

# Prosjektplan

**Navn:** Sigrid Djønné Moldekleiv, Åshild Milde og Sigrid Lundeland

**Intern veileder:** førsteamanuensis Signe Lilia Steinkopf

**Ekstern veileder:** bioingeniør Therese Midtbø

**Laboratorium:** Molekylærbiologisk seksjon ved Mikrobiologisk avdeling (MIA) på Haukeland Universitetssykehus

## Prosjektets tittel:

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

Målet med oppgaven er å sammenligne PCR-basert metode for differensiering av EIEC og *Shigella* species fra ipaH-positive fecesprøver med dagens metode.

## Bakgrunn, problemstilling:

Enteroinvasiv *Escherichia coli* (EIEC) og *Shigella* species er nært beslektete bakterier med potensiale til å forårsake alvorlig gastroenteritt. På verdensbasis er det beskrevet flere utbrudd. EIEC, *S. dysenteriae* og *S. boydii* er mest assosiert med utviklingsland, mens *S. flexneri* og *S. sonnei*, som gir noe mildere sykdom, også er vanlig i Norge. Av epidemiologiske hensyn er det ønskelig å differensiere mellom disse ulike mikrobenes ved funn i avføringsprøver relatert til sykdom. I dag baseres denne differensieringen på noe usikre, biokjemiske metoder.

Mikrobiologisk avdelings diagnostikk av tarmpatogene mikrober er i dag primært basert på en screening med flere multipleks PCR-analyser. For identifikasjon av EIEC og *Shigella*, detekteres genet ipaH. Positive prøver dyrkes på selektive medier, og kolonier blir undersøkt med PCR for et annet EIEC/*Shigella*-relatert gen, ial. Forekomsten av ipaH- og ial-genet er ikke nødvendigvis sammenfallende, noe som gir en diagnostisk utfordring.

Artikkelen "MOLECULAR DIFFERENTIATION OF SHIGELLA SPP. FROM ENTEROINVASIVE E. COLI" skrevet av Løbersli, Wester, Kristiansen og Branda beskriver hvordan bakteriene er nært beslektet, og dermed gjør det vanskelig å skille dem fra hverandre ved bruk av dagens metoder. Artikkelen beskriver videre hvordan en annen PCR-metode rettet

mot genene ipaH og lacY bedre kan differensiere bakteriene (Løbersli, Wester, Kristiansen, & Branda, 2016). Dette er en av artiklene som ble brukt for orientering om tema i oppgaven.

## Material og metode

Det forsøkes å etablere en dupleks-PCR for deteksjon av ipaH- og lacY-genet for bruk på oppdyrket materiale. To singelpleks-PCR oppsett for hver av de to genene skal også testes ut. Det benyttes hydrolyseringsprobe (FAM og texas-red), og instrumentet MyGo Pro. Analysen prøves ut på kjente stammer av EIEC og *Shigella*. I prosjektet benyttes det totalt 53 prøver fra tidligere pasienter. Disse prøvene har blitt dyrket opp og lagret i frys frem til prosjektet. DNA ekstraheres ved koking.

IpaH-genet bekrefter at det er EIEC eller *Shigella* til stede i prøven, mens lacY-genet brukes til å skille mellom *Shigella* spp. og EIEC. Dersom prøven er positiv for ipaH-genet og negativ for lacY-genet indikerer dette at bakterien er en *Shigella* spp. Dersom prøven er positiv for både ipaH- og lacY-genet indikerer dette at bakterien er en EIEC.

Metodens riktighet valideres ved hjelp av sensitivitet, spesifisitet, linearitet og effektivitet. Metodens presisjon valideres ved hjelp av repeterbarhet, reproducerbarhet og robusthet. Kontaminasjon og måleområde (deteksjonsgrense) undersøkes også.

## Etiske betraktninger

I prosjektet arbeides det med pasientprøver. Pasientprøvene er i forkant av prosjektet overført til sekundærrør, slik at det gjennom hele prosjektperioden kun er brukt laboratorienummer og ikke pasientens navn. Utenom selve prosjektet og dens prøver møter man på annen sensitiv informasjon på laboratoriet. Det har derfor vært viktig å overholde taushetsplikten. Det har også vært viktig å følge prinsippet om at alt biologisk materiale skal behandles med respekt og at det skal jobbes faglig forsvarlig på laboratoriet.

Bachelorprosjektet er gjennomført ved mikrobiologisk avdeling på Haukeland. Denne avdelingen har vært inne i en stressende tid på grunn av koronapandemien. Ved hjelp av god dialog med veileder på Mikrobiologisk avdeling, Therese Midtbø, ble det bestemt av arbeidet med prosjektet skulle fortsette så lenge riktige smittevernstiltak ble overholdt. Her var det spesielt viktig at det ble holdt riktig avstand mellom alle på laboratoriet. For å få gjennomført mest mulig av det praktiske arbeidet med prosjektet ble tilbrakt lange, men få dager på Haukeland. Slik kunne det unngås å ta opp for mye plass på laboratoriet over en lengre periode.

Regional etisk komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) skal vurdere om forskningsprosjekt er etisk forsvarlige å gjennomføre. Ved all medisinsk og helsefaglig forskning som involverer mennesker, menneskelig biologisk materiale eller helseopplysninger, skal det søkes om forhåndsgodkjenning fra REK. Godkjenning fra REK skal alltid foreligge før prosjektet kan igangsettes (Salbu, 2014). REK har vurdert bachelorprosjektet som etisk forsvarlig, og vi har dermed tillatelse til å gjennomføre det.

## Fremdriftsplan

Det er laget en egen fremdriftsplan for prosjektet som viser hvordan planen for gjennomføring av prosjektet ser ut. Kort oppsummert beskriver den at alt laboratoriearbeid gjennomføres så fort som mulig, i tillegg til at skriving på oppgaven skjer samtidig. Dersom det er mulig ønskes det å komme tilbake på laboratoriet senere for å kunne gjøre mer arbeid som oppgaven kan bygges på.

De ulike kravene gjøres ferdige etter hvert som de skal innleveres, til de fristene som er oppgitt.

## Ressurser

Prosjektet er utført i samarbeid med Mikrobiologisk avdeling (MIA) ved Haukeland Universitetssykehus. Avdelingen har i forkant av prosjektet kjøpt inn og ordnet alt det nødvendige av prøvemateriale, reagenser og utstyr.

Bakteriestammene som ble benyttet var Enteroinvasiv *Escherichia coli* (EIEC), *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri* og *Shigella dysenterie*. Prøvemateriale var i forkant av prosjektet overført til sekundærrør og fryst.

PCR-reaksjonene ble kjørt på to like PCR-maskiner, MyGo Pro. Disse var ikke i bruk, men tilgjengelige på avdelingen. I forkant av prosjektet ble det også utarbeidet et primer-probe-design som var kjøpt inn til oppstart av prosjektet. Det ble også benyttet Probes Master som er en mastermiks kjøpt inn fra leverandør. Selve utførelsen av prosjektet krevde mange mikrosentrifugerør og pipettespisser.

Det økonomiske aspektet ved prosjektet har gruppen ikke fått innblikk i, men forhåpentligvis vil prosjektet være med å gjøre differensieringen lettere, mer effektiv og mindre kostbar.

## Referanseliste

Litteraturen som er benyttet i prosjektet kan sees i litteraturlisten i slutten av bacheloroppgaven. EndNote er benyttet som et verktøy for referering til litteratur. Det er benyttet både bøker og litteratur på nett.

Litteraturen som er benyttet til å utarbeide denne prosjektplanen er angitt på siste side av dette dokumentet.

## Vedlegg

Fremdriftsplan for prosjektet ligger vedlagt som egen fil.

Artikkelen "MOLECULAR DIFFERENTIATION OF SHIGELLA SPP. FROM ENTEROINVASIVE E. COLI" ligger vedlagt som egen fil.

29. mai 2020

*Dato: 29. mai 2020*

Sigrd D. Moldekleiv

*Sigrd Djonne Moldekleiv*

Åshild Milde

*Åshild Milde*

Sigrd Lundeland

*Sigrd Lundeland*

Signe Steinkopf

*Signe Steinkopf*

## Kilder

- Løbersli, I., Wester, A. L., Kristiansen, Å., & Branda, L. T. (2016). Molecular differentiation of *shigella* spp. from enteroinvasive *E.coli*. *European journal of microbiology and immunology*, 6, 197-205.
- Salbu, A. K. (2014). Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Retrieved from <https://www.etikkom.no/FBIB/Praktisk/Forskningsetiske-enheter/Regionale-komiteer-for-medisinsk-og-helsefaglig-forskningsetikk/>