

BACHELOROPPGAVE

Metodevalidering av sanntids-PCR for differensiering av *Shigella* species fra enteroinvasiv *Escherichia coli* ved deteksjon av genene ipaH og lacY

Method validation of real-time PCR for differentiation of *Shigella* species from enteroinvasive *Escherichia coli* by detection of the genes ipaH and lacY

Sigrid Djønne Moldekleiv, Åshild Milde og Sigrid Lundeland

Kandidatnummer: 370, 326 og 322

Antall ord: 16953

Bioingeniørutdanningen ved fakultet for ingeniør- og naturvitenskap (FIN) og institutt for bio- og kjemiingeniørfag

Intern veileder: førsteamanuensis Signe Steinkopf

Ekstern veileder: bioingeniør Therese Midtbø

Innleveringsdato: 29. mai 2020

Jeg bekrefter at arbeidet er selvstendig utarbeidet, og at referanser/kildehenvisninger til alle

kilder som er brukt i arbeidet er oppgitt, jf. Forskrift om studium og eksamen ved Høgskulen på Vestlandet, § 12-1.

Sammendrag

Bakgrunn: *Shigella* spp. kan differensieres fra enteroinvasiv *Escherichia coli* (EIEC) ved sanntids-PCR for genene ipaH og ial. Forekomsten av ipaH- og ial-genet er dessverre ikke alltid sammenfallende. Hensikten med prosjektet er å teste sanntids-PCR for differensiering ved hjelp av genene ipaH og lacY. IpaH-genet finnes hos begge bakteriene, mens lacY-genet kun er å finne hos EIEC.

Materiale og metode: 53 pasientprøver som tidligere er identifisert som enten en *Shigella* spp. eller en EIEC ble benyttet. Metoden som benyttes er singelpleks og dupleks sanntids-PCR med hydrolyseringsprobenes FAM og texas-red, ved hjelp av PCR-instrumentet MyGo Pro. Metodens kvalitet er vurdert ved hjelp av riktighet, presisjon, kontaminasjon og deteksjonsgrense.

Resultat: 33 av prøvene er fortsatt *Shigella* spp. etter differensiering med ny metode, 14 prøver er fortsatt EIEC, fire prøver som ved dagens metode var *Shigella* spp. er nå blitt EIEC, og to prøver som ved dagens metode var EIEC er nå blitt *Shigella* spp.

Konklusjon: Resultatene ble annerledes ved bruk av den nye metoden. Kvalitetsparameterne viser gode resultater, og godkjenningkriteriene for å ta metoden (singelpleks PCR) i bruk er oppfylt.

Nøkkelord: sanntids-PCR, ipaH, lacY, *Shigella* spp., EIEC.

Abstract

Background: *Shigella* spp. can be differentiated from enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) by real-time PCR for the ipaH- and ial-genes. The presence of the ipaH- and ial-gene are not always coinciding. The purpose of the project is to test real-time PCR for differentiation using the ipaH- and lacY-genes. IpaH exists in both bacteria, while lacY exists only in EIEC.

Material and method: 53 samples from earlier patients are used. The samples are previously analyzed for intestinal pathogenic bacteria. Singleplex and duplex real-time PCR with the hydrolysisprobes FAM and texas-red on the PCR-instrument MyGo Pro is the method applied. The quality of the method is rated using accuracy, precision, contamination and detection limit.

Results: 33 of the samples are still *Shigella* spp. after differentiation with the new method, 14 samples are still EIEC, four samples which by the currently used method were *Shigella* spp. are identified as EIEC with the new method, and two samples which by the current method are identified as EIEC are *Shigella* spp. with the new method.

Conclusion: The results differed by using the new method compared with the results from the current method. The quality parameters show good results and the criteria for approving the new method (singleplex PCR) are adequate.

Keywords: real-time PCR, ipaH, lacY, *Shigella* spp., EIEC.

Forord

Vi er tre bioingeniørstudenter som går tredje året ved Høgskulen på Vestlandet (HVL), Campus Bergen, og har skrevet denne besvarelsen på vegne av Mikrobiologisk avdeling (MIA) ved Haukeland Universitetssykehus. De hadde et ønske om å teste en ny metode for differensiering av de tarmpatogene bakteriene *Shigella* spp. fra enteroinvasiv *Escherichia coli*. Analysen utføres ved hjelp av sanntids-PCR med hydrolyseringsprober for deteksjon av genene ipaH og lacY.

Bachelorprosjektet er utført ved Mikrobiologisk avdeling på Haukeland universitetssjukehus. Denne avdelingen har vært inne i en stressende tid som følge av koronapandemien. Det ble gjennom hele prosjektet vurdert om det var forsvarlig å fortsette arbeidet på laboratoriet, med tanke på smitte, deres kapasitet og ressurser. Ved hjelp av god dialog med ekstern veileder, Therese, ble det bestemt at arbeidet med oppgaven skulle fortsette. Det var dog viktig at retningslinjene fra helsedirektoratet rundt smittevern ble overholdt.

Vi vil takke MIA for godt samarbeid, og all hjelp under prosjektet. En spesiell takk til ekstern veileder; bioingeniør Therese Midtbø, og overlege Øyvind Kommedal ved MIA. Vi vil også takke intern veileder førsteamanuensis Signe Steinkopf ved HVL.

29. mai 2020

Sigrid D. Moldekleiv

Åshild Milde

Sigrid Lundeland

Dato: 29. mai 2020

Sigrid Djønn Moldekleiv

Åshild Milde

Sigrid Lundeland

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	2
Abstract	3
Forord	4
Forkortelser	7
Fremmedord	8
Innledning	10
<i>Bakgrunn</i>	10
<i>Hensikt og mål</i>	10
<i>Etiske betraktninger</i>	10
Teori	12
<i>DNA og bakterier</i>	12
<i>Shigella</i> spp.	13
Enteroinvasiv <i>Escherichia coli</i> (EIEC)	13
<i>Shigella</i> og EIEC - likheter og forskjeller	14
Diagnostikk av EIEC og <i>Shigella</i> spp.	14
<i>PCR – Polymerase Chain Reaction</i>	19
Tolking av amplifikasjonsplott ved PCR	22
Dupleks PCR	23
Sanntids-PCR	24
<i>Riktighet</i>	25
Effektivitet og linearitet	25
Sensitivitet og spesifisitet	26
<i>Presisjon</i>	26
Repeterbarhet	27
Reproduserbarhet	28
Robusthet	28
Materiale og metode	29
<i>Stammer som er benyttet i prosjektet</i>	29
<i>Pre-PCR</i>	29
Isolering av bakterier fra bakteriestammer	30
Primer- og probedesign	30
Preparering av PCR-amplifikasjonsmiks	31
<i>Kontroller</i>	36
Fortynningsrekke for kontrollstammer	37
<i>PCR</i>	38
<i>Post-PCR</i>	39
Resultat	40
<i>Konsentrasjonsmåling av DNA i kontrollstammene</i>	40
<i>Resultat av PCR-kjøring av fortynningsrekker</i>	41

<i>Riktighet</i>	43
Effektivitet og linearitet	43
Spesifisitet	47
Sensitivitet	47
<i>Presisjon</i>	47
Repeterbarhet	47
Reproduserbarhet	48
Robusthet	49
<i>Kontaminasjon</i>	49
<i>Resultat ved kjøring av pasientprøver</i>	49
Diskusjon	54
<i>Antall kopier av templatet i kontrollstammene</i>	54
<i>PCR-kjøring av fortynningsrekker</i>	54
<i>Riktighet</i>	56
<i>Presisjon</i>	56
<i>Kontaminasjon</i>	57
<i>Kjøring av pasientprøver</i>	57
<i>Videre arbeid med prøvene</i>	59
<i>Problemer som følge av Covid-19</i>	60
<i>Dagens metode vs. ny metode</i>	60
Konklusjon	62
Litteraturliste	64
Vedlegg	67
<i>Vedlegg 1: Resultat og beregninger</i>	68
<i>Vedlegg 2: Molecular differentiation of Shigella spp. from enteroivasive E.coli</i>	91
<i>Vedlegg 3: LightCycler 480 Probes Master version 10</i>	100
<i>Vedlegg 4: Brukerveiledning MyGo Pro</i>	120

Forkortelser

ATCC – American Type Culture Collection

Cq-/Ct-verdi – quantification cycle-/cycle threshold verdi

DNA - deoksyribonukleinsyre

dNTP – deoksyribonukleotid trifosfat

EHEC – Enterohemoragisk *Escherichia coli*

EIEC – Enteroinvasiv *Escherichia coli*

EPEC – Enteropatogen *Escherichia coli*

ETEC – Enterotoksigen *Escherichia coli*

ipaH – Invasjon plasmid antigen H

lacY – Laktose permease Y

LPS - Lipopolysakkaridmolekyl

PCR – Polymerase Chain Reaction

Spp. – species/arter (sp. i ental og spp. i flertal (art))

Fremmedord

Amplifikasjonsmiks – blanding av Probes Master som inneholder Taq DNA polymerase, reaksjonsbuffer, dNTP miks og MgCl₂. I tillegg inneholder amplifikasjonsmiks primere og prober spesifikke for genet som skal undersøkes ved PCR. Amplifikasjonsmiksen blandes med pasientprøver i rør eller i brønner før PCR.

ATCC (American Type Culture Collection) - cellebank hvor kjente stammer med mikrober oppbevares. Mikrobiologisk avdeling kjøper stammer herifra.

DNA polymerase – enzym som kan kopiere og lage komplementære DNA-tråder.

dNTP (deoksyribonukleotid trifosfat) - molekyl som består av deoksyribose, fosfat og en nitrogenbase, enten adenin, tymin, cytosin eller guanin. Er byggestener i DNA.

Dupleks PCR – brukes for å detektere to spesifikke gener i samme prøve ved hjelp av ulike primersett merket med ulike fluoroforer. Reaksjonene avleses ved ulike bølgelengder.

Fakultativ anaerob - fakultative anaerobe organismer kan vokse enten med eller uten oksygen.

Hemolytisk anemi – samlebetegnelse på sykdommer hvor levetiden til de røde blodcellene er redusert samtidig som benmargen ikke klarer å kompensere med økt produksjon av nye celler. Årsaken til tilstanden kan både være arvelige og ervervete.

Hemolytisk uremisk syndrom - en sykdom karakterisert med anemi med hemolyse av røde blodceller, lavt antall blodplater og akutt nyresvikt.

Hydrolyseringsprobe – sekvensspesifikk fluorescerende merket oligonukleotidprobe som benyttes ved TaqMan analyser. Hydrolyseringsproben er merket med en fluorescerende reporter i 5'-enden (f.eks. FAM eller texas-red som er benyttet her) og en slukker/quencher i 3'-enden. Når hydrolyseringsproben er intakt slukkes reporterens fluorescens på grunn av nærheten til quencheren. Ved hydrolyseringstrinnet i PCR skilles reporteren fra quencheren, som resulterer i fluorescenssignal som er proporsjonalt med mengden produkt i prøven.

IpaH – gen som finnes i EIEC og *Shigella* spp. Genet koder for invasivitet. Det gjør at bakteriene med dette genet invaderer tarmslimhinnen.

Lac operon – en operon som kreves for transport og metabolisme av laktose i blant annet *E.coli*. Laktose er en nødvendig sukkerkilde for visse bakterier.

Monovalent – det samme som enverdig. Monovalent antisera inneholder dermed antistoffer mot kun en serotype av bakterien.

Nukleasefritt vann – nukleaser er enzymer som kan spalte fosfodiesterbindingene mellom nukleotidene i DNA. Nukleasefritt vann inneholder ikke slike nukleaser, og vannet vil derfor ikke påvirke DNA'et i prøven.

O-antisera – termostabile lipopolysakkarider (LPS) som finnes i den ytre membranen til visse bakterier.

Oligonukleotider – et kort fragment av enkelttrådet DNA eller RNA. Vanligvis er det bygd opp av 5-50 enkeltnukleotider i en definert baserekkefølge.

Patovoar – sykdomsfremkallende bakteriestamme.

Polyvalent – det samme som flerverdig. Polyvalent antisera inneholder dermed antistoffer mot flere serotyper av bakterien.

PCR-strips - åtte små prøverør bundet sammen i en felles strips som tilhører PCR-maskinen MyGo Pro.

Primater – pattedyrorden som omfatter halvaper, spøkelsesaper, egentlige aper, menneskeaper og mennesker.

Primer – korte syntetiske fragmenter av DNA som blir brukt for å indusere syntese av DNA i PCR-reaksjoner.

Probe – kort enkelttrådet nukleinsyre som benyttes til å identifisere og lokalisere en komplementær nukleinsyresekvens ved hybridisering.

Quencher – en forbindelse som har evnen til å overta molekyler eller ulike former for energi og på den måten forhindre at energien leder til videre prosesser.

Singelpleks PCR - brukes for å detektere et spesifikt mål (gen) i en prøve.

Slp-prøve - sammenlignende laboratorieprøver. Prøver fra et eksternt kvalitetssikringsprogram. Prøvene har en oppgitt fasit.

Sop – ved å dra en øse gjennom en bakteriekoloni dyrket på en agarskål, får man et sop.

Trombocytopeni – unormalt lav konsentrasjon av trombocytter (blodplater), $< 125 \cdot 10^9/L$.

Vehikkelsmitte – smitte via en fysisk gjenstand, som for eksempel mat eller vann.

Innledning

Bakgrunn

Av epidemiologiske hensyn er det ønskelig å differensiere mellom *Shigella* spp. og EIEC ved funn i avføringsprøver relatert til sykdom. Disse bakteriene er nært beslektet og begge har potensiale til å forårsake alvorlig gastroenteritt. Dagens differensiering er primært basert på en screening med flere multipleks PCR-analyser. Genene ial og ipaH blir brukt for å detektere EIEC og *Shigella* spp., men disse klarer ikke i god nok grad å skille bakteriene fra hverandre. Forekomsten er heller ikke alltid sammenfallende, noe som kan gi en ytterligere diagnostisk utfordring. Artikkelen “Molecular differentiation of *Shigella* spp. from enteroinvasive *E.coli*” skrevet av Løbersli, Wester, Kristiansen og Branda beskriver hvordan en annen PCR-metode rettet mot genene ipaH og lacY bedre kan differensiere bakteriene (Løbersli, Wester, Kristiansen, & Branda, 2016). Denne artikkelen ble brukt som bakgrunn for oppgaven, og kan sees i vedlegg 2.

Hensikt og mål

Hensikten med denne bacheloroppgaven er å teste ut et nytt sanntids-PCR oppsett mot genene ipaH og lacY for å bedre kunne differensiere mellom *Shigella* spp. og enteroinvasiv *Escherichia coli* (EIEC). Det vil bli prøvd ut både singelpleks- og dupleks PCR. Målet er at den nye metoden skal gi en sikrere differensiering av bakteriene, og dermed erstatte dagens metode som blir brukt ved Mikrobiologisk avdeling på Haukeland. Oppgaven vil derfor basere seg på problemstillingen; «kan det nye sanntids-PCR oppsettet mot genene ipaH og lacY brukes for å differensiere mellom *Shigella* og EIEC, og vil den gi en sikrere identifikasjon av bakteriene enn dagens metode?»

Etiske betraktninger

I prosjektet arbeides det med tidligere pasientprøver. Pasientprøvene er i forkant overført til sekundærrør, slik at det kun anvendes laboratorienummer og ikke pasientenes navn. Utenom selve prosjektet og dens prøver kan man møte på annen sensitiv informasjon på laboratoriet. Det har derfor vært viktig å overholde taushetsplikten. I tillegg har prinsippet om at alt biologisk materiale skal behandles med respekt og at man skal arbeide faglig forsvarlig blitt overholdt.

I forkant av prosjektet har Høgskulen på Vestlandet, Campus Bergen søkt til Regional etisk komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) for vurdering om bachelorprosjektet er etisk forsvarlig å gjennomføre. Ved all medisinsk og helsefaglig forskning som involverer mennesker, menneskelig biologisk materiale eller helseopplysninger, skal det søkes og få forhåndsgodkjenning fra REK. REK har vurdert bachelorprosjektet som etisk forsvarlig og dermed gitt tillatelse til å gjennomføre prosjektet.

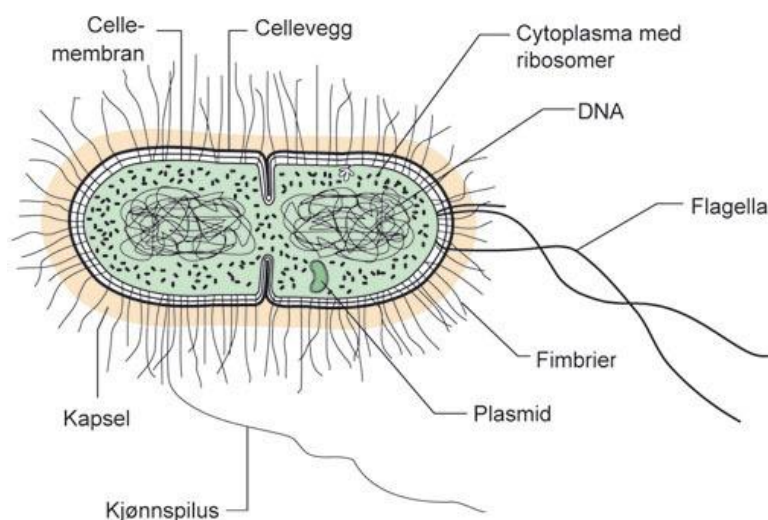
Teori

DNA og bakterier

Bakteriene er de minste levende organismene som finnes, og har trolig utviklet seg på jorden i tre billioner år. Denne lange levetiden har resultert i en flersidig organisme som klarer å kolonisere de fleste deler av jorden og dens innbyggere (Microbiology : a clinical approach, 2016, p. 198). Bakterier er en gruppe mikrober som normalt finnes i jord, vann, luft, på planter, dyr og på overflatene av hud og slimhinner hos mennesker. Under de rette forholdene evner de til å indusere sykdom (Tjade, 2008, p. 57).

I likhet med andre prokaryote celleorganismer har bakterier DNA jevnt fordelt gjennom sine celler. I eukaryote celler er mesteparten av DNA'et derimot samlet i organismens cellekjerner. DNA kan opptre i mange former. Det kan ha åpen ende, være sirkulært, være enkeltrådig eller dobbeltrådig. (Tjade, 2008, p. 57)

Bakterier har sirkulært DNA fritt i cytoplasma. DNA'et inneholder alle genene bakterien trenger for å formere seg. Noen bakterier har plasmider. Det er sirkulære, ekstrakromosomale deler av DNA som deler seg uavhengig av resten av DNA'et. Plasmider kan overføres fra en bakteriecelle til en annen (Microbiology : a clinical approach, 2016, p. 680). De kan på den måten tilføre bakterien nye egenskaper. I mange tilfeller bærer plasmider egenskaper som antibiotikaresistens og andre virulensfaktorer som kan utnyttes hos vertsbakterien (Tjade, 2008, p. 57).



FIGUR 1: OVERSIKTSBILDE OVER EN BAKTERIE UNDER DELING. FIGUREN VISER AT BAKTERIEN HAR DNA FRITT I CYTOPLASMA, OG AT DEN OGSÅ HAR ETT PLASMID. I CYTOPLASMA LIGGER MANGE RIBOSOMER. RUNDT CYTOPLASMA LIGGER

CELLEMEMBRANEN OG CELLEVEGGEN. FRA CELLEVEGGEN ER DET FESTET FIMBRIER OG FLAGELLER, SAMT EN KJØNNSPILUS SOM BAKTERIEN BRUKER TIL Å OVERFØRE DNA. BAKTERIEN HAR OGSÅ EN KAPSEL (HENRIKSEN, BØVRE, & HØILAND, 2020).

***Shigella* spp.**

I 1898 identifiserte den japanske forskeren Kioshi Shiga bakterieslekten *Shigella*. Da ble bakterien kalt *Bacillus* på bakgrunn av sykdommen den gav, bakteriell dysenteri, og at den virket å være beslektet med *Bacillus coli*, nå kjent som *Escherichia coli* (Hale, 1991). Til tross for likheten med *E. coli* ble bakterien klassifisert i en egen slekt på bakgrunn av patologiske ulikheter. Bakterieslekten ble videre delt inn i fire forskjellige subgrupper basert på biokjemisk sammensetning og strukturen av O-antigen i lipopolysakkaridmolekylet (LPS) i bakterienes cellevegg; *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, og *S. sonnei* (Folkehelseinstituttet, 2019).

Shigella er en gram-negativ, laktose-negativ, fakultativ anaerob patogen bakterie (Løbersli, Wester, Kristiansen, & Brandal, 2016). Denne bakterien gir tilstanden Shigellose eller bakteriell dysenteri som rammer tykktarmen og kan gi kraftig blodig diaré. *S. dysenteriae* og *S. boydii* forekommer oftest i utviklingsland og gir de alvorligste sykdomstilfellene. *S. flexneri* og *S. sonnei* er hyppigst forekommende i Norge, og gir som regel mildere sykdom. I Norge ses Shigellose som regel ved import, og sykdommen smitter ved kontaktsmitte fekalt-oralt ved uhygieniske forhold. Smitte kan også forekomme som vehikkelsmitte gjennom kontaminert mat eller drikke. Mennesket og store primater er eneste reservoar for bakterien (Folkehelseinstituttet, 2019).

Enteroinvasiv *Escherichia coli* (EIEC)

Escherichia coli (*E. coli*) er en gram-negativ, fakultativ anaerob bakterie som finnes i normalfloraen i tarmen hos alle mennesker. Det finnes mer enn 700 serotyper av *E. coli*, der "O" og "H" antigener skiller de ulike serotypene. De vanligste typene er enterohemoragisk *E. coli* (EHEC), enteroinvasiv *E. coli* (EIEC), enteropatogen *E. coli* (EPEC) og enterotoksigen *E. coli* (ETEC).

Enteroinvasiv *E. coli* er tarmpatogen og kan gi *E. coli*-enteritt. Bakterien invaderer epitelcellene i tarmen og gir en akutt betennelsesreaksjon i slimhinnen som kan resultere i blødninger og nekrose av epitelet. Bakterien smitter fra person til person, men også som

vehikkelsmitte gjennom forurenset mat og drikke. Mennesker og store primater er eneste reservoar for bakterien (Schøyen, 2011, p. 245).

EIEC har i likhet med *Shigella* spp. også en rekke O-antigen i sine lipopolysakkaridlag, deriblant O112ac, O124, O136, O143, O152, og O164 som er identiske med lipopolysakkaridlagene til *Shigella* spp. (Cheasty & Rowe, 1983).

***Shigella* og EIEC - likheter og forskjeller**

I diagnostikken har det vist seg å være lett å skille *Shigella* spp. fra *E. coli*, men utfordrende å skille dem fra en av *E. coli* typene; Enteroinvasiv *E. coli* (EIEC). Grunnen til dette er at *Shigella* spp. og EIEC viser like biokjemiske kjennetegn og kan gi sykdommen dysenteri ved lik invasjonsmetode (Ud-Din & Wahid, 2015).

Sekvensering av flere gener i bakteriene har vist at *Shigella* spp. og EIEC har utviklet seg fra et felles patovoar av *E. coli* (Lan, Alles, Donohoe, Martinez, & Reeves, 2004).

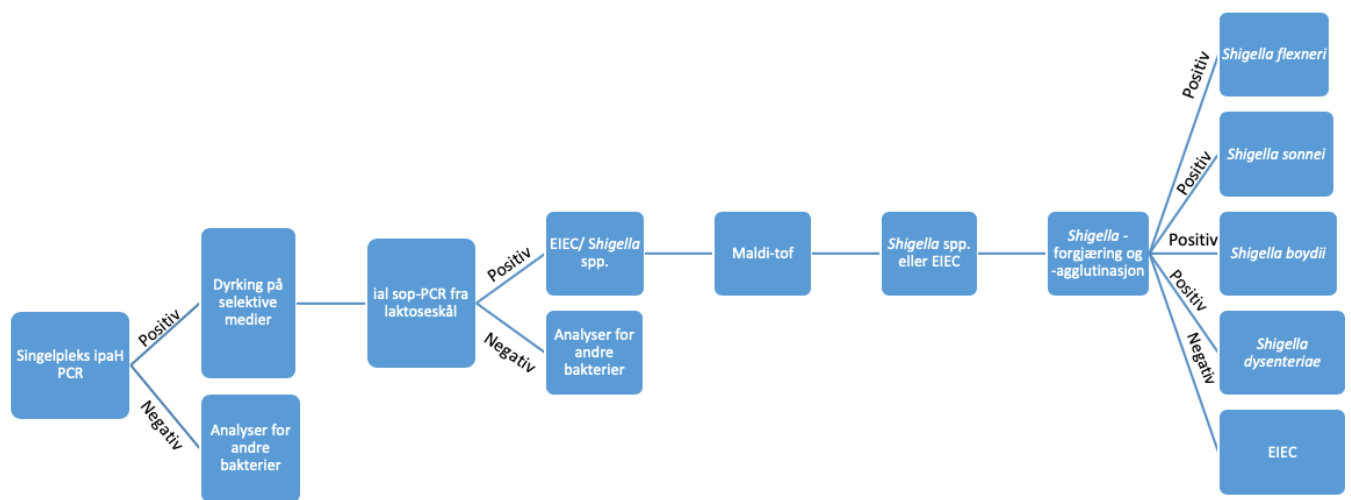
Likevel viser bakteriene en rekke kliniske forskjeller som gjør det viktig å differensiere dem i diagnostikken. *Shigella* spp. gir et mer alvorlig sykdomsbilde enn EIEC, med blant annet muligheten til å forårsake hemolytisk uremisk syndrom, hemolytisk anemi og trombocytopeni (Ud-Din & Wahid, 2015).

Til tross for at bakteriene er nært beslektet, viser de ulikheter som gjør det mulig å skille dem fra hverandre. Dette gjelder blant annet bakterienes evne til å fermentere laktose, som EIEC har, mens *Shigella* spp. ikke har (Lan et al., 2004).

Diagnostikk av EIEC og *Shigella* spp.

EIEC påvises ved invasjon plasmid antigen H (ipaH) som koder for invasivitet av epitelcellene i tarmen. Dette er et gen som også finnes hos *Shigella* spp. De fleste andre bakterier er negative for dette genet, og det gjør at man kan være sikker på at det er enten *Shigella* spp. eller EIEC man har ved positiv prøve. Diagnostikken av disse bakteriene inngår i en multipleks PCR for tarmpatogene agens ved diaré (Folkehelseinstituttet, 2019). For å kunne vite hvilke av de to bakteriene prøven inneholder, må den dyrkes på selektive medier. Dagens metode for diagnostisering av de to bakteriene går ut på at kolonier blir undersøkt videre med PCR for genet ial som er relatert til EIEC og *Shigella* spp. Figur 2 fremstiller hvordan det per i dag

differensieres mellom EIEC og *Shigella* på Mikrobiologisk avdeling på Haukeland. Ved bruk av Maldi-tof vet man at prøven inneholder enten *E. coli* eller *Shigella* spp. For å skille mellom de to bakteriene, gjøres *Shigella*-forgjæring og *Shigella*-agglutinasjon. *Shigella*-forgjæring benyttes til å skille mellom de ulike artene *Shigella*, dersom en prøve kommer ut positiv for *Shigella* spp. Dersom forgjæringen er negativ, kan det bety at prøven inneholder EIEC. Metoden for forgjæring er senere beskrevet. Det samme gjelder for agglutinasjonen. Hvordan en prøve avleses som positiv eller negativ ved bruk av PCR, er beskrevet under «Tolking av amplifikasjonsplott ved PCR» senere i teorien. Informasjonen om dagens diagnostikk av EIEC og *Shigella* spp. er hentet i fra prosedyrene brukt på MIA.



FIGUR 2: FREMSTILLING AV FREMGANGSMÅTE FOR DIFFERENSIERING MELLOM EIEC OG *SHIGELLA* SPP. SOM PER DAGS DATO BENYTTES VED MIKROBIOLOGISK AVDELING PÅ HAUKELAND.

Forekomsten av ipaH- og ial-genene er ikke nødvendigvis sammenfallende, og gir en diagnostisk utfordring ved dagens metode (Løbersli et al., 2016). Invasjon plasmid antigenet (ipaH) er til stede i bakterienes kromosom, og i plasmider i bakteriecellen. Genet ial er på den andre siden, kun til stede i plasmider. Plasmider er mer utsatt for genforandringer, som for eksempel tap av baser. Ved en gen-basert deteksjon av ial-genet, er det derfor lett at man får et falskt negativt resultat. Dette på grunn av at ial-genet i plasmid ikke blir detektert (Thong, Hoe, Puthuchear, & Yasin, 2005).

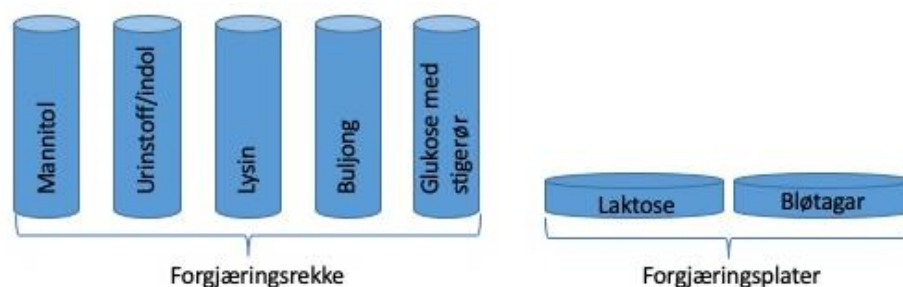
En svakhet med dagens metode, er at PCR-reaksjonen i seg selv ikke klarer å skille mellom de to typene av bakterier, ettersom begge bakteriene har begge genene PCR-reaksjonen er rettet mot (Løbersli et al., 2016). Prøver som gir positiv PCR-reaksjon for ial- og ipaH-genet, blir videre analysert med *Shigella*-forgjæring og *Shigella*-agglutinasjon. De sistnevnte analysene

klarer så å skille mellom EIEC og *Shigella*. Men dersom bakterier gir falsk negativ PCR-reaksjon for ipaH-genet, er det lett at mange prøver med *Shigella* spp. eller EIEC ikke blir oppdaget.

Siden man ikke klarer å skille mellom de to bakterietypene ved dagens metode, er det ønskelig å teste for et annet gen i tillegg til ipaH-genet: laktose permease, lacY. Dette er et av tre gener (lacY, lacZ og lacA) som utgjør lac operon som er viktig ved laktosefermentering. EIEC, som alle typer *E. coli* har genet, mens *Shigella* spp. mangler det. Ved å analysere for lacY-genet, kan man differensiere mellom de to bakterietypene (Løbersli et al., 2016).

***Shigella*-forgjæring**

Som nevnt, dyrkes prøver positive for ipaH-genet på selektive medier. Etter dyrkning er *Shigella*-forgjæring metoden som benyttes til å identifisere *Shigella* spp. En forgjæringsrekke bestående av fem rør benyttes: buljong, glukose med stigerør, mannitol, urinstoff/indol og lysin. En halv koloni bakterier på en øse stikkes i mannitolrøret, deretter i urinstoffrøret og lysinrøret. Resten av kolonien røres ut i buljongen. Med en pipette dryppes fire til fem dråper i glukoserøret med stigerør, og en dråpe dryppes på laktose- og bløtagar forgjæringsplate. Rørene og platene som benyttes er fremstilt i figur 3. Figuren er laget ut fra prosedyren for *Shigella*-forgjæring som benyttes ved MIA.



FIGUR 3: DE ULIKE RØRENE OG PLATENE SOM BENYTTES VED *SHIGELLA*-FORGJÆRING I RIKTIG REKKEFØLGE: MANNITOL, URINSTOFF/INDOL, LYSIN, BULJONG, GLUKOSE MED STIGERØR, LAKTOSE OG BLØTAGAR.

Ved hjelp av ulike kjennetegn som bestemte farger, luft/ikke luft, blakking/ikke blakking og vekst, avgjøres det om testene er negative eller positive. Tabell 1 fremstiller dette, og er hentet fra prosedyren for *Shigella*-forgjæring brukt på MIA.

TABELL 1: AVLESING AV POSITIVE OG NEGATIVE REAKSJONER ETTER Å HA UTFØRT FORGJÆRINGSREKKE, HVOR POSITIVE OG NEGATIVE REAKSJONER SKILLES VED HJELP AV FARGER, LUFT/IKKE LUFT I STIGERØRET, BLAKKING/INGEN BLAKKING AV MEDIET OG VEKST/IKKE VEKST I MEDIET.

Rør / Reaksjon	Positiv	Negativ
Laktose (LS-plate)	Gul	Blå
Sakkarose (LS-plate)	Gul	Blå
Syre (glukose med stigerør)	Gul	Grønn
Gass (glukose med stigerør)	Luft i stigerøret	Ingen luft i stigerøret
Mannitol	Gul	Rød
Bevegelighet	Blakking av mediet	Ingen blakking av mediet
Urinstoff	Rosa/rød	Gul/orange
Indol	Rød	Gul
Lysin	Lilla farge m/ vekst i mediet	Gul

De ulike artene av *Shigella* har bestemte reaksjonsmønstre, og man kan slik skille mellom dem. Tabell 2 fremstiller dette, og er også hentet fra prosedyren for *Shigella*-forgjæring brukt ved MIA.

TABELL 2: SPESIFIKKE REAKSJONSMØNSTRE FOR DE FIRE SHIGELLA-ARTENE SOM BENYTTES I IDENTIFISERING AV DE ULIKE ARTENE. NØKKELREAKSJONENE ER MARKERT MED BLÅ. VED + ER REAKSJONEN POSITIV, VED – ER REAKSJONEN NEGATIV, VED +/- GIR 50-90% POSITIV REAKSJON OG VED -/+ GIR 10-49% POSITIV REAKSJON.

Species / biokjemiske reaksjoner	Lakt.	GI (syre)	GI (gass)	Man.	Bev.	Urea	Ind.	LD A	Sak.
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	+	-	-	-	-	-/+	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	+	-	+	-	-	+/-	-	-
<i>Shigella boydii</i>	-	+	-	+	-	-	-/+	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-

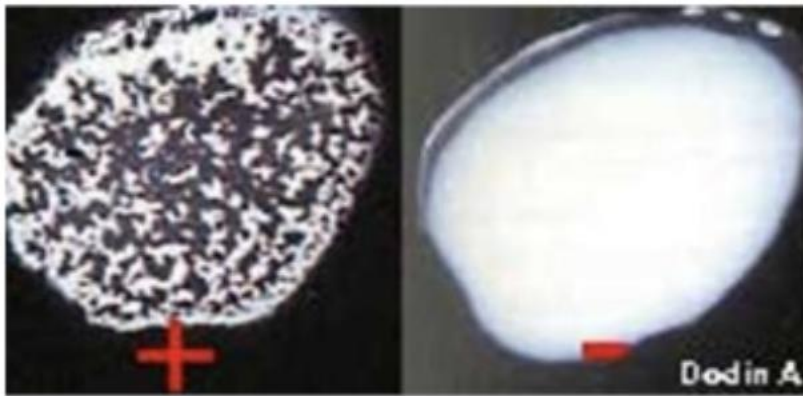
***Shigella*- agglutinasjon**

Ved hjelp av ulike agglutinerende antisera kan *Shigella* serotypene skilles fra hverandre. Det blir brukt polyvalente O-antisera som er ulike for *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri* og *Shigella sonnei* (Wester, Tjade, & Villmones, 2018). Disse polyvalente antiseraene inneholder antistoffer mot flere serotyper av *Shigella*. Det vil si at alle polyvalente antisera for *Shigella flexneri* vil reagere med alle serotyper av *Shigella flexneri*. For å bestemme serotype blir monovalente antisera brukt. Dersom *Shigella* stammen har det antigenet som er forenlig med det spesifikke antistoff i antiseraet vil disse binde seg. Det oppstår da en antigen-antistoff reaksjon som viser seg gjennom agglutinasjon/utfelling.

Shigella agglutinasjon blir utført på en renkultur som er isolert på et ikke-selektivt agarmedium, etter at *Shigella* er identifisert gjennom *Shigella* forgjæring eller PCR. Det blir først utført en negativ kontrolltest av stammen i fysiologisk saltvann. Det blir brukt en øse til å overføre et lite sop bakterier i en dråpe saltvann. Da skal det ikke skje en agglutinasjon. Dersom løsningen agglutinerer tilsvarer det en selvagglutinerende belastning, og testen med antisera kan ikke utføres uten videre.

Dersom den negative kontrollen er negativ, kan man gå videre med antiseraene. Hvert antiserum tilsvarer en av de fire serotypene av *Shigella*. Det blir avsatt en dråpe av et av antiseraene på et objektglass. Et sop med renkultur av *Shigella* overføres til dråpen ved hjelp av en øse. Deretter blir objektglasset vippet inntil 20 ganger før negativ reaksjon eventuelt aksepteres. Dersom reaksjonen er positiv vil dråpen ha agglutinert innen 1 minutt, og det viser seg som hvit utfelling. Dersom reaksjonen er positiv på det første antiserumet er det ikke nødvendig å gå videre med de andre antiserumene.

Selv om bakteriestammen er *Shigella*, kan det i noen tilfeller hende at det ikke skjer en utfelling. Det kan komme av at bakteriene har en kapsel som kamuflerer antigenene på overflaten. Dette kan løses ved å koke bakteriene i en saltvannsløsning i 100 °C i en time. Det vil ødelegge kapselen og dermed frigjøre overflateantigenene. For store mengder bakterier kan også i noen tilfeller skjule en fin agglutinasjon. Teorien om *Shigella* agglutinasjon er hentet fra prosedyren brukt på MIA. Figur 4 viser eksempel på positivt og negativt resultat ved *Shigella* agglutinasjon.

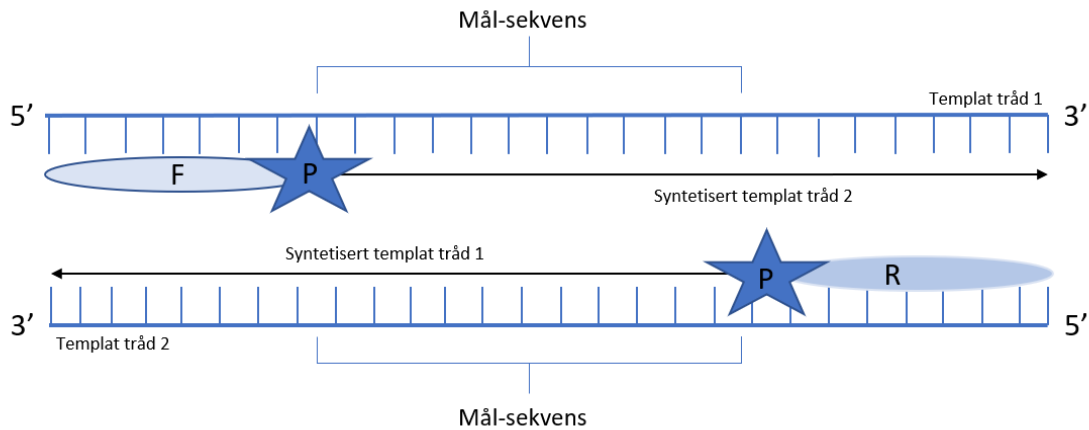


FIGUR 4: ILLUSTRASJON AV *SHIGELLA* AGGLUTINASJONSTEST. DET FØRSTE KAMMERET VISER EN POSITIV AGGLUTINASJON OG DERMED PÅVIST *SHIGELLA*. DET ANDRE KAMMERET VISER EN NEGATIV REAKSJON. (UNKNOWN).

PCR – Polymerase Chain Reaction

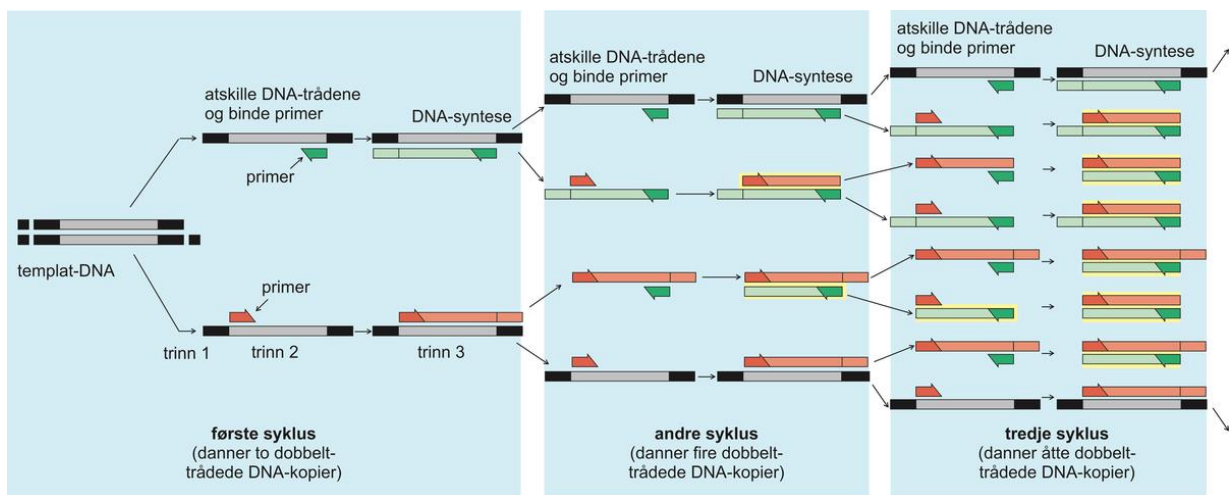
Polymerase Chain Reaction (PCR) er en metode for *in vitro* amplifisering av DNA (figur 5). Formålet med PCR er å amplifisere et gitt gen fra isolert DNA, i dette tilfellet bakterie-DNA. Metoden benyttes for at man skal ha nok kopier av en gitt DNA-sekvens slik at for eksempel et bestemt bakterie-gen kan detekteres i en prøve. Ved hver syklus i PCR dobles antallet DNA-kopier. For å utføre PCR trengs en reaksjonsblanding bestående av enzymet DNA polymerase som syntetiserer nytt DNA, to primere (forward og reverse) som fungerer som startsekvens for de nye DNA-trådene, templat DNA (prøve), dNTP som er byggesteiner for de ulike DNA basene (A, T, C og G) og Mg^{2+} som er nødvendig for at polymerasen skal binde seg til DNA.

I PCR er primerne designet i forkant. Ved å kjenne til DNA-sekvensen på hver side av målgenet kan man velge primere som passer spesifikt de områdene man ønsker å amplifisere. Slik markerer primerne starten for hvor DNA-polymerasen skal feste seg og begynne med syntetiseringen av nytt DNA. DNA syntetiseres alltid fra 5'- til 3'-ende. Etersom DNA er dobbeltrådig, vil det være en 5'-ende på hver side av DNA'et. Det tilsettes derfor to primere, forward og reverse, som markerer hver sin 5'-ende i motsatt side av DNA-tråden i forhold til hverandre. De vil begge syntetisere DNA fra 5'- til 3'-ende. Ved å tilsette en forward-primer som leser DNA-trådens fremste 5'-ende, og en reverse-primer som leser DNA-tråden fra bakerste 5'-ende sørger man for at hele DNA-sekvensen blir amplifisert. Figur 5 viser en fremstilling av primeres virkemåte.



FIGUR 5: FREMSTILLING AV FORWARD (F) OG REVERSE (R) PRIMERS VIRKEMÅTE. DNA-POLYMERASEN (P) FESTER SEG TIL HVER PRIMER OG BYGGER DNA I 5'- TIL 3'- RETNING. FORWARD-PRIMER SYNTETISERER SLIK KOMPLEMENTÆR DNA-TRÅD TIL TEMPLAT TRÅD 2, MENS REVERS PRIMER SYNTETISERER KOMPLEMENTÆR DNA-TRÅD TIL TEMPLAT TRÅD 1. VED BRUK AV TO PRIMERE FÅR MAN SLIK SYNTETISERT BEGGE TEMPLAT-TRÅDENE SOM OPPRINNELIG VAR DOBBELTRÅDIG DNA.

PCR består av tre trinn: denaturering, hybridisering og amplifisering. Dette gjentas vanligvis med 20-40 sykluser. Figur 6 viser en oversikt over PCR.



FIGUR 6: ILLUSTRASJON AV PCR. DE TRE FØRSTE SYKLUSENE VISES, HVOR DENATURERING, HYBRIDISERING OG AMPLIFISERING SKJER. DE TRE SYKLUSENE GJENTAS TIL ØNSKET ANTALL OPPKOPIERT MÅL-GEN ER NÅDD (FOSSUM & DISSEN, 2020).

Denaturering skjer ved cirka 95 °C, og gjør at DNA'et i prøven blir enkelttrådet. Primerne vil også bli denaturert. Temperatur og varighet av dette trinnet kan justeres etter hvor stort DNA-templatet er.

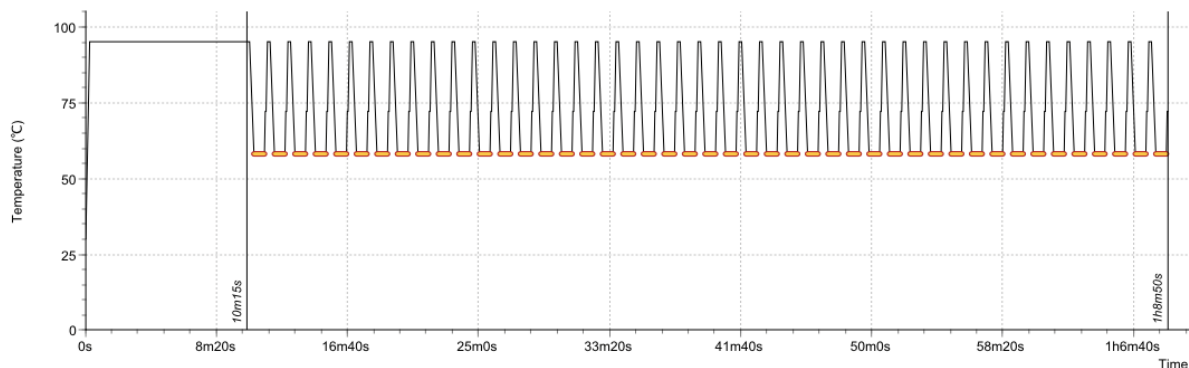
I neste trinn, hybridisering, senkes temperaturen til cirka 58 °C. Dette fører til at de enkelttrådede primere i reaksjonsblandingen bindes til templat-DNA. Hybridisering er det samme som «annealing». Dette trinnet kan vare i opp til ett minutt.

Ved amplifisering rundt 72 °C, vil polymerasen lese og kopiere DNA. En DNA-polymerase er et enzym som kopierer og lager en komplementær DNA-tråd. Enzymet kan bare lage DNA i 5'- til 3'-retning. Siden DNA-polymerase ikke kan starte kopiering av en DNA-tråd alene trenger man primere som DNA-polymerasen kan bindes til. Primerne markerer hvor oppkopieringen skal starte. Her benyttes dNTP'er som byggestener.

Ved denatureringen i PCR, ødelegges de fleste enzymer, inkludert DNA-polymerase. Man benytter derfor varmestabil DNA-polymerase, Taq-polymerase. Slik at man slipper å tilsette nytt enzym etter hver oppvarming, og kan heller tilsette det til reaksjonsblandingen i starten.

(Sjøberg, 2013, pp. 180-182).

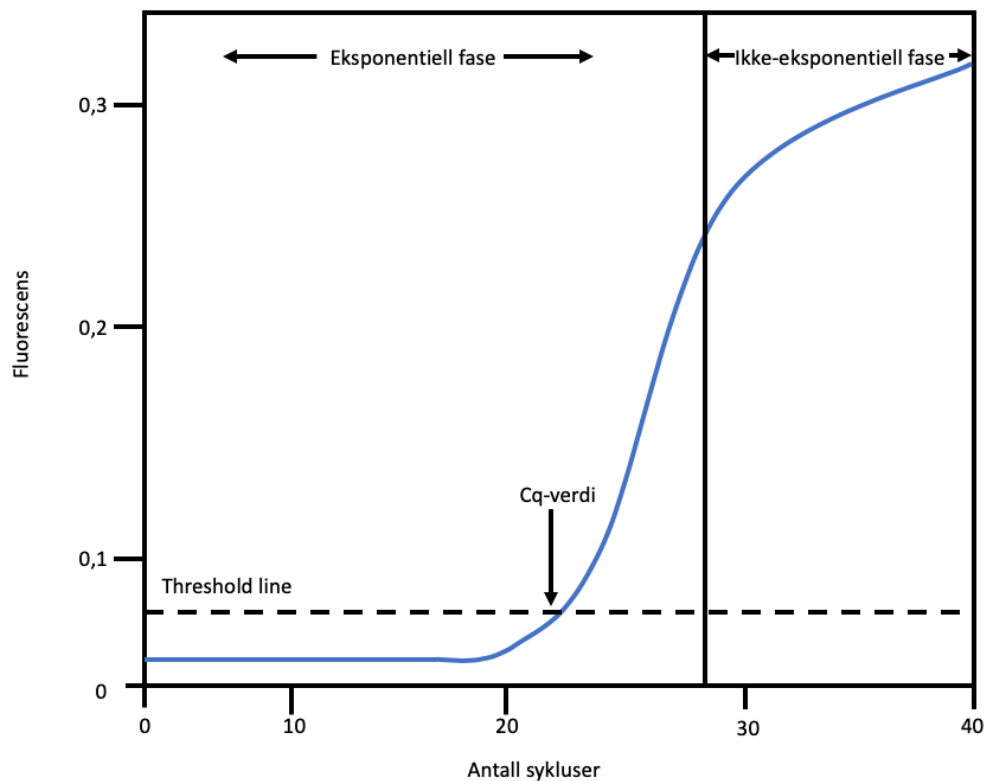
Figur 7 viser en temperaturprofil som er brukt på PCR-instrumentet MyGo Pro.



FIGUR 7: TEMPERATURPROFIL FRA RAPPORTEN AV PCR PÅ INSTRUMENTET MYGO PRO ETTER PCR UTFØRT PÅ FORTYNNINGSREKKE MED PRIMERE OG PROBER FOR IPAH-GENET. KURVEN HAR TID PÅ X-AKSEN OG TEMPERATUR PÅ Y-AKSEN. PCR-PROGRAMMET SOM ER KJØRT ER HOLD VED 95 °C I 10 MINUTTER, OG DERETTER EN 3- STEGS AMPLIFIKASJON I 45 SYKLUSER MED TEMPERATURER PÅ 95, 58 OG 72 °C. HVER TOPP OG BUNN REPRESENTERER SAMMEN EN SYKLUS. TILSVARENDE PROGRAM ER BENYTTET VED ALLE PCR-KJØRINGER.

Tolking av amplifikasjonsplott ved PCR

Etter gjennomført PCR-reaksjon, får man et amplifikasjonsplott (figur 8) hvor målt signal i form av fluorescens fra amplifikasjonsreaksjonen er plottet på y-aksen mot antall PCR-sykluser på x-aksen. Signalet fra amplifikasjonsreaksjonen er proporsjonalt med mengde amplifisert produkt i prøven. Softwaren til PCR-maskinen tar utgangspunkt i tre beregninger for å bedømme om prøven er positiv eller negativ for genet man undersøker for. Det er kvalitet, intensitet og ytelse. Kvaliteten er et mål på hvor ren prøven er, intensiteten er et mål på størrelsen til eksponentiellfasen, og ytelse er relatert til den observerte effekten av prøven ved senere sykluser. Underveis i kjøringene vil det bli filtrert for biokjemiske og fysiske faktorer som kan føre til støy i reaksjonen. Filtrering av disse vil forberede nøyaktigheten til analysen (MygoPCR, p. 37).



FIGUR 8: AMPLIFIKASJONSPLOTT HVOR FLUORESCENS PÅ Y-AKSEN ER PLOTTET MOT ANTALL PCR-SYKLUSER PÅ X-AKSEN. FIGUREN VISER AT AMPLIFIKASJONSKURVEN HAR TO HOVEDFASER, EKSPONENTIELL- OG IKKE-EKSPONENTIELL FASE. CQ-VERDI VISES OGSÅ, DET ER HVOR AMPLIFIKASJONSKURVEN KRYSSER THRESHOLD LINE (BIO-RAD, 2020A).

Som plottet viser, har reaksjonskurven to ulike faser. Den første fasen er eksponentiell hvor mengden PCR-produkt dobler seg ved hver syklus. Etter hvert forbrukes komponenter som trengs i reaksjonen, og en eller flere av disse blir en begrensende faktor for PCR-reaksjonen. Reaksjonen sakker dermed ned farten, og går inn i en ikke-eksponentiell fase også kalt platåfasen.

I starten av reaksjonen vil fluorescensen som måles kun registreres som bakgrunnsstøy, og økninger i fluorescens vil ikke kunne detekteres selv om kurven etter hvert også begynner å stige. Når det så har gått noen sykluser og mengden PCR-produkt har doblet seg nok antall ganger, vil fluorescenssignalene bli detekterbare. Antallet sykluser som har gått når dette skjer, kalles quantification cycle eller cycle threshold (Cq- eller Ct-verdi). Dette er altså skjæringspunktet mellom amplifikasjonskurven og threshold line ved PCR reaksjonen. Verdien benyttes som et relativt mål på konsentrasjon i PCR-reaksjonen (ThermoFisher, 2016). Siden denne verdien måles i den eksponentielle fasen når reagensene ikke er begrensende, kan sanntids-PCR benyttes som en pålitelig måte til å nøyaktig beregne den initielle mengden templat i prøven. Dersom en stor mengde templat er tilstede i en prøve, trengs det relativt få sykluser for å få amplifisert nok produkt til å gi et fluorescenssignal over threshold-line. Reaksjoner som dette vil derfor ha lav Cq-verdi. Omvendt trengs det flere sykluser for å få et detekterbart signal dersom den initielle DNA-konsentrasjon er lav. Prøver med lav DNA-konsentrasjon vil derfor ha høyere Cq-verdi.

(Bio-Rad, 2020b).

Dupleks PCR

Dupleks PCR er en metode hvor to PCR-reaksjoner blir utført i samme rør samtidig, hvor to ulike primersett benyttes i en felles primer-probe miks (Sjøberg, 2013, pp. 183, 239). Siden de ulike genene er merket med prober med ulike fluoroforer, er det mulig å skille dem. Fluoroforene avgir signal ved ulike bølgelengder. Ved å velge ulike filtre på instrumentet kan det skilles mellom de ulike genene.

Sanntids-PCR

Realtime eller sanntids-PCR innebærer at mengden PCR-produkt kan måles kontinuerlig mens prøven blir kjørt. Det gjør det mulig å bestemme forekomst og mengde av en spesiell DNA-sekvens.

For å kunne påvise bestemte DNA-sekvenser, er det utviklet prober. Prober har en bestemt DNA-sekvens som er komplementær til deler av DNA-sekvensen i målgenet. De kan være syntetisk fremstilt, eller de kan være en bit av genomisk DNA (Sjøberg, 2013, p. 194). Prober som er merket, vil gi fra seg et signal dersom det er festet til målgenet, og kan slik vise om man har målgenet tilstede i prøvematerialet eller ikke. TaqMan-probe er en slik probe, og skal benyttes i dette PCR-oppsettet.

(Sjøberg, 2013, pp. 245-246)

TaqMan-probe og fluoroforene texas-red og FAM

En TaqMan-probe er merket med en fluorofor kalt reporter nær 5'-enden og en såkalt quencher nær 3'-enden. Fluoroforene som benyttes i forsøket er texas-red og FAM. Quencheren fanger opp lysenergi fra reporteren uten å sende det videre, og gjør at fluoroforen ikke gir fra seg signal når de sitter sammen på proben, og proben er intakt. Ved PCR binder TaqMan-proben seg mellom de to primerne. Når DNA polymerasen skal lage nytt DNA vil den bevege seg fra den ene primeren til den andre, og dermed passere TaqMan-proben. Proben splittes til enkle nukleotider som går i oppløsning på grunn av enzymet Taq polymerase i reaksjonsblandingen. Quencheren og reporteren blir dermed skilt fra hverandre, og reporteren vil frigi et signal i form av emisjon (Sjøberg, 2013, p. 246). Figur 9 viser hvordan en fluorofor fungerer.

Fluoroforen texas-red avgir rød farge med bølgelengder mellom 561 og 594 nm, og kan blant annet brukes for å merke lacY-genet (Thermofisher).

FAM er en annen fluorofor som avgir farge med bølgelengde mellom 494 og 520 nm. Denne fluoroforen er den mest brukte fluoroforen for deteksjon av oligonukleotider, som blant annet nukleotidene i DNA, og kan brukes for deteksjon av ipaH-genet (technologies).



FIGUR 9: FREMSTILLING AV HVORDAN EN FLUOROFOR FUNGERER. «F» REPRESENTERER FLUOROFOREN ELLER REPORTEREN, MENS Q REPRESENTERER QUENCHEREN. PROBEN BINDER SEG MELLOM PRIMERNE. NÅR DNA-POLYMERASEN PASSERER PROBEN, SPLITTES DEN TIL ENKLE NUKLEOTIDER. DA SKILLES REPORTEREN OG QUENCHEREN FRA HVERANDRE, QUENCHEREN KAN IKKE LENGER FANGE OPP LYSENERGIEN FRA REPORTEREN, OG DET FRIGJØRES DERMED ET SIGNAL SOM KAN DETEKTERES VED BESTEMTE BØLGELENGDER.

Riktighet

Ved PCR er riktighet et sentralt og viktig begrep. Bolann (Bolann, 2009, p. 117) definerer riktighet som samsvar mellom gjennomsnittet av mange målinger av et prøvemateriale, og prøvematerialets sanne verdi.

Effektivitet og linearitet

En metodes riktighet kan undersøkes ved hjelp av linearitet og effektivitet. Linearitet undersøkes ved hjelp av standardkurver laget fra kjøring av fortynningsrekker. Korrelasjonskoeffisienten i andre potens, R^2 , angir grad av linearitet. Det er ønskelig at denne verdien ligger så langt opp mot 1 som mulig, og jo nærmere 1 den ligger, jo mer lineær er standardkurven. Linearitet angir grad av sammenheng mellom verdiene på x- og y-aksen i standardkurven (Pripp, 2018).

Effektivitet for PCR er sentralt i vurderingen av en PCR-kjøring sin kvalitet. Ønsket effektivitet ligger mellom 90 - 110% (Christensen, Kommedal, Tylden, & Rykkvin, 2018). Effektivitet undersøkes på samme måte som linearitet. Det benyttes en fortynningsrekke som man lager en standardkurve av. Videre benyttes stigningstallet i ligningen for standardkurven til å beregne effektivitet ved hjelp av følgende formel:

FORMEL 1

$$\text{Effektivitet} = (10^{\frac{1}{(\text{stigningstall})}} - 1) * 100\%$$

Sensitivitet og spesifisitet

Sensitivitet og spesifisitet er sentrale egenskaper for diagnostiske metoder. Sensitivitet er sannsynligheten for at et positivt resultat faktisk er positiv, mens spesifisitet er sannsynligheten for at et negativt resultat faktisk er negativt (Lydersen, 2017).

En metodes spesifisitet og sensitivitet kan bestemmes ved bruk av formel 2 og 3, og bør være så nær 100 % som mulig.

FORMEL 2

$$\text{Spesifisitet} = \frac{\text{antall negative resultat}}{\text{antall sanne negative prøver}} * 100 \%$$

FORMEL 3

$$\text{Sensitivitet} = \frac{\text{antall positive resultat}}{\text{antall sanne positive prøver}} * 100 \%$$

Presisjon

Bolann (Bolann, 2009, p. 15) definerer presisjon som samsvar mellom gjentatte, uavhengige målinger. Presisjonen kan også ses på som den tilfeldige variasjonen mellom målesvarene, og uttrykkes som en variasjonskoeffisient (CV %). For å beregne CV %, må også analysens standardavvik være kjent. Standardavviket kan beregnes som vist i formel 4. Videre beregnes CV % etter formel 5 (Bolann, 2009, p. 15).

FORMEL 4

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

S er standardavvik, n er antall målinger, X_i er den enkelte måling, og \bar{X} er gjennomsnittsverdien av alle målingene (Bolann, 2009, p. 15).

FORMEL 5

$$CV \% = \frac{S}{\bar{x}} * 100 \%$$

Beregningen av en metodes standardavvik og variasjonskoeffisient, blir mer presis jo mer måledata som er samlet inn, og beregningene er basert på. Ideelt bør det være omtrent førti målinger (Bolann, 2009, p. 17).

Avvikskriteriene for metoden som skal brukes er basert på Westgards regler for avvik. En enkeltmåling utenfor 3 standardavvik blir beregnet som et avvik. Det samme blir to påfølgende målinger mellom 2 og 3 standardavvik på samme side av gjennomsnittet. Dersom syv målinger etter hverandre kun blir enten høyere eller lavere enn gjennomsnittet er dette også et avvik. Prøvesvar som er avvikende kan ikke gis ut (Jenum, Dorengerg, Hvidsten, & Kommedal, 2017).

Variasjon mellom ulike PCR-kjøringer har vist seg å være stor, og det er dermed vanlig å basere seg på ± 2 sykluser (Ct-trinn). Det tilsvarer en CV% på omtrent 2,5%. En CV% på 2,5% blir brukt til å sette opp en aksjonsgrense. Det betyr at resultater med en CV% på mer enn 2,5% må analyseres på nytt, eller at en annen handling må utføres for å finne ut hvorfor svaret blir avvikende. (Christensen et al., 2018)

Repeterbarhet

Med en metodes repeterbarhet vises samsvaret mellom gjentatte målinger gjort under samme målebetingelser. Dette kan også kalles innenseriepresisjon (Bolann, 2009, p. 117). Repeterbarhet beregnes ved å analysere samme prøve flere ganger i en måleserie, og beskriver metodens evne til å analysere samme prøvemateriale likt i samme måleserie. Repeterbarhet beregnes etter formelen for standardavvik for duplikate målinger gitt under:

FORMEL 6

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n d_i^2}{2n}}$$

d_i er differansen mellom de duplikate målingene (Bolann, 2009, p. 51). Videre benyttes standardavviket til å beregne variasjonskoeffisienten slik formel 5 viser.

Reproduserbarhet

En metodes reproduserbarhet er samsvaret mellom gjentatte målinger gjort under endrede målebetingelser, og beskriver hvor stor variasjon en metode har fra dag til dag, ved analysering av samme prøvemateriale (Bolann, 2009, p. 117). Reproduserbarhet kan også kalles mellomseriepresisjon, og beregnes ved å analysere samme prøve flere ganger i forskjellige måleserier. Beregningen av reproduserbarhet skjer på samme måte som for repeterbarhet, ved bruk av formel 6 for standardavvik og 5 for variasjonskoeffisient.

Robusthet

Robusthet er et system sin evne til å tåle ytre påkjenninger og stress, som for eksempel temperaturendringer (Aven, 2016). Metodens robusthet kan kommenteres ved å se på endringer i analysesvaret til de samme prøvene målt ved forskjellige temperaturer.

Materiale og metode

Stammer som er benyttet i prosjektet

I bachelorprosjektet arbeides det med bakterier av typene enteroinvasiv *Escherichia coli* (EIEC), *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri* og *Shigella dysenteriae*.

Prøvematerialet som ble benyttet, er for det meste gamle pasientprøver sådd ut og oppbevart i frys, hvor de forskjellige bakteriene tidligere er påvist. Det benyttes totalt 53 prøver, hvorav 16 er EIEC, 7 er *Shigella flexneri*, 21 er *Shigella sonnei*, 7 er *Shigella boydii*, 1 er *Shigella dysenteriae* og 1 kun er oppført som *Shigella*. Prøvene er innhentet mellom 2011 og 2020 fra pasienter som har vært infisert med bakteriene i den gitte perioden.

I forkant har veilederne på Mikrobiologisk avdeling (MIA) gjort det meste av forarbeidet med prøvene. Dette inkluderer tining av de frysede prøvene, utsæd på skåler for å dyrke frem bakterievekst og isolering av de fleste bakteriene. Det er bestemt at studenter ikke skal jobbe med oppdyrket *Shigella*, da denne bakterien er svært smittsom.

Veilederne på MIA har også forberedt ipaH-negative sop som skal analyseres for å teste metodens spesifisitet. Dette er gjort ved å ta en øse med bakterier fra agarskålene. Bakteriene er deretter slemmet opp i destillert vann.

En oversikt over prøvene som er benyttet i prosjektet kan sees i vedlegg 1 under «stammer benyttet».

Pre-PCR

Pre-PCR prosessering fjerner komponenter som kan være forstyrrende i en PCR-reaksjon. Pre-PCR omfatter alle trinnene som utføres før deteksjon av PCR-produkt, det vil si prøvetaking, prøveforbereding og DNA-amplifisering. Målet med pre-PCR er å konvertere den komplekse initielle prøven med sine DNA-målsekvenser til PCR-amplifiserbare prøver.

For å preparere prøvene ble det benyttet en fysisk metode basert på bakterievekst på agarskåler. Ved å velge selektive medium, som blodskål, kan man dyrke frem bakteriene man ønsker å analysere ved PCR. Dette er en enkel metode med lave kostnader. Siden cellene man får ved dyrkning også inneholder høye konsentrasjoner av makromolekyler som kan bli forstyrrende i PCR-reaksjonen, kokes prøvene. Slik isoleres også DNA (Rådström, Knutsson, Wolffs, Lövenklev, & Löfström, 2004).

Isolering av bakterier fra bakteriestammer

For isolering av DNA, og inaktivering av potensielt patogene bakterier fra dyrket feces, utføres koking av oppdyrket prøvemateriale.

Et lite sop bakterier/kolonier slemmes opp i et makrosentrifugerør tilsatt 0,5 mL destillert vann. Destillert vann og tom øse benyttes som blankprøve for å kontrollere at forholdene er sterile. For å lysere bakterien slik at DNA frigjøres, settes rørene i varmeblokk ved 100 °C i 10 minutter. Celleveggen åpner seg slik at innholdet frigjøres. Suspensjonen avkjøles og sentrifugeres i 5 minutter ved 16 060 rpm og settes i PCR-maskinen MyGo Pro som sees på figur 10.



FIGUR 10: MYGO PRO, INSTRUMENTET BENYTTET I PROSJEKTET VIST NÅR DEN ER FERDIG MED KJØRING (GRØNT LYS), NÅR DEN ER KLAR FOR NY KJØRING (RØDT LYS), OG VED INNSETTING AV PRØVER I STRIPS (NANOLIFEQUEST, 2020).

Primer- og probedesign

Primer- og probedesign er utarbeidet av seksjonsoverlege Øyvind Kommedal i forkant av oppgaven. Han har tatt utgangspunkt i gendatabaser. For lacY-genet er det valgt to ulike forwardprimere ettersom det i gendatabaser ble funnet en mutasjon hos noen bakterier i lacY-genet. Derfor velges en primer som kan påvise denne muterte formen, i tillegg til den “normale” varianten av genet. Dette vil sikre at lacY-genet i pasientstammene kommer med dersom de er av den muterte varianten. Dette problemet gjelder ikke for reverseprimeren. For ipaH-genet er det utarbeidet en forward- og en reverseprimer. Vurderingene som er tatt her sikrer at primerne gir metoden god nok sensitivitet. Det blir ikke gjennomført flere analyser for å beregne metodens sensitivitet.

For lacY-genet benyttes følgende primere og probe:

TABELL 3: NAVN OG BASESEKVENNS FOR LAC^Y-PRIMERE OG -PROBE BENYTTET I PROSJEKTET. DET BENYTTES TRE PRIMERE; TO FORWARD OG EN REVERSE, SAMT PROBE MERKET MED FLOUORFOREN TEXAS-RED.

Primer/probe	Basesekvens
lacY1-F	GGAACGGTAYTTCAAACA
lacY2-F	GCATCACCTTCAAACATA
lacY-R	CTGGCTGGCACYATTATG
lacY-Pb	TEX-CTCATCGTTCGACYACCTCAGC

For ipaH-genet benyttes følgende primere og probe:

TABELL 4: NAVN OG BASESEKVENNS FOR IPA^H-PRIMERE OG -PROBE BENYTTET I PROSJEKTET. DET BENYTTES TO PRIMERE; EN FORWARD OG EN REVERSE, SAMT PROBE MERKET MED FLUORFOREN FAM.

Primer/probe	Basesekvens
ipaH-F	CTTCGACAGCAGTCTTTC
ipaH-R	GGAGATTGTTCCATGTGAG
ipaH-Pb	FAM-CTYTCAGTGGCATCAGCAGCA

Preparering av PCR-amplifikasjonsmiks

I prosjektet benyttes LightCycler 480 Probes Master bestående av Taq DNA polymerase, reaksjonsbuffer, dNTP miks og MgCl₂ (6,4 mM). Det ble også benyttet PCR-vann fra samme leverandør.

Ved kjøring av prøver tillages det alltid en negativ kontroll. Den er laget ved at vann tilsettes istedenfor templat-DNA (prøvemateriale). Ved bruk av negativ kontroll kontrolleres det for kontaminering ved PCR-oppsettet.

Probes Master inneholder ikke primere og prober, og dette må derfor tilsettes. Den ferdige blandingen kalles amplifikasjonsmiks. Det anbefales en sluttkonsentrasjon på 0,3-1 µM, 0,5 µM av hver primer. For probene er det anbefalt en sluttkonsentrasjon på 0,05-0,2 µM. Ved å

lage en singelpleks ipaH primer-probe miks etter følgende tabeller for de ulike genene, oppnås sluttkonsentrasjonen etter ønsket beskrevet over. Viser til vedlegg 3 ”LightCycler 480 Probesmaster versjon 10”.

TABELL 5: OPPSETT FOR TILLAGING AV SINGELPLEKS IPA^H PRIMER-PROBE MIKS HVOR NAVN PÅ PRIMER/PROBE, KONSENTRASJON OG VOLUM AV DEN GITTE PRIMEREN/PROBEN, KONSENTRASJONEN AV PRIMEREN/PROBEN I MIKS OG I PCR-REAKSJON, SAMT VOLUM AV HVER PRIMER/PROBE PER PRØVE ER PRESENTERT.

Primer/ probe	Konsentrasjon (μM)	Volum (μl)	Konsentrasjon i miks (μM)	Konsentrasjon i PCR-reaksjon (μM)	Volum per prøve (μl)
ipaH-F	10	80	4	0,4	0,8
ipaH-R	10	80	4	0,4	0,8
ipaH-Pb	10	40	2	0,2	0,4
Totalt		200			2

Primer-probe miksene benyttes videre i amplifikasjonsmiksen for ipaH-genet.

TABELL 6: OPPSETT FOR TILLAGING AV SINGELPLEKS LAC^Y PRIMER-PROBE MIKS HVOR NAVN PÅ PRIMER/PROBE, KONSENTRASJON OG VOLUM AV DEN GITTE PRIMEREN/PROBEN, KONSENTRASJONEN AV PRIMEREN/PROBEN I MIKS OG I PCR-REAKSJON, SAMT VOLUM AV HVER PRIMER/PROBE PER PRØVE ER PRESENTERT.

Primer/ probe	Konsentrasjon (μM)	Volum (μl)	Konsentrasjon i miks (μM)	Konsentrasjon i PCR-reaksjon (μM)	Volum per prøve (μl)
lacY1-F	10	80	2,86	0,4	0,8
lacY2-F	10	80	2,86	0,4	0,8
lacY-R	10	80	2,86	0,4	0,8
lacY-Pb	10	40	1,42	0,2	0,4
Totalt		280			2,8

Løsning bestående av primere og hydrolyseringsprober med 10 x konsentrasjon som tabellen over viser, benyttes videre i preparering av amplifikasjonsmiks.

Oppsettet for tillaging av singelpleks primer-probe miks for genene ipaH og lacY er laget ut ifra vedlegg 3 «LightCycler 480 Probes Master versjon 10».

Volumene i tabell 7 er for amplifikasjonsmiks for en prøve. Det lages amplifikasjonsmiks for alle prøvene i et oppsett samtidig. Det ble også laget til noen ekstra prøver for å være sikker på å ha nok til alle reaksjoner. Volumene i tabellen ble derfor multiplisert med antall reaksjoner. Man vil da ha 15 μ L amplifikasjonsmiks per reaksjon.

TABELL 7: OPPSETT FOR SINGELPLEKS AMPLIFIKASJONSMIKS FOR DE ULIKE GENENE HVOR NAVN PÅ REAGENS OG VOLUM FOR DE ULIKE GENENE ER PRESENTERT.

Reagens	Volum for ipaH (μL)	Volum for lacY (μL)
PCR-vann	3,0	2,2
Primer-probe miks, 10x konsentrasjon	2,0	2,8
Probes master	10,0	10,0
Totalvolum	15,0	15,0

Ved bruk av MyGo Pro PCR-instrumentet benyttes det strips med 8 prøverør per strips. På en PCR-kjøring er det plass til fire strips, og dermed 32 prøver. 15 μ L PCR-miks tilsettes hvert rør på PCR-stripsen. Deretter tilsettes 5 μ L templat DNA (prøve). Stripsen plasseres i instrumentet og PCR-programmet angitt i tabell 12 kjøres. Denne metoden for preparering av primer-probe miks, amplifikasjonsmiks og tillaging av PCR-oppsett ble benyttet ved alle PCR-kjøringer som ble utført. Oppsett for singelpleks amplifikasjonsmiks er laget ut ifra vedlegg 3 «LightCycler 480 Probes Master versjon 10». Brukerveiledning for instrumentet ligger vedlagt i vedlegg 4 «Brukerveiledning for MyGo Pro».

(Roche, 2016).

Videre ble det laget en dupleks amplifikasjonsmiks. Tabell 8 viser miksen som ble benyttet ved første kjøring av fortynningsrekkene for dupleks PCR.

TABELL 8: OPPSETT FOR TILLAGING AV DUPEKS IPA_H/LAC_Y PRIMER-PROBE MIKS VED FØRSTE FORSØK PÅ DUPEKS PCR AV FORTYNNINGSREKKER HVOR NAVN PÅ PRIMER/PROBE, KONSENTRASJON OG VOLUM AV DEN GITTE PRIMEREN/PROBEN, KONSENTRASJONEN AV PRIMEREN/PROBEN I MIKS OG I PCR-REAKSJONEN, SAMT VOLUM AV HVER PRIMER/PROBE ER PRESENTERT.

	Konsentrasjon (μM)	Volum (μl)	Konsentrasjon i miks (μM)	Konsentrasjon i PCR-reaksjon (μM)	Volum per prøve (μl)
ipaH-F	10	80	1,67	0,4	0,8
ipaH-R	10	80	1,67	0,4	0,8
ipaH-Pb	10	40	0,83	0,2	0,4
lacY1-F	10	80	1,67	0,4	0,8
lacY2-F	10	80	1,67	0,4	0,8
lacY-R	10	80	1,67	0,4	0,8
lacY-Pb	10	40	0,83	0,2	0,4
Totalt		480			4,8

Siden amplifikasjonskurvene for lacY-genet ikke ble fine, ble det gjort ett nytt forsøk neste dag hvor det ble endret på primerkonsentrasjonen for å se om kurvene ble finere (tabell 9).

TABELL 9: OPPSETT FOR TILLAGING AV DUPELEKS IPA^H/LAC^Y PRIMER-PROBE MIKS VED ANDRE FORSØK PÅ DUPELEKS PCR AV FORTYNNINGREKKER HVOR NAVN PÅ PRIMER/PROBE, KONSENTRASJON OG VOLUM AV DEN GITTE PRIMEREN/PROBEN, KONSENTRASJONEN AV PRIMEREN/PROBEN I MIKS OG I PCR-REAKSJONEN, SAMT VOLUM AV HVER PRIMER/PROBE ER PRESENTERT.

	Konsentrasjon (μM)	Volum (μl)	Konsentrasjon i miks (μM)	Konsentrasjon i PCR-reaksjon (μM)	Volum per prøve (μl)
ipaH-F	10	40	0,83	0,2	0,4
ipaH-R	10	40	0,83	0,2	0,4
ipaH-Pb	10	40	0,83	0,2	0,4
lacY1-F	10	80	1,67	0,4	0,8
lacY2-F	10	80	1,67	0,4	0,8
lacY-R	10	80	1,67	0,4	0,8
lacY-Pb	10	40	0,83	0,2	0,4
Totalt		400			4,0

Dupleks primer-probe miksen ble videre benyttet til å lage en dupleks ipaH/lacY amplifikasjonmiksgitt i tabell 10.

Oppsettet for tillaging av dupleks primer-probe miks for genene ipaH og lacY er laget ut ifra vedlegg 3 «LightCycler 480 Probes Master versjon 10».

TABELL 10: OPPSETT FOR DUPELEKS AMPLIFIKASJONSMIKS FOR GENENE LAC^Y OG IPA^H HVOR NAVN PÅ REAGENS OG VOLUM FOR DE ULIKE GENENE ER PRESENTERT.

Reagens	Volum (μL)
PCR-vann	1,0
Primer-probe miks, 10x konsentrasjon	4,0
Probes master	10,0
Totalvolum	15,0

15 µL amplifikasjonsmikros pipetteres i alle brønner før 5 µL templat DNA (prøve) tilsettes. Resten av utførelsen er lik som for singelpleks PCR beskrevet tidligere.

Oppsett for dupleks amplifikasjonsmikros er laget basert på vedlegg 3 «LightCycler 480 Probes Master versjon 10».

Kontroller

I prosjektet benyttes to kontrollstammer presentert i følgende tabell:

TABELL 11: KONTROLLSTAMMER MED TILHØRENDE ATCC-NUMMER OG Cq-VERDI BENYTTET I PROSJEKTET.

Kontrollstamme	ATCC-nummer	Positiv for	Cq-verdi
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC* 25931	ipaH	12,19
EPEC	ATCC* 43887	lacY	17,96

(*ATCC = American Type Culture Collection. Celleblank hvor kjente stammer med mikrober oppbevares.)

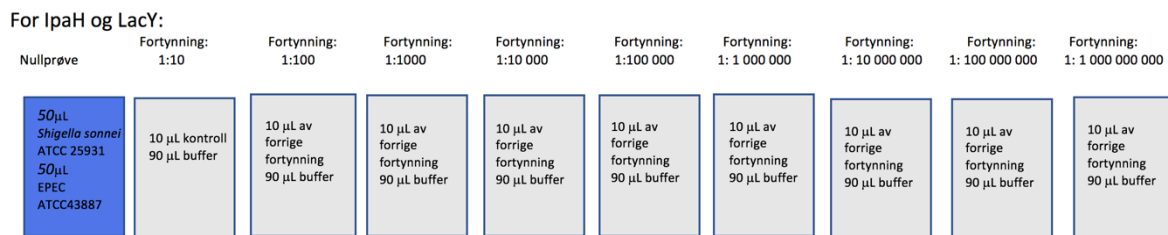
Det er ønskelig at kontrollverdien sin Cq-verdi ligger rundt 30. Det tilsvarer en svak positiv prøve slik at det kontrolleres at metoden klarer å påvise svake positive prøver. *Shigella sonnei* stammen (ATCC 25931) sin Cq-verdi på 12,19 tilsier at prøven er sterkt positiv. Denne må derfor fortynnes før bruk. En ti-foldsfortynning vil gjøre at Cq-verdien øker med cirka 3 sykluser. Denne kontrollen må dermed fortynnes 1:1 000 000 med elueringsbuffer slik at man oppnår en teoretisk Cq-verdi lik 30,19. Det samme gjelder EPEC stammen (ATCC 43887) med Cq-verdi på 17,96. Denne kontrollen fortynnes 1:10 000 med elueringsbuffer, slik at man oppnår en teoretisk Cq-verdi på 29,96. Elueringsbufferen sikrer at DNA holder seg stabilt over lengre tid. Cq-verdiene er bestemt ved PCR. Kontrollstammene kjøres 29 ganger som en blanding sammen med tre negative kontroller i hver sin singelpleks PCR for de to genene, for å teste metodens repeterbarhet. Videre er standardavvik og variasjonskoeffisient beregnet i Excel. I tillegg er 11 positive kontroller for IpaH- og lacY-genene, fordelt over 4 kjøringene benyttet i beregning av metodens reproduktibilitet.

EPEC brukes som kontrollstamme for lacY-genet ettersom laboratoriet ikke har kontrollstamme av EIEC. Begge disse stammene inneholder lacY-genet og vil være derfor være likeverdige som kontroller.

De to kontrollstammene er slått sammen til en felles positiv kontroll som benyttes ved hver PCR-kjøring. Det kjøres også tre negative kontroller som inneholder nukleasefritt vann og amplifikasjonsmiks ved hver PCR-kjøring.

Fortynningsrekke for kontrollstammer

Det lages fortynningsrekke av kontrollstammene for de to genene for å finne lineariteten og effektiviteten til metoden. 50 µL av hver kontrollstamme blandes sammen, og blandingen blir videre fortynnet i elueringsbuffer slik figur 11 viser. Fortynningsrekkene kjøres som singelpleks og dupleks PCR.



FIGUR 11: FORTYNNINGSREKKE FOR KONTROLLSTAMMENE. NULLPRØVEN BESTÅR AV 50 U_L SHIGELLA SONNEI (ATCC 25931) OG 50 U_L EPEC (ATCC 43887). DENNE ER FORTYNNET HELT TIL 1:1 000 000 000 VED HJELP AV ELUERINGSBUFFER.

Effektiviteten og lineariteten ble beregnet ved hjelp av standardkurve laget av målingene av fortynningsrekken. Korrelasjonskoeffisienten i andre potens, R^2 , beregnes, og stigningstallet i ligningen til standardkurven benyttes til å beregne effektiviteten.

Etter kontrollstammene er fortynnet måles konsentrasjonen av DNA med instrumentet Qubit fluorometer 3.0. Dette gjøres ved hjelp av Qubit dsDNA HS-reagens og Qubit dsDNA HS-buffer i forholdet 1:200. To standarder benyttes også for å danne kurven som brukes for å avlese DNA-konsentrasjon i prøvene. Instrumentet beregner konsentrasjonen av DNA i prøvene automatisk (Thermofisher, 2015). Dette gjøres for å finne deteksjonsgrensen som er et kvalitetsmål og godkjenningkriterium for at metoden skal kunne tas i bruk.

Deteksjonsgrensen skal være bedre enn 100 kopier per PCR. Dette betyr at metoden skal kunne detektere prøver der antall kopier av templatet er mindre enn 100 per PCR-kjøring. Etter å ha målt DNA-konsentrasjonen benyttes den, sammen med genomstørrelsen til bakteriene (funnet ved hjelp av PubMed), til å beregne antall kopier av templatet per μL som prøven inneholder. Det gjøres ved hjelp av kalkulator på nettet (Staroscik, 2004). Antall kopier av templatet per μL ganges videre med mengde templat i reaksjonsmiksen (2,5 μL) for å beregne antall kopier av templatet som detekteres per PCR-kjøring.

PCR

Alle PCR-reaksjonene ble utført på PCR-instrumentet MyGo Pro etter PCR-program gitt i tabell 12. Reaksjonen ble kjørt i 45 sykluser.

TABELL 12: PCR-PROGRAM BENYTTET FOR AMPLIFISERING AV LAC \bar{Y} - OG IPA \bar{H} -GENENE UTFØRT PÅ MYGO PRO HVOR TEMPERATUR, TID OG RAMP FOR INNLEDENDE DENATURERING, DENATURERING, HYBRIDISERING OG SYNTSE ER PRESENTERT.

	Innledende denaturering	PCR		
		45 sykluser		
		Denaturering	Hybridisering	Syntese
Temperatur	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C
Tid	10 minutter	10 sekunder	40 sekunder	3 sekunder
Ramp	4.4	4.4	2.2	4.4

Som tabellen viser, ble hybridisering utført ved 58 °C. Den positive kontrollen for ipaH- og lacY-genene ble også testet ved 56 og 60 °C for å teste hvor robuste genene er.

11 ipaH-negative sop ble kjørt ved samme PCR-program for å teste metodens spesifisitet.

PCR-programmet som er benyttet er utarbeidet av ekstern veileder basert på vedlegg 3 «LightCycler 480 Probes Master versjon 10».

Post-PCR

Etter å ha utført singelpleks PCR for de to genene i prøvene, skal det være mulig å skille mellom EIEC og *Shigella* spp. etter hvilke gener prøven er positiv for. EIEC er positiv for både ipaH- og lacY-genet, mens *Shigella* spp. kun er positiv for ipaH-genet. Siden probene er merket med ulike fluoroforer som avgir signal ved ulike bølgelengder, FAM og texas-red, kan bakteriene skilles.

Resultat

Resultatene i prosjektet er presentert i tabeller og figurer med tilhørende tekst. Alle resultat kan sees i vedlegg 1.

Konsentrasjonsmåling av DNA i kontrollstammene

Resultatene av måling av DNA-konsentrasjonen i kontrollstammene for beregning av deteksjonsgrensen til PCR-oppsettet er presentert i følgende tabell. Resultatene kan sees i vedlegg 1 under «DNA konsentrasjon».

TABELL 13: KONSENTRASJONSMÅLING AV DNA I KONTROLLSTAMMENE MÅLT I TO PARALLELLER. GJENNOMSNI TTET AV PARALLELLENE ER BENYTTET SAMMEN MED GENOMSTØRRELSEN I BEREGNING AV ANTALL KOPIER ER AV TEMPLATET PER PCR.

Kontroll- stamme	DNA konsentrasjon (ng/ μ L)			Genom- størrelse	Antall kopier av templatet per μ L	Antall kopier av templatet per PCR
	1. parallell	2. parallell	Gjennom- snitt			
<i>Shigella</i> <i>sonnei</i> ATCC 25931*	10,60	10,70	10,65	4,848,621	0,203	0,5075
EPEC ATCC 43887**	4,21	3,81	4,01	4,962,700	7,49	18,725

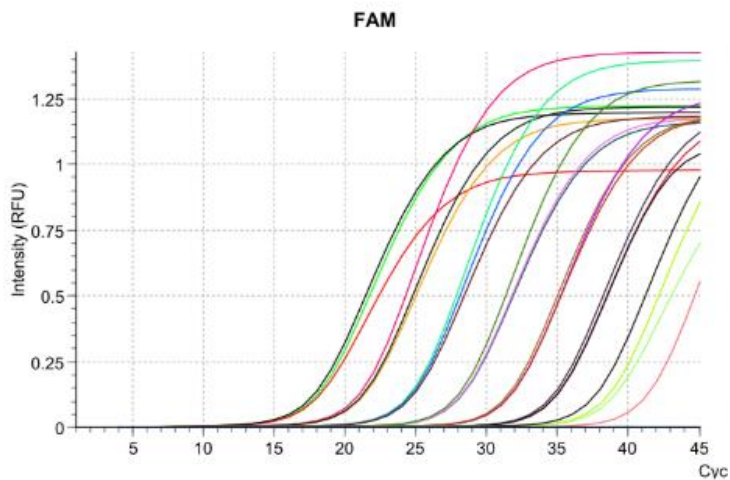
*kontrollstammen *Shigella sonnei* ATCC 25931 er fortynnet 1:10000000

**kontrollstammen EPEC ATCC 43887 er fortynnet 1:100000

Tabell 13 viser konsentrasjonsmålingene av DNA i kontrollstammene. Konsentrasjonen er målt i to paralleller, og gjennomsnittet er beregnet. Tabellen viser også genomstørrelsen til kontrollstammene, antall kopier av templatet per μ L i prøvematerialet, og antall kopier av templatet per PCR.

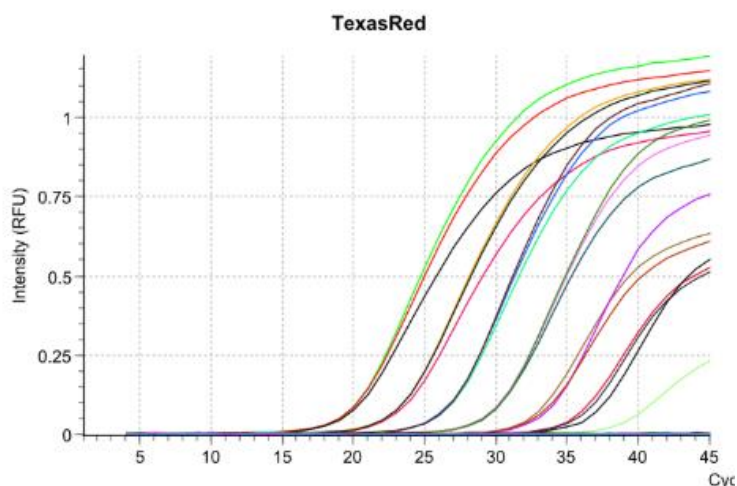
Resultat av PCR-kjøring av fortynningsrekker

Figur 12-15 viser ulike amplifikasjonsplott hentet fra resultatrapportene etter PCR av fortynningsrekke ble utført. Hver enkelt kurve representerer en prøve. Resultatene kan sees i vedlegg 1 under «fortynningsrekke».



FIGUR 12: AMPLIFIKASJONSPLOTT AV SINGELPLEKS-FORTYNNINGSREKKE AV IPA_H-GENET MERKET MED FLUOROFOREN FAM.

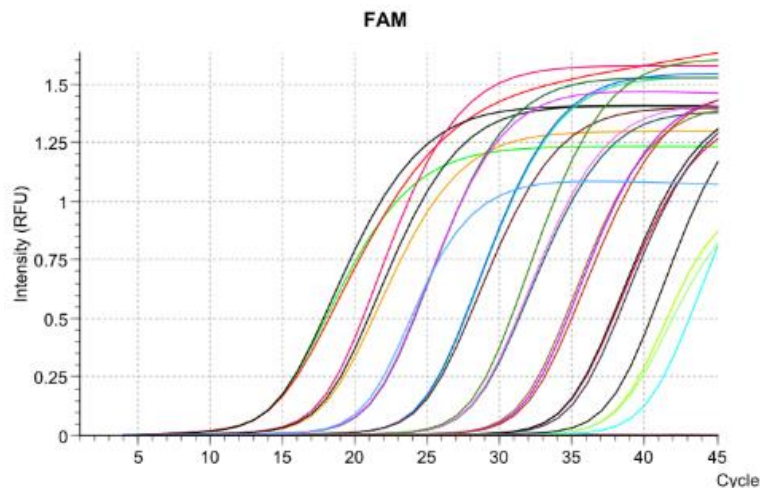
Figur 12 viser amplifikasjonsplottet av singelpleks-fortynningsrekken av ipaH-genet merket med fluoroforen FAM. Amplifikasjonsplottet viser at alle fortynningene har en eksponentiell kurve.



FIGUR 13: AMPLIFIKASJONSPLOTT AV SINGELPLEKS-FORTYNNINGSREKKE AV LAC_Y-GENET MERKET MED FLUOROFOREN TEXAS-RED.

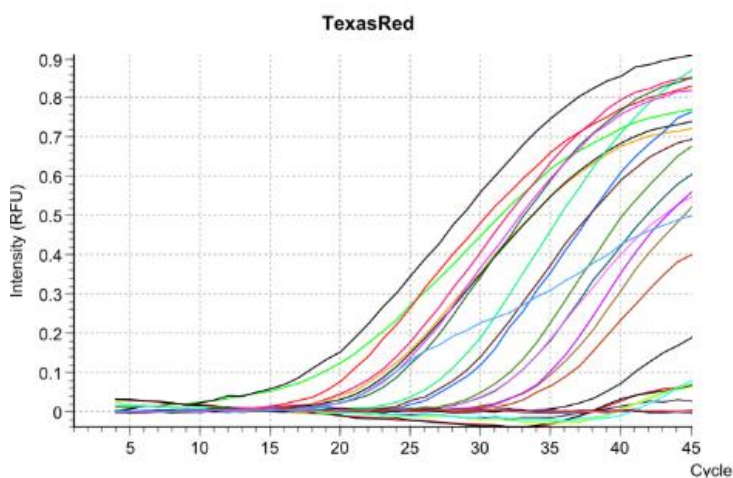
Figur 13 viser amplifikasjonsplottet av singelpleks-fortynningsrekken av lacY-genet merket med fluoroforen texas-red. Her følger også alle fortynningene en eksponentiell kurve, men man kan se at noen av fortynningene er svakere positiv enn andre.

Resultatet av singelpleks PCR-reaksjonene for ipaH- og lacY-genene i figur 12 og 13 brukes videre til å lage standardkurve for å kunne beregne linearitet og effektivitet til metoden.



FIGUR 14: AMPLIFIKASJONSPLOTT AV DUPEKS-FORTYNNINGSREKKE AV IPA_H-GENET MERKET MED FLUOROFOREN FAM.

Figur 14 viser amplifikasjonsplottet av dupleks-fortynningsrekken av ipaH-genet merket med fluoroforen FAM. Alle fortynningene viser en eksponentiell kurve, som vil si at reaksjonsbetingelsene for ipaH-genet i dupleks-reaksjonen var egnet for metodens hensikt.



FIGUR 15: AMPLIFIKASJONSPLOTT AV DUPEKS-FORTYNNINGSREKKE AV LAC_Y-GENET MERKET MED FLUOROFOREN TEXAS-RED.

Figur 15 viser amplifikasjonsplottet av dupleks-fortynningsrekke av lacY-genet merket med fluoroforen texas-red. Her viser ikke alle fortynningene en eksponentiell kurve, og reaksjonsbetingelsene har ikke vært gunstige for dette genet i dupleks PCR-reaksjonen.

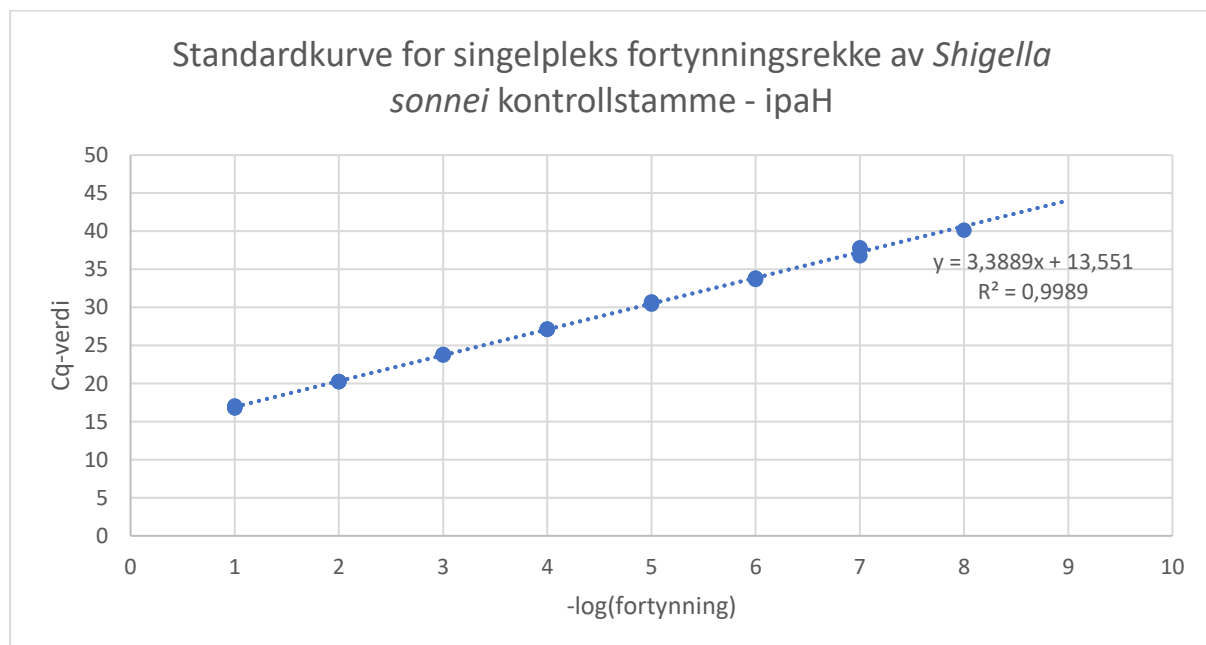
Resultatet av dupleks PCR-reaksjonene for ipaH- og lacY-genene i figur 14 og 15 brukes videre til å lage standardkurve for å kunne beregne linearitet og effektivitet til metoden.

Riktighet

Riktigheten til metoden er undersøkt ved effektivitet, linearitet og spesifisitet. Resultatene er presentert i grafer med tilhørende beregninger og er til slutt oppsummert i tabell 14.

Effektivitet og linearitet

Figur 16-19 viser standardkurver etter kjøring av singel- og dupleks fortynningsrekker for de to genene. I figurene er ligningen til standardkurven og korrelasjonskoeffisienten i andre potens presentert. Standardkurvene er laget ut fra resultatene fra PCR-reaksjonene i figur 12-15. Resultatene kan sees i vedlegg 1 under «fortynningsrekke».



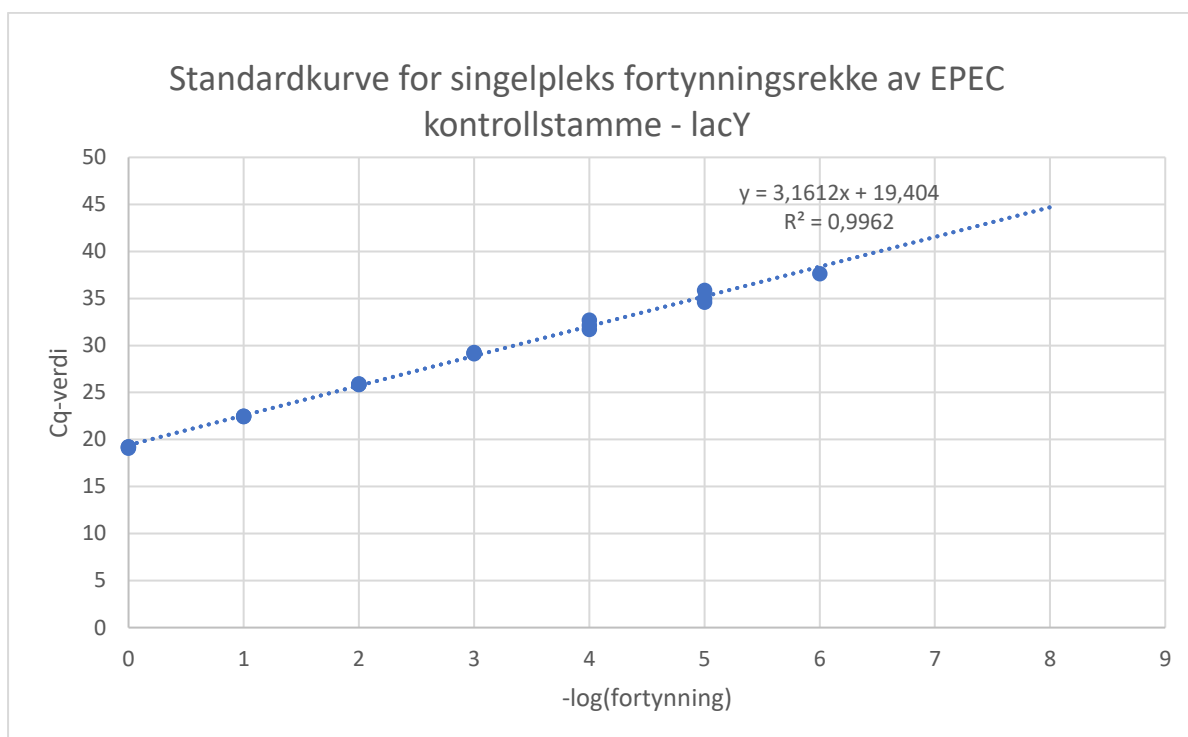
FIGUR 16: STANDARDKURVE AV SINGELPLEKS FORTYNNINGSREKKE AV SHIGELLA SONNEI (ATCC 25931) KONTROLLSTAMME BRUKT FOR Å BEREKNE EFFEKTIVITET OG LINEARITET FOR IPAH-GENET. CQ-VERDI ER PRESENTERT PÅ Y-AKSEN OG DEN NEGATIVE LOGARITMEN AV FORTYNNINGEN PÅ X-AKSEN.

Standardkurven er laget ut fra resultatene i amplifikasjonsplottet i figur 12. Likningen for kurven blir videre brukt for å beregne effektivitet til metoden, mens R^2 -verdien brukes for å bestemme metodens linearitet gitt tabell 14.

Effektiviteten til metoden beregnes ved hjelp av formel 1 slik som eksempelet under viser.

$$\text{Effektivitet} = (10^{\frac{1}{3,3889}} - 1) * 100 \% = 97,3 \%$$

Den beregnede effektiviteten for singelpleks PCR-reaksjonen av ipaH-genet er 97,3 %.

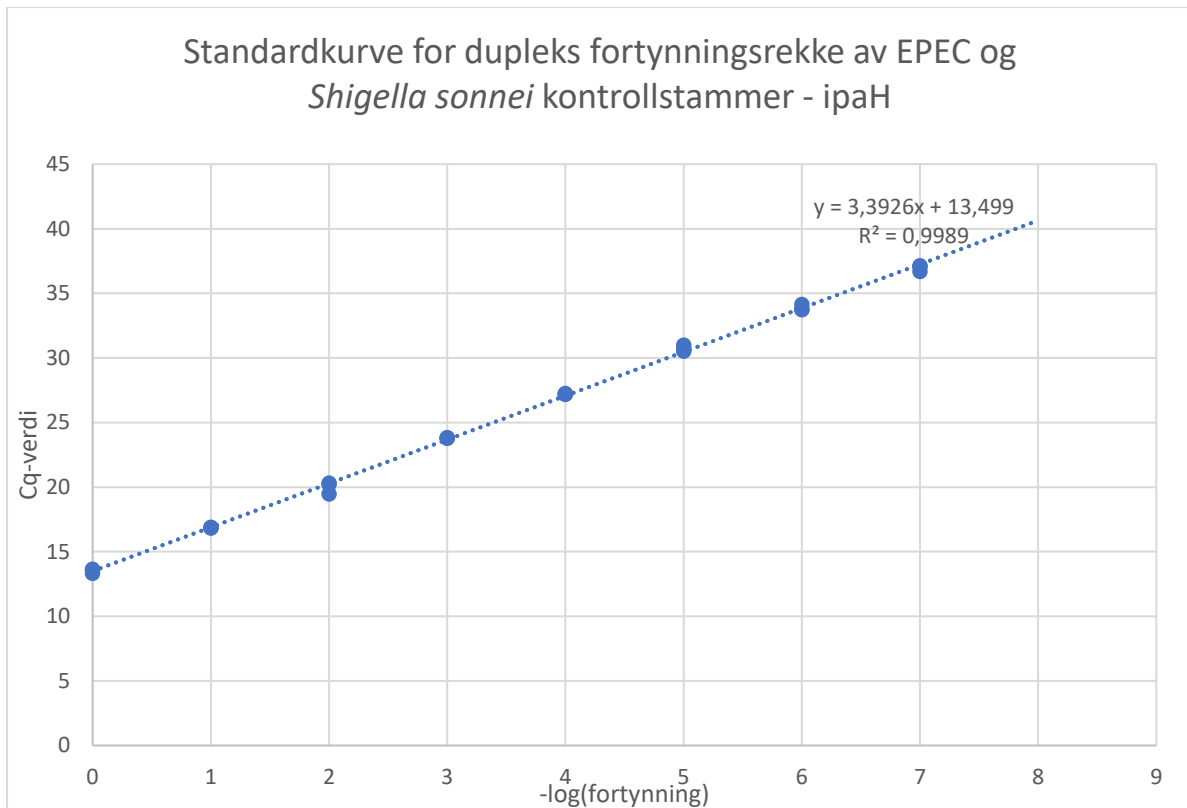


FIGUR 17: STANDARDKURVE AV SINGELPLEKS FORTYNNINGSREKKE AV EPEC KONTROLLSTAMME (ATCC 43887) BRUKT FOR Å BEREKNE EFFEKTIVITET OG LINEARITET FOR LACY-GENET. CQ-VERDI ER PRESENTERT PÅ Y-AKSEN OG DEN NEGATIVE LOGARITMEN AV FORTYNNINGEN PÅ X-AKSEN.

Standardkurven er laget ut fra resultatene i amplifikasjonsplottet i figur 13. Likningen for kurven blir videre brukt for å beregne effektivitet til metoden, mens R^2 -verdien brukes for å bestemme metodens linearitet (tabell 14).

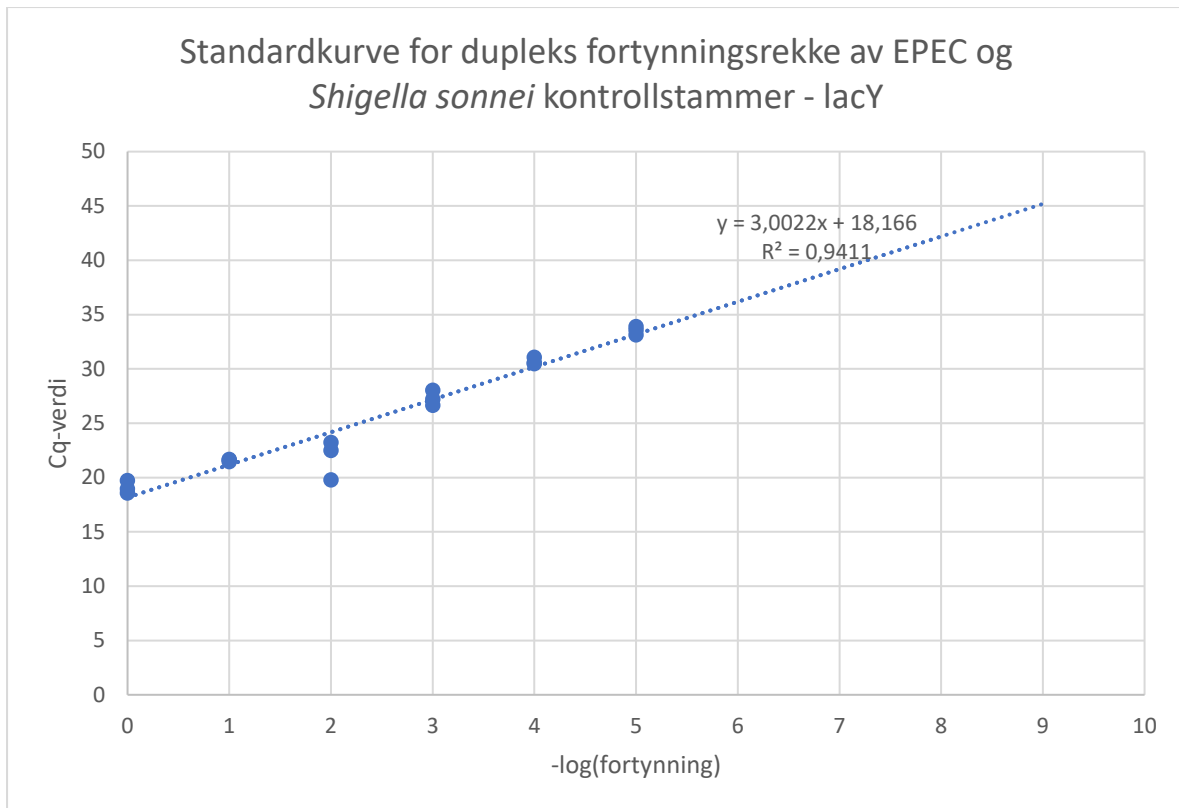
$$\text{Effektivitet} = (10^{\frac{1}{3,1612}} - 1) * 100 \% = 107,2 \%$$

Den beregnede effektiviteten for singelpleks PCR-reaksjonen for lacY-genet er 107,2 %.



FIGUR 18: STANDARDKURVE AV DUPEKS FORTYNNINGSREKKE AV EPEC OG *SHIGELLA* SPP. KONTROLLSTAMME BRUKT FOR Å BEREGNE EFFEKTIVITET OG LINEARITET FOR IPA_H-GENET. CQ-VERDI ER PRESENTERT PÅ Y-AKSEN OG DEN NEGATIVE LOGARITMEN AV FORTYNNINGEN PÅ X-AKSEN.

Standardkurven er laget ut fra resultatene i amplifikasjonsplottet i figur 14. Likningen for kurven blir videre brukt for å beregne effektivitet til metoden, mens R^2 -verdien brukes for å bestemme metodens linearitet (tabell 14).



FIGUR 19: STANDARDKURVE AV DUPEKS FORTYNNINGSREKKE AV EPEC OG *SHIGELLA* SPP. KONTROLLSTAMMER BRUKT FOR Å BEREGNE EFFEKTIVITET OG LINEARITET FOR LAC \bar{Y} -GENET. CQ-VERDI ER PRESENTERT PÅ Y-AKSEN OG DEN NEGATIVE LOGARITMEN AV FORTYNNINGEN PÅ X-AKSEN.

Standardkurven er laget ut fra resultatene i amplifikasjonsplottet i figur 15. Også her ble likningen for kurven og R^2 -verdien benyttet for å beregne effektivitet og linearitet til metoden, gitt i tabell 14.

Effektiviteten til dupleks PCR ble beregnet på samme måte som vist for singelpleks PCR.

TABELL 14: BEREGNET EFFEKTIVITET (%) OG LINEARITET FOR SINGELPLEKS OG DUPEKS PCR FOR DE TO KONTROLLSTAMMENE; *SHIGELLA SONNEI* (ATCC 25931) OG EPEC (ATCC 43887).

Kontrollstamme	Linearitet	Effektivitet (%)
Singelpleks		
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	0,9989	96,3
EPEC ATCC 43887	0,9962	107,2
Dupleks		
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	0,9989	97,1
EPEC ATCC 43887	0,9411	115,3

Spesifisitet

Spesifisiteten til metoden, som ble testet med ipaH-negative sop gav samsvarende resultat med dagens metode. Alle prøver som var forventet negative, kom ut som negative og metodens spesifisitet er dermed 100 %. Resultatene kan sees i vedlegg 1 under «Robusthet og spesifisitet».

Sensitivitet

Sensitiviteten til metoden ble sjekket i forkant av prosjektet og ble vurdert som god nok.

Presisjon

I prosjektet er presisjonen undersøkt ved hjelp av repeterbarhet og reproduserbarhet. Resultatene er presentert i tabeller og figurer.

Repeterbarhet

Metodens repeterbarhet er beregnet fra 29 paralleller av kontrollen med begge genene kjørt på PCR-instrumentet med en singelpleks PCR for hver av genene. Standardavvik er beregnet etter formel 6, og variasjonskoeffisienten etter formel 5. Resultatene kan sees i vedlegg 1 under «Repeterbarhet».

TABELL 15: RESULTATER FOR REPETERBARHET FOR METODEN BEREGNET I VARIASJONSKOEFFISIENTEN (CV%) FRA 29 PARALLELLER AV KONTROLLEN KJØRT PÅ PCR-INSTRUMENTET.

Bakteriestamme	Gen/fluorofor	Gjennomsnittlig Cq-verdi	Standardavvik	Variasjonskoeffisient (CV %)
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	ipaH/FAM	32,91	0,164	0,499
EPEC ATCC 43887	lacY/texas-red	31,54	0,160	0,507

Reproduserbarhet

Reproduserbarheten til metoden er beregnet fra 11 paralleller av kontrollen med begge genene kjørt på PCR-instrumentet med en singelpleks PCR for hver av genene.

Standardavviket og variasjonskoeffisienten er også her beregnet ved hjelp av formel 5 og 6.

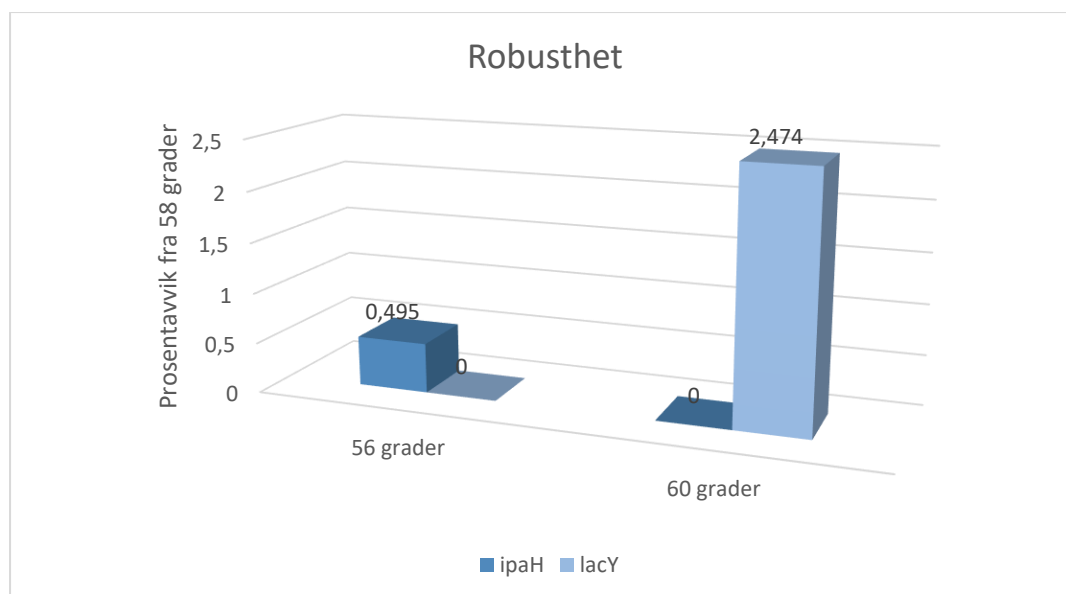
Resultatene kan sees i vedlegg 1 under «Reproduserbarhet».

TABELL 16: RESULTATER FOR REPRODUSERBARHET FOR METODEN BEREGNET MED VARIASJONSKOEFFISIENTEN (CV%) FRA 11 PARALLELLER AV KONTROLLEN KJØRT PÅ PCR-INSTRUMENTET.

Bakteriestamme	Gen/fluorofor	Gjennomsnittlig Cq-verdi	Standardavvik	Variasjonskoeffisient (CV%)
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	ipaH/FAM	32,94	0,159	0,480
EPEC ATCC 43887	lacY/texas-red	31,42	0,139	0,440

Robusthet

Metodens robusthet testet ved analysering av prøvene ved temperaturer på 56, 58 og 60 °C er presentert i følgende figur:



FIGUR 20: ROBUSTHET PRESENTERT I SØYLER MED PROSENTAVVIK FRA 58 GRADER PÅ Y-AKSEN, OG 56 OG 60 GRADER PÅ X-AKSEN. FIGUREN VISER AT DESS HØYERE SØYLEN ER, DESS STØRRE ER PROSENTAVVIKET, OG DESS MINDRE ROBUSTHET ER DET.

Resultatene kan sees i vedlegg 1 under «Robusthet og spesifisitet».

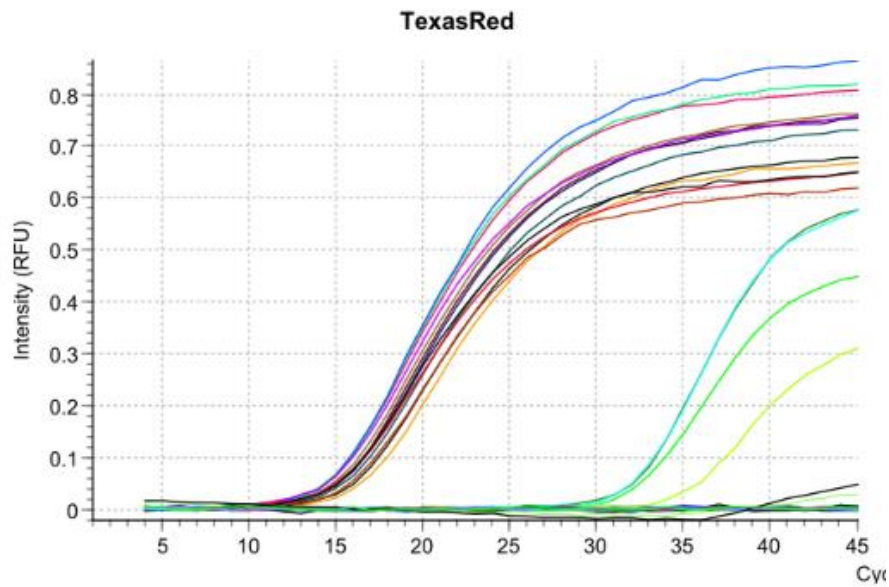
Kontaminasjon

Kontaminasjon ble testet ved å kjøre 3 negative kontroller med hvert oppsett. Det ble til sammen kjørt 26 negative kontroller. I det ene oppsettet ble den ene negative kontrollen svakt positiv med en Cq-verdi på nærmere 40. Alle de andre negative kontrollene var negative.

Resultatene kan sees i vedlegg 1 under «Kontaminering».

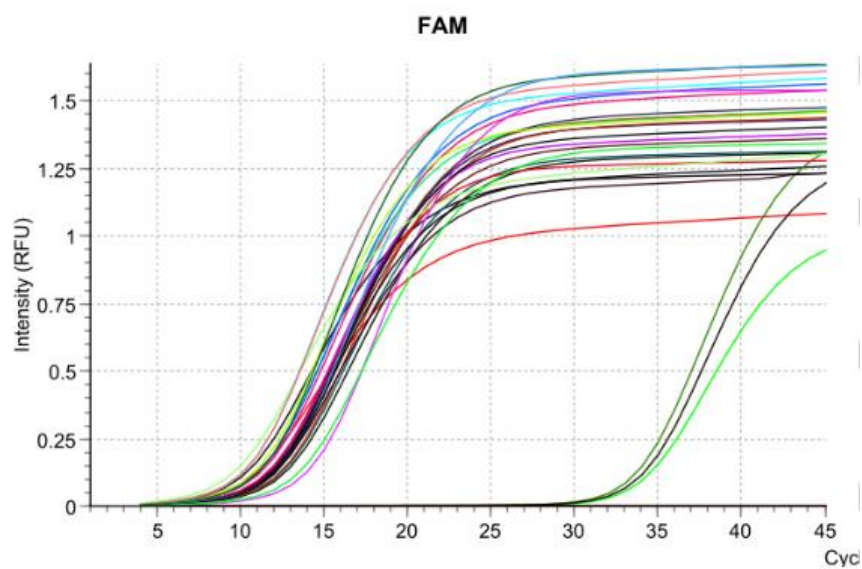
Resultat ved kjøring av pasientprøver

Alle pasientprøver ble kjørt med singelpleks PCR for hvert av de to genene. Resultatene er presentert i amplifikasjonskurver (figur 21 og 22) og oppsummert i kakediagrammer (figur 23 og 24), og kan sees i vedlegg 1 under «Resultat pasientprøver».



FIGUR 21: RESULTAT AV LAC Y-GENET TESTET MED TEXAS-RED SOM FLUOROFOR VED SINGELPLEKS PCR FOR PASIENTPRØVER OG KONTROLLER. I OPPSETTET ER DET KJØRT 26 PASIENTPRØVER, 3 POSITIVE KONTROLLER OG 3 NEGATIVE KONTROLLER.

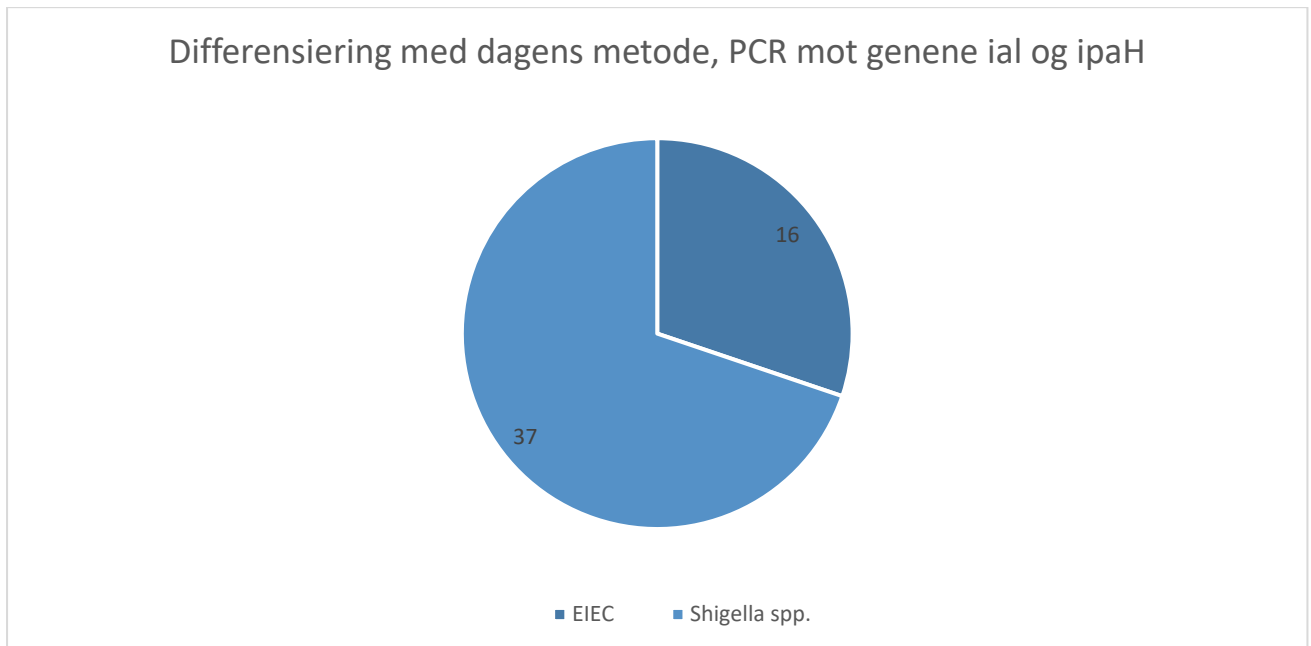
Amplifikasjonsplottet i figur 21 viser at det både er positive og negative resultater.



FIGUR 22: RESULTAT AV IPAH-GENET TESTET MED FAM SOM FLUOROFOR VED SINGELPLEKS PCR FOR PASIENTPRØVER OG KONTROLLER. I OPPSETTET ER DET KJØRT 26 PASIENTPRØVER, 3 POSITIVE KONTROLLER OG TRE NEGATIVE KONTROLLER.

Figur 22 viser kun positive reaksjoner. Resultatene av de negative kontrollene er negativt, og ligger så tett langs x-aksen at de ikke er synlige.

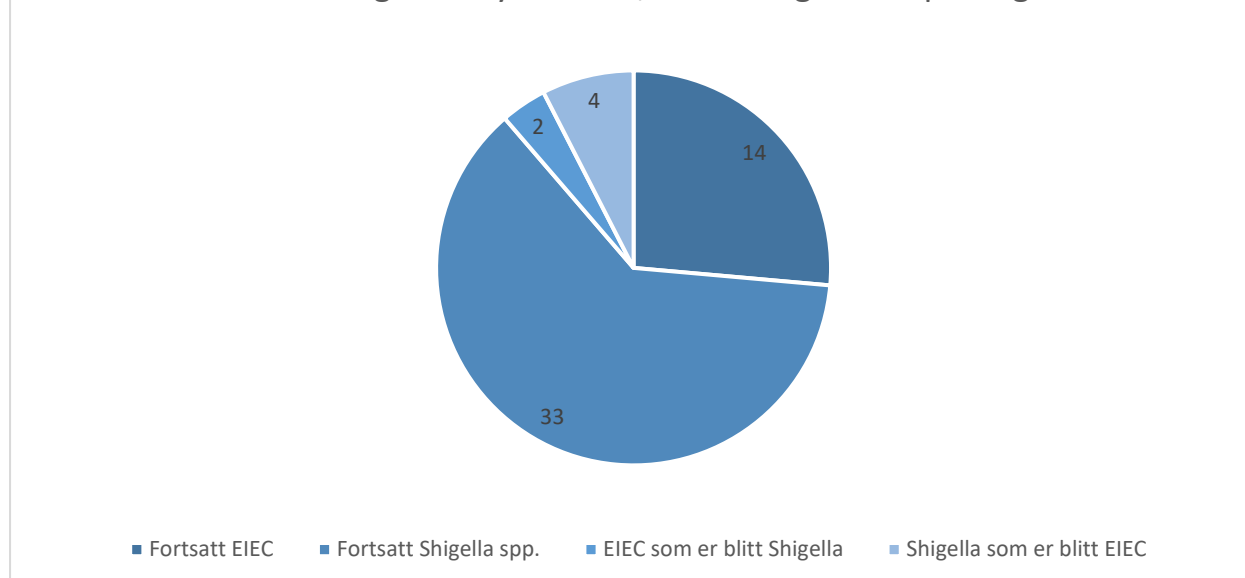
Pasientprøvene differensiert med dagens og ny metode er fremstilt i hvert sitt kakediagram (figur 23 og 24).



FIGUR 23: FREMSTILLING AV PASIENTPRØVER DIFFERENSIERT MED DAGENS METODE MED PCR RETTET MOT GENENE IAL OG IPA H.

Av utdelte prøver analysert med PCR rettet mot genene ial og ipaH, ble 16 prøver identifisert som EIEC og 37 som *Shigella* spp.

Differensiering med ny metode, PCR mot genene ipaH og lacY



FIGUR 24: FREMSTILLING AV PASIENTPRØVER DIFFERENSIERT MED NY METODE MED PCR RETTET MOT GENENE IPA_H OG LAC_Y.

Figur 24 viser differensieringen ved bruk av ny metode. Figuren viser også hvor mange bakterier som ble differensiert ulikt med ny metode i forhold til dagens metode; 33 prøver er fortsatt *Shigella* spp., 14 prøver er fortsatt EIEC, to prøver som tidligere var EIEC er nå blitt *Shigella* spp., og fire prøver som tidligere var *Shigella* spp. er nå blitt EIEC.

TABELL 17: PASIENTPRØVER SOM GIR ULIKT RESULTAT VED BRUK AV DAGENS METODE MED GENENE IAL OG IPA_H, OG VED BRUK AV NY METODE MED GENENE IPA_H OG LAC_Y. RESULTAT VED BRUK AV DAGENS METODE STÅR OPPFØRT SOM TIDLIGERE RESULTAT.

Prøve nummer	Tidligere resultat	Resultat ipaH (Cq-verdi)	Resultat lacY (Cq-verdi)	Tolking av resultat
1	EIEC	9,74	Negativ	<i>Shigella</i> spp.
2	EIEC	9,44	Negativ	<i>Shigella</i> spp.
16	<i>Shigella</i> spp.	10,23	34,21	EIEC
27	<i>Shigella</i> spp.	11,85	35,51	EIEC
49	<i>Shigella</i> spp.	9,73	13,09	EIEC
52	<i>Shigella</i> spp.	15,54	17,58	EIEC

Tabell 17 viser en oversikt over pasientprøvene som har blitt identifisert annerledes ved bruk av de to metodene. Kolonnen med tidligere resultat viser hvordan dagens metode, ved PCR rettet mot genene ial og ipaH har identifisert bakteriene, mens kolonnen med tolkning av resultat viser hvordan identifiseringen ved bruk av ny metode med PCR rettet mot genene ipaH og lacY er. Tabellen viser også Cq-verdien for genene lacY og ipaH for de gitte prøvene. Resultatene er hentet i fra vedlegg 1.

TABELL 18: TIDLIGERE RESULTAT FRA *SHIGELLA*-AGGLUTINASJON OG *SHIGELLA*-FORGJÆRING AV PRØVENE SOM GIR ULIKT RESULTAT VED IDENTIFISERING MED DAGENS OG NY METODE. ANALYSESVAR PÅ PRØVENE SOM ER SENDT TIL FOLKEHELSEINSTITUTTET (FHI) VISES OGSÅ.

Prøve nummer	<i>Shigella</i> -agglutinasjon	<i>Shigella</i> -forgjæring	Svar fra FHI
1	Negativ	Negativ	<i>E. coli</i>
2	Negativ	+	<i>E. coli</i>
16	Positiv	+	IU
27	Positiv	+	IU
49 *	Negativ	Negativ	IU
52**	IU	IU	IU

*prøven er en sammenlignende laboratorieprøve (slp-prøve).

**prøven er tatt fra prøver av ipaH-negativt sop, og tester som *Shigella*-agglutinasjon og forgjæring er derfor ikke utført.

IU = ikke utført.

Tabell 18 viser tidligere resultat fra *Shigella*-agglutinasjons og -forgjæringstester for bakteriene som ble identifisert ulikt ved bruk av dagens og ny metode. Noen av prøvene er tidligere sendt inn til FHI for analysering. Analysesvaret derfra er også oppgitt i tabellen. For *Shigella*-forgjæring er resultatene oppført som negativ eller positiv (+). For prøvene som er oppført med +, har reaksjonene i forgjæringsrekken identifisert bakteriene som *Shigella* spp. Akkurat hvilken subgruppe bakteriene ble identifisert som, er ikke relevant for denne oppgaven, og er derfor ikke oppgitt i tabellen.

Diskusjon

Antall kopier av templatet i kontrollstammene

Resultatet for beregningene av antall kopier av templatet per μL i kontrollstammene viser at *Shigella sonnei* kontrollstammen (ATCC 25931) har 0,203 kopier av templatet per μL , og at EPEC kontrollstammen (43887) har 7,49 kopier av templatet per μL . Når dette omgjøres til antall kopier av templatet tilsvarer det 0,5 for *Shigella sonnei* kontrollstammen, og 18,7 for EPEC kontrollstammen. Dette betyr at metoden kan detektere ned mot 0,5 kopier per pcr for ipaH, og ned mot 18,7 kopier per PCR for lacY. Kravet til deteksjonsgrensen var at den skulle klare å detektere mindre enn 100 kopier per PCR. Resultatene viser at metoden klarer å detektere langt færre kopier enn dette, og kvalitetsmålet for deteksjonsgrensen er dermed oppnådd.

PCR-kjøring av fortynningsrekker

Etter å ha utført singelpleks- og dupleks PCR på fortynningsrekkene, kan det i resultatet ses at amplifikasjonskurvene for singelplekskjøringene er fine. Figur 12 og 13 viser at de pipetterte parallellene er bra, og at reaksjonen har hatt gode reaksjonsbetingelser. Amplifikasjonsplottet som singelpleks for lacY-genet er noe dårligere enn for ipaH-genet, men den er likevel god.

Amplifikasjonskurven for dupleks PCR med fluoroforen FAM er god (figur 14). De pipetterte parallellene ligger likt og reaksjonsbetingelsene har vært gode for ipaH-genet. Amplifikasjonskurven for lacY-genet hvor fluoroforen texas-red er benyttet, viser et dårligere resultat (figur 15). Den følger ikke et eksponentielt forløp slik positive resultater skal, og parallellene ligger ikke fint ved siden av hverandre. Dette skyldes trolig at reaksjonsbetingelsene i dupleks-reaksjonen ikke var gunstige for lacY-genet. For å prøve å forbedre resultatene ved dupleks PCR, ble det endret på reaksjonsbetingelsene. Det er mistanke om en slags "konkurrans" mellom primerne, og det ble derfor gjennomført en ny duplekskjøring hvor primer-probe miksen inneholdt lavere konsentrasjon av primerne for ipaH-genet. Denne amplifikasjonskurven ble heller ikke god nok, og det ble derfor besluttet at det jobbes videre med singelpleks PCR.

Bruk av multipleks PCR, som for eksempel dupleks PCR, kommer med en rekke utfordringer. Som tidligere nevnt kan en av disse utfordringene være konkurranse mellom primerne i reaksjonen. Etersom man i dupleks PCR har to mål-gen, trenger man derfor også minimum fire forskjellige primere (to forward og to reverse) for å detektere målgenet. I dette forsøket ble

det brukt fem forskjellige primere, noe som kan føre til enda større konkurranse. De forskjellige primerne må være designet slik at de kun kan binde seg til ett sted på målgenet. Dette kan være en utfordring da målgenet kan inneholde like basesekvenser på flere forskjellige steder. Det gjør at en primer lett kan binde seg til feil område på genet dersom dette har likt eller liknende basesekvens på flere steder. I tillegg kan primerne konkurrere om ressursene i amplifikasjonsmiksen. Primere som har en større effektivitet, vil jobbe raskere, og dermed også bruke opp mer av ressursene enn en primer som jobber mindre effektivt. I et slikt tilfelle vil noen målgener kopieres opp mer hyppig enn andre.

Temperatur i de forskjellige syklusene av PCR-reaksjonen kan også tenkes å ha ulik påvirkning på de ulike primerne i en amplifikasjonsmikse. Temperaturen i en PCR-reaksjon er primeravhengig, og varierer både med primerens basesammensetning og lengde. En primer med mange dobbeltbindinger vil kreve høyere temperatur enn en primer med kun enkeltbindinger for å kunne hybridiseres og denatureres. Det bør derfor velges primere som har omtrent likt smeltepunkt, slik at temperaturen i PCR-syklusene kan tilpasses de spesifikke reaksjonene best mulig.

En annen utfordring er primerkonsentrasjonen. Ikke bare kan konkurransen mellom primerne endres ved å endre på primerkonsentrasjonen til en av primerne, men også tilgangen på reagenser endres ved å endre primerkonsentrasjonene. Det kan tenkes at primerkonsentrasjonen for de forskjellige primerne bør være lavere ved bruk av dupleks PCR i forhold til singelpleks PCR ettersom den totale primerkonsentrasjonen i dupleks PCR'en vil være større enn den var i singelpleks-reaksjonen. Slik kan det videre tenkes at tilgangen på andre reaksjonskomponenter bli større.

Det ble prøvd å senke konsentrasjonen av primeren for ipaH-genet som virket å jobbe raskest i første forsøk med dupleks PCR. Dette gav derimot ikke et bedre resultat, som betyr at primerkonsentrasjonen enten ikke ble endret i stor nok grad, eller at dette ikke var en faktor som påvirket denne PCR-reaksjonen.

For å forsøke å få dupleks-reaksjonen til å virke ved en senere anledning kan det anbefales å gjøre endringer i en eller flere av faktorene som er nevnt over. Et dupleks PCR-oppsett sammenlignet med et singelpleks PCR-oppsett ville gjort identifiseringen av bakteriene mer effektiv, krevd mindre ressurser og slik også vært mindre kostbart. Det kan være gunstig for avdelingen å prøve å utarbeide dupleks-metoden videre ved en senere anledning.

Riktighet

I resultat ses beregninger for effektiviteten til PCR-kjøringene av fortynningsrekkene (figur 16-19 og tabell 14). Det er ønskelig at den ligger mellom 90-110 %, noe som er tilfelle på alle kjøringene unntatt dupleks PCR for lacY-genet, der den var litt for effektiv (115,3 %). Siden det ble besluttet å kjøre singelpleks PCR, vil ikke dette ha noe å si. Lineariteten (R^2) er også beregnet, og den er svært god for singelpleks PCR-kjøringene. Alle ligger med en korrelasjonskoeffisient i andre potens over 0,99. Dette tyder på at verdiene på de to aksene samsvarer lineært, og at kvaliteten på standardkurvene er god. For dupleks-kjøringen er ikke lineariteten like god. Lineariteten for dupleks for ipaH-genet er god (0,9989), mens lineariteten for lacY-genet ikke er god nok (0,9411). I figur 19 ses også en uteligger, hvor den negative logaritmen av fortynningen er 2. Denne uteliggeren kan være grunnen til at lineariteten for standardkurven ikke er god nok.

Kontrollstammene ble fortynnet til en teoretisk C_q-verdi som ville gitt negativt resultat ved PCR. Ved de siste og laveste fortynningene er noen av parallellene blitt svakt positive, mens noen er blitt negative. Parallellene som her ble positive, er ikke tatt med i standardkurvene.

Spesifisitet er også testet for å vurdere metodens riktighet. Ved testing av ipaH-negative sop ble alle resultatene samsvarende med den gamle metoden, og metodens spesifisitet er dermed på 100 %.

Presisjon

Repeterbarhet ble testet ved 29 kjøringene av den positive kontrollen. De ble utført som singelpleks PCR for hver av de to genene siden dupleks PCR med de to genene ikke fungerte bra.

Resultatene viser at repeterbarheten er svært god (tabell 15) siden variasjonskoeffisienten (CV%) er veldig lav for begge genene (0,499 % for ipaH-genet og 0,507 % for lacY-genet). Det tilsier at det er samsvar mellom de gjentatte målingene som er utført ved samme målebetingelser.

Variasjonskoeffisienten er dermed innenfor tillatt CV% for denne metoden som er på 2,5%.

Resultatene viser også at reproduserbarheten er svært god (tabell 16) siden variasjonskoeffisienten også her er lav for begge kontrollstammene (0,480 % for *Shigella sonnei* kontrollstammen, og 0,440 % for EPEC kontrollstammen).

Metodens robusthet mot temperaturendringer er testet ved 56 og 60 °C. Figur 20 i resultat viser at både ipaH- og lacY-genet tåler en senkning i temperatur på 2 °C rimelig godt. IpaH-genet har et prosentavvik fra 58 °C på 0,495 %, mens lacY-genet har et prosentavvik på 0,00 %. LacY-genet tåler derimot ikke en økning på 2 °C like godt. Her er prosentavviket 2,474 % fra 58 °C. IpaH-genet tåler økningen godt og har et prosentavvik på 0,00 %.

Kontaminasjon

Kontaminasjonen ble testet ved å kjøre tre negative kontroller spredt i hvert oppsett. Den ene negative kontrollen ble svakt positiv med en Cq-verdi på nærmere 40. Det tyder på at det på det ene oppsettet har skjedd en kontaminasjon. Siden de andre negative kontrollene på oppsettet var negative, og Cq-verdien var svært svak, ble det besluttet å ikke kjøre hele oppsettet på nytt. De 25 andre negative kontrollene var negative.

Kjøring av pasientprøver

I resultat kan det ses to kakediagrammer (figur 23 og 24) hvor differensiering med ny metode og dagens metode er presentert. Diagrammet viser at resultatene har endret seg. Ved dagens metode er det påvist *Shigella* spp. i 37 av prøvene, mens det i 16 av prøvene er påvist EIEC. Denne metoden har basert seg på genene ial og ipaH. I figur 24 ses det at det i 33 av prøvene er påvist *Shigella* spp., mens det i 14 av prøvene er påvist EIEC. To av prøvene har endret resultat fra EIEC til *Shigella* spp., mens fire av prøvene har endret resultat fra *Shigella* spp. til EIEC.

Prøvene som har gitt ulikt resultat ved bruk av dagens metode, i forhold til den nye metoden, er undersøkt videre ved å se på prøvens tidligere resultat ved agglutinasjons-test og forgjærings-test. I tillegg er noen av prøvene også analysert av Folkehelseinstituttet (FHI). Prøvene som har endret resultat er prøve 1, 2, 16, 27, 49 og 52. Disse vil bli diskutert videre. For oversikt over resultatet for alle pasientprøver med tidligere resultat av agglutinasjons- og forgjærings-tester og analysesvar fra FHI, henvises det til vedlegg 1 under «Forgjæring pasientprøver».

Prøve 1 er identifisert som *Shigella* spp. ved bruk av ny metode, og som EIEC ved bruk av dagens metode. For denne bakterien foreligger det også et resultat fra FHI som sier at bakterien er en av *E. coli*-artene, oppført i tabell 17. Hvis man ser på resultatene av forgjærings- og agglutinasjonstestene i tabell 18, er prøven negativ. Det betyr at det ikke finnes noen tidligere svar som tilsier at denne prøven inneholder *Shigella* spp. Dersom man skulle stole på de tidligere analyseresultatene, burde PCR-reaksjonen mot lacY gitt en positiv reaksjon. Det er ikke tilfelle, og på bakgrunn av de motstridende resultatene kan bakteriene i prøven ikke sikkert identifiseres.

Tilsvarende gjelder også prøve nummer 2, men her viser forgjæringsreaksjonen at prøven kan inneholde *Shigella* spp. Analysesvaret fra FHI og analysesvaret ved bruk av dagens metode er motstridende i forhold til resultatet fra forgjæringstesten og resultatet fra ny metode. Derfor kan man heller ikke her sikkert identifisere bakterien. En mulig feilkilde som kan ha forårsaket dette problemet er feilpipettering og forveksling av prøvemateriale. For å bekrefte eller utelukke dette som en feilkilde, burde prøve 1 og 2 analyseres på nytt.

For prøve 16 og 27 sier resultatet i tabell 17 at prøvene tidligere var identifisert som *Shigella* spp., mens de med ny metode ble identifisert som EIEC. Prøvene som er analysert i prosjektet skal være renkultur, og kun inneholde en bakterietype. Dersom det er tilfellet, skal Cq-verdien for lacY og ipaH være tilnærmet lik, dersom PCR-reaksjonen gir positivt resultat for begge genene. Her er Cq-verdien for lacY mye høyere enn den er for ipaH. Det tilsvarer at prøven er sterkt positiv for ipaH, og svak positiv for lacY. Det kan tyde på at prøven ikke er av renkultur, som følge av kontaminering. Resultatet av agglutinasjonstesten i tabell 18 sier også at prøvene inneholder *Shigella* spp. som understreker teorien om at det er kontaminering tilstede. Det kan være i form av at det er små mengder *E. coli* i prøvematerialet som er overført til primærrøret ved en feil. For å kunne identifisere bakteriene som *Shigella* spp. må prøvene sås ut igjen fra sitt primærrør, og deretter bli analysert på nytt.

Prøve 49 er en slp-prøve med en fasitverdi som sier at den er en EIEC. Ettersom dette er en prøve som er brukt i et eksternt kvalitetskontrollprogram kan man stole på at identifiseringen som EIEC oppgitt fra leverandøren av prøven stemmer. Tabell 17 viser at prøven er identifisert som *Shigella* med dagens metode og som EIEC med ny metode. Det vil si at dagens metode ikke klarer å identifisere bakterien riktig.

Prøve 52 ble plukket ut av prøvene som ble preparert som ipaH-negative sop, da den gav positivt resultat for ipaH-genet ved analysering. Prøvens historikk er undersøkt, og viser at

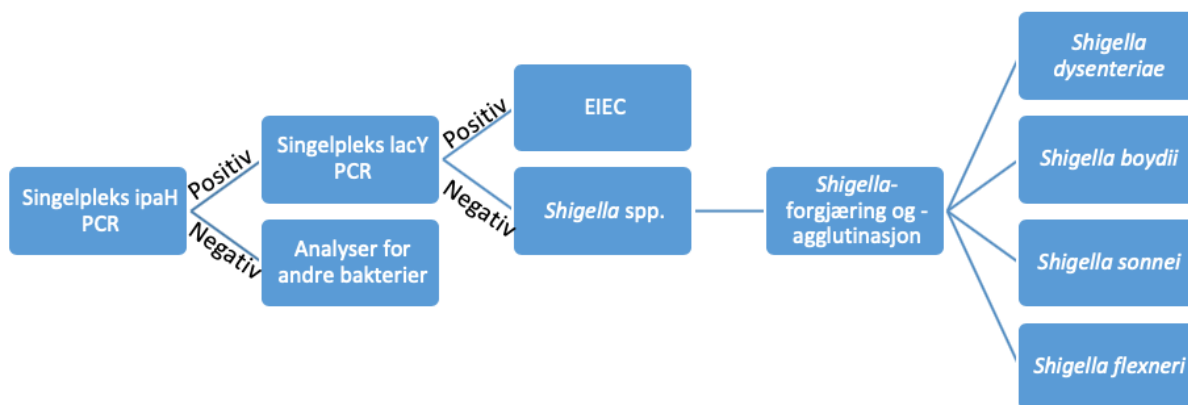
prøven inneholder flere mikrober, deriblant *Shigella* og EHEC. Dette er grunnen til at prøven gav positivt resultat for lacY ved analysering med ny metode. En liknende situasjon kan tenkes å være tilfelle med flere av prøvene. Ettersom analysehistorikken til alle prøvene ikke er undersøkt, er det usikkert å si om analysesvaret med ny metode stemmer eller ikke.

Videre arbeid med prøvene

Metoden som er testet i prosjektet klarer ikke skille mellom de ulike artene av *Shigella*. Prøvene som blir positive på ipaH, men negative på LacY undersøkes dermed videre ved *Shigella*-forgjæring og *Shigella*-agglutinasjon som er beskrevet i teoridelen. *Shigella*-forgjæring og *Shigella*-agglutinasjon blir også brukt i dagens metode.

Det ble i forkant av prosjektet diskutert om det var mulig å helgenomsekvensere noen av bakteriene. En helgenomsekvensering ville gitt en sikker identifikasjon av bakteriene og dermed en «fasit» på hvilke bakterier prøvene inneholder. Dette kunne vært aktuelt å gjennomføre på prøve 1 og 2 der resultatet er usikkert. For å videre utarbeide denne metoden, kan det være aktuelt å helgenomsekvensere ved en senere anledning.

Den nye fremgangsmåten for å differensiere EIEC og *Shigella* spp. er presentert i figur 25. Prøven kjøres først som singelpleks PCR for ipaH-genet. Dersom den er negativ, vil det utføres analyser for andre bakterier. Dersom prøven er positiv, blir det arbeidet videre med singelpleks-PCR for lacY-genet. Dersom denne PCR-kjøringen er positiv vet man at det er EIEC i prøven. Er PCR-kjøringen negativ vet man at det er en av *Shigella*-artene i prøven, og det utføres *Shigella*-forgjæring og *Shigella*-agglutinasjon som skiller mellom de ulike *Shigella*-artene basert på bestemte reaksjonsmønstre.



FIGUR 25: FLYTSKJEMA FOR DIFFERENSIERING AV EIEC OG *SHIGELLA* SPP. VED HJELP AV SINGELPLEKS IPAH PCR OG SINGELPLEKS LAC Y PCR, SAMT DIFFERENSIERING AV DE ULIKE *SHIGELLA*-ARTENE VED HJELP AV *SHIGELLA*-FORGJÆRING OG -AGGLUTINASJON.

Problemer som følge av Covid-19

I perioden da denne bacheloroppgaven ble gjennomført rammet koronapandemien Norge og resten av verden. Dette hadde påvirkninger for laboratoriearbeidet som la grunnlag for oppgaven. Tidsrammen med arbeid på laboratoriet ble sterkt begrenset, som har ført til at det videre arbeidet med prøvematerialet ikke har blitt så omfattende som det først var tiltenkt.

På grunn av koronapandemien ble det ikke mulig å utarbeide dupleks PCR-oppsettet videre for å få den til å fungere for lacY- og ipaH-genene. Det ble heller ikke anledning til helgenomsekvensering av prøvematerialene for å få en sikker identifikasjon på hvilken bakterie de inneholdt. For noen av pasientprøvene hadde det og vært aktuelt med en reanalysering for å utelukke tilfeldige feil.

Dagens metode vs. ny metode

Selv om resultatene av pasientprøvene ikke ble helt ferdigstilt, og det gjerne skulle vært bedre tid til å utarbeide metoden ytterligere, tyder tidligere forskning på at denne metoden er mer gunstig enn dagens metode til å skille *Shigella* spp. fra EIEC. Dette stemmer overens med resultatene fra artikkelen til Løbersli, Wester, Kristiansen og Brandal, der de konkluderer med at sanntids-PCR rettet mot genene ipaH og lacY er en god metode for å skille EIEC fra *Shigella* spp. (Løbersli et al., 2016).

Til tross for dette bør MIA ferdigstille arbeidet ved å reanalysere noen av prøvene, utarbeide en dupleks PCR dersom det er mulig, og helgenomsekvensere bakteriene med usikkert analyseresultat før metoden tas i bruk.

Konklusjon

Deteksjonsgrensen for singelpleks PCR for både ipaH- og lacY-genet er bedre enn 100 kopier per PCR-kjøring. Alle isolater som har vært positive for ipaH og/eller ial er nå testet positiv på ipaH. Dette er godkjenningskriterier for metoden. Siden disse kriteriene er oppfylt kan metoden tas i bruk.

Etter singelpleks- og dupleks PCR kjøring av fortynningsrekkene for ipaH- og lacY-genet, ble det besluttet å benytte singelpleks PCR'en for hvert av de to genene. Dersom det hadde vært anledning kunne det blitt forsøkt å få til dupleks PCR ved å endre reaksjonsbetingelsene, og primerene som ble brukt i metoden.

En rekke parametere er undersøkt for vurdering av metodens riktighet og presisjon. Etter vurdering av metodens effektivitet, linearitet og spesifisitet, er riktigheten til metoden god. Dette gjelder ikke for dupleks PCR for lacY-genet, som var en av grunnene til at det ble besluttet å ikke benytte dupleks PCR. Ved vurdering av metodens repeterbarhet, reproduserbarhet og robusthet, er metodens presisjon vurdert som god. Minuset er at lacY-genet ikke tåler en temperaturøkning på to grader fra hybridiseringstemperaturen benyttet ved PCR.

Det ble undersøkt om det var kontaminasjon i PCR-oppsettet. En prøve ble svakt positiv som betyr at det ved den prøven er skjedd en kontaminasjon. Det kan være mange grunner til dette. Noe kan ha kommet opp i røret fra luften, eller det kan ha skjedd kontaminasjon ved pipettering. Det er derfor viktig å være litt ekstra oppmerksom på pipetteringen, slik at man unngår falske positive resultater.

For pasientprøvene som har endret resultat, er det vanskelig å si om det er dagens metode med PCR rettet mot genene ial og ipaH, eller den nye metoden med PCR rettet mot ipaH og lacY som gir riktig resultat. For å konkludere burde noen av prøvene analyseres på nytt slik at eventuelle tilfeldige feil ved den nye metoden kan utelukkes.

Ved den nye metoden er det viktig å ta stilling til styrken på de målte genene i en prøve, når en prøve skal identifiseres som EIEC. Dersom ipaH-genet er målt til en mye sterkere Cq-verdi enn lacY-genet, bør kontaminasjon mistenkes og prøven analyseres på nytt.

I dette prosjektet er det undersøkt om det nye sanntids-PCR oppsettet mot genene ipaH og lacY kan brukes for å differensiere mellom *Shigella* og EIEC. Metoden som singelpleks PCR tilfredsstillter kravene til kvalitet og det tilsier at metoden kan tas i bruk. Det er derimot ikke

mulig å si om den nye metoden gir en sikrere identifisering av bakteriene enn dagens metode, basert på resultatene i denne oppgaven. Ved å se på tidligere forskning kan mye tyde på at den nye metoden er mer gunstig, men det bør uansett arbeides videre med metoden for å avklare om den kan gi en sikker identifisering av bakteriene eller ikke.

Litteraturliste

- Aven, T. (2016). Robusthet. Retrieved from <https://snl.no/robusthet>
- Bio-Rad. (2020a). Amplification plot. In. bio-rad.com: Bio-Rad.
- Bio-Rad. (2020b). What is Real-Time PCR (qPCR)? Retrieved from <https://www.bio-rad.com/en-no/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU#3>
- Bolann, B. J. (2009). *Riktig svar på biokjemiske analyser : en innføring i analytisk kvalitetsovervåking*. Bergen: Fagbokforl.
- Cheasty, T., & Rowe, B. (1983). Antigenic relationships between the enteroinvasive *Escherichia coli* O antigens O28ac, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, and O164 and *Shigella* O antigens. *J Clin Microbiol*, 17(4), 681-684.
- Christensen, A., Kommedal, Ø., Tylden, G., & Rykkvin, R. (2018). Kvalitetskontroll av genteknologiske metoder. Retrieved from <https://www.fhi.no/publ/2018/kvalitetskontroll-av-genteknologiske-metoder/>
- Folkehelseinstituttet. (2019). Shigellose - veileder for helsepersonell. Retrieved from <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/shigellose---veileder-for-helsepers/>
- Fossum, S., & Dissen, E. (2020). Polymerasekjedereaksjon. Retrieved from <https://sml.snl.no/polymerasekjedereaksjon>
- Hale, T. L. (1991). Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiol Rev*, 55(2), 206-224.
- Henriksen, S. D., Bøvre, K., & Høiland, K. (2020). Skisse over strukturene i en bakterie under deling. In *S. o. s. i. e. b. u. deling*. (Ed.): snl.no.
- Jenum, P. A., Dorengerg, D. H., Hvidsten, D., & Kommedal, Ø. (2017). Kvalitetskontroll av infeksjonsserologiske metoder. Retrieved from https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/strategirapporter/virologi-serologi_strategirapport_kvalitetskontroll-av-infeksjonsserologiske-metoder_2017.pdf
- Lan, R., Alles, M. C., Donohoe, K., Martinez, M. B., & Reeves, P. R. (2004). Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect Immun*, 72(9), 5080-5088. doi:10.1128/iai.72.9.5080-5088.2004
- Lydersen, S. (2017). Hva er sannsynligheten for riktig resultat av en diagnostisk test? Retrieved from <https://tidsskriftet.no/2017/10/medisin-og-tall/hva-er-sannsynligheten-riktig-resultat-av-en-diagnostisk-test>
- Løbersli, I., Wester, A. L., Kristiansen, Å., & Brandal, L. T. (2016). Molecular differentiation of *Shigella* Spp. from enteroinvasive *E.coli*.

Microbiology : a clinical approach. (2016). (2nd ed. ed.). New York: Garland Science.

MygoPCR. Mygopro user manual. In: Mygopcr.com.

nanolifequest. (2020). MyGo Pro® RealTime PCR System. In.

<https://www.nanolifequest.com/mygo-pro--realtime-pcr-system.html>:

<https://www.nanolifequest.com/mygo-pro--realtime-pcr-system.html>.

Pripp, A. H. (2018). Pearsons eller Spearmans korrelasjonskoeffisienter.

Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lövenklev, M., & Löfström, C. (2004). Pre-PCR Processing.

Roche. (2016). LightCycler 480 Probes Master. In (10 ed.).

https://lifescience.roche.com/en_no.html: Roche.

Schøyen, R. (2011). *Mikroorganismer og sykdom: lærebok i mikrobiologi og infeksjonssykdommer for helsepersonell* (9 ed.). Oslo: Gyldendal akademisk.

Sjøberg, N. O. (2013). *Molekylær genetikk : genteknologi, humant DNA* (5. utg. ed.). Høvik: Vett & viten.

Staroscik, A. (2004). Calculator for determining the number of copies of a template.

Retrieved from <https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>

technologies, I. D. 5' 6-FAM (fluorescein). Retrieved from

<https://eu.idtdna.com/site/Catalog/Modifications/Product/1108>

ThermoFisher. Texas Red (and Texas Red-X) Dye. Retrieved from

<https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/texas-red.html>

ThermoFisher. (2015). Qubit ® dsDNA HS Assay Kits. Retrieved from

https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FQubit_dsDNA_HS_Assay_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUXViaXQgZHNETkEgSFMgQXNzYXkgS2l0cw==

ThermoFisher. (2016). Real-Time PCR: Understanding Ct. Retrieved from

<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PJ1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>

Thong, K. L., Hoe, S. L., Puthuchery, S. D., & Yasin, R. (2005). Detection of virulence genes in Malaysian Shigella species by multiplex PCR assay. *BMC Infect Dis*, 5, 8. doi:10.1186/1471-2334-5-8

Tjade, T. (2008). *Medisinsk mikrobiologi og infeksjonssykdommer* (3. utg. ed.). Bergen: Fagbokforl.

Ud-Din, A., & Wahid, S. (2015). Relationship among Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and their differentiation. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4323284/>

unknown. Shigella and salmonella lecture. Retrieved from <https://www.slideshare.net/ClemenciaTjazuko/shigella-and-salmonella-lecture>

Wester, A. L., Tjade, T., & Villmones, H. C. (2018). Bakteriologisk fecesdiagnostikk. Retrieved from https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/strategirapporter/strategirapport-nr-29--bakteriologisk-fecesdiagnostikk_publicert.pdf

Vedlegg

Vedlegg 1: Resultat og beregninger. (s. 68-90)

Vedlegg 2: Molecular differentiation of *Shigella* spp. from enteroinvasive *E.coli* (s.91-99)

Vedlegg 3: LightCycler 480 Probes Master versjon 10 (s. 100-118)

Vedlegg 4: Brukerveiledning for MyGo pro (s. 119-124)

Vedlegg 1: Resultat og beregninger

Stammer benyttet

Prøve navn	Mikrobe påvist tidligere
1	EIEC
2	EIEC
3	EIEC
4	EIEC
5	EIEC
6	EIEC
7	EIEC
8	EIEC
9	EIEC
10	EIEC
11	EIEC
12	EIEC
13	EIEC
14	EIEC
15	SHFLEX
16	SHFLEX
17	SHFLEX
18	SHFLEX
19	SHFLEX
20	SHFLEX
21	SHFLEX
22	SHSONN
23	SHSONN
24	SHSONN
25	SHSONN
26	SHSONN
27	SHSONN
28	SHSONN
29	SHSONN
30	SHSONN
31	SHSONN
32	SHSONN
33	SHSONN
34	SHSONN
35	SHSONN
36	SHSONN
37	SHSONN
38	SHSONN
39	SHSONN
40	SHSONN
41	SHSONN
42	SHBOYD
43	SHBOYD
44	SHBOYD
45	SHBOYD
46	SHBOYD
47	SHBOYD
48	SHBOYD
49	SHIGEL
50	SHDYSE
51	EIEC
52	SHSONN
53	EIEC

Mikrobe	Antall
EIEC	16
SHFLEX	7
SHSONN	21
SHBOYD	7
SHIGEL	1
SHDYSE	1

Primer-probe-miks

Primer/probe	Basesekvens
lacY1-F	GGAACGGTAYTTCAAACA
lacY2-F	GCATCACCCCTTCAAACATA
lacY-R	CTGGCTGGCACYATTATG
lacY-Pb	TEX -CTCATCGTTTCGYACCTCAGC

Primer/probe	Basesekvens
ipaH-F	CTTCGACAGCAGTCTTTC
ipaH-R	GGAGATTGTTCCATGTGAG
ipaH-Pb	FAM -CTYTCAGTGGCATCAGCAGCA

Primer og probedesign er utarbeidet av seksjonsoverlege Øyvind Kommedal. Mengdene av de ulike primerene/probene er bestemt ut i fra den ønskelige sluttkonsentrasjonen av

Singleplex ipaH primer/probemiks

Primer/probe	Konsentrasjon	volum (µl)	i miks (µM)	i PCR-reaksjon (µM)	per prøve (µl)
ipaH-F	10 µM	80	4	0,4	0,8
ipaH-R	10 µM	80	4	0,4	0,8
ipaH-Pb	10 µM	40	2	0,2	0,4
		200			2

Singleplex lacY primer/probemiks

Primer/probe	Konsentrasjon	volum (µl)	i miks (µM)	i PCR-reaksjon (µM)	per prøve (µl)
lacY1-F	10 µM	80	2,86	0,4	0,8
lacY2-F	10 µM	80	2,86	0,4	0,8
lacY-R	10 µM	80	2,86	0,4	0,8
lacY-Pb	10 µM	40	1,42	0,2	0,4
		280			2,8

Duplex ipaH/lacY primer/probemiks

Primer/probe	Konsentrasjon	volum (µl)	i miks (µM)	i PCR-reaksjon (µM)	per prøve (µl)
ipaH-F	10 µM	80	1,67	0,4	0,8
ipaH-R	10 µM	80	1,67	0,4	0,8
ipaH-Pb	10 µM	40	0,83	0,2	0,4
lacY1-F	10 µM	80	1,67	0,4	0,8
lacY2-F	10 µM	80	1,67	0,4	0,8
lacY-R	10 µM	80	1,67	0,4	0,8
lacY-Pb	10 µM	40	0,83	0,2	0,4
		480			4,8

Amplifikasjonsmikser

Singleplex ipaH amplifikasjonsmiks

Probes Master	10 µl
H2O	3 µl
Primer/probe	2 µl
Eluat	5 µl
Totalvolum	20 µl

Singleplex lacY amplifikasjonsmiks

Probes Master	10 µl
H2O	2,2 µl
Primer/probe	2,8 µl
Eluat	5 µl
Totalvolum	20 µl

Duplex ipaH/lacY amplifikasjonsmiks

Probes Master	10 µl
H2O	1,0 µl
Primer/probe	4,0 µl
Eluat	5 µl
Totalvolum	20 µl

Fortynningsrekker

Oppsett på fortynningsrekke for singelplex ipaH amplifikasjonsmik

glass nr	antall μ L probes master	antall μ L H2O	antall μ L Primer/probe	antall μ L Eluat	Total volum	teoretisk Cq-verdi eluat
1 neg ktr	10	3	2	5 (dH2O)	20	0
2,3,4	10	3	2	5 (0.1)	20	15,19
5,6,7	10	3	2	5 (0.01)	20	18,19
8,9,10	10	3	2	5 (0.001)	20	21,19
11 neg ktr	10	3	2	5 (dH2O)	20	0
12,13,14	10	3	2	5 (0.0001)	20	24,19
15,16,17	10	3	2	5 (0.00001)	20	27,19
18,19,20	10	3	2	5 (0.000001)	20	30,19
21 neg ktr	10	3	2	5 (dH2O)	20	0
28,29,30	10	3	2	5 (0.0000001)	20	33,19
31,32,33	10	3	2	5 (0.00000001)	20	36,19
34,35,36	10	3	2	5 (0.000000001)	20	39,19

Oppsett på fortynningsrekke for singelplex lacY amplifikasjonsmik

glass nr	antall μ L probes master	antall μ L H2O	antall μ L Primer/probe	antall μ L Eluat	Total volum	teoretisk Cq-verdi Eluat
1 neg ktr	10	2,2	2,8	5 (dH2O)	20	0
2,3,4,	10	2,2	2,8	5 (0.1)	20	20,96
5,6,7	10	2,2	2,8	5 (0.01)	20	23,96
8,9,10	10	2,2	2,8	5 (0.001)	20	26,96
11 neg ktr	10	2,2	2,8	5 (dH2O)	20	0
12,13,14	10	2,2	2,8	5 (0.0001)	20	29,96
15,16,17	10	2,2	2,8	5 (0.00001)	20	32,96
18,19,20	10	2,2	2,8	5 (0.000001)	20	35,96
21 neg ktr	10	2,2	2,8	5 (dH2O)	20	0
22,23,24	10	2,2	2,8	5 (0.0000001)	20	38,96

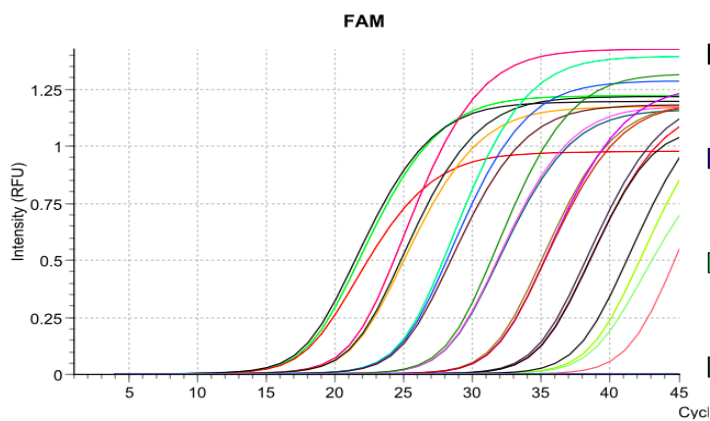
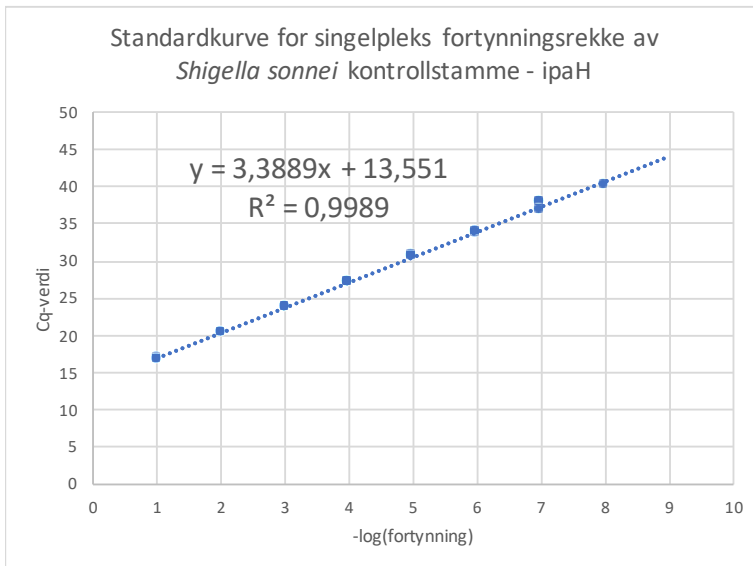
Oppsett på fortynningsrekke for dupleks amplifikasjonsmik

glass nr	antall μ L probes master	antall μ L H2O	antall μ L Primer/probe	antall μ L Eluat	Total volum
1 neg ktr	10	0	5	5 (dH2O)	20
2,3,4,	10	0	5	5 (0.1)	20
5,6,7	10	0	5	5 (0.01)	20
8,9,10	10	0	5	5 (0.001)	20
11 neg ktr	10	0	5	5 (dH2O)	20
12,13,14	10	0	5	5 (0.0001)	20
15,16,17	10	0	5	5 (0.00001)	20
18,19,20	10	0	5	5 (0.000001)	20
21 neg ktr	10	0	5	5 (dH2O)	20
22,23,24	10	0	5	5 (0.0000001)	20
25,26,27	10	0	5	5 (0.00000001)	20
28,29,30	10	0	5	5 (0.000000001)	20

Resultat fortynningsrekke ipaH

Negativ logaritme av fortynning	Cq	fortynning
1	17,05	0,1
1	16,8	0,1
1	16,79	0,1
2	20,26	0,01
2	20,27	0,01
2	20,26	0,01
3	23,81	0,001
3	23,77	0,001
3	23,76	0,001
4	27,17	0,0001
4	27,15	0,0001
4	27,13	0,0001
5	30,45	0,00001
5	30,74	0,00001
5	30,63	0,00001
6	33,84	0,000001
6	33,67	0,000001
6	33,85	0,000001
7	37,75	1E-07
7	37,83	1E-07
7	36,77	1E-07
8		1E-08
8		1E-08
8	40,14	1E-08
9		1,00E-09
9		1,00E-09
9		1,00E-09

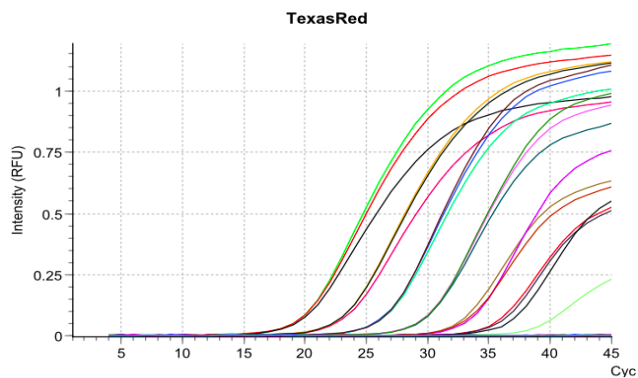
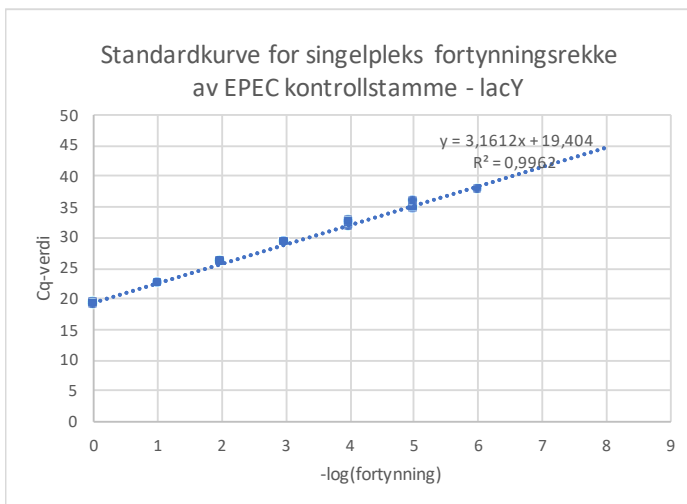
Effektivitet: 97,3 %



Resultat fortynningsrekke lacY

Negativ logaritme av fortynning	Cq	fortynning
0	19,22	1
0	19,24	1
0	19,1	1
1	22,48	0,1
1	22,47	0,1
1	22,45	0,1
2	25,85	0,01
2	25,86	0,01
2	25,94	0,01
3	29,13	0,001
3	29,2	0,001
3	29,27	0,001
4	31,73	0,0001
4	32,69	0,0001
4	32,17	0,0001
5	34,6	0,00001
5	34,98	0,00001
5	35,87	0,00001
6	37,65	0,000001
6		0,000001
6		0,000001
7		1E-07
7		1E-07
7		1E-07
8		1E-08
8		1E-08
8		1E-08

Effektivitet: 107,2 %



Resultat dupleks fortynningsrekke

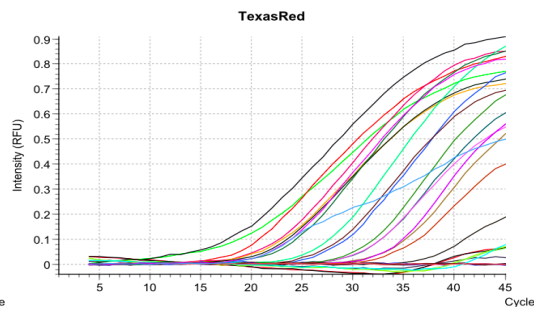
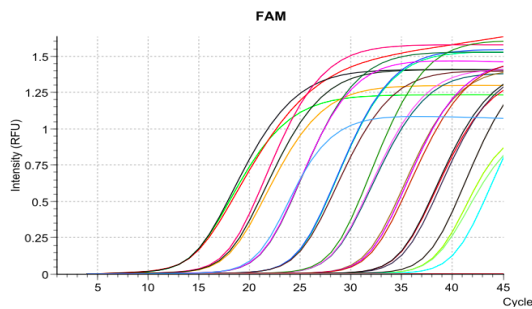
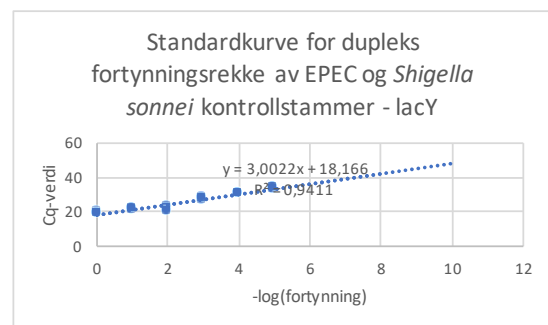
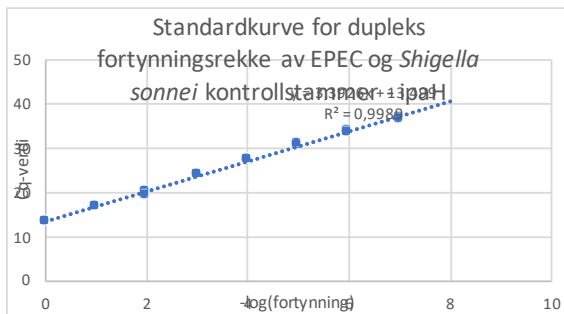
ipaH			lacY		
Negativ logaritme av fortynning	Cq-verdi	Fortynning	Negativ logaritme av fortynning	Cq-verdi	Fortynning
0	13,33	1	0	19,72	1
0	13,64	1	0	18,97	1
0	13,57	1	0	18,56	1
1	16,83	0,1	1	21,62	0,1
1	16,88	0,1	1	21,47	0,1
1	16,84	0,1	1	21,68	0,1
2	20,31	0,01	2	23,22	0,01
2	20,22	0,01	2	22,48	0,01
2	19,48	0,01	2	19,77	0,01
3	23,84	0,001	3	26,66	0,001
3	23,79	0,001	3	28,02	0,001
3	23,81	0,001	3	27,2	0,001
4	27,24	0,0001	4	31,07	0,0001
4	27,2	0,0001	4	30,47	0,0001
4	27,17	0,0001	4	30,57	0,0001
5	30,52	0,00001	5	33,58	0,00001
5	30,77	0,00001	5	33,13	0,00001
5	30,98	0,00001	5	33,9	0,00001
6	33,74	0,000001	6		0,000001
6	34,14	0,000001	6		0,000001
6	33,75	0,000001	6		0,000001
7	37,07	0,0000001	7		0,0000001
7	37,15	0,0000001	7		0,0000001
7	36,69	0,0000001	7		0,0000001
8		0,00000001	8		0,00000001
8		0,00000001	8		0,00000001
8		0,00000001	8		0,00000001

lacY: 36,51

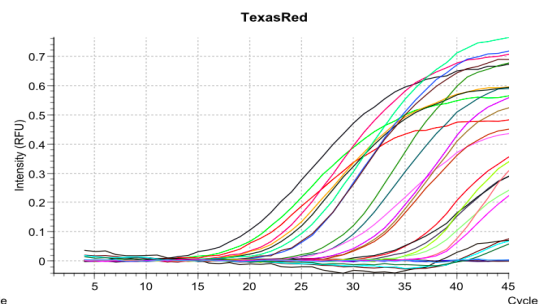
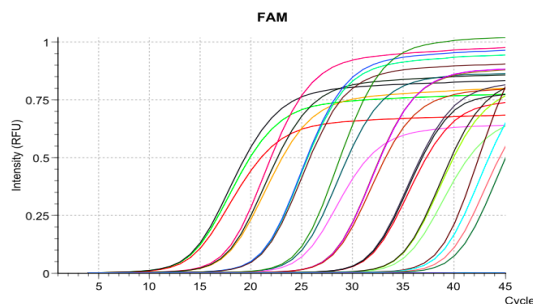
ipaH: 39,15

Effektivitet lacY: 115,3 %

Effektivitet ipaH: 97,1 %



Andre forsøk:



PCR-program

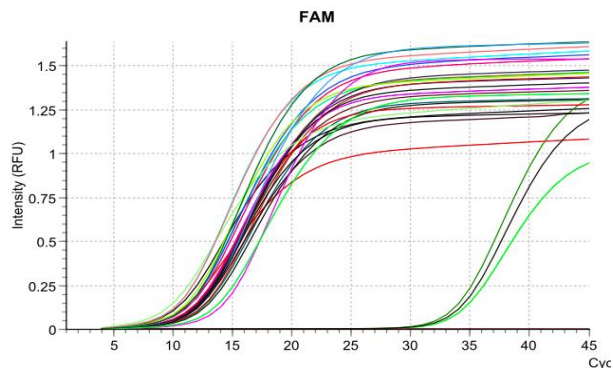
	Temperatur	Tid	Ramp
Denaturering	95 °C	10 min	4.4.
Amplifikasjon 45 sykluser	95 °C	10 sek	4.4.
	58 °C	40 sek	2.2.
	72 °C	3 sek	4.4.

Resultat av pasientprøver

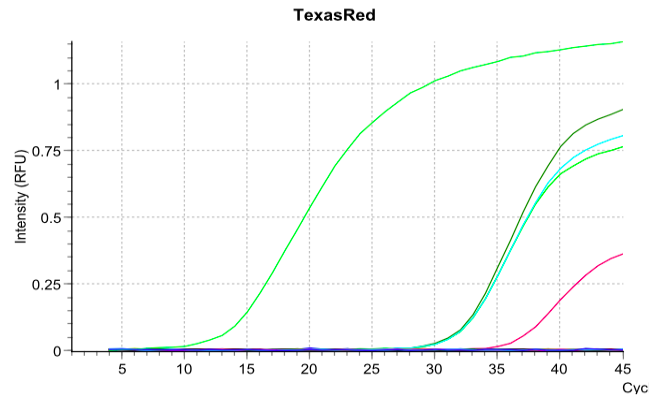
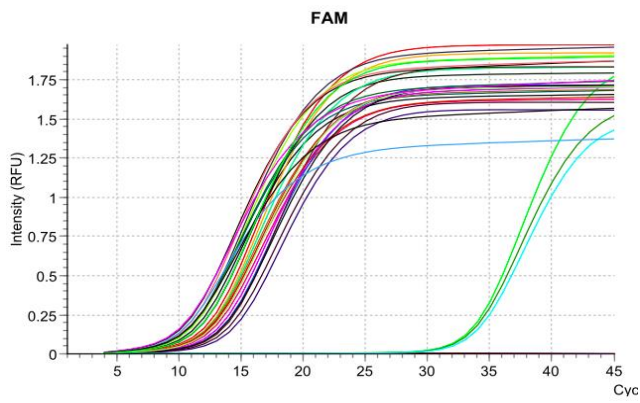
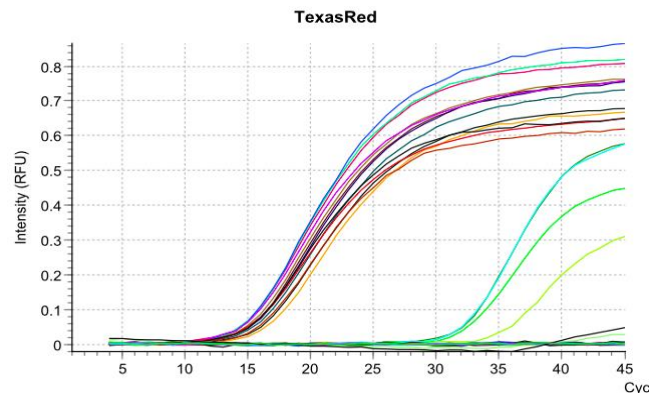
Prøve navn	Mikrobe påvist tidligere	Resultat IpaH	Resultat LacY	Tolkning av resultat
1	EIEC	9,74		<i>Shigella</i>
2	EIEC	9,44		<i>Shigella</i>
3	EIEC	10,71	14,06	EIEC
4	EIEC	11,83	15,21	EIEC
5	EIEC	10,43	14,07	EIEC
6	EIEC	10,57	14,13	EIEC
7	EIEC	11,04	14,58	EIEC
8	EIEC	11,11	14,68	EIEC
9	EIEC	11,65	14,88	EIEC
10	EIEC	11,49	14,36	EIEC
11	EIEC	10,9	14,13	EIEC
12	EIEC	11,72	14,99	EIEC
13	EIEC	10,84	14,45	EIEC
14	EIEC	11,24	14,44	EIEC
15	SHFLEX	11,09		<i>Shigella</i>
16	SHFLEX	10,23	34,21	EIEC
17	SHFLEX	8,78		<i>Shigella</i>
18	SHFLEX	9,74		<i>Shigella</i>
19	SHFLEX	9,78		<i>Shigella</i>
20	SHFLEX	10,71		<i>Shigella</i>
21	SHFLEX	13,46		<i>Shigella</i>
22	SHSONN	11,72		<i>Shigella</i>
23	SHSONN	12,68		<i>Shigella</i>
24	SHSONN	11,36		<i>Shigella</i>
25	SHSONN	11,5		<i>Shigella</i>
26	SHSONN	10,39		<i>Shigella</i>
27	SHSONN	11,85	35,51	EIEC
28	SHSONN	11,69		<i>Shigella</i>
29	SHSONN	10,91		<i>Shigella</i>
30	SHSONN	11,64		<i>Shigella</i>
31	SHSONN	12,6		<i>Shigella</i>
32	SHSONN	12,9		<i>Shigella</i>
33	SHSONN	13,38		<i>Shigella</i>
34	SHSONN	10,06		<i>Shigella</i>
35	SHSONN	11,52		<i>Shigella</i>
36	SHSONN	12,32		<i>Shigella</i>
37	SHSONN	11,5		<i>Shigella</i>
38	SHSONN	11,69		<i>Shigella</i>
39	SHSONN	10,32		<i>Shigella</i>
40	SHSONN	12,6		<i>Shigella</i>
41	SHSONN	13		<i>Shigella</i>
42	SHBOYD	10,41		<i>Shigella</i>
43	SHBOYD	11,8		<i>Shigella</i>
44	SHBOYD	9,63		<i>Shigella</i>
45	SHBOYD	9,93		<i>Shigella</i>
46	SHBOYD	10,05		<i>Shigella</i>
47	SHBOYD	9,31		<i>Shigella</i>
48	SHBOYD	9,09		<i>Shigella</i>
49	SHIGEL	9,73	13,09	EIEC
50	SHDYSE	10,98		<i>Shigella</i>
51	EIEC	24,49	19,95	EIEC
52	SHSONN	15,54	17,58	EIEC
53	EIEC	26,95	18,68	EIEC

Antal prøver som har endret svar:	6
Antal EIEC som nå er blitt <i>Shigella</i> :	2
Antall <i>Shigella</i> som nå er blitt EIEC:	4

ipaH pasientprøver:



lacY pasientprøver:



Alle oppsett pasientprøver:

ipaH med fluoroforen FAM				
Oppsett nummer	Prøve nummer	Prøve navn	Mikrobe	Resultat (Cq)
1	1	Negativ kontroll	Ingen	
	2	Positiv kontroll	EPEC + SHSONN	33,18
	3	1	EIEC	9,74
	4	2	EIEC	9,44
	5	3	EIEC	10,71
	6	x	EIEC	???
	7	4	EIEC	11,83
	8	5	EIEC	10,43
	9	6	EIEC	10,57
	10	7	EIEC	11,04
	11	8	EIEC	11,11
	12	9	EIEC	11,65
	13	Negativ kontroll	Ingen	
	14	Positiv kontroll	EPEC + SHSONN	32,92
	15	10	EIEC	11,49
	16	11	EIEC	10,9
	17	12	EIEC	11,72
	18	13	EIEC	10,84
	20	14	EIEC	11,24
	21	15	SHFLEX	11,09
	22	16	SHFLEX	10,23
	23	17	SHFLEX	8,78
	24	18	SHFLEX	9,74
	25	Negativ kontroll	Ingen	
	26	Positiv kontroll	EPEC + SHSONN	33,22
	27	19	SHFLEX	9,78
	28	20	SHFLEX	10,71
	29	21	SHFLEX	13,46
	30	22	SHSONN	11,72
	31	23	SHSONN	12,68
	32	24	SHSONN	11,36
	2	1	Negativ kontroll	Ingen
2		Positiv kontroll	EPEC + SHSONN	32,86
3		25	SHSONN	11,5
4		26	SHSONN	10,39
5		27	SHSONN	11,85
6		28	SHSONN	11,69
7		29	SHSONN	10,91
8		30	SHSONN	11,64
9		31	SHSONN	12,6
10		32	SHSONN	12,9
11		33	SHSONN	13,38
12		34	SHSONN	10,06
13		Negativ kontroll	Ingen	
14		Positiv kontroll	EPEC + SHSONN	32,78
15		35	SHSONN	11,52
16		36	SHSONN	12,32
17		37	SHSONN	11,5
18		38	SHSONN	11,69
19		39	SHSONN	10,32
20		40	SHSONN	12,6
21		41	SHSONN	13
22		42	SHBOYD	10,41
23		43	SHBOYD	11,8
24		44	SHBOYD	9,63
25		Negativ kontroll	Ingen	
26		Positiv kontroll	EPEC + SHSONN	33,01
27		45	SHBOYD	9,93
28		46	SHBOYD	10,05
29		47	SHBOYD	9,31
30		48	SHBOYD	9,09
31		49	SHIGEL	9,73
32		50	SHDYSE	10,98

SLETTET

LacY med fluoroforen TexasRed					
Oppsett nummer	Prøve nummer	Prøve navn	Mikrobe	Resultat (Cq)	Tolking av resultat
3	1	Negativ kontroll	Ingen		ok
	2	Positiv kontroll	EPEC + SHSONN	31,34	ok
	3	1	EIEC		Shigella
	4	2	EIEC		Shigella
	5	3	EIEC	14,06	EIEC
	6	x	EIEC	15,74	Ukjent
	7	4	EIEC	15,21	EIEC
	8	5	EIEC	14,07	EIEC
	9	6	EIEC	14,13	EIEC
	10	7	EIEC	14,58	EIEC
	11	8	EIEC	14,68	EIEC
	12	9	EIEC	14,88	EIEC
	13	Negativ kontroll	Ingen		ok
	14	Positiv kontroll	EPEC + SHSONN	31,33	ok
	15	10	EIEC	14,36	EIEC
	16	11	EIEC	14,13	EIEC
	17	12	EIEC	14,99	EIEC
	18	13	EIEC	14,45	EIEC
	20	14	EIEC	14,44	EIEC
	21	15	SHFLEX		Shigella
	22	16	SHFLEX	34,21	EIEC
	23	17	SHFLEX		Shigella
	24	18	SHFLEX		Shigella
	25	Negativ kontroll	Ingen		ok
	26	Positiv kontroll	EPEC + SHSONN	31,37	ok
	27	19	SHFLEX		Shigella
	28	20	SHFLEX		Shigella
	29	21	SHFLEX		Shigella
	30	22	SHSONN		Shigella
	31	23	SHSONN		Shigella
	32	24	SHSONN		Shigella
	4	1	Negativ kontroll	Ingen	
2		Positiv kontroll	EPEC + SHSONN	31,25	ok
3		25	SHSONN		Shigella
4		26	SHSONN		Shigella
5		27	SHSONN	35,51	EIEC
6		28	SHSONN		Shigella
7		29	SHSONN		Shigella
8		30	SHSONN		Shigella
9		31	SHSONN		Shigella
10		32	SHSONN		Shigella
11		33	SHSONN		Shigella
12		34	SHSONN		Shigella
13		Negativ kontroll	Ingen		ok
14		Positiv kontroll	EPEC + SHSONN	31,3	ok
15		35	SHSONN		Shigella
16		36	SHSONN		Shigella
17		37	SHSONN		Shigella
18		38	SHSONN		Shigella
19		39	SHSONN		Shigella
20		40	SHSONN		Shigella
21		41	SHSONN		Shigella
22		42	SHBOYD		Shigella
23		43	SHBOYD		Shigella
24		44	SHBOYD		Shigella
25		Negativ kontroll	Ingen		ok
26		Positiv kontroll	EPEC + SHSONN	31,32	ok
27		45	SHBOYD		Shigella
28		46	SHBOYD		Shigella
29		47	SHBOYD		Shigella
30		48	SHBOYD		Shigella
31		49	SHIGEL	13,09	EIEC
32		50	SHDYSE		Shigella

Oppsett IpaH negative sop:

Prøve posisjon	Prøve navn	Mikrobe/gen påvist tidligere	Temperatur	Resultat (Cq)
1 strips 1	Positiv kontroll ipaH	EPEC + SHSONN	56	33,07
2 strips 1	Positiv kontroll ipaH	EPEC + SHSONN	56	33,17
3 strips 1	Negativ kontroll ipaH	Ingen	56	
4 strips 1	Positiv kontroll IpaH	EPEC + SHSONN	56	32,98
5 strips 1	Negativ kontroll ipaH	EPEC + SHSONN	56	
4 strips 2	Positiv kontroll LacY	Ingen	56	31,8
5 strips 2	Negativ kontroll LacY	EPEC + SHSONN	56	
6 strips 2	Positiv kontroll LacY	EPEC + SHSONN	56	31,89
7 strips 2	Positiv kontroll LacY	EPEC + SHSONN	56	31,78
8 strips 2	Negativ kontroll LacY	Ingen	56	
1 strips 1	Positiv kontroll IpaH	EPEC + SHSONN	58	32,97
2 strips 1	Positiv kontroll IpaH	EPEC + SHSONN	58	32,83
3 strips 1	Negativ kontroll ipaH	Ingen	58	
4 strips 1	Positiv kontroll IpaH	EPEC + SHSONN	58	32,83
5 strips 1	Positiv kontroll LacY	EPEC + SHSONN	58	31,4
6 strips 1	Negativ kontroll LacY	Ingen	58	
7 strips 1	Positiv kontroll LacY	EPEC + SHSONN	58	31,63
8 strips 1	Positiv kontroll LacY	EPEC + SHSONN	58	31,46
1 strips 2	Negativ kontroll LacY	Ingen	58	39,77
2 strips 2	ipaH-negativt sop 1	Ingen	58	
3 strips 2	ipaH-negativt sop 2	Ingen	58	
6 strips 3	ipaH-negativt sop 51	Påvist ipaH på primærprøve, og påvist ial på sop PCR	58	29,49
7 strips 3	ipaH-negativt sop 3	Ingen	58	
8 strips 3	ipaH-negativt sop 4	Ingen	58	
1 strips 4	ipaH-negativt sop 5	Ingen	58	
2 strips 4	ipaH-negativt sop 52	Påvist ipaH på primærprøve, og påvist ial på sop PCR, og gen for EHEC STX2. Shigella sonnei. Blanding i sop, ville mest sannsynlig fått pos på lacY og	58	15,45
3 strips 4	ipaH-negativt sop 53	Påvist ipaH på primærprøve, og påvist ial på sop PCR	58	26,95
4 strips 4	ipaH-negativt sop 70776924	Ikke påvist ipaH, men EHEC ved STX1, samme i primærprøven. Denne vil være positiv på lacY.	58	
5 strips 4	ipaH-negativt sop 7	Ingen	58	
6 strips 4	ipaH-negativt sop 8	Ingen	58	
7 strips 4	Negativ kontroll ipaH	Ingen	58	
8 strips 4	X		58	
1 strips 1	Positiv kontroll IpaH	EPEC + SHSONN	60	32,77
2 strips 1	Positiv kontroll IpaH	EPEC + SHSONN	60	33,05
3 strips 1	Negativ kontroll	Ingen	60	
4 strips 1	Positiv kontroll IpaH	EPEC + SHSONN	60	33,04
5 strips 1	Negativ kontroll	Ingen	60	
4 strips 2	Positiv kontroll LacY	EPEC + SHSONN	60	32,36
5 strips 2	Negativ kontroll	Ingen	60	
6 strips 2	Positiv kontroll LacY	EPEC + SHSONN	60	32,38
7 strips 2	Positiv kontroll LacY	EPEC + SHSONN	60	32,25
8 strips 2	Negativ kontroll	Ingen	60	

Ny kjøring av sop med lacY-primer/prober og ekstra kontroller:

Prøve navn	Mikrobe/gen påvist tidligere	Resultat (Cq)
Positiv kontroll lacY	EPEC + SHSONN	31,68
Negativ kontroll lacY	Ingen	
Positiv kontroll lacY	EPEC + SHSONN	31,52
ipaH-negativt sop 1	Ingen	18,28
ipaH-negativt sop 2	Ingen	17,85
ipaH-negativt sop 51	Påvist ipaH på primærprøve, og påvist ial på sop PCR	19,95
ipaH-negativt sop3	Ingen	19,55
ipaH-negativt sop 4	Ingen	18,03
ipaH-negativt sop 5	Ingen	17,58
ipaH-negativt sop 52	Påvist ipaH på primærprøve, og påvist ial på sop PCR, og gen for EHEC STX2. Shigella sonnei. Blanding i sop, ville mest sannsynlig fått pos på lacY og	17,58
ipaH-negativt sop 53	Påvist ipaH på primærprøve, og påvist ial på sop PCR	18,68
ipaH-negativt sop 6	Ikke påvist ipaH, men EHEC ved	18,68
ipaH-negativt sop 7	Ingen	22,56
ipaH-negativt sop 8	Ingen	19,67
Negativ kontroll lacY	Ingen	
Positiv kontroll IpaH	EPEC + SHSONN	32,71
Negativ kontroll Ipah	Ingen	
Positiv kontroll IpaH	EPEC + SHSONN	32,98

Temperaturtesting - robusthet, og spesifisitet

Resultat IpaH negative sop:

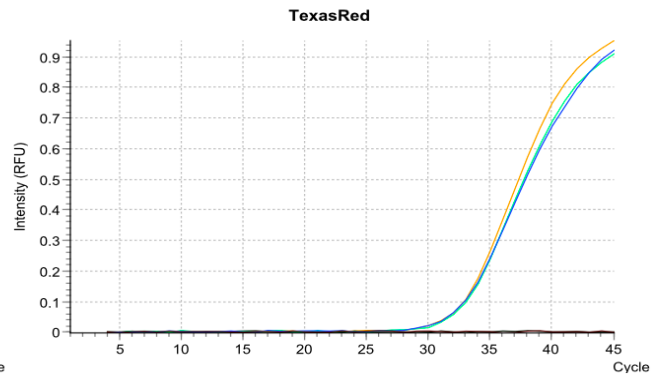
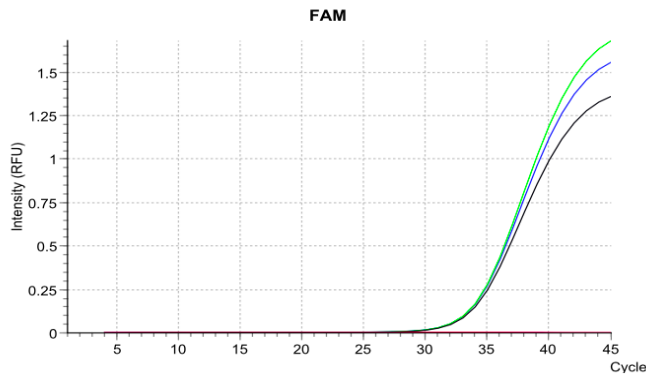
Prøve navn	Mikrobe/gen påvist tidligere	Resultat Cq IpaH	Resultat Cq LacY
ipaH-negativt sop 70828751	Ingen	-	18,28
ipaH-negativt sop 70869403	Ingen	-	17,85
ipaH-negativt sop 70792003	Ingen	-	19,55
ipaH-negativt sop 66952285	Ingen	-	18,03
ipaH-negativt sop 66952277	Ingen	-	17,58
ipaH-negativt sop 70776924	Ikke påvist ipaH, men EHEC ved STX1, samme i primærprøven. Denne vil være positiv på lacY.	-	18,68
ipaH-negativt sop 66916750	Ingen	-	22,56
ipaH-negativt sop 70862917	Ingen	-	19,67

Resultat "nye" pasientprøver:

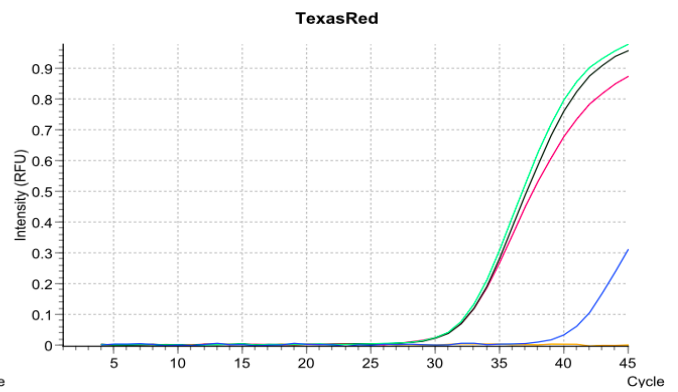
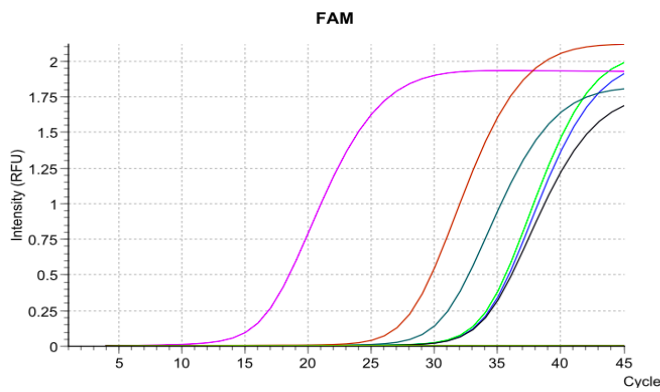
Prøve navn	Mikrobe/gen påvist tidligere	Resultat Cq IpaH	Resultat Cq LacY
ipaH-negativt sop 51	Påvist ipaH på primærprøve, og påvist ial på sop PCR	29,49	19,95
ipaH-negativt sop 52	Påvist ipaH på primærprøve, og påvist ial på sop PCR, og gen for EHEC STX2. Shigella sonnei. Blanding i sop, ville mest sannsynlig fått pos på lacY og	15,45	17,58
ipaH-negativt sop 53	Påvist ipaH på primærprøve, og påvist ial på sop PCR	26,95	18,68

Resultat robusthet

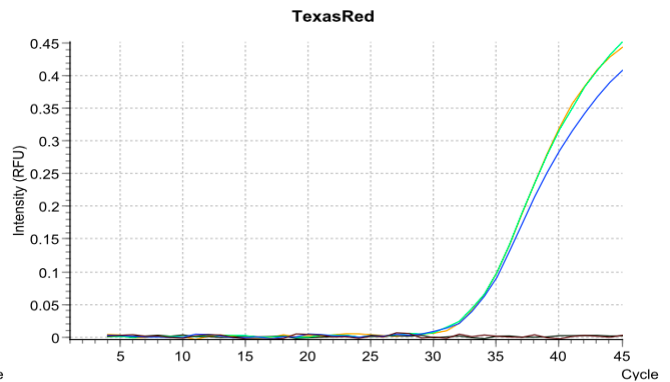
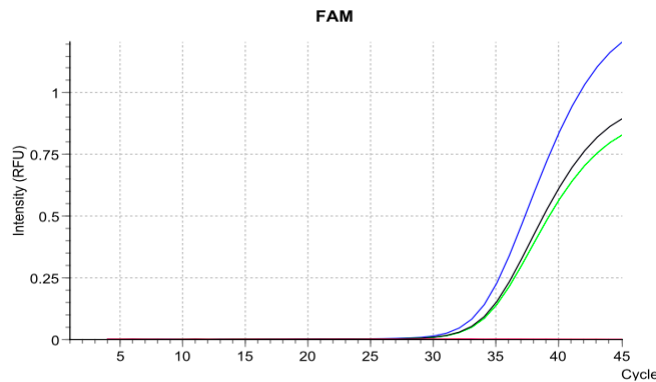
56 grader:



58 grader:



60 grader:



	ipaH			lacY		
Resultat (Cq)	56 grader	58 grader	60 grader	56 grader	58 grader	60 grader
	33,07		32,77	31,8		32,36
	33,17		33,05	31,89		32,38
	32,98		33,04	31,78		32,25
Gjennomsnitt	33,07333333	32,91	32,95	Gjennomsnitt	31,82	31,54

	56 mot 58 grader	58 mot 60 grader
Prosentavvik	0,4951 %	0,000 %

På 58 grader har vi brukt gjennomsnittet fra repeterbarhet.

	56 mot 58 grader	58 mot 60 grader
Prosentavvik	0,000 %	2,474 %
Spesifisitet (%)		100

Kontaminering

Negative kontroller kjørt	Antall negative	Antall positive
26	25	1

På IpaH negative sop oppsettet ble en negativ kontroll svak positiv.

Repeterbarhet

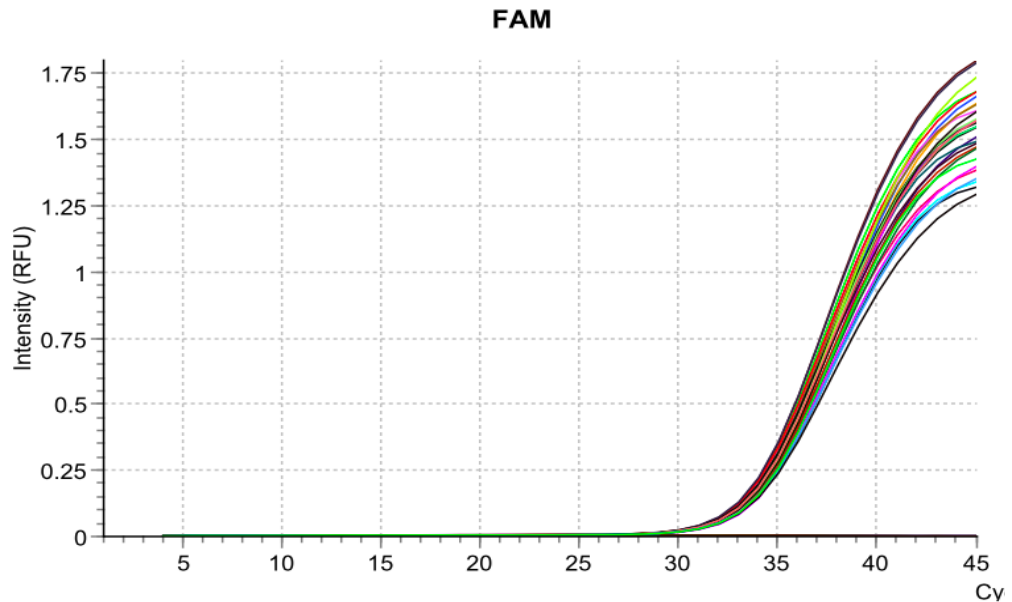
ipaH

Ved kjøring ble alle de tre negative kontrollene negative som forventet.

Kontrollen fra stammen ATCC 25931 (*Shigella sonnei*) ble kjørt 29 ganger.

Dette er en kontroll med begge genene, men ved denne kjøringen ble kun primere/prober for ipaH-genet benyttet.

Cq-verdi	Standardavvik	Gjennomsnitt	Variasjonskoeffisient
32,74	0,164172803	32,90793103	0,49889 %
32,83			
32,99			
32,69			
33,14			
32,77			
32,91			
33,07			
32,77			
33,06			
32,95			
32,72			
32,78			
33,37			
32,92			
32,71			
32,72			
32,73			
32,74			
33,17			
32,88			
33,01			
32,97			
32,84			
33,01			
32,93			
32,94			
32,91			
33,06			



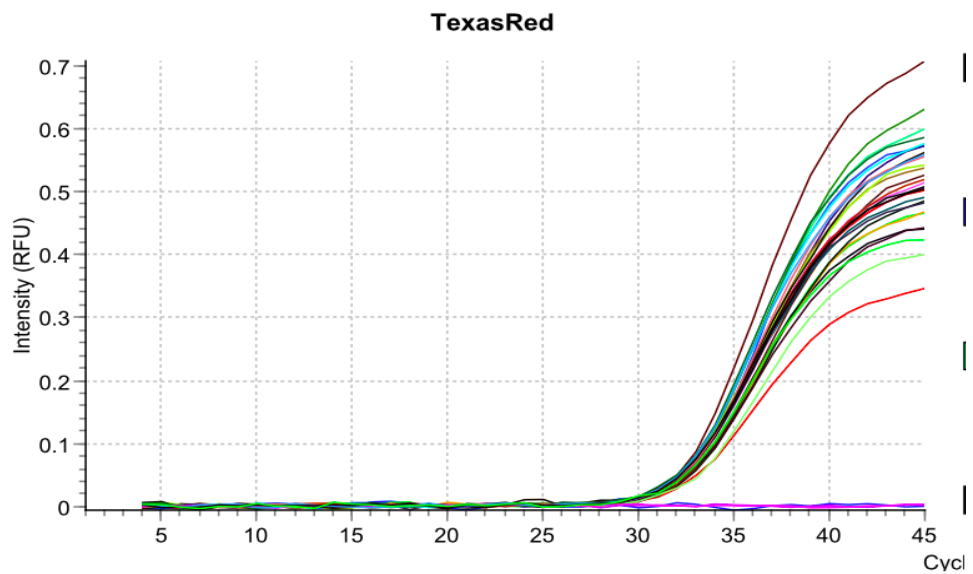
lacY

Ved kjøring ble alle de tre negative kontrollene negative som forventet.

Kontrollen fra stammen ATCC 43887 (EPEC) ble kjørt 29 ganger.

Dette er en kontroll med begge genene, men ved denne kjøringen ble kun primere/prober for lacY-genet benyttet.

Cq-verdi	Standardavvik	Gjennomsnitt	Variasjonskoeffisient
31,43	0,159785108	31,54206897	0,50658 %
31,49			
31,4			
31,41			
31,62			
31,82			
31,58			
31,88			
31,86			
31,66			
31,3			
31,57			
31,69			
31,48			
31,41			
31,4			
31,46			
31,51			
31,57			
31,39			
31,85			
31,5			
31,6			
31,44			
31,65			
31,57			
31,41			
31,34			
31,43			



Reproduserbarhet

Fordelt over 4 kjøring er 11 positive kontroller for IpaH og LacY kjørt.

Positiv kontroll IpaH			
Cq-verdi	Gjennomsnitt	Standardavvik	Variasjonskoeffisient
33,18	32,935	0,159	0,483
32,92			
33,22			
32,86			
32,78			
33,01			
32,97			
32,83			
32,83			
32,71			
32,98			

Positiv kontroll LacY			
Cq-verdi	Gjennomsnitt	Standardavvik	Variasjonskoeffisient
31,34	31,418	0,139	0,443
31,33			
31,37			
31,25			
31,30			
31,32			
31,40			
31,63			
31,46			
31,68			
31,52			

DNA-konsentrasjon

Kontrollstamme	DNA-konsentrasjon (ng/ul)			Genomstørrelse	Antall kopier av templatet per uL	Antall kopier av templatet
	1. parallell	2. parallell	Gjennomsnitt			
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	10,6	10,7	10,65	4,848,621	0,203	0,5075
EPEC ATCC 43887	4,21	3,81	4,01	4,962,700	7,49	18,725

<https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>

Deteksjonsgrensen skal vere bedre enn 100 kopier per PCR.

<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931 (ipaH), påviser 7 fortyninger		
Fortynning	Kopier/ μ L	Kopier
1	2030000	5075000
10	203000	507500
100	20300	50750
1000	2030	5075
10000	203	507,5
100000	20,3	50,75
1000000	2,03	5,075
10000000	0,203	0,5075

EPEC ATCC 43887 (lacY), påviser 5 fortyninger		
Fortynning	Kopier/ μ L	Kopier
1	749000	1872500
10	74900	187250
100	7490	18725
1000	749	1872,5
10000	74,9	187,25
100000	7,49	18,725

Forgjæring pasientprøver

Prøve navn	Mikrobe	Oxidase	ONPG	Phenylalanin	Laktose	Sakkarose	Syre	Gass
	1 EIEC	-	-	IU	-	-	+	-
	2 EIEC	-	-/+	IU	-	-	+	-
slp nov 2011	3 EIEC	-	+	IU	-	-	+	+
	4 EIEC	IU	+	IU	+	IU	+	-
	5 EIEC	-	+	IU	-	IU	+	+
	6 EIEC	-	+	IU	+	IU	+	+
	7 EIEC	-	+	IU	-/+	IU	+	+
	8 EIEC	IU	+	IU	+	IU	+	-
	9 EIEC	IU	+	IU	+	IU	+	+
	10 EIEC	-	+	IU	+	+	+	+
	11 EIEC	IU	IU	IU	+	+	+	-
	12 EIEC	IU	IU	IU	+	+	+	+
	13 EIEC	-	+	IU	+	+	+	+
	14 EIEC	IU	IU	IU	+	IU	+	+
	15 SHFLEX	-	-	-	-	-	+	-
	16 SHFLEX	-	-	-	-	-	+	-
	17 SHFLEX	-	-	-	-	-	+	-
	18 SHFLEX	-	-	IU	-	-	+	-
slp juli 2016	19 SHFLEX	-	-	IU	-	-	+	-
slp aug 2017	20 SHFLEX	-	-	IU	-	-	+	-
slp juni 2018	21 SHFLEX	IU	-	IU	-	-	+	-
	22 SHSONN	-	+	-	-	-	+	-
slp juli 2011	23 SHSONN	-	+	-	-	-	+	-
	24 SHSONN	-	+	-	-	-	+	-
	25 SHSONN	-	+	-	-	-	+	-
	26 SHSONN	-	+	-	-	-	+	-
	27 SHSONN	-	+	-	-	-	+	-
	28 SHSONN	-	+	-	-	-	+	-
slp sept 2013	29 SHSONN	-	+	IU	-	-	+	-
	30 SHSONN	-	+	IU	-	-	+	-
slp mai 2014	31 SHSONN	-	+	IU	-	-	+	-
slp nov 2014	32 SHSONN	-	+	IU	-	-	+	-
slp juli 2015	33 SHSONN	-	+	IU	-	-	+	-
	34 SHSONN	-	+	IU	-	-	+	-
	35 SHSONN	IU	+	IU	-	-	+	-
slp mai 2017	36 SHSONN	-	+	IU	-	-	+	-
slp juli 2018	37 SHSONN	-	+	IU	-	-	+	-
	38 SHSONN	IU	+	IU	-	-	+	-
	39 SHSONN	IU	+	IU	-	-	+	-
slp mai 2018	40 SHSONN	IU	+	IU	-	-	+	-
slp juli 2019	41 SHSONN	IU	IU	IU	-	-	+	-
slp aug 2011	42 SHBOYD	-	-/+	-	-	-	+	-
slp mai 2012	43 SHBOYD	-	+	-	-	-	+	-
slp jan 2013	44 SHBOYD	-	+	-	-	-	+	-
slp okt 2013	45 SHBOYD	-	-/+	IU	-	-	+	-
slp okt 2015	46 SHBOYD	-	+	IU	-	-	+	+
	47 SHBOYD	-	+	IU	-	-	+	-
	48 SHBOYD	-	-	IU	-	-	+	-
slp nov 2017	49 SHIGEL	IU	+	IU	-	IU	+	-
	50 SHDYSE	-	-	IU	-	-	+	-

Agglutinasjon	PCR		ipaH primærpr	ipaH sop
	ial	uidA		
Negativ	+	+	IU	IU
Negativ	+	+	IU	IU
IU	+	IU	IU	IU
Negativ	+	IU	+	IU
Shigella dysenteriae	+	IU	+	IU
IU	+	IU	+	IU
Negativ	+	IU	+	IU
Negativ	+	IU	+	IU
IU	+	IU	+	IU
IU	+	IU	+	IU
Negativ	+	IU	+	IU
IU	+	IU	+	IU
IU	+	IU	+	IU
IU	+	IU	+	IU
Shigella flexneri	IU	IU	IU	IU
Shigella flexneri	IU	IU	IU	IU
Shigella flexneri	IU	IU	IU	IU
Shigella flexneri	IU	IU	IU	IU
Shigella flexneri	IU	IU	IU	IU
Shigella flexneri	IU	IU	+	IU
Shigella flexneri	-	IU	+	+
Shigella sonnei	IU	IU	IU	IU
Shigella sonnei	IU	IU	IU	IU
Shigella sonnei	IU	IU	IU	IU
Shigella sonnei	IU	IU	IU	IU
Shigella sonnei	IU	IU	IU	IU
Shigella sonnei	IU	IU	IU	IU
Shigella sonnei	IU	IU	IU	IU
Shigella sonnei	IU	IU	IU	IU
Shigella sonnei (R-formen)	-	+	IU	+ (påvist ved FHI)
Shigella sonnei	IU	IU	IU	IU
Shigella sonnei	IU	IU	IU	IU
Shigella sonnei	IU	IU	IU	IU
Shigella sonnei	+	IU	+	IU
Negativ (kun testa S. dysenteriae)	+	IU	+	IU
Shigella sonnei	IU	IU	+	IU
Shigella sonnei	IU	IU	+	IU
Shigella sonnei	+	IU	+	IU
Shigella sonnei	+	IU	+	IU
Shigella sonnei	-	IU	+	IU
Shigella sonnei	+	IU	+	IU
Shigella boydii	IU	IU	IU	IU
Shigella boydii	-	IU	IU	IU
Shigella boydii	+	IU	IU	IU
Shigella boydii	+	IU	IU	IU
Shigella boydii	+	+	IU	IU
Shigella boydii	+	IU	IU	IU
Shigella boydii	+	IU	IU	IU
Negativ	+	IU	+	IU
Shigella dysenteriae	+	IU	+	IU

Vedlegg 2: Molecular differentiation of *Shigella* spp. from enteroinvasive *E. coli*

Original article

European Journal of Microbiology and Immunology 6 (2016) 3, pp. 197–205
DOI: 10.1556/1886.2016.00004

MOLECULAR DIFFERENTIATION OF *SHIGELLA* SPP. FROM ENTEROINVASIVE *E. COLI*

I. Løbersli, A. L. Wester, A. Kristiansen, L. T. Brandal*

Department of Foodborne Infections, The Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway

Received: February 22, 2016; Accepted: February 23, 2016

A real-time polymerase chain reaction (PCR) assay, amplifying the genes encoding lactose permease (*lacY*) and invasion plasmid antigen H (*ipaH*), was run on 121 isolates phenotypically classified as *Shigella* spp., enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), or EIEC O nontypable (ONT). The results were compared with data from a generic *E. coli* multiple-locus variable-number of tandem repeat analysis (MLVA) and a *Shigella* MLVA.

The real-time PCR verified all *Shigella* spp. ($n = 53$) as *Shigella* (*lacY* negative) and all EIEC O121 ($n = 15$) and EIEC O124 ($n = 2$) as EIEC (*lacY* positive). However, the real-time PCR typed EIEC O164 as either EIEC ($n = 2$) or *Shigella* ($n = 2$) and, thus, was not suited for classifying this group of isolates. Interestingly, the majority (42/47, 89.4%) of the EIEC ONT were classified as *Shigella* (*lacY* negative) by the real-time PCR, and in nearly all cases, (92.9%, 39/42) data from both MLVA assays supported these findings. Overall, in 94.7% (114/121) of the isolates, the results from the real-time PCR were substantiated by the results from the MLVA assays.

In conclusion, the real-time PCR assay was fast and accurate in differentiating *Shigella* spp. from EIEC, with the exception of the EIEC O164 group. This molecular assay was particularly pragmatic for the challenging EIEC ONT group.

Keywords: EIEC, *Shigella*, real-time PCR, molecular differentiation, MLVA

Abbreviations: EIEC, enteroinvasive *E. coli*; *ipaH*, invasive plasmid antigen H; *lacY*, lactose permease; MLVA, multiple-locus variable-number of tandem repeat analysis; ONT, O nontypable; spp., species; Stx, shiga toxin

Introduction

Shigella is a gram-negative, lactose-negative, facultative intracellular pathogen, closely related to *Escherichia coli* (*E. coli*). It was recognized as the etiologic agent of bacillary dysentery or shigellosis in the 1890s, and in the 1950s, *Shigella* was adopted as a genus and subgrouped into four species (spp.): *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, and *Shigella sonnei* [1]. Shigellosis remains a major cause of morbidity and mortality among children in developing countries, in which *S. flexneri* is the dominating species. These bacteria are also important causes of morbidity in the industrialized part of the world where *S. sonnei* is the most common [2]. Shiga toxins (Stx) carrying *S. dysenteriae* serotype 1 and, to a lesser extent, *S. flexneri*,

are the *Shigella* spp. responsible for most severe diseases. Recently, Stx2, the Stx subtype associated with hemolytic uremic syndrome in patients infected with Stx-producing *E. coli* (STEC), was described in an *S. sonnei* isolate [3]. *Shigella* infection spreads by the fecal–oral route, and the infectious dose is low [4]. Rapid identification of *Shigella* spp. is thus important for outbreak control purposes. In Norway, shigellosis is a rare disease, with 100–200 cases annually. *S. sonnei* is the dominating species, and the majority of the cases are infected abroad (<http://www.msis.no/>). However, some domestic outbreaks of shigellosis have been detected in Norway, mainly associated with imported vegetables, meat, or herbs [5–8].

In the 1970s, the first invasive strains of *E. coli* causing *Shigella*-like dysentery were described [9]. Thereafter,

* Corresponding author: Lin Thorstensen Brandal; Norwegian Institute of Public Health, Division of Infectious Disease Control, Department of Foodborne Infections, P.O. Box 4404 Nydalen, N-0403 Oslo, Norway; Phone: +47 21076652; Fax: +47 21076518; E-mail: lin.thorstensen.brandal@fhi.no

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium for non-commercial purposes, provided the original author and source are credited.

several studies have shown that *Shigella* spp. and enteroinvasive *E. coli* (EIEC) form a single pathovar of *E. coli* [10–13]. In spite of this, discrimination between *Shigella* spp. and EIEC is essential due to clinical differences and also for epidemiological purposes [14]. However, the close relatedness between *Shigella* spp. and EIEC makes the distinction difficult if based on biochemical, serological, or molecular characteristics [11]. Most *Shigella* spp. are lactose negative, whereas EIEC isolates display variable ability to utilize lactose. It has been suggested that *Shigella* spp. lack the lactose permease gene (*lacY*), one of three genes constituting the *lac* operon important for lactose fermentation, or carry a *lacY* pseudogene. On the other hand, EIEC, as do all *E. coli*, harbor this particular gene [10, 14, 15]. Even though various molecular methods developed in the past few years presumably allow differentiation between *Shigella* spp. and EIEC, the discrimination between the two still represents a challenge [4, 16–19]. Therefore, in the present study, we aimed at establishing a rapid and reliable duplex real-time polymerase chain reaction (PCR) able to differentiate *Shigella* spp. from EIEC based on the presence or absence of *lacY*. Second, we wanted to substantiate these results by comparing them with genotyping data from two multiple-locus variable-number of tandem repeat analysis (MLVA) assays: one designed for *E. coli* and one for *Shigella* spp.

Materials and methods

Phenotypical characterization and *E. coli* pathotype PCR

Clinical microbiology laboratories throughout Norway mandatory forwarded presumptive *Shigella* and enteropathogenic *E. coli* isolated from stool specimens to the National Reference Laboratory for Enteropathogenic Bacteria at the Norwegian Institute of Public Health (NIPH). At NIPH, the received isolates were routinely subjected to a broad panel of single tube biochemical tests, and the results were evaluated according to established criteria [20]. Based on the biochemical findings, the isolates were tested for agglutination with either polyvalent anti-*S. flexneri*, anti-*Shigella* II and III (Sifin Diagnostics, Berlin, Germany), and anti-*S. boydii* 14–18 (Difco by Becton and Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey), or polyvalent *E. coli* antisera, Anti-Coli I, II, and III (Sifin Diagnostics, Berlin, Germany). Positive agglutination in a polyvalent antiserum was followed by agglutination in the relevant monovalent antiserum (either Sifin or from noncommercial production at NIPH). Isolates not clearly defined as either *Shigella* spp. or EIEC by phenotypic typing were denoted EIEC O nontypable (ONT). Presumptive *E. coli* isolates were classified into well-known pathotypes by running a multiplex PCR including, among other genes, *ipaH* [21].

Table 1. Bacterial isolates examined and results achieved using the duplex real-time PCR

Pathogen	Pathotype*	Serotype	No. analyzed	Duplex real-time PCR no.			
				<i>lacY</i> +	<i>ipaH</i> +	EIEC (%)	<i>Shigella</i> (%)
<i>E. coli</i>	EIEC	ONT†	47	5	47	5 (10.6%)	42 (89.4%)
		O121	15	15	15	15 (100%)	0 (0%)
		O124	2	2	2	2 (100%)	0 (0%)
		O164	4	2	4	2 (50%)	2 (50%)
	STEC	O103:H2, O26:H11	2	2	0	0 (0%)	0 (0%)
	aEPEC	ONT:H11, O145:H8	2	2	0	0 (0%)	0 (0%)
	EAEC	O104:H4, ONT	2	2	0	0 (0%)	0 (0%)
	ETEC	O6, ONT (2)	3	3	0	0 (0%)	0 (0%)
Non-enteropathogenic	–	1	1	0	0 (0%)	0 (0%)	
<i>Shigella</i> spp.	<i>S. sonnei</i>	–	13	0	13	0 (0%)	13 (100%)
	<i>S. flexneri</i>	1, 2, 3, 4, 6, and x variant	15	0	15	0 (0%)	15 (100%)
	<i>S. dysenteriae</i>	1, 2, 3, 4, 7, and 9	13	0	13	0 (0%)	13 (100%)
	<i>S. boydii</i>	2, 4, 8, 10, 14, and 18	12	0	12	0 (0%)	12 (100%)
<i>Salmonella enterica</i> spp.	<i>S. Typhimurium</i>	4, 5, 12:i:1, 2	1	0	0	0 (0%)	0 (0%)
	<i>S. Kedougou</i>	–	1	0	0	0 (0%)	0 (0%)
<i>Yersinia</i> spp.	<i>Y. enterocolitica</i>	O:3	1	0	0	0 (0%)	0 (0%)
		O:9	1	0	0	0 (0%)	0 (0%)

*The pathotype was phenotypically determined for *Shigella* spp., *Salmonella* spp., and *Yersinia* spp.; however, for *E. coli*, the pathotype was determined running an 11-plex PCR [21]

†ONT: O nontypable

Bacterial isolates

A total of 121 isolates from 121 patients infected within the period 2006 to 2014 were obtained from the national strain collection at NIPH. The selection was based on phenotypical findings and comprised 53 *Shigella* spp. (13 *S. sonnei*, 15 *S. flexneri*, 12 *S. boydii*, and 13 *S. dysenteriae*), 21 EIEC of known serotype (15 O121, four O164, and two O124), and 47 EIEC ONT. All isolates, except two *S. sonnei* and two *S. dysenteriae* serotype 2, were sporadic cases. To ensure the specificity of the real-time PCR method, the following strains were added: STEC ($n = 2$), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) ($n = 2$), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) ($n = 2$), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ($n = 3$), non-diarrhea/commensal *E. coli* ($n = 1$), *Salmonella* Typhimurium ($n = 1$), *Salmonella* Kedougou ($n = 1$), and *Yersinia enterocolitica* (serogroups 3 and 9, respectively) ($n = 2$) (Table 1).

Growth conditions and extraction of DNA

All isolates were recultivated from stabbing agar on nutrient broth agar at 37 °C overnight. Suspensions of bacterial cells were boiled for 15 min and used directly as template in the real-time PCR after a brief 3 min centrifugation at 13,000 rpm.

Primer and probe design

Two primer-probe sets were used in the duplex real-time PCR (Table 2). The primer set for *lacY* was modified from Pavlovic et al., 2011 [19], whereas the primer set for the internal amplification control, *ipaH*, was adapted from Barletta et al., 2013 [22], with minor modifications. The probes for *lacY* [19] were modified to minor groove binder (MGB) format, and an MGB probe for

ipaH was designed using PrimerExpress 3.0 (Life Technologies). To check the specificity of both primer pairs and the probes, a BLAST search on NCBI was performed.

Conventional PCR and sequencing

Two conventional PCRs, including either the *lacY* or the *IpaH* primer set, were conducted to verify the expected PCR product size and to check the specificity of each primer set. EIEC O121 (*lacY* and *ipaH* positive) and *S. dysenteriae* (*lacY* negative, but *ipaH* positive) were used as positive controls in each run. PCR was performed using the Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany), as described by the manufacturer. The PCRs were run in a GeneAmp 9700 machine (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) with a temperature profile as indicated for the Qiagen Multiplex PCR kit and an annealing temperature of 58 °C. PCR products were diluted 1:10 prior to capillary electrophoresis on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). DNA 1000 LabChip kit series II was prepared and loaded with samples as recommended by the manufacturer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). The specificity of each primer pair was verified by direct sequencing of the PCR product of the positive control.

Real-time PCR; efficiencies and detection limits

For each primer-probe set, a 20× primer-probe mix was prepared with a final concentration of 2.5 μM of the respective primers and probes. Each reaction mix consisted of 10 μl 2× QuantiTect Multiplex RT-PCR Rox Mastermix (Qiagen, Hilden, Germany), 1 μl of 20× primer-probe mix for *ipaH* and/or *lacY*, 4 μl template DNA diluted 1:10,

Table 2. *ipaH* and *lacY* primers and probes used in the present study

Gene	Primer or probe*	Sequence (5'–3')	Melting point (°C)	PCR product (bp)	Fluorochrome (5' end)	Reference
<i>lacY</i> [†]	<i>lacY</i> -F	ACCAGACCCAGCACCAGATAAG	59	104		[19]
	<i>lacY</i> -R	TTCTGCTCTTTAAGCAACTGGC	58.9			Modified from [19]
	<i>lacY</i> -MGB-p1	CATACATATTGCCGCCAGTA	70		FAM	Modified from [19]
	<i>lacY</i> -MGB-p2	CATACATATGCCGCCAGA	70		FAM	Modified from [19]
<i>ipaH</i>	<i>ipaH</i> -F	GACGGACAACAGAATACACTCCATC	59.8	108		Modified from [22]
	<i>ipaH</i> -R	ATGTTCAAAAGCATGCCATATCTGT	59.8			[22]
	<i>ipaH</i> -MGB-p	CGGAAAACAACAATCTGATGT	69		VIC	Modified from [22]

* All probes were conjugated with minor groove binder (MGB) and had a "Black Hole Quencher" at the 3' end

[†] Due to sequence variation in the *lacY* gene of certain EIEC strains, two different *lacY* probes were used to detect all EIEC strains [19]

and sterile PCR grade water (Qiagen, Hilden, Germany) to bring the final volume to 20 µl. Real-time PCR was run in a StepOnePlus machine (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) with the following PCR program: initial activation step of 15 min at 95 °C followed by 30 cycles of denaturation for 60 s at 94 °C and annealing/extension for 60 s at 58 °C. DNA from EIEC O121 was used as template, and a dilution series ranging from 50 ng/µl to 0.5 pg/µl was measured. Triplicates of the dilution series were run,

and PCR efficiencies were calculated as described previously [23].

MLVA typing

All 121 isolates were examined by a 10-loci *E. coli* generic MLVA assay (GECM10) as described by Løbersli et al. [24] and an MLVA specific for *Shigella* spp. as described by Rawal et al. [8].

Table 3. *E. coli* MLVA and *Shigella* MLVA profiles in concordance with the duplex real-time PCR results

<i>E. coli</i> MLVA group*	Pathotype†	Serotype	No. analyzed	Duplex real-time PCR	<i>Shigella</i> MLVA group‡
I	<i>S. boydii</i>	18	1	<i>Shigella</i>	A
	<i>S. dysenteriae</i>	3, 4, and 9	6	<i>Shigella</i>	A/B
	EIEC	ONT [¶]	7	<i>Shigella</i>	A
II	<i>S. boydii</i>	2, 4, 8, 10, 14, and 16	12	<i>Shigella</i>	B
	<i>S. dysenteriae</i>	7	1	<i>Shigella</i>	B
	<i>S. flexneri</i>	6	3	<i>Shigella</i>	B
	EIEC	ONT	27	<i>Shigella</i>	B
III	EIEC[§]	ONT	3	<i>Shigella</i>	C (n = 1)/D
	EIEC	O121 and O124	17	EIEC	C
	EIEC	O164	1	<i>Shigella</i>	C
IV	<i>S. flexneri</i>	1, 2, 3, 4, and x variant	11	<i>Shigella</i>	A/E
	<i>S. sonnei</i>	–	13	<i>Shigella</i>	G
	EIEC	O164	2	EIEC	C
	EIEC	ONT	2	<i>Shigella</i>	E
V	EIEC	O164	1	<i>Shigella</i>	C
	EIEC	ONT	4	EIEC	C/G (n = 1)
VI	<i>S. dysenteriae</i>	2	5	<i>Shigella</i>	F
	EIEC	ONT	3	<i>Shigella</i>	F
Other MLVA profiles not seen in EIEC	<i>S. dysenteriae</i>	1	1	<i>Shigella</i>	G
	<i>S. flexneri</i>	4	1	<i>Shigella</i>	B

*Six main groups of *E. coli* MLVA profiles are defined; each group was given a Roman numeral (I–VI). Within each group, different copy number profiles are seen: I, 4-NA-NA-X-NA-X-X-2-NA-NA; II, 4-2-NA-X-X-X-2-NA-NA; III, 5-2-NA-X-X-X-X-X-NA; IV, 6-NA-NA-X-X-X-X-X-NA; V, 6-2-NA-X-3-X-X-X-NA; and VI, 11-2-NA-9-X-X-5-2-NA-NA. The repeat number of each allele is designated as suggested by ref. [24]; however, absence of PCR product is designated with NA instead of a negative number (–2). X assign the presence of a PCR product; however, different copy numbers of the specific locus exist

†The pathotype was phenotypically determined for *Shigella* spp.; however, for *E. coli*, the pathotype was determined running an 11-plex PCR [21]

‡The MLVA group for *Shigella* spp. is designated by letters (A–F). Seven different MLVA groups were defined: A, X-X-0-5-4-0-0; B, X-5-0-X-X-0-0; C, X-5-5-4-0-0; D, 5-X-5-5-X-0-0; E, X-X-0-5-5-0-X; F, X-X-5-5-3-0-0; and G, X-5-X-5-4-X-0. The allele number of each locus is designated as suggested by ref. [8]. Within each letter variation of MLVA, profiles exist, but each letter has from four to five identical loci. X assigns the presence of a PCR product; however, different allele numbers of the specific locus exist. Absence of PCR product is designated zero (0)

¶ONT: O nontypable

§Bold indicate isolates (7/121, 5.8%) showing disagreement between the real-time PCR method and one or both MLVA assays. In total, 94.2% (114/121) of the strains showed concordance when comparing these molecular methods

Ethical considerations

At the NIPH, all *Shigella* spp. and EIEC strains are routinely collected for disease surveillance and outbreak detection. The current study is descriptive of a bacterial collection and microbiological characteristics are not combined with clinical data. Ethical approval was therefore not required. Also, the Norwegian Act relating to control of communicable diseases (<https://lovdata.no/dokument/NL/lov/1994-08-05-55?q=Smittevernloven>) obliges the NIPH to monitor the *Shigella* spp. and EIEC populations within the country on a regular basis. For these reasons, consent was not obtained from the patients to analyze the bacterial samples for this research project.

Results

Duplex real-time PCR: efficiencies, detection limits, sensitivity, and specificity

The NCBI BLAST search confirmed that the lacY primers were absent in published sequences of *Shigella* spp. but present in *E. coli*. The ipaH primers were exclu-

sively seen in *Shigella* spp. and EIEC. By conventional PCR, both PCR products showed expected base pair sizes and no scatter bands were observed. Sequencing of the PCR products confirmed the correct sequences (data not shown). The PCR efficiencies for lacY primer-probes were 106.3% in singleplex PCR and 93.1% in duplex PCR, whereas the values for ipaH primer-probe were 109.4% and 90.4%, respectively. The detection limit for both genes was 5 pg/ μ l. All *E. coli* isolates, except the majority of the EIEC O164 group and two EIEC O164 isolates, were positive for lacY. On the other hand, the *Shigella* spp., *Salmonella* spp., and *Yersinia* spp. were all negative for this specific gene (Table 1). As expected, ipaH was detected in all EIEC and *Shigella* spp. isolates, but in no other pathogens. Thus, the duplex real-time PCR had a high sensitivity and specificity.

Evaluating the duplex real-time PCR with other typing methods

A 100% (53/53) concordance between phenotypic typing and the duplex real-time PCR was seen for all *Shigella* spp. isolates (Table 1). Similar results were observed for

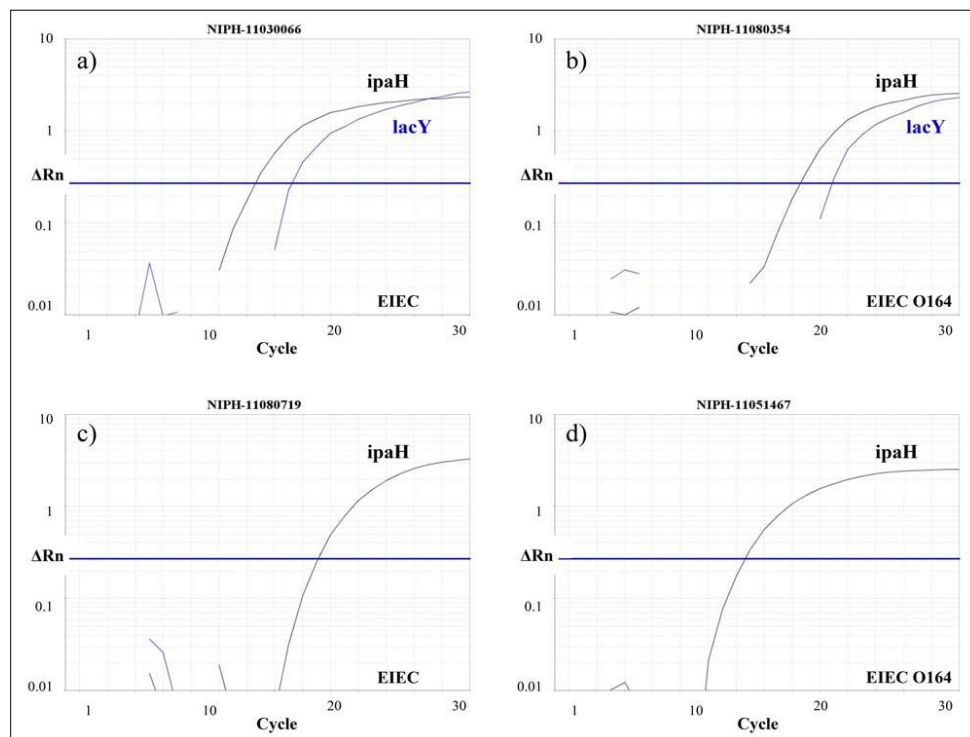


Fig. 1. Four strains phenotypically determined as EIEC O164 were either classified as EIEC (*lacY* positive) or *Shigella* (*lacY* negative) by the real-time PCR. a) NIPH-11030066 and b) NIPH-11080354 carried *lacY* and *ipaH* and were classified as EIEC. However, c) NIPH-11080719 and d) NIPH-11051467 harbored *ipaH* only and, thus, designated *Shigella* by the real-time PCR. Phenotypically, except for the lactose fermentation in NIPH-11080354, they could not be distinguished

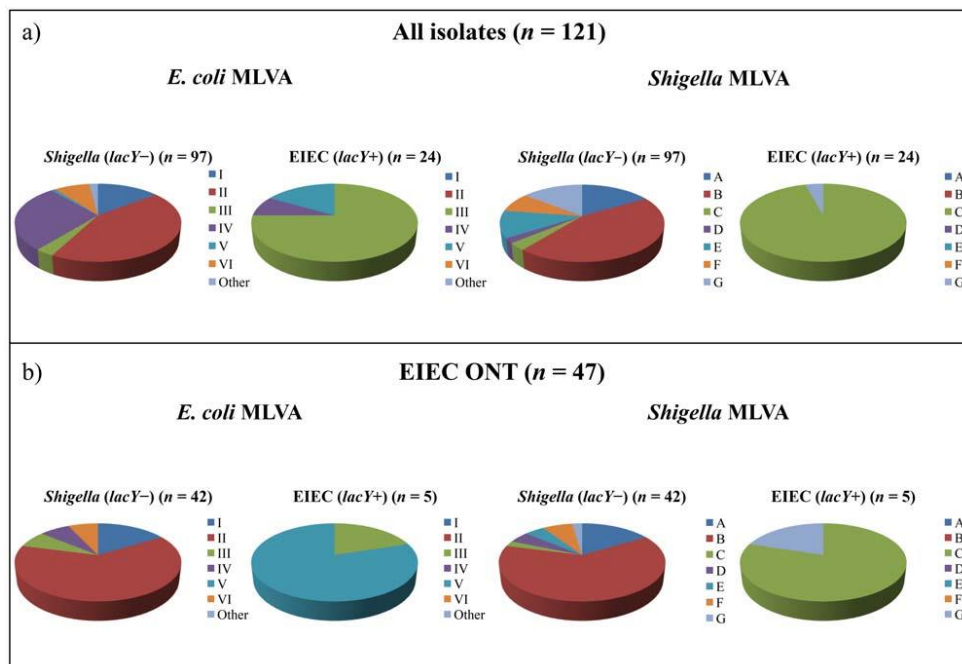


Fig. 2. Generic *E. coli* MLVA and *Shigella* MLVA groups compared with duplex real-time PCR results. a) All *Shigella* spp. and EIEC isolates ($n = 121$) were included. *E. coli* MLVA groups I, II, and VI and *Shigella* MLVA groups A, B, E, and F were exclusively detected in isolates classified as *Shigella* (*lacY*⁻) by real-time PCR. On the other hand, *E. coli* MLVA groups III and V and *Shigella* MLVA group C were preferentially associated with strains classified as EIEC (*lacY*⁺) by the real-time PCR. b) Only EIEC ONT isolates ($n = 47$) were included. Interestingly, a) and b) showed comparable patterns, indicating that the duplex real-time PCR was suited to classify the phenotypically challenging EIEC ONT group

EIEC O121 and O124 (100%, 17/17), whereas only 10.6% (5/47) of the isolates phenotypically determined as EIEC ONT were confirmed as EIEC by duplex real-time PCR. Furthermore, of the four EIEC O164 isolates, two were verified as EIEC (*lacY* positive) and two were identified as *Shigella* (*lacY* negative) (Fig. 1). In total, disagreement between the real-time PCR and the phenotypic typing was observed in 36.4% (44/121) of the isolates examined, and the majority of the discrepant cases was seen within the EIEC ONT group (42/44, 95.5%).

Results from generic *E. coli* MLVA and *Shigella* MLVA showed six main groups of *E. coli* MLVA profiles (I–VI) and seven groups of *Shigella* MLVA profiles (A–G) (Table 3, Fig. 2). *E. coli* MLVA group I included seven *Shigella* spp. and seven EIEC ONT isolates. All these 14 isolates were classified as *Shigella* (*lacY* negative) by the duplex real-time PCR, and they belonged to one of two *Shigella* MLVA groups (A and B). The second *E. coli* group (II) constituted 16 *Shigella* spp. and 27 EIEC ONT. The real-time PCR assay identified all 43 isolates as *Shigella* (*lacY* negative), and they all fell into *Shigella* MLVA group B (Table 3). *E. coli* group III included 17 EIEC with known O groups (15 EIEC O121 and two EIEC O124)

and four isolates phenotypically defined as EIEC ONT. Of these, 18/21 (85.7%) were verified as EIEC (*lacY* positive) by real-time PCR and they belonged to *Shigella* MLVA group C. The three last isolates, all EIEC ONT, were classified as *Shigella* (*lacY* negative) and were assigned to one of two *Shigella* MLVA groups (C or D) (Table 3). Interestingly, these three latter isolates, although not unambiguous, were phenotypically typed as EIEC ONT, but agglutinated with *S. boydii* serotype 9 (2/3) or *S. dysenteriae* serotype 3. The fourth *E. coli* MLVA group (IV) harbored 24 *Shigella* spp., three EIEC O164, and two EIEC ONT isolates. All *Shigella* spp. were verified as *Shigella* (*lacY* negative) by real-time PCR, and they were placed in *Shigella* MLVA groups A, E, or G. However, only two EIEC O164 were confirmed as EIEC (*lacY* positive), whereas the last EIEC O164 was classified as *Shigella* (*lacY* negative). All three EIEC O164 belonged to *Shigella* MLVA group C. Both EIEC ONT were *lacY* negative and clustered within *Shigella* MLVA group A, supporting the real-time PCR results (Table 3). Within *E. coli* MLVA group V, one EIEC O164 and four EIEC ONT were defined. The four EIEC ONT were determined as EIEC (*lacY* positive), and all but one belonged to *Shigella* MLVA group C. Although clus-

tering within *Shigella* MLVA group C, the EIEC O164 isolate was defined as *Shigella* (*lacY* negative) by real-time PCR. The last *E. coli* MLVA group (VI) included eight isolates, five *Shigella*, and three EIEC ONT, all found as *Shigella* (*lacY* negative) by real-time PCR and all belonging to *Shigella* MLVA group F (Table 3). In conclusion, in 94.7% (114/121) of the cases, MLVA profiles both from the generic *E. coli* and *Shigella* assays supported the findings achieved by duplex real-time PCR. *E. coli* MLVA groups I, II, and VI, and *Shigella* MLVA groups A, B, E, and F were exclusively seen in isolates defined as *Shigella* (*lacY* negative) by the real-time PCR. On the other hand, *E. coli* MLVA groups III and V, and *Shigella* MLVA profile C, were associated with isolates defined as EIEC (*lacY* positive). Overall, a discrepancy between the real-time PCR and the MLVA assays was seen for the O164 EIEC group ($n = 4$) and in three EIEC ONT isolates (Table 3). Repeated biochemical analyses of the four EIEC O164 isolates showed that one of two was verified as EIEC (*lacY* positive) by real-time PCR fermented lactose, whereas no other biochemical differences among the isolates were revealed. All four EIEC O164 agglutinated weakly in monovalent antiserum against *S. dysenteriae* serotype 3. Of the 47 EIEC ONT examined, only five were defined as EIEC (*lacY* positive) by real-time PCR. All five showed *E. coli* MLVA profiles belonging to group III or V, and all but one clustered within *Shigella* MLVA group C, supporting the finding of these isolates as EIEC (Fig. 2). Moreover, 39/42 (92.9%) EIEC ONT defined as *Shigella* (*lacY* negative) showed MLVA profiles associated with *Shigella* spp., indicating that the real-time PCR classification was correct (Table 3 and Fig. 2).

Discussion

Discrimination of *Shigella* spp. from EIEC has been challenging using phenotypical typing methods and molecular typing techniques [16–19, 25]. However, due to clinical differences between *Shigella* spp. and EIEC and also from an epidemiological point of view, discriminating the two is essential [13, 14, 19, 26]. The *lac* operon, responsible for fermentation of lactose, consists of three functional genes; *lacZ*, *lacY*, and *lacA*. *Shigella* spp. do not ferment lactose or do so slowly due to *lacY* deficiency or presence of a *lacY* pseudogene [10, 15]. Although *S. sonnei* and *S. dysenteriae* serotype 1 carry the *lacY* pseudogene [10, 15], this is not detected by our *lacY* primers since no match was observed during the NCBI BLAST search and no positive results were seen in the *S. sonnei* and *S. dysenteriae* serotype 1 isolates examined. This is in concordance with previous reports demonstrating the absence of *lacY* in *Shigella* spp. [19, 27]. Thus, it is tempting to speculate that the structural changes at the 5' end of the *lacY* pseudogene described in *S. sonnei* and *S. dysenteriae* serotype 1 inhibited binding of the *lacY* primers [28]. Considering EIEC, previous studies have suggested the presence of *lacY* in this bacterium [19, 29]. A probe

based real-time PCR assay detecting all known variants of *lacY*, using *uidA* (encoding the β -glucuronidase) as an internal amplification control, has previously been developed and shown to differentiate *Shigella* spp. from EIEC [19]. In the current study, this assay was established but with some modifications. Surprisingly, 25% (3/12) of the strains initially examined (1 EIEC O164, 1 EIEC ONT, and 1 *S. boydii* serotype 13) did not amplify *uidA* using these *uidA* primers (data not shown). Thus, *uidA* was replaced by *ipaH*, a gene known to be present in all *Shigella* spp. and EIEC isolates [13]. Additionally, to ensure the specificity of the *lacY* and *ipaH* probes, these were redesigned to MGB format [30]. In the study by Pavlovic et al. [19], only 11 EIEC and 18 *Shigella* spp. were examined and they did not include more than two uncharacterized *Shigella* spp. [19]. The latter group, defined as EIEC ONT in our study, is the most challenging and cumbersome in a phenotypical diagnostic perspective. Therefore, a molecular method rapidly classifying these isolates as either *Shigella* or EIEC was sought. In the present study, as many as 47 EIEC ONT strains were examined. Interestingly, most of these strains were detected as *Shigella* by the duplex real-time PCR, and the two MLVA assays supported our findings in the majority of the cases. This indicated that the real-time PCR was able to classify the challenging EIEC ONT group. However, for three EIEC ONT isolates typed as *Shigella* by real-time PCR, the MLVA assays disagreed with this classification. Interestingly, these three EIEC ONT isolates agglutinated with *Shigella* antisera. Nonetheless, they were phenotypically defined as EIEC due to biochemical characteristics [31]. It has been suggested that EIEC is an intermediate stage between noninvasive *E. coli* and *Shigella* [11, 14]. These EIEC ONT isolates might be precursors of “full-blown” *Shigella* and, thus, were either classified as *Shigella* or EIEC depending on the characteristics examined. Furthermore, the EIEC O164 group was not unambiguously classified molecularly, although being so by phenotypical typing. It is well known that some EIEC O antigens are identical to O antigens present in *Shigella* spp., and this complicates serological differentiation [11, 14, 32]. Cross-reactivity between O-antigens from EIEC O164 and *S. dysenteriae* serotype 3 has been described [32, 33], an observation also detected in our study. Therefore, based on the present knowledge, we cannot conclude on the molecular classification of the EIEC O164 group. Whole genome sequencing of the EIEC O164 strains, as well as the three EIEC ONT strains, is in progress and will hopefully help us understand the discrepancies observed.

Culture-independent assays for detecting gastrointestinal pathogens at clinical microbiological laboratories are increasingly used. These multiplex PCR assays particularly focus on *ipaH* and, therefore, do not distinguish *Shigella* spp. from EIEC. Hence, after isolation of *ipaH* positive bacteria, the herein described real-time PCR will be an important supplement for fast and reliable molecular differentiation of these two entities.

Conclusion

A high correlation between the real-time PCR method, the two MLVA assays (generic *E. coli* MLVA and *Shigella* MLVA), and phenotypical typing was achieved. This indicated that the real-time PCR was well suited for discriminating *Shigella* spp. from EIEC and especially fruitful for the challenging EIEC ONT group. Phenotypical typing methods distinguishing *Shigella* spp. from EIEC are labor intensive and sometimes nonconclusive. Thus, implementing the herein described real-time PCR method is advantageous for a fast and reliable discrimination between *Shigella* spp. and EIEC.

Acknowledgements

We would like to thank all medical microbiological laboratories in Norway for isolating *Shigella* spp. and EIEC from patient samples and forwarding the isolates to the NIPH for further characterization. Additionally, Anne Marie Sørgaard and Marit Hindrum at NIPH are gratefully acknowledged for skillful technical assistance.

Declaration of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Hale TL: Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiol Rev* 55, 206–224 (1991)
- Lima IF, Havt A, Lima AA: Update on molecular epidemiology of *Shigella* infection. *Curr Opin Gastroenterol* 31, 30–37 (2015)
- Nyholm O, Lienemann T, Halkilahti J, Mero S, Rimhanen-Finne R, Lehtinen V, Salmenlinna S, Siitonen A: Characterization of *Shigella sonnei* isolate carrying Shiga toxin 2-producing gene. *Emerg Infect Dis* 21, 891–892 (2015)
- Ojha SC, Yean Yean C, Ismail A, Singh KK: A pentaplex PCR assay for the detection and differentiation of *Shigella* species. *Biomed Res Int* 2013, 412370 (2013)
- Kapperud G, Rorvik LM, Hasseltvedt V, Hoiby EA, Iversen BG, Staveland K, Johnsen G, Leitao J, Herikstad H, Andersson Y, et al.: Outbreak of *Shigella sonnei* infection traced to imported iceberg lettuce. *J Clin Microbiol* 33, 609–614 (1995)
- Guzman-Herrador B, Vold L, Comelli H, MacDonald E, Heier BT, Wester AL, Stavnes TL, Jensvoll L, Lindegard Aanstad A, Severinsen G, Aasgaard Grini J, Werner Johansen O, Cudjoe K, Nygard K: Outbreak of *Shigella sonnei* infection in Norway linked to consumption of fresh basil, October 2011. *Euro Surveill* 16 (2011)
- Heier BT, Nygard K, Kapperud G, Lindstedt BA, Johannessen GS, Blekkan H: *Shigella sonnei* infections in Norway associated with sugar peas, May–June 2009. *Euro Surveill* 14, (2009)
- Rawal M, Hoff E, Aas-Pedersen L, Haugum K, Lindstedt BA: Rapid multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Shigella* spp. using multicolour capillary electrophoresis. *J Microbiol Methods* 83, 279–285 (2010)
- Levine MM: *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 155, 377–389 (1987)
- Yang F, Yang J, Zhang X, Chen L, Jiang Y, Yan Y, Tang X, Wang J, Xiong Z, Dong J, Xue Y, Zhu Y, Xu X, Sun L, Chen S, Nie H, Peng J, Xu J, Wang Y, Yuan Z, Wen Y, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Hou Y, Yu J, Jin Q: Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Nucleic Acids Res* 33, 6445–6458 (2005)
- Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB, Reeves PR: Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect Immun* 72, 5080–5088 (2004)
- Fukiya S, Mizoguchi H, Tobe T, Mori H: Extensive genomic diversity in pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains revealed by comparative genomic hybridization microarray. *J Bacteriol* 186, 3911–3921 (2004)
- van den Beld MJ, Reubsæet FA: Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and non-invasive *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 899–904 (2012)
- Ud-Din A, Wahid S: Relationship among *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation. *Braz J Microbiol* 45, 1131–1138 (2014)
- Ito H, Kido N, Arakawa Y, Ohta M, Sugiyama T, Kato N: Possible mechanisms underlying the slow lactose fermentation phenotype in *Shigella* spp. *Appl Environ Microbiol* 57, 2912–2917 (1991)
- Hsu BM, Wu SF, Huang SW, Tseng YJ, Ji DD, Chen JS, Shih FC: Differentiation and identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* in environmental waters by a molecular method and biochemical test. *Water Res* 44, 949–955 (2010)
- Kingombe CI, Cerqueira-Campos ML, Farber JM: Molecular strategies for the detection, identification, and differentiation between enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Food Prot* 68, 239–245 (2005)
- Zhao J, Kang L, Hu R, Gao S, Xin W, Chen W, Wang J: Rapid oligonucleotide suspension array-based multiplex detection of bacterial pathogens. *Foodborne Pathog Dis* 10, 896–903 (2013)
- Pavlovic M, Luze A, Konrad R, Berger A, Sing A, Busch U, Huber I: Development of a duplex real-time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella* spp. *J Appl Microbiol* 110, 1245–1251 (2011)
- Jorgensen HJ, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter S, Warnock DW (2015): *Manual of Clinical Microbiology*, vol. 1, 11th Edition, ASM Press, Washington.
- Brandal LT, Wester AL, Lange H, Løbersli I, Lindstedt BA, Vold L, Kapperud G: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Norway, 1992–2012: characterization of isolates and identification of risk factors for haemolytic uremic syndrome. *BMC Infect Dis* 15, 324 (2015)
- Barletta F, Mercado EH, Lluque A, Ruiz J, Cleary TG, Ochoa TJ: Multiplex real-time PCR for detection of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Shigella*. *J Clin Microbiol* 51, 2822–2829 (2013)

23. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45 (2001)
24. Lobersli I, Haugum K, Lindstedt BA: Rapid and high resolution genotyping of all *Escherichia coli* serotypes using 10 genomic repeat-containing loci. *J Microbiol Methods* 88, 134–139 (2012)
25. Sahl JW, Morris CR, Emberger J, Fraser CM, Ochieng JB, Juma J, Fields B, Breiman RF, Gilmour M, Nataro JP, Rasko DA: Defining the phylogenomics of *Shigella* species: a pathway to diagnostics. *J Clin Microbiol* 53, 951–960 (2015)
26. Johnson JR: *Shigella* and *Escherichia coli* at the crossroads: machiavellian masqueraders or taxonomic treachery? *J Med Microbiol* 49, 583–585 (2000)
27. Horakova K, Mlejnkova H, Mlejnek P: Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease, beta-D-glucuronidase, and beta-D-galactosidase. *J Appl Microbiol* 105, 970–976 (2008)
28. Denamur E, Picard B, Tenaillon O (2010). In: *Bacterial Population Genetics in Infectious Disease*, eds. Robinson DA, Feil EJ, Falush D, Wiley–Blackwell, Hoboken, pp. 269–286
29. Leonard SR, Lacher DW, Lampel KA: Draft Genome sequences of the enteroinvasive *Escherichia coli* strains M4163 and 4608-58. *Genome Announc* 3, (2015)
30. Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J: 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 28, 655–661 (2000)
31. Rezwani F, Lan R, Reeves PR: Molecular basis of the indole-negative reaction in *Shigella* strains: extensive damages to the tna operon by insertion sequences. *J Bacteriol* 186, 7460–7465 (2004)
32. Cheasty T, Rowe B: Antigenic relationships between the enteroinvasive *Escherichia coli* O antigens O28ac, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, and O164 and *Shigella* O antigens. *J Clin Microbiol* 17, 681–684 (1983)
33. Linnerborg M, Weintraub A, Widmalm G: Structural studies of the O-antigen polysaccharide from the enteroinvasive *Escherichia coli* O164 cross-reacting with *Shigella dysenteriae* type 3. *Eur J Biochem* 266, 460–466 (1999)

LightCycler[®] 480 Probes Master

y Version: 10

Content version:

September 2016 Ready-to-use hot start reaction mix for PCR using the LightCycler[®]
480 System

Cat. No. 04 707 494 001	5 x 1 ml 5 x 100 reactions of 20 µl final volume each
Cat. No. 04 887 301 001	10 x 5 ml 10 x 500 reactions of 20 µl final volume each
Cat. No. 04 902 343 001	1 x 50 ml 5,000 reactions of 20 µl final volume each

Store the kit at -15 to -25°C.

1. General Information	3
1.1.Contents.....	3
1.2. Storage and Stability.....	3
Storage Conditions (Product)	3
1.3. Additional Equipment and Reagents Required ..	3
1.4. Application	4
1.5. Preparation Time	4
Assay Time	4
2. How to Use this Product	5
2.1. Before you Begin	5
Sample Materials	5
Control Reactions	5
Primers	5
Probe	5
Mg ²⁺ Concentration	5
General Considerations	5
Two-Step RT-PCR	6
2.2. Protocols	6
LightCycler® 480 Instrument Protocol	6
Preparation of the PCR Mix	9
Color Compensation	9
2.3. Other Parameters	10
Prevention of Carryover Contamination	10
3. Results	11
Troubleshooting	12
Additional Information on this Product	14
5.1. Test Principle	14
5.2. References	14

5.3. Quality Control	14
6. Supplementary Information	15
6.1. Conventions	15
6.2. Changes to previous version	15
6.3. Ordering Information	15
6.4. Trademarks	17
6.5. License Disclaimer	17
6.6. Regulatory Disclaimer	17
6.7. Safety Data Sheet	17
6.8. Contact and Support	17
1. General Information	

1. General Information

1.1. Contents


Vial / Bottle	Cap	Label	Function/Description	Catalog Number	Content
1	red	LightCycler® 480 Probes Master, 2x conc.	<ul style="list-style-type: none"> • Ready-to-use hot start PCR mix • Contains FastStart Taq DNA Polymerase, reaction buffer, dNTP mix (with dUTP instead of dTTP), and 6.4 mM MgCl₂ 	04 707 494 001	5 vials, 1 ml each
				04 887 301 001	10 vials, 5 ml each
				04 902 343 001	1 vial, 50 ml
2	colorless	LightCycler® 480 Probes Master, Water, PCR Grade	To adjust the final reaction volume	04 707 494 001	5 vials, 1 ml each
				04 887 301 001	2 vials, 25 ml each
				04 902 343 001	2 vials, 25 ml each

1.2. Storage and Stability

Storage Conditions (Product)

The kit is shipped on dry ice.

- When stored at –15 to –25°C, the kit is stable through the expiration date printe
- Once the kit is opened, store the kit components as described in the followin

Vial / Bottle	Cap	Label	Storage
1	red	Master, 2x conc.	Store at –15 to –25°C.  Avoid repeated freezing and thawing! After first thawing, the master may be stored for up to 4 weeks at +2 to +8°C.
2	colorless	Water, PCR Grade	Store at –15 to –25°C.

1.3. Additional Equipment and Reagents Required

Additional reagents and equipment required to perform PCR with the LightCycler® 480 Probes Master include:

- LightCycler® 480 Instrument II*
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 384* or LightCycler® 480 Multiwell Plate 96*
- LightCycler® 8-Tube Strip Adapter Plate*
- LightCycler® 8-Tube Strips*
- Standard swinging-bucket centrifuge containing a rotor for multiwell plates with suitable adaptors
- LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase* (optional⁽¹⁾)
- Nuclease free, aerosol-resistant pipette tips
- Pipettes with disposable, positive-displacement tips

- Sterile 1.5 ml reaction tubes for preparing master mixes and dilutions

⁽¹⁾ For prevention of carryover contamination, please refer to the corresponding chapter.

1. General Information

1.4. Application

LightCycler®

480 Probes Master is designed for research studies on the LightCycler® 480 System. The LightCycler® 480 Probes Master is a ready-to-use hot start reaction mix designed specifically for detecting DNA targets with hydrolysis probes during LightCycler® 480 System PCR. However, it may be used in other types of PCR on the LightCycler® 480 System. For best results, use this master mix with LightCycler® 480 Multiwell Plates. The kit can also help prevent carryover contamination during PCR (when used with LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase*) or to perform the second step of a two-step RT-PCR.

1.5. Preparation Time

Assay Time

The assay time is variable, depending on the number of cycles and the annealing time.

For example, for a cycling program of 40 cycles and an annealing time of 20 seconds, the LightCycler® 480 PCR run will require about 45 minutes, including 5 minutes pre-incubation time.

2. How to Use this Product

2.1. Before you Begin

Sample Materials

- Use any template DNA (e.g., genomic or plasmid DNA, cDNA) suitable for PCR, as long as it is sufficiently pure, concentrated, and free of PCR inhibitors.

⚠ For reproducible isolation of nucleic acids, we recommend:

- Either a MagNA Pure System together with a dedicated MagNA Pure nucleic acid isolation kit (for automated isolation)
- or a High Pure nucleic acid isolation kit (for manual isolation).

For details, see the Roche Life Science homepage, www.lifescience.roche.com.

- Use up to 500 ng complex genomic DNA or up to 10^{10} copies plasmid DNA for a reaction volume of 20 μ l. For larger volumes, the amount of template can be increased equivalently.

i *When using unpurified cDNA from a reverse transcription reaction, especially when it contains high concentrations of RNA and oligonucleotides, you can improve your results by using 2 μ l (or less) of that sample in the reaction and performing a 10-minute pre-incubation at +95°C. This will result in lower crossing point (Cp) values with a decreased standard deviation.*

Control Reactions

Always run a negative control with the samples. To prepare a negative control:

- Replace the template DNA with Water, PCR Grade PCR (Vial 2). This will reveal whether a contamination problem exists.
- For a two-step RT-PCR setup, omit the addition of reverse transcriptase to the cDNA synthesis reaction; this will indicate whether DNA in RNA samples causes false-positive results.

Primers

Use PCR primers at a final concentration of 0.3 to 1 μ M. The recommended starting concentration is 0.5 μ M each.

⚠ Optimize the primer concentration before optimizing the probe concentration.

i *The optimal primer concentration is the lowest concentration that results in the lowest Cp and an adequate fluorescence for a given target concentration.*

Probe

Use hydrolysis probes at a final concentration of 0.05 to 0.2 μ M.

i *The optimal probe concentration is the lowest concentration that results in the lowest Cp and an adequate fluorescence for a given target concentration.*

⚠ For a digestible hybridization complex to form correctly, the hydrolysis probe must anneal to the target before primer extension. The Tm of the probe should be only slightly higher than the Tm of the PCR primer, so the hybridization complex is stable. The probe sequence must also take into account mismatches in the DNA template, as these will also affect the annealing temperature.

Mg²⁺ Concentration

The composition of the reaction mix in this kit already contains an optimal concentration of MgCl₂ which works with nearly all primer combinations.

i *You do not need to adjust the MgCl₂ concentration to amplify different sequences.*

General Considerations

Two-Step RT-PCR

The LightCycler® 480 Probes Master can also be used to perform the second step of a two-step RT-PCR. In two-step

RT-PCR, the first step, reverse transcription of RNA into cDNA, is performed outside the LightCycler® 480 System. Subsequent amplification and online monitoring is performed according to the LightCycler® 480 System standard procedure, using cDNA as starting sample material.

i One of the following reagents is required for reverse transcription of RNA into cDNA (see Ordering Information for details):

- Transcriptor Reverse Transcriptase*
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit*

Synthesis of cDNA is performed according to the detailed instructions provided with the cDNA synthesis reagent. **⚠** For initial experiments, we recommend running undiluted, 1:10 diluted, and 1:100 diluted cDNA template in parallel to determine the optimum template amount. If you use undiluted cDNA as template, we recommend to extend the pre-incubation time to 10 minutes.

In principle, the LightCycler® 480 PCR Master Probes can be used to amplify and detect any DNA or cDNA target. However, you would need to adapt your detection protocol to the reaction conditions of the LightCycler® 480 Instrument, and design specific PCR primers and probes for each target. See the LightCycler® 480 Operator's Manual for general recommendations.

- **The amplicon should not exceed 1,000 bp in length. For optimal results, select a product length of 500 bp or less.**
- **The performance of the kit described in this Instructions for Use is warranted only when it is used with the LightCycler® 480 System.**

Other assay formats may also be adapted to real-time PCR on the LightCycler® 480 Instrument. For example, probe formats that may be adapted to the LightCycler® 480 Instrument in addition to hydrolysis probes include FRET hybridization probes, Molecular Beacons, and Scorpions. However, any fluorescent dyes used in a LightCycler® 480 analysis must be compatible with the optical unit of the LightCycler® 480 Instrument.

2.2. Protocols

LightCycler® 480 Instrument Protocol

The following procedure is optimized for use with the LightCycler® 480 System.

- **If the instruments type is not stated, "LightCycler® 480 Instrument" stands for LightCycler® 480 Instrument I and II.**
- **Program the LightCycler® 480 Instrument before preparing the reaction mixes.**

A LightCycler® 480 Instrument protocol that uses the LightCycler® 480 Probes Master should contain the following programs:

- **Pre-Incubation** for activation of FastStart Taq DNA Polymerase and denaturation of the DNA.
- Amplification of the target DNA.
- **Cooling** of the thermal block.

For details on how to program the experimental protocol, see the LightCycler® 480 Operator's Manual.

A) Protocol for use with the LightCycler® 480 Multiwell Plate 96

The following table shows the PCR parameters that must be programmed for a LightCycler® 480 System PCR run with the LightCycler® 480 Probes Master using a LightCycler® 480 Multiwell Plate 96.

Setup		
Block Type	Reaction Volume [µl]	
96	10 – 100	
Detection Format	Excitation Filter	Emission Filter

Mono Color Hydrolysis Probe / UPL Probe:

Melting Factor	1
Quantification Factor	10
Integration Time	2

Programs		
Program Name	Cycles	Analysis Mode
Pre-Incubation	1	None
Amplification	45 ⁽¹⁾	Quantification
Cooling	1	None

Temperature Targets					
	Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp Rate [°C/s]	Acquisitions [per °C]
FAM		465		510	

or for example:

3 Color Hydrolysis Probe:

FAM		465		510	
VIC/Hex/Yellow 555		533		580	
Cy5/Cy5.5		618		660	

For new customized detection formats (hydrolysis probes), set for all selected filters in the "Selected Filter Combination

		None			
			00:10:00 ⁽²⁾		
Amplification	95	None	00:00:10	4.4 (or 2.0) ⁽³⁾	
List" (under Tools), the following values:					
Pre-Incubation	95		00:00:05 –	4.4 (or 2.0) ⁽³⁾	–
					–
		primer None	00:00:15 – 2.2 (Target °C – dependent ⁽⁴⁾	00:50:00 ⁽⁵⁾ ≥50°C	
				1.5 (Target °C <50°C) ⁽⁶⁾	
	72	Single	00:00:01	4.4 (or 2.0) ⁽³⁾	–
Cooling	40	None	00:00:10	1.5	–

B) Protocol for use with LightCycler® 480 Multiwell Plate 384

The following table shows the PCR parameters that must be programmed for a LightCycler® 480 System PCR Run with the LightCycler® 480 PCR Probes Master and hydrolysis probes using a LightCycler® 480 Multiwell Plate 384.

Setup		
Block Type	Reaction Volume [μ l]	
384	3 – 20	
Detection Format	Excitation Filter	Emission Filter
Mono Color Hydrolysis Probe / UPL Probe:		
FAM	465	510
or for example:		
3 Color Hydrolysis Probe:		
FAM	465	510
VIC/Hex/Yellow 555	533	580
Cy5/Cy5.5	618	660

For new customized detection formats (hydrolysis probes), set for all selected filters in the “Selected Filter Combination List” (under Tools), the following values:


Melting Factor	1				
Quantification Factor	10				
Integration Time	2				
Programs					
Program Name	Cycles	Analysis Mode			
Pre-Incubation	1	None			
Amplification	45 ⁽¹⁾	Quantification			
Cooling	1	None			
Temperature Targets					
	Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp Rate [°C/s]	Acquisitions [per °C]
Pre-Incubation	95		00:00:05 –	4.8	–
		None	00:10:00 ⁽²⁾		
	95	None	00:00:10	4.8	–
	primer dependent ⁽⁴⁾	None	00:00:15 – 00:30:00 ⁽⁵⁾	2.5 (Target °C ≥50°C) 2.0 (Target °C <50°C) ⁽⁶⁾	–
	72	Single	00:00:01	4.8	–
Cooling	40	None	00:00:10	2.0	–

Amplification

- ⁽¹⁾ 45 cycles are suitable for most assays. If the assay is optimized and has steep amplification curves and early crossing points (even when target concentrations are low), 40 cycles should be sufficient. Reducing the number of cycles will reduce the time required for the assay.
- ⁽²⁾ If high polymerase activity is required in early cycles, you can sometimes improve results by extending the pre-incubation to 10 minutes. This is especially recommended for higher reaction volumes and when working with unpurified cDNA samples as template. Do not use more than 2 µl unpurified cDNA sample.
- ⁽³⁾ A ramp rate of 2.0°C/s is recommended for reaction volumes of 50 µl or higher.
- ⁽⁴⁾ For initial experiments, set the target temperature (i.e., the primer annealing temperature) 5°C below the calculated primer T_m.
- ⁽⁵⁾ For greater precision in target quantification experiments, it can be advantageous (in some cases) to choose longer annealing and extension times for the amplification cycles. This is especially recommended for higher reaction volumes.
- ⁽⁶⁾ For users of LightCycler® 480 Software 1.1: (From LightCycler® 480 Software 1.2 on, the Cooling Ramp Rate can be set to maximum.)
- For the 96-
multiwell plate: For target temperatures of 50°C and above, set the Ramp Rate for Cooling to 2.2°C/s. For target temperatures below 50°C, set the Ramp Rate to 1.5°C/s.
 - For the 384-
multiwell plate: For target temperatures of 50°C and above, set the Ramp Rate for Cooling to 2.5°C/s. For target temperatures below 50°C, set the Ramp Rate to 2.0°C/s.

Preparation of the PCR Mix

Follow the procedure below to prepare one 20 µl standard reaction.

 **Do not touch the surface of the the LightCycler® 480 Multiwell Plate and Multiwell Sealing Foil when *handling them*. Always wear gloves during handling.**

- Thaw the LightCycler® 480 Probes Master (Vial 1) and Water (Vial 2) and, to ensure recovery of all the contents, briefly spin vials in a microcentrifuge before opening.
 - Mix carefully by pipetting up and down and store on ice.

— Prepare a 10x conc. solution that contains PCR primers and hydrolysis probe.

5 In a 1.5 ml reaction tube on ice, prepare the PCR mix for one 20 µl reaction by adding the following components in the order listed below:

Reagent	Volume
Water, PCR Grade (Vial 2)	3 µl
Primer-probe mix ⁽¹⁾ , 10x conc.	2 µl
LightCycler® 480 Probes Master (2x conc.) (Vial 1)	10 µl
Total volume	15 µl

⁽¹⁾ Due to possible primer/primer interactions that occur during storage, it may be necessary to preheat the PCR primer-probe mix for 1 min at 95°C before starting the reaction. This extra step will ensure optimum sensitivity. *To prepare the PCR Mix for more than one reaction, multiply the amount in the "Volume" column above by z, where z = the number of reactions to be run + two additional reactions.*

Mix carefully by pipetting up and down. Do not vortex.

- Pipette 15 µl PCR mix into each well of the LightCycler® 480 Multiwell Plate.
- Add 5 µl of the DNA template.
- Seal Multiwell Plate with the LightCycler® 480 Sealing Foil*.

6 Place the Multiwell Plate in the centrifuge and balance it with a suitable counterweight (e.g., another Multiwell Plate).
– Centrifuge for 2 min at 1500 × g in a standard swinging-bucket centrifuge, containing a rotor for multiwell plates with suitable adaptors.

6 Load the Multiwell Plate into the LightCycler® 480 Instrument.

7 Start the PCR program described above.

⚠ *If you use reaction volumes different from 20 µl, be sure to adapt the right volume in the running protocol. As a starting condition, we recommend to use the same hold times as for the 20 µl volume.*

Color Compensation


For information on generating and using a color compensation file, see the LightCycler® 480 Operator's Manual.


2.3. Other Parameters

Prevention of Carryover Contamination

Uracil DNA N-Glycosylase (UNG) can help prevent carryover contamination in PCR. The prevention technique involves incorporating deoxyuridine triphosphate (dUTP, a component of the Master Mix in this kit) into amplification products, then pretreating later PCR mixtures with UNG. If a dUTP-containing contaminant is present in the later PCRs, it will be

cleaved by a combination of the UNG and the high temperatures of the pre-incubation step; it will not serve as a PCR template.

 *Since your target DNA template contains thymidine rather than uridine, it is not affected by this procedure.*

 **To ensure optimum results in carryover prevention reactions with the LightCycler® 480 Probes Master, always use LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase*. Follow the instructions in the Instructions for Use for the enzyme.**

3. Results

3. Results

The following amplification curves were obtained by using the LightCycler® 480 Probes Master. The fluorescence values versus cycle number are displayed.

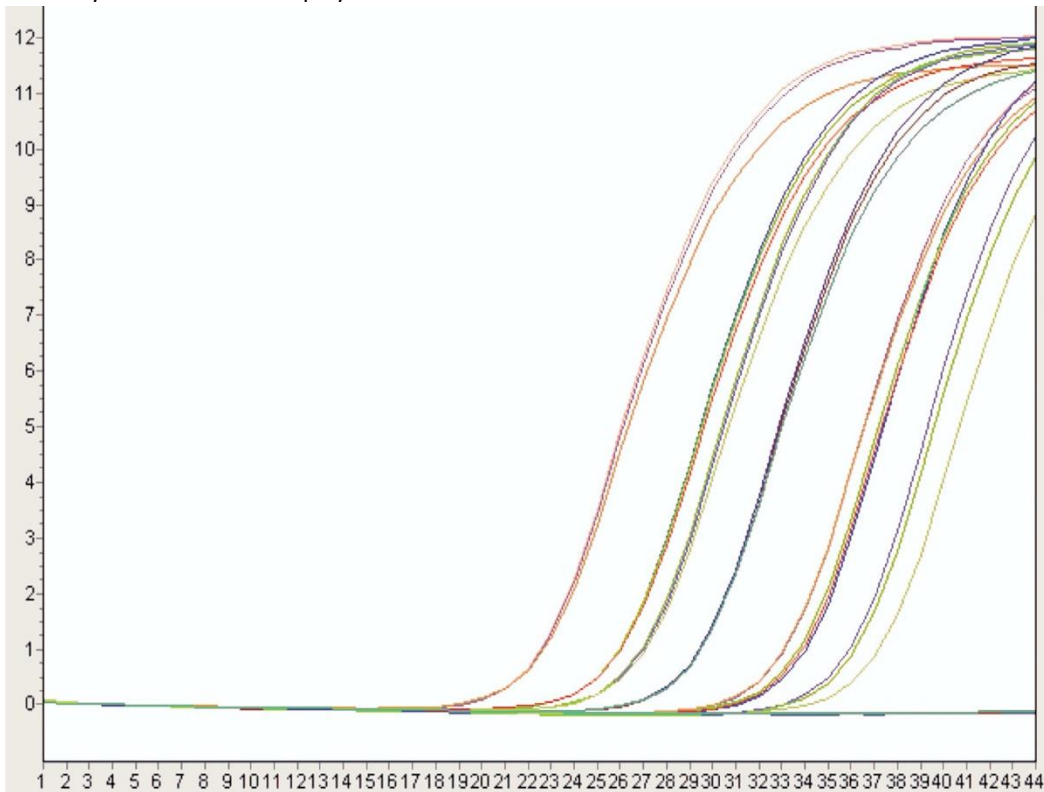


Fig. 1: Amplification curves were obtained from serial dilutions (triplicates) of 1 (far right), 10, 50 100, 1,000, 5,000, 10,000, and 100,000 (far left) copies Cytochrome P450 2C9 transcript per well. A specific set of primers and a FAM/ TAMRA-labeled hydrolysis probe that recognizes a 196-bp fragment of the Cytochrome P450 2C9 gene was used.

4. Troubleshooting

4. Troubleshooting

Observation	Possible cause	Recommendation
Amplification curves reach plateau phase before continue automatically.	Starting amount of nucleic acid is very high.	Stop the cycling program by clicking the <i>End Program</i> button. The next cycle program will cycling is complete.
	The number of cycles is too high.	program.
Reduce the number of cycles in the cycling Log-linear phase of amplification just starts as	The number of cycles is too low.	While cycling is still going on, use the <i>Add 10 Cycles</i> button to increase the number of cycles.
the cycling program ends.		Increase the number of cycles in the cycling program. Use more starting material. Optimize PCR conditions (primer/probe design, protocol).

No amplification display	Wrong filter combination was used to display amplification on screen.	Select appropriate filter combination for your detectable assay on the analysis screen and start again.
	Wrong detection format was chosen for experimental protocol.	Select appropriate detection format for your assay and start again.
Impure sample material inhibits reaction.		Try a 1:10 dilution of your sample. Purify the nucleic acids from your sample material to ensure removal of inhibitory agents.
	FastStart Taq DNA Polymerase is not presufficiently activated.	Make sure PCR protocol includes an incubation step (95°C for 5 – 10 minutes). Make sure denaturation time during amplification is at least 10 seconds.
	Pipetting errors or omitted reagents.	Check for missing or defective reagents.
	Amplicon length is >1 kb.	Do not design primers that produce amplicons >1 kb, as they are inefficiently amplified. Optimal results are obtained with amplicons <500 bp.
	Difficult template, for example, unusual GC-rich sequence.	Optimize temperatures and times used for the amplification cycles. Optimize primer/probe sequences. Repeat PCR but add increasing amounts of DMSO. Use as much as 10% DMSO in the reaction.
Fluorescence intensity varies.	Some of the reagent is still in the upper part of the microwell, or an air bubble is trapped in the microwell.	Repeat centrifugation, but allow sufficient centrifugation time (e.g., 2 minutes at 1,500 × g) for all reagent to reach the bottom of the microwell and/or to expel air bubbles.
	Skin oils or dirt on the surface of the microwell.	Always wear gloves when handling the Multiwell Plate.

4. Troubleshooting

Observation	Possible cause	Recommendation
Fluorescence intensity is very low.	Low concentration or deterioration of dyes in the reaction mixtures because dye was not stored properly.	Keep dye-labeled reagents away from light. Store the reagents at –15 to –25°C and avoid repeated freezing and thawing.
	Poor PCR efficiency (reaction)	Check concentrations of reagents and probes.

	conditions not optimized). Chosen imaging time is too low.	Optimize protocol. Choose adequate Roche Detection Format in combination with “dynamic” detection mode.
		Increase imaging time when using “manual” detection mode. For details, see the LightCycler® 480 Operator’s Manual.
Negative control sample gives a positive signal.	Contamination	Remake all critical solutions. Pipette reagents on a clean bench.
		Use UNG to eliminate carryover contamination.
High background.	Fluorescence signals are very low, therefore the background seems relatively high.	Follow general strategies for optimizing PCR runs in the LightCycler® 480 System.
	Probe quality is poor.	Prepare a new probe solution.
High standard deviation of crossing point (Cp) values.	Impure, heterogenous DNA template.	Increase pre-incubation time to 10 minutes. Use a maximum of 2 µl unpurified cDNA sample.

Additional Information on this Product

5. Additional Information on this Product

5.1. Test Principle

LightCycler® 480 Probes Master is a ready-to-use reaction mix specifically developed for the hydrolysis probe detection format in multiwell plates on the

LightCycler® 480 Instrument. It contains FastStart Taq DNA Polymerase for hot start PCR, which significantly improves the specificity and sensitivity of PCR by minimizing the formation of nonspecific amplification products (Chou, Q. et al., 1992, Kellogg, D.E. et al., 1994, and Birch, D.E., 1996).

FastStart Taq DNA Polymerase is a chemically modified form of thermostable recombinant Taq DNA Polymerase that shows no activity up to 75°C. The enzyme is active only at high temperatures, where primers no longer bind nonspecifically. The enzyme is completely activated (by removal of blocking groups) in a single pre-incubation step (95°C, 5–10 minutes) before cycling begins. Activation does not require the extra handling steps typical of other hot start techniques.

Sequence-specific detection of PCR products relies on sequence-specific oligonucleotide probes that are coupled to fluorophores. These probes hybridize to their complementary sequence in target PCR products. Probe chemistries that are suitable for use in the LightCycler® 480 Instrument include single-labeled probes, hybridization probes, and hydrolysis probes. Hybridization and hydrolysis probe chemistries use the so-called FRET principle. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) is based on the transfer of energy from one fluorophore (the donor or reporter) to another adjacent fluorophore (the acceptor or quencher).

Hydrolysis probe assays can technically be described as homogeneous 5'-nuclease assays, since a single 3'-nonextendable probe, which is cleaved during PCR amplification, is used to detect the accumulation of a specific target DNA sequence (Holland, P. M. et al., 1991). This single probe contains two labels, a fluorescent reporter and a quencher, in close proximity to each other. When the probe is intact, the quencher dye is close enough to the reporter dye to suppress the reporter fluorescent signal (fluorescent quenching takes place via FRET). During PCR, the 5'-nuclease activity of the polymerase cleaves the hydrolysis probe, separating the reporter and quencher. The reporter dye is no longer quenched and emits a fluorescent signal when excited.

The LightCycler® 480 Instrument can detect hydrolysis probes that are labeled with the reporter dyes LightCycler® Red 610, LightCycler® Red 640, LightCycler® Cyan 500, FAM, or HEX. These labeled hydrolysis probes can be used separately or in combination, which permits either single- or multicolor detection.

⚠ For multicolor hydrolysis probe assays, it is recommended to use dark quencher dyes (i.e., dye molecules which efficiently quench the fluorescence of a FRET reporter dye without emitting fluorescence themselves). Roche Life Science recommends using BHQ-2 (quenching range 550–650 nm) for all hydrolysis probe reporter dyes listed above

5.2. References

- Birch DE, Kolmodin L, Wong J, Zangenberg GA, Zoccoli MA, McKinney N, Young KKY - Simplified hot start PCR (1996) *Nature* **381** (6581), 445-446
- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W - Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications (1992) *Nucleic Acids Research* **7**, 1717-1723
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH - Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing 5' → 3' the exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* **16**, 7276-7280
- Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, Mukhamedova N, Vlasik T, Siebert PD, Chenchika A - TaqStart antibody: hot start PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase (1994) *BioTechniques* **16** (6), 1134-1137

5.3. Quality Control



The LightCycler® 480 Probes Master is function tested using the LightCycler® 480 Instrument, according to the kit protocols.

[6. Supplementary Information](#)

6. Supplementary Information

6.1. Conventions

To make information consistent and easier to read, the following text conventions and symbols are used in this document to highlight important information:

Text convention and symbols	
 <i>Information Note: Additional information about the current topic or procedure.</i>	
 Important Note: Information critical to the success of the current procedure or use of the product.	
1② ○ ③ etc.	Stages in a process that usually occur in the order listed.
② ● ③ etc.	Steps in a procedure that must be performed in the order listed.
* (Asterisk)	The Asterisk denotes a product available from Roche Diagnostics.

6.2. Changes to previous version

Layout changes.

Editorial changes.

6.3. Ordering Information

Roche offers a large selection of reagents and systems for life science research. For a complete overview of related products and manuals, please visit and bookmark our homepage lifescience.roche.com.

Product	Pack Size	Cat. No.
Accessories general (hardware)		
LightCycler® 480 Block Kit 96 Silver	1 block kit	05 015 219 001
LightCycler® 480 Block Kit 384 Silver	1 block kit	05 015 197 001
LightCycler® 8-Tube Strip Adapter Plate	1 piece, adapter plate, The adapter plate can be used multiple times	06 612 598 001
Accessories software		
LightCycler® 480 LIMS Interface Module	1 software package	05 066 310 001
LightCycler® 480 Software, Version 1.5	1 software package	04 994 884 001

Consumables		
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white	5 x 10 plates	04 729 692 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white	5 x 10 plates	04 729 749 001
LightCycler® 480 Sealing Foil	50 foils	04 729 757 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, clear	5 x 10 plates	05 102 413 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, clear	5 x 10 plates	05 102 430 001

6. Supplementary Information

LightCycler® 8-Tube Strips (clear) 10 x 12 clear strips and caps, Each 06 327 672 001 pack of LightCycler® 8-Tube Strips contains 10 x 12 strips of both tubes and flat caps, in 10 non-sterile plastic bags., Each pack of LightCycler® 8-Tube Strips contains 10 x 12 strips of both tubes and flat caps, in 10 non-sterile plastic bags.

LightCycler® 8-Tube Strips (white) 10x 12 white strips and clear caps. 06 612 601 001

Instruments

LightCycler® 480 Instrument II 1 instrument 05 015 278 001

1 instrument 05 015 243 001

Reagents , kits

LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase 50 µl, 100 U, (2 U/µl) 03 539 806 001

Universal ProbeLibrary Extension Set, 1 set, of 75 Universal ProbeLibrary

Probes #91 to #165 probes, 125 µl, 10 µM, each.

04 869 877 001

Universal ProbeLibrary Set, Human 1 set 04 683 633 001

Transcriptor Reverse Transcriptase 250 U, 25 reactions of 20 µl final volume 03 531 317 001

500 U, 50 reactions of 20 µl final volume 03 531 295 001

2,000 U, 4x500 U, 200 reactions of
20 µl final volume 03 531 287 001

Transcriptor First Strand cDNA 1 kit, 50 reactions, including 10

Synthesis Kit control reactions

04 379 012 001

1 kit, 100 reactions

04 896 866 001

1 kit, 200 reactions

04 897 030 001

6. Supplementary Information

6.4. Trademarks

FASTSTART, HIGH PURE, LIGHTCYCLER and MAGNA PURE are trademarks of Roche.
All third party product names and trademarks are the property of their respective owners.

6.5. License Disclaimer

For patent license limitations for individual products please refer to: <http://technical-support.roche.com>.

6.6. Regulatory Disclaimer

For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.

6.7. Safety Data Sheet

Please follow the instructions in the Safety Data Sheet (SDS).

6.8. Contact and Support

If you have questions or experience problems with this or any Roche product for Life Science, please contact our Technical Support staff. Our scientists are committed to providing rapid and effective help.
Please also contact us if you have suggestions for enhancing Roche product performance or using our products in new or specialized ways. Such customer information has repeatedly proven invaluable to the research community worldwide.

To ask questions, solve problems, suggest enhancements or report new applications, please visit our **Online Technical Support** Site.

Visit **lifescience.roche.com**, to download or request copies of the following **Materials**:

- Instructions for Use
- Safety Data Sheets
- Certificates of Analysis
- Information Material

To call, write, fax, or email us, visit **lifescience.roche.com** and select your home country to display country-specific contact information.

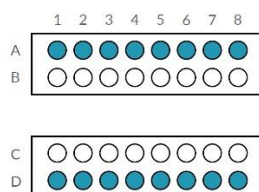
Vedlegg 4: Brukerveiledning MyGo Pro

Brukerveiledning MyGo Pro

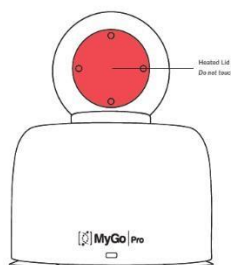
1 Instrumentet

1.1 MyGo Pro

MyGo Pro har 32 brønner. Lokket må alltid være balansert. Ved bruk av strips må det alltid være en strips i rad A og en i rad D. Ved bruk av enkle rør må posisjonene A1, A8, D1 og D8 ha rør. Balanserørene kan enten være tomme eller fylt med vann.



Ikke ta på innsiden av lokket! Lokket blir varm under kjøring. Det er helt normalt. Ikke forlat instrumentet uten lokk. Det kan komme støv i brønnene, og dette kan påvirke kvaliteten til instrumentet.



Bruk små (0,1 ml) rør (eller strips til MyGo Pro). Prøvene må sentrifugeres raskt for å få hele innholdet ned i røret. Pass på at det ikke er bobler i røret.



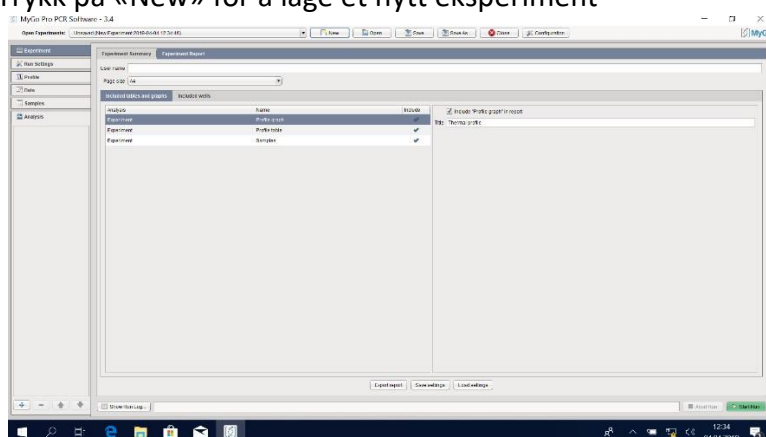
1.1.1 MyGo Pro

Blå	Initialisering
Grønn	Klar
Rød	Lokk åpen
Gul	Rør i instrumentet
Blå	Kjører, lav temperatur
Rosa	Kjører, middels temperatur
Rød	Kjører, høy temperatur
Turkis	Ekspirimentet er ferdig
Rød blinkende	Error

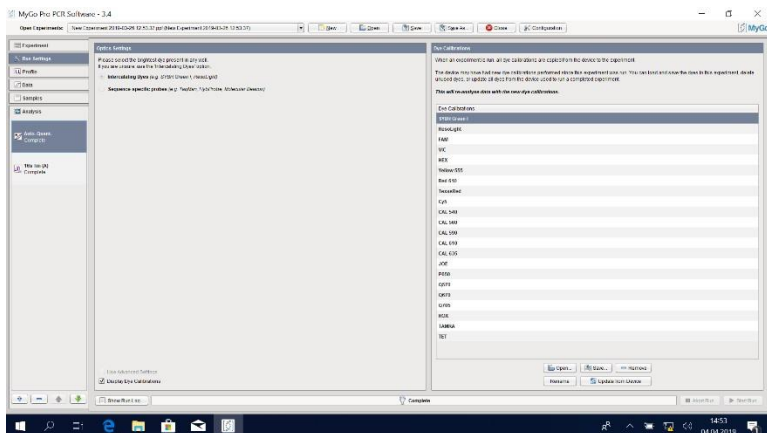
Slå på pc. Åpne MyGo programmet.

2 Lage en ny protokoll

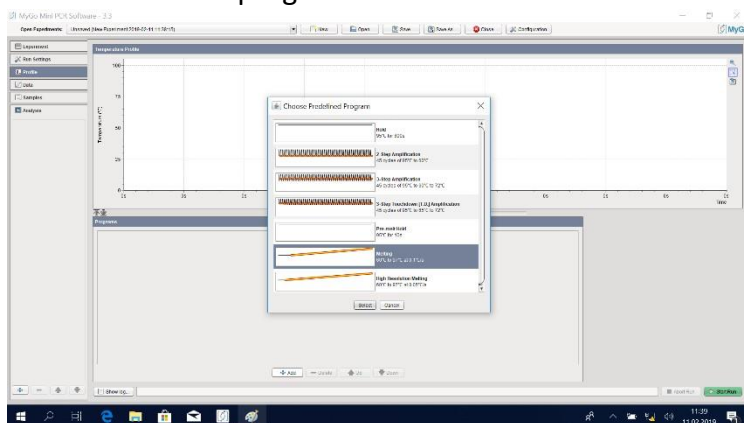
1. Velg riktig instrument.
2. Åpne «MyGo Pro» programmet
3. Trykk på «New» for å lage et nytt eksperiment



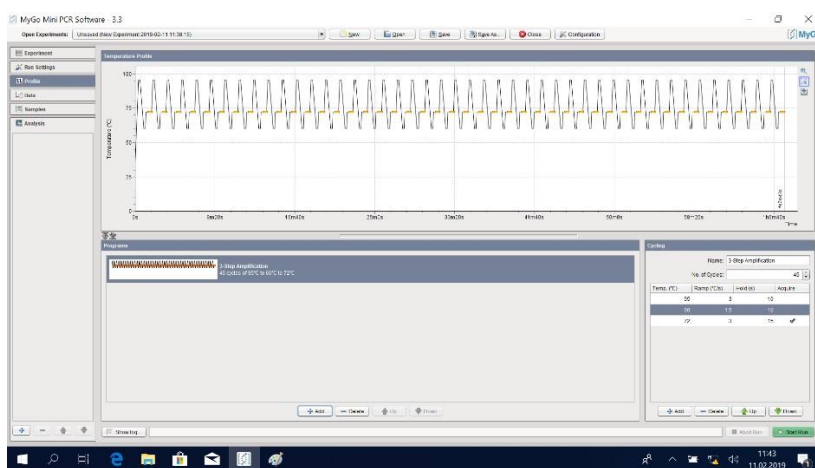
4. Trykk på «Run settings» for å endre innstillinger.



5. Legg inn parameterne for PCR profilen. Trykk «profile». Trykk «add». Og velg riktige forhåndsdefinerte programmer.

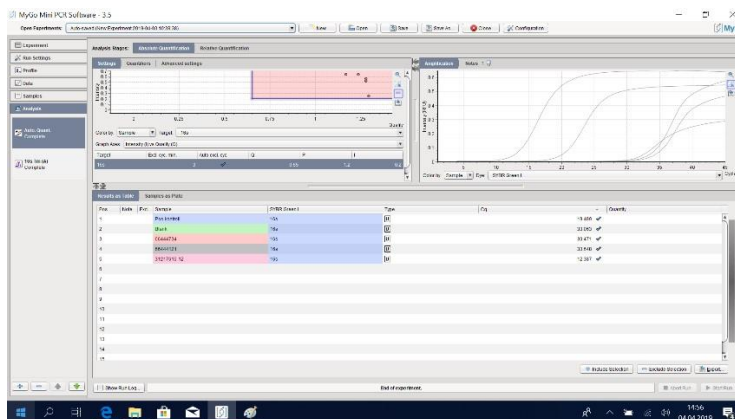


6. Endre parameterne.

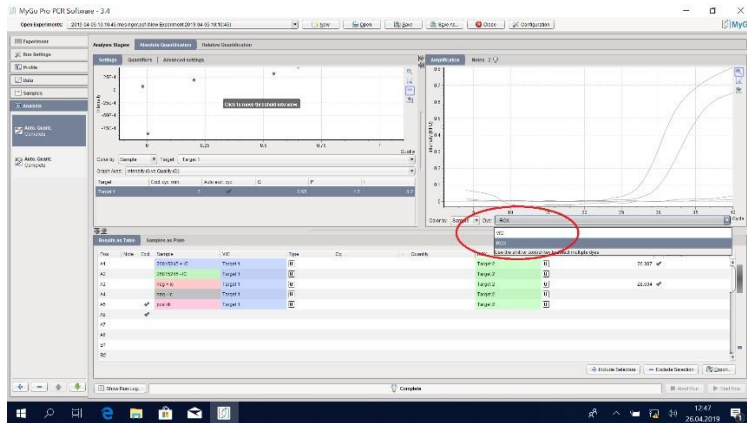


7. Samples. Legg inn prøved ID på samples. Target kan f. eks være 16s. Prøved ID og target kan også legges inn etter at kjøringen er startet. Trykk + under «Samples» for å legge til flere prøver. For å knytte prøvene til pcr brønnene, merk prøvene og trykk på «Set». En må også knytte target til brønnene. Targetene kan være Standards, Unknown eller Negative.

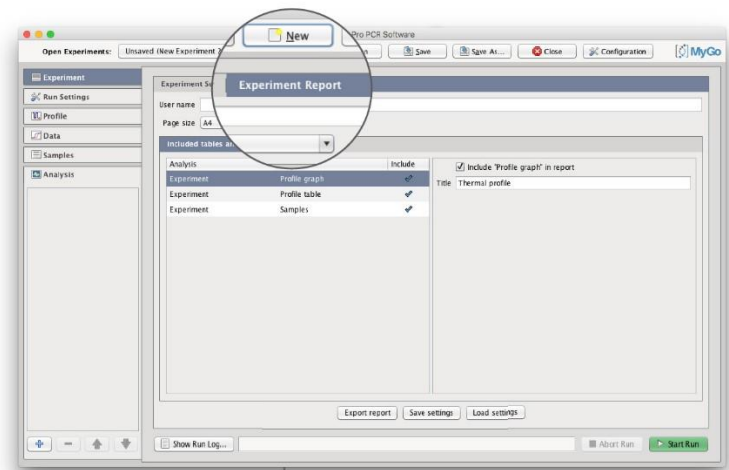
8. Trykk på «Save as». Åpne mappen hvor kjøringen skal lagres. Gi serien navn "år.mnd.dato-analyse". Lagre kjøringen.
9. Start kjøring. Trykk «start»
10. Analysering av data
Når eksperimentet er fullført, kan du legge til en analysetype ved å velge «+» knappen til venstre i programmet.



For endring av bølgelengde/farge, bruk rullegardinen ved «dye».



11. Rapport. Trykk «Experiment Report» under «Experiment»-knappen. Trykk for å velge hvilke data som skal inkluderes i rapporten. Trykk «Export Report». Lagre på harddisk eller USB-minnepinne, og velg pdf-fil.



Utskrift. Høyre klikk på rapporten. Velg skriv ut.

