiserer og formerer seg i epitelceller i tarmtraktus, men vanligvis uten å fremkalle gastrointestinale symptomer. Enterovirus kan spre seg til andre organer, og selv om en infeksjon vanligvis gir et mildt sykdomsbilde, kan det i enkelte tilfeller føre til alvorlig sykdom hos barn og voksne (Folkehelseinstituttet, 2015). Enterovirusfamilien er svært heterogen både med tanke på klinikk og genetikk. Genomet består av et omlag 7400-7500 nukleotider langt enkelttrådet RNA-molekyl (figur 1). RNA-tråden koder for et polyprotein bestående av strukturelle og ikke-strukturelle proteiner. P1-regionen er den strukturelle delen av genomet og koder for de fire kapsidproteinene viralt protein 1-4 (VP1-4) (Nasri et al., 2007).

Humane enterovirus ble frem til 1970 inndelt i fire hovedgrupper etter patogenese; poliovirus, coxsackievirus A eller B og echovirus. Videre ble hver hovedgruppe delt inn i undergrupper med fortløpende nummerering etter hvert som nye virus ble beskrevet. Fra 1970 har i stedet alle nye humane enterovirus blitt nummerert fortløpende fra 68 og oppover (EV68, EV69, osv.), og disse kalles i dag sero- eller genotyper. Enterovirus deles nå inn i 12 ulike arter, enterovirus A-J (bortsett fra I) og rhinovirus A-C (ICTV, 2019). Hver art består av nært beslektede genotyper. Dagens inndeling har ingen sammenheng med den tidligere, ettersom den er basert på aminosyrehomologi i P1-regionen, ikke patogenese som før. Virusstammer innenfor samme genotype skal ha >75% nukleinsyrehomologi innenfor VP1-genet. Nukleinsyrehomologi på mellom 70% og 75% er en gråsoner, mens under 70% tyder på funn av en ny genotype (Oberste et al., 2003). Innenfor samme art varierer sekvenslikeheten fra 48,9% til 73,2% mellom de ulike genotypene (Oberste et al., 1999).



Figur 1: Organisering av enterovirus-genomet. Genomet er et 7400-7500 nukleotider langt RNA-molekyl, delt opp i strukturelle (oransje) og ikke-strukturelle (blå) regioner. P1-regionen er den strukturelle regionen og koder for de fire kapsidproteinene VP1-4. VP1-genet har vist seg å være best egnet for genotyping av viruset.



Ofte er en infeksjon med enterovirus asymptomatisk, men de kan forårsake en rekke forskjellige sykdomsbilder hvor ikke-spesifikk febersykdom er det vanligste. Andre mindre alvorlige manifestasjoner er hånd- fot- og munnsyke, milde luftveisinfeksjoner, øyebetennelser og muskelsmerter. I mer alvorlige tilfeller kan viruset forårsake meningitt (hjernehinnebetennelse), poliomyelitt (ved poliovirus) eller polio-liknende symptomer, myokarditt, perikarditt og neonatal infeksjon med sepsis-liknende infeksjon hos nyfødte (Folkehelseinstituttet, 2015).

Sammenhenger mellom genotyper og type klinikk er diskutert i tidligere studier, også i studier hvor alle enterovirus-positive prøver fra et gitt tidsrom er blitt typebestemt. Selv om de fleste genotyper kan gi svært varierende sykdomsbilder hos ulike pasienter, er det funnet noen sammenhenger. For eksempel viser studier at enterovirus gruppe B oftere blir funnet hos pasienter med enterovirus-meningitt enn enterovirus gruppe A (de Crom et al., 2016, Dumaidi and Al-Jawabreh, 2017, B'Krong et al., 2018). Enterovirus D68 har ved flere anledninger forårsaket utbrudd av luftveisinfeksjoner, og i studier assosieres denne genotypen nesten utelukkende med luftveisinfeksjoner (Wollants et al., 2019, Van Leer-Buter et al., 2016, Wang et al., 2019). Utbrudd av hånd- fot- og munnsyke er som oftest forårsaket av enterovirus genotyper i gruppe A, spesielt genotypene enterovirus A71 og coxsackievirus A16, men også coxsackievirus A6 og coxsackievirus A10 (Xu et al., 2013, WHO, 2011).

Enterovirus kan påvises i avføring, spinalvæske og i sekret fra luftveier og blemmer. Hvert år diagnostiseres 500-1000 tilfeller av enterovirus i Norge, men det er bare noen få av disse som blir typet (Folkehelseinstituttet, 2015). Ved noen tilfeller av infeksjon er det ønskelig å typebestemme viruset så fort som mulig, for eksempel ved meningitt. Typing av viruset vil også kunne utelukke at infeksjonen skyldes poliovirus, som vil angripe de motoriske cellene i ryggmargen og føre til lammelser (Gjerstad and Myrvang, 2018). Overvåking av slappe lammelser hos barn under 15 år er en viktig del av den norske beredskapen mot polio og er samtidig et av Norges bidrag til WHO's globale overvåking av poliomyelitt. I tillegg vil typing av viruset gi verdifull epidemiologisk informasjon som er nyttig for å overvåke og kontrollere utbrudd.

Gullstandarden for typebestemmelse av enterovirus har tidligere vært en metode basert på dyrkning av viruset fra avføringsprøver eller halssekret i cellekultur hvor immunfluorescenssteknikk benyttes til identifisering av dyrkede virus. Ettersom enterovirus formeres i tarmtraktus, har feces ofte et høyt innhold av viruset og egner seg derfor godt til dyrkning. Metoden har derimot flere ulemper. Den er tidkrevende og tar flere dager. Dessuten kan kun et utvalg av virustypene types ettersom ikke alle enterovirustypene vokser like lett i cellekultur (Oberste et al., 2003). Virusaggregering og innhold av flere forskjellige typer virus i prøvematerialet er også utfordringer med den tradisjonelle metoden (Oberste et al., 2000). En inneliggende pasient har heller ikke alltid mulighet til å avgi avføringsprøve, grunnet for eksempel lite inntak av mat eller kort sykehusopphold.

Revers transkriptase polymerase kjedereaksjon (RT-PCR) brukes i rutinediagnostikken til å raskt påvise enterovirus i ulike prøvematerialer. Enterovirus-meningitt blir for eksempel diagnostisert ved at det utføres en spinalpunksjon, og spinalvæsken blir undersøkt for virus med en RT-PCR. Selv om RT-PCR i dag er gullstandard for deteksjon av viruset, gir den ikke svar på hvilken genotype av viruset prøven inneholder. RT-PCR etterfulgt av sekvensering av det amplifiserte PCR-produktet representerer en dyrkningsuavhengig metode for typing av enterovirus (Oberste et al., 2000). Man vil da kunne utføre typing direkte fra det primære prøvematerialet i stedet for å måtte be om egen avførings- eller halsprøve til dyrkning. I tillegg vil de fleste prøvene kunne types, da man ved å kun gjøre typing fra avførings- eller halsprøve, kan risikere å gå glipp av mange. Metoden vil kunne brukes til å analysere og typebestemme virus både fra feces, luftveissekreter, sår- og blemmesekreter og spinalvæsker som har testet positivt for enterovirus. På grunn av variabiliteten til enterovirus og at RT-PCR beregnet på typing nødvendigvis ikke kan rette seg mot et hyperkonservert område, er det utfordrende å lage en god metode som fanger opp alle typer enterovirus. VP1 genet er et område i P1 regionen i virusets RNA og koder for et kapsidprotein. Området har vist seg å være egnet for genotyping (Oberste et al., 1999). Likevel har PCR-metodene som er beskrevet lavere sensitivitet fra kliniske materialer enn det man skulle ønske.

En ny PCR-basert metode for typebestemmelse er under utprøving ved Mikrobiologisk avdeling på Haukeland universitetssjukehus. Metoden går ut på at etter at prøven har testet positivt for enterovirus ved RT-PCR, analyseres prøven med nested PCR etterfulgt av deoksyribonukleinsyre (DNA)-sekvensering av VP1-genet. DNA-sekvensene sammenlignes så mot en gen-database for identifisering av viruset. Målet er at denne skal tas i bruk i diagnostikken, slik at så mange enterovirus-positive prøver som mulig blir typebestemt.

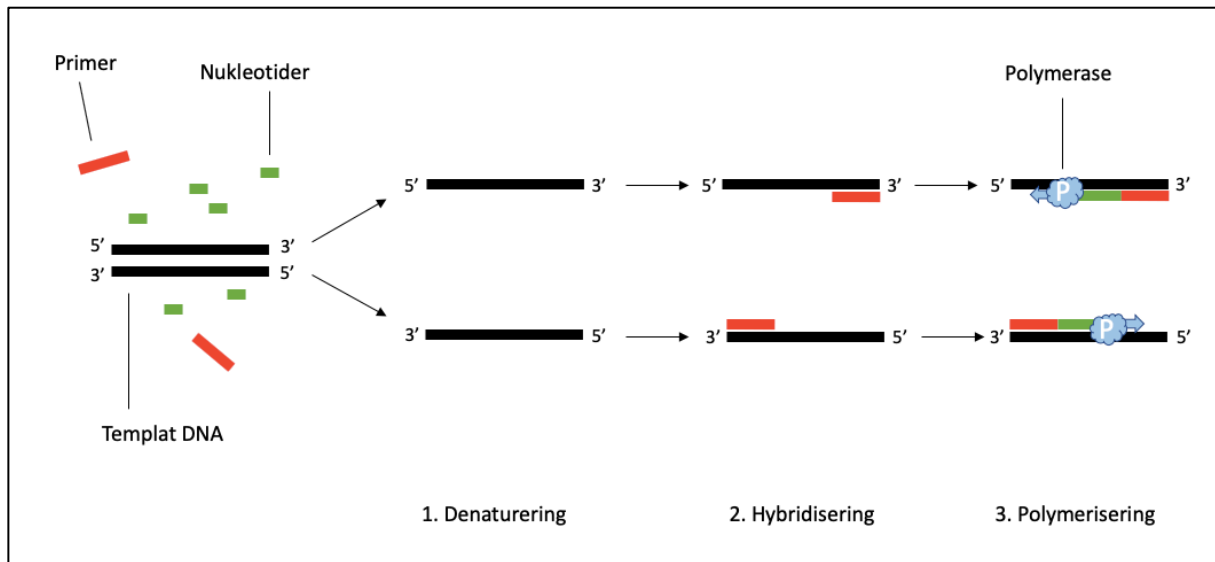
Hordaland har hatt flere utbrudd av enterovirus de siste årene. Både i 2017 og 2018 var det nasjonale utbrudd av enterovirus som i flere tilfeller infiserte sentralnervesystemet hos de smittede (Folkehelseinstituttet, 2018). Utbrudd av hånd- fot- og munnsyke forårsaket av enterovirus er ikke uvanlig hver sommer og høst (Folkehelseinstituttet, 2010). Alle virus-positive prøver som analyseres ved Mikrobiologisk avdeling lagres i et arkiv, både spinalvæsker, feces og sår- og blemmesekret og luftveissekret. Noen av disse er typebestemt tidligere, mens mange gjenstår. Å typebestemme disse ved hjelp av den nye, PCR-baserte metoden, vil gi informasjon om hvor sensitiv metoden er og eventuelt hvordan den kan forbedres. Typebestemmelse av enterovirus i forbindelse med tidligere studier har også vist seg å gi verdifull epidemiologisk informasjon (Van Leer-Buter et al., 2016, Papadakis et al., 2014, Wollants et al., 2019).

## 1.2 Revers transkriptase polymerase kjedereaksjon (RT-PCR)

PCR er en rask og sensitiv metode som går ut på å detektere en ønsket nukleotidsekvens ved å amplifisere opp millioner av kopier av den. For at dette skal skje må prøven inneholde intakt DNA fra mikroben som skal analyseres, siden dette brukes som templat i reaksjonen. Til en PCR-reaksjon trengs det primere, som er 18-30 baser lange oligonukleotider som er laget for å passe målsekvensen. For å kunne detektere en mikrobe ved PCR må man derfor vite hvilken mikrobe man leter etter. Før reaksjonen kan finne sted, trengs også termostabil DNA-polymerase, frie nukleotider og buffere (Mülhardt, 2007, s.65). Ved sanntids-PCR tilsettes i tillegg en fluoriserende reporter for å kunne følge med på reaksjonen i sanntid.

PCR-reaksjonen består av sykluser på tre trinn; denaturering, hybridisering (annealing) og polymerisering (figur 2). Temperaturer og varighet ved de ulike trinnene programmeres etter ønske. Ved denaturering varmes løsningen opp til 95°C. I dette trinnet brytes hydrogenbindingene, og dobbeltrådet DNA denatureres til enkelttrådet. Ved hybridisering senkes temperaturen til 55 °C, og primerne hybridiseres med den komplementære målsekvensen. Videre økes temperaturen til 72 °C. Dette er optimal arbeidstemperatur for polymerasen, og det skjer en polymerisering. Enzymet DNA-polymerase syntetiserer en ny DNA-tråd ved å bruke de tilsatte nukleotidene til å forlenge primerne som allerede er bundet til målsekvensen. For hver slik syklus doubles antall amplikon (produkt/templat DNA), og etter hver syklus starter en ny ved at de nysyntetiserte DNA-trådene skilles fra templatet (Mülhardt, 2007, s. 65-66). Ved sanntids-PCR måles mengde fluorescens etter hver syklus

som et mål på mengde PCR-produkt. CT-verdi er hvor mange sykluser som må skje før instrumentet registrerer prøven som positiv for målsekvensen.



Figur 2: En syklus i PCR-reaksjonen består av tre trinn: (1) Dobbeltrådet DNA denatureres til enkeltrådet. (2) Primere fester seg til komplementær DNA-tråd ved hybridisering. (3) Polymerasen forlenger primerne ved å feste komplementære nukleotider til DNA-tråden, og det syntetiseres en ny DNA-tråd. Antall amplikon dobles dermed for hver syklus, man får dermed en eksponentiell vekst i antall amplikon.

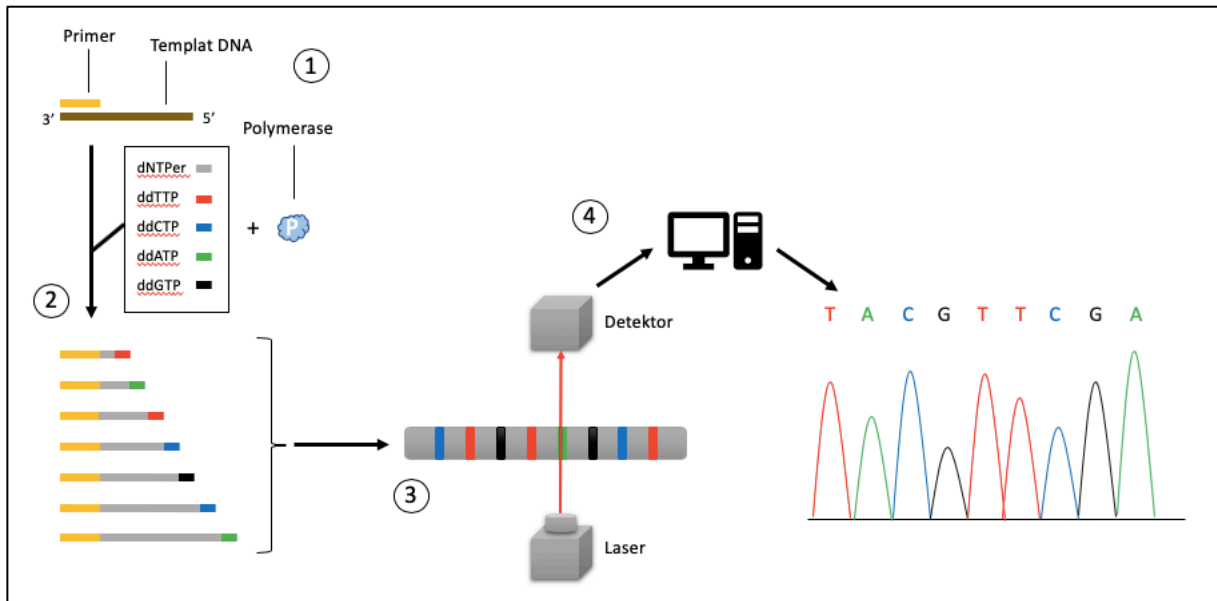
Mange virus har ribonukleinsyre (RNA) som arvemateriale. For at disse skal kunne påvises ved PCR må man først transkribere viralt RNA til DNA. Revers transkriptase-PCR er en to trinns reaksjon hvor RNA er starttemplatet i stedet for DNA. I det første trinnet syntetiseres et komplementært DNA (cDNA). Dette skjer ved at enzymet revers transkriptase bruker RNA som templat og syntetiserer en komplementær, singeltrådet DNA-tråd. cDNA brukes som templat ved sanntids-PCR i trinn to.

Nested PCR er en modifikasjon av konvensjonell PCR hvor prøven går gjennom to etterfølgende PCR-reaksjoner med to ulike primersett. I den første reaksjonen brukes primere for å amplifisere et større område som inkluderer området som skal kopieres i den etterfølgende PCR-en. Produktet fra første reaksjon brukes som templat i andre reaksjon. Her benyttes et andre primersett som ligger innenfor det første, for å amplifisere et mindre område av RNA-tråden (Mülhardt, 2007, s. 76). Det å bruke to primersett på denne måten kan øke både sensitiviteten og spesifisiteten i komplekse PCR-reaksjoner. Den første PCR-en vil øke

den relative konsentrasjonen av det området av viruset man ønsker å kopiere i den andre PCR-en og dermed redusere effekten av at primerne kan binde seg uspesifikt til humant DNA, som det ofte vil finnes rikelig av i prøvene.

### 1.3 DNA-sekvensering ved Sanger-metoden

DNA-sekvensering er en prosess som brukes for å kunne lese rekkefølgen på baseparene i en DNA-sekvens. I 1977 utviklet Frederick Sanger og hans kollegaer teknikken dideoksysekvensering eller Sanger-sekvensering, en metode for DNA-sekvensering som var langt mer effektiv enn de allerede eksisterende (Sanger et al., 1977). Prinsippet bak metoden er illustrert i figur 3. Til metoden trengs et DNA-polymerase enzym, en primer som passer til målsekvensen, de fire deoksynukleotidene (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) med samlenavnet dNTP og DNA-templat som skal sekvenseres. I tillegg tilsettes dideoksyvarianter av de fire nukleotidene (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), markert med hver sin fluorescerende farge. Dideoksynukleotidene mangler også OH-gruppe i posisjon 3', og stanser dermed reaksjonen. I reaksjonsrøret tilsettes DNA-templat, DNA-polymerase og DNA-nukleotider. De fire fluorescerende nukleotidene tilsettes i lavere konsentrasjon enn de vanlige nukleotidene. Prinsippet for metoden starter med at de doble DNA-trådene denatureres til enkelttrådet DNA ved at temperaturen økes. Temperaturen senkes deretter, og primeren bindes til komplementær DNA-tråd. Temperaturen økes igjen, og polymerasen syntetiserer en ny tråd av de frie nukleotidene ved å forlenge primeren. Dette fortsetter til polymerasen kommer til et dideoksynukleotid som stanser reaksjonen. Produkt etter reaksjonen er dermed fragmenter av ulik lengde med et fluorescerende dideoksynukleotid i 3'-enden (Schoales, 2015).



Figur 3: (1) Templat DNA, primere, DNA-polymerase, nukleotider og fluorescensmerkede nukleotider blandes i et PCR-rør. (2) Polymerasen forlenger primerne ved å feste nukleotider komplementære til templat-DNA, og DNA-fragmenter av ulike lengde syntetiseres. (3) De syntetiserte fragmentene separeres etter størrelse ved kapillærelektroforese. (4) Den fluorescerende siste basen i hvert fragment detekteres ved hjelp av en laser, og programvaren omformer informasjonen til et kromatogram.

Fragmentene separeres ved kapillærelektroforese. Molekylene injiseres i en glasskapillær med gel. Fragmentene sorteres så etter størrelse, da de korte fragmentene går først igjennom kapillæren. Dette skjer ved hjelp av elektrisk strøm, og de negativt ladde DNA-molekylene trekkes mot en positiv elektrode. Ved enden av kapillæren eksiterer en laser et lys som treffer de fluorescensmerkede DNA-fragmentene i det de passerer laseren. Når de fluorescensmerkede DNA-fragmentene bestråles av laseren, emitteres et fluorescerende lys ved en bestemt bølgelengde, og dette detekteres av en sensor (Schoales, 2015). Programvaren omformer så denne informasjonen til lett leselige DNA-sekvenser.

#### 1.4 Primere

Den genetiske variasjonen mellom de ulike enterovirus genotypene er stor, noe som gjør det utfordrende å designe primere som fanger opp alle typer. I tillegg finnes det variasjon i nukleinsyresekvensene mellom enterovirus av samme genotype (Oberste et al., 1999). For fange opp alle enterovirus brukes derfor degenererte primere, som er primere som inneholder variable baser i en eller flere posisjoner (Oberste et al., 2003). Ved bruk av degenererte primere er kryssreaktivitet en utfordring, som vil si at primerne også vil kunne binde til andre nukleinsyrer i prøven enn den ønskede målsekvensen. De ulike typene prøvematerialer inneholder ulik mengde av bakterier, virus og humant DNA, noe som kan påvirke muligheten for å kunne type enterovirus. Å undersøke hvor vidt metoden fungerte på ulike prøvematerialer var derfor aktuelt. Spinalvæske er det mest cellefattige prøvematerialet, men inneholder også ofte lav konsentrasjon av enterovirus. Andre prøvematerialer som sekret og feces kan ha høyere innhold av bakterier, andre virus og humant DNA, men disse inneholder ofte også høyere konsentrasjon av enterovirus enn spinalvæske.

## 1.5 Hensikt og problemstilling

### 1.5.1 Hensikt

- Ta i bruk en ny metode for å genotype enterovirus-positive pasientprøver. Optimalisere metoden og undersøke om den kan overføres til et nyere instrument, da originalinstrumentet skal avvikles.
- Få svar på hvor sensitiv metoden er og om faktorer som CT-verdi, konsentrasjon av humant DNA i prøven og type prøvemateriale påvirker sensitiviteten. Avdekke eventuelle svakheter ved metoden.
- Studere om genotype har sammenheng med hvilken type prøvemateriale som er innhentet hos pasientene. Få oversikt over hvilke typer enterovirus som har sirkulert og som det eventuelt har vært utbrudd av i 2019.

### 1.5.2 Problemstillinger

Ved å benytte en ny metode for genotyping av enterovirus, kan enterovirus-positive prøver fra de to siste årene typebestemmes? Hvor god er metodens sensitivitet og hva påvirker den?

Hvilke enterovirus ble detektert på Haukeland Universitetssjukehus i 2019?



## 2. Materiale og metode

### 2.1 Valg av forskningsdesign og metode

Ingen av variablene som skulle studeres var manipulerbare, og derfor ble det valgt et observerende design. I studien ble det typebestemt enterovirus i prøver fra pasienter som i rutinediagnostikken ved Mikrobiologisk avdeling hadde fått påvist enterovirus i spinalvæske, sår- og blemmesekret, luftveissekret eller feces. I tillegg til å vite hvilken type prøvemateriale som var innhentet hadde vi også noe informasjon om pasientenes sykdomsbilder, det vil si årsak til prøvetaking. Prøvene ble analysert som beskrevet i kapittel 3.3. Studien gav oversikt over hvilke typer av viruset som hadde sirkulert i innsamlingsperioden. Resultatene ble også brukt til å studere metodens sensitivitet, og hva som kan ha påvirket om prøvene kunne typebestemmes eller ikke. Alle pasientprøvene som hadde testet positivt på enterovirus-PCR ved Haukeland universitetssjuehus i 2019 ble forsøkt analysert slik at vi fikk en oversikt over ett fullstendig år. I tillegg ble det inkludert prøver fra 2018 og 2020.

### 2.2 Utvalg

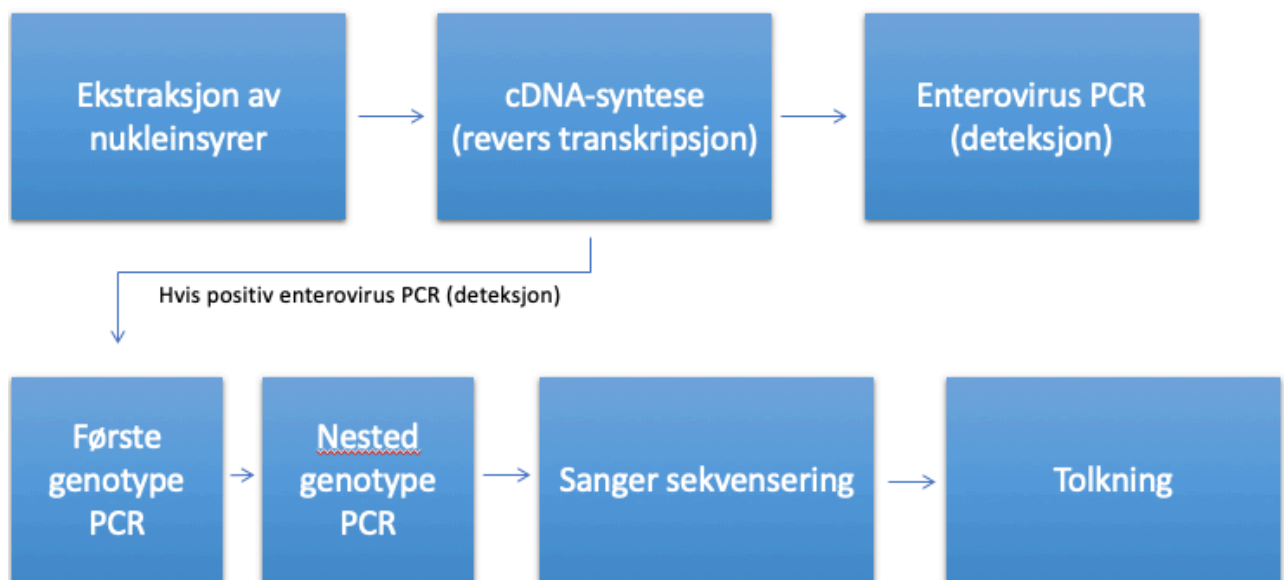
Utvalget som ble brukt i denne studien er enterovirus-positive prøver analysert på Haukeland universitetssjuehus de to siste årene. Prøvene er tidligere analysert ved rutinediagnostikk og ble plukket ut fra arkivet. Alle prøvene hadde en tilhørende CT-verdi, som sa noe om hvor mye enterovirus det var i prøvene var da de ble analysert. Utvalget bestod av spinalvæsker, feces, luftveissekret, sår- og blemmesekret. Alle 71 prøver fra 2019 som var positive for enterovirus ble analysert i studien. Det ble også analysert 46 enterovirus-positive prøver fra siste halvdel av 2018 og 3 prøver fra januar 2020. Utvalget bestod av totalt 120 pasientprøver.

Sekret, luftveisprøver og feces ble analysert fra primærprøver eller cDNA (complementary DNA, DNA som er syntetisert fra enkelttrådet RNA) og spinalvæsker fra eluat (ekstrahert DNA). Enterovirus-positive prøver som kom inn etter oppstart av prosjektet (01.09.19) ble også inkludert, og ble i de fleste tilfeller analysert fra cDNA. Identifikasjons-nummer (ID) på alle prøvene ble byttet ut med en ny studie-ID slik at pasientidentitet ikke kunne knyttes hverken til prøvene eller de kliniske opplysningene. Prøvene ble nummerert fra 1 og oppover, hvor 1 var den nyeste prøven ved oppstart. Prøver det ikke fantes materiale på i arkivet ble fjernet fra listen, og da gjenstod 63 prøver nummerert 1-96. Prøve nummer 96 tatt 29.06.18 var den eldste som ble tatt ut fra arkiv. Etter hvert som det kom inn flere positive enterovirus-prøver etter at prosjektet var i gang, ble disse tildelt tilfeldige ledige numre fra 1 og oppover.

I tillegg til pasientprøver ble det analysert tre kvalitetskontrollpaneler (SLP: sammenliknende laboratorieprøving) fra QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics). Dette er en ekstern kvalitetskontroll som laboratoriet mottar et par ganger i året, og resultater rapporteres tilbake til QCMD etter analysering. Et SLP-panel består av 8-10 prøver og skal behandles som pasientprøver. Det ble analysert et SLP-panel for enterovirus deteksjon (SLP 2019) og to for enterovirus typebestemmelse (SLP 2016 og 2019). Resultatene ble sammenlignet med fasit.

### 2.3 Innsamling og analyse av datamaterialet

Prøvematerialet var samlet inn i forbindelse med diagnostikk og behandling og oppbevart i et arkiv ved -80°C. Tilhørende informasjon som prøvedato, undersøkelsesdato, laboratorienummer og type prøvemateriale var også tilgjengelig. Prøvene ble analysert enten fra primærprøver eller cDNA, alt etter hva som var tilgjengelig. Primærprøvene gikk igjennom fem trinn, beskrevet i figur 4. I tillegg ble innhold av humant DNA i prøvene analysert ved å gjøre en sanntids-PCR av humant ribonuklease P-genet.



Figur 4: Figuren beskriver prosessen prøvene gikk igjennom. Utvalget av prøver som ble analysert i prosjektet hadde allerede testet positivt ved enterovirus-PCR (deteksjon). For de prøvene som ble analysert fra cDNA startet prosessen ved første genotype PCR.

### 2.3.1 Ekstraksjon

Ekstraksjon eller frigjøring av nukleinsyrer fra celler/viruspartikler er det første trinnet i alle molekylærgenetiske analyser. Ekstraksjonen går ut på å tilgjengeliggjøre nukleinsyrene, konservere intakt nukleinsyre og fjerne eventuelle hemmere av amplifikasjonsprosessen i neste trinn, ved hjelp av både mekaniske og enzymatiske rensetrinn (Kalland et al., 2005). Dette ble gjort på instrumentet Nuclisens EasyMag (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankrike) etter laboratoriets prosedyre. Reagensene som ble brukt i instrumentet var Easymag Extraction buffer 1, 2 og 3 og EasyMag Lysis buffer. Til egne EasyMag kassetter ble det pipetert 500µL prøvemateriale. Prøvekassetten og tilhørende EasyMag pipettespisser ble plassert i instrumentet hvor prøvene ble lysert. Etter lysering ble kassetten tilsatt 100 µL EasyMag magnetiske silicakuler i hver prøve, og instrumentets ekstraksjonsprogram ble satt i gang. Etter ekstraksjonen inneholdt kassetten 50 µL eluat fra hver prøve som ble pipetert over i nye rør. Etersom RNA er relativt ustabil og dermed har kort holdbarhet, ble det laget cDNA så snart som mulig etter ekstraksjonen. Resten av eluatet ble lagret ved -80 °C.

### 2.3.2 RT-PCR

#### *cDNA-syntese*

Enterovirus er et RNA-virus og derfor ble det utført en cDNA-syntese som det første trinnet i en RT-PCR. Eluat ble brukt som templat i reaksjonen. Ved cDNA-syntese blir RNA revers transkribert til enkelttrådet cDNA, og til dette ble Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Basel, Sveits) benyttet. En pre-RT (pre-revers transkriptase) miks og en cDNA miks ble blandet etter oppskrift fra leverandør, gjengitt i tabell 1. I PCR-rør ble det tilsatt 8 µL av pre-RT miksen og 5 µL templat før det ble inkubert ved 65 °C i 5 minutter på termosykleren Proflex PCR System. De ble så kjølt ned til 4 °C. Rørene ble så tilsatt 7 µL cDNA-miks før inkubering på termosykleren. Denne gangen ble de inkubert ved 25 °C i 10 minutter, 55 °C i 30 minutter og deretter 85 °C i 5 minutter før temperaturen ble senket til 4 °C. cDNA ble oppbevart kjølig ved 2-8°C.

Tabell 1: Ved cDNA-syntese ble Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) benyttet. Pre-RT miks og cDNA miks ble blandet etter oppskriften i tabellen, som er gjengitt fra leverandør.

Pre-RT miks		cDNA miks	
Reagens	Volum i $\mu\text{L}$ (5 prøver)	Reagens	Volum i $\mu\text{L}$ (5 prøver)
H <sub>2</sub> O, PCR-gradert	36	Transcriptor RT Reaction Buffer (5x)	22
Random hexamer	12	Deoxynucleotide mix (10 mm each)	11
		Protector RNase Inhibitor (40 U/ $\mu\text{L}$ )	2,75
		Transcriptor Reverse Transcriptase	2,75

#### Første PCR-reaksjon

Første PCR-analyse i nestingen var en sanntids-PCR på instrumentet SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, California, USA) hvor cDNA ble brukt som templat. Primere brukt i første PCR var to forlengs primere (EV-F1, EV-F2) og en revers primer (EV-R) modifisert fra Oberste et al (2003). Se tabell 2 for oversikt over primersekvensene. Prøvene ble analysert i 25  $\mu\text{L}$  reaksjonsrør. I hvert rør ble det tilsatt 12,5  $\mu\text{L}$  TB green Premix Ex Taq II (TaKaRa, Kusatsu, Japan), 2  $\mu\text{L}$  av hver av de tre primerne, 4,5  $\mu\text{L}$  PCR-gradert H<sub>2</sub>O og 2  $\mu\text{L}$  templat. PCR-programmet som ble benyttet bestod av sykluser av denaturering ved 95 °C i 10 sekunder, annealing ved 50 °C i 30 sekunder og polymerisering ved 72 °C i 25 sekunder. PCR-programmet var allerede bestemt under utprøving av metoden før prosjektets oppstart.

Fra PCR-analysene fikk prøvene en CT-verdi (Threshold Cycle) som representerer antall PCR-sykluser som måtte til før avlest signal nådde fluorosens terskelverdien. CT-verdien sier noe om hvor sterkt positiv prøven er ved PCR. Lavere CT betyr sterkere positiv og mer virus-RNA tilstede i templatet. Ettersom primerne brukt ved første PCR skal fange opp alle enterovirus, skulle i teorien CT-verdien ligge i nærheten av CT-verdien prøven hadde fått ved PCR-en som benyttes for påvisning enterovirus i rutinediagnostikken. Dette var ikke tilfellet i praksis på grunn av bruk av degenererte primere og amplifisering av et lengre amplikon som var nødvendig for genotypingen.

### 2.3.3 Nested PCR

Produktet fra første PCR ble fortynnet 1:1000 og brukt som templat for en nested PCR. Også dette trinnet ble utført på instrumentet SmartCycler. Det ble laget to amplifikasjonsmikser, ettersom prøvene ble nestet med to ulike sett med primere (A-primere og B-primere) i to ulike reaksjoner. Den som ble positiv, ble undersøkt videre med sekvensering. Ofte var begge positive, og da ble den med lavest CT-verdi ble analysert videre med sekvensering, altså den som var sterkest positiv. Ved mislykket sekvensering ble det forsøkt å sekvensere prøven med det andre primersettet. Tabell 2 inneholder en oversikt over primerne i de to primersettene.

Amplifikasjonsmiksen for nesting på A-siden for hver prøve bestod av 12,5 µL TB green Premix Ex Taq II, 1 µL primer CoxA-F1, 1 µL primer CoxA-F2, 0,5 µL primer CoxA6-F, 2 µL primer CoxA-R, 0,5 µL primer EV68/70-R og 5,5 µL PCR-gradert H<sub>2</sub>O. Ved nesting på B-siden bestod amplifikasjonsmiksen for hver prøve av 12,5 µL TB green Premix Ex Taq II, 2 µL primer CoxB/Echo-1na-F, 2 µL primer CoxB/Echo-1na-R og 6,5 µL PCR-gradert H<sub>2</sub>O.

For hver prøve ble 23 µL amplifikasjonsmiksen tilsatt 2 µL templat i et 25 µL PCR-rør. Røret ble deretter satt på PCR-instrumentet. Rørene tilsatt A-primere ble analysert på PCR-program med sykluser bestående av denaturering ved 95 °C i 10 sekunder, annealing ved 55 °C i 30 sekunder og polymerisering ved 72 °C i 25 sekunder. Rørene tilsatt B-primere ble analysert på PCR-program med sykluser bestående av denaturering ved 95 °C i 10 sekunder, annealing ved 50 °C i 30 sekunder og polymerisering ved 72 °C i 25 sekunder.

### 2.3.4 Rens av PCR-produkt med ExoSAP-IT

Etter en PCR-reaksjon inneholder PCR-produktet rester etter nukleotider og primere, som kan interferere med Sanger DNA-sekvensering. Produktet ble derfor rensset ved bruk av ExoSAP-IT (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), som fjerner kontaminantene ved hjelp av enzymene exonuklease og alkalisk fosfatase. I et PCR-rør ble 5 µL PCR-produkt og 1,5 µL ExoSAP-IT tilsatt. På termosykleren Proflex PCR System (Thermo Fischer Scientific) ble prøven inkubert ved 37 °C i 15 minutter og deretter ved 80 °C i 15 minutter.

### 2.3.5 Sanger-sekvensering

Prøven ble sekvensert med Sanger-sekvensering. Det rensede PCR-produktet ble brukt som templat. Hvert rør med rensed PCR produkt (6,5 µL) ble fortynnet ved å tilsette 10 µL PCR-gradert H<sub>2</sub>O. Reaksjonsmikser ble blandet i PCR-rør. For hver prøve ble det laget to rør; et med forlengs primere og et med reverse primere. Primerne som ble benyttet til sekvensering var de samme som ved nested PCR.

I røret til forlengs sekvensering på A-siden ble det tilsatt 3,5 µL PCR-gradert H<sub>2</sub>O, 1 µL primer CoxA-F1, 1 µL primer CoxA-F2 og 0,5 µL primer CoxA6-F. I røret til revers sekvensering på A-siden ble det tilsatt 4,5 µL PCR-gradert H<sub>2</sub>O, 1 µL primer CoxA-R og 0,5 µL primer EV68/70-R.

Ved sekvensering på B-siden ble det tilsatt 5 µL PCR-gradert H<sub>2</sub>O i alle rørene og 1 µL av forlengs B-primer i forlengs rør og revers B-primer i revers rør. I alle rørene til sekvensering ble det også tilsatt 1 µL Big Dye (Thermo Fischer Scientific) og 2 µL sekvenseringsbuffer. Til slutt ble 1 µL templat ble tilsatt.

Rørene ble satt til inkubering på ProFlex PCR System hvor de ble inkubert ved 96 °C i 1 minutt og deretter i 28 sykluser bestående av 10 sekunder ved 96 °C, 5 sekunder ved 50 °C og 4 minutter ved 60 °C. Rørene ble så kjølt ned til 4 °C før de ble flyttet over til oppbevaring i fryseboks. Prøvene ble levert til Avdeling for medisinsk genetikk (MGM), hvor selve kapillærelektroforesen ble utført av personalet ved avdelingen.

### 2.3.6 Tolkning av sekvenser

Sekvensfilene ble studert ved hjelp av programvaren Chromas 2.5.1 levert av Technelysium, South Brisbane, Australia. Signalene i elektroferogrammet er av fire forskjellige farger for å skille de fire ulike DNA-basene. Kvaliteten på sekvensene ble vurdert etter hvor tydelige basesignalene var. Dersom sekvensene inneholdt mye kryssreaktivitet eller «støy» i form av små, forstyrrende signaler, var manuell tolkning av noen av signalene nødvendig. I starten (5'-enden) av sekvensene er signalene uklare, ettersom fragmentene fra Sanger syklus-sekvenseringen er så korte at instrumentet ikke klarer å skille dem fra hverandre. Ved en fin sekvens ble det typisk trimmet bort 30-50 baser fra 5'-enden. Ved sekvenser av dårligere kvalitet kunne det noen ganger være nødvendig å kutte bort mer, opp mot 150-160 baser. I 3'enden av sekvensene ble de 20 siste basene klippet bort, ettersom dette kun representerer primeren som ble tilsatt. Det ble gjort søk i GenBank med den resterende sekvensen for å sammenligne med andre nukleotidsekvenser. Søkene ble gjort ved hjelp av basic local assignment search tool (BLAST) av National Center for Biotechnology Information (NCBI). Treff i GenBank ga informasjon om hvilken enterovirus genotype prøven inneholdt. Hvem som helst kan publisere sekvenser i GenBank, og derfor ble kildene vurdert ved treff på flere genotyper.

### 2.3.7 Sanntids-PCR av Ribonuklease P-genet

For å måle innhold av humant DNA i prøven ble genet for RNase P analysert ved hjelp av sanntids-PCR. Genet finnes i humant DNA og koder for RNase P- enzymet. Analysen ble utført av laboratoriepersonell ved Mikrobiologisk avdeling. Resultatene ble sammenlignet med typingsmulighet i prøvene, og type prøvemateriale.

### 2.3.8 Statistiske beregninger

Deskriptiv statistikk og beregning av statistisk signifikans ble utført i Microsoft Excel. Pearsons korrelasjonstest ble brukt for å regne ut sammenhenger mellom CT-verdi og typingsmulighet og mellom innhold av humant DNA i prøven og typingsmulighet.

## 2.4 Valg av primere og instrument

På grunn av den store genetiske variasjonen mellom de ulike enterovirus genotypene, måtte vi bruke degenererte primere som inneholder variable baser i enkelte posisjoner. På grunn av at risikoen for kryssreaktivitet øker for hver degenerert baseposisjon som inngår i primeren, er det ønskelig med så få av disse som mulig. De fleste primerne som skulle brukes i prosjektet var allerede bestemt under tidligere utprøving av metoden. Ved første analysering ble det likevel testet ut nye forlengs primere på A-siden, for å se om disse ga bedre resultat. En oversikt over primerne som inngikk i metoden finnes i tabell 2. Primerne som ble testet var de to primerne CoxA F1 og CoxA F2 som erstatning for én forlengs primer CoxA F. På bakgrunn av resultatene ble det avgjort at de nye primerne, CoxA F1 og CoxA F2, skulle benyttes i prosjektet.

*Tabell 2: Primerne som ble valgt å benytte ved typing av enterovirus-positive prøver. Primersekvensene er skrevet i rekkefølgen 5' til 3'. De degenerte basene kan fungere som to eller flere ulike baser, og er angitt med egne bokstaver. Se forklaring på slutten av tabellen.*

ANALYSE	PRIMERNAVN	PRIMERSEKVENNS 5'→3'
<b>FØRSTE PCR</b>	EV-F1	CCIGCIYTIMMIGCIGYIGARACHGG
	EV-F2	CCIGCIYTIMMIGCIGYIGAAACGGG
	EV-R	CICCGGIGGIAYRWACAT
<b>NESTED PCR A-SIDE</b>	CoxA-F1	CGGYGGARACIGGIGCNAC
	CoxA-F2	CGGYGGARACIGGIKCNTC
	CoxA6-F	CGGYGGARACIGGAGCAAG
	CoxA-R	GGGGAYRWACATDWDYTG
	EV68/70-R	GGGGAYRWACATYGCTTG
<b>NESTED PCR B-SIDE</b>	CoxB/Echo-I <sub>na</sub> -F	GYGGARACNGGNCA <sub>Y</sub> +AC
	CoxB/Echo-I <sub>na</sub> -R	GGGAYRWACATNANYTGR+TG
<b>BOKSTAVFORKLARING VARIABLE BASER</b>	N	A, T, C eller G
	R	A eller G
	Y	C eller T
	K	G eller T
	W	A eller T
	M	A eller C
	H	A, C eller T



D	A, G eller T
I	Deoxyinosine, binder svakt til både A, T, C eller G. Kan erstatte andre baser i posisjoner for å forhindre sterke primer-sekundærstrukturer.

Primerne som ble benyttet ved nested PCR på B-siden inneholdt modifisert baser, såkalte «locked nucleic acids» (LNA) i noen posisjoner. Dette er merket i tabell 2 med en «+» foran de modifiserte basene. Det ble også prøvd ut LNA-primer på A-siden, men ble valgt bort til fordel for de nye primerne CoxA-F1 og CoxA-F2 og den reverse CoxA-R. LNA skal stabilisere hybridiseringen mellom komplementære DNA-tråder ved at molekylets ribosering er låst i en formasjon. En LNA-base gir sterkere binding til en komplementær base enn en umodifisert base, og tilsvarende mindre mulighet for uspesifikk binding mot en ikke-komplementær base. De kan altså både benyttes for å øke annealingtemperaturen på en primer og for å øke spesifisiteten.

Siden instrumentet SmartCycler etter hvert skal avvikles, ble det undersøkt om første PCR og nested PCR kunne flyttes over til et nytt instrument, MyGo Mini (IT-IS Life Science, Dublin, Irland). Prøvene i første oppsett ble derfor kjørt parallelt på de to instrumentene. Det ble brukt samme oppskrift for amplifikasjonsmikser på begge instrumentene. På bakgrunn av resultatene ble det bestemt at SmartCycler var instrumentet som skulle benyttes i prosjektet.

#### 2.4.1 Utprøving av nye primere til enterovirus A71

Mot slutten av prosjektet ble det oppdaget en mismatch mot enterovirus A71 i de aktuelle primerne som medførte at det var behov for å teste ut modifiserte primere som også matchet enterovirus A71. Det ble testet ut ulike strategier for både første PCR og nested PCR. Fire ulike strategier ble testet ut ved å analysere to forskjellige prøver fra samme pasient med kjent enterovirus A71. De to prøvene var en feces-prøve som allerede var typebestemt ved opprinnelig metode, og en spinalvæske hvor genotypen ikke kunne bestemmes ved den samme metoden. Strategien som ble valgt å gå videre med var å legge til 1 µL av en tredje variant av forlengs primer (EV-F3) ved første PCR, og deretter erstatte andre variant av forlengs A primer (CoxA-F2) med en modifisert variant (CoxA-F2b) ved nested PCR med A-primere. Denne strategien gav god sensitivitet for EV A71 samtidig som den gav den minste økningen i kryssreaktivitet mot humant DNA. De to primerne som ble lagt til metoden er listet opp i tabell 3. Resten av primerne var de samme som i den opprinnelige metoden listet opp i tabell 2. Denne fremgangsmåten ble så testet videre ved å analysere spinalvæsker og prøver i SLP-panel som ikke kunne types med den opprinnelige metoden.

Tabell 3: Primerne som ble lagt til metoden for å bedre matche enterovirus A71. Primersekvensene er skrevet i rekkefølgen 5' til 3'. De degenerte basene kan fungere som to eller flere ulike baser, og er angitt med egne bokstaver. Se forklaring på slutten av tabellen.

ANALYSE	PRIMERNAVN	PRIMERSEKVENNS 5'→3'
<b>FØRSTE PCR</b>	EV-F3	CRCTYCAAGCIGCIGARATTGG
<b>NESTED PCR A-SIDE</b>	CoxA-F2b	CGGYGGARAYIGGIKCNTC
<b>BOKSTAVFORKLARING VARIABLE BASER</b>	N	A, T, C eller G
	R	A eller G
	Y	C eller T
	K	G eller T
	I	Deoxyinosine, binder svakt til både A, T, C eller G. Kan erstatte andre baser i posisjoner for å forhindre sterke primersekundærstrukturer.

## 2.5 Etske hensyn

Pasientprøvene brukt i studien er aidentifisert, og pasientene er dermed sikret anonymitet. Analyseringen av prøvene til prosjektet foregikk etter at prøvesvarene fra rutinediagnostikk var gitt ut og prøvematerialet var arkivert. Alle prøver var kjent positive for enterovirus, og tilleggsopplysning av eventuell genotype ville ikke få behandlingmessige konsekvenser for den enkelte pasient. Funn i forbindelse med prosjektet ble ikke rapportert tilbake til behandlende lege eller lagt inn i pasientjournal. Godkjenning hos Regional etisk komité (REK) var derfor ikke nødvendig, men prosjektet er godkjent av ledelsen ved avdelingen og personvernombudet ved Haukeland universitetssjukehus.

## 3. Resultat

### 3.1 Valg av primere og instrument

Som beskrevet i kapittel 2 ble det vurdert to ulike PCR-instrumenter ved første oppsett; Smartcyclers og MyGo Mini. Prøver med studie-ID 2 og 3 ble inkludert i denne vurderingen. Ettersom prøve 3 ikke var mulig å type, ble valg av instrument tatt med utgangspunkt i resultatene fra prøve 2. Typebestemmelse var mulig av prøver både analysert med Smartcyclers og MyGo Mini, men kvaliteten på sekvensene varierte og ble funnet å være tydelig bedre for SmartCyclers. Det ble derfor valgt å gå videre med dette instrumentet.

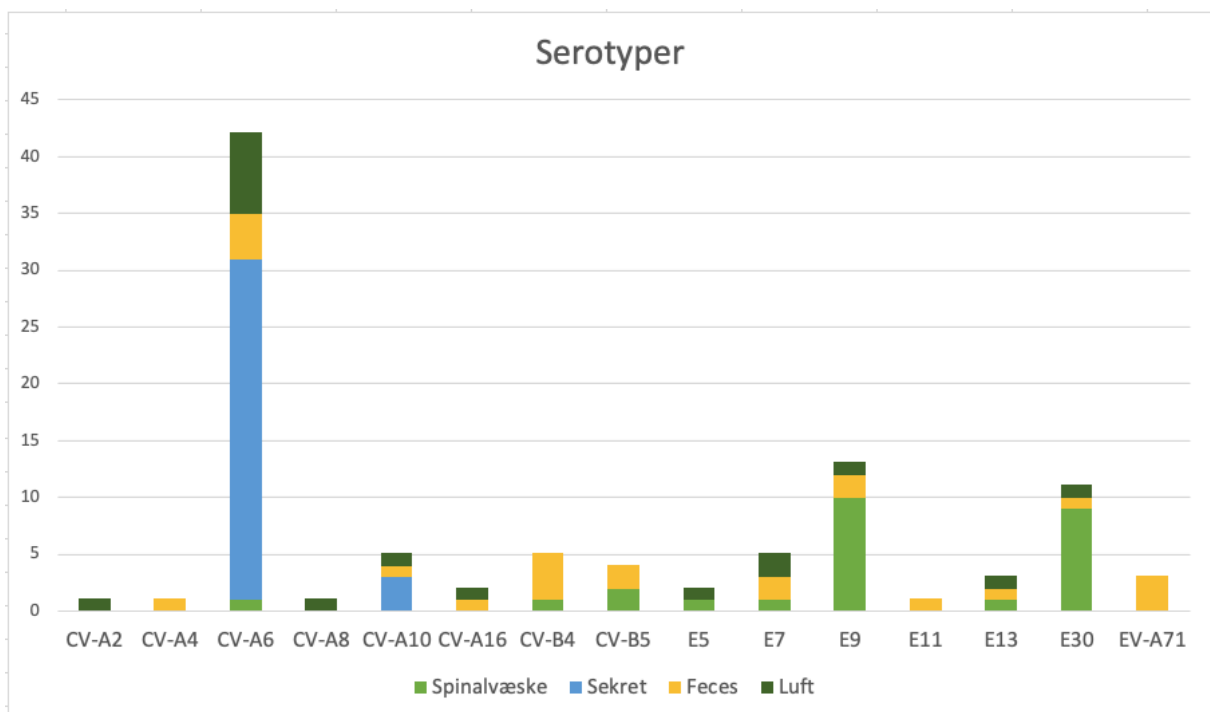
Ved første oppsett ble det også testet to alternative forlengs A-primere. Det viste seg at de nye primerne (CoxA F1 og F2) ga mindre grad av kryssreaktivitet mot humant DNA enn den gamle primeren (CoxA F). Det ble derfor bestemt at disse A-primerne skulle brukes videre.

For noen av prøvene som ikke kunne types med metoden, ble ytterligere optimalisering forsøkt ved å benytte LNA-modifiserte primere også på A-siden. Ingen av prøvene som ble sekvensert på nytt med LNA-primere lot seg typebestemme ved bruk av disse. I ett tilfelle (prøve 20) var typebestemmelse mulig ved bruk av de nye CoxA F1 og F2 på tross av at sekvensen inneholdt noe kryssreaktivitet med humant DNA. Den samme prøven lot seg ikke typebestemme ved bruk av LNA-modifiserte primere.

### 3.2 Typing i pasientprøver

Totalt ble det analysert 120 pasientprøver fra tidsrommet 29.06.18 til 07.01.20. Av disse var 32 spinalvæsker, 23 luftveissekret, 37 sår- og blemmesekret og 28 fecesprøver, og alle er listet opp i vedlegg 1 sammen med rådata fra de ulike trinnene i analysemetoden. Prøvene inneholdt varierende mengde virus, hvor den sterkeste hadde CT=17,88 og den svakeste CT=37,85 ved enterovirus-PCR i forbindelse med rutinediagnostikk. Av 120 prøver ble totalt 99 typebestemt, det vil si 82,5%. Totalt ble det typebestemt enterovirus fra 26 spinalvæsker (81,3%), 17 luftveissekret (73,9%), 33 sår- og blemmesekret (89,2%) og 23 fecesprøver (82,1%).

Vi fant tilsammen 15 forskjellige genotyper i prøvene ved metoden. Figur 5 viser en oversikt over de ulike genotypene og hvilke prøvematerialer de ble funnet i. Coxsackie A6 utgjorde den største delen av funnene, og ble påvist i 42,4% av de 99 prøvene som ble typet. Den nest største andelen var echovirus 9 (13,1%) etterfulgt av echovirus 30 (11,1%). For sju av pasientene hadde vi mer enn en type prøvemateriale tilgjengelig. Til sammen klarte vi å genotype virus hos 89 av 102 pasienter.



Figur 5: Oversikt over genotypene som ble detektert i pasientprøvene ved metoden. Fargene representerer type prøvemateriale genotypen ble detektert i. Alle prøvene som ble typet i studien er representert.

Ettersom ikke alle prøvene kunne typebestemmes, ble det undersøkt om ulike forhold kunne påvirke metodens sensitivitet. Vi undersøkte sammenhengen mellom vellykket genotyping og prøvens CT-verdi fra enterovirus-PCR, type prøvemateriale og innhold av humant DNA.

### 3.2.1 Prøver der virus ikke kunne typebestemmes

Tabell 4 gir en oversikt over de 21 prøvene hvorfra enterovirus ikke lot seg type med metoden. Alle de 11 prøvene som hadde en CT-verdi på over 35 fra enterovirus-PCR ved rutinediagnostikk finnes på denne listen. Blant prøvene som ikke kunne typebestemmes er også 6 prøver tatt fra to pasienter hvor det er detektert enterovirus A71 i annet prøvemateriale. Begge pasientene hadde enterovirus meningitt, og i tabell 5 benevnes disse pasient 2 og pasient 5.

*Tabell 4: Prøvene som ikke kunne typebestemmes med metoden er listet opp i tabellen. Seks av prøvene var fra pasienter hvor enterovirus A71 ble detektert i annet prøvemateriale, og disse er merket med «EV-71» i siste kolonne. Den fjerde kolonnen er prøvens CT-verdi fra enterovirus-PCR ved rutinediagnostikk. CT-verdier over 35 er rødfarget.*

PRØVE- NUMMER	PRØVEDATO	PRØVEMATERIALE	CT-VERDI	ANNET
101	08.12.2019	Spinalvæske	35,75	
85 <sup>A</sup>	21.11.2019	Feces	31,96	EV-71
89 <sup>A</sup>	21.11.2019	Cellekultur (hals)	29,51	EV-71
91 <sup>A</sup>	20.11.2019	Spinalvæske	31,54	EV-71
82	08.11.2019	Feces	33,82	
74	07.11.2019	Spinalvæske	35,68	
73	06.11.2019	Sekret	35,28	
64	30.10.2019	Spinalvæske	36,64	
11	11.09.2019	Sekret	37,85	
1	27.08.2019	Feces	27,50	
3	09.07.2019	Sekret	35,71	
9 <sup>B</sup>	17.06.2019	Halssekret	31,02	EV-71
12 <sup>B</sup>	15.06.2019	Spinalvæske	29,35	EV-71
119 <sup>B</sup>	15.06.2019	Nasofarynkssekret	33,79	EV-71
14	20.05.2019	Feces	28,82	

120	02.03.2019	Nasofarynkssekret	36,89
25	03.12.2018	Halssekret	26,54
27	03.12.2018	Sekret	36,89
30	04.11.2018	Feces	37,1
52	10.09.2018	Nasofarynkssekret	37,55
95	30.06.2018	Spinalvæske	36,66

### 3.2.2 Flere prøver fra samme pasient

I flere tilfeller av meningitt var det samlet inn ulike typer prøvematerialer fra samme pasient. I alle tilfellene ble enterovirus typebestemt i minst én av prøvene. I tre av tilfellene hvor det i spinalvæsken var positiv enterovirus-PCR med en CT-verdi under 35 og enterovirus ikke kunne typebestemmes, ble enterovirus typebestemt i andre prøvematerialer med høyere virusinnhold. Det kan sees i figur 5 at samme genotype er påvist i ulike prøvematerialer, men i flere av tilfellene var disse fra samme pasient. Tabell 5 inneholder en oversikt over pasientene hvorfra det ble analysert flere ulike prøver. Hos alle pasientene kunne genotypen bestemmes i en eller flere av prøvene. Der hvor metoden ikke var i stand til å typebestemme enterovirus i en prøve, kunne en prøve av et annet prøvemateriale gi svar på hvilken genotype pasienten var infisert av.

Tabell 5: Fra flere av pasientene med meningitt var det samlet inn ulike typer prøvematerialer. Tabellen inneholder en oversikt over disse tilfellene. I alle tilfellene kunne genotyping skje fra en eller flere av prøvene. CT-verdier over 35 er rødfarget.

PASIENT /PRØVE-NUMMER	PRØVEDATO	PRØVEMATERIALE	CT-VERDI	RESULTAT
<b>PASIENT 1 / 116</b>	06.01.2020	Halssekret	27,19	Echovirus 13
	<b>115</b> 06.01.2020	Spinalvæske	32,31	Echovirus 13
<b>PASIENT 2 / 89</b>	21.11.2019	Cellekultur (hals)	29,51	Mislykket
	<b>85</b> 21.11.2019	Feces	31,96	Mislykket
	<b>91</b> 20.11.2019	Spinalvæske	31,54	Mislykket
	<b>84</b> 20.11.2019	Feces	22,99	Enterovirus A71
<b>PASIENT 3 / 77</b>	08.11.2019	Feces	24,91	Echovirus 7
	<b>74</b> 07.11.2019	Spinalvæske	35,68	Mislykket
	<b>76</b> 06.11.2019	Nasofarynkssekret	22,79	Echovirus 7
<b>PASIENT 4 / 54</b>	23.10.2019	Feces	25,13	Echovirus 7
	<b>34</b> 22.10.2019	Spinalvæske	32,08	Echovirus 7
	<b>49</b> 21.10.2019	Nasofarynkssekret	24,55	Echovirus 7
<b>PASIENT 5 / 12</b>	15.06.2019	Spinalvæske	29,35	Mislykket
	<b>119</b> 15.06.2019	Nasofarynkssekret	33,79	Mislykket
	<b>118</b> 15.06.2019	Feces	22,27	Enterovirus A71
	<b>6</b> 15.06.2019	Feces	23,64	Enterovirus A71
<b>PASIENT 6 / 16</b>	10.03.2019	Spinalvæske	25,00	Echovirus 5
	<b>17</b> 10.03.2019	Halssekret	24,25	Echovirus 5
<b>PASIENT 7 / 28</b>	04.11.2018	Feces	23,80	Coxsackievirus B4
	<b>29</b> 02.11.2018	Feces	21,87	Coxsackievirus B4
	<b>31</b> 31.10.2018	Spinalvæske	33,98	Coxsackievirus B4



### 3.2.3 Sammenheng mellom genotype og type prøvemateriale

Sekreter er i hovedsak samlet inn fra pasienter med hånd- fot- og munnsyke, mens spinalvæsker er samlet inn fra pasienter med meningitt. Prøver fra luftveier og feces kan være samlet inn fra pasienter med ulike kliniske manifestasjoner. Å undersøke hvilke genotyper som er funnet i hvilke typer prøvematerialer, kan gi svar på om noen genotyper oftere har gitt meningitt eller hånd- fot- og munnsyke enn andre.

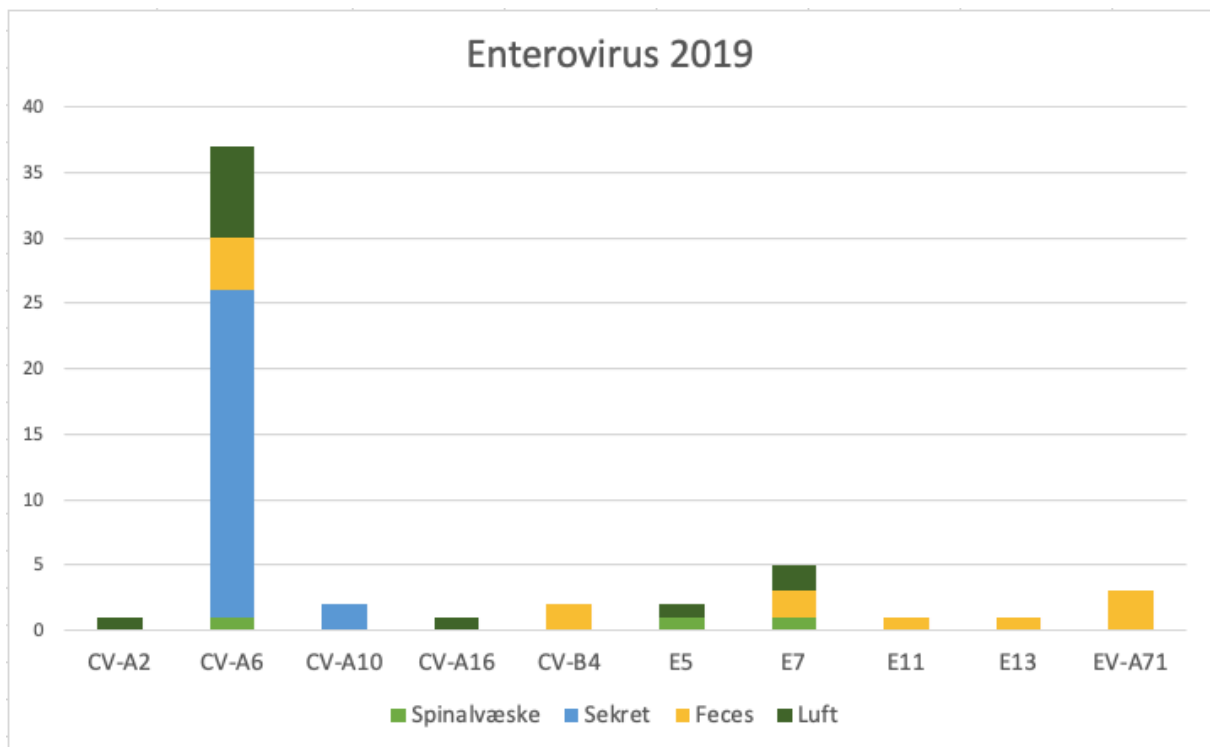
Coxsackievirus A6 er den genotypen som ble detektert flest ganger. Den ble detektert i 30 av totalt 33 typebestemte sekreter fra pasienter med hånd- fot- og munnsyke. I tillegg ble det detektert coxsackievirus A10 i tre sekreter. Coxsackievirus A6 ble også i ett tilfelle detektert i spinalvæske fra en pasient med meningitt.

Echovirus 30 og echovirus 9 var genotypene som ble funnet hyppigst i spinalvæske, henholdsvis 9 og 10 ganger. Samtlige av prøvene hvor de to genotypene ble detektert, var samlet inn i 2018. Coxsackievirus B5 ble funnet i spinalvæske hos to pasienter. Også coxsackievirus B4, echovirus 13, echovirus 5 og echovirus 7 ble i enkelttilfeller funnet i spinalvæske. Selv om enterovirus A71 ikke ble detektert i spinalvæske, ble genotypen funnet i feces hos to pasienter med meningitt.

### 3.2.4 Enterovirus-positive prøver fra 2019

Alle enterovirus-positive pasientprøver fra 2019 ble analysert. De 71 prøvene omfattet 30 sekret, 17 fecesprøver, 16 luftveisprøver og 8 spinalvæsker. Genotyping var vellykket for 55, det vil si 77,5%. Det ble typebestemt 27 sekret, 13 fecesprøver, 12 luftveisprøver og 3 spinalvæsker.

I prøvene fra 2019 ble det funnet 10 ulike typer enterovirus. Coxsackievirus A6 ble funnet i 30 (52,1%) prøver og var det desidert hyppigste funnet. En grafisk fremstilling av resultatene er presentert i figur 6.



Figur 6: Oversikt over funn i pasientprøver fra 2019. Totalt 55 pasientprøver ble typebestemt.

I de tre spinalvæskene fra 2019 som ble typet ble det funnet coxsackievirus A6, echovirus 5 og echovirus 7. I tillegg var det fem spinalvæsker som ikke ble typet. To av disse var fra pasienter med funn av enterovirus A71 i feces, to var fra pasienter med echovirus 7 i luftveissekret og feces og én var fra pasient med echovirus 5 i luftveissekret (se tabell 5). I 25 av de 30 sekretene fra 2019 ble det funnet coxsackievirus A6. Det ble også funnet coxsackievirus A10 i to sekreter, mens tre ikke ble typet.

Også i luftveisprøver og feces ble det gjort funn av coxsackievirus A6. I luftveisprøver ble det også funnet coxsackievirus A16 og coxsackievirus A2, som ikke var detektert i noen andre prøvematerialer fra 2019.

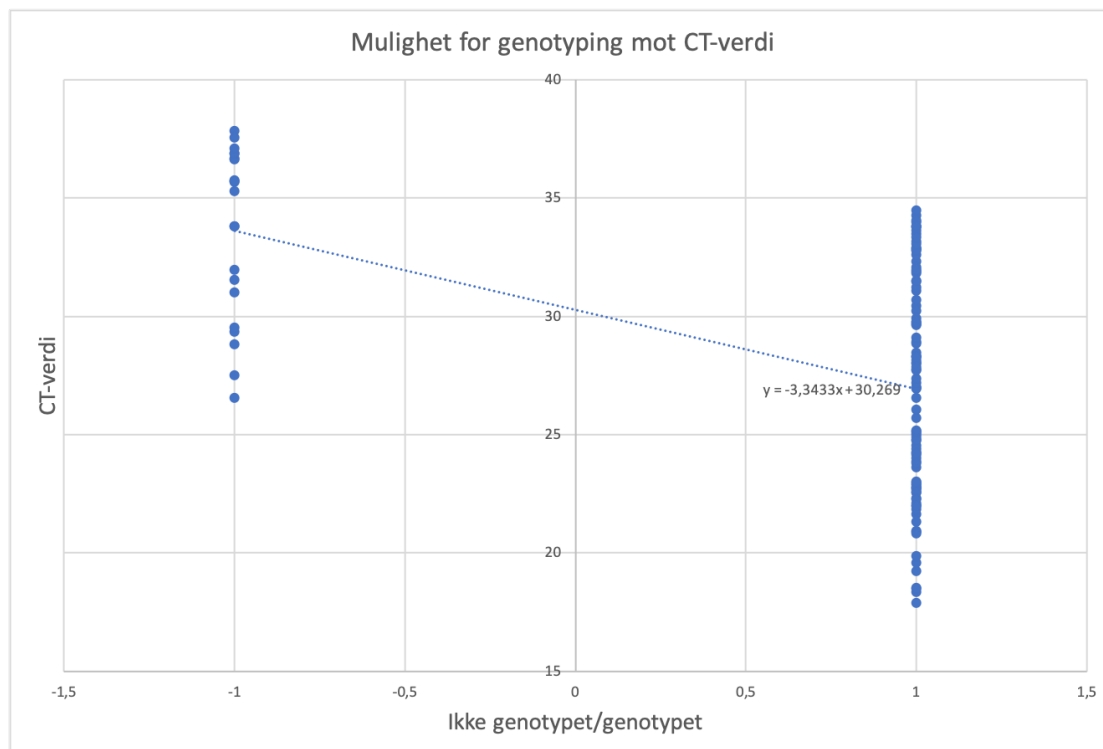
I 2019 ble det gjort funn av enterovirus A71 hos tre pasienter. To av pasientene hadde kjent meningitt, men kun fecesprøvene ble typebestemt med metoden. Coxsackievirus B4, echovirus 11 og echovirus 13 ble også funnet i fecesprøver fra 2019, men indikasjon for prøvetaking er ikke kjent for disse pasientene.

### 3.3 Mulige påvirkninger av metodens sensitivitet

#### 3.3.1 CT-verdi

Fra enterovirus sanntids-PCR ved rutinediagnostikk hadde prøvene en CT-verdi (Threshold Cycle) som er antall PCR-sykluser som måtte til før avlest signal nådde terskelverdien. Det ble utforsket om denne verdien hadde sammenheng med sannsynligheten for en vellykket genotyping. Prøvene som ble analysert i dette prosjektet hadde alle blitt undersøkt med sanntids-PCR i forbindelse med rutinediagnostikk, slik at CT-verdien var kjent på forhånd.

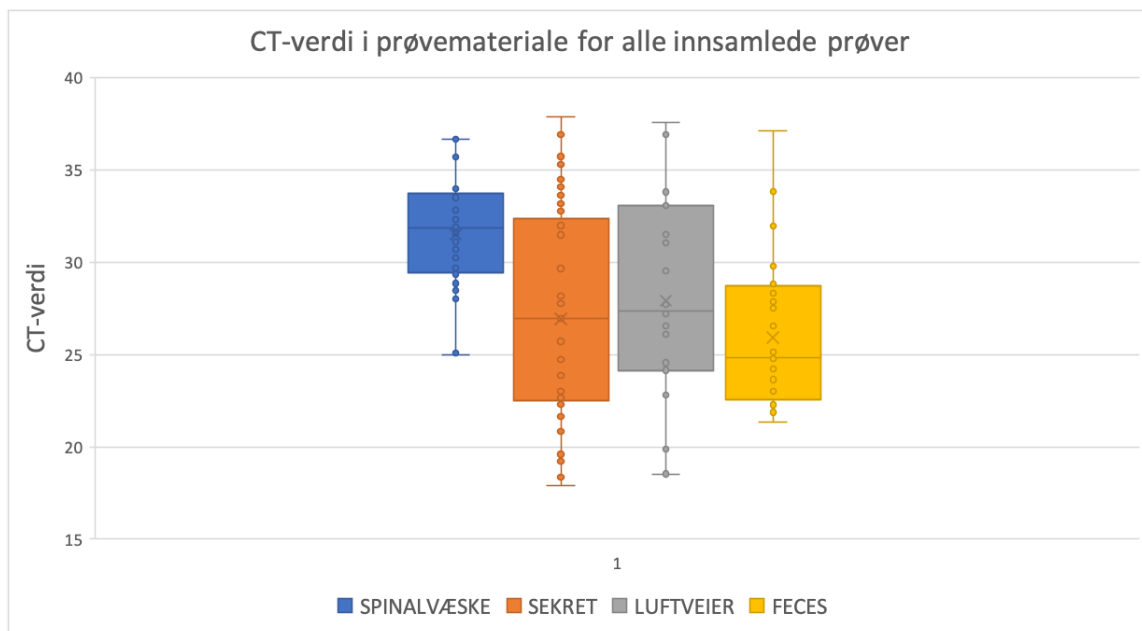
Ingen av de 11 prøvene med CT-verdi over 35 var mulig å type med metoden. Om CT-verdi hadde sammenheng med typingsmulighet ble undersøkt ved å gjøre en bivariat analyse, hvor CT-verdien ble plottet mot typingsmulighet, uttrykt ved verdiene -1 (ikke typet) og 1 (typet). Plottet er presentert i figur 7. Det ble utført Pearsons korrelasjonstest for å teste om det fantes en sammenheng mellom de to variablene. Det ble regnet ut en Pearsons korrelasjonskoeffisient lik  $-0,50$  og en p-verdi på  $6,94 \cdot 10^{-9}$ . Ettersom dette er en tosidig test ble det valgt å bruke  $\alpha=0,0025$ . P-verdien er mindre enn  $\alpha$ , som vil si at det foreligger negativ korrelasjon mellom CT-verdi og typingsmulighet.



Figur 7: Typingsmulighet plottet mot prøvens CT-verdi fra enterovirus-PCR. Typingsmuligheten er oppgitt som verdier, hvor 1 er vellykket typing, og -1 er ikke typebestemt. En trendlinje er generert for å visualisere en eventuell sammenheng. En Pearsons korrelasjonstest bekreftet at det foreligger en sammenheng.

### 3.3.2 Type prøvemateriale

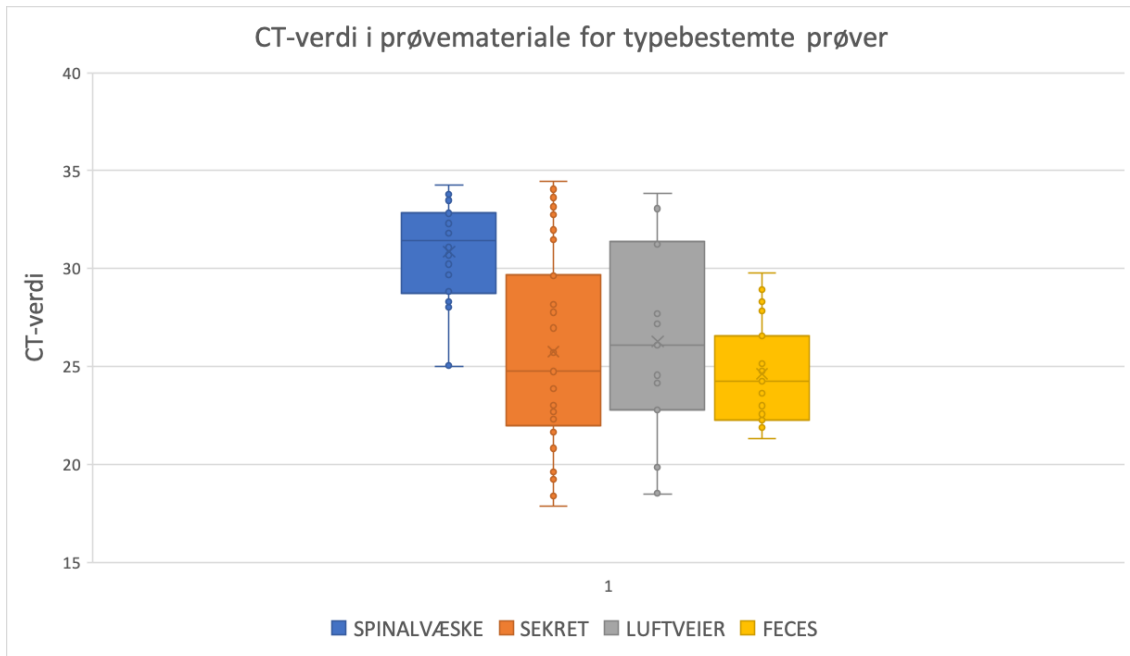
Det ble videre undersøkt om type prøvemateriale kan ha påvirket metodens sensitivitet og muligheten for typing. Det ble observert at CT-verdien kunne variere med type prøvemateriale, slik at dette ble derfor undersøkt nærmere. En oversikt over CT-verdier i ulike prøvematerialer er presentert i form av et boksplokk i figur 8. De innsamlede spinalvæskene hadde gjennomsnittlig CT-verdi på 31,49, høyest av de fire typene prøvemateriale. Lavest gjennomsnittlig CT-verdi fantes fra fecesprøvene med CT=25,09. Sår- og blemmesekreter og luftveisprøvene ligger litt høyere i plottet med gjennomsnittlige CT-verdier på henholdsvis 26,92 og 27,91. Både den sterkeste (CT=17,88) og den svakeste (CT=37,85) prøven var sekreter.



Figur 8: De ulike typene prøvemateriale sammenlignet etter CT-verdi. Oversikten inkluderer alle de innsamlede prøvene.

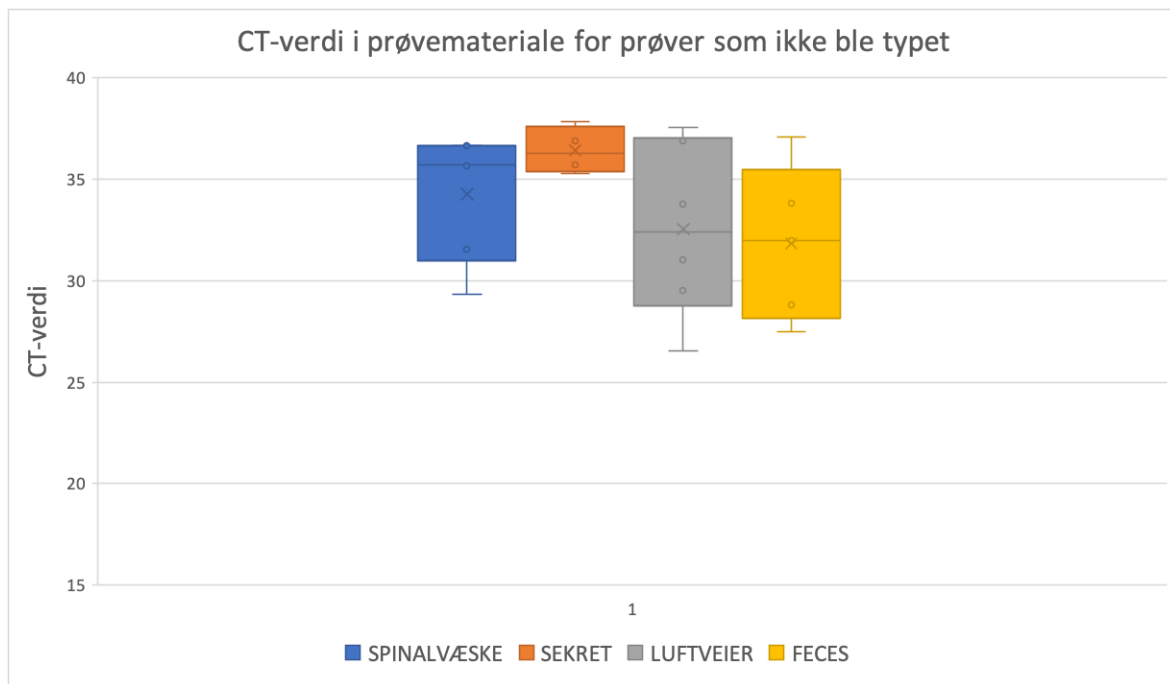
De typede prøvene ble også plottet i et boksplokk etter CT-verdi, sortert etter type prøvemateriale (figur 9). Også blant prøvene som ble typet hadde spinalvæske høyeste gjennomsnittlige CT-verdi på 30,86. For fecesprøvene som ble typet var den gjennomsnittlige CT-verdier på 24,62. Sekretene som ble typet hadde gjennomsnittlig CT på 25,77 og luftveisprøvene 26,28. Av alle prøvene som ble typet var den svakeste et sekret og hadde en CT=34,46. Den svakeste spinalvæsken var omtrent like svak med CT=34,28 og deretter den

svakeste luftveisprøven med CT=33,82. Den svakeste fecesprøven som ble typet hadde CT=29,77.



Figur 9: De typede prøvene plottet etter CT-verdi og type prøvemateriale. Ingen av prøvene med  $CT > 35$  ble typet.

Av de fire typene prøvemateriale var luftveisprøver det med lavest andel genotypede virus 73,9%. Av spinalvæskene og fecesprøvene ble henholdsvis 81,3% og 82,1% typet. Den høyeste prosenten typede prøver var sår- og blemmesekreter, hvor det lyktes å type 89,2%. En oversikt over CT-verdier i prøvene som ikke kunne types er presentert som et boksplott i figur 10. Alle sår- og blemmesekreter med CT-verdi under 35 ble typet, og de som ikke ble det hadde en gjennomsnittlig CT-verdi på 36,4. Den nest høyeste gjennomsnittlige CT-verdien på 34,3 hadde de ikke-typede spinalvæskene. Luftveissekretene og fecesprøvene som ikke ble typet hadde noe lavere gjennomsnittlige CT-verdier på henholdsvis 32,6 og 31,8.

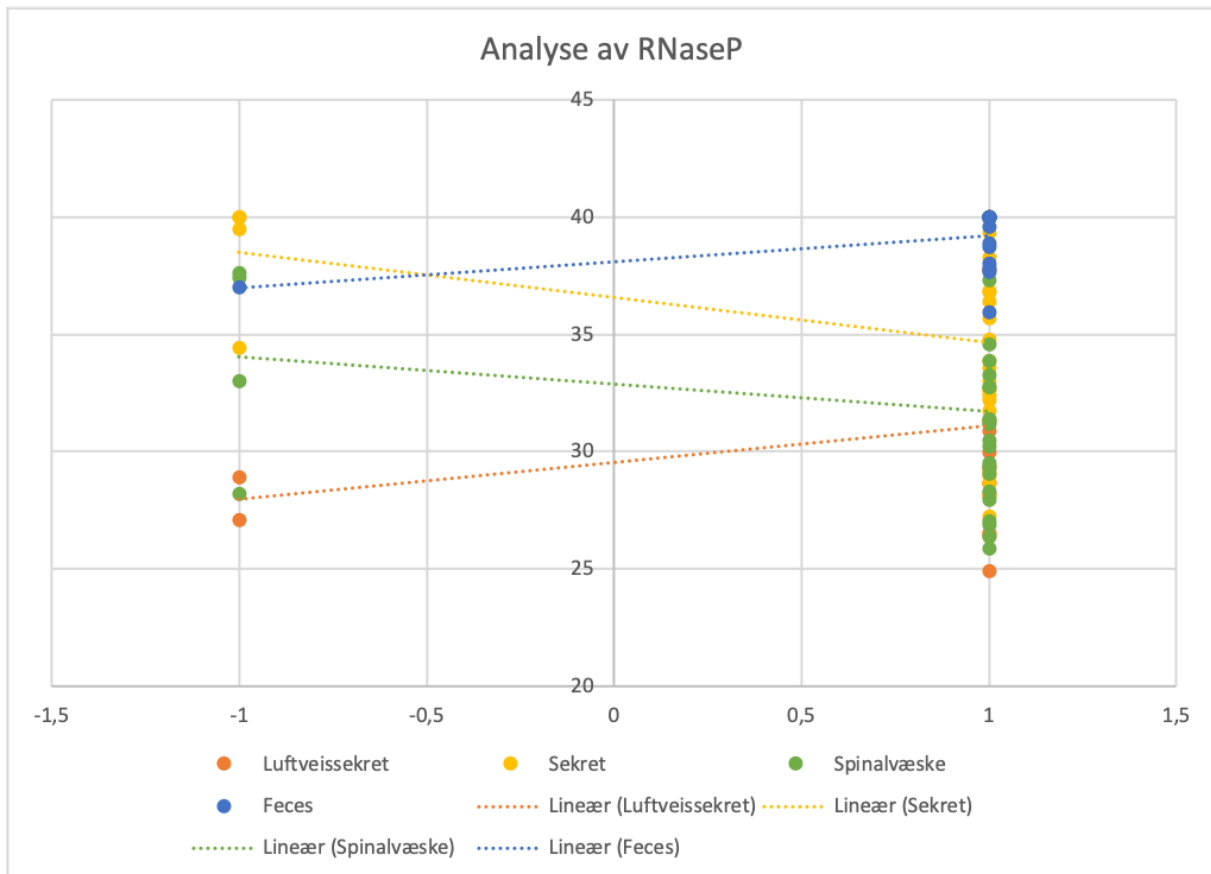


Figur 10: Prøvene som ikke kunne types med metoden plottet etter CT-verdi og type prøvemateriale.

### 3.3.3 Analyse av Ribonuklease P (RNase P)

PCR av RNase P-genet i prøvene ble utført av personell ved laboratoriet. Rådata fra analysene finnes i vedlegg 2. Resultatene ble sammenlignet med prøvenes typingsmulighet. Grunnet lite prøvemateriale ble ikke RNase P analysert i alle prøvene, men 97 av dem. Av spinalvæskene ble 27 prøver analysert, hvorav tre var negative (CT=0 eller 40). De positive hadde en gjennomsnittlig CT-verdi på 31,07 fra sanntids-PCR av RNase P. Det ble analysert 34 sekreter, hvor 25 ga positivt resultat med et gjennomsnitt på CT=33,05. Av de 18 luftveisprøvene som ble analysert var 16 positive, med gjennomsnittlig CT på 29,60. Kun åtte av de 18 fecesprøvene som ble analysert var positive, og hadde også den høyeste gjennomsnittlige CT-verdien på 37,96.

Det ble undersøkt om innhold av RNase P-genet i prøvene kunne ha sammenheng med om prøven kunne types eller ikke. På grunn av ulik sammensetning ble dette beregnet per prøvemateriale. Resultatene er presentert grafisk i figur 11, hvor mulighet for typing er omgjort til verdiene -1 (ikke typet) og 1 (typet). Det ble gjort Pearsons korrelasjonstest for hvert av prøvematerialene for å teste om det fantes en sammenheng mellom CT-verdi ved analyse av RNase P og om prøven kunne types eller ikke. I den sammenheng ble negative prøver satt til CT=40, som er høyest mulige CT-verdi ved analysen og regnes som negativ.



Figur 11: Typingsmulighet plottet mot prøvens CT-verdi fra RNase P sanntids-PCR. Typingsmuligheten er omgjort til verdiene -1 (ikke typet) og 1 (typet). Trendlinjer er generert for å visualisere en eventuell sammenheng. Pearsons korrelasjonstest bekreftet at det ikke foreligger noen sammenheng mellom de to variablene.

Det ble for hvert av de fire prøvematerialene utført Pearsons korrelasjonstest for CT-verdi ved sanntids-PCR av RNase P mot mulighet for genotyping. Ettersom det var tosidige tester ble det valgt å bruke  $\alpha=0,0025$ . For alle prøvematerialene ble P-verdien større enn  $\alpha$ , som vil si at det ikke foreligger noen korrelasjon mellom innhold av RNase P og om prøvene kunne genotypes eller ikke. Tabell 6 gir en oversikt over de utregnede korrelasjonskoeffisientene og p-verdiene for hvert av de fire prøvematerialene.

Tabell 6: Pearsons korrelasjonskoeffisient og p-verdi utregnet for de fire ulike prøvematerialene. Det ble gjort Pearsons korrelasjonstest av resultatene fra PCR av RNase P og mulighet for genotyping. Alfa-verdi ble satt til 0,0025. Det ble ikke funnet noen signifikant sammenheng for noen av prøvematerialene.

<b>PRØVE-MATERIALE</b>	<b>PEARSONS KORRELASJONS-KOEFFISIENT</b>	<b>P-VERDI</b>	<b>ALFA</b>	<b>SIGNIFIKANT SAMMENHENG MELLOM RNASE P OG MULIGHET FOR GENOTYPING</b>
<b>SPINALVÆSKE</b>	-0,1954	0,8357	0,0025	Nei
<b>SEKRET</b>	-0,2790	0,9450	0,0025	Nei
<b>LUFTVEIER</b>	0,2132	0,8022	0,0025	Nei
<b>FECES</b>	0,4096	0,9543	0,0025	Nei

### 3.4 SLP-panel

Det ble analysert ett EV-panel (2019) og to EV-typepanel (2016 og 2019). De utgjorde til sammen 27 prøver, hvor alle ble analysert. Vanlig EV-panel ble analysert fra cDNA, ettersom disse allerede var analysert med enterovirus-PCR og det derfor fantes tilgjengelig cDNA. De to typepanelene hadde ikke vært analysert tidligere, og ble derfor analysert fra primær materialet.

Vanlig EV-panel fra august 2019 bestod av 10 prøver. En av prøvene var negativ. Av de 9 enterovirus-positive prøvene ble 8 typebestemt. Alle funnene stemte i henhold til fasit. En oversikt over prøvene i det vanlige EV-panelet fra 2019 finnes i tabell 7. Prøvene i dette SLP-panelet ble kalt EV19 etterfulgt av nummer. Alle genotypene som var inkludert i panelet ble vellykket genotypet med unntak av Enterovirus 71.



Tabell 7: Vanlig enterovirus-panel fra august 2019. Oversikten viser prøvenavn, funn og fasitsvar. I de åtte prøvene som ble typebestemt ble det funnet genotypene som var oppgitt i fasit. Én prøve som inneholdt enterovirus lot seg ikke typebestemme.

PRØVE	FUNN	FASIT
EV19-01	Ingen	Enterovirus 71
EV19-02	Coxsackievirus A9	Coxsackievirus A9
EV19-03	Enterovirus D68	Enterovirus D68
EV19-04	Echovirus 25	Echovirus 25
EV19-05	Enterovirus D68	Enterovirus D68
EV19-06	Echovirus 6	Echovirus 6
EV19-07	Echovirus 18	Echovirus 18
EV19-08	Echovirus 30	Echovirus 30
EV19-09	Ingen	Negativ
EV19-10	Coxsackievirus A24	Coxsackievirus A24

Enterovirus typepanel fra 2019 inneholdt 8 prøver. Ingen av prøvene var negative. Alle unntatt én prøve ble typebestemt, og disse stemte med fasiten. Også i dette typepanelet var det enterovirus 71 som vi ikke klarte å genotype. Tabell 8 inneholder en oversikt over de 8 prøvene. Prøvene i dette SLP-typepanelet ble kalt TEV-19 etterfulgt av nummer.

Tabell 8: Enterovirus typepanel fra mars 2019. Oversikten viser prøvenavn, funn og fasitsvar. I de prøvene som ble typebestemt ble det funnet genotyper som stemte i henhold til fasit.

PRØVE	FUNN	FASIT
TEV19-01	Coxsackievirus A24	Coxsackievirus A24
TEV19-02	Echovirus 25	Echovirus 25
TEV19-03	Echovirus 30	Echovirus 30
TEV19-04	Echovirus 6	Echovirus 6
TEV19-05	Echovirus 18	Echovirus 18
TEV19-06	Ingen	Enterovirus 71
TEV19-07	Coxsackievirus A9	Coxsackievirus A9
TEV19-08	Enterovirus D68	Enterovirus D68

Enterovirus typepanel fra 2016 inneholdt 9 prøver. En av prøvene inneholdt parechovirus 1, og var dermed negativ for enterovirus ved PCR. Av de 8 enterovirus-positive prøvene ble 6 typebestemt, og resultatene stemte med fasiten. Heller ikke i dette typepanelet var det mulig å type enterovirus 71. I dette panelet inneholdt prøve 1 og prøve 9 enterovirus 71, hvor den siste var en fortykning av den første. Tabell 9 inneholder oversikt over de 9 prøvene. Prøvene i dette SLP-typepanelet ble kalt TEV-16 etterfulgt av nummer.

*Tabell 9: Enterovirus typepanel fra mars 2016. Oversikten viser prøvenavn, funn og fasitsvar. I de åtte prøvene som ble typebestemt ble det funnet genotypene som var oppgitt i fasit. Prøve to inneholdt parechovirus, altså ikke et enterovirus.*

<b>PRØVE</b>	<b>FUNN</b>	<b>FASIT</b>
<b>TEV16-01</b>	Ingen	Enterovirus 71
<b>TEV16-02</b>	Ingen	Parechovirus 1
<b>TEV16-03</b>	Coxsackievirus A9	Coxsackievirus A9
<b>TEV16-04</b>	Enterovirus D68	Enterovirus D68
<b>TEV16-05</b>	Coxsackievirus A21	Coxsackievirus A21
<b>TEV16-06</b>	Coxsackievirus B3	Coxsackievirus B3
<b>TEV16-07</b>	Echovirus 30	Echovirus 30
<b>TEV16-08</b>	Coxsackievirus A24	Coxsackievirus A24
<b>TEV16-09</b>	Ingen	Enterovirus 71

Av de 27 prøvene som ble analysert i de tre SLP-panelene, ga 23 av dem resultater som stemte med fasiten. Det gir en riktig svarprosent på 85,2%. Det ble ikke detektert feil genotype i noen av prøvene. Samtlige av de fire prøvene som ikke var mulige å type inneholdt enterovirus 71. De tre panelene inneholdt totalt 9 ulike genotyper i tillegg til negative prøver.

### 3.5 Utprøving av nye primere som matchet enterovirus A71

På bakgrunn av at metoden flere ganger har feilet i å type enterovirus A71 i pasientprøver og SLP-panel, ble det utført en ny in-silica analyse av primerne og primerbindingssetene for enterovirus A71. Det ble da oppdaget en variasjon i en baseposisjon hos enterovirus A71 svarende til posisjon 3'-ende minus 4 i forlengs primer EV-F1. En mismatch i denne posisjonen er forventet å kunne redusere sensitiviteten vesentlig, og det ble derfor designet nye primere som tok høyde for denne varianten. Disse ble så testet som en del av prosjektet. Det ble forsøkt to ulike primersett for første PCR og to ulike primersett for nested PCR, altså totalt fire ulike strategier. To prøver ble testet med de ulike strategiene; en feces (prøve nr. 6) hvor det allerede var detektert enterovirus A71 tidligere i prosjektet, og en spinalvæske (prøve nr. 12) fra samme pasient, men som ikke hadde latt seg type med metoden tidligere i prosjektet.

Ved den første PCR-reaksjonen gikk strategi 1 ut på å legge til en tredje versjon av forlengs primer som kun dekket varianten som fantes hos enterovirus A71. Strategi 2 gikk ut på å endre variant 2 av forlengs primer ved å legge til en degenerert base som også dekket enterovirus A71. Utfordringen ved å legge til en degenerert base er at man øker antallet primerkombinasjoner, og dermed øker sannsynligheten for kryssreaktivitet, det ble derfor testet ut ulike strategier.

Ved nested PCR gikk strategi a ut på å beholde primerne slik de var i den opprinnelige metoden, i tilfelle mismatchen ikke påvirket primerbindingen til enterovirus A71 i betydelig grad. Dersom dette var tilfellet ville man beholdt den opprinnelige primeren for å minimere antall degenererte baseposisjoner. Strategi b var å endre forlengs primer CoxA F2 ved å legge til en degenerert baseposisjon som også matchet enterovirus A71 sekvensen.

Begge prøvene kunne types ved hjelp av alle de fire strategiene, men sekvensene var av varierende kvalitet. Strategi 2 ga i større grad kryssreaktivitet med humant DNA enn strategi 1. Ved sekvensering av spinalvæske ga både strategi 1a og 1b lite kryssreaktivitet. Det var større forskjell mellom de to strategiene ved sekvensering av fecesprøven. Her ga strategi 1a mer kryssreaktivitet enn strategi 1b. Det ble valgt å bruke strategi 1b videre, som var en tredje variant av forlengs primer ved første PCR, og en ny variant av CoxA F2 ved nesting. Tabell 3 gir en oversikt over de nye primerne som inngikk i strategi 1b.

### 3.5.1 Typebestemmelse av enterovirus A71 med nye primere

Fire av de seks spinalvæskene som ikke hadde blitt typebestemt med den opprinnelige metoden, ble forsøkt typet med de nye primerne. Viser til tabell 10 for en oversikt over de seks spinalvæskene. Ettersom to av prøvene var svært svake, ble det valgt å analysere de fire prøvene med sterkest viruskonsentrasjon.

I tillegg til prøve 12 som ble vellykket typet til EV A71 under utprøvingen av de modifiserte primerne, ble de tre spinalvæskene 74, 91 og 101 analysert, alle fra november og desember 2019. Prøve nummer 91 var den med høyest virusinnhold med CT-verdi på 31,54 ved enterovirus-PCR, og var den eneste av de tre prøvene med CT-verdi under 35. Prøvene 74 og 101 hadde CT-verdier på henholdsvis 35,68 og 35,75. Heller ikke i dette tilfelle kunne prøvene som var svakere enn CT=35 types, men enterovirus A71 ble sekvensert i prøve 91. På dette tidspunktet var altså alle spinalvæskene med CT-verdi under 35 typebestemt, enten med den originale eller den modifiserte metoden.

*Tabell 10: Spinalvæskene som ikke kunne types med den originale metoden. De fire med høyest virusinnhold ble forsøkt typebestemt med modifisert metode. De to spinalvæskene som hadde CT-verdi under 35 ved enterovirus-PCR ble typebestemt med den modifiserte metoden. CT-verdier over 35 er rødfarget.*

<b>PRØVE- NUMMER</b>	<b>DATO</b>	<b>CT-VERDI</b>	<b>NY TYPING</b>
101	08.12.2019	35,75	Mislykket
91	20.11.2019	31,54	Enterovirus A71
74	07.11.2019	35,68	Mislykket
64	30.10.2019	36,64	Ikke analysert
12	15.06.2019	29,35	Enterovirus A71
95	30.06.2018	36,66	Ikke analysert

### 3.5.2 Typing av SLP-typepanel med nye primere

Alle de tre SLP-panelene inneholdt prøver som ikke hadde blitt typet med metoden. Ifølge fasiten skulle alle disse inneholde enterovirus A71. SLP-typepanel fra 2016 inneholdt to prøver med enterovirus A71, hvor prøve 9 var en fortykning av prøve 1. Ved bruk av de nye primerne, designet for å bedre dekke enterovirus A71, kunne alle de fire prøvene typebestemmes. Metoden lyktes i å sekvensere enterovirus A71 i samtlige SLP-typepanel.

Det ble testet ut om den modifiserte metoden fortsatt kunne typebestemme prøver med innhold av de andre genotypene på A-siden. De nye primerne ble derfor testet ut på prøvene med innhold av enterovirus D68 og coxsackievirus A24 i de to SLP-typepanelene.

Enterovirus D68 kunne typebestemmes med den modifiserte metoden, og BLAST-søk ga treff med identity på 100%. Også coxsackievirus A24 ble identifisert, og beste treff ved BLAST-søk hadde identity på over 90% for begge prøvene. Kvaliteten på sekvensene var like god som ved den opprinnelige metoden.

## 4. Diskusjon

Ved å etablere en metode for å typebestemme enterovirus i ulike pasientprøver, vil de aller fleste enterovirusinfeksjoner kunne typebestemmes. Dette betyr at pasientene raskere får en presis diagnose og at man kan holde en god, løpende oversikt over enterovirus epidemiologien. Etter å ha analysert alle enterovirus-positive prøver det var tilgjengelig på, kunne metoden undersøkes for eventuelle svakheter og rom for forbedringer kunne sees på. Før metoden skal etableres til bruk i rutinediagnostikk er det viktig at den gir beste mulige resultater. Ulike forhold som kan påvirke metodens sensitivitet ble derfor undersøkt.

### 4.1 Valg av primere og instrument

Som beskrevet tidligere ble det første analyseoppsettet utført parallelt på de to instrumentene SmartCycler og MyGo Mini. Ved nested PCR og sekvensering ble de to prøvene analysert parallelt med det opprinnelige primersettet og primersettet som inneholdt todelt forlengs primer. De to prøvene som ble analysert var to tilfeldig valgte sekreter fra listen som ble brukt til utprøving av de to instrumentene og A-primersettene ved nested PCR. Det ble valgt to sekreter ettersom hånd- fot- og munnsyke oftest er forårsaket av en infeksjon med genotyper fra gruppe A (WHO, 2011). Coxsackievirus A6 ble funnet i prøve 2, og sekvensene av denne prøven ble derfor brukt videre til å sammenligne de ulike metodene. Det ønskelige hadde vært å få mulighet til å sammenligne sekvenser fra begge prøvene, men prøve 3 var ikke mulig å typebestemme ved noen av metodene. Det ble bestemt at sekvenseringsresultatene fra prøve 2 var tilstrekkelig, ettersom det var så tydelig forskjell mellom de ulike metodene.

Sekvensene hvor prøven hadde vært gjennom PCR-reaksjoner på SmartCycler skilte seg umiddelbart ut, da de inneholdt lite kryssreaktivitet og enkelt kunne tolkes av programvaren. Prøvene analysert på MyGo Mini fikk mer utydelige sekvenser som i større grad måtte tolkes manuelt. Sekvensene inneholdt mye mer forstyrrende signaler og kryssreaksjoner med annet DNA. Riktig målsekvens ble sekvensert ved begge metoder, og det var mulig å identifisere genotypen ved å gjøre BLAST-søk av sekvensene. Derimot var det forskjell på søkeresultatene, da forlengs sekvenser etter å ha kjørt prøvene på MyGo Mini ga dårligere match og score enn etter å ha kjørt dem på SmartCycler. Det ble derfor allerede på dette tidspunktet valgt å gå helt bort fra analyseinstrumentet MyGo Mini, og å gå videre med å bruke SmartCycler til PCR-analysene.

For å sammenligne de to forward primerne ble det sammenlignet sekvenser av prøver kjørt på SmartCycler. Både de nye, todelte forlengs primerne og de originale forlengs primerne ga sekvenser som var lette å tolke, med tydelige basesignaler og lite kryssreaktivitet. Likevel var det at de nye primerne ga finere sekvenser enn de originale primerne. Dette var forventet, da man ved å bruke to ulike primere kan redusere det totale antallet primerkombinasjoner. Det ble valgt å bruke de todelte primerne videre i prosjektet. Reverse sekvensene var også lette å tolke og ga samme resultater ved BLAST-søk som forlengs. Det betyr at det ved hvert oppsett er to muligheter for å gjøre BLAST-søk av hver prøve.

#### 4.2 Sekvenser og BLAST-søk

Sekvensene av enterovirus var som regel 300-320 basepar lange. Mange av sekvensene var ryddige, tydelige og ble tolket automatisk av programvaren. Her var det kun nødvendig å trimme bort 50-60 basepar i starten og 20-30 basepar på slutten av sekvensen. Ved BLAST-søk følger flere parametere med hvert treff; «max score», «total score», «query cover» og «prosent identity». Score blir regnet ut fra hvor mange baser i søkesekvensen som matcher med treffsekvensen. Query cover er hvor stor prosentandel av søkesekvensen som matcher med treffsekvensen. Ved nok trimming i begynnelsen og slutten av sekvensen før søk, var denne alltid 99-100%. Prosent identity var den viktigste parameteren, ettersom den ga informasjon om hvor godt treffsekvensen matchet den matchende delen av søkesekvensen. Ettersom sistnevnte parameter var den viktigste, ble treffene i BLAST sortert etter denne.

Ikke alle sekvenser var like tydelige, og ved flere anledninger inneholdt sekvensene kryssreaksjoner som ble trimmet bort. Dette fantes oftest i starten av sekvensen, og noen ganger ble opptil 150-170 baser fjernet. Selv om kun 100-150 baser i noen tilfeller ble brukt videre til BLAST-søk, var det fullt mulig å identifisere genotypen med høy prosent identity og god avstand til neste alternative genotype. I noen tilfeller skjedde det en kryssreaksjon med humant DNA, hvor sekvensene inneholdt en lang sekvens etter basepar 300-320. Signalene var svakere, slik at det var mulig å se et skille mellom den ønskede sekvensen og det som var en kryssreaksjon. Sekvensene ble trimmet som vanlig, slik at den lange sekvensen med kryssreaksjon ble kuttet bort. Kryssreaksjonen hadde da ingen påvirkning på BLAST-søket.

I de aller fleste tilfellene ga BLAST-søk av sekvensen kun treff på en genotype. I disse tilfellene var det lett å konkludere med hvilken genotype prøven inneholdt. I svært sjeldne tilfeller ga BLAST-søk treff på flere enn en genotype. I disse tilfellene var det kun én til tre treff på en genotype blant mange av en annen. Ettersom GenBank gir tilgang på alle offentlig tilgjengelige nukleotidsekvenser, må man være kritisk til referansene. Det ble gjort BLAST-søk av de unntvikkende treffene for å se om de var representative for sin genotype. Disse kom da alltid ut som uteliggere og ble oppfattet å representere feilannonserte referanser.

Enkelte av forlengs sekvensene inneholdt doble signaltopper, hvor samtlige av signalene hadde et mindre signal (av samme type) en posisjon til venstre for seg. Det ble konkludert med at dette sannsynligvis oppstod fordi målsekvensene for primerne noen ganger inneholdt repetitive basemønstre. Dette gjør at en liten andel av de degenererte primerne noen ganger kunne binde en base forskjøvet, slik at resten av signalene også forskyves med en base. Dette ble ofte observert i forlengs sekvenser av coxsackievirus A6, men var aldri et problem ved revers sekvensering.



### 4.3 Metodens sensitivitet og mulige påvirkninger

Av totalt 120 prøver ble 99 typebestemt (82,5%). Det lyktes ikke å typebestemme de resterende 21 prøvene med metoden. Mulige årsaker til dette som ble undersøkt var type prøvemateriale, type enterovirus, CT-verdi fra enterovirus-PCR fra rutinediagnostikk og innhold av humant DNA i prøvene. Det ble også undersøkt hvor god sensitivitet som normalt kan forventes av en slik metode, basert på hvor stor andel av prøvene som kunne typebestemmes i andre studier.

Tidligere studier hvor metodens sensitivitet og typingsmulighet er diskutert, tyder på at det er vanskelig å typebestemme alle prøver. I en studie fra Australia hvor 729 spinalvæsker fra 2003-2007 ble analysert, var det kun 43% som lot seg typebestemme (Papadakis et al., 2014). Ved Nasjonalt referansesenter for enterovirus i Belgia ble det utført en studie som inkluderte prøver fra 2007-2018. Av de totalt 1702 enterovirus-positive prøvene lyktes det å typebestemme 89% (Wollants et al., 2019). Hayes et al. (2019) utførte en studie for å evaluere kvaliteten på metodene for deteksjon og typing av enterovirus hos 39 laboratorier i 17 ulike land i Europa. Av laboratoriene som deltok hadde 17 status som referanselaboratorier. Prøvene som ble sendt til laboratoriene inneholdt to ulike konsentrasjoner av viruset (10 og 1000 kopier per 5 µL), og resultatene viste stor forskjell mellom de to nivåene. Prøvene med høy konsentrasjon ble vellykket typet hos 88% av referanselaboratoriene og 71% av de diagnostiske laboratoriene, mens prøvene med lav konsentrasjon kun ble typet hos 41% av referanselaboratoriene og 31% av de diagnostiske laboratoriene (Hayes et al., 2019).

Det er vanskelig å sammenligne resultatene fra denne studien med andre studier direkte på grunn av at sensitiviteten vil avhenge av hvilke typer prøver som er inkludert og sannsynligvis også av hvilke genotyper som dominerer i materialet. Det gir allikevel en god indikasjon på hva man kan forvente. At det i denne studien ble typebestemt hele 82,5% av prøvene tyder på at metodens sensitivitet er god, og at den er på et tilfredsstillende nivå sammenlignet med andre laboratorier som utfører typing av enterovirus. Selv om metoden er god, ble det sett på mulige årsaker til at ikke 100% av prøvene kunne types.

For å undersøke eventuelle svakheter ved metoden ble det sett etter sammenhenger mellom de 21 prøvene som ikke kunne typebestemmes. Ingen av de 11 prøvene med CT>35 var mulige å type med metoden, noe som tyder på at CT-verdi ved enterovirus-PCR har en sammenheng med om prøven kunne typebestemmes eller ikke. Dette var også forventet på forhånd, ettersom et lavt innhold av enterovirus i prøvene gjør at primerne har større sannsynlighet for

å binde til annet DNA i prøven. Et spørsmål er da hvor lavt virusinnholdet kan være for at metoden skal kunne typebestemme viruset i prøven.

Det ble observert at flere av prøvene som ikke kunne typebestemmes var innhentet fra pasienter hvor metoden hadde påvist enterovirus A71 i en annen prøve. Av de 21 prøvene var 6 innhentet fra pasienter med enterovirus A71. I tillegg klarte ikke metoden å type enterovirus A71 i SLP-panelene. Dette vekket mistanke om at metoden hadde en svakhet ved deteksjon av denne genotypen. De 4 siste prøvene som ikke ble typet var tre fecesprøver og ett halssekret. Vi vet ikke grunnen til at enterovirus fra disse ikke lot seg genotype. Vi foreslår at kryssreaktivitet mot humant eller bakterielt DNA er den mest sannsynlige årsaken.

#### 4.3.1 CT-verdi ved enterovirus-PCR

På bakgrunn av at ingen av prøvene med CT-verdi på over 35 ved enterovirus-PCR var mulige å type med metoden, var det sterk mistanke om at viruskonsentrasjon hadde mye å si for typingsmuligheten. Høyere innhold av enterovirus i prøven øker også sannsynligheten for at riktig sekvens fanges opp av primerne ved PCR, og minsker sjansen for kryssreaktivitet. Det ble undersøkt om det fantes en statistisk sammenheng mellom typingsmulighet og CT-verdi ved enterovirus-PCR. Dette ble først visualisert ved å plote de to variablene mot hverandre (figur 7), og generere en trendlinje mellom punktene. Trendlinjen fikk et stigningstall på -3,34, som tydet på at det forelå en negativ korrelasjon mellom CT-verdi og typingsmulighet. Pearsons korrelasjonstest ble benyttet for å måle styrken på korrelasjonen mellom de to variablene, typingsmulighet og CT-verdi, hvor 1 eller -1 betyr sterk korrelasjon og 0 betyr ingen korrelasjon (Sedgwick, 2012). Deretter ble det gjort en signifikanstest for å undersøke om det forelå en signifikant korrelasjon. Korrelasjonskoeffisienten ble regnet ut til -0,50, som betyr at det foreligger en negativ korrelasjon, men det var nødvendig å gjøre en signifikanstest. Den utregnede p-verdien på  $6,94 \cdot 10^{-9}$  var mindre enn den valgte  $\alpha$ -verdi på 0,0025, som betyr at det forelå en signifikant korrelasjon.

Så langt har ingen prøver med svakere viruskonsentrasjon enn CT=35 kunnet types med metoden. Derimot ble det typebestemt prøver som var tett opptil CT-verdi på 35 ved enterovirus-PCR, som tyder på at grensen for om prøven kan typebestemmes eller ikke ligger rundt dette nivået. På grunn av for få prøver med konsentrasjon i dette området kan det ikke konkluderes med at metoden ikke kan typebestemme prøver med svakere viruskonsentrasjon

enn CT=35, ei heller settes en grense for hvor høyt virusinnholdet må være. Det regnes også med at det kan variere etter genotype og type prøvemateriale.

#### 4.3.2 Type prøvemateriale

Alle sår- og blommesekreter og de fleste luftveisprøver med CT under 35 ble typet. Noen av luftveisprøvene med CT under 35 var ikke mulige å type, noe som kan skyldes høyt innhold av humant eller bakterielt DNA. Dette i kombinasjon med degenererte primere gjør at det øker sannsynlighet for kryssreaktivitet eller at primerne binder uspesifikt og annet DNA enn enterovirus-DNA blir oppamplifisert. Det ble forsøkt gjort BLAST-søk selv om sekvensene var veldig uklare, men det ble ingen treff på enterovirus. Ved typing av sekreter og luftveisprøver var de fleste sekvensene av svært god kvalitet. Spesielt på B-siden og de reverse på A-siden hadde sekvensene sterke signal med lite kryssreaksjoner. For samtlige av prøvene hvor sekvenseringen var vellykket, ga BLAST-søk treff på kun et enterovirus. Det vil si at det ikke var noen tvil om hvilket enterovirus prøven inneholdt. Av sår- og blommesekretene ble 89,2% typet, mens 73,9% av luftveisprøvene ble typet. Forskjellen skyldes antakeligvis ikke typen prøvemateriale, men hvilke genotyper som dominerte. De aller fleste sår- og blommesekretene inneholdt coxsackievirus A6, og ved nested PCR benyttes en egen primer med få degenererte posisjoner for akkurat denne genotypen. Sensitiviteten på denne genotypen forventes derfor å være meget god.

Feces var det prøvematerialet som oftest ga sekvenser som inneholdt kryssreaksjoner, og sekvensene hadde oftere behov for manuell tolkning enn de andre prøvematerialene. Feces er gjerne det prøvematerialet som har høyest innhold av andre bakterier og virus, og mye innhold av annet DNA øker sannsynligheten for kryssreaksjoner. Som vist i figur 8 var feces det prøvematerialet med lavest gjennomsnittlig CT-verdi, det vil si høyest innhold av enterovirus i prøvene. Dette var forventet, ettersom enterovirus primært infiserer celler i tarmtraktus og oppformerer der. På tross av at mange sekvenser inneholdt mye kryssreaksjoner og trengte noe manuell tolkning, ble hele 82,1% av fecesprøvene typet.

Spinalvæske var prøvematerialet med minst forurensninger av annet DNA. Naturlig finnes det ikke innhold av andre bakterier og virus som kan kontaminere. Et problem var at mange av spinalvæskene hadde et ganske lavt innhold av enterovirus, og fire av dem kunne ikke types antakelig på grunn av dette. Av spinalvæskene ble 81,3 % typet, deriblant de aller fleste spinalvæskene med CT-verdi under 35. Det at spinalvæske ofte har en lav viruskonsentrasjon,

gjorde at flere av spinalvæskene hadde en CT-verdi over 35, og ikke kunne typebestemmes med metoden. Dette viser viktigheten av å typebestemme enterovirus også i andre typer prøvemateriale som ofte har en høyere viruskonsentrasjon. Ved å typebestemme halsprøver og/eller feces i tillegg til spinalvæske, vil sannsynligheten for å kunne bestemme riktig genotype bli større.

Det var ingen tydelige sammenhenger mellom type prøvemateriale og mulighet for typing. Prosent andel typet varierte noe mellom de ulike prøvematerialene, men det er sannsynlig at dette skyldes andre betingelser enn type prøvemateriale.

#### 4.3.3 Innhold av RNase P i prøvene

Noen sekvenser inneholdt varierende signaler fra humant DNA. I mange tilfeller kunne delene av sekvensene som inneholdt humant DNA klippes bort, og det var mulig å gjøre BLAST-søk av kun enterovirus-sekvensen. I noen tilfeller inneholdt derimot sekvensene kun humant DNA. Det kunne tenkes at et høyt innhold av humant DNA ga økt sannsynlighet for kryssreaktivitet, og mindre mulighet for å typebestemme enteroviruset i prøven. Dette gjorde det aktuelt å analysere innhold av humant DNA i prøvene. Det ble utført en sanntids-PCR analyse av RNase P- genet. Om den var positiv eller ikke kunne leses av CT-verdien, og de positive hadde vanligvis CT-verdi mellom 20 og 30. Høyeste mulige CT-verdi var 40, og denne regnes som negativ.

Mange av prøvene ble undersøkt for RNase P, men ikke alle. Årsaken til at ikke alle ble analysert, var at det for noen av prøvene ikke var tilstrekkelig prøvemateriale igjen. Likevel var det nok til å undersøke om det kunne være en sammenheng mellom mulighet for genotyping og innhold av humant DNA i prøven. Det ble ikke funnet noen sammenheng. Det betyr at innhold av humant DNA sannsynligvis ikke har påvirket om enterovirus i prøvene kunne types eller ikke.

Innhold av RNase P i prøvene ble studert per prøvemateriale. Årsaken til dette er det ulike innholdet i de fire ulike typene prøvemateriale. Feces inneholder svært mye mer bakterielt DNA enn de andre prøvematerialene og dermed er kryssreaktivitet et stort problem her. Innhold av bakterielt DNA kan også spille en stor rolle ved analysering av RNase P i luftveissekret. Selv om det ble skilt mellom de ulike prøvematerialene ble likevel

konklusjonen den samme; det var ingen signifikant sammenheng tilstede mellom innhold av RNase P i prøvene og hvorvidt de kunne genotypes.

#### 4.3.4 Sensitivitet ved deteksjon av ulike genotyper

En feilkilde som ble tatt i betraktning var at metodens sensitivitet kunne variere etter hvilken enterovirus genotype prøven inneholdt, selv om metoden var designet for å dekke alle de klinisk relevante typene. Det ble analysert tre SLP-panel som kvalitetskontroller for å teste analysekvaliteten på identifisering av de forskjellige genotypene og for å avdekke eventuelle svakheter ved typing av ulike genotyper. Det ble både analysert et vanlig SLP-panel for påvisning av enterovirus og to SLP-typepanel. Selv om det første panelet var beregnet for kontroll av metoden for påvisning av enterovirus (EV-PCR), var det oppgitt hvilken genotype prøvene inneholdt. Av de 8 prøvene i typepanelet kunne 6 typebestemmes, én prøve var negativ og en prøve kunne ikke typebestemmes. Den prøven som ikke kunne types, inneholdt ifølge fasiten enterovirus A71. Det ble bestemt at det også skulle analyseres to typepanel, ettersom disse var mest relevante for testing av metoden, og det var ønskelig å sekvensere så mange ulike genotyper som mulig. Til sammen i de tre SLP-panelene lyktes det å sekvensere 9 ulike enterovirus genotyper. Også i hvert av de to SLP-typepanelene var det 1-2 prøver som ikke kunne types med metoden, og ifølge fasiten inneholdt alle disse enterovirus A71.

Enterovirus A71 ble detektert i tre av pasientprøvene analysert med metoden. Alle tre prøvene var feces, og de var innhentet hos to forskjellige pasienter. Det vil si at genotypen har sirkulert, og det er sannsynlig at flere enn de to pasientene som har avgitt de typede prøvene har vært smittet av genotypen. Alle prøvene hadde også et høyt innhold av viruset, ettersom CT-verdiene var på 22,27 til 23,64 ved enterovirus-PCR. De to pasientene i prosjektet som fikk påvist enterovirus A71 i feces hadde også avgitt spinalvæske og luftveissekret med lavere viruskonsentrasjon som ikke kunne types. Dersom metoden hadde vært i stand til å detektere svakere konsentrasjoner av enterovirus A71, ville den totale andelen typebestemte prøver gått opp. Det er også mulig at enda flere av prøvene som ikke er typet med metoden inneholder enterovirus A71. Ettersom genotypen har vist seg å gi enterovirus meningitt, noe det har vært flere tilfeller av i 2019, er det spesielt viktig at metoden dekker den. Mot slutten av prosjektet ble det derfor forsøkt å forandre på metoden for å bedre kunne identifisere enterovirus A71.

Noe som kan ha påvirket typingsprosenten i positiv retning, var utbruddet av hånd-fot og munnsyke hos barnehagebarn forårsaket av coxsackievirus A6. Det ble funnet denne genotypen i 42,4% av de typede prøvene, hvor den svakeste prøven hadde en CT-verdi på 34,46. Som nevnt tidligere ble det brukt en egen spesifikk coxsackie A6 forlengs primer, og metoden burde derfor være ekstra sensitiv til deteksjon av denne genotypen. Faktisk ble alle sekretene med CT-verdi under 35 typebestemt, men hele 91% av dem inneholdt coxsackievirus A6. Dette har i stor grad bidratt til å dra opp andelen typebestemte prøver. Alle enterovirus-positive prøver fra 2019 ble imidlertid analysert, slik at utvalget er representativt for enterovirus-prøvene som analyseres ved laboratoriet i løpet av et tidsrom.

#### 4.4 Genotyper detektert

Før metoden etableres ved laboratoriet skal den være i stand til å typebestemme alle de klinisk relevante genotypene av enterovirus. Ved å analysere så mange pasientprøver som mulig, ville man forhåpentligvis kunne sekvensere så mange av de relevante genotypene, og kanskje avdekke svakheter ved metoden. Enterovirus-positive prøver arkiveres vanligvis i ett år før de kastes. Unntaket er spinalvæsker som lagres til «evig» tid, og derfor var disse tilgjengelige fra lenger tilbake enn ett år. Ettersom spinalvæskene er samlet inn fra pasienter med meningitt, ville disse vært viktigst å type i rutinediagnostikken. Meningitt kan forårsakes av mange ulike genotyper av enterovirus, og det var ønskelig å sekvensere så mange ulike genotyper som mulig. Vi inkluderte derfor alle de 23 spinalvæskene som var tilgjengelige fra 2018.

Ved analysering av pasientprøver ble det sekvensert og identifisert 15 ulike genotyper. På grunn av utbruddet av hånd-, fot- og munnsyke forårsaket av coxsackie A6, utgjorde disse den største andelen. Metoden var også i stand til å detektere coxsackievirus A10, coxsackievirus A16, coxsackievirus A2, coxsackievirus A4, coxsackievirus A8, coxsackievirus B4, coxsackievirus B5, echovirus 5, echovirus 11, echovirus 13, echovirus 30, echovirus 7 i pasientprøvene. Enterovirus A71 ble detektert i tre fecesprøver med relativt høyt innhold av virus, men ikke i spinalvæske eller luftveisprøver fra de samme pasientene. Hos alle pasientene som avga flere ulike typer prøvematerialer, var det mulig å typebestemme enterovirus i minst ett av dem. Alle disse hadde meningitt, og enterovirus ble derfor forsøkt typebestemt i spinalvæske. I flere av tilfellene var spinalvæsken for svakt positiv til å kunne typebestemmes, men da kunne viruset typebestemmes i andre prøvematerialer. Dette viser viktigheten av å analysere ulike typer prøvematerialer, spesielt ved meningitt.

Noe av hensikten med å analysere SLP-paneler var å dekke flere genotyper, gjerne noen som ikke kunne finnes i pasientprøvene. Faktisk bestod SLP-panelene av et flertall av genotyper som ikke hadde blitt funnet i pasientprøvene. Resultatene viste at metoden kunne benyttes til å sekvensere enda flere genotyper. Oversikt over de tre panelene finnes i tabellene 7, 8 og 9. Noen av genotypene gikk igjen i SLP-panelene, og ble derfor testet opp til tre ganger. Genotypene som uten problemer ble detektert med metoden var coxsackievirus A9, coxsackievirus A21, coxsackievirus A24, coxsackievirus B3, echovirus 6, echovirus 18, echovirus 25 og enterovirus D68. To av genotypene som fantes i SLP-panelene var også detektert i pasientprøver. Echovirus 30 ble detektert i flere pasientprøver og kunne types fra SLP-panel uten problemer. Den andre var enterovirus A71, som ikke var så lett å type i pasientprøver. Alle de tre SLP-panelene inneholdt en eller to prøver av denne genotypen, men ingen av dem kunne types med metoden. Metodens sensitivitet ved deteksjon av enterovirus A71 er tidligere diskutert i kapittel 4.3.4.

Totalt i pasientprøver og SLP-panel detekterte vi 23 ulike genotyper.

#### 4.4.1 Genotyper og klinikk

Noen av genotypene ble kun detektert i ett prøvemateriale, mens de fleste ble detektert i flere typer prøvemateriale. I sår- og blemmesekretene samlet inn fra pasienter med hånd- fot- og munnsyke ble det kun funnet coxsackievirus A6 og coxsackievirus A10. Et utbrudd av coxsackievirus A6 gjorde at denne genotypen ble funnet i hele 42,4% av de typede prøvene. Tidligere studier viser også at hånd-, fot- og munnsyke oftest forårsakes av enterovirus i gruppe A (Xu et al., 2013, WHO, 2011). I tillegg til i sekret ble genotypen funnet i spinalvæske hos en pasient med enterovirus-meningitt. Det betyr at en infeksjon med genotypen i noen tilfeller kan føre til enterovirus-meningitt.

I flertallet av spinalvæskene ble det funnet gruppe B genotyper. I 10 av de totalt 26 typede spinalvæskene ble det detektert echovirus 9, og i 9 av spinalvæskene ble det funnet echovirus 30. Både echovirus 9 og echovirus 30 ble også detektert i luftveisprøver og feces, men ikke i noen av sekretene. Det vil si at disse genotypene ikke i noen av de undersøkte tilfellene forårsaket hånd-, fot- og munnsyke.

Den store andelen av echovirus 9 og echovirus 30 i spinalvæskene fra 2018 tyder på at det har vært utbrudd av disse to genotypene som har gitt meningitt hos flere. Begge genotypene er av gruppe B enterovirus. Fra dette tidsrommet ble kun enterovirus fra spinalvæsker typebestemt, slik at alle prøvene hvor de to genotypene ble detektert var fra pasienter med enterovirus-meningitt. Folkehelseinstituttet rapporterte i 2018 om et utbrudd av echovirus 30 som forårsaket meningitt både hos voksne og små barn, og som pågikk over sesongene 2017 og 2018. Genotypen opptrer vanligvis i epidemier med omtrent 5 års intervaller, og kan noen ganger gå over to sesonger (Folkehelseinstituttet, 2018).

Selv om enterovirus A71 ikke kunne detekteres i noen spinalvæsker ved metoden, ble genotypen detektert i feces innhentet fra to pasienter med meningitt i 2019. Det betyr at en infeksjon av denne genotypen sannsynligvis kan forårsake meningitt. Enterovirus A71 og coxsackie A6 var de eneste genotypene i gruppe A enterovirus som ble detektert hos pasienter med meningitt. I tidligere studier har man også sett at gruppe B enterovirus oftere forårsaker meningitt enn gruppe A enterovirus (de Crom et al., 2016, Papadakis et al., 2014).

Enterovirus 71 har vist seg å kunne gi en rekke forskjellige sykdomsbilder, men kan også være asymptomatisk. Vanligvis blir i størst grad barn berørt av et utbrudd, hvor de vanligste sykdomsbildene har vært hånd-, fot- og munnsyke og aseptisk meningitt (Ooi et al., 2010). Genotypen har også i sjeldne tilfeller gitt alvorlig sykdom hos barn som har resultert i død (WHO, 2011). Etersom en infeksjon med genotypen kan få svært alvorlige konsekvenser, vil det være spesielt viktig at den kan typebestemmes med metoden som skal etableres ved laboratoriet.

#### 4.4.2 Enterovirus-positive prøver fra 2019

Alle de enterovirus-positive prøvene fra 2019 var bevart i arkiv og ble forsøkt typebestemt. Etersom alle prøvene fra 2019 ble analysert, er utvalget derfor representativt for enterovirus-prøvene som analyseres ved laboratoriet i et tidsrom. Av 71 prøver samlet inn i 2019 ble 55 typebestemt, som vil si 77,5%. Relativt få tilfeller av enterovirus-meningitt i 2019 gjorde at det kun ble samlet inn åtte spinalvæsker i løpet av året. Kun tre av disse var mulige å typebestemme med metoden, mens ytterligere to ble genotypet etter modifikasjon, noe som gav bedret sensitivitet for EV A71.



Resultatene fra 2019 var dominert av utbruddet av hånd-, fot- og munnsyke forårsaket av coxsackievirus A6. Flertallet av de smittede var barn i barnehage, men det kom inn prøver også fra voksne hvor coxsackievirus A6 ble detektert. På grunn av dette var de fleste av prøvene fra 2019 sekret med innhold av coxsackievirus A6. Genotypen ble også funnet i spinalvæske hos én av pasientene. Også andre genotyper ble detektert i prøvene samlet inn i løpet av året, men kun enkelttilfeller.

Prosentandelen som ble vellykket typet var noe lavere i 2019 enn for alle prøvene samlet. Det kan skyldes tilfeller av enterovirus A71, ettersom alle de tre prøvene som testet positivt for genotype A71 ble samlet inn det året. Det er allerede kjent at 6 av prøvene som ikke kunne typebestemmes var fra pasienter med enterovirus A71, og sannsynligheten er tilstede for at det var flere. Dersom de seks prøvene hadde blitt typet ved metoden, ville suksessraten økt til 87,5% for det totale antallet prøver og til 80% for prøvene fra 2019.

#### 4.5 Utprøving av nye primere med hensyn til enterovirus A71

Under studien oppdaget vi en mismatch mellom forward-primere og målsekvensen hos enterovirus A71 som gjorde at metoden flere ganger feilet i å typebestemme denne genotypen. Strategier for å bedre kunne detektere enterovirus A71 ble prøvd ut. En slik mismatch som den som ble oppdaget kan påvirke sensitiviteten til PCR-metoden. Mismatchen lå svært nær 3'-enden på forlengs primeren i første PCR. Ettersom det gjaldt den fjerde basen fra 3'-enden, heter det at basen ligger i 3'-enderegionen, som er de 5 basene lengst mot enden. En mismatch nær 3'-enden har potensielt større negativ effekt på primerbindingen enn en mismatch nærmere 5'-enden, da en mismatch i 3'-enden kan forstyrre polymerasens aktive sete (Stadhouders et al., 2010). Den samme baseposisjonen var også en del av målsekvensen ved nested PCR, men var her den tiende baseposisjonen fra 3'-enden. Uansett vil enhver mismatch potensielt kunne påvirke metoden, slik at også ved nestingen ble det prøvd ut en modifisert primer.

To prøver ble analysert parallelt ved fire ulike strategier. Prøvene kunne types ved hjelp av alle de fire strategiene, men sekvensene var av varierende kvalitet. Ved den første PCR-reaksjonen ble det forsøkt to ulike strategier. Strategi 1 gikk ut på å legge til en tredje versjon av forlengs primer som kun dekket varianten som fantes hos enterovirus A71. Strategi 2 gikk ut på å endre variant 2 av forlengs primer ved å legge til en degenerert base som også dekket enterovirus A71. Strategi 2 ga i større grad kryssreaktivitet med humant DNA enn strategi 1.

Dette var forventet, ettersom flere degenererte baseposisjoner i en allerede høyt degenerert primer øker sannsynligheten for kryssreaksjoner betydelig.

Ved nested PCR og sekvensering ble det også prøvd ut to strategier. Strategi A gikk ut på å beholde primerne slik de var i den opprinnelige metoden, i tilfelle mismatchen ikke påvirket primerbindingen til enterovirus A71 i betydelig grad. Dersom dette var tilfellet, ville man beholdt den opprinnelige primeren for å minimere antall degenererte baseposisjoner. Strategi B var å endre CoxA F2 primeren til en som bedre dekket enterovirus A71. Det som ble gjort var å endre den tiende basen (fra 3'-enden) til en degenerert base som også matchet enterovirus A71 sekvensen. Ved sekvensering av spinalvæske ga både strategi 1A og 1B sekvenser med lite kryssreaktivitet. Det var større forskjell mellom de to strategiene ved sekvensering av fecesprøven, der 1A gav mer kryssreaktivitet enn 1B. Dette er på grunn av at feces inneholder hundrevis av bakteriearter i tillegg til humant DNA som primerne kan kryssreagere med, noe som gjør det vanskeligere å få fine sekvenser. Ved strategi 1B der man hadde en ikke-perfekt match mot enteroviruset ble det oppkopierte relativt sett mer bakgrunns-DNA enn når man hadde en perfekt match mot enteroviruset. Det ble valgt å bruke strategi 1B videre, som var en tredje variant av forlengs primer ved første PCR, og en ny variant av CoxA-F2 ved nesting. De nye primerne som ble valgt er gjengitt i tabell 3.

#### 4.5.1 Typebestemmelse av prøver ved modifisert metode

Fire av seks spinalvæsker som tidligere ikke var typet ble analysert med den modifiserte metoden (tabell 10). To av spinalvæskene ble genotypet med den modifiserte metode. De to øvrige prøvene hadde CT-verdi over 35 ved enterovirus-PCR, og det var derfor forventet at disse ikke ville la seg genotype. På dette tidspunktet var alle spinalvæskene med CT-verdi under 35 ved enterovirus-PCR blitt typebestemt, enten med den modifiserte eller den opprinnelige metoden. På bakgrunn av resultatene ser det ut som om metodens sensitivitet ved typebestemmelse av enterovirus A71 var like god som det den hadde vært ved typebestemmelse av resten av prøvene tidligere i prosjektet.

Også prøvene i SLP-panelene som ikke kunne types med den originale metoden ble forsøkt typet på nytt med de nye primerne. Fire SLP-prøver ble analysert, og enterovirus A71 ble vellykket sekvensert i alle. Også prøven i SLP-typepanel 2016 som var av lavere viruskonsentrasjon ble vellykket sekvensert og typet. Det konkluderes med at metodens evne til å typebestemme enterovirus A71 er tilfredsstillende.

Etter å ha endret metoden var det nødvendig å kontrollere at metoden fortsatt var i stand til å typebestemme andre genotyper i enterovirus gruppe A. Det optimale ville vært å analysere alle pasientprøvene på nytt med den nye metoden, men grunnet begrenset tilgang på tid og prøvemateriale lot dette seg ikke gjøre. SLP-panel skal gi en god indikasjon på hvilke genotyper metoden er i stand til å typebestemme, så det ble valgt å typebestemme disse på nytt. Prøvene i SLP-typepanelene som inneholdt genotyper på A-siden ble plukket ut og analysert med den modifiserte metoden. Det ble vurdert om det var nødvendig å analysere alle SLP-prøvene på nytt, men dette ble ikke sett på som hensiktsmessig ettersom kun A-primere ble endret ved nested PCR, og det å legge til en tredje variant av primere ved første PCR burde ha liten innvirkning. Typepanelene inneholdt tre prøver totalt med enterovirus gruppe A.

## 4.6 Metodediskusjon

Prosjektet er gjennomført ved et akkreditert laboratorium som stiller høye krav til kvalitet for sine analyser. Metodene for nukleinsyreekstraksjon og cDNA-syntese er gjennomført etter laboratoriets prosedyrer, og det ble benyttet de samme reagensene og instrumentene som brukes i rutinedriften. I tilfellene hvor tilgjengelig prøvemateriale har vært eluat eller cDNA i stedet for primærprøve, er disse i forbindelse med rutinediagnostikk blitt preparert av laboratoriepersonell etter gjeldende prosedyrer.

Det ble bestemt at det for alle prøvene skulle utføres nested PCR parallelt med både A-primere og B-primere. Etersom mange av prøvene som følge av krysreaktivitet ga positiv nested PCR med begge primersettene, ble det valgt å sekvensere prøven med de primerne som ga sterkest positivt svar først. I de fleste tilfellene lyktes det da å sekvensere og typebestemme viruset. Kun i to tilfeller (prøvene 34 og 32, en spinalvæske og en fecesprøve) skjedde typebestemmelse ved å sekvensere produktet fra den svakeste nested PCRen. I begge tilfellene var nested PCR sterkest positiv ved A-primere, mens prøven inneholdt en genotype fra gruppe B. Grunnen til at en reelt positiv reaksjon i gruppe B kommer senere enn krysreaktiviteten i gruppe A, kan skyldes bruken av LNA-baser i B-primere. Selv om disse gir høyere spesifisitet og bedre genotypingsrate totalt sett, så vi at PCR-effektiviteten gikk noe ned som følge av LNA-basene når vi testet på spinalvæsker. Dette er i praksis ikke et problem, bortsett fra at man for de få prøvene dette gjelder vil få et litt forsinket svar.

Metodens interne validitet sier noe om metoden gir riktige resultater. Ved sekvensering er sekvensen fasiten på hva som finnes i prøven. Den eneste muligheten for å få galt svar er derfor menneskelige feil eller unøyaktighet, som hvis prøvene i ett av trinnene er blitt byttet om eller ved kontaminering mellom prøvene. Dersom det hadde blitt gjort en teknisk feil under utførelse av analysene, ville det i de fleste tilfeller ha ført til at sekvenseringen hadde mislyktes.

Alle analysene i metoden med unntak av kapillærelektroforese ved Sanger-sekvensering ble utført av forfatter av masteroppgaven. Dette kan være en svakhet, da forfatter ikke hadde kjennskap til noen av metodene fra før av. Før oppstart av prosjektet ble det gjennomført en grundig opplæring i bruk av de ulike metodene og analyseinstrumentene. Det å arbeide i de ulike arbeidssonene på et molekylærbiologisk laboratorium var også en viktig del av opplæringen, ettersom dette er kritisk i forhold til å unngå kontaminering. En eventuell

kontaminering kunne gått utover analyseresultatet av de andre prøvene i samme oppsett, men også i andre metoder.

Studiens eksterne validitet er hvor vidt resultatene kan generaliseres, det vil si om utvalget er representativt. Det at alle de enterovirus-positive prøvene fra 2019 ble inkludert i studien er positivt for den eksterne validiteten, ettersom det gir et utvalg som er representativt for hvilke enterovirus-prøver som analyseres ved Haukeland universitetssjukehus innenfor et tidsrom. I tillegg tok vi med spinalvæsker, som er den viktigste prøvetypen, fra hele 2018.

Typebestemmelse av prøvene har også gitt en oversikt over hvilke typer av enterovirus som har sirkulert blant pasientene testet ved Mikrobiologisk avdeling, HUS. Det er sannsynlig at disse genotypene har sirkulert i samfunnet i tidsrommet som er undersøkt. Studiens resultater er i stor grad relevante ved fremtidig etablering av metoden for enterovirus typebestemmelse ved avdelingen, og er på denne måten generaliserbare når metodens sensitivitet skal studeres. Det ble avdekket at primerne benyttet i metoden inneholdt en mismatch med enterovirus A71, noe som førte til at metoden ble endret. Metodens evne til å typebestemme enterovirus A71 vil være viktig i diagnostikken ettersom genotypen kan forårsake alvorlig sykdom hos barn, som beskrevet tidligere.

## 5. Konklusjon

I studien ble det undersøkt to ulike problemstillinger. Metodens diagnostiske sensitivitet ble undersøkt basert på resultater fra 120 pasientprøver og de tre SLP-panelene. Av de 120 prøvene ble 99 typebestemt, som utgjorde 82,5%. Sammenlignet med andre studier ble metodens sensitivitet sett på som god, men mulige forhold som kunne påvirket sensitiviteten ble undersøkt. Det ble konkludert med at metodens sensitivitet var mindre god på genotypen enterovirus A71, grunnet en mismatch med primerne. Etter en forandring på noen av primerne lyktes det å sekvensere ytterligere tre spinalvæsker slik at den diagnostiske sensitiviteten økte til 85%. I tillegg ble alle SLP-prøvene vellykket genotypet. Det ble også konkludert med at lavt innhold av virusmengde i prøven hadde negativ innvirkning på metodens sensitivitet, og ingen prøver med CT-verdi over 35 ved enterovirus-PCR ved rutinediagnostikk kunne typebestemmes.

Alle enterovirus-positive prøver som var samlet inn i 2019 ble analysert. Resultatene var sterkt dominert av coxsackievirus A6, som ble funnet i over halvparten av prøvene. Genotypen forårsaket et utbrudd av hånd-, fot- og munnsyke hos barnehagebarn, noe som førte til at laboratoriet mottok et stort antall sekreter i løpet av dette året. Få tilfeller av enterovirus meningitt førte til at det kun var 7 spinalvæsker å analysere fra dette året. Genotyper som ble funnet i disse var echovirus 7, echovirus 5 og coxsackie A6, men også enterovirus A71 etter analysering med modifiserte primere.

Metoden ble justert helt på slutten av prosjektet, og derfor var det ikke anledning til fullstendig utprøving av de modifiserte primerne. Kun prøvene i SLP-panel på A-siden ble analysert, samt fire spinalvæsker som ikke hadde blitt typebestemt med den opprinnelige metoden. På bakgrunn av resultatene ser det ut som om sensitiviteten til metoden ikke ble påvirket negativt av modifiseringen, men videre utprøving er nødvendig.

## 6. Referanser

- B'KRONG, N. T. T. C., MINH, N. N. Q., QUI, P. T., CHAU, T. T. H., NGHIA, H. D. T., DO, L. A. H., NHUNG, N. N., VAN VINH CHAU, N., THWAITES, G., VAN TAN, L., VAN DOORN, H. R. & THANH, T. T. 2018. Enterovirus serotypes in patients with central nervous system and respiratory infections in Viet Nam 1997-2010. *Virology journal*, 15, 69-69.
- DE CROM, S. C. M., ROSSEN, J. W. A., DE MOOR, R. A., VELDKAMP, E. J. M., VAN FURTH, A. M. & OBIHARA, C. C. 2016. Prospective assessment of clinical symptoms associated with enterovirus and parechovirus genotypes in a multicenter study in Dutch children. *Journal of Clinical Virology*, 77, 15-20.
- DUMAIDI, K. & AL-JAWABREH, A. 2017. Molecular detection and genotyping of enteroviruses from CSF samples of patients with suspected sepsis-like illness and/or aseptic meningitis from 2012 to 2015 in West Bank, Palestine. *PLoS One*, 12, e0172357.
- FOLKEHELSEINSTITUTTET. 2010. *Hånd-, fot- og munnsyke og andre coxsackievirusinfeksjoner - veileder for helsepersonell* [Online]. Available: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/coxsackievirusinfeksjon---veileder/> [Accessed 27.04.20].
- FOLKEHELSEINSTITUTTET. 2015. *Enterovirusinfeksjoner - veileder for helsepersonell* [Online]. Available: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/enterovirusinfeksjoner---veileder-f/#om-enterovirusinfeksjoner> [Accessed 11.09.18].
- FOLKEHELSEINSTITUTTET. 2018. Økning av enterovirus-infeksjoner i juni. Available: <https://www.fhi.no/nyheter/2018/okning-av-enterovirus-infeksjoner-i-juni/>.
- GJERSTAD, L. & MYRVANG, B. 2018. Polio. *Store medisinske leksikon*.
- HAYES, A., NGUYEN, D., ANDERSSON, M., ANTÓN, A., BAILLY, J. L., BEARD, S., BENSCHOP, K. S. M., BERGINC, N., BLOMQVIST, S., CUNNINGHAM, E., DAVIS, D., DEMBINSKI, J. L., DIEDRICH, S., DUDMAN, S. G., DYRDAK, R., ELTRINGHAM, G. J. A., GONZALES-GOGGIA, S., GUNSON, R., HOWSON-WELLS, H. C., JÄÄSKELÄINEN, A. J., LÓPEZ-LABRADOR, F. X., MAIER, M., MAJUMDAR, M., MIDGLEY, S., MIRAND, A., MORLEY, U., NORDBØ, S. A., OIKARINEN, S., OSMAN, H., PAPA, A., PELLEGRINELLI, L., PIRALLA, A., RABELLA, N., RICHTER, J., SMITH, M., SÖDERLUND STRAND, A., TEMPLETON, K., VIPOND, B., VUORINEN, T., WILLIAMS, C., WOLLANTS, E., ZAKIKHANY, K., FISCHER, T. K., HARVALA, H. & SIMMONDS, P. 2019. A European multicentre evaluation of detection and typing methods for human enteroviruses and parechoviruses using RNA transcripts. *Journal of Medical Virology* [preprint] Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.25659> [Accessed 03.02.20]
- ICTV, I. C. O. T. O. V. 2019. *Genus: Enterovirus* [Online]. Available: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus) [Accessed 27.04.20].
- KALLAND, K.-H., MYRMEL, H. & NORDBØ, S. A. 2005. Nukleinsyrediagnostikk i medisinsk mikrobiologi. *Tidsskr Nor Lægeforen*, 125: 3110-4.
- MÜLHARDT, C. 2007. *Molecular Biology and Genomics*, Burlington, UNITED STATES, Elsevier Science & Technology.
- NASRI, D., BOUSLAMA, L., PILLET, S., BOURLET, T., AOUNI, M. & POZZETTO, B. 2007. Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus. *Expert Rev Mol Diagn*, 7, 419-34.

- OBERSTE, M. S., MAHER, K., FLEMISTER, M. R., MARCHETTI, G., KILPATRICK, D. R. & PALLANSCH, M. A. 2000. Comparison of Classic and Molecular Approaches for the Identification of Untypeable Enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1170.
- OBERSTE, M. S., MAHER, K., KILPATRICK, D. R. & PALLANSCH, M. A. 1999. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol*, 73, 1941-8.
- OBERSTE, M. S., NIX, W. A., MAHER, K. & PALLANSCH, M. A. 2003. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *Journal of Clinical Virology*, 26, 375-377.
- OOI, M. H., WONG, S. C., LEWTHWAITE, P., CARDOSA, M. J. & SOLOMON, T. 2010. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *The Lancet Neurology*, 9, 1097-1105.
- PAPADAKIS, G., CHIBO, D., DRUCE, J., CATTON, M. & BIRCH, C. 2014. Detection and genotyping of enteroviruses in cerebrospinal fluid in patients in Victoria, Australia, 2007–2013. *Journal of Medical Virology*, 86, 1609-1613.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463.
- SCHOALES, J. 2015. How Does Sanger Sequencing Work? Available: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/how-does-sanger-sequencing-work/> [Accessed 13.11.19].
- SEDGWICK, P. 2012. Pearson's correlation coefficient. *Bmj*, 345, e4483.
- STADHOUDERS, R., PAS, S. D., ANBER, J., VOERMANS, J., MES, T. H. M. & SCHUTTEN, M. 2010. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *The Journal of molecular diagnostics*, 12, 109-117.
- VAN LEER-BUTER, C. C., POELMAN, R., BORGER, R. & NIESTERS, H. G. M. 2016. Newly Identified Enterovirus C Genotypes, Identified in the Netherlands through Routine Sequencing of All Enteroviruses Detected in Clinical Materials from 2008 to 2015. *Journal of Clinical Microbiology*, 54, 2306-2314.
- WANG, H., TAO, K., LEUNG, C. Y., HON, K. L., YEUNG, C. M. A., CHEN, Z., CHAN, K. S. P., LEUNG, T.-F. & CHAN, W. Y. R. 2019. Molecular epidemiological study of enterovirus D68 in hospitalised children in Hong Kong in 2014-2015 and their complete coding sequences. *BMJ open respiratory research*, 6, e000437-e000437.
- WHO 2011. A guide to clinical management and public health response for hand, foot and mouth disease (HFMD). Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific.
- WOLLANTS, E., BELLER, L., BEUSELINCK, K., BLOEMEN, M., LAGROU, K., REYNDERS, M. & VAN RANST, M. 2019. A decade of enterovirus genetic diversity in Belgium. *Journal of Clinical Virology*, 121, 104205.
- XU, M., SU, L., CAO, L., ZHONG, H., DONG, N. & XU, J. 2013. Enterovirus genotypes causing hand foot and mouth disease in Shanghai, China: a molecular epidemiological analysis. *BMC infectious diseases*, 13, 489-489.



## Vedlegg

### Vedlegg 1 – Rådata fra typebestemmelse av pasientprøver.

F = forlengs, R = revers

Prøve	Prøvedato	Materiale	EV-PCR	1. PCR	Nested PCR		BLAST-søk		
			CT	CT	CT A-prim.	CT B-prim.	Treff	Identity	Sekvens
117	07.01.2020	Sekret	34,46	37,83	20,27	35,99	Coxsackie A6	100,00 %	F
115	06.01.2020	Spinalvæske	32,31	35,37	22,28	13,61	Echovirus 13	99,14 %	F
116	06.01.2020	Halssekret	27,19	28,65	19,91	12,37	Echovirus 13	99,14 %	F
114	24.12.2019	Feces	24,41	25,85	18,29	27,51	Coxsackie A6	100,00 %	F
111	22.12.2019	Sekret	23,02	25,13	17,29	31,56	Coxsackie A6	99,10 %	R
113	21.12.2019	Sekret	24,02	26,58	15,37	28,67	Coxsackie A6	97,74 %	R
112	20.12.2019	Sekret	22,31	25,47	18,16	28,96	Coxsackie A6	99,10 %	F
108	16.12.2019	Halssekret	31,24	34,5	21,16	0	Coxsackie A6	99,08 %	R
109	16.12.2019	Sekret	19,23	21,13	15,36	27,26	Coxsackie A6	99,08 %	F
110	16.12.2019	Halssekret	18,53	21,62	13,75	23,6	Coxsackie A6	100,00 %	F
107	12.12.2019	Sekret	29,65	32,85	20,89	0	Coxsackie A6	99,07 %	F
106	11.12.2019	Sekret	29,74	33,48	20,53	0	Coxsackie A6	99,70 %	R
105	10.12.2019	Halssekret	18,49	19,60	17,69	29,9	Coxsackie A6	98,92 %	R
103	09.12.2019	Sekret	25,71	27,62	18,68	30,8	Coxsackie A6	99,09 %	F
104	09.12.2019	Sekret	22,88	24,19	18,33	23,83	Coxsackie A6	99,05 %	F
101	08.12.2019	Spinalvæske	35,75	29,42	31,8	23,63			
102	06.12.2019	Halssekret	33,34	29,76	23,82	24,11	Coxsackie A6	99,57 %	R
100	02.12.2019	Sekret	26,96	30,25	21,8	32,67	Coxsackie A6	96,35 %	R
98	29.11.2019	Sekret	33,63	39,43	27,69	34,71	Coxsackie A6	99,55 %	F
99	29.11.2019	Halssekret	31,49	22,19	22,57	25	Coxsackie A6	98,65 %	R
97	26.11.2019	Sekret	33,16	35,52	20,51	36,32	Coxsackie A6	100,00 %	R
92	22.11.2019	Sekret	34,05	28,89	23,49	30,75	Coxsackie A6	74,41 %	F
85	21.11.2019	Feces	31,96	38,36	34,22	39,22			
89	21.11.2019	Cellekultur (hals)	29,51	27,59	29,95	38,05			
84	20.11.2019	Feces	22,99	26,8	28,08	29,92	Enterovirus A71	96,20 %	R
91	20.11.2019	Spinalvæske	31,54	39,12	34,58	0			
83	19.11.2019	Feces	22,11	22,54	26,33	16,45	Coxsackie B4	96,34 %	R
81	11.11.2019	Halssekret	22,79	24,19	19,24	36,17	Coxsackie A6	98,90 %	F
80	09.11.2019	Sekret	27,01	29,65	19,21	0	Coxsackie A6	99,10 %	F
77	08.11.2019	Feces	24,91	27,88	29,45	26,98	Echovirus 7	96,25 %	F
78	08.11.2019	Sekret	17,88	19,69	16,57	37,89	Coxsackie A6	98,74 %	R
82	08.11.2019	Feces	33,82	27,81	26,71	37,24			
74	07.11.2019	Spinalvæske	35,68	37,25	29,85	0			
73	06.11.2019	Sekret	35,28	38,08	34,49	0			
76	06.11.2019	Nasofarynkssekret	22,79	29,56	28,29	23,59	Echovirus 7	96,34 %	F
72	04.11.2019	Feces	24,78	28,76	22,44	13,76	Echovirus 13	97,62 %	F
69	01.11.2019	Sekret	18,37	21,77	13,82	0	Coxsackie A6	100,00 %	F
70	31.10.2019	Sekret	21,64	24,13	17,72	0	Coxsackie A6	98,73 %	F
71	31.10.2019	Feces	22,55	22,10	18,30	39,05	Coxsackie A6	99,53 %	F
64	30.10.2019	Spinalvæske	36,64	0	23,99	0			
67	30.10.2019	Spinalvæske	34,28	37,39	22,46	0	Coxsackie A6	98,32 %	R
68	30.10.2019	Sekret	31,47	34,14	20,51	0	Coxsackie A6	99,60 %	F
61	28.10.2019	Sekret	22,67	25,4	20,28	0	Coxsackie A6	98,75 %	R
57	25.10.2019	Halssekret	27,37	25,42	21,39	38,76	Coxsackie A6	97,79 %	R
54	23.10.2019	Feces	25,13	35,83	29,25	21,99	Echovirus 7	96,46 %	F
55	23.10.2019	Sekret	22,90	23,91	18,87	0	Coxsackie A6	99,15 %	R

## Vedlegg 1 forts.

34	22.10.2019	Spinalvæske	32,08	30,36	29.31	34.71	Echovirus 7	97,00 %	F
49	21.10.2019	Nasofarynkssekret	24,55	25,75	28.62	25.74	Echovirus 7	96,37 %	F
21	16.10.2019	Feces	22,57	20,18	18.93	34.80	Coxsackie A6	97,26 %	R
7	11.10.2019	Sekret	19,60	21,24	19.55	0	Coxsackie A6	99,59 %	F
18	11.10.2019	Sekret	23,88	27,79	16.40	37.08	Coxsackie A6	97,44 %	R
8	19.09.2019	Sekret	27,76	27,47	18.64	0	Coxsackie A6	99,59 %	F
11	11.09.2019	Sekret	37,85	26,3	30.19	33.79			
10	03.09.2019	Sekret	28,16	29,6	19.25	0	Coxsackie A6	99,56 %	F
1	27.08.2019	Feces	27,50	28,95	32.44	34.79			
122	26.08.2019	Feces	24,23	25,3	25.56	12.15	Coxsackie B4	96,79 %	R
2	12.07.2019	Sekret	26,98	16,94	16.45	35.29	Coxsackie A6	99,53 %	F
3	09.07.2019	Sekret	35,71	27,37	29.34	38.09			
4	02.07.2019	Feces	27,85	28,93	30.44	13.84	Echovirus 11	96,84 %	R
5	27.06.2019	Halssekret	24,14	21,23	22.21	35.10	Coxsackie A2	97,31 %	F
9	17.06.2019	Halssekret	31,02	28,18	29.25	33.46			
6	15.06.2019	Feces	23,64	29,23	29.60	0	Enterovirus A71	97,56 %	R
12	15.06.2019	Spinalvæske	29,35	30,77	31.18	39.44			
118	15.06.2019	Feces	22,27	28,4	29.35	26,4	Enterovirus A71	93,72 %	F
119	15.06.2019	Nasofarynkssekret	33,79	26,95	26,54	24,48			
13	31.05.2019	Feces	25,18	25,56	20.29	39.22	Coxsackie A6	99,55 %	F
14	20.05.2019	Feces	28,82	23,71	21.66	30.88			
15	06.05.2019	Sekret	22,74	23,25	18.70	35.43	Coxsackie A6	99,05 %	F
17	10.03.2019	Halssekret	24,25	25,25	29.48	14.42	Echovirus 5	89,16 %	R
16	10.03.2019	Spinalvæske	25,00	28,29	27.62	13.45	Echovirus 5	89,21 %	R
120	02.03.2019	Nasofarynkssekret	36,89	25,58	30,84	24,27			
19	11.02.2019	Sekret	24,74	26,09	19.45	0	Coxsackie A10	99,13 %	R
20	11.02.2019	Sekret	32,77	28,83	30.45	35.09	Coxsackie A10	98,59 %	R
121	07.01.2019	Nasofarynkssekret	33,82	25,56	27,7	22,54	Coxsackie A16	99,33 %	R
22	16.12.2018	Sekret	20,93	22,23	17.67	39.74	Coxsackie A6	98,65 %	R
23	14.12.2018	Feces	28,92	31,63	30.92	12.86	Echovirus 30	98,23 %	F
24	06.12.2018	Sekret	20,89	19,32	17.54	34.60	Coxsackie A6	99,12 %	F
25	03.12.2018	Halssekret	26,54	28,6	29.11	37.19			
27	03.12.2018	Sekret	36,89	25,25	29.31	34.69			
26	30.11.2018	Feces	29,77	25,24	24.41	39.69	Coxsackie A10	93,60 %	R
28	04.11.2018	Feces	23,80	26,76	21.23	14.30	Coxsackie B4	97,33 %	F
30	04.11.2018	Feces	37,1	28,66	32.61	0			
29	02.11.2018	Feces	21,87	23,15	22.39	13.78	Coxsackie B4	97,40 %	F
31	31.10.2018	Spinalvæske	33,98	34,65	27.87	16.34	Coxsackie B4	97,50 %	F
32	12.10.2018	Feces	28,3	19,45	21.64	26.25	Echovirus 9	98,81 %	F
33	11.10.2018	Sekret	31,97	33,63	20.69	0	Coxsackie A6	98,65 %	R
35	11.10.2018	Spinalvæske	31,89	34,4	32,97	21,55	Echovirus 9	99,62 %	R
36	09.10.2018	Spinalvæske	32,82	30,56	26,65	18,67	Echovirus 30	99,17 %	R
39	07.10.2018	Spinalvæske	28,31	33,09	28,12	16,5	Echovirus 9	99,60 %	R
37	04.10.2018	Halssekret	19,86	21,87	18.00	35.19	Coxsackie A8	96,44 %	F
40	04.10.2018	Spinalvæske	32,60	30,41	26,5	22,85	Echovirus 9	99,22 %	R
41	28.09.2018	Feces	26,56	25,16	24.40	16.64	Coxsackie B5	97,57 %	F
42	26.09.2018	Feces	29,09	24,7	26.09	17.81	Coxsackie B5	97,55 %	F
43	25.09.2018	Halssekret	27,71	31,37	25.43	37.95	Coxsackie A10	97,85 %	R

## Vedlegg 1 forts.

44	25.09.2018	Sekret	28,30	32,39	26,54	0	Coxsackie A10	98,21 %	R
45	24.09.2018	Spinalvæske	31,07	33,22	31,78	19,29	Echovirus 9	99,58 %	R
46	18.09.2018	Feces	22,01	22,95	28,15	26,82	Coxsackie A4	93,63 %	R
47	14.09.2018	Halssekret	26,08	28,15	30,32	12,17	Echovirus 30	96,77 %	R
50	12.09.2018	Feces	21,98	26,71	17,28	25,67	Coxsackie A16	97,93 %	R
48	11.09.2018	Spinalvæske	28,05	29,6	29,72	19,66	Echovirus 30	99,18 %	R
56	10.09.2018	Spinalvæske	33,78	36,36	34,5	26,52	Echovirus 9	98,86 %	F
52	10.09.2018	Nasofarynkssekret	37,55	31,25	32,12	25,16			
53	10.09.2018	Nasofarynkssekret	33,06	25,68	29,79	19,3	Echovirus 9	96,02 %	R
51	07.09.2018	Spinalvæske	25,06	29,48	29,73	23,13	Echovirus 9	94,19 %	F
58	01.09.2018	Spinalvæske	33,80	32,47	33,16	19,17	Coxsackie B5	98,72 %	R
59	01.09.2018	Spinalvæske	32,87	28,49	32,53	20,95	Coxsackie B5	96,70 %	R
60	01.09.2018	Spinalvæske	28,47	27,94	32,18	14,22	Echovirus 30	97,35 %	R
63	31.08.2018	Sekret	20,82	21,83	17,35	32,4	Coxsackie A6	99,95 %	F
62	28.08.2018	Feces	21,33	20,47	30,21	13,44	Echovirus 9	94,58 %	R
65	28.08.2018	Spinalvæske	30,45	29,4	28,58	14,46	Echovirus 30	99,60 %	R
66	11.08.2018	Spinalvæske	33,49	36,71	34,52	15,92	Echovirus 9	99,16 %	R
75	22.07.2018	Spinalvæske	28,01	27,88	29,71	16,32	Echovirus 9	99,15 %	R
79	16.07.2018	Spinalvæske	32,87	31,84	30,35	15,96	Echovirus 9	98,48 %	R
86	06.07.2018	Spinalvæske	28,84	30,27	27,52	15,22	Echovirus 9	99,17 %	R
90	05.07.2018	Spinalvæske	31,82	29,18	31,43	15,39	Echovirus 30	91,11 %	R
93	05.07.2018	Spinalvæske	29,68	34,35	23,19	13,19	Echovirus 30	99,59 %	R
87	04.07.2018	Spinalvæske	30,7	25,94	29,68	15,38	Echovirus 30	99,44 %	R
94	03.07.2018	Spinalvæske	30,22	33,32	30,52	15,7	Echovirus 30	99,58 %	R
95	30.06.2018	Spinalvæske	36,66	34,81	32,14	28,27			
96	29.06.2018	Spinalvæske	29,91	34,81	28,59	12,87	Echovirus 30	98,00 %	R

## Vedlegg 2 – Rådata fra RNase P

Prøve	Prøvedato	Materiale	RNaseP
117	07.01.2020	Sekret	38,29
115	06.01.2020	Spinalvæske	33,89
116	06.01.2020	Halssekret	31,24
114	24.12.2019	Feces	0
111	22.12.2019	Sekret	32,59
113	21.12.2019	Sekret	28,68
112	20.12.2019	Sekret	33,02
108	16.12.2019	Halssekret	37,77
109	16.12.2019	Sekret	29,09
110	16.12.2019	Halssekret	26,49
107	12.12.2019	Sekret	40
106	11.12.2019	Sekret	36,83
105	10.12.2019	Halssekret	24,91
103	09.12.2019	Sekret	35,68
104	09.12.2019	Sekret	28,14
101	08.12.2019	Spinalvæske	28,19
102	06.12.2019	Halssekret	28,09
100	02.12.2019	Sekret	36,88
98	29.11.2019	Sekret	0
99	29.11.2019	Halssekret	40
97	26.11.2019	Sekret	40
92	22.11.2019	Sekret	0
89	21.11.2019	Cellekultur (hals)	27,07
84	20.11.2019	Feces	0
91	20.11.2019	Spinalvæske	37,62
81	11.11.2019	Halssekret	26,51
77	08.11.2019	Feces	37,8
78	08.11.2019	Sekret	32,21
82	08.11.2019	Feces	37
74	07.11.2019	Spinalvæske	37,39
73	06.11.2019	Sekret	39,49
76	06.11.2019	Nasofarynkssekret	28,65
69	01.11.2019	Sekret	31,33
70	31.10.2019	Sekret	36,41
71	31.10.2019	Feces	38,9
67	30.10.2019	Spinalvæske	37,29
68	30.10.2019	Sekret	0
61	28.10.2019	Sekret	32,65
57	25.10.2019	Halssekret	29,96
54	23.10.2019	Feces	0
55	23.10.2019	Sekret	31,74
34	22.10.2019	Spinalvæske	30,22
49	21.10.2019	Nasofarynkssekret	28,68
7	11.10.2019	Sekret	32,39
18	11.10.2019	Sekret	0
8	19.09.2019	Sekret	39,34
11	11.09.2019	Sekret	34,44

Prøve	Prøvedato	Materiale	RNaseP
122	26.08.2019	Feces	39,58
2	12.07.2019	Sekret	34,79
3	09.07.2019	Sekret	0
4	02.07.2019	Feces	0
5	27.06.2019	Halssekret	0
6	15.06.2019	Feces	0
13	31.05.2019	Feces	0
17	10.03.2019	Halssekret	29,39
16	10.03.2019	Spinalvæske	31,35
19	11.02.2019	Sekret	28,97
20	11.02.2019	Sekret	27,26
22	16.12.2018	Sekret	0
23	14.12.2018	Feces	0
24	06.12.2018	Sekret	26,38
27	03.12.2018	Sekret	0
26	30.11.2018	Feces	38,74
28	04.11.2018	Feces	38,02
31	31.10.2018	Spinalvæske	32,77
32	12.10.2018	Feces	0
33	11.10.2018	Sekret	40
36	09.10.2018	Spinalvæske	40
37	04.10.2018	Halssekret	29,29
40	04.10.2018	Spinalvæske	0,00
41	28.09.2018	Feces	0
43	25.09.2018	Halssekret	30,86
44	25.09.2018	Sekret	33,88
45	24.09.2018	Spinalvæske	31,19
46	18.09.2018	Feces	40,00
47	14.09.2018	Halssekret	28,21
50	12.09.2018	Feces	35,97
48	11.09.2018	Spinalvæske	0
52	10.09.2018	Nasofarynkssekret	28,89
53	10.09.2018	Nasofarynkssekret	37,72
51	07.09.2018	Spinalvæske	27,96
58	01.09.2018	Spinalvæske	31,41
59	01.09.2018	Spinalvæske	26,88
60	01.09.2018	Spinalvæske	27,04
63	31.08.2018	Sekret	33,55
62	28.08.2018	Feces	37,66
65	28.08.2018	Spinalvæske	29,08
66	11.08.2018	Spinalvæske	34,57
75	22.07.2018	Spinalvæske	26,37
79	16.07.2018	Spinalvæske	29,51
86	06.07.2018	Spinalvæske	29,36
90	05.07.2018	Spinalvæske	28,32
93	05.07.2018	Spinalvæske	33,24
87	04.07.2018	Spinalvæske	25,86
94	03.07.2018	Spinalvæske	30,47
95	30.06.2018	Spinalvæske	33,03
96	29.06.2018	Spinalvæske	32,77