



Examensarbete, 15 hp
Kandidatexamen i Biomedicinsk laboratorievetenskap
Vårterminen 2019

Tidsserieanalys av aktiv norovirus- infektion med RT-qPCR

Henrik Dahlin

Naturvetenskapliga Fakulteten

Populärvetenskaplig sammanfattning

De flesta sjukdomar sker på vintern och kulmen för sjukdomar sker ofta i februari och denna period på vintern har fått ett eget begrepp, vabruari. Detta på grund av mycket dagsersättning från försäkringskassan i form av vård av barn (VAB).

Vinterkräksjukan är en del av vintersjukdomarna och en orsak till vabruari. Sjukdomsperioden varierar från en till tre dagar med symtom som kräkning och diarré. Virus som orsakar vinterkräksjukan heter norovirus. Norovirus är mycket smittsamt och smittar främst via kontakt med smittade personer, men också via mat och dryck. Det räcker med 18-2800 viruspartiklar för att insjukna. Det finns många exempel på utbrott av vinterkräksjukan på äldreboende, sjukhus och kryssningsfartyg. Idag finns ingen typ av vaccin eller annat läkemedel mot sjukdomen. Trots att norovirus är en vanlig orsak till sjukdom är kunskapsluckorna stora.

Norovirus är ett enkelsträngat plus-RNA och vid aktiv infektion transkriberas plussträngen till en minussträng. Minussträngen används som mall när ett nytt plus-RNA tillverkas.

Syftet med studien var att göra en tidsserieanalys av koncentrationen minus-RNA i celler som infekterats med olika koncentrationer av musnorovirus. Förhoppningen med studien var att hitta en experimentmodell som i sin tur kan användas i framtida forskning för att tidseffektivisera forskning kring norovirus.

Slutsatsen av denna studie är att det finns ett exponentiellt samband mellan den initiala viruskoncentrationen och minus-RNA-uttrycket i cellerna vid 4 och 8 timmar. Resultaten visar att initiala dosen avgör inkuberingstiden så att hög konc kan analyseras efter 4 timmars inkubering och lägre koncentrationer behöver 24 timmar eller längre inkubering.

Författare/Author
Henrik Dahlin

Svensk titel
Tidsserieanalys av aktiv norovirus-infektion med RT-qPCR

Engelsk titel
Time-series analysis of active norovirus-infection with RT-qPCR

Handledare/Supervisor
Malin Alsved, Doktorand, Ergonomi och aerosolteknologi, Lund Universitet
Ann-Sofi Rehnstam-Holm, leg. Biomedicinsk analytiker och Professor i mikrobiologi, Högskolan Kristianstad

Examinator/Examiner
Bodil Hernroth, leg. Biomedicinsk Analytiker, professor i biomedicinsk laboratorievetenskap, Högskolan Kristianstad

Svensk Sammanfattning

Norovirus som orsakar vinterkräksjukan är en av de vanligaste vintersjukdomarna i Sverige. Sjukdomstiden varar generellt i en till tre dagar med symptomen kräkning och/eller diarré. Till den totala sjukdomsbilden världen över gällande akut gastroenterit, bidrar norovirus med 18 %. Trots att sjukdomen är mycket vanlig är kunskapen om norovirusets förfarande till stor del okänd.

Syftet med studien var att göra en tidsserieanalys, även så kallad One-Step Growth analys, av koncentrationen minus-RNA i celler som infekterats med olika koncentrationer av murint norovirus (MNV). För att detektera minus-RNA användes RT-qPCR med SYBR Green. Målet var att se om startkoncentrationerna av virus vid någon tidpunkt korrelerar med mängden minus-RNA i cellerna. Efter 4 och 8 timmar fanns ett exponentiellt samband mellan den initiala viruskoncentrationen och minus-RNA-uttrycket i cellerna. Koncentrationen minus-RNA i de infekterade cellerna ökade mellan de undersökta tiderna 4, 8 och 24 timmar. Vidare visade resultaten att det krävs 4 timmar för att minus-RNA skulle vara kvantifierbar vid en högre infektionskoncentration av viruspartiklar, medan det krävs 24 timmar för den lägre infektionskoncentrationen av viruspartiklar.

Ämnesord

RT-qPCR, SYBR Green, norovirus, MNV, One-Step Growth Analysis, vinterkräksjukan

Engelsk sammanfattning

Norovirus causes winter vomiting disease and is one of the commonest cause of winter illness in Sweden. The disease period generally lasts one to three days with symptoms like vomiting and/or diarrhea. To the disease burden of acute gastroenteritis worldwide, norovirus contributes with 18 %. Even though the illness is very common, the knowledge about norovirus is poor and largely unknown.

The purpose of the study was to do a time series analysis, a so-called One-Step Growth analysis, of the minus-RNA concentration in cells infected with different concentrations of murine norovirus (MNV). For the detection of minus-RNA RT-qPCR was used with SYBR Green. The goal was to correlate start concentration of virus at any time with the amount of minus-RNA in the cells. At 4 and 8 hours there was an exponential connection by the initial virus concentration and minus-RNA development in the cells. The concentration of minus-RNA in the infected cells increased between 4, 8 and 24 hours. Further, the results can be interpreted as requiring 4 hours for the higher concentrations to become quantifiable, while requiring 24 hours for the lower concentrations to become quantifiable.

Keywords

RT-qPCR, SYBR Green, norovirus, MNV, One-Step Growth Analysis, winter vomiting disease

Innehåll

1. Inledning	7
1.1. Norovirus	7
1.2. Primerdesign	9
1.3. RT-qPCR	10
1.4. Syfte	10
2. Material och Metod	10
2.1. Material	10
2.1.1. Förberedelser inför försöket	11
2.1.2. Metodöversikt	11
2.1.3. MNV-infektering av celler	12
2.1.4. Extraktion av intracellulärt minus-RNA	13
2.1.5. Transkribering av minus-RNA till cDNA (RT)	14
2.1.6. Detektion med qPCR och SYBR Green	14
2.2. Säkerhet -och miljöaspekter	15
2.3. Dataanalys och statistiska metoder	15
2.4. Etik	15
3. Resultat	15
3.1. Standardkurvor och smältkurvor qPCR	16
3.2. Kvantifiering med RT-qPCR	19
4. Diskussion	21
5. Slutsats	23
Erkännanden	23
Referenser	24

1. Inledning

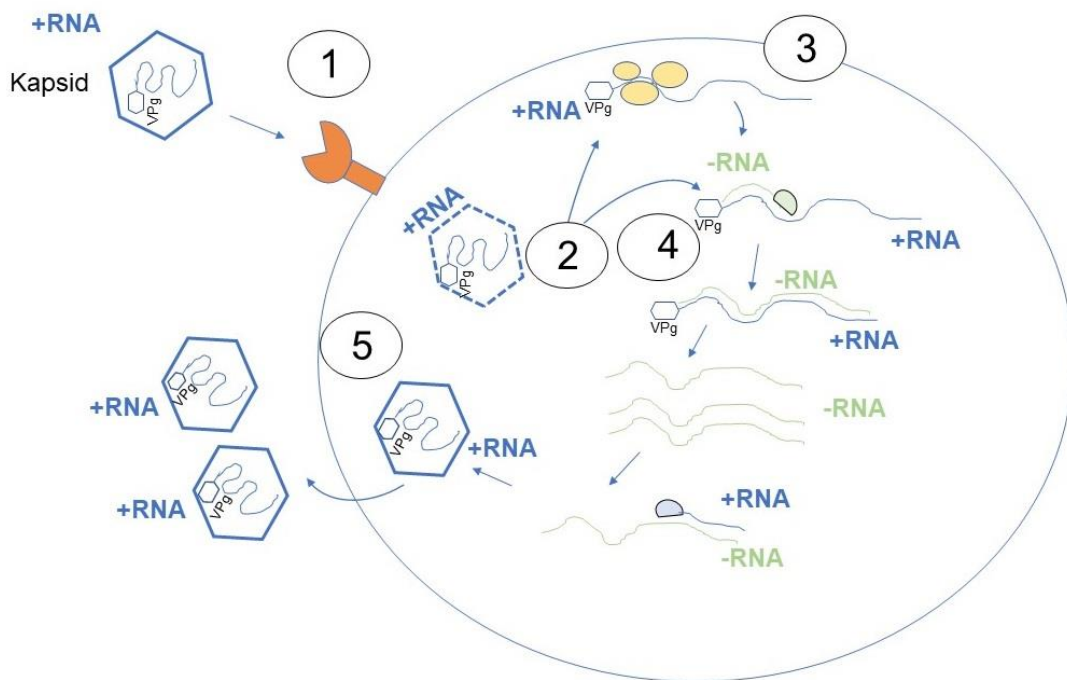
En av de vanligaste vintersjukdomarna i Sverige är vinterkräksjukan. Vinterkräksjukan orsakas av norovirus och sjukdomstiden varar generellt i en till tre dagar med symptomen kräkning och/eller diarré. Dödsfall från vinterkräksjukan är ovanligt i Sverige men är vanligare i utvecklingsländer (CDC 2018). Norovirus är mycket smittsamt och smittar främst via kontakt med smittade personer, men också via mat och dryck. Det räcker med 18-2800 viruspartiklar för att insjukna i vinterkräksjukan (Atmar et al. 2014; Teunis et al. 2008). Grundvatten som kontaminerats med norovirus kan vara smittsamt ett par månader efter kontamineringen och viruset kan finnas kvar i flera år (Seitz et al. 2011). Till den totala sjukdomsbilden världen över gällande akut gastroenterit, bidrar norovirus med 18 % (Ahmed et al. 2014). Utbrott på grund av norovirus som rapporterades i Europa under 2001-2006 var till 88 % orsakade av smitta mellan människor, 10 % var livsmedelsburna och 2 % var vattenburna (Kroneman et al. 2008). Enligt beräkningar orsakade norovirus 5 miljoner insjuknanden som kunde härledas till livsmedel per år i USA med 15 000 sjukhusvistelser 2000-2008 (Scallan et al. 2011). Vid en granskning gjord av Hoffmann et al. (2012), estimerades kostnaden specifikt för norovirus-sjukdomar till 2 miljarder dollar per år i USA. Det finns exempel på utbrott av norovirus i Sverige där källan varit det kommunala vattnet (Larsson et al. 2014).

1.1. Norovirus

Norovirus tillhör *Caliciviridae* och har ett enkelsträngat plus-RNA genom, med ett stabiliserande VPg protein vid 5'-ändan och en poly-A svans vid 3'-ändan (Thorne & Goodfellow 2014). Genomet omsluts av en kapsid. Det humana noroviruset (HuNoV) har tre öppna läsramar (ORF) medan det murina noroviruset (MNV), som används i denna studie, har fyra ORFs (McFadden et al. 2011). Båda HuNoV och MNV plus-RNA genomen innehåller ca 7,5 kilobaspar (Glass et al. 2009) där ORF1 ligger vid 5'-ändan och ORF3 vid 3'-ändan. MNVs ORF4 är en del av ORF2 och ligger mellan ORF1 och ORF3. ORF 1 translateras till ett stort protein som sedan klyvs till sex olika proteiner, bl.a. N7 som kodar för det RNA-beroende RNA polymeraset som behövs vid replikationen, där negativt-RNA syntetiseras som mall för nya positiva RNA kopior (se Figur 1).

Dessa positiva-RNA kopiorna (utgör mRNA) kan sedan translateras, men utgör också nya virusgenom. Vid replikationen syntetiseras även s.k subgenom RNA, dvs mRNA strängar som inte täcker hela genomet, utan saknar 5'- delen av ORF1 (Thorne & Goodfellow 2014).

Även om MNV är en enteropatogen (Karst et al. 2003), kan det replikera i cellodlingssystem med makrofager från möss. Innan robusta reproducerbara metoder finns tillgängliga för att odla HuNoV *in vitro*, används MNV som ersättning vid studier av vinterkräksjukesvirus. Odling av MNV har pågått i ca 15 år, då man för första gången visade att MNV går att odla i murina makrofager, cellinje RAW 264.7 (Wobus et al. 2004). MNV och HuNoV har likheter när det gäller morfologi, genetik och replikation (Hardy 2005; Wobus et al. 2006) och både MNV och HuNoV genomgår minst fem steg i sin infektionscykel; 1) upptag i cellen, 2) frisläppning av genom, 3) translation, 4) replikation och 5) frisläppning av nya viruspartiklar (Figur 1). Det humana virusets använder histoblodgruppsantigener (HBGAs) som receptorer (Atmar et al. 2014; Marionneau et al. 2002), medan receptorer för det murina virusets infektion av värdcellen är cellens sialinsyragrupper, glykolipider och/eller glykoproteiner (Taube et al. 2009). Under en aktiv norovirusinfektion frisläpps viruset kontinuerligt från värdcellen (Santiana et al. 2018), men vilka mekanismer som används för detta är till största delen okänt (de Graaf et al. 2016; Thorne & Goodfellow 2014). När cellen lyserar frisläpps också virus. Norovirusets infektionscykeln är komplicerad och endast enstaka delar är kända, dvs kunskapsluckorna om infektionscykeln för norovirus är stora och inkompleta (Thorne & Goodfellow 2014).



Figur 1. Infektionscykel för både MNV och HuNoV. Infektionscykeln för MNV och HuNoV genomgår minst fem steg 1) viruset binder in till ytreceptorer och tas upp av cellen, 2) virus-genomet frisläpps från kapsiden, 3) transkribering av genomet, 4) replikation, 5) frisläppning av viruspartikel (Dahlin, H. 2019).

1.2. Primerdesign

Primerdesign är en viktig del för att få specifika resultat. Opålitliga resultat kan uppnås om fenomenet "false priming" uppstår vilket inte är önskvärt. Fenomenet "false priming" förekommer vid genom av typen plus-RNA men är inte begränsat till just plus-RNA (Tuiskunen et al. 2010). Fenomenet "false priming" förekommer oftast vid 3' änden av genomet. Primerdesignen av Vashist et al. (2012) (dessa primrar används i denna studie) använder ett område nära 5' änden av genomet och använder också en så kallad taggad primer som innehåller en viral del och en icke viral del. Den virala delen basparar med målsträngen och används som primer vid cDNA syntes. Vid nästa steg används den icke-virala delen i primern som målsekvens för forward primer, detta för att öka specificiteten vid transkribering.

1.3. RT-qPCR

Detektion av minus-RNA med reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Reverse transcription (RT) innebär att RNA görs om till cDNA i ett steg innan qPCR körs. För att öka specificiteten vid RT steget kan en taggad primer användas. För att detektera cDNA kan SYBR Green användas. SYBR Green binder in till dubbelsträngat DNA och börjar då fluorescera. Resultaten från qPCR-analyserna visas i form av en amplifieringsplot, standardkurva och en smältkurva. Amplifieringsplotten visar utvecklingen av ljusintensitet efter varje cykel. Standardkurva med kända koncentrationer används som referens för att kvantifiera okända provs koncentration. Provens cykeltröskel (Ct) jämförs med standarden och därmed kan koncentrationen för provet räknas ut. Smältkurvan talar om vid vilken temperatur dubbelsträngat DNA separerar från varandra och blir enkelsträngat. Smälttemperaturen från smältkurvan av standardproverna bestämmer referensvärdet för korrekt detekterat cDNA.

1.4. Syfte

Syftet med studien var att göra en tidsserieanalys, även så kallad One-Step Growth analys, av antalet cDNA kopior av minus-RNA i celler som infekterats med olika koncentrationer av murint norovirus. Målet var att se om startkoncentrationerna av virus vid någon tidpunkt korrelerar med mängd minus-RNA i cellerna.

2. Material och Metod

2.1. Material

Studien utfördes på Biomedicinskt centrum (BMC) i Lund. Cellerna som användes i studien var murina makrofager av cellinje RAW 264.7 och viruset var murint norovirus (MNV, stam Berlin/06/06DE S99). Både cellerna och MNV var en gåva från Dr. Maren Eggers och Labor Prof. Gisela Enders, MVZ GbR Virologie, Stuttgart, Tyskland. Koncentration av virusympen var okänd. Virusympen späddes i 10 steg med 10x spädning i vart steg. Detta gav att originalympen benämns 10^0 och den mest spädda virusympen 10^{10} . Som reverse primer användes TnegGneg

(Thermo Fisher Scientific, Litauen) med sekvensen 5'-GGCCGTCATGGTGGCGAATAATGGACAACGTGGTGAAGGAT och position 1678–1697 (Vashist et al. 2012). Gneg positionen motsvarar virusgenomets plus-RNA sekvens i ORF1 nära 5'-ändan. Den understrukna sekvensen i TnegGneg är den anti-virala taggen Tneg. Position 1678–1697 refererar till den ej understrukna, virala delen Gneg. Som negative strand forward primer användes 2 µl Tneg (5 µM) 5'-GGCCGTCATGGTGGCGAATAA och 2 µl positive strand reverse primer Gpos (5 µM) 5'-CAAACATCTTTCCCTTGTTTC med position 1760–1779 i virusets genom (plus-RNA) nära ORF1 5'-ände (Vashist et al. 2012).

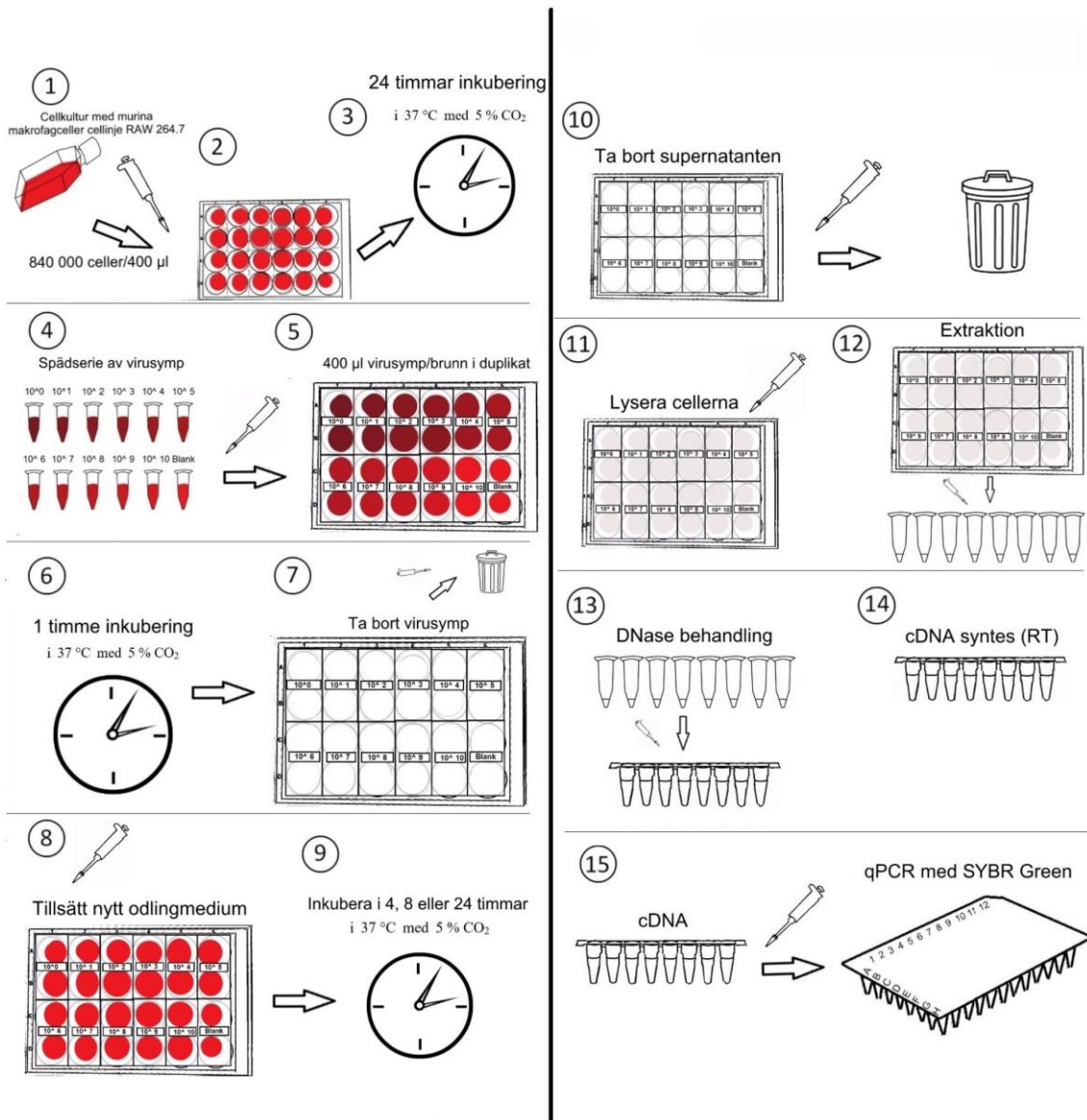
2.1.1. Förberedelser inför försöket

De murina cellerna odlades i 25 cm² cellodlingsflaskor (Corning Incorporated, USA) som passeras med två till tre dagars mellanrum. Vid passering tvättades cellerna med Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Life Technologies Limited, United Kingdom) och sedan skrapades cellerna loss från flaskans botten i 5 ml odlingmedium som består av Dulbecco MEM (Biochrom, Tyskland) med 10% fetal bovine serum (FBS), 1 % Gibco® MEM icke-essentiella aminosyror (NEAA) (Life Technologies Corporation, UK) och 0,5 % Gibco® penicillin/streptomycin (Life Technologies Europe BV, Holland). Därefter flyttades 1 ml av cellerna till en ny flaska med 5 ml av samma odlingmedium. Inkubering mellan passeringarna skedde i 37 °C med 5 % CO₂ i en HERAcell 150 inkubator (Kendro, Tyskland).

2.1.2. Metodöversikt

Makrofager tillsattes till cellodlingsplatta och inkuberas i 24 timmar därefter tillverkas en spädserie av virus 10⁰ spädning - 10¹⁰ spädning och tillsattes i duplikat till cellodlingsplattan. Blank som bestod av odlingmedium tillsattes också i duplikat. De infekterade cellerna inkuberas i 1 timme vartefter virus tas bort och oinfekterat medium tillsattes. Cellerna inkuberas i respektive tidsintervall på 4, 8 och 24 timmar därefter lyseras cellerna och cDNA syntetiseras följt av qPCR.

Metodöversikt



Figur 2. Metodöversikt i 15 steg (Dahlin, H. 2019).

2.1.3. MNV-infektering av celler

Till varje försök (efter 4, 8 respektive 24 timmar) användes en 24 brunns cellodlingsplatta (TPP®, SIGMA, Schweiz). Till var brunn tillsattes 840 000 celler/400 µl. Vid räkning av celler i cellodlingen användes EVE Automatic cell counter (NanoEnTek Inc., Korea), därefter spädde cellodlingen med odlingsmedium till rätt koncentration som därefter tillsattes till var brunn (Figur 2, steg 1-2). Efter tillsatts av celler inkuberades plattorna

under 24 timmar i 37 °C med 5 % CO₂ (Figur 2, steg 3). Syfte med denna inkubering var att få cellerna att fästa till brunnens botten och skapa en konfluensgrad på 80-90 %. Därefter tillsattes viruslösningar i olika koncentrationer med 10x spädning från hög koncentration (10⁰) till låg koncentration (10¹⁰). Detta skedde i duplikat inklusive blank. Blank innehöll odlingsmedium utan virus (Figur 2, steg 4-5).

Alla plattor inkuberades med viruslösning i 1 timme i 37 °C med 5 % CO₂ (Figur 2, steg 6). Därefter byttes viruslösningen ut mot oinfekterat odlingsmedium och inkuberingstiden startade för respektive tidsintervall (Figur 2, steg 8-9). När inkuberingstiden nått sitt slut separerades supernatanten från cellerna (Figur 2, steg 10), cellerna lyserades med 350 µl RLT Lysis buffert innehållande guanidin och tiocyanat (Qiagen, Tyskland) för att frigöra minus-RNA från cellerna (Figur 2, steg 11).

2.1.4. Extraktion av intracellulärt minus-RNA

Extraktionen (Figur 2, steg 12) av virus-RNA följde protokollet från RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Tyskland). Först homogeniserades lysatet genom en QIAshredder-kolonn (Qiagen, Tyskland) 13 000 rpm i 2 minuter med Eppendorf centrifug 5417 C (Eppendorf, Tyskland). Därefter tillsattes 350 µl 70 % etanol och provet blandades väl. Lösningen överfördes till en RNeasy-kolonn (Qiagen, Tyskland) och centrifugerades i 15 sekunder vid 8 000 rpm. Därefter tillsattas 700 µl buffer RW1 till kolonnen innan den centrifugerades i 15 sekunder vid 8 000 rpm. 700 µl buffer RPE tillsattes och kolonnen centrifugerades i 15 sekunder vid 8 000 rpm. En andra gång tillsattes RPE buffert till kolonnen, denna gång med 500 µl och med efterföljande centrifugering i 2 minuter 8 000 rpm. Efter detta skedde en till centrifugering utan tillsättning av något vätska, i 1 minut och vid 13 000 rpm. Sist skedde eluering till eppendorfrör (Eppendorf, Tyskland) med 30 µl RNase-fritt vatten i 1 minut vid 8 000 rpm.

DNase-behandling gjordes med 1,25 µl DNase I 1 U/µl och 1,25 µl 10x DNase I buffert (Thermo scientific, Litauen). Dessa blandades med 2,5 µl RNA prov och inkuberades i 37 °C under 30 minuter. Efter detta tillsattes 1,25 µl EDTA 50 mM och proven inkuberades i 65 °C i 10 minuter (Figur 2, steg 13).

2.1.5. Transkribering av minus-RNA till cDNA (RT)

Vid transkribering till cDNA (Figur 2, steg 14), följdes protokollet från SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific, Litauen) enligt följande: 2,5 µl av RNA proven blandades med 3,7 µl dH₂O, 0,5 µl dNTPs (10 mM) (Life Technologies, USA), och 0,2 µl reverse primer (5 µM) TnegGneg. Detta inkuberades i 65 °C i 5 minuter. Efter detta tillsattes 0,1 µl SuperScript IV (200 U/µl), 2 µl 5x SSIV Buffer, 0,5 µl DTT 0,1 M, samt 0,5 µl RiboLock (40 U/µl) (Thermo scientific, Litauen). Vid cDNA syntesen användes LifeTouch Thermal Cycler (Hangzhou Bioer Technology, Kina) och kördes med 23 °C i 10 minuter, 55 °C i 30 minuter och 80 °C i 10 minuter.

2.1.6. Detektion med qPCR och SYBR Green

Vid qPCR (Figur 2, steg 15) följdes tillverkarens anvisningar i SYBR® Select Mastermix-kit (Life technologies, USA). 2 µl cDNA blandades med 10 µl 2x SYBR select master mix, 4 µl dH₂O, 2 µl av negative strand forward primer (5 µM) och 2 µl positive strand reverse primer (5 µM). En standardkoncentration av MNV cDNA på $2,5 \times 10^6$ cDNA/µl späddes 1/10 ner till $2,5 \times 10^1$ cDNA/µl och användes till standardkurva. Tröskelvärde var satt till 0,32 ΔRn fluorescens och när amplifieringsvärdet för provet kommer upp till denna nivå når provet sitt cykeltröskelvärde (Ct). Alla prov, standarder och blank tillsattes i duplikat. Till qPCR analyser användes 20 µl och maskinen StepOnePlus (Applied Biosystems, Singapore) användes, med en start med ett holding stage på 50 °C i 2 minuter och 95 °C i 2 minuter. Därefter kördes 45 cykler med 95 °C i 15 sekunder, 58 °C i 15 sekunder, 72 °C i 15 sekunder. Därefter gjordes ett smältkurvesteg som innebar 95 °C i 15 sekunder, 60 °C i 60 sekunder och slutligen 95 °C i 15 sekunder.

2.2. Säkerhet -och miljöaspekter

Vid arbete med immortaliserade celler eller skadliga kemikalier användes skyddsutrustning såsom handskar, förkläde och skyddsglasögon. Arbete skedde i dragbänk och efter varje laborationstillfälle tvättades händerna med tvål och vatten och därefter med handsprit. Det finns alltid en viss risk att preparaten som arbete utförs på innehåller patogener med zoonotiska egenskaper. Risker för detta var dock liten vid våra försök, men försiktighetsprincipen gäller. Slöseri med plast minimerades, dock utan att riskera kontamination då kontaminationsrisken måste gå före miljöaspekten.

2.3. Dataanalys och statistiska metoder

Tolkning och dataanalys av qPCR skedde med StepOne Software version 2.3 (Life Technologies, USA) som också räknade ut determinationskoefficienten, effektiviteten och smälttemperaturen (T_m) på standardkurvorna. Sammanställning av rådata samt bearbetning av resultat skedde med Microsoft® Excel® för Office 365MSO (16.0.11601.20130) (Microsoft, USA). Med hjälp av Excel räknades medelvärde, standardavvikelse och determinationskoefficienten ut på resultatet som också presenterades i grafer. Konstruktion av bilder skedde med Paint (10.0.10586.672) (Microsoft, USA), Microsoft® PowerPoint® för Office 365MSO (16.0.11601.20130), PhotoPad v 4.00 (NCH Software, USA) och Doodly v 1.19.11 (Bryxen, Inc., USA).

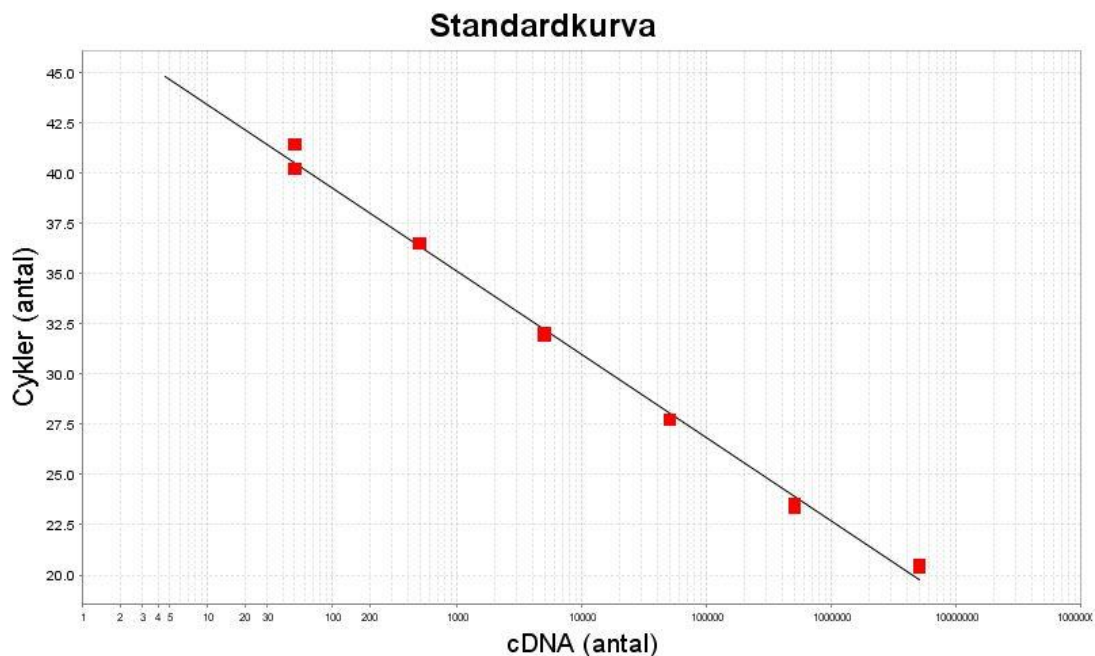
2.4. Etik

Inget etiskt tillstånd har krävts. Muscellkulturen som användes i denna studie kräver inte etiskt tillstånd (Jordbruksverket 2019).

3. Resultat

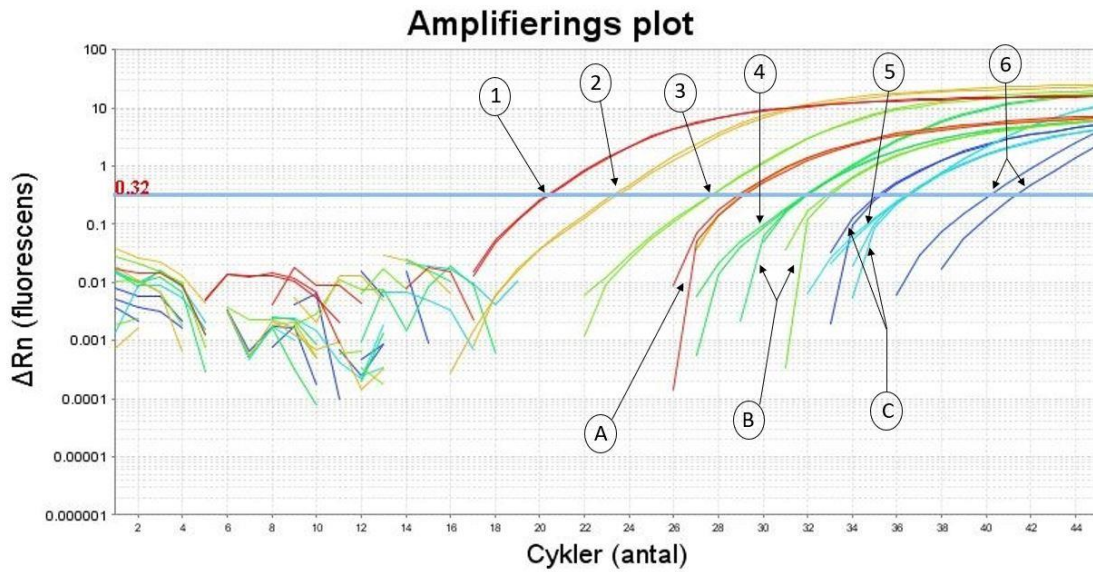
3.1. Standardkurvor och smältkurvor qPCR

Standardkurvor för samtliga qPCR-körningar hade R^2 värden mellan 0,986 till 0,996 och effektiviteten låg mellan 68 % till 75 %, se figur 3. Detektionsgränsen för qPCR var 25 cDNA kopior/ μ l (cykel nr. 42) och detektionen för $2,5 \times 10^6$ cDNA kopior/ μ l skede vid cykel nr. 21, se figur 4. Smälttemperaturen (T_m) var $86,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ vid alla försök, se exempel, figur 5. Tröskelvärde sattes till 0,32 ΔR_n fluorescens. Endast de prover som genererade en topp i smältkurvan valdes ut som godtagbara vid kvantitativ utvärdering med ett medel $C_t \leq 42$, valdes ut som godtagbara vid kvantitativ utvärdering.

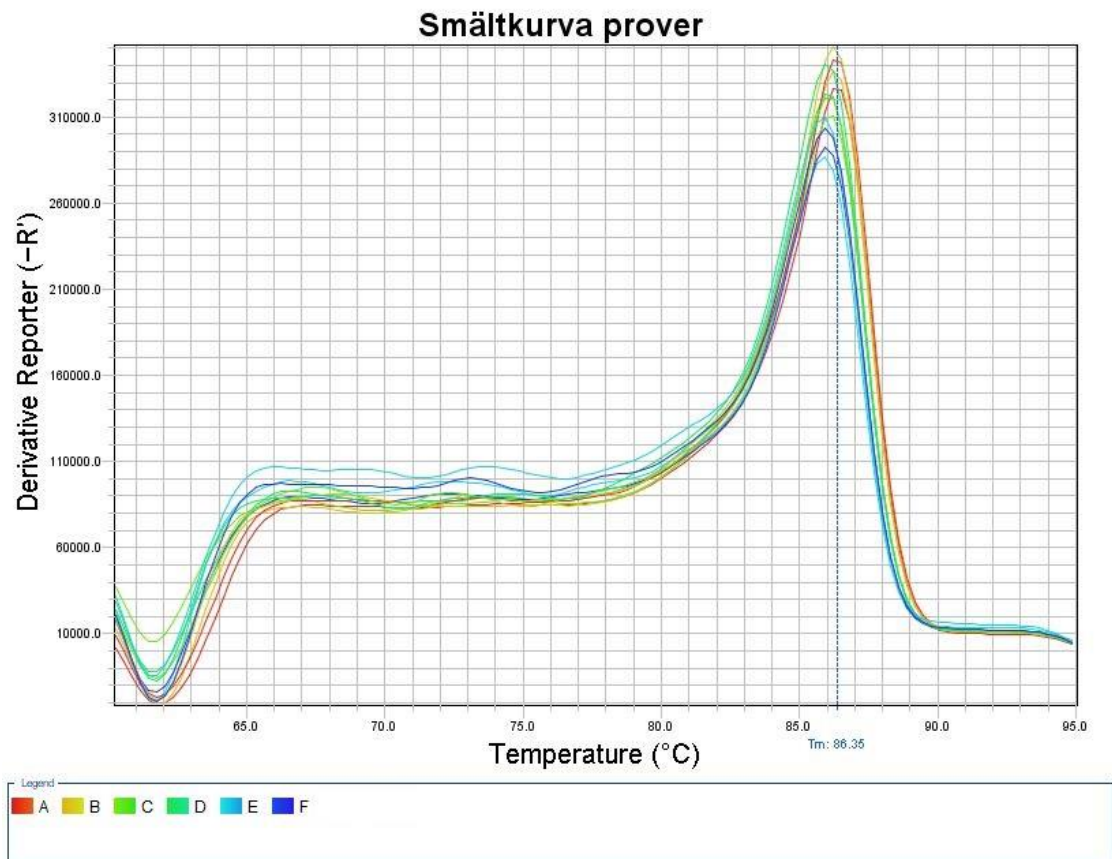


Target: MNV Slope: -4.155 Y-Inter: 47.606 R^2 : 0.996 Eff%: 74.05

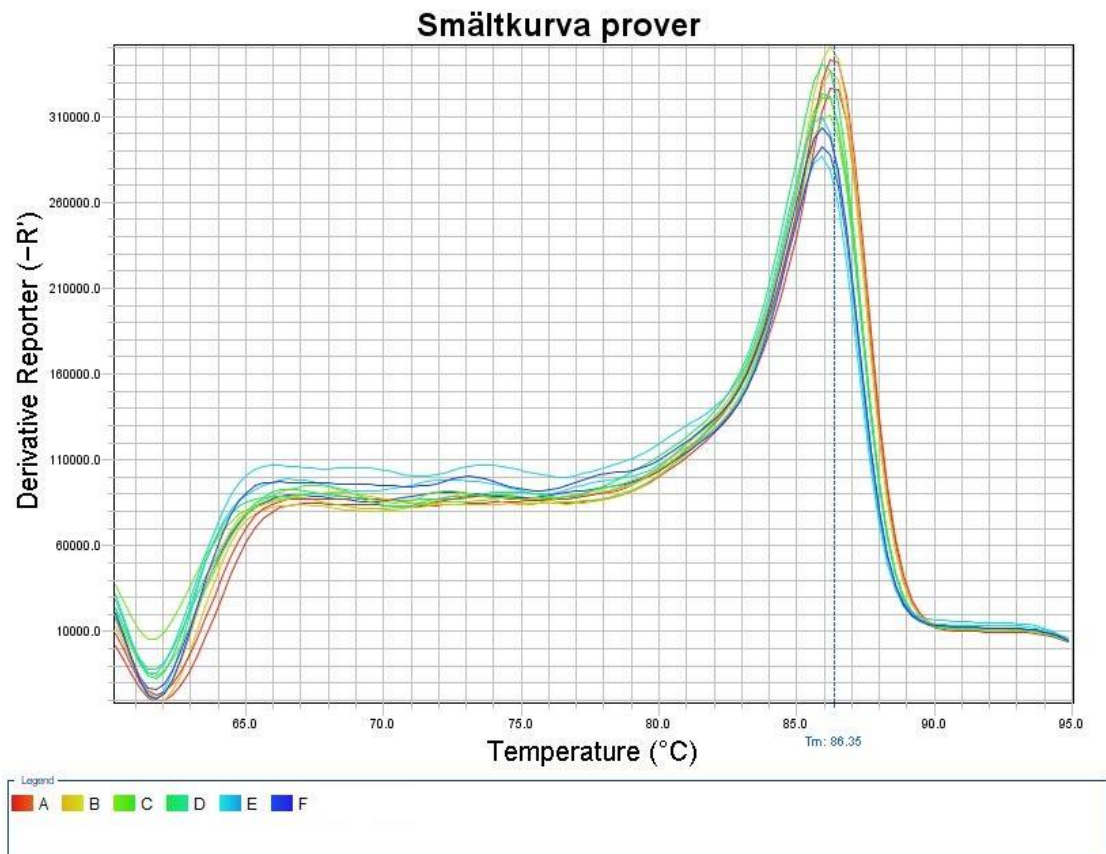
Figur 3. Standardkurva för qPCR från 4-timmars försöket. Determinationskoefficienten (R^2) var 0,996, effektiviteten 74 %. Tröskelvärde var satt till 0,32 delta R_n fluorescens. C_t för standardkurvan var mellan 21 och 42 cykler.



Figur 4. Amplifieringsfigur för qPCR från 4-timmars försöket. Tröskelvärdet var satt till 0,32 ΔRn fluorescens. Ct för standardkurvan var mellan 21 och 42 cykler. Standarder med koncentration $2,5 \times 10^6$ cDNA kopior/ μl (1), $2,5 \times 10^5$ cDNA kopior/ μl (2), $2,5 \times 10^4$ cDNA kopior/ μl (3), $2,5 \times 10^3$ cDNA kopior/ μl (4), $2,5 \times 10^2$ cDNA kopior/ μl (5) och $2,5 \times 10^1$ cDNA kopior/ μl (6). Prov med spädning 10^0 (A), spädning 10^1 (B) och spädning 10^2 (C).



Figur 4. Smältkurvor för standarder från 4-timmars försöket. Smälttemperatur (T_m) var 86,5 °C ± 0,5 °C. Smältkurva standarder där den högsta koncentrationen (A) var på 2,5 miljoner cDNA kopior/μl. Spädserie med 10x spädning ner till 25 cDNA kopior/μl (F).

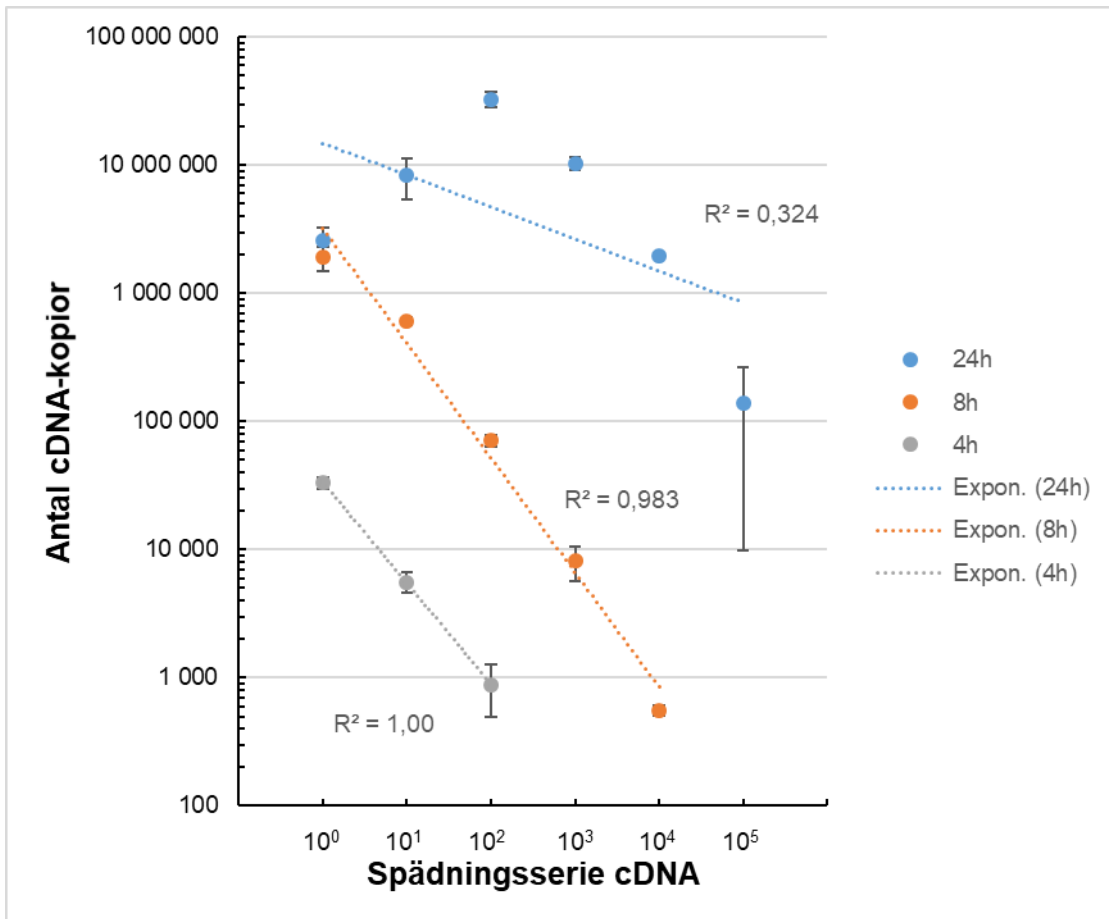


Figur 5. Smältkurva för prover från 4-timmars försöket. Smälttemperatur (T_m) var $86,5\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$. A och B var virusymp med spädning 10^0 , C och D var virusymp med spädning 10^1 , E och F var virusymp med spädning 10^2 .

3.2. Kvantifiering med RT-qPCR

Vid 24 timmar sågs en koncentration av virusymp med spädning 10^0 på $2,5 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^5$ cDNA kopior (Figur 6). Vid spädning 10^1 var koncentrationen $8,0 \times 10^6 \pm 3,0 \times 10^6$ cDNA kopior (Figur 6). Den högsta kvantifierbara koncentrationen vid 24 timmar fanns vid spädning 10^2 och var på $33 \times 10^6 \pm 4,0 \times 10^6$ cDNA kopior (Figur 6). Spädning 10^3 hade $10 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$ cDNA kopior (Figur 6). Spädning 10^4 hade $2,0 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^5$ cDNA kopior (Figur 6). Lägsta koncentrationen vid 24 timmars försöket erhöles vid spädning 10^5 och var på $1,4 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$ cDNA kopior (Figur 6). Vid 8 timmar sågs den högsta koncentration av virusymp med spädning 10^0 på $2,0 \times 10^6 \pm 4,0 \times 10^5$ cDNA kopior, respektive den lägsta vid spädning 10^4 på $6,0 \times 10^2 \pm 5,0 \times 10^1$

cDNA kopior (Figur 6). Vid 4 timmar sågs den högsta koncentration av virusymp med spädning 10^0 på $33 \times 10^3 \pm 4,0 \times 10^3$ cDNA kopior, respektive den lägsta vid spädning 10^2 på $9,0 \times 10^2 \pm 4,0 \times 10^2$ cDNA kopior (Figur 6). Determinationskoefficienten (R^2) vid 4 timmars försöket gav ett värde på 1,0 och 8 timmars försöken gav en R^2 värde på 0,983 (Figur 6).



Figur 6. Antal cDNA vid tre olika tidpunkter (2, 8 och 24h) i cellkulturer som infekterats med olika spädningar av virus.

4. Diskussion

Resultaten från denna metod, där man använder olika startkoncentrationer av murint norovirus för att infektera musmakrofager för att följa virusets negativa-RNA mängd över tid, har gett insikt i hur utvecklingen av intracellulärt virus minus-RNA utvecklas under aktiv norovirus-infektion. Minus-RNA ökade exponentiellt under de kortare inkubationstiderna 4 respektive 8 timmar. Den högsta ympen av viruspartiklar (ospätt prov) gav den högsta koncentrationen minus-RNA, men en inkubering på över 8 timmar gav inte högre antal cDNA kopior. Resultaten visar också att den högsta virusspädningen (10^5) som gav infektion, bara genererade detekterbart cDNA efter 24 timmars infektionstid. Med utgångspunkt från resultaten kan framtida försök tidsoptimeras gentemot ingående viruskoncentration. Exempelvis skulle man i framtida försök med känd startkoncentration av viruspartiklar minska tiden för virusinfektion till 6 timmar och därmed kan detta steg genomföras under en arbetsdag.

Metoden som helhet var stabil och reproducerbar, för även om vissa resultat inte blev som förväntat kunde man se tydliga trender. Vid första försöket erhöles ett exponentiellt förhållande av cDNA mellan spädningarna med determinationskoefficient för den exponentiella utvecklingen mycket nära ett efter 4 och 8 timmars infektionstid. Vidare var den högsta kvantifierbara koncentrationen av proven vid första försöket 33×10^6 respektive 8×10^6 cDNA kopior för det andra försöket. Skillnaden mellan dessa försök är $\text{Log}_{10} < 1$ vilket kan anses som reproducerbart.

I denna studie har tre standardkurvor gjorts och vid dessa tillfällen har den lägsta standardkoncentrationen på 25 cDNA/ μl kunnat detekteras vid alla tillfällen. Metoden med standardkurvor med koncentrationer från $2,5 \times 10^6$ cDNA/ μl ner till 25 cDNA/ μl är en vid laboratoriet beprövad metod, där lägsta koncentrationen 25 cDNA/ μl ofta blir kvantifierbar efter 42 cykler eller något lägre.

Effektiviteten vid qPCR bör ligga högt och önskvärt för alla qPCR analyser är 100 % effektivitet. 100 % effektivitet uppnås när en dubbling av DNA sker mellan varje cykel. Effektiviteten för våra försök låg på $71 \% \pm 3 \%$, denna effektivitet är inte optimal men efter tidigare optimeringsförsök av forskargruppen som studien utförs hos fås inte högre värde och den troligaste orsaken till den relativt låga effektiviteten antas vara primerdesignen. Fört att kunna utvärdera ett experiment och exempelvis dess effektivitet bör till exempel MIQE guiden följas (Bustin et al. 2009). Till detta experiment kan dock

en lägre effektivitet vara godtagbar, då mätresultaten ligger på höga värden och var därmed inte så känslig. Detta medför att 71 % effektivitet kan vara accepterad. Vid suboptimal effektivitet, ska inte effektiviteten variera mer än 10 % för att vara acceptabel (Life Technologies Corporation 2012) och experimentets variation var ± 3 %.

Vid RT steget gjordes ingen kontroll av cDNA mängd. Självprimning kan vara ett problem som kan uppstå vid RT steget av cDNA tillverkning (Tuiskunen et al. 2010), dvs replikeringen av cDNA sker oberoende av primers. Resultaten från outspätt prov (spädning 10^0) och spädning 10^1 där dessa värden förväntades generera de högsta cDNA kopiorna respektive näst högsta cDNA kopiorna i intervallet, men där spädning 10^2 genererade flest cDNA kopior, kan bero på självprimning, där enkelsträngade RNA molekyler dels kan ha basparat med sig själva, dvs en amplifiering kan ske utan primers, men också att de positiva och negativa RNA strängarna kan ha bildat dubbelsträngat RNA, vilket kan störa amplifieringen. En annan förklaring kan vara nedbrytning av RNA i vissa spädningsrör, då RNA i regel är en molekyl som degraderas fort *in vivo*, speciellt om man inte lyckats inhibera eller förhindra RNase aktiviteter (Doma & Parker 2007).

Primerdesignen till denna studie var av typen taggad primer, vilket helt kan dämpa inhiberande effekt p.g.a. falsk-priming i RT steget (Plaskon et al. 2009), RT steget kördes också med temperaturen 65 °C, vilket har visats ge reducerat antal hårnåls-loopar och höjer därmed effektiviteten av transkriberingen (Tuiskunen et al. 2010).

Det finns andra qPCR tekniker som skulle ha kunnat användas för att detektera MNV, exempelvis TAT peptide-delivered molecular beacons (Ganguli et al. 2011), där man utöver specifika primers använder en prob som består av en nukleinsyrasträng med en fluorofor i ena änden och en quencher i den andra änden. När proben basparar med en komplementär sträng börjar den spontant fluorescera (Tyagi & Kramer 1996). Man kan också använda TaqMan teknik som också har specifika primers och prob, där proben likt TAT peptide-delivered molecular beacons, har en fluorofor i ena änden och en quencher i den andra. Dock börjar denna prob fluoresera när den släpper från den komplementära strängen som den basparar med, vilket sker när målsträngen transkriberas med hjälp av primrarna och därmed trycker undan proben (Strachan & Read 2010). TaqMan tekniken finns utvecklad för MNV (Kitajima et al. 2010). Vidare skulle man ha kunnat göra en plaque assay (Baert et al. 2008) för att fenotypiskt följa infektionsförloppet. Metoden baseras på att en spädsérie av virus tillsattes till en agarosplatta innehållande murina

makrofagceller (RAW 264.7) och tillväxtmedel. Infekterade celler lyserar och detta skapar cirkelformade mönster som kan visuellt avläsas och som används för att beräkna plackbildande enheter (PFU) (Gonzalez-Hernandez et al. 2012). Molekylärt baserad detektion genom RT-qPCR anses dock vara den en bättre metoden med högre känslighet vid detektion och reproducerbarhet än plaqua analys (Vashist et al. 2012).

Denna studie borde i framtiden kunna användas som mall för planering av utförande vid framtida studier. Exempelvis om virus-koncentrationen är låg behöver inkubation ske i minst 24 timmar. Om virus-koncentrationen däremot är hög kan försöket ske över dagen med 6 timmars inkubering. Denna studie borde också kunna användas som hjälpmedel för planering hur många spädningar som kommande försök kan tänkas använda. Elva spädningar skulle kunna reduceras ner till 3 till 4 stycken. Ett annat tänkbart scenario är att om koncentrationen virus är låg, kanske en uppkoncentrering är att föredra innan försöket genomförs.

5. Slutsats

Koncentrationen minus-RNA i de infekterade cellerna ökar mellan de undersökta tiderna 4, 8 och 24 timmar och efter 4 och 8 timmar fanns ett exponentiellt samband. Det krävdes 4 timmar för en ymp med hög viruskoncentration för att negativt virus RNA ska bli kvantifierbart, medan det krävs 24 timmar för en lägre ympkoncentration

Erkännanden

Jag vill ge ett stort tack till min handledare Malin Alsved på IKDC för handledarskapet och hennes intresse för vintersjukdomar. Även Jakob Löndahl på IKDC och hans intresse för vintersjukdomar. Hade inte deras intresse funnits hade inte mitt intresse för vintersjukdomar, såsom vinterkräksjukan kunnat leda till detta examensarbete. Jag vill också tacka Fariba Vaziri-Sani för hennes hjälp och positiva attityd till mina idéer till examensarbete, och för hennes hjälp att hitta till Jakob och Malin. Tack också till min skrivhandledare Ann-Sofi Rehnstam-Holm. Jag vill tacka Patrik Medstrand, Anders Widell och Sara Karlson på BMC för deras hjälp och engagemang. Tack till undervisande personal på BMA programmet HKR. Slutligen vill jag tacka min fru och mina barn.

Referenser

- Ahmed, S. M., Hall, A. J., Robinson, A. E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U. D., Koopmans, M. & Lopman, B. A. (2014). Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 14(8), ss. 725-730. doi:10.1016/S1473-3099(14)70767-4
- Atmar, R. L. et al. (2014). Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. *J Infect Dis*, 209(7), ss. 1016-22. doi:10.1093/infdis/jit620
- Baert, L., Wobus, C. E., Van Coillie, E., Thackray, L. B., Debevere, J. & Uyttendaele, M. (2008). Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl Environ Microbiol*, 74(2), ss. 543-6. doi:10.1128/AEM.01039-07
- Bustin, S. A. et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4), ss. 611-22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- CDC (2018). Norovirus Worldwide. <https://www.cdc.gov/norovirus/trends-outbreaks/worldwide.html> [2019-06-06].
- de Graaf, M., van Beek, J. & Koopmans, M. P. (2016). Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat Rev Microbiol*, 14(7), ss. 421-33. doi:10.1038/nrmicro.2016.48
- Doma, M. K. & Parker, R. (2007). RNA quality control in eukaryotes. *Cell*, 131(4), ss. 660-8. doi:10.1016/j.cell.2007.10.041
- Ganguli, P. S., Chen, W. & Yates, M. V. (2011). Detection of murine norovirus-1 by using TAT peptide-delivered molecular beacons. *Appl Environ Microbiol*, 77(15), ss. 5517-20. doi:10.1128/AEM.03048-10
- Glass, R. I., Parashar, U. D. & Estes, M. K. (2009). Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med*, 361(18), ss. 1776-85. doi:10.1056/NEJMra0804575
- Gonzalez-Hernandez, M. B., Bragazzi Cunha, J. & Wobus, C. E. (2012). Plaque assay for murine norovirus. *J Vis Exp*, (66), s. e4297. doi:10.3791/4297
- Hardy, M. E. (2005). Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett*, 253(1), ss. 1-8. doi:10.1016/j.femsle.2005.08.031
- Hoffmann, S., Batz, M. B. & Morris, J. G., Jr. (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J Food Prot*, 75(7), ss. 1292-302. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-417
- Jordbruksverket (2019). Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd om försöksdjur. SJVFS 2019:9. <http://www.jordbruksverket.se/> [2019-05-20].
- Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J. & Virgin, H. W. t. (2003). STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*, 299(5612), ss. 1575-8. doi:10.1126/science.1077905
- Kitajima, M., Oka, T., Takagi, H., Tohya, Y., Katayama, H., Takeda, N. & Katayama, K. (2010). Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *Journal of Virological Methods*, 169(2), ss. 269-273. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.018>
- Kroneman, A. et al. (2008). Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol*, 46(9), ss. 2959-65. doi:10.1128/JCM.00499-08

- Larsson, C., Andersson, Y., Allestam, G., Lindqvist, A., Nenonen, N. & Bergstedt, O. (2014). Epidemiology and estimated costs of a large waterborne outbreak of norovirus infection in Sweden. *Epidemiology and Infection*, 142(3), ss. 592-600. doi:10.1017/S0950268813001209
- Life Technologies Corporation (2012). Using TaqMan® Endogenous Control Assays to select an endogenous control for experimental studies. <https://www.thermofisher.com/se/en/home/life-science/m/pcr/improving-real-time-pcr-performance.html> [2019-05-30].
- Marionneau, S., Ruvoen, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A., Ruiz-Palacois, G., Huang, P., Jiang, X. & Le Pendu, J. (2002). Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*, 122(7), ss. 1967-77.
- McFadden, N. et al. (2011). Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS Pathog*, 7(12), s. e1002413. doi:10.1371/journal.ppat.1002413
- Plaskon, N. E., Adelman, Z. N. & Myles, K. M. (2009). Accurate Strand-Specific Quantification of Viral RNA. *PLOS ONE*, 4(10), s. e7468. doi:10.1371/journal.pone.0007468
- Santiana, M. et al. (2018). Vesicle-Cloaked Virus Clusters Are Optimal Units for Inter-organismal Viral Transmission. *Cell Host Microbe*, 24(2), ss. 208-220 e8. doi:10.1016/j.chom.2018.07.006
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L. & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*, 17(1), ss. 7-15. doi:10.3201/eid1701.P11101
- 10.3201/eid1701.091101p1
- Seitz, S. R. et al. (2011). Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Appl Environ Microbiol*, 77(19), ss. 6884-8. doi:10.1128/AEM.05806-11
- Strachan, T. & Read, A. P. (2010). *Human molecular genetics*. 4 upplagan uppl. New York: Garland Science.
- Taube, S. et al. (2009). Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. *J Virol*, 83(9), ss. 4092-101. doi:10.1128/JVI.02245-08
- Teunis, P. F. M., Moe, C. L., Liu, P., E. Miller, S., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J. & Calderon, R. L. (2008). Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology*, 80(8), ss. 1468-1476. doi:10.1002/jmv.21237
- Thorne, L. G. & Goodfellow, I. G. (2014). Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology*, 95(2), ss. 278-291. doi:doi:10.1099/vir.0.059634-0
- Tuiskunen, A., Leparac-Goffart, I., Boubis, L., Monteil, V., Klingstrom, J., Tolou, H. J., Lundkvist, A. & Plumet, S. (2010). Self-priming of reverse transcriptase impairs strand-specific detection of dengue virus RNA. *J Gen Virol*, 91(Pt 4), ss. 1019-27. doi:10.1099/vir.0.016667-0
- Tyagi, S. & Kramer, F. R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 14(3), ss. 303-8. doi:10.1038/nbt0396-303
- Vashist, S., Urena, L. & Goodfellow, I. (2012). Development of a strand specific real-time RT-qPCR assay for the detection and quantitation of murine norovirus RNA. *J Virol Methods*, 184(1-2), ss. 69-76. doi:10.1016/j.jviromet.2012.05.012

- Wobus, C. E. et al. (2004). Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol*, 2(12), s. e432. doi:10.1371/journal.pbio.0020432
- Wobus, C. E., Thackray, L. B. & Virgin, H. W. t. (2006). Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol*, 80(11), ss. 5104-12. doi:10.1128/JVI.02346-05