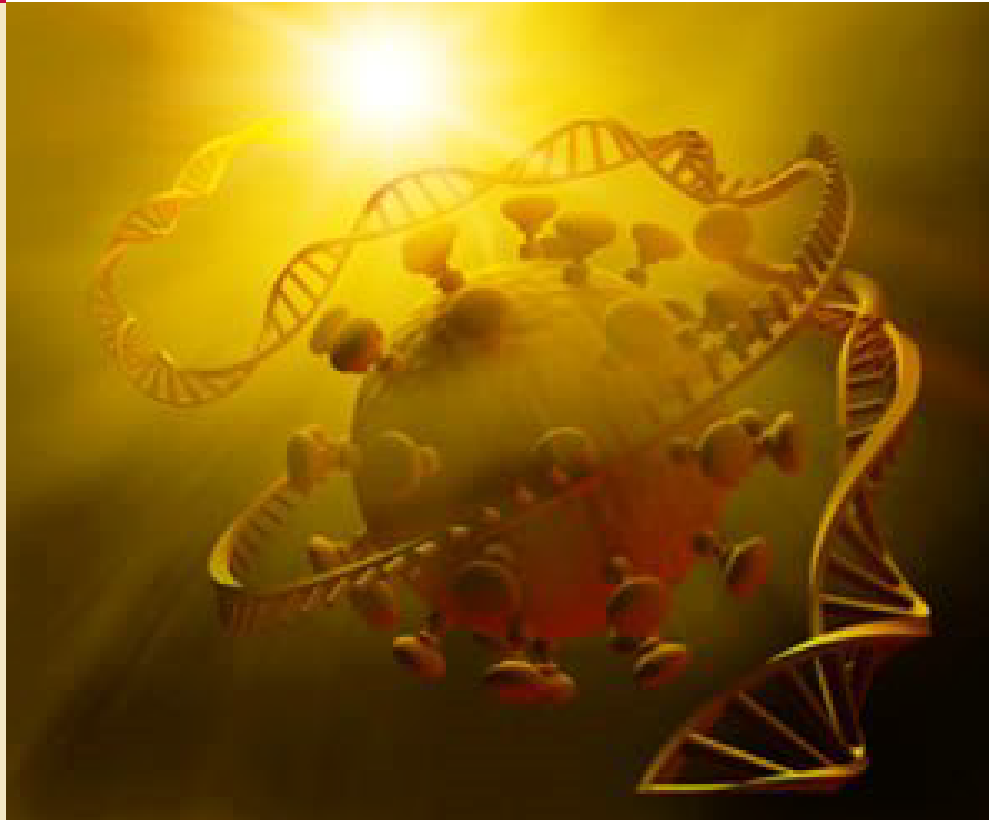


Mastergradsoppgave

Moustafa Gibory

Påvisning av to forskjellige virusagens ved  
Real-time PCR - Tick-borne  
encephalitis virus og  
Cytomegalovirus



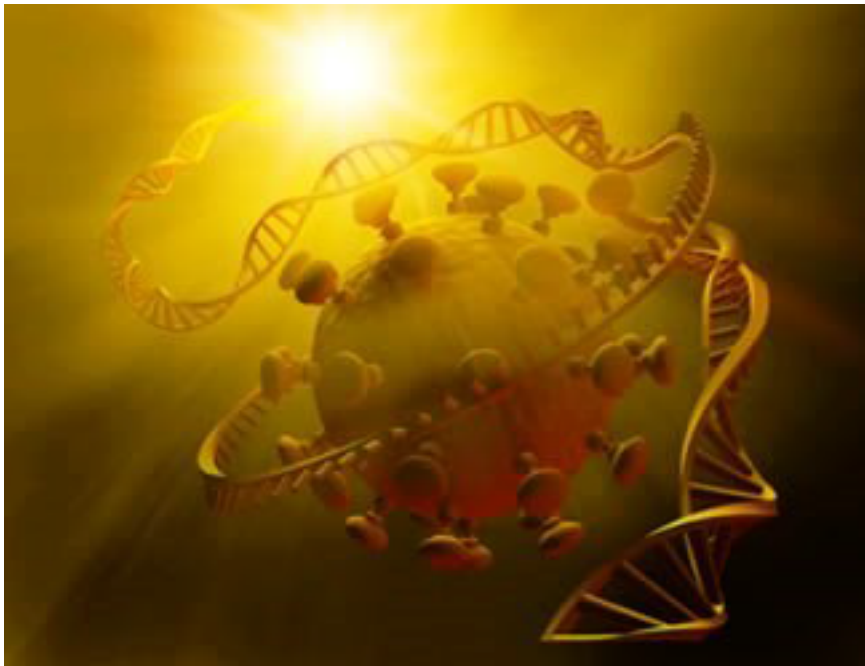
**Høgskolen i Telemark**

Fakultet for allmennvitenskapelige fag

Masteroppgave i Natur Helse og Miljøfag

Moustafa Gibory

Påvisning av to forskjellige virusagens ved  
Real-time PCR - Tick-borne encephalitis virus  
og Cytomegalovirus .



Høgskolen i Telemark  
Avdeling for allmennvitenskapelige fag  
Fakultet for natur-, helse - og miljøfag  
Hallvard Eikas plass  
3800 Bø i Telemark

<http://www.hit.no>

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng

© Rettigheter etter lov om åndsverk: Moustafa Gibory

Trykket ved Høgskolens kopisenter i Bø

Omslagsfoto/ -illustrasjon: [codiagnostics.com](http://codiagnostics.com)

# Forord

Denne masteroppgaven er skrevet for Institutt for natur, helse- og miljøvern (INHM) ved Høgskolen i Telemark, avdeling Bø, men praktiske arbeidet ble utført ved Avdeling for virologi, Divisjon for Smittevern ved Folkehelseinstitutt-Oslo.

Jeg vil rette en stor takk til mine to svært flinke veiledere ved FHI, Åshild Andreassen og Kirsti Vainio som har alltid hatt tid til overs for spørsmål og ikke minst for fantastisk hjelp med sine engasjement, sterke faglige kompetanse og utformingen av oppgaven. Dette har vært til utrolig stor hjelp for meg.

Jeg vil takke også min internveileder ved HiT, Mona Sæbø, for kjempe god veiledning og fantastisk opplæring.

En takk må også rettes til alle ansatte ved avdeling for virologi ved FHI for en kjempe bra samarbeid og morsom tid både på laboratorium og i fritida.

I tillegg vil jeg takke også den mikrobiologiske avdelingen ved Rikshospitalet for CMV prøvene vi fikk av dem og samarbeidet angående CMV del av denne oppgaven.

Sist, men ikke minst vil jeg rette en kjempe stor takk til min fantastiske kone, Refah, for all tålmodighet og støtten i veldig vanskelig tid og for at du tok stort ansvar for barn og hjem.

Oslo, juli 2013

Moustafa Gibory

# Innholdsfortegnelse

<b>Innholdsfortegnelse</b> .....	4
<b>Sammendrag</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	7
<b>Forkortelser og ordforklaringer</b> .....	8
<b>Hensikten med oppgaven</b> .....	11
<b>1 Innledning</b> .....	12
1.1 Virus .....	12
1.1.1 Virus replikasjon .....	14
1.2 Tick-borne encephalitis-virus .....	15
1.2.1 Virus struktur .....	16
1.2.2 TBEV infeksjon og symptomer .....	17
1.2.3 TBEV epidemiologi .....	17
1.2.4 TBEV Smittemåter .....	18
1.2.5 Flått og flåttarter .....	18
1.3 Cytomegalovirus .....	20
1.3.1 Virus struktur .....	20
1.3.2 CMV infeksjon og symptomer .....	21
1.3.3 CMV smittemåte .....	21
1.3.4 CMV utbredelse/epidemiologi .....	21
1.4 Bakgrunn og beskrivelse av PCR, Real-time PCR og Pyrosekvensering.....	22
1.4.1 Polymearse Chain Reaction (PCR) .....	22
1.4.2 Nested-PCR .....	23
1.4.3 Real-time PCR .....	23
1.4.4 Pyrosekvensering .....	25
<b>2 Materiale og metoder</b> .....	27
2.1 Materiale og metoder for TBEV .....	27
2.1.1 TBEV materiale .....	27
2.1.2 TBEV metoder .....	28

2.1.2.1 Innsamling av flått .....	28
2.1.2.2 Nukleinsyre (RNA) isolasjon fra flått (nymfer) .....	29
2.1.2.3 Revers Transkripsjon PCR (RT-PCR) .....	30
2.1.2.4 Real-time PCR for TBEV påvisning .....	30
2.1.2.5 Pyrosekvensering analyse for bekreftelse av positive Real-time PCR.....	32
2.1.2.6 Beregning av prøve størrelse og estimert pooled prevalens (EPP) .....	33
2.2 Materiale og metoder for CMV .....	33
2.2.1 CMV materiale .....	33
2.2.2 CMV metoder .....	35
2.2.2.1 Nukleinsyre (DNA) isolasjon .....	35
2.2.2.2 Real-time PCR for CMV påvisning .....	36
<b>3 Resultater</b> .....	38
3.1 TBEV påvisning resultater.....	38
3.2 CMV påvisning resultater .....	40
<b>4 Diskusjon</b> .....	44
4.1 TBEV .....	44
4.2 CMV .....	51
<b>5 Konklusjon</b> .....	54
5.1 TBEV .....	54
5.2 CMV .....	54
<b>Referanser/litteraturliste</b> .....	55
<b>Appendiks</b> .....	62
A. Flowskjema arbeid for TBEV .....	62
B. Flowskjema arbeid for CMV .....	63
C. RNeasy mini Kit for opprensing av total RNA fra dyreceller og vev .....	64
D. TBEV PCR standard reagensmengder oppsettet og betingelsene .....	67
E. Prosedyren til pyrosekvenseringen .....	70
F. CMV nukleinsyre isoleringsmetoder .....	74
G. CMV PCR standard reagensmengder oppsettet og betingelsene.....	76
H. CMV PCR tillegg resultat.....	77

# Sammendrag

Et virus er et lite smittestoff som kun kan reprodusere inne i levende celler i en vertsorganisme. Virus kan infisere alle typer organismer som dyr, planter og bakterier. De finnes nesten i alle økosystemer på jorda, og er den mest tallrike type biologisk enhet.

Virusene kan enten inneholde DNA eller RNA som genetisk materiale og deles i to hovedgrupper; RNA-virus og DNA-virus..

Virus kan påvises ved Real-time PCR metoden, som i denne oppgaven ble brukt til å undersøke to forskjellige virus agnes; Tick-borne encephalitis virus (TBEV) som er et RNA-virus og Cytomegalovirus (CMV) som er et DNA-virus.

Tick-borne encephalitis (TBE), som forårsakes av infeksjon med TBEV, er blant de viktigste vektorbårne sykdommer hos mennesker i Europa, og er i dag identifisert som et stort helseproblem i mange land inkludert Norge. Forekomsten av TBEV i flåtten *Ixodes ricinus* ble undersøkt i 4 utvalgte lokaliteter langs kysten av Sør-Norge. Totalt ble 1630 flått innsamlet i 2011 og 2840 innsamlet i 2012 og analysert med in-house TBEV Real-time PCR.

Resultatene fra denne delen av oppgaven bekrefter forekomst av TBEV i Norge og det ble ikke påvist TBEV frie lokaliteter i Sør-Norge. Resultatene viser også en årlig variasjon i TBEV forekomsten i flått innen samme lokalitet.

Cytomegalovirus (CMV) er et herpes virus som er utbredt i dyr og mennesker. Ca. 50-60 % av befolkningen i Norge er smittet med CMV ved 20 års alder. Viruset kan overføres gjennom forskjellige måter blant annet direkte kontakt og gjennom kroppsvæsker som f.eks. spytt, urin, morsmelk og blodoverføring samt transplantasjon.

Det ble etablert en Real-time PCR metode som en del av denne oppgaven for påvisning av CMV i forskjellige prøvemateriale (serum, urin og spinalvæske) og med forskjellige nukleinsyre ekstraksjonsmetoder. I tillegg ble metoden testet for spesifisitet mot andre virus agens.

Resultatene fra denne delen av oppgaven viser at den etablerte/modifiserte metoden fungerte bra og har god sensitivitet og spesifisitet.

# Abstract

A virus is a small infectious agent that can reproduce within living cells in an organism. Viruses infect all types of organisms such as animals, plants and bacteria. They are found in almost every ecosystem on Earth and are the most abundant type of biological entity.

The viruses may contain either DNA or RNA as genetic material and therefore are divided into two main groups depending on the nucleic acid they contain.

One of virus detection methods is Real-time PCR, which was used to investigate viral nucleic acid (RNA or DNA) of two different virus agents; Tick-borne encephalitis virus (TBEV) and Cytomegalovirus (CMV), respectively.

Tick-borne encephalitis (TBE) is among the most important vector-borne diseases for humans in Europe, and is currently identified as a major health problem in many countries including Norway. We investigated the prevalence of TBEV in ticks (*Ixodes ricinus*) in four selected locations along the coast of Southern Norway. A total of 1630 nymphs ticks were collected in 2011 and 2840 in 2012 were selected for further analysis by in-house TBEV Real-time PCR.

The results from this part of the study confirm the existence of TBEV foci in Norway. No localities without TBEV in ticks were discovered in these four locations. The results also showed a year to year variation in the number of TBEV positive pools of ticks at the same location.

Cytomegalovirus (CMV) is a herpes virus widespread in animals and humans. Approx. 50-60% of Norway's population infected with CMV at 20 years of age. The virus can be transmitted through various ways including direct contact and body fluids such as saliva, urine, breast milk and blood transfusion as well as transplantation.

We established a Real-time PCR method as a part of this task for the detection of CMV in different specimens (serum, urine and cerebrospinal fluid) and using different nucleic acid extraction methods. In addition, the method was tested for specificity against other viral agents.

The result from this part of the study shows that the established / modified method worked well with a good sensitivity and specificity.



# Forkortelser og ordforklaringer

**Agens** - Fellesbetegnelse på virus, bakterier og parasitter som kan forårsake sykdom.

**Amplifisering** - En metode for å lage flere kopier av et bestemt segment av DNA.

**Annealing** - PCR trinnet der primeren fester seg til DNA tråden (=templat) når temperaturen senkes til ca. 50-65°C.

**cDNA** - Enkeltrådet DNA som er laget ved å bruke RNA som templat.

**CMV** - Cytomegalovirus, et DNA-virus i gruppen herpesvirus og som er svært utbredt blant mennesker og dyr.

**Ct-verdi** - (Terskelverdi, Threshold cycle) Ct verdien til en prøve gir uttrykk for det antallet sykluser som skal til før en gitt mengde PCR-produkt målt ved fluorescens har nådd en bestemt terskelverdi. Jo mer templat som i utgangspunktet er til stede i en prøve, jo færre PCR-sykluser skal det til før det lages påviselige mengder av PCR-produkt, og desto lavere CT verdi for denne prøven.

**Denaturering** - Betyr at dobbeltråd DNA går over til to enkeltråder ved oppvarming av reaksjonen til vanligvis 94-98°C. Dette skjer gradvis og er avhengig av lengden på DNA. Ved 94-98 grader en gitt tid er all dsDNA gått over til ssDNA.

**DNA (deoksyribonukleinsyre, deoxyribonucleic acid)** - DNA er arvestoffet til de fleste levende organismer, og består av to komplementære kjeder av nukleotider. Nukleotider er byggesteiner i DNA molekylet og består av et suktermolekyl (pentose), en fosfatgruppe og en av fire forskjellige baser som kalles adenin (A), thymin (T), cytosin (C) og guanin (G).

**dNTP** - (deoksyribonukleotid) Byggestein i DNA tråden som består av ulike kombinasjoner av fire deoksyribonukleotider; dATP, dCTP, dGTP og dTTP. En deoksyribonukleotid er monomeren, eller en enkelt enhet av DNA.

**dsDNA virus** - Et virus som har en dobbeltrådig DNA som genetisk material (for eksempel CMV).

**dsRNA virus** - Et virus som har en dobbeltrådig RNA som genetisk material (for eksempel Rotavirus).

**EPP** - (Estimated Pooled Prevalence) En statistisk metode for å estimere Pooled Prevalens med konfidensgrenser.

**Gen** - Et gen er en funksjonell enhet i organismens arvemateriale og består av en sekvens nukleinsyrer som koder for et protein. En organismes arvemateriale inneholder som regel mange ulike gener.

**Genom** - En organismes arvemateriale «DNA eller RNA (kun virus)». Brukes også for å beskrive det totale genetiske materialet i virus og bakterier.

**In-house PCR** - En PCR metode som ble gjort og utviklet ved en bedrift/institusjon, den er ikke kommersielt tilgjengelig.

**IK** - (Internkontroll) Brukes blant annet til å kvalitetssikre at nukleinsyre ekstraksjon og PCR har fungert tilfredsstillende.

**Kappe** - Det er et lag som finnes i noen virus agens der viruset skaffer en ytre lipoprotein lag gjennom verten cellemembraner og er derfor kalt kappeklede virus.

**MGP** - Magnetiske glasspartikler brukt for ekstraksjon av total viral nukleinsyre i MagNA Pure plattformen. DNA/RNA i prøven bindes til overflaten på kulene.

**mRNA** - Messenger RNA (budbringer RNA). En type RNA som er kopiert fra DNA og deltar i proteinsyntesen.

**MSIS** - (Meldingssystem for smittsomme sykdommer) Et nasjonalt overvåkingssystemet for smittsomme sykdommer ved Folkehelseinstituttet.

**Målsekvens/templat** - (Mal) DNA eller RNA man ønsker å oppformere/kopiere.

**Nested PCR** - PCR som lager mange kopier av samme templat i to omganger. PCR produkt fra første PCR brukes som templat for andre PCR. Dette øker både sensitivitet og spesifisitet av metoden.

**Oligonukleotid** - En kort, syntetisk DNA sekvens som brukes som probe (for eksempel i Real-time-PCR) eller primer (i PCR-reaksjoner) i blant annet PCR og sekvensering.

**PCR** - (Polymerase kjede reaksjon, Polymerase Chain Reaction) En teknikk for å lage millioner av kopier av en bestemt DNA sekvens.

**Pool** - Refererer til en bestemt utvalgsstørrelse i det enkelte prøverør, i denne oppgaven antall flått i en pool.

**Pools** - Flere pool av flått.

**Primer** - Korte, syntetiske enkeltrådig DNA fragment som er nødvendig for å indusere syntese av DNA i PCR reaksjonen.

**Probe** - Kort enkeltrådig DNA fragment som er merket med et fluoriserende fargestoff og som binder seg til sin komplementære DNA sekvenser i amplifisert templat i en DNA prøve.

**Quencher** - Quenching (hemmer) refererer til enhver prosess som reduserer fluorescens intensiteten av en gitt substans i forhold til PCR.

Så lenge fluoroforen og Quencher (hemmeren) er i nærhet, hemmer quencher eventuelle fluorescens-signaler. Eksempel er BHQ1 quencher molekyl festet til probens i en Real-time PCR reaksjon.

**Real-time PCR (sanntids-PCR)** - Dette er en PCR metode der produktet kvantifiseres for hver syklus i PCR-reaksjonen. Dette gjøres oftest ved hjelp av en merket probe som binder til PCR-produktet slik at fluoriserer når PCR-produktet oppformes og frigjøring av reporteren.

**Reporter** - Fluorescerende fragmenter inkluderer fargestoffer som binder seg til den dobbeltrådig DNA (f.eks. SYBR® Green) eller sekvens spesifikke prober (f.eks. Molecular Beacons eller TaqMan® prober). Påvisning av fluorescensen som produseres av en reporter molekyl øker proporsjonelt som reaksjonen fortsetter.

**RNA (ribonukleinsyre, ribonucleic acid)** - RNA er en nukleinsyre som finnes både i cellekjernen og i cytoplasma, samt utgjør genomet til RNA virus. I motsetning til DNA inneholder RNA uracil (dUTP) istedenfor thymin (dTTP) og forekommer vanligvis enkelttrådet. Der finnes en rekke typer RNA, men de vanligste er mRNA (messenger RNA), tRNA (transfer RNA) og rRNA (ribosomal RNA).

**RT- PCR** - Revers transkripsjon-Polymerase Chain Reaction, der RNA tråd blir oversatt til komplementær DNA, cDNA, ved bruk av enzymet revers transkriptase. (Den resulterende cDNA blir amplifisert ved hjelp av PCR).

**ssDNA virus** - Et virus som har en enkelttrådig DNA som genetisk material (for eksempel Parvovirus).

**ssRNA virus** - Et virus som har en enkelttrådig RNA som genetisk material (for eksempel Flavivirus).

**TBE** - Tick-borne encephalitis (norsk, Skogflåttencefalitt), et smittomt virus sykdom som involverer sentralnervesystemet (encefalitt). TBE forårsakes av TBE-virus (TBEV).

**TBEV** - (Tick-borne encephalitis virus (norsk, Skogflåttencefalitt-virus), et RNA-virus i familien Flaviviridae som forårsaker TBE.

**TBEV foci** - Avledet fra ordet Focus, et lite avgrenset området der man finner flått med TBEV.

**Vektor** - En vektor er en organisme som bærer/overfører et agens fra vert til vert.

**Vert** - En vertsorganisme er en levende celle hvor et virus kan leve i og reprodusere seg ved å bruke cellens næring og komponenter. For eksempel flått er vektor for TBEV, men mus og hjort er vert for flåtten.

**Virion** - Beskriver helt virus partikkelen, bestående av et ytre protein skall (kapsid) som omgir genomet (RNA eller DNA).

# Hensikten med oppgaven

Hovedmålet med oppgaven er å påvise to forskjellige virus (RNA- og DNA virus) med Real-time PCR.

## **Hovedmål 1:**

Studie av utbredelse av Tick-borne encephalitis virus (TBEV) i flått innsamlet fra utvalgte områder på Sørlandet med Real-time PCR og Pyrosekvensering.

- Delmål 1: Studere områder som er kjent for å ha TBEV i flått, i tillegg til nye områder langs sørlandskysten der vi per i dag har liten kunnskap om TBEV i flått.
- Delmål 2: Undersøke om TBEV prevalensen i flått varierer innenfor samme lokalitet fra år til år.

Hensikten med denne delen av oppgaven er å få en oversikt over områder hvor det er risiko for human smitte av TBEV og å se hvilke variabler som kan forklare eventuelle endringer av TBEV prevalensen i flått fra år til år. Data fra denne kartleggingen vil også kunne brukes til vaksineanbefalinger.

## **Hovedmål 2:**

Påvise cytomegalovirus (CMV) i ulike prøvematerialer (serum, urin og spinalvæske), med spesifikke fordypnings mål:

- Delmål 1: Etablere en Real-time PCR metode for påvisning av CMV i små mengder prøvemateriale.
- Delmål 2: Sammenlignbare resultater oppnådd med/uten bruk av internkontroll i ekstraksjons trinn.
- Delmål 3: Sammenligne resultater oppnådd med/uten bruk av internkontroll i PCR trinnet.
- Delmål 4: Påvisning av CMV med Real-time PCR i forskjellig prøvematerialer og ved bruk av ulike ekstraksjonsmetoder.
- Delmål 5: Sammenligne sensitivitet av nested PCR og Real-time PCR for påvisning av CMV.
- Delmål 6: Undersøke spesifisiteten av Real-time PCR for påvisning av CMV.

# 1 Innledning

## 1.1 Virus

Et virus er et biologisk agens som reproduserer i cellene til levende vertsceller. I motsetning til de fleste levende organismer er virus avhengig av andre celler for å dele seg. Nye virus partikler settes sammen av komponenter (genom, kapsid og ytre lipoprotein lag «kappe») fra den infiserte vertscellen og avhenger av replikasjon i cellen. Dette skyldes at virus ikke har egen metabolisme, dvs. at virus er parasitter som er helt avhengig av vertscellen for replikering og transkripsjon av sitt genom samt for å oversette mRNA til protein (Knipe and Howley 2007).

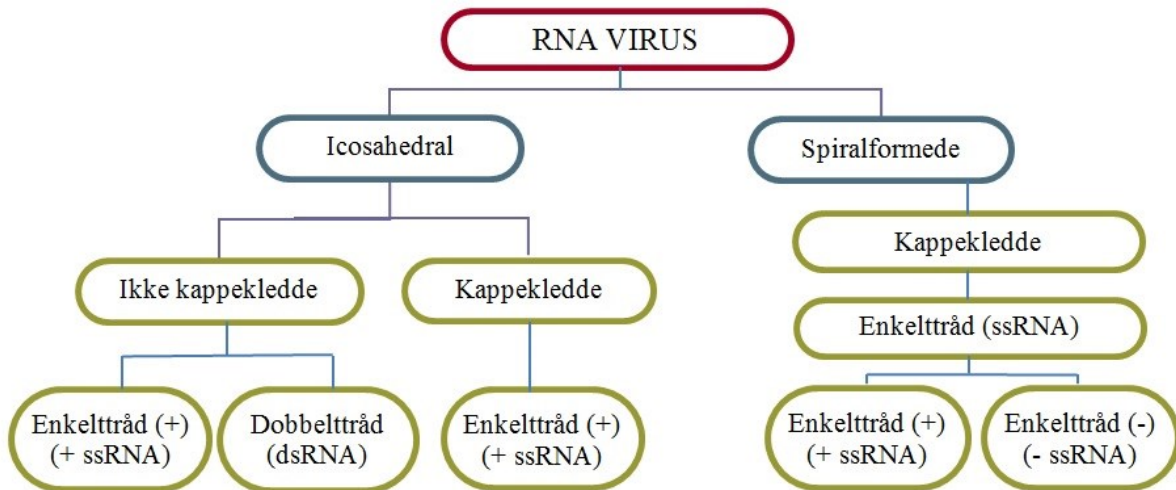
Virus varierer i form fra spiralformede (eks. Coronavirus) og icosahedral (eks. Rotavirus) til mer komplekse strukturer (eks. Poxvirus). Virus er omtrent 100 ganger mindre enn bakterier, og de fleste varierer i størrelse mellom 5-300 nanometer (Madigan et al. 2003; Knipe and Howley 2007).

Virus deles i to hovedgrupper basert på deres genetiske materiale. Virus genomet består av enten RNA eller DNA, som kan være enkelt- eller en dobbelt-trådig.

RNA virus har RNA (ribonukleinsyre) som sitt genetiske materiale. Deres nukleinsyre er vanligvis enkelttrådet RNA (ssRNA, eks. Retrovirus), men det kan også være dobbelt-trådet RNA (dsRNA, eks. Reovirus).

ssRNA virus kan enten bestå av en positivtråd (sens tråd + ssRNA, eks. Togavirus) eller en negativ tråd (antisens tråd – ssRNA, eks. Arenavirus).

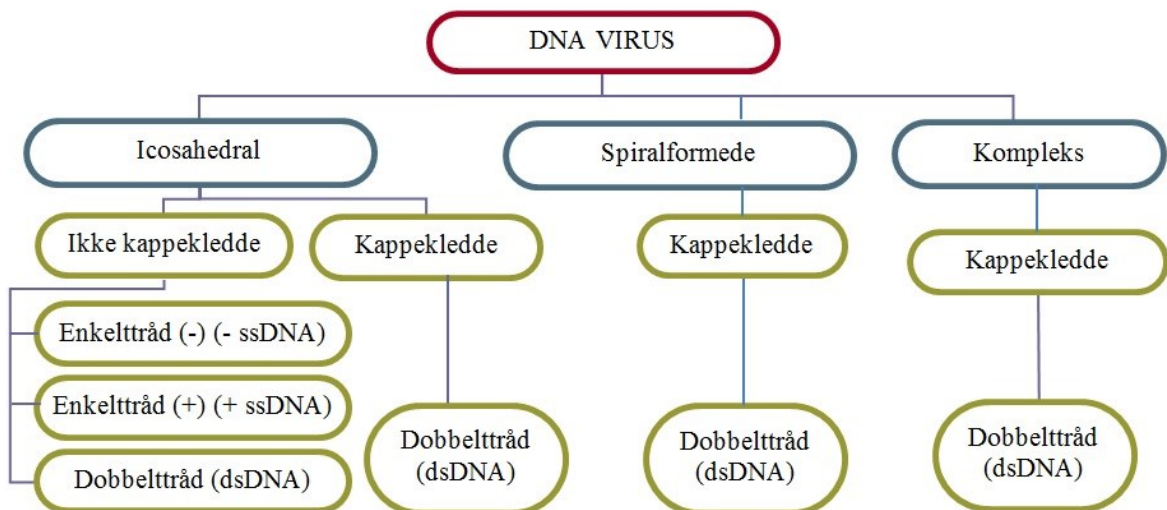
RNA replikasjonen foregår i cytoplasma og RNA har høy mutasjonsrate og derfor RNA virus er mer ustabile enn DNA virus. Noen eksempler på RNA virus er Flavivirus, Picornavirus og Coronavirus (Figur 1.1) (Madigan et al. 2003; Madigan 2006; Knipe and Howley 2007; Correa et al. 2013).



**Figur 1.1:** Enkel skjematisk fremstilling som viser inndeling av RNA virus basert på struktur og genom (Gelderblom 1996; Knipe and Howley 2007).

DNA virus har DNA (deoksyribonukleinsyre) som sitt genetiske materiale og genomet er hovedsakelig dobbeltrådet. De er store, icosahedriske med en kappe bestående av lipoproteiner. Genomet er vanligvis et enkelt molekyl.

DNA replikasjonen foregår i kjernen. Noen eksempler på dsDNA virus er Poxvirus og Herpesvirus, eksempler på ssDNA virus er Parvovirus B19 og Nanovirus (Figur 1.2) (Gelderblom 1996; Madigan et al. 2003; Madigan 2006; Knipe and Howley 2007).



**Figur 1.2:** Enkel skjematisk fremstilling som viser inndeling av DNA virus basert på struktur og genom (Gelderblom 1996; Knipe and Howley 2007).

## 1.1.1 Virus replikasjon

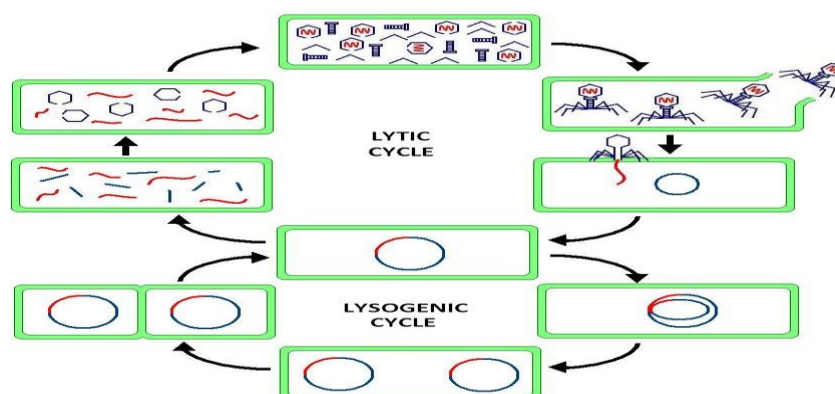
Lytisk og lysogen syklus er to forskjellige måter for virusreplikasjon. Selv om metodene er forskjellige, kan de også erstatte hverandre eller involvere begge metoder i atskilte faser (Shojaie and Dehestani 2010; Sonal 2010).

Lytisk syklus er en replikasjonsyklus der et virus overtar vertscellens genetiske materiale og bruker vertscellens strukturer og energi til å replikere inntil vertscellen ødelegges (Figur 1.3).

Den lytiske syklusen skjer når virus er i virulent fase, og symptomene på en virus infeksjon skjer når viruset er i lytisk fasen (Madigan 2006; Wang et al. 2013).

I lysogen syklus, integrere det virale DNA eller RNA (RNA må omdannes først til DNA ved hjelp av revers transkriptase) i vertens DNA som et nytt sett av gener og viruset kalles da profag (eng. Prophage) og blir en del av cellens arvemateriale.

Hver gang vertscellens DNA replikeres under celledelingen, replikeres den passive og ikke-virulente prophagen også. Dette kan endre cellens egenskaper, men uten å ødelegge den (Figur 1.3) (Madigan 2006; Sonal 2010).



**Figur 1.3: Viser forskjell mellom lytisk og lysogen virus livsyklus (Wikipedia.org).** Viruset i lytiske syklus overtar og ødelegger vertscellens genetiske material<sup>1</sup> til den cellen blir ødelagt. Men i lysyogen syklus, virus<sup>2</sup> DNA eller RNA kommer inn i vertscellen og integreres med cellens DNA uten å ødelegge den. Dvs. replikeres med vertcellen slik at vertcellen kan infisere nye celler som kan gå inn i lytisk syklus og produsere nye virus partikler med nytt genetisk innhold.

<sup>1</sup> Blå sirkel og segmenter er vertscellen genetisk material.

<sup>2</sup> Røde segmenter er genetisk material av virus.

## 1.2 Tick-borne encephalitis-virus

**Tick-borne encephalitis virus** (TBEV), (norsk - Skogflåttencefalitt-virus) ble først identifisert i Russland (Soviet Union USSR) i 1937 av professor Lev Zilber, lederen av det første medisinske virologiske laboratorium i landet.

Zilber, sammen med sin gruppe, isolerte viruset fra hjernevev til pasienter i Khabarovsk og Primorsky langt øst i Russland, og viruset fikk først navnet Russian Spring encephalitis (Zilber 1939; Kisselev et al. 1992).

TBEV er et flavivirus som tilhører familien *Flaviviridae*, og er årsak til infeksjon i sentralnervesystemet (Süss 2011).

Flaviviridae familien inneholder en rekke virus som for eksempel Gulfeber-virus (YFV), Japansk encefalittis-virus (JEV), Dengue-virus (DENV) og Saint Louis encefalittis-virus (SLEV). Disse kan forårsake mange sykdommer som Gulfeber, Japansk encefalitt og Denguefeber (Kreil et al. 1998; Heinz and Stiasny 2012).

Hovedsakelig er det identifisert tre ulike subtyper av TBEV med ulik geografisk utbredelse og ulike vektorer.

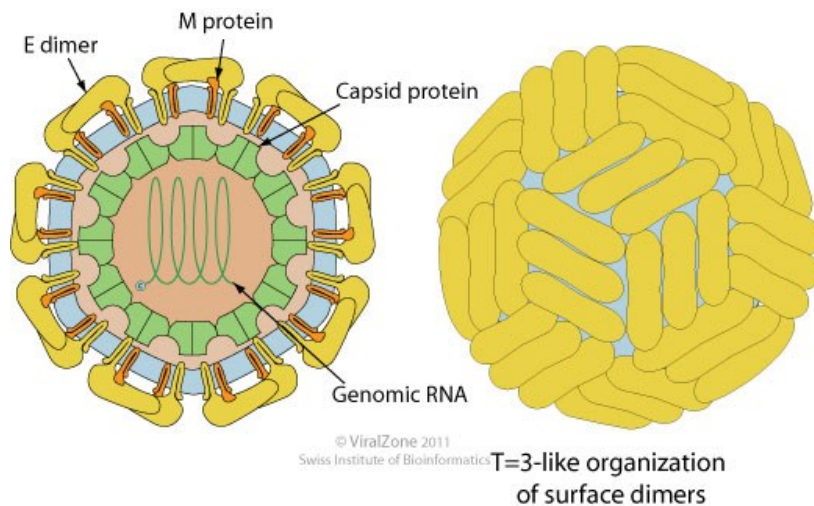
- Den vestlige/sentraleuropeiske typen (TBEV-Eu) overføres hovedsakelig med flåttarten *Ixodes ricinus* og den finnes geografisk i Europa og europeisk delen av Russland (Ecker et al. 1999; Kovalev et al. 2010).
- Den sibirske typen (TBEV-Sib) overføres via flåttarten *Ixodes persulcatus* og den finnes geografisk vanligst i Øst- og Vest-Sibir, Ural-regionen, den europeiske delen av Russland, de baltiske landene og Finland (Lundkvist et al. 2001; Kovalev et al. 2010).
- Den fjerne Østen typen (TBEV-Fe) også kalt østeuropeisk type eller Russian spring-summer encephalitis overføres også via flåttarten *Ixodes persulcatus* og finnes hovedsakelig geografisk i det russiske fjerne Østen, den østlige delen av Nord-Kina og Nord-Japan (Ecker et al. 1999; Fauquet 2005; Kovalev et al. 2010).

I Sibir er det nå publisert data som tyder på at det finnes 2 nye uavhengige genotyper (Tkachev 2013).



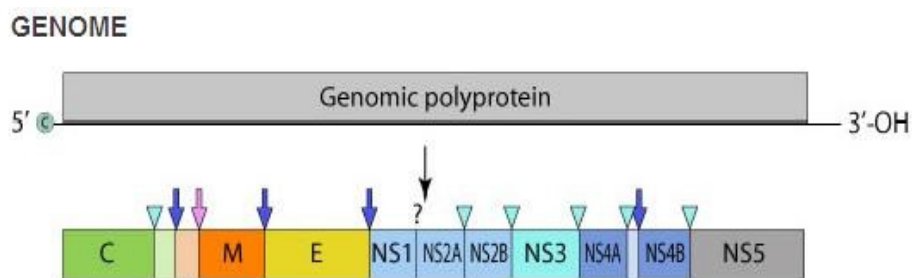
## 1.2.1 Virus struktur

TBE viruset har et positivt ssRNA genom på ca. 11 kilobaser (kb). Viruset er sfærisk (kuleformede), 40 til 60 nm i diameter (Figur 1.4) (Grard et al. 2007).



**Figur 1.4:** Viser ulike komponenter av TBE viruset (Zhang et al. 2003).

Genomet består av enkel, lang ORF (åpen leseramme) som koder for tre strukturelle proteiner (envelope E, membrane M og capsid C) og syv ikke strukturelle proteiner (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b og NS5) (Figur 1.5) (Grard et al. 2007; Mansfield et al. 2009).



**Figur 1.5:** Viser områdene som koder for de strukturelle og ikke strukturelle proteiner i flavivirus genomet (Zhang et al. 2003)

## 1.2.2 TBEV infeksjon og symptomer

Symptomer ved TBEV infeksjon kan variere fra asymptomatisk til svært alvorlig sykdom. Vanligvis deles sykdommen inn i to faser. Den første fasen starter etter 1-2 uker inkubasjonsperiode regnet fra tidspunkt for flåttbitt og varer ca. 4-5 dager. Denne fasen er assosiert med feber, hodepine og muskelsmerter. Deretter forsvinner symptomene i 3-4 dager og ca. 2/3 blir friske.

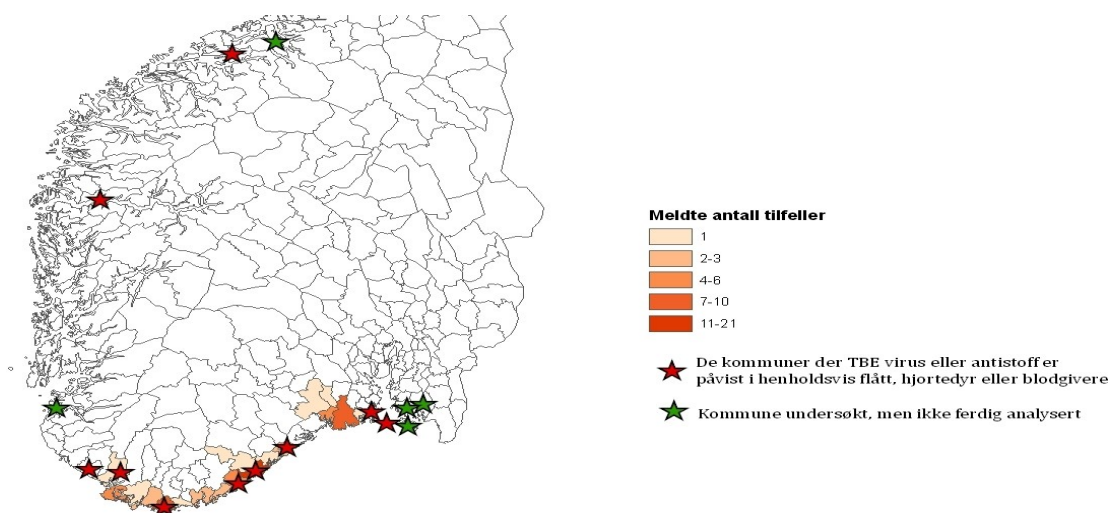
Resterende 1/3 går videre til andre fase med høy og langvarig feber som kan føre til hjernebetennelse (encefalitt) karakterisert ved symptomer som kraftig hodesmerter, søvnløshet, forvirring, kvalme, oppkast, nakkestivhet og psykiske symptomer.

Dødeligheten i Vest-Europa er mindre enn 1%. TBE har vanligvis et mildere forløp hos små barn (Skarpaas et al. 2006; Süss 2011).

## 1.2.3 TBEV epidemiologi

I Norge finner vi den vestlige/sentraleuropeiske subtypen langs kysten og tilstøtende områder i Agderfylkene, Telemark og Vestfold, og som er årsak til TBE sykdommen.

Første rapporterte tilfelle av TBE i Norge var i 1997, og ytterligere fire tilfeller ble registrert i årene 1998-2001. Alle fem tilfeller var fra Tromøya i Aust-Agder fylke i Sør-Norge (Figur 1.6) (Csango et al. 2004; Skarpaas et al. 2004; Andreassen et al. 2012).



**Figur 1.6:** Viser kommuner med tilfeller av TBE meldt Meldingssystem for Smittsomme Sykdommer (MSIS) i perioden 1994-2012. TBE forekommer langs kysten av Sør-Norge, økende farge viser økende antall tilfeller av TBE sykdommen i kommunene. Høyeste antall ble påvist i Arendal kommunen (Kartet ble laget av Emily MacDonald, FHI).

## 1.2.4 TBEV Smittemåter

TBEV overføres gjennom bitt av en infisert flått, eller i sjeldne tilfeller gjennom upasteurisert melkeprodukter fra infiserte pattedyr (Holzmann et al. 2009). Flåtten kan bli infisert gjennom blodsuging av en infisert vert eller ved co-feeding, dvs. at viruset overføres fra en infisert flått til andre ikke-infisert flått når de sitter ved siden av hverandre og suger blod fra samme vert samtidig (Hillyard 1996; Parola and Raoult 2001).

## 1.2.5 Flått og flåttarter

Det er registrert ca. 850 forskjellige flåttarter i verden, fordelt på tre familier *Ixodidae*, *Argasidae* og *Nuttalliellidae* (Soleng and Kjelland; Barker and Murrell 2008). I Norge er det registrert ca. 11 flåttarter, men bare to (Skogflått *Ixodes ricinus* og Fuglefjellflått *Ixodes uriae*) som er mest kjent for å suge blod av mennesker (Mehl 1999). Den siste nevnt Fuglefjellflått *Ixodes uriae* foretrekker fugler i fuglefjell eller i redeansamlinger i jordvoller, slik som for lundefugl. *Ixodes ricinus* er den mest vanlige flåttarten i sør-Norge (Folkehelseinstitutt 2009).

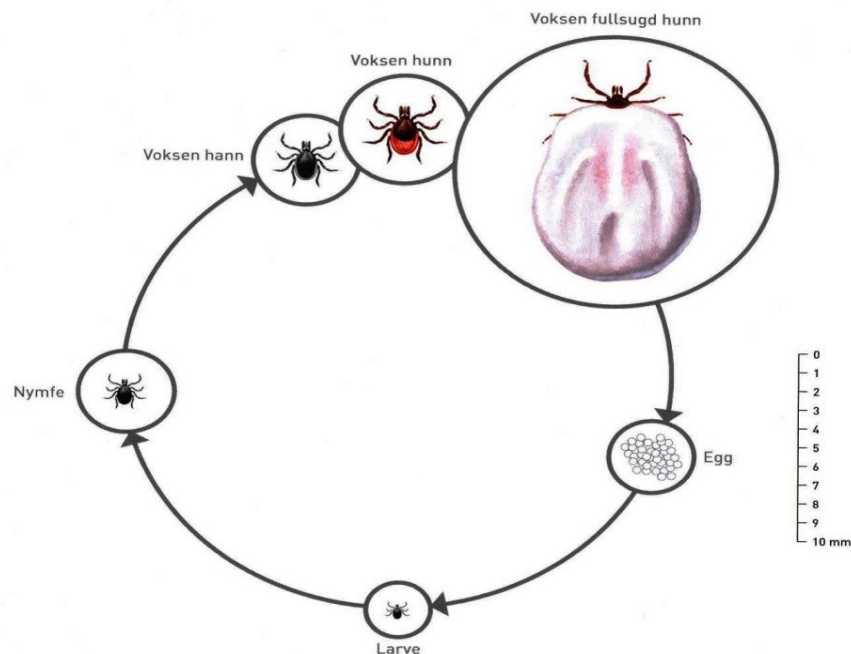
*Ixodes ricinus* er et edderkopp dyr som tilhører gruppen midd. Den er avhengig av blod fra små gnagere og hjortedyr, men kan også suge blod fra mennesker. De har 6-8 bein avhengig av hvilket utviklingsstadium den er i, og det finnes ikke noe tydelig skille linje mellom hode, bryst og bakkropp.

Den har fire utviklingsstadier kalt egg, larve, nymfe og voksen (Figur 1.7) og det tar ca. ett år mellom hvert stadium. Livssyklus tar vanligvis fra 2 til 3 år, men kan vare opptil 6 år avhengig av vektorvilkår og klima (Hillyard 1996; Parola and Raoult 2001; Folkehelseinstitutt 2009).

For at flåtten skal utvikle seg fra et stadium til det neste, må det ha et blodmåltid.

Larve er ca. 0,5 mm lang, og den har bare 6 bein, i motsetning til de andre stadier som har 8 bein. Nymfe er ca. 1 mm lang og kroppen har grå sort farge (Parola and Raoult 2001; Folkehelseinstitutt 2009).

Voksne hunner er større en voksne hanner, og er over 2 mm lange og kan bli ca. 1 cm når de er fullsugd og har svart hode og brunrød bakkropp. Voksne hanner er opptil 2 mm og har gråsvart farge (Figur 1.7) (Hillyard 1996; Folkehelseinstitutt 2009).



**Figur 1.7: Skjematisk fremstilling av livssyklusen til skogflått *Ixodes ricinus* (Elven og Ottesen, Folkehelseinstitutt 2009).** Fremstillingen viser de fire forskjellige utviklingsstadier flåtten har som er: egg, larve, nymfe og voksen.

Aktuelle vert for larver for et blodmåltid er vanligvis små pattedyr (gnagere) og fugler, aktuelle vert for nymfer er små gnagere, fugler og større pattedyr (eks. Hjortedyr, hund og katt).

Aktuelle vert for voksne hunner er større pattedyr og det er viktig for hunner å få sugd seg full av blod for å kunne legge sine 2000-4000 egg. Voksne hanner trenger ikke en vert å suge blod fra, men må finne en hunn de kan parre seg med når hunn er på en vert for å suge et blodmåltid (Hillyard 1996; Folkehelseinstitutt 2009).

## 1.3 Cytomegalovirus

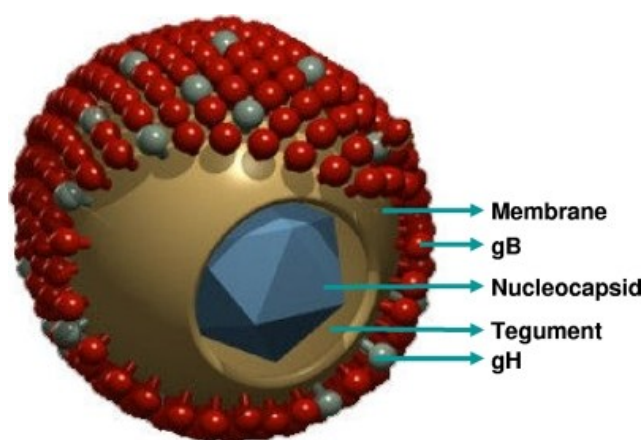
**Cytomegalovirus** (CMV) infeksjon ble første gang oppdaget av Tyske forskere i 1881, men de trodde infeksjonen skyldtes protozoer. Uavhengig av hverandre, påviste Weller, Smith og Rowe humane CMV stammer ved dyrking i cellekultur i 1956-1957. Gruppen til Weller foreslo begrepet "Cytomegalovirus" i 1960 og kunne senere isolere CMV i urin fra spedbarn med generalisert sykdom (Riley 1997). Navnet Cytomegalovirus kommer fra gresk og betyr "CYTO" - celle og "MEGALO" -stor, siden virusinfeksjonen medfører forstørrelse av cellene i forskjellige infiserte organer (Ho 2008).

### 1.3.1 Virus struktur

CMV er et dsDNA-virus som tilhører familien *Herpesviridae*. CMV er utbredt i dyr og mennesker og med et genom på ca. 235 kb er det største av de humane herpesvirusene. CMV stammene som infiserer menneske er kjent som humant CMV (HCMV) eller humant herpesvirus-5 (HHV-5), og er den mest studerte av alle CMV.

CMV virion består av et dobbelttrådet lineært DNA omgitt av et (icosahedral) nukleokapsid og en dobbeltlaget lipidmembran med glycoproteinene gB og gH, og et proteinholdig lag (Tegument) mellom kapsid og membran (Figur 1.8) (Knipe and Howley 2007).

Modne CMV virion varierer mellom 200-300 nanometer i diameter (Cha et al. 1996; Lurain et al. 2006; Crough and Khanna 2009).



**Figur 1.8:** Virtual tredimensjonal modell av CMV (Crough and Khanna 2009). Viser ulike komponenter av viruset.

### 1.3.2 CMV infeksjon og symptomer

Symptomer ved en CMV infeksjon kan forekomme både ved primærinfeksjon og reaktivering. Det er stor variasjon i symptomene (influensa- eller mononukleose liknende, hodepine, sår hals, slapphet, feber og generell glandelsvulst), men de fleste infeksjoner er asymptomatiske, særlig hos barn.

CMV infeksjon hos immunsvekkede personer (f.eks. HIV positive eller transplanterte) kan være svært alvorlig og føre til pneumoni, leverskade, encefalitt eller kolitt (Foulon et al. 2008; Folkehelseinstitutt 2010; Lashini et al. 2011).

Overføring av Cytomegalovirus fra mor til fosteret gjennom morkaken kan forårsake misdannelse hos den nyfødte som f. eks. skader i nervesystemet og død.

CMV kan være årsak til alvorlige funksjonshemninger og misdannelser hos fullbårne barn og er den ledende årsaken til medfødte døvhet (hørseltap) (Foulon et al. 2008; Zhang et al. 2010).

CMV har nå blitt en av de vanligste opportunistiske infeksjonene hos pasienter med nedsatt immunforsvar fra arvelig eller ervervet årsaker som AIDS eller transplantasjon (Riley 1997; Ho 2008).

### 1.3.3 CMV smittemåte

Overføring av viruset fra en smittet person til en mottakelig person skjer gjennom direkte kontakt og gjennom kroppsvæsker (spytt, tårer, genital sekreter, urin og morsmelk). I tillegg smitter CMV ved blodoverføring og transplantasjon, samt ved fødsel og amming. Gravide med primær- eller reaktivert infeksjon kan smitte fosteret og resultere i varige skader hos fosteret (Crough and Khanna 2009; Lashini et al. 2011).

### 1.3.4 CMV utbredelse/epidemiologi

Ca. 50-60% av befolkningen i Norge er smittet med CMV ved 20 års alder. De fleste smittes vanligvis omkring to årsalderen, eller i løpet av tenårene (Foulon et al. 2008; Folkehelseinstitutt 2010).

I likhet med andre herpesvirus forblir CMV latent i kroppen resten av livet, og viruset kan reaktiveres under spesielle forhold som for eksempel immunsvikt, graviditet og kreftsykdommer. Reinfeksjon med nye genetisk distinkte CMV stammer er utbredt, særlig ved organtransplantasjon (Chou 1986; Zwegberg et al. 1998; Folkehelseinstitutt 2010).

## 1.4 Bakgrunn og beskrivelse av PCR og Real-time PCR

### 1.4.1 Polymearse Chain Reaction (PCR)

PCR er en metode for amplifisering av små mengder DNA og den kan brukes til å lage millioner med identiske kopier av et DNA sekvens. Metoden ble utviklet av Amerikaneren Kary B. Mullis tidlig på 80-tallet. Grunnprinsippet av PCR med bruk av DNA polymerase (men ikke termostabil DNA-polymerase) ble først utviklet av Norsk biokjemikeren Kjell Kleppe i 1969 ved Universitetet i Wisconsin, USA (Kleppe et al. 1971; Bartlett and Stirling 2003).

Metoden som ble videreutviklet av Mullis med å innføre bruk av termostabil DNA-polymerase i termisk sykling. Den termiske syklingen tillater hurtig og eksponentiell amplifikasjon av store mengder av hvilken som helst ønsket DNA-sekvens (templat) ved bruk av en termostabil DNA-polymerase (Taq DNA polymerase) isolert fra den termofile bakterien *Thermus aquaticus* (McPherson and Moller 2009; Institutt for biovitenskap 2011).

PCR metoden krever flere grunnleggende komponenter og reagenser. Disse komponentene er:

DNA-templat som inneholder DNA-regionen (target) som skal amplifiseres, to primere "Forward" og "Revers" som er komplementære til 5'- ende av DNA-templat, termostabil DNA-polymerase, deoxyribonucleotides (dNTP), bufferoppløsninger (som gir et passende kjemisk miljø for optimal aktivitet og stabilitet av DNA-polymerase), divalente kationer (vanligvis  $Mg^{2+}$  som fungerer som en co-faktor for termostabil DNA polymerase), vann og PCR maskin (Termosykler) (Bartlett and Stirling 2003; McPherson and Moller 2009).

PCR reaksjon består av tre forskjellige trinn: (i) Denaturering, der dobbeltrådig DNA spaltes til enkeltrådig ved høy temperatur (94-98°C) slik at dobbeltrådene skiller lag og blir enkeltrådet, (ii) Hybridisering/Annealing, der blandingen avkjøles til ca. 50°C (40-70°C) slik at primere kan binde seg til den komplementær ssDNA (templaten), (iii) Polymerisering/elongering, der target-DNA blir syntetisert av DNA polymerase fra primerne. Dette skjer ved ca. 72°C i (5'→ 3') retning for hver av templattrådene.

Denne sykliske prosessen gjentas mange ganger (vanligvis 25 sykler) og resulterer i fordobling av DNA for hver syklus inntil man har fått oppformert nok DNA til det formålet det skal brukes til (Wikipedia.org; Saiki et al. 1985; Bartlett and Stirling 2003).

### 1.4.2 Nested PCR

Nested PCR er en metode som gjøres i to omganger, der PCR produkt fra den første PCR reaksjonen brukes som templat i den andre PCR reaksjonen. Dette øker metodens sensitivitet betydelig. Det lages to PCR produkter, det første er større enn det andre (Porter-Jordan et al. 1990).

Metoden er arbeidskrevende og det er relativ stor risiko for falske positive reaksjoner på grunn av kontaminasjon. Denne metoden er viktig dersom man har små mengder target DNA/RNA (Andree et al. 1998; Llop et al. 2000).

### 1.4.3 Real-time PCR

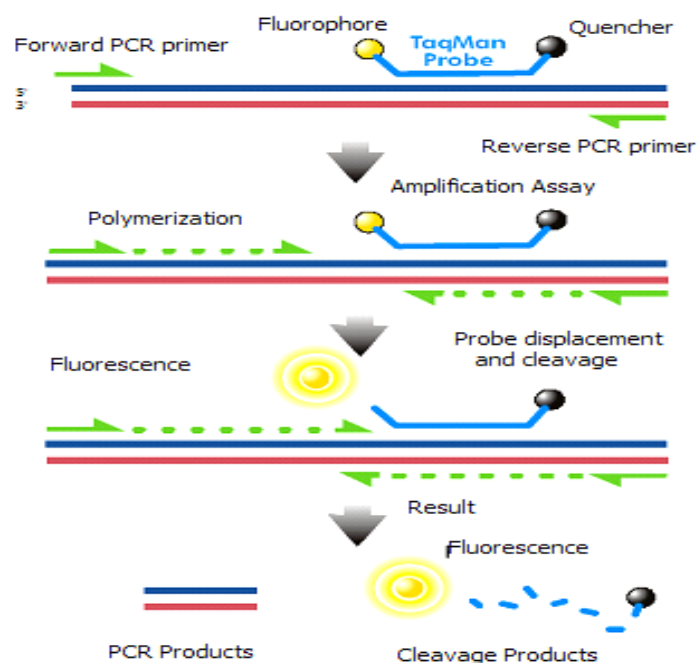
Real-time PCR er en metode som brukes til å amplifisere et mål DNA (Templat) og detekteres i sann (real) tid underveis i reaksjonen. Real-Time PCR er basert på deteksjon av fluorescensen som produseres av et reporter molekyl som frigjøres mens reaksjonen forløper. Dette skjer ved akkumulering med en dobling av PCR produkt for hver amplifiserings syklus.

Disse fluorescerende reportere molekylene inkluderer fargestoffer som binder seg til dsDNA (dvs. SYBR® Green) eller sekvens spesifikke prober (dvs. TaqMan® prober) (Figur 1.9) (Schwaiger and Cassinotti 2003; Abou El Hassan et al. 2006).



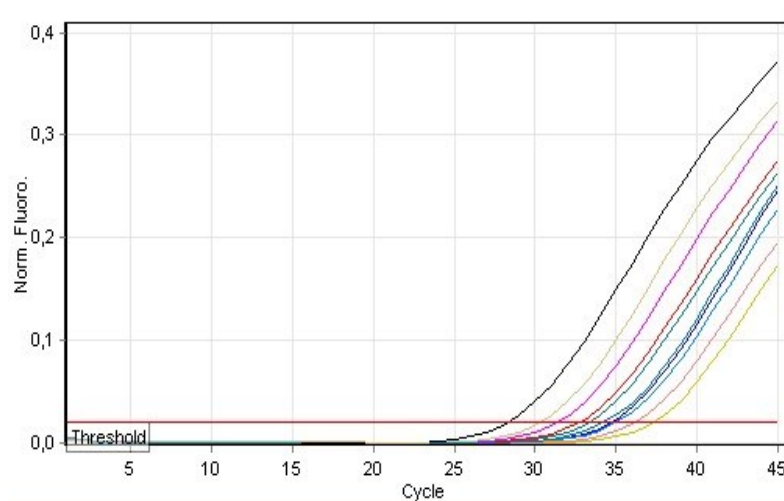
To vanlige metoder for påvisning av produkter i Real-time PCR er:

- a) Bruk av ikke-spesifikke fluorescerende fargestoffer som bindes til "minor Groove" i dsDNA, eks. SYBR® Green.
  
- b) Bruk av sekvens-spesifikke DNA-prober bestående av oligonukleotider som er merket med både en "reporter" (fluorescerende fargestoff) og et "quencher" molekyl. Fluorescens reporter tillater deteksjon bare etter hybridisering av proben med dens komplementære DNA-templat. Eks. på denne metoden er TaqMan, Beacons og Scorpions.



**Figur 1.9: Figuren viser kjemiske mekanismen til en TaqMan® probe. TaqMan prober består av en fluoroforen (reporter) kovalent bundet til 5'-enden av en oligonukleotid-probe og en quencher (hemmer) ved 3'-enden. Flere forskjellige fluorophores (f.eks FAM, TET eller JOE) og quenchers (f.eks BHQ, TAMRA eller MGB) er tilgjengelige for denne type probe (en.wikipedia.org).**

En økning i PCR produktet med reporteren (prob) ved hver PCR syklus forårsaker derfor en proporsjonal økning i fluorescens på grunn av fordeling av proben og frigjøring av reporteren. Jo mer PCR produkt, jo mer fluorescensen frigjøres desto lavere CT verdi vil man få av produktet (Figur 1.10) (Schwaiger and Cassinotti 2003; Royuela et al. 2006).



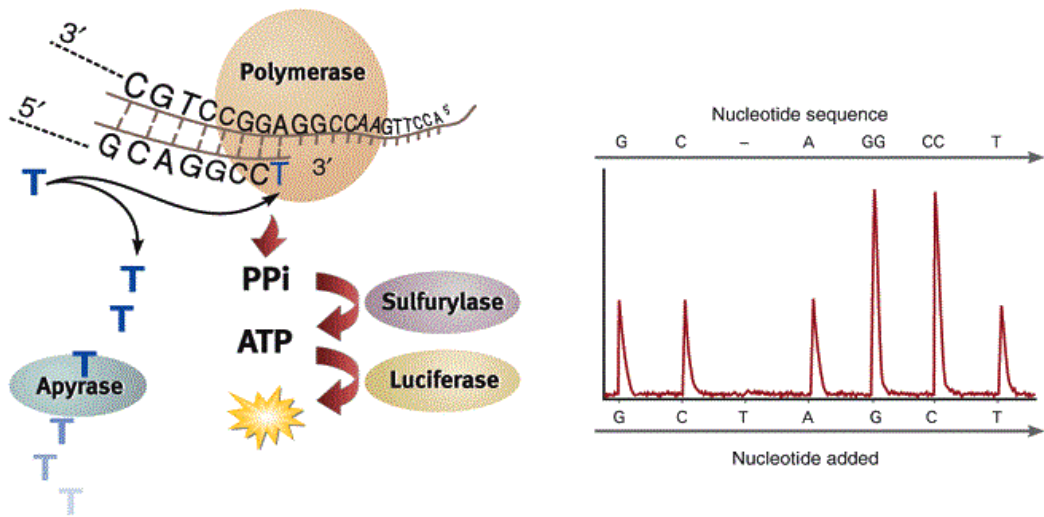
*Figur 1.10: Viser hvordan Real-time PCR kurver ser ut, og proporsjonal økning i fluorescensen med økning av PCR produktet. Figuren viser hvordan en ønsket kurve ser ut med riktig produkt amplifisering.*

#### 1.4.4 Pyrosekvensering

Pyrosekvensering er en metode som brukes for å sekvensere DNA, det vil si for å finne rekkefølgen av nukleotider i DNA. Teknikken ble utviklet av Mostafa Ronaghi og Pål Nyrén ved Royal institutt for teknologi i Stockholm i 1996 (Ronaghi et al. 1998).

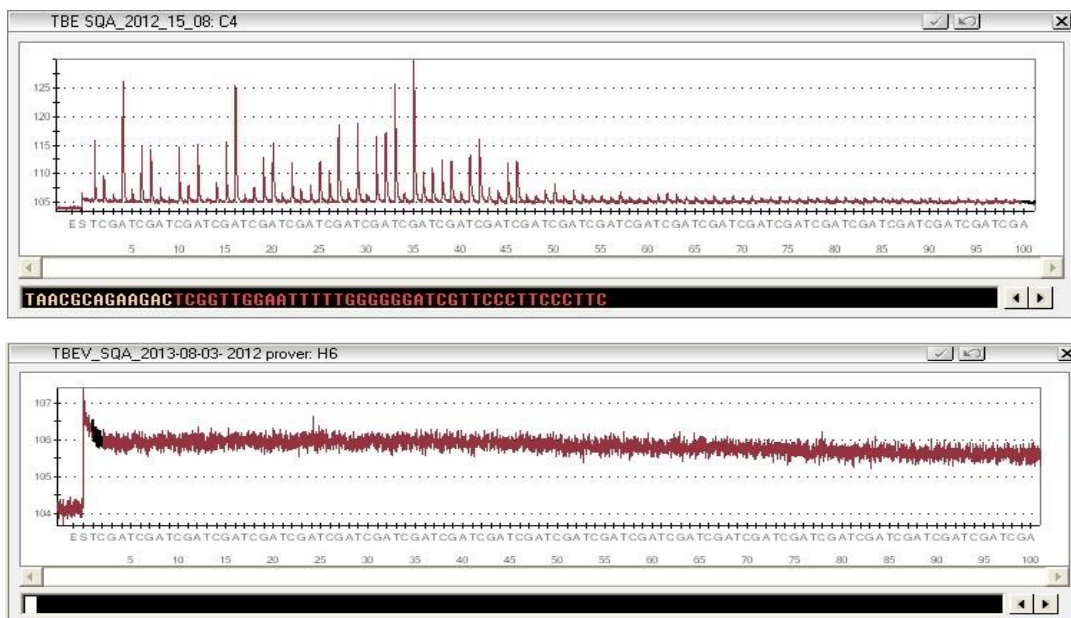
Denne prosedyren starter med denaturering av dsDNA til ssDNA. Real-time PCR produktet (dsDNA) var biotinmerket i revers primer (Tabell 2.3). Dette produktet ble brukte som templat i pyrosekvenserings reaksjonen.

Biotinmerket ssDNA isoleres ut av blanding med streptavidin kuler for deretter å bindes til sekvenseringsprimere i pyrosekvenserings reaksjonen. De fire nukleotidene (dNTP) tilsettes (Figur 1.11) (Fakhrai et al. 2002).



**Figur 1.11: Pyrosekvensering metode prinsippet.** *Dobbelt topphøyder indikerer inkorporasjons av to nukleotider i en rad (Biotage AB; www.nature.com).*

Når pyrofosfat molekyler frigjøres ved innsetting av et nukleotid under reaksjonen, konverterer enzymet ATP-sulfurylase de frigjorte pyrofosfat molekylerne til ATP, og dermed frigjøres energi til luciferase som genererer synlig lys som så registreres i LCC kamera (Figur 1.12) (Ronaghi 2001; Royo et al. 2007).



**Figur 1.12: Pyrogram positiv og negativ pools.** *Den overste figuren er for en PCR-positiv pool som ble bekreftet ved Pyrosekvensering med BioTage (Pyromark ID) System (QIAGEN). Nederste figuren viser et eksempel på en negativ pool. Toppene representerer lysemisjon og nukleotidsekvens binding, og intensiteten av lyset avgjør om det er mer enn en av disse "nukleotidene" i en rad.*

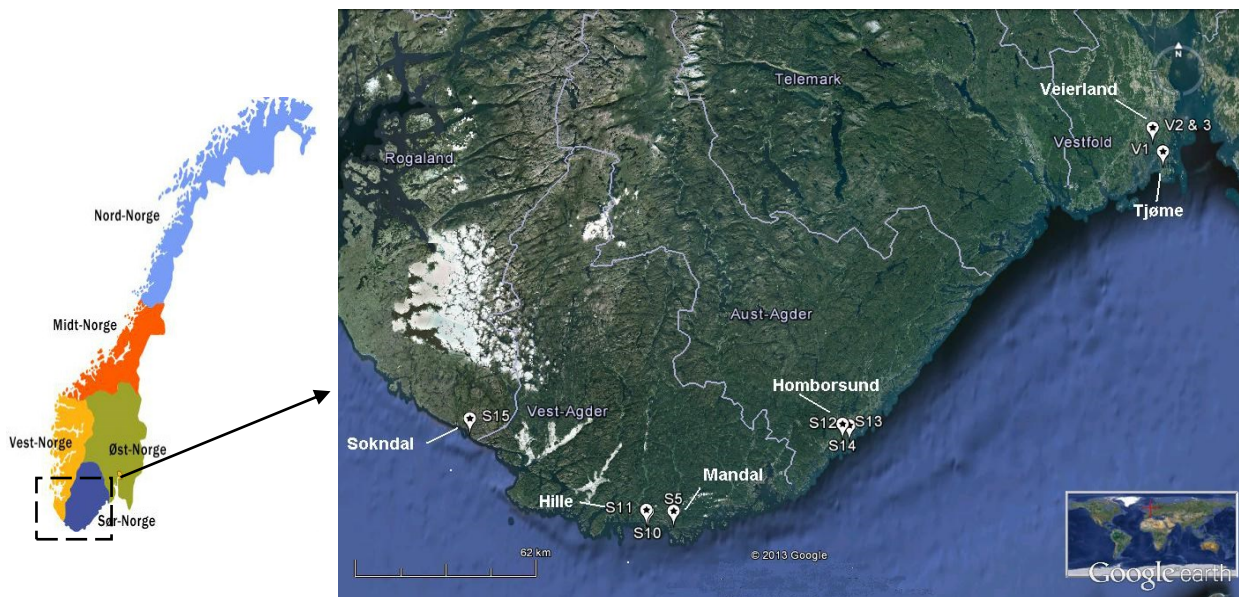
## 2 Materiale og metoder

### 2.1 Materiale og metoder for TBEV

#### 2.1.1 TBEV materiale

Dette arbeidet består av et utvalg av innsamlet materiale til ScandTick prosjektet i løpet av våren 2011 og 2012.

Flått som ble samlet inn i 2011 er fra tre lokaliteter i Vest-Agder, tre lokaliteter i Aust-Agder, en lokalitet i Rogaland og en lokalitet i Vestfold. Alle lokalitetene er kystnære med et typisk kystklima og blandingsskog med skygge og gress i randsone. I 2012 ble flått samlet inn fra to lokaliteter i Vest-Agder, fire lokaliteter i Aust-Agder, to lokaliteter i Østfold og tre lokaliteter i Vestfold (Figur 2.1).



**Figur 2.1:** Kart over Sør-Norge som viser de utvalgte lokalitetene hvor flått ble samlet inn i 2011 og 2012 (Google).

De ulike lokaliteter ble valgt i henhold til registreringer av humane TBE tilfeller mellom 1998 og 2010 i Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS), informasjon fra lokale allmennleger og publikum, og i tillegg til ønske om å undersøke nye steder i grense områder der kunnskapen om TBEV forekomsten i flått er ukjent.

Innsamling av aktiv (questing) flått ble foretatt i juni i 2011, mai og juni i 2012. Det ble brukt "flagging metode" for innsamlingen (Mejlon and Jaenson 1993). Både nymfer og voksne flått ble samlet inn, men bare nymfer ble inkludert i denne studien.

I denne oppgaven ble det gjort et valg om bare å undersøke flått fra 4 lokaliteter samlet inn i 2011 og 2012, med totalt 1630 nymfer i 2011 og 2840 nymfer i 2012 (Tabell 2.1).

Vegetasjonen på lokalitetene var blandingskog med lyng og gress, litt fuktig vegetasjon.

Innsamlingen av flått foregikk bare på godværsdager uten regn.

**Tabell 2.1: Oversikt over UTM (Universal Transverse Mercator) koordinater og antall nymfer analysert fra de ulike lokalitetene i 2011 og 2012. Alle nymfene ble sortert inn i pools av 10 pr. rør.**

Lokalisasjon	UTM-koordinater	Antall nymfer 2011	Antall nymfer 2012
S5 VA <sup>3</sup> , Mandal	32V 411861 6430610	740	740
S13 AA <sup>4</sup> , Homborsund	32V 469564 6459170	570	630
V1 VF <sup>5</sup> , Tjøme	32V 580568 6550324	320	740
V3 VF, Veierland	32V 577275 6558675	-	730
Totalt antall nymfer		1630	2840

## 2.1.2 TBEV metoder

### 2.1.2.1 Innsamling av flått

Flått innsamling ble utført med flagging (Mejlon and Jaenson 1993) og den foregår ved at det brukes en hvit flanell håndklede på dimensjon 1,1 x 0,65 meter (flagg).

Flagging metoden ble utført ved at flagget dras over bakken eller gjennom vegetasjonen og etter et par runder med flagget, blir kledet undersøkt og alle nymfer og voksne flått som hadde

<sup>3</sup> Vest-Agder fylke

<sup>4</sup> Aust-Agder fylke

<sup>5</sup> Vestfoldfylke

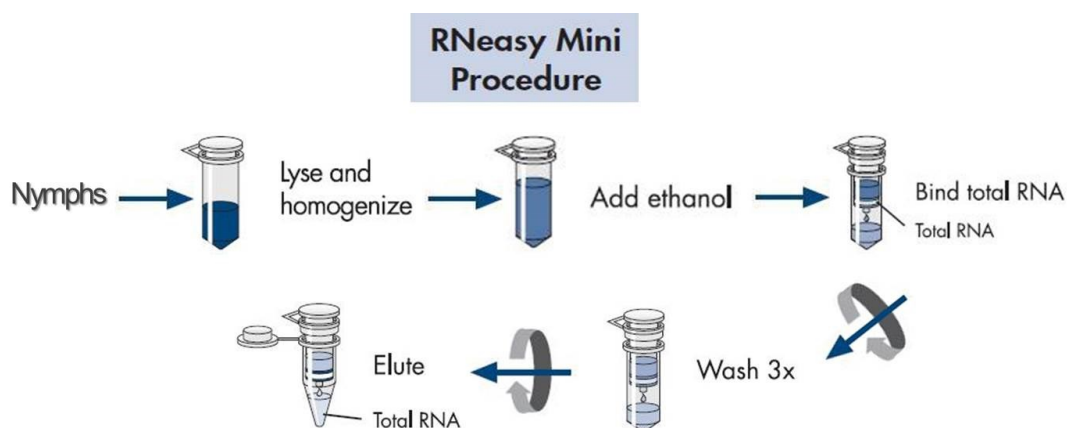
festet seg på flagget fjernet med pinsett og grov talt før man fordelte de i et Eppendorf rør merket med kode for innsamlingsområde.

Eppendorf rørene ble oppbevart på knust is under transport til laboratoriet og ved -70°C etter ankomst til laboratoriet. Flåtten ble senere karakterisert ut fra art og finsortert på blokker av tørr is (CO<sub>2</sub>), og nymfer ble sortert inn i tilfeldige pools av 10 nymfer i hvert rør fra hvert område.

### 2.1.2.2 Nukleinsyre (RNA) isolasjon fra flått (nymfer)

Total RNA ble ekstrahert med RNeasy mini Kit (QIAGEN Inc, CA, USA) i henhold til protokoll fra produsentens med noen små modifikasjoner (Appendiks C1).

Flåtten har et hardt skall som må knuses ved at røret med 10 nymfer blir homogenisert i RLT lysisbuffer (QIAGEN Inc, CA, USA) med 4 MK-28 stål kuler (Precellys, Bertin Technologies, Frankrike, kat.no: 03961-1-008) i en Precellyse<sup>®</sup>24 Homogenisator, 5500 rpm i 20 sek. (Figur 2.2) (MO BIO Laboratories, Inc, Carlsbad, CA, USA) for å frigjøre nukleinsyre og andre celle komponenter.



**Figur 2.2: Skjematisk fremstilling av RNeasy Mini prosedyren « Total RNA ekstraksjon» (QIAGEN Inc, CA, USA, RNeasy<sup>®</sup> Mini Handbook). Figuren viser trinnene for RNA isolering fra nymfer til rent RNA produkt. Første trinn i prosedyren er lysering og homogenisering, etterfulgt av tilsetning av etanol og til slutt effektiv vasking for å få høykvalitets RNA.**

Denne teknologien kombinerer de selektivt bindende egenskapene til en silikat-basert membran og hastigheten til mikrospinn teknologi. Biologiske prøver blir først lysert og homogenisert med en sterkt denaturerende guanidin-tiocyanat-holdig buffer, som umiddelbart inaktiverer RNaser for å sikre rensing av intakt robust RNA.

Homogenisatet sentrifugeres ved høy hastighet for å fjerne cellerester og supernatanten overføres til nye rør.

Etanol tilsettes supernatanten for å oppnå bindende forhold til RNeasy membranen før prøven overført til en RNeasy Mini spinn kolonne.

RNA i kolonnen bindes til membranen mens forurensninger vaskes bort (vaskingen gjentas tre ganger for å få en høy konsentrasjon av rent RNA) (QIAGEN Inc, CA, USA). Tilslutt elueres RNA med Tris-HCl buffer (10 mM pH 8,0) (Figur 2.2).

### ***2.1.2.3 Revers Transkripsjon PCR (RT-PCR)***

MultiScribe™ Revers transkriptase enzymet er en rekombinant RNA-avhengig DNA polymerase, MMLV-enzym, som må ha en primer og enkelttrådet RNA som templat for å syntetisere en komplementær DNA tråd (cDNA) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

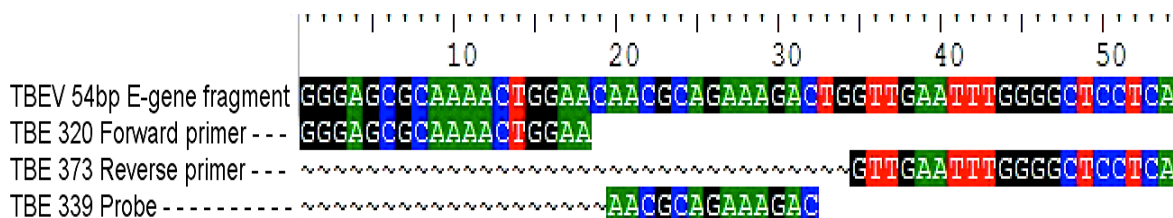
Fem µl isolert RNA (~ 500 ng) fra hver pool ble revers transkribert til cDNA ved bruk av High Capacity cDNA Reverse Transcription System Kit med RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) og random primere i henhold til produsentens protokoll (Appendiks D1).

cDNA ble enten analysert med Real-time PCR dagen etter eller fordelt i porsjoner av 5 µl pr. rør og lagret ved - 80°C inntil videre analyse.

Revers transkripsjons betingelser ble utført som beskrevet i protokollen fra produsenten: 25°C i 10 minutter (min), etterfulgt av 37°C i 120 min, 85°C i 5 min og 4°C i ∞ (Appendiks D2).

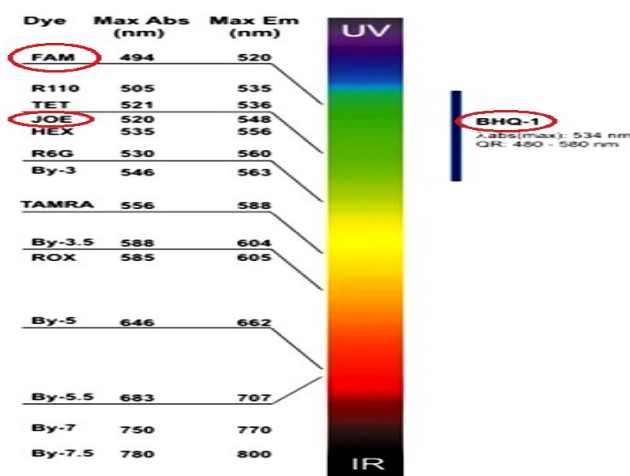
### 2.1.2.4 Real-time PCR for TBEV påvisning

Påvisning av TBEV ble utført med en in-house Real-time PCR-metode utviklet for å amplifisere et 54 basepar fragment i 3' enden av E-genet (nt 1662-1715) til TBEV (GenBank aksjonsnummer U27495.1) (Figur 2.3).



**Figur 2.3:** Figuren viser sekvensen til 54 basepar fragmentet i 3' enden av E-genet (Envelope gene) til TBEV (Neudortfl, GenBank aksjonsnummer U27495.), samt primere og probe brukt i Real-time PCR analysen. Bildet ble laget ved bruk av BioEdit sequence alignment editor version 7.0.5.2.

Proben var merket med FAM (Reporter) i 5'-enden og BHQ-1 (Quencher) i 3'-enden.



**Figur 2.4:** Lys spekteret for de forskjellige fargestoffer i to merket prober. FAM fargestoff leses av detektoren i Rotor-Gene 6000 PCR maskin i det grønne lys område i spekteret (PrimeTech, Minsk, Belarus).

Proben og primere ble utviklet av Torstein Tengs ved Norges veterinærinstitutt (NVI) ved hjelp av programvaren Primer Express (versjon 2.0.0, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) (Figur 2.3) (Tabell 2.3).

Metoden ble utviklet med tanke på agens spesifikk amplifisering av TBEV-Eu for å sikre metodens spesifisitet. Biotinylert revers primer (373 R) ble brukt i reaksjonen slik at PCR produkt kunne verifiseres med Pyrosekvensering.



**Tabell 2.3: Primere og Probe brukt til Real-time PCR påvisning av TBEV.** Tabellen viser navn, sekvens, genom posisjon og GenBank aksjesjonsnummer til TBEV som er opphav til sekvensen.

Primer navn	Sekvensen (5' → 3')	Genom posisjonen	GenBank Aksjesjonsnr.
TBE 320 F	GGGAGCGCAAAACTGGAA	1662–1680	U27495
TBE 373 R	TGAGGAGCCCCAAATTCAAC	1696–1715	U27495
TBE 339 Probe	(FAM)-AACGCAGAAAGAC-(BHQ1)	1681–1693	U27495

Totalvolum per pool i PCR reaksjonen var 25 µl og bestod av 3 µl cDNA og 22 µl Real-time PCR master miks. Master miksen inneholdt 2,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5 µl 10X AB Buffer; 0,2µl 25X dNTP mix; 0,25 µl 25 µM 320 Forward primer; 0,25 µl 25 µM 373 Revers primer med biotin; 0,3 µl 25 µM 339 TBE Probe; 0,19 µl Platinum Taq DNA Polymerase enzym og 15,81 µl RNase-free H<sub>2</sub>O (Appendiks D3).

PCR betingelsene var følgende: 95°C i 2 min, etterfulgt av 48 sykluser bestående 95°C i 15 sek, 60°C i 45 sek og 72°C i 30 sek (Appendiks D4). PCR reaksjonen ble kjørt på Rotor-Gene 6000 PCR maskinen (QIAGEN) og analysert med Rotor-Gene 6000 series 1.7.87 programvare (QIAGEN, Tyskland).

En TBEV positiv prøve "Soukupa" (gave fra Dr. Christian Beuret, Spiez lab, Spiez, Sveits) ble brukt som standard for å sikre Real-time PCR metodens reproduserbarhet.

En 10-ganger seriefortynning av positiv standarden, 10<sup>-3</sup> – 10<sup>-7</sup>, ble brukt i hvert PCR oppsett for å få semikvantitativt mengde og renhet av virus partikler som er i en pool.

### **2.1.2.5 Pyrosekvensering analyse for bekreftelse av positive Real-time PCR pools**

Pyrosekvensering ble brukt for å bekrefte de positive pools funnet med Real-time PCR.

Pyrosekvensering analysen er i henhold til produsentens protokoll for sekvenseringsanalyse (SQA) i en BioTage (Pyromark ID) System (QIAGEN, Tyskland) (Achazi et al. 2011).

For pyrosekvensering reaksjonen ble TBEV 320 F primer (Tabell 2.3) benyttet som sekvenseringsprimer, og reaksjonen ble utført ved anvendelse av Pyrogold SQA reagenser (QIAGEN, Tyskland) i henhold til produsentens protokoll.

PCR standard "Soukupa" fra samme Real-time PCR kjøring ble analysert parallelt ved pyrosekvensering som kontroll (Appendiks E).

### **2.1.2.6 Beregning av pool størrelse og estimert pooled prevalens (EPP)**

Den ønskede pool størrelse ble beregnet utfra den forventede prevalens på 0,3% (Skarpaas et al. 2006) med en gitt ønsket nøyaktighet  $\pm 0.4$  ble beregnet fra dataprogrammet "Pool size for fixed prevalence and perfect test" under pooled prevalence calculator (<http://www.Epitools.aus.vet.au>).

Estimated Pooled Prevalence (EPP) er en statistisk metode for å beregne forekomsten i en pool og den estimerer forekomst med konfidensintervall (Sacks et al. 1989; Cowling et al. 1999; ESG 2009).

EPP ble beregnet ved hjelp av dataprogrammet Epitools for beregning av "Estimated Pool prevalence for fixed prevalence and perfect test" under "pooled prevalence calculator" (<http://www.Epitools.aus.vet.au>).

Metoden benytter frequentist metode for å estimere prevalens og konfidensintervall, forutsatt en fast pool størrelse og perfekt (100%) test sensitivitet og spesifisitet (Cowling et al. 1999; ESG 2009; Andreassen et al. 2012).

## **2.2 Materiale og metoder for CMV**

### **2.2.1 CMV materiale**

Materialet som ble brukt i denne delen av oppgaven bestod av totalt 41 prøver; 24 prøver mottatt fra mikrobiologisk avdelingen ved Rikshospitalet (RH) og 17 prøver analysert tidligere ved Avdeling for virologi (FHI).

Prøvene fra RH var 12 CMV positive pasient prøver (serum), 10 CMV positive "Quality Control for Molecular Diagnostics" (QCMD) prøver og to CMV positive kontroller. Prøvene fra FHI tilhørte «positiv arkiv» fra 2000-2001 og bestod av følgende PCR positive prøver; 14 CMV, en Herpes simplex virus (HSV), en Varicella zoster virus (VZV) og en Parvovirus B19.

Prøvene analysert ved FHI ble inkludert for å teste ut spesifisiteten og sensitiviteten av vår etablerte metode (Tabell 2.4).

**Tabell 2.4: Oversikt over prøvene analysert med CMV PCR.** Prøve nr. 1-24 er prøvene mottatt fra mikrobiologisk avdelingen ved Rikshospitalet og prøvene 25-41 er prøvene analysert ved Avdeling for virologi, Folkehelseinstitutt.

#	Prøve ID	Agens	Prøvemateriale
1	RH-1	CMV	Serum
2	RH-2	CMV	Serum
3	RH-3	CMV	Serum
4	RH-4	CMV	Serum
5	RH-5	CMV	Serum
6	RH-6	CMV	Serum
7	RH-7	CMV	Serum
8	RH-8	CMV	Serum
9	RH-9	CMV	Serum
10	RH-10	CMV	Serum
11	RH-11	CMV	Serum
12	RH-12	CMV	Serum
13	QCMD-1	CMV	Serum
14	QCMD-2	CMV	Serum
15	QCMD-3	CMV	Serum
16	QCMD-4	CMV	Serum
17	QCMD-5	CMV	Serum
18	QCMD-6	CMV	Serum
19	QCMD-7	CMV	Serum
20	QCMD-8	CMV	Serum
21	QCMD-9	CMV	Serum
22	QCMD-10	CMV	Serum
23	RH-pos-1	CMV	Serum
24	RH-pos-2	CMV	Serum
25	SMVI-1	CMV	Urin
26	SMVI-2	CMV	Urin
27	SMVI-3	CMV	Urin
28	SMVI-4	CMV	Urin
29	SMVI-5	CMV	Urin
30	SMVI-6	CMV	Urin
31	SMVI-7	CMV	Urin
32	SMVI-8	CMV	Urin
33	SMVI-9	CMV	Urin
34	SMVI-10	CMV	Urin
35	SMVI-11	CMV	Serum
36	SMVI-12	CMV	Spinalvæske
37	SMVI-13	CMV	Spinalvæske
38	SMVI-14	CMV	Spinalvæske
39	SMVI-15	HSV	Spinalvæske
40	SMVI-16	VZV	Spinalvæske
41	SMVI-17	Parvovirus B19	Serum

## 2.2.2 CMV metoder

Prøvematerial som ble brukt ved FHI var 140 µl, mens i metoden som var utviklet ved RH ble det brukt 500 µl prøvemateriale.

### 2.2.2.1 Nukleinsyre (DNA) isolasjon

#### A. MagNA Pure

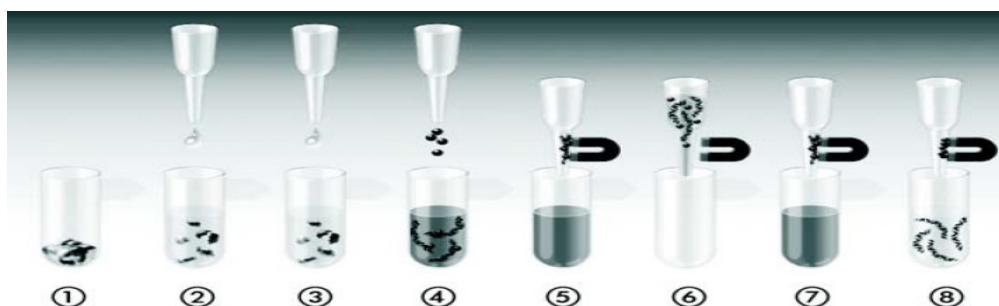
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid isolation - High Performance kit ble brukt på MagNA Pure LC maskin, for å isolere høy kvalitet total viral nukleinsyre (DNA og RNA).

MagNA Pure LC er en automatisert ekstraksjonsrobot som er optimalisert for effektiv isolering av totale virale nukleinsyrer fra forskjellige prøvemateriale, med et høyt utbytte og sensitivitet.

Selve ekstraksjonen benytter teknologien utviklet for bruk av magnetiske glasskuler. Cellene i prøvene lyses ved hjelp av en lysis buffer, som inneholder kaotropisk salt og Proteinase K, for å frigjøre nukleinsyrer, fjerne proteiner og cellerester. (Figur 2.6).

Magnetiske glasspartikler (MGPs) blir tilsatt og total viral nukleinsyrer som finnes i prøven er bindes til deres overflate.

Ubundet stoff fjernes ved flere vasketrinnene, deretter elueres de rensede virale nukleinsyrene med en lav-saltbuffer (Roche Applied Science, Germany) (Appendiks F1).



**Figur 2.6: MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Kit-High Performance prosedyre trinnene (Roche Applied Science, Germany). Figuren viser fremgangsmåte som gjennomgår i MagNA Pure LC apparatet med isolasjon kittet.**

De ekstraherte prøvene (CMV DNA) ble overført fra MagNA Pure LC til Eppendorfrør ved bruk av en pipetteringsrobot, CorbettRobotics CAS-1200 (Corbett Lif Sceinces, QIAGEN).

CAS-1200 pipetteringsrobot gjør en raskt og pålitelig utført automatisk pipettering for å unngå menneskelige feil. Stasjonen bruker én enkelt-kanals pipette å blande master miks og de enkelte isolatene (Corbettlife Sciences- QIAGEN).

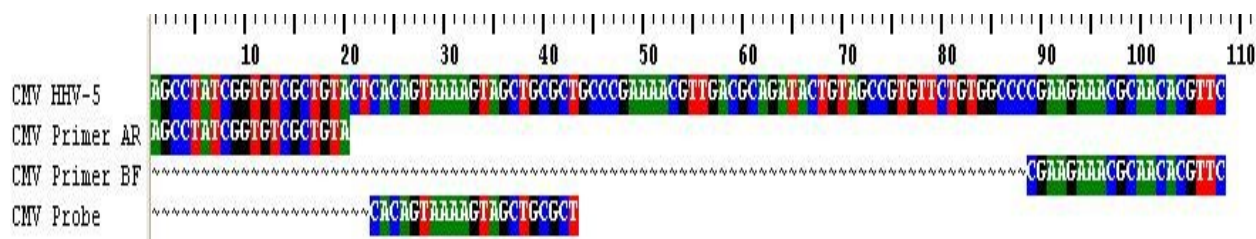
## B. Koking

Virus i cellene frigjøres under koking fordi cellene sprekker, og DNA blir tilgjengelig for amplifisering. Koking foregår ved bruk av en PCR LightCycler® under følgende betingelsene: 94°C i 10 min etterfulgt av 4°C i ∞ (Appendiks F2).

### 2.2.2.2 Real-time PCR for CMV påvisning

Metoden ble utviklet ved mikrobiologisk avdelingen ved Rikshospitalet (RH), men ble optimalisert/modifisert ved virologisk avdeling ved Folkehelseinstitutt.

Påvisning av CMV ble utført med den modifiserte metoden for å amplifisere et 108 basepar fragment av UL54 gen (CMV DNA polymerase) til CMV (GenBank aksesjonsnummer X17403.1) (Figur 2.7) (Tabell 2.5).



**Figur 2.7:** Figuren viser sekvensen til 108 basepar fragment av UL54 gen (CMV DNA polymerase) Human herpesvirus-5 HHV-5 (GenBank aksesjonsnummer X17403.1), samt primere og probe brukt i Real-time PCR analysen. Bildet ble laget ved bruk av BioEdit sequence alignment editor version 7.1.11.

Totalvolum per prøve i PCR reaksjonen var 20 µl og bestod av 5 µl DNA og 15 µl Real-time PCR master miks. Master miksen uten internkontroll (IK) inneholdt 10 µl av 2x TaqMan Fast

Advanced; 0,5µl 10 µM Probe pCMV; 0,4 10 µM CMV-Run Control Probe; 0,6 µl 10 µM Primer CMV-AR; 0,6 µl 10 µM Primer CMV-AF og 2,9 µl Nuklease fritt vann.

Tilsatt mengde IK til master miksen er beskrevet i Appendiks G1.

PCR betingelsene var følgende: 95°C i 10 sek, etterfulgt av 45 sykluser bestående 95°C i 3 sek, 60°C i 30 sek etterfulgt av 1 syklus 40°C i 10 sek (Appendiks G2). PCR reaksjonen ble kjørt på Rotor-Gene 6000 PCR maskinen og analysert med Rotor-Gene 6000 serien versjon 1.7.87 Software (QIAGEN, Tyskland).

CMV-proben som ble brukt i vår studie var merket med FAM (Fluorescens fargestoff) i 5'-enden og BHQ-1 (Quencher) i 3'-enden (Sigma). Den originale CMV internkontroll probe ble utviklet av GenExpress, TempelhofWeg 11-12, 10829 Berlin, Tyskland. Denne ble benyttet til innkjøring av metoden på RH. I vår studie benyttet vi en CMV internkontroll probe merket med JOE (Fluorescens fargestoff) i 5'-enden og BHQ-1 (Quencher) i 3'-enden (Sigma) (Tabell 2.5).

**Tabell 2.5: Primere og Prober brukt til Real-time PCR påvisning av CMV. Tabellen viser navn, sekvens og GenBank aksjonsnummer til CMV som er opphav til sekvensen.**

Primer navn	Sekvensen (5' → 3')	Genom posisjon	GenBank Akses.nr.
CMV Primer AF	GAACGTGTTGCGTTTCTTCG	80220-80239	X17403.1
CMV Primer AR	AGCCTATCGGTGTCGCTGTA	80132-80151	X17403.1
CMV Probe	6FAM- CACAGTAAAAGTAGCTGCGCT-BHQ1	80154-80174	X17403.1
Int.ktr. probe <sup>6</sup> CMV lambda IK	JOE-ACCTTACCGAAATCGGTACGGATACCGC- BHQ1	-	-

IK ble brukt som en ekstraksjonskontroll for nukleinsyre ekstraksjonen. Alternativt ble den brukt i forbindelse med koke metoden som PCR kontroll og tilsettes først i PCR reaksjonen. En CMV positiv kontroll (mottatt fra mikrobiologiske avdelingen ved RH) ble brukt som standard for å sikre Real-time PCR metodens reproduserbarhet, og negativ kontroll for å utelukke kontaminasjon i hvert oppsett.

<sup>6</sup> CMV int.ktr. ble levert til Rikshospitalet opprinnelig fra TIB MOLBIOL GmbH, Berlin (prod. #: 956193), men det som ble brukt ved Folkehelseinstitutt levert fra Sigma-Aldrich Co. (Batch #: HA04511662).

## 3 Resultater

### 3.1 TBEV påvisning resultater

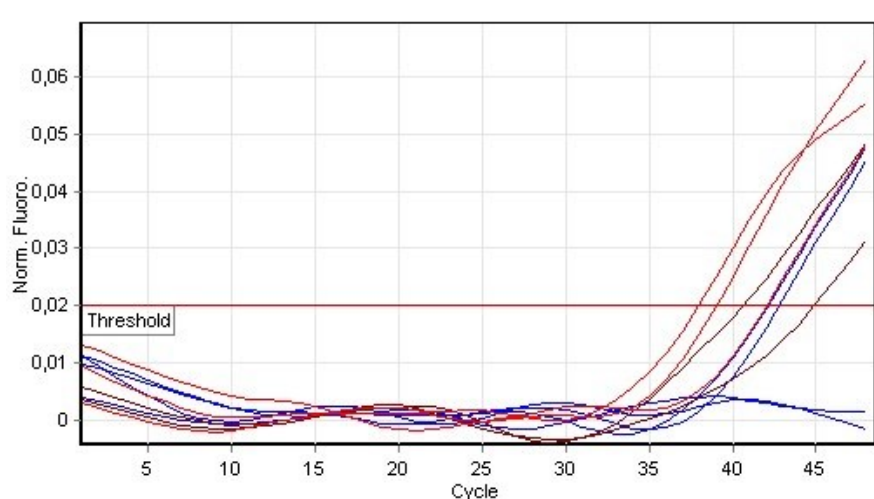
I 2011 ble det samlet inn flått fra tre av de fire utvalgte innsamlingsområder. Hver lokalitet bestod av 32-74 analyserte pools. Det ble påvist TBEV i kun to pools fra Homborsund (S13) med Real-time PCR, men ingen ble bekreftet ved pyrosekvensering. Estimert pooled prevalens (EPP) ble derfor 0% i 2011 for disse lokalitetene (Tabell 3.1).

I 2012 ble det analysert fra 63 til 74 pools og det ble påvist TBEV i alle de fire innsamlings lokalitetene. Real-time PCR av TBEV ble bekreftet med pyrosekvensering i en pool fra Mandal (S5), en fra Homborsund (S13), en fra Tjøme (V1) og to fra Veierland (V3). I 2012 varierte EPP fra 0,14% til 0,28% (Tabell 3.1).

**Tabell 3.1: Oversikt over 2011 og 2012 TBEV resultater.** Tabellen viser antall totale analysert pools med Real-time PCR, antall positive pools, antall pyrosekvensering bekreftede positive pools og estimert pooled prevalens (EPP) for de forskjellige lokaliteter.

Lokalitet	2011			2012		
	Totalt antall pools	PCR Positive pools	Bekreftet pools v/pyro. (EPP)	Totalt antall pools	PCR Positive pools	Bekreftet pools v/pyro. (EPP)
S5 Mandal <sup>7</sup>	74	0	0	74	1	1 (0,14%)
S13 Homborsund	57	2	0	63	3	1 (0,16%)
V1 Tjøme	32	0	0	74	2	1 (0,14%)
V3 Veierland	-	-	-	73	5	2 (0,28%)

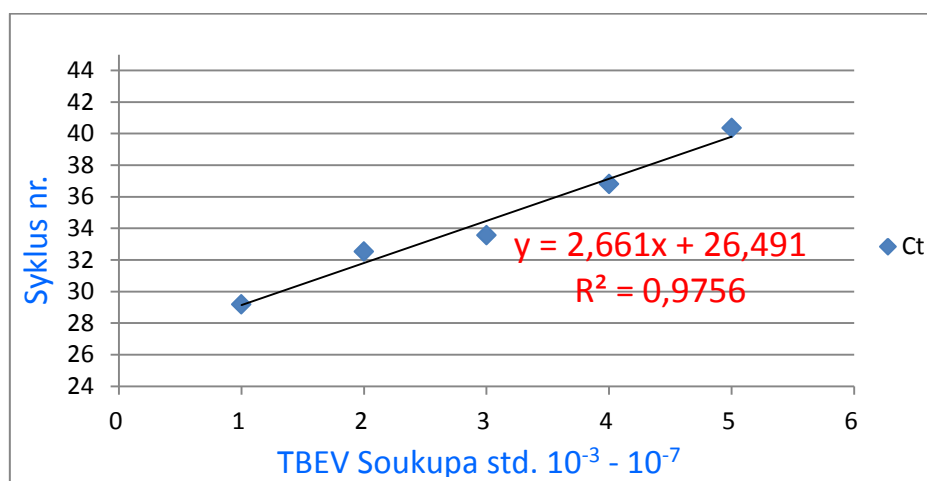
<sup>7</sup> EPP for Mandal (S5) i 2009 var 1,22% (Andreassen et al. 2012).



**Figur 3.1: Eksempel på Real-time PCR resultat for TBEV analyse (lineær skala).** Blå linjer viser noen prøver som var enten positive eller negative sammenlignet med de røde linjer som viser TBEV positive standard, Soukupa.

Alle Real-time PCR analysene og pyrosekvensering ble utført med en seriell fortynningsrekke av den positive TBEV kontrollprøven "Soukupa". Sekvens likheten mellom TBEV positiv standard (Soukupa) og de positive prøver varierte mellom 70-100% ved pyrosekvensering.

Regresjonsanalysen for TBEV positive kontroll fortynningsserie (Soukupa  $10^{-3}$ - $10^{-7}$ ) viste en høy grad av likhet og hadde en regresjonskoeffisient  $R^2$  på 0,9756 som indikerer at regresjonslinje passer dataene godt (ideal verdi for  $R^2$  er 1), og fortynningene variabler er lineær korrelert (Figur 3.2).



**Figur 3.2: Regresjonslinje for TBEV positiv kontroll (Soukupa  $10^{-3}$  -  $10^{-7}$ ).**  $R^2$  (Determinasjonskoeffisient) for TBEV stds. er 0,9756. Jo høyere verdi (nærmere til 1), jo bedre passform.

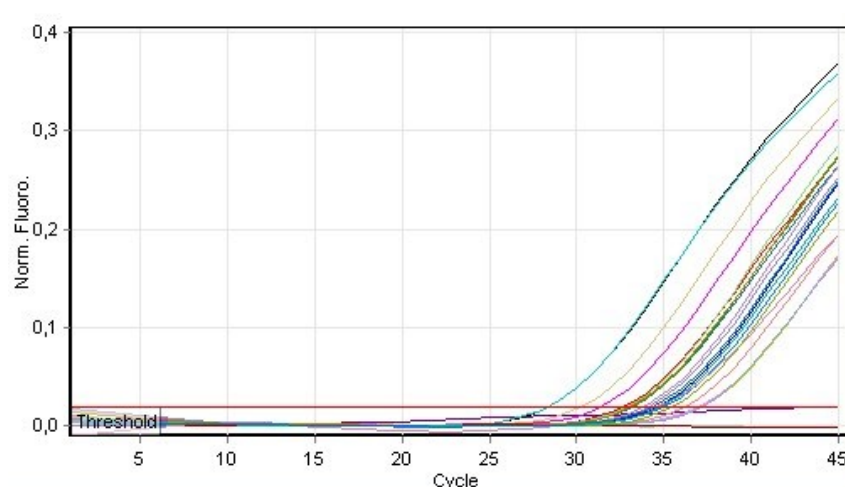


## 3.2 CMV påvisning resultater

Totalt ble 41 prøver undersøkt med CMV Real-time PCR. Det var 38 CMV positive prøver samt 3 prøver med positive for andre virus agens (HSV, VZV og Parvovirus B19) for å undersøke spesifisiteten på metoden.

Prøvene som ble analysert bestod av forskjellig prøvemateriale og enkelte av prøvene ble ekstrahert med forskjellige ekstraksjonsmetoder.

Tabell (3.3) viser oversikt over CMV Real-time PCR resultater for prøvene mottatt fra Rikshospitalet for analyse og verifisering av metode etablering ved FHI. Totalt var det 24 CMV positive prøver (1-24) hvorav 2 var CMV positive kontroller.



**Figur 3.4:** Eksempel på Real-time PCR resultat for CMV analyse. Jo høyere Ct verdien (verdien der prøven krysser Treshold linjen), jo lavere konsentrasjon av CMV er det i prøven.

I vår studie anvendte vi en modifisert analyse metode av den som benyttes på RH. RH måler Real-time resultatene i kopier/ml ut fra ekstraksjon av 500 µl utgangsmateriale, mens hos oss er hensikten å bekrefte om denne metoden fungerer på et redusert prøvemateriale (1/3-del av originaloppskriften) og om vi kan bekrefte eller avkrefte tilstedeværelse av CMV.

Alle resultatene fra våre analyser er gitt i Ct verdier, mens RH oppgir sine resultater i kopier/ml bortsett fra 2 positivkontroller. Resultatene fra vår analyse viste at 21 av 24 CMV prøver fra RH var positive med vårt Real-time PCR oppsett uten IK. De tre svake positive prøvene fra RH, prøve 4 (RH-4), prøve 15 (QCMD-3) og prøve 20 (QCMD-8) (Tabell 3.3) ble negative i vårt oppsett. Dette viser at metodene samsvarer godt.

Bruk av CMV IK i ekstraksjons- og/eller PCR trinnet ga tilnærmet likt PCR resultat, bortsett fra i to veldig svakt positive prøver, prøve 2 (RH-2) og prøve 4 (RH-4) (Tabell 3.3).

**Tabell 3.3: Oversikt over CMV PCR resultater for CMV serum prøvene mottatt fra Rikshospitalet og ekstrahert med MagNA Pure LC maskin. Tabellen viser Rikshospitalets resultat (kopier/ml) og FHI resultat (Ct) for de prøvene både med/uten internkontroll i ekstraksjon og PCR trinnet. (-) Betyr ikke testet.**

#	Prøve ID	RH res. <sup>8</sup> kopier/ml	Res. <sup>9</sup> uten IK (Ct)	Res. med IK (Ct)	
				Ekstr. trinn <sup>10</sup>	PCR trinn <sup>11</sup>
1	RH-1	1705	32,67	-	-
2	RH-2	172	37,23	Neg	Neg
3	RH-3	365	34,69	33,13	-
4	RH-4	138	Neg	37,40	Neg
5	RH-5	283	37,07	34,40	-
6	RH-6	201	34,95	34,42	-
7	RH-7	1800	33,25	-	-
8	RH-8	488	36,18	-	-
9	RH-9	2068	33,18	-	-
10	RH-10	5662	31,35	-	-
11	RH-11	18908	28,27	27,22	-
12	RH-12	35965	28,17	27,03	28,45
13	QCMD-1	5525	30,31	-	-
14	QCMD-2	3600	33,01	-	-
15	QCMD-3	179	Neg	-	-
16	QCMD-4	<100	37,12	-	-
17	QCMD-5	799	33,93	-	-
18	QCMD-6	833	33,80	-	-
19	QCMD-7	973	32,89	-	-
20	QCMD-8	0	Neg	-	-
21	QCMD-9	2342	32,98	-	-
22	QCMD-10	208	35,51	-	-
23	RH-Pos-1	Ct 32-34	34,29	32,69	35,68
24	RH-Pos-2	Ct 32-34	34,21	-	-

<sup>8</sup> Alle positive CMV prøver mottatt fra Rikshospitalet var målt med kopier/ml som konsentrasjon, unntatt de to positive kontroller (RH-Pos) som ble målt med Ct (Threshold cycle).

<sup>9</sup> Resultat uten internkontroll i ekstraksjon og PCR trinnet.

<sup>10</sup> Resultat med internkontroll i ekstraksjon og PCR trinnet.

<sup>11</sup> Resultat med internkontroll i ekstraksjon trinnet (ikke i PCR).

Prøve nr. 12 (RH-12) som var sterkest CMV positiv ble analysert i en 10-ganger seriefortynning  $10^0$ - $10^{-7}$ , resultat var at den ble påvist fra  $10^0$  til  $10^{-4}$  og  $10^{-7}$ , men ikke  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ . Og prøve nr. 23 (RH-Pos-1) ble analysert i en 10-ganger seriefortynning  $10^0$ - $10^{-2}$  og resultatet var at den ble påvist  $10^0$ - $10^{-2}$ . Dette ble gjort for å teste ut sensitiviteten på metoden (Appendiks H1).

CMV Real-time PCR resultater for prøvene 25-41 hentet fra FHI positiv arkiv består av forskjellig prøvemateriale, som urin, serum og spinalvæske. Det ble brukt forskjellig ekstraksjonsmetoder, en med og en uten IK i ekstraksjons- og PCR trinnet (Tabell 3.4). Alle CMV prøvene ble PCR positive ved bruk av MagNA Pure ekstraksjon, i motsetning til koking der noen ble falsk negative. Resultatene viser at MagNA Pure ekstraksjon er bedre egnet til ekstraksjon av både spinalvæske og urin.

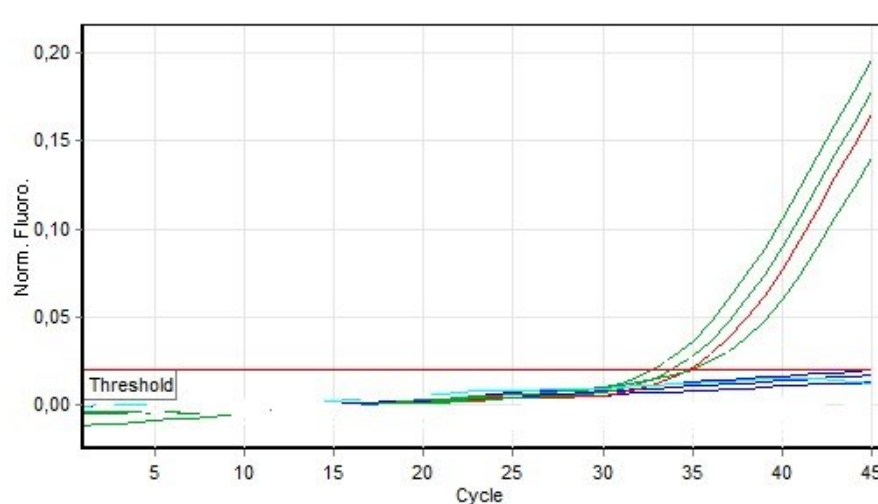
**Tabell 3.4: Oversikt over CMV PCR resultater for de gamle prøvene FHI «positiv arkiv» og ekstrahert med både MagNA Pure LC og koking.**

#	Prøve ID	Agens	Prøve mat.	Ekstraksjon metode <u>uten</u> <sup>12</sup> IK	Real-time PCR res. (Ct)	Ekstraksjon metode <u>med</u> <sup>13</sup> IK	Real-time PCR res. (Ct)	(Ct) IK
25	SMVI-1	CMV	Urin	Koking	Neg	MagNA	35,26	27,30
26	SMVI-2	CMV	Urin	Koking	31,37	MagNA	31,01	28,53
27	SMVI-3	CMV	Urin	Koking	26,48	MagNA	23,66	29,13
28	SMVI-4	CMV	Urin	Koking	33,48	MagNA	34,53	29,80
29	SMVI-5	CMV	Urin	Koking	32,29	MagNA	32,71	27,69
30	SMVI-6	CMV	Urin	Koking	37,5	MagNA	32,47	29,66
31	SMVI-7	CMV	Urin	Koking	37,52	MagNA	35,99	27,92
32	SMVI-8	CMV	Urin	Koking	Neg	MagNA	33,72	29,82
33	SMVI-9	CMV	Urin	Koking	Neg	MagNA	16,78	Neg
34	SMVI-10	CMV	Urin	Koking	35,10	MagNA	35,69	27,39
35	SMVI-14	CMV	Serum	MagNA	36,27	MagNA	35,56	33,04
36	SMVI-11	CMV	Sp.vs.	Koking	Neg	MagNA	35,46	28,62
37	SMVI-12	CMV	Sp.vs.	Koking	Neg	MagNA	33,22	29,25
38	SMVI-13	CMV	Sp.vs.	Koking	Neg	MagNA	33,88	27,78
39	SMVI-15	HSV	Sp.vs.	Koking	Neg	MagNA	Neg	28,78
40	SMVI-16	VZV	Sp.vs.	Koking	Neg	MagNA	Neg	28,76
41	SMVI-17	B19	Serum	MagNA	Neg	MagNA	Neg	28,96

<sup>12</sup> Uten internkontroll i ekstraksjon og PCR trinnet.

<sup>13</sup> Med internkontroll i ekstraksjon og PCR trinnet.

CMV spinalvæske prøvene 36 (SMVI-12), 37 (SMVI-13) og 38 (SMVI-14) ble ekstrahert både med MagNA Pure LC ekstraksjonsrobot og med koking for å sammenligne ekstraksjonsmetoder på spinalvæske prøver (Figur 3.5) (Tabell 3.5) (Appendiks H2). Resultatene viser at MagNA Pure er bedre egnet til ekstraksjon av spinalvæske.



**Figur 3.5: Sammenligning av Real-time PCR resultat for spinalvæske CMV prøver ekstrahert med både MagNA Pure LC Maskin og med koking.** De grønne linjene viser spinalvæske prøver som ble ekstrahert med MagNA Pure LC og de blå prøvene (som ligger under påvisning linjen Treshold) er de som ble kokt. Rød linje er CMV positiv kontroll.

**Tabell 3.5: Oversikt over CMV PCR resultater for de tre spinalvæske prøvene som ble ekstrahert både med MagNA Pure LC og koking.** Tabellen viser prøvene som kom positive ved bruk av MagNA Pure LC og var negative med koking.

#	Prøve ID	Agens	Prøve mat.	Ekstraksjon metode	Res. uten int.ktr (Ct)	Ekstraksjon metode	Res. uten int.ktr (Ct)
36	SMVI-12	CMV	Sp.vs.	MagNA	34,94	Koking	Neg
37	SMVI-13	CMV	Sp.vs.	MagNA	32,89	Koking	Neg
38	SMVI-14	CMV	Sp.vs.	MagNA	33,92	Koking	Neg

## 4 Diskusjon

### 4.1 TBEV

Hensikten med denne delen av mastergradsoppgaven er å studere utbredelsen av Tick-borne encephalitis virus (TBEV) i skogflått (*Ixodes ricinus*) og årsvariasjoner fra noen utvalgte områder på Sørlandet.

TBE sykdommen ble første gang diagnostisert i Norge i 1997 (Skarpaas et al. 2004). Tidligere studier har vist eksistensen av TBEV endemisk foci i Norge (Skarpaas et al. 2006; Andreassen et al. 2012).

Flåtten er avhengig av flere faktorer for å gå over fra et stadium til neste, som f. eks. tilstedeværelse av aktuelle vertsdyr og klima. Aktiviteten til flåtten er generelt påvirket av to klimatiske faktorer: temperatur og fuktighet, og flåtten krever et relativt fuktig mikroklima med høy temperatur. Det ble påvist at temperatur påvirker utvikling av flått fra et stadium til et annet betydelig, mens det ikke påvirker virusets infeksjons rate. Tvert imot påvirker den relative fuktigheten virusets infeksjons rate. Det er en kombinasjon mellom temperatur, fuktighet og varighet av fôring som påvirker flått utviklingen fra nymfe til fullt utviklede voksen (Danielová et al. 1983; Daniel and Dusbabek 1994; Andreassen et al. 2012).

Fuktighet under 80% vil redusere flåttens sjans for å overleve og forkorte dens aktive periode (Randolph et al. 1999). Det var derfor viktig å samle inn flått i dens mest aktive periode, dvs. ved relativt høy fuktighet og temperatur. I denne studien ble det samlet inn flått i juni i 2011 og mai-juni i 2012.

Mastergradsstudien bekrefter tidligere funn av TBEV endemiske foci i Norge, og våre analyser av flått fra Vestfold viser at TBEV finnes også i nye områder. I tillegg viser kartleggingen av TBEV forekomst i noen utvalgte områder i Sør-Norge over to år at TBEV forekomsten i flått varierte mellom lokalitetene og fra år til år på de samme innsamlingsstedene.

Økt forekomst av TBE sykdom i Europa kan skyldes flere faktorer som klimaendringer, økt eksponering, delvis på grunn av sosio-økonomiske og politiske endringer, og andre fortsatt ukjente faktorer (Randolph and Šumilo 2007; Süss 2011; Stefanoff et al. 2013). I Norge er trolig klimaendringer en av de viktigste faktorene for at TBEV forekomsten varierer fra sted til sted og fra år til år (Andreassen et al. 2012) (Tabell 3.1).

Denne studien samsvarer godt med andre europeiske studier, der TBE forekomsten varierer mye fra år til år (Süss 2011). Det generelle mønsteret gjennom Europa har gradvis endret seg med økning i TBE tilfeller de siste 30 årene blant annet i Italia, Tyskland og Sveits. En kontinuerlig økning i gjennomsnittlig temperatur og nedbør de siste tiårene har ført til en økning av fuktighet og overlevelse av flått. Situasjonen i Europa varierer fra land til land og antall TBE tilfeller i f.eks. Østerrike er redusert de siste 30 årene særlig på grunn av vaksinasjonskampanjer men også pga. økt generell bevissthet (Randolph and Šumilo 2007; Süss 2011).

Det ble ikke påvist sammenheng mellom TBEV forekomsten i flått i de områdene som ble inkludert i studien og antall pasienter med TBE som er meldt til Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS). Dette er i samsvar med tidligere studier (Stefanoff et al. 2013). Et eksempel på manglende samsvar mellom TBE tilfeller og TBEV forekomsten i flått er Mandal i Vest Agder fylke der det ble meldt to TBE tilfeller i 2011, mens TBEV ikke ble påvist i innsamlet flått. En mulig forklaring kan være at legene er mer oppmerksomme på TBE sykdommen i noen områder enn andre.

Vanligvis finner man flått i kystnære områder, f.eks. i 2013 fant vi ikke flått i Siljan i Telemark fylke som ligger inn i landet mens vi fant flått i Bjønnes som ligger nær kysten ved Langesund.

Det har blitt rapportert at forekomsten av TBEV og flått (*I. ricinus*) sprer seg i høyden i fjellet og nordover i Norge, Sverige, Finland (Jore et al. 2011). Dette skyldes sannsynligvis temperatur økning om sommeren. Reduksjon i fuktighet kan gradvis drive distribusjon av flått til høyere breddegrad og høyere områder over havet (Randolph and Rogers 2000).

Mange artikler som beskriver TBEV i flått er basert på et variabelt antall flått i hver pool, samt en blanding av voksne, larver og nymfer (Bormane et al. 2004; Han et al. 2005; Skarpaas et al. 2006; Danielova et al. 2010; Stefanoff et al. 2013). Dette gjør det vanskelig å sammenligne prevalens studiene fra land til land eller mellom regioner innenfor et gitt land.

I denne studien valgte vi bare å analysere nymfer. Dette skyldes at nymfer regnes som det viktigste stadium for overføring av TBEV fra flått til mennesker, siden de er mer tallrike enn voksne flått og mindre vertsspesifikke (Suss 2003; Gaumann et al. 2010). Størrelsen på en pool (antall nymfer per pool) og antall pools analysert fra hvert område vil påvirke beregning av EPP i et foci (Daniel 1999; Ebert et al. 2010).

Det er kun få studier i Norge som har undersøkt TBEV prevalensen i flått (Skarpaas 2006; Andreassen 2012). Siden TBE forekomsten ble påvist i Norge først i 1997, stilles det spørsmål ved om nye endemiske TBEV foci har blitt etablert nylig eller om de har eksistert lenge uten å ha blitt oppdaget på grunn av underdiagnostikk og lite kunnskap.

Ut fra beregning av anbefalt pool størrelse fra Epitools (<http://epitools.ausvet.com.au>) valgte vi å bruke en pool størrelse på 10 nymfer i denne studien. Dette for å kunne sammenligne denne studien med tidligere studier og for å få et sannsynlig resultat.

Vi benyttet et fast antall nymfer i hver pool for å sikre at lik mengde nukleinsyre ble isolert fra hver pool. Dette resulterer i et mer pålitelig EPP når man sammenligner TBEV tilstedeværelse og fravær og gjør at resultatet blir så nær virkelig forekomst i de forskjellige områdene som mulig.

Når det brukes samme antall nymfer i pool er det den beste tilnærming til å isolere lik mengde RNA. Bruk av samme antall nymfer i hver pool minker også risiko for ulike feilkilder fra oppsett til oppsett.

Hverken på Tjøme (V1) eller Veierland (V3) er det tidligere blitt påvist TBE sykdom eller TBEV i flått. På Tjøme var det totale innsamlete antall flått i 2011 kun 50% av det som burde vært samlet inn (32/74) ut fra beregnet forventet prevalens (EPP) for å finne minst en positiv pool.

I motsetning til 2011, fikk vi i 2012 samlet inn nok flått i forhold til beregnet med Epitools fra dette området og da påviste vi TBEV i flått (1/74) (Tabell 3.1).

Som vist i Tabell 3.1, ble det påvist flere positive pools i 2012 sammenlignet med 2011. Dette gjaldt for alle 3 lokalitetene som ble undersøkt begge årene, og variasjon ble påvist både mellom lokalitetene og fra år til år. Variasjonen i TBEV prevalensen fra år til år samsvarer med funn fra andre deler av Europa og kan skyldes faktorer som endring i klima eller andre faktorer som kan ha betydning for påvist variasjon, f.eks. endringer i gnagere bestand og/eller rådyr bestand (Süss 2011).

Et eksempel på slik variasjon finner vi i Mandal (S5) med EPP 1,22% i 2009, 0% i 2011 og 0,14% i 2012. Vinteren 2010-2011 var lang og kald med mye barfrost. Vinteren 2011-2012 var litt mildere (personlig informasjon fra Meteorologisk institutt) noe som kan ha ført til at vi fikk en økning av antall positive pools med TBEV denne sesongen enn forrige.

Årsaken til at vi ikke påviste TBEV positive pools i Tjøme (V1) og Veierland (V3) i 2011 kan skyldes at det ble samlet inn for lite antall flått i de to områdene.

Virusmengden i poolen avgjør om vi klarer å påvise viruset med Real-time PCR og om PCR produktet er mulig å bekrefte med pyrosekvensering. Siden prevalensen av TBEV i flått er lav i Norge (EPP=0,1-0,5%), er det viktig å samle inn nok flått for å kunne beregne riktig forekomst (Skarpaas et al. 2006; Andreassen et al. 2012). Dersom vi samler inn og analyserer for lite materiale kan vi få falske negative områder som vil være av stor betydning for vaksineanbefalingene for det enkelte området.

En annen faktor som kan være av betydning for påvisning av TBEV i flått er RNA isoleringen. Dette er et nøkkelement i hele analysen, og derfor var det svært viktig å mestre dette trinnet i den praktiske delen av studien. Urent RNA kan påvirke sensitiviteten og spesifisiteten av TBEV Real-time PCR metoden negativt.

I vår studie var vi nøye med at det var en jevn flyt fra vi tok flåtten opp fra fryseren til analyse resultatene med Real-time PCR var ferdig. Flåtten ble direkte overført fra fryser til RNA isolering med påfølgende revers transkripsjon av RNA til cDNA og videre til Real-time PCR uten frysing og tining innimellom.



Dette muliggjør påvisning av pools med lavt virus innhold. Gjentatt tining og frysing av RNA og cDNA vil føre til at disse (RNA og cDNA) kan degraderes, og det vil redusere sjansen for å påvise pools med lavt virus innhold.

Andre faktorer som er av betydning for å kunne påvirke påvisningen av TBEV i flått er blant annet ufullstendig homogenisering. Ufullstendig homogenisering kan føre til betydelig redusert RNA utbytte og kan forårsake tetting av RNeasy spinn kolonnene i følge leverandørens protokoll (QIAGEN Inc, CA, USA) (Egyhazi et al. 2004).

Det ble påvist positive pools ved Real-time PCR som ikke kunne bekreftes med pyrosekvensering. Dette kan skyldes at primerne har hybridisert på feil sted langs DNA-templatet, noe som kan gi uspesifikke PCR-produkter. Dette på grunn av at vi kjører med nokså lav stringens, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, for å få opp flest mulig positive pools. En annen forklaring kan være at virusmengden i poolene var høy nok til å gi positiv Real-time PCR produkt, men for lav til å bli bekreftet med pyrosekvensering.

Dette gir selvfølgelig usikkerhet i beregning av EEP. Funn fra 2012, f. eks fra Tjøme der vi samlet inn tilstrekkelig antall flått, viste at det var positiv TBEV pools selv om vi ikke fant tilsvarende i 2011. Disse positive pools fra 2012 ble bekreftet med pyrosekvensering. Dette viser at det ikke er tilstrekkelig å samle inn flått fra ett område kun en gang dersom resultatet blir negativt. Analyse betingelser eller andre faktorer som klima kan påvirke påvisningen av TBEV

Bruk av 10-ganger seriefortynning av TBEV positiv kontroll ( $10^{-3} - 10^{-7}$ ) i hvert oppsett sikret at Real-time PCR metoden var reproducerbar ved at vi kunne kontrollere at vi fikk samme resultat hver gang (Ct-verdi). Alle TBEV positive pools var nær påvisningsgrensen for Real-time PCR (Ct=31-48), noe som tyder på lav virus mengde i prøven. Dette tyder på at sannsynligvis er kun en av nymfene i poolen smittet med TBEV. Vi kan i vår metode ikke kvantitere mengde virus i prøvene da PCR produktet ikke skiller mellom levende og døde virus partikler og vi vet heller ikke hvor mange virus en positiv nymfe har. Virusmengden kan være avhengig av hvor lenge nymfer har vært smittet.

Noen av de TBEV positive pools fra Real-time analysene ble ikke bekreftet ved pyrosekvensering. I andre ble bare deler av sekvensen bekreftet. Dette ble vurdert ut fra hvor mange baser i sekvensen kunne sammenlignes med den TBEV positiv kontrollen (Soukupa).

Dersom TBEV i disse pools hadde mindre enn 70% sekvenslikhet med TBEV positiv kontroll ble de vurdert som negative.

Grunnen til at disse pools ikke hadde 100% sekvenslikhet med kontrollen kan skyldes at mengde Real-time PCR produkt var for lavt til å gi en god sekvens med pyrosekvensering, eller var falsk positive på grunn av uspesifikk Real-time PCR.

Når vi sammenligner våre funn med hva som er publisert tidligere ser vi at det er benyttet flere forskjellige PCR metoder. Forskjellige metoder kan ha forskjellig sensitivitet, og kan derfor påvirke påvisning av TBEV i flått på grunn av andre faktorer enn pool størrelse og antall flått undersøkt.

En studie fra Polen som brukte Schwaiger og Cassinottis PCR metoden (2003) påviste de TBEV i flått innsamlet fra områder i Sør-vest Polen (Stefanoff et al. 2010). I et samarbeidsprosjekt vår avdeling hadde med en Polsk gruppe ble pools analysert med samme PCR metode som ble brukt i vår studie. Disse Polske flåttene ble innsamlet fra tilsvarende områder som de som ble publisert av Stefanoff et al. (2010). I disse pools påviste vi TBEV (6/675) (personlig kommunikasjon, Åshild Andreassen-FHI), mens de fant ingen positive i studien presentert av Stefanoff et al. (2010). Dette viser at vår Real-time PCR metode egner seg for denne type studier.

Årsaken til ulik sensitivitet kan være at vi i vår PCR benytter lavere stringens enn PCR metoden publisert av Schwaiger og Cassinottis (2003). En annen mulig forklaring kan være at vår PCR metode amplifiserer et annet gen fragment. Schwaiger og Cassinotti (2003) har en metode som påviser et fragment i NS5 regionen som ligger i et ikke-kodende område av TBEV genomet. Vår PCR metode amplifiserer en del av E-genet i det kodende område av TBEV genomet.

En annen viktig faktor som kan være av betydning om man kan påvise TBEV fra flått er at man oftest finner TBEV i svært lokale foci. Det er derfor viktig at mange har kunnskap om området man samler inn flått fra og at det må samles materiale inn fra flere steder i samme område med noen meters avstand for å sikre pålitelig påvisning av TBEV sirkulering i et område.

Tidligere studier som har brukt nested RT-PCR har vist at TBEV prevalensen i flått hadde en tendens til å være høyere med nestet RT-PCR enn Real-time PCR. I disse studier sammenlignet de påvisning av flått fjernet fra mennesker med innsamlet flått fra felt og fant flere positive flått med å bruke nested RT-PCR enn Real-Time PCR (Oehme et al. 2002; Drago et al. 2004; Süss et al. 2006; Frimmel et al. 2010; Klaus et al. 2010; Wójcik-Fatla et al. 2011; Stefanoff et al. 2013). Dette viser at valg av metode for påvisning av TBEV er svært viktig for å oppnå et gode resultat.

Nested PCR kan være egnet når vi har små mengder virus i hver pool siden nested PCR er kjent for å være både veldig sensitiv og spesifikk. Når vår Real-time PCR metode ble sammenlignet med en nested RT-PCR metode beskrevet av Skarpaas (2006) fant vi at vår metode var 10 ganger mer sensitiv (upubliserte data).

Resultatene fra dette mastergradsstudiet er av betydning for å øke bevisstheten om TBEV utbredelse og smitte risiko i Norge og kan brukes til offentlig informasjon og anbefalinger for TBE vaksinasjon. For å forstå grunnlaget for hvorfor det er så vanskelig å påvise TBEV i felt studier må vi være oppmerksom på at flått ofte har lav virusmengde, at det er små områder som har få infisert individer på hvert innsamlingssted. Dette gjør at prevalensen av TBEV varierer fra sted til sted og fra år til år.

### **Videre planer:**

Resultater fra 2011 og 2012 flått innsamlingen viser variasjon i TBEV forekomst i forskjellige områder i Norge. Dette viser at det er behov for videre kartlegging av både tidligere kjente og nye ukjente områder med mulig TBEV smitte risiko. Det er også behov for å studere faktorer som kan ha betydning for TBEV forekomsten i flått i utvalgte områder.

Videre er det planlagt å undersøke TBEV i flått sammenlignet med TBEV i små pattedyr som for eksempel smågnagere, i tillegg til store pattedyr som rådyr og hjortedyr. Disse dyrene er viktige for at flåtten skal kunne spres i terrenget og øke bestanden ved at de får tilgang til et blodmåltid. Undersøkelse av andre vertsdyr i tillegg til flått vil derfor gi en bedre kartlegging og mer helhetlig oversikt over TBEV forekomsten i Norge.

## 4.2 CMV

Hensikten med denne delen av oppgaven var å etablere en Real-time PCR metode for påvisning av CMV i ulike prøvematerialer, samt å undersøke sensitiviteten og spesifisiteten av metoden.

Metoden ble tilpasset vår PCR plattform bestående av ekstraksjonsrobot (MagNA Pure LC, Roche ), pipetteringsrobot (Corbett Robotics CAS-1200) og PCR-instrument Rotor-Gene 6000 (QIAGEN). Vi ønsket å teste sensitiviteten av den modifiserte PCR metoden, spesielt med bruk av mindre mengde prøvemateriale. Dette kan være av stor betydning i diagnostikken siden mengde prøvemateriale kan være en begrensende faktor.

CMV Real-time PCR metoden ble testet på total 41 kjente serum prøver; 38 CMV positive og 3 positive for andre virus agens (Tabell 2.4).

I første utprøvingen av CMV Real-time PCR metoden ble det ikke brukt IK hverken i DNA ekstraksjons- eller PCR trinnet. Alle 24 CMV positive serum prøvene mottatt fra RH ble positive, med unntatt av to prøver som hadde få kopier virus/ml, henholdsvis prøve 4 og 15, i tillegg til prøve 20 som hadde 0 kopier virus/ml fra RH (Tabell 3.3).

Dette viser at vår modifiserte metode fungerte tilfredsstillende og at vi oppnådde tilsvarende resultater som RH uten bruk av internkontroll. Grunnen til at de to svakt positive prøvene fra RH ble falsk negative hos oss skyldes mest sannsynlig at vi i vår modifiserte metode kun bruker 140 mikroliter prøvemateriale i ekstraksjonen mens RH bruker 500 mikroliter prøvemateriale.

I videre utprøving ble noen av prøvene i tillegg analysert med IK i ekstraksjonstrinnet og andre med IK i både ekstraksjonstrinns- og PCR trinnet. På grunn av få antall prøver analysert med IK er det vanskelig å trekke sikre konklusjoner, men resultatene tyder på at bruk av IK ikke påvirker sensitiviteten av metoden.

En serie-fortynninger av et par sterkt CMV positive prøver ble undersøkt med CMV Real-time PCR metoden, både med og uten IK i PCR trinnet. Dette ble gjort for å få et bilde på sensitiviteten av den modifiserte metoden og for å kvantitere CMV i prøvene (Appendiks H1) (Tabell 3.3).

Resultatene viste at metoden hadde høy sensitivitet og egner seg godt til bruk for diagnostisering og kvantitering av CMV i serum. Re-testing av et utvalg av prøvene fra RH inkludert positiv kontroll viste også at den modifiserte metoden hadde høy reproduserbarhet.

Som forventet, vekslet de svakest positive prøvene mellom PCR positiv (med høy Ct verdi) og PCR negativ status. Resultater fra retestingen viste at bruk av IK i ekstraksjons- og PCR trinnet førte til at Ct verdien på noen av prøvene ble lavere enn uten bruk av IK (lavere Ct verdi betyr høyere CMV konsentrasjon i prøven). På grunn av få prøver analysert er dette funnet vanskelig å tolke, men kan tyde på at IK øker sensitiviteten av metoden. Ct verdiene for IK er som forventet lavere enn Ct verdiene for prøvene (FHI 2001, positiv arkivet) og resultatene viser at IK kan brukes sammen med flere typer prøvemateriale (Siste kolonnen, Tabell 3.4).

Våre resultater viser at IK hverken påvirker reproduserbarheten eller minker sensitiviteten av den modifiserte PCR metoden. Dette er i overensstemmelse med andre studier som har vist at IK ikke påvirker PCR resultatene og at PCR metoden var reproduserbar uavhengig av type prøvemateriale (Burrell et al. 2012; Henke-Gendo et al. 2012).

Andre studier har også vist at bruk av IK har ført til påvisning av PCR inhibitorer i prøvene (Stöcher et al. 2004). I vår studie har vi ikke påvist inhibitorer i prøvematerialet, noe som kan skyldes forholdsvis få prøver analysert.

Real-time PCR metodens sensitivitet og spesifisitet ble også sammenlignet med nested PCR, en metode som ble brukt for å påvise CMV i pasientprøver ved FHI tidligere (2001). Totalt ble 17 prøver fra «positiv arkivet» undersøkt med den modifiserte metoden og CMV ble påvist i alle prøvene (Tabell 3.4). Sammenlikningen viser at den modifiserte metoden er like sensitiv og spesifikk som nested PCR, en metode som tidligere ble brukt i diagnostikken. Nested PCR er forbundet med høy kontaminerings fare og er derfor lite egnet for bruk i diagnostikken på tross av metodens høye sensitivitet.

Sammenligning av ekstraksjonsmetodene viste at MagNA Pure ekstraksjonen var bedre egnet for nukleinsyre ekstraksjon enn koking, spesielt for spinalvæske prøvene (Tabell 3.5) (Figur 3.5). Om lag halvparten av prøvene ble negative med koking, og Ct verdi for prøver ekstrahert med MagNA Pure var lik eller lavere sammenlignet med prøvene som bare ble kokt.

Dette kan skyldes at i motsetning til koking blir man kvitt inhiberende stoffer i prøven ved MagNA Pure ekstraksjon. I tillegg analyserer man mer prøvemateriale ved MagNA Pure enn ved koking.

Tidligere studier har vist at bruk av MagNA Pure for nukleinsyre ekstraksjon er karakterisert med høy sensitivitet og sikrer pålitelig, reproducerbar laboratorier diagnostikk og har bedre ytelse enn andre nukleinsyre ekstraksjons systemer som for eksempel Chemagic system (Chemagen, Baesweiler, Germany) (Kang et al. 2012; Verheyen et al. 2012; Edelmann et al. 2013).

Mange virus som er beslektet med CMV kan ha lignende sekvensbiter i sitt genom som kan amplifiseres opp ved PCR slik at man får falske positive prøver. For å utelukke dette ble spesifisiteten av metoden undersøkt ved amplifisering av HSV, VZV og Parvovirus B19 positive prøver fra «positiv arkivet». Resultatene viser at Real-time PCR metoden var spesifikk siden den ikke påviste disse virus agens (Tabell 3.4).

Oppsummering av CMV delen i denne mastergradsoppgaven er at den modifiserte metoden er like bra eller bedre enn Rikshospitalets originale metode, og er spesifikk og sensitiv mhp. påvisning av CMV.

Både amplifikasjonseffektivitet, reproducerbarhet og robusthet av metoden var tilfredsstillende.

## 5 Konklusjon

### 5.1 TBEV

Denne studien viste vi at TBEV ble påvist i flått innsamlet fra alle de fire lokaliteter i Sør-Norge. Studien påviste også år til år variasjon i forekomst av TBEV i flått innenfor de fire lokalisasjonene. Denne variasjonen innen samme lokalitet kan skyldes forskjeller i klima, vekstsesong og eksisterende flått og pattedyr bestand i de forskjellige lokalitetene.

I lokaliteter der TBEV ikke ble påvist kan dette skyldes at virus nivået i flått var svært lav slik at vår test metode ikke var i stand til å påvise det. Man kan ikke utelukke tilstedeværelse av TBEV i flått på bakgrunn av et enkelt studium. Det er derfor viktig å kartlegge forekomst av TBEV i flått i flere studier for å kunne bekrefte eller avkrefte virus forekomsten i de forskjellige lokaliteter.

Dette studiet danner et viktig grunnlag for vaksine anbefaling for folk som ferdes mye utendørs i områder med kjent TBE risiko, og anbefalingene gjelder både fastboende og besøkende.

### 5.2 CMV

Real-time PCR metoden etablert ved FHI viste gode resultater, og påviste CMV virus med høy sensitivitet i forskjellige typer prøvemateriale. Metoden påviste ikke andre utvalgte DNA virus, og tilfredsstillende derfor kravene for spesifisitet.

MagNA Pure ekstraksjon viste seg godt egnet for ekstraksjon av DNA fra kliniske prøver. Samlet konklusjonen er at metoden er godt egnet for påvisning av CMV virus i diagnostisk sammenheng.

# Referanser

Abou El Hassan, M. A. I., et al. (2006). "A real-time RT-PCR assay for the quantitative determination of adenoviral gene expression in tumor cells." Journal of Virological Methods 133(1): 53-61.

Achazi, K., et al. (2011). "Detection and differentiation of tick-borne encephalitis virus subtypes by a reverse transcription quantitative real-time PCR and pyrosequencing." Journal of Virological Methods 171(1): 34-39.

Andreassen, A., et al. (2012). "Prevalence of tick borne encephalitis virus in tick nymphs in relation to climatic factors on the southern coast of Norway." Parasit Vectors 5: 177.

Andree, K. B., et al. (1998). "A nested polymerase chain reaction for the detection of genomic DNA of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*." Diseases of aquatic organisms 34(2): 145-154.

Barker, S. C. and A. Murrell (2008). "Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names." In Bowman, A.S., Nuttall, P. (EDs.), Ticks: Biology, Disease and Control. Cambridge University Press, Cambridge.: S1-39.

Bartlett, J. S. and D. Stirling (2003). A Short History of the Polymerase Chain Reaction. PCR Protocols. J. S. Bartlett and D. Stirling, Humana Press. 226: 3-6.

Bormane, A., et al. (2004). "Vectors of tick-borne diseases and epidemiological situation in Latvia in 1993-2002." Int J Med Microbiol 293 Suppl 37: 36-47.

Burrell, S., et al. (2012). "Routine use of duplex real-time PCR assays including a commercial internal control for molecular diagnosis of opportunistic DNA virus infections." Journal of Virological Methods 185(1): 136-141.

Cha, T. A., et al. (1996). "Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains." J Virol 70(1): 78-83.

Chou, S. W. (1986). "Acquisition of donor strains of cytomegalovirus by renal-transplant recipients." N Engl J Med 314(22): 1418-1423.

Correa, A. M., et al. (2013). "Unique nucleocytoplasmic dsDNA and +ssRNA viruses are associated with the." Isme j 7(1): 13-27.

Cowling, D. W., et al. (1999). Comparison of methods for estimation of individual-level prevalence based on pooled samples. Prev Vet Med. Netherlands. 39: 211-225.



Crough, T. and R. Khanna (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. Clin Microbiol Rev. United States. 22: 76-98, Table of Contents.

Csango, P. A., et al. (2004). "Tick-borne encephalitis in southern Norway." Emerg Infect Dis 10(3): 533-534.

Daniel (1999). Biostatistics. New York: A foundation for analysis in the Health Sciences.

Daniel, M. and F. Dusbabek (1994). "Micrometeorological and microhabitat factors affecting maintenance and dissemination of tick-borne diseases in the environment." Sonenshine DE and Mather TE (eds.) Ecological Dynamics of Tick-borne Zoonoses: 91-138.

Danielova, V., et al. (2010). "Integration of a tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi* sensu lato into mountain ecosystems, following a shift in the altitudinal limit of distribution of their vector, *Ixodes ricinus* (Krkonose mountains, Czech Republic)." Vector Borne Zoonotic Dis 10(3): 223-230.

Danielová, V., et al. (1983). "Influence of microclimatic factors on the development and virus infection rate of ticks *Ixodes ricinus* (L.) under experimental conditions." Folia Parasitol (Praha) 30: 153-161.

Drago, L., et al. (2004). "Comparison of nested PCR and real time PCR of Herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients." BMC Infectious Diseases 4(1): 55.

Ebert, T. A., et al. (2010). "Reexamining the Pooled Sampling Approach for Estimating Prevalence of Infected Insect Vectors." Annals of the Entomological Society of America 103(6): 827-837.

Ecker, M., et al. (1999). "Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia." J Gen Virol 80 ( Pt 1): 179-185.

Edelmann, A., et al. (2013). "Performance of the MagNA Pure 96 system for cytomegalovirus nucleic acid amplification testing in clinical samples." J Clin Microbiol 51(5): 1600-1601.

Egyhazi, S., et al. (2004). "Proteinase K added to the extraction procedure markedly increases RNA yield from primary breast tumors for use in microarray studies." Clin Chem 50(5): 975-976.

ESG, S. (2009). Epitools Epidemiological Calculators.: AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease; <http://epitools.ausvet.com.au>.

Fakhrai-Rad, H., et al. (2002). "Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms." Hum Mutat 19(5): 479-485.

Fauquet, C. M. (2005). *Virus Taxonomy: VIII report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Amsterdam, Elsevier Academic Press: p. 981-988.

Folkehelseinstitutt (2009). "Skogflåtten (*Ixodes ricinus*), [http://www.fhi.no/eway/default.aspx?MainArea\\_5661=5568:0:15,1895:1:0:0:::0:0&MainLeft\\_5568=5544:58877::1:5570:1:::0:0&pid=233&trg=MainLeft\\_5568.](http://www.fhi.no/eway/default.aspx?MainArea_5661=5568:0:15,1895:1:0:0:::0:0&MainLeft_5568=5544:58877::1:5570:1:::0:0&pid=233&trg=MainLeft_5568.)"

Folkehelseinstitutt (2010). "Cytomegalovirusinfeksjon-Smittevernbooka, [http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft\\_6039&MainArea\\_5661=6039:0:15,5078:1:0:0:::0:0&MainLeft\\_6039=6041:82703::1:6043:29:::0:0.](http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_6039&MainArea_5661=6039:0:15,5078:1:0:0:::0:0&MainLeft_6039=6041:82703::1:6043:29:::0:0.)"

Foulon, I., et al. (2008). "Hearing Loss in Children With Congenital Cytomegalovirus Infection in Relation to the Maternal Trimester in Which the Maternal Primary Infection Occurred." *Pediatrics* 122(6): e1123-e1127.

Frimmel, S., et al. (2010). "[Tick-borne encephalitis virus in humans and ticks in Northeastern Germany]." *Dtsch Med Wochenschr* 135(27): 1393-1396.

Gaumann, R., et al. (2010). High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland. *Appl Environ Microbiol*. United States. 76: 4241-4249.

Gelderblom, H. R. (1996). *Structure and Classification of Viruses*. *Medical Microbiology*. S. Baron. Galveston TX, The University of Texas Medical Branch at Galveston.

Grard, G., et al. (2007). "Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy." *Virology* 361(1): 80-92.

Han, X., et al. (2005). "Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Lithuania." *J Med Virol* 77(2): 249-256.

Heinz, F. X. and K. Stiasny (2012). "Flaviviruses and flavivirus vaccines." *Vaccine* 30(29): 4301-4306.

Henke-Gendo, C., et al. (2012). "Improved quantitative PCR protocols for adenovirus and CMV with an internal inhibition control system and automated nucleic acid isolation." *Journal of Medical Virology* 84(6): 890-896.

Hillyard, P., D. (1996). *Ticks of North-West Europe*. "Synopses of the British Fauna" (New Series) No. 52.. The Linnean Society of London and the Estuarine and Coastal Sciences, Montford Bridge, U.K. ISBN 1-85153-257-9.

Ho, M. (2008). "The history of cytomegalovirus and its diseases." *Med Microbiol Immunol* 197(2): 65-73.

- Holzmann, H., et al. (2009). "Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria." Emerg Infect Dis 15(10): 1671-1673.
- Institutt for biovitenskap, D. m.-n. f. (2011). "PCR." from <http://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html>.
- Jore, S., et al. (2011). "Multi-source analysis reveals latitudinal and altitudinal shifts in range of *Ixodes ricinus* at its northern distribution limit." Parasit Vectors 4: 84.
- Kang, S. H., et al. (2012). "Comparison of MagNA Pure 96, Chemagic MSM1, and QIAamp MinElute for hepatitis B virus nucleic acid extraction." Ann Clin Lab Sci 42(4): 370-374.
- Kisselev, L. L., et al. (1992). Lev Zilber, the Personality and the Scientist. Advances in Cancer Research. F. V. W. a. G. K. George, Academic Press. Volume 59: 1-40.
- Klaus, C., et al. (2010). "Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk, non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany." Clinical Microbiology and Infection 16(3): 238-244.
- Kleppe, K., et al. (1971). "Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases." Journal of Molecular Biology 56(2): 341-361.
- Knipe, D. M. and P. M. Howley (2007). *Fields Virology*, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1;2: 1102-1228, 2703-2758.
- Kovalev, S. Y., et al. (2010). "Distribution of Far-Eastern tick-borne encephalitis virus subtype strains in the former Soviet Union." J Gen Virol 91(Pt 12): 2941-2946.
- Kreil, T. R., et al. (1998). "Vaccination against tick-borne encephalitis virus, a flavivirus, prevents disease but not infection, although viremia is undetectable." Vaccine 16(11-12): 1083-1086.
- Lashini, H., et al. (2011). "Development of PCR assay for early detection of CMV infection in renal transplant recipients." Nephro Urol Mon 03(02): 106-108.
- Llop, P., et al. (2000). "Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material." Appl Environ Microbiol 66(5): 2071-2078.
- Lundkvist, k., et al. (2001). "Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: evidence for co-circulation of three distinct subtypes." J Med Virol 65(4): 730-735.

- Lurain, N. S., et al. (2006). Analysis of the human cytomegalovirus genomic region from UL146 through UL147A reveals sequence hypervariability, genotypic stability, and overlapping transcripts. *Virology*. England. 3: 4.
- Madigan, M. T., et al. (2003). *Brock Biology of Microorganisms, Tenth Edition – Pearson Education*.
- Madigan MT, M. J. (2006). *Brock Biology of Microorganisms (11th ed.)*. Prentice Hall.
- Mansfield, K. L., et al. (2009). "Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis." *J Gen Virol* 90(Pt 8): 1781-1794.
- McPherson, M. and S. Moller (2009). *PCR, 2nd edition, The Basics*, Tylor & Francis Books UK.
- Mehl, R. (1999). "Flått og borreliose i norge - epidemiologi. Nytt om legemidler. Behandling og profylakse av flåttbårne sykdommer.": 22:15-16.
- Mejlon, H. A. and T. G. Jaenson (1993). "Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in different vegetation types in Sweden." *Scand J Infect Dis* 25(4): 449-456.
- MSIS Norwegian Institute of Public Health: *Norwegian Surveillance System for Communicable Diseases (MSIS)*. 2012.
- Oehme, R., et al. (2002). "Foci of tick-borne diseases in Southwest Germany." *International Journal of Medical Microbiology* 291, Supplement 33(0): 22-29.
- Parola, P. and D. Raoult (2001). "Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat." *Clin Infect Dis* 32(6): 897-928.
- Porter-Jordan, K., et al. (1990). "Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA." *J Med Virol* 30(2): 85-91.
- Randolph, S. E., et al. (1999). "Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate." *Parasitology* 118 ( Pt 2): 177-186.
- Randolph, S. E. and D. J. Rogers (2000). "Fragile transmission cycles of tick-borne encephalitis virus may be disrupted by predicted climate change." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267(1454): 1741-1744.
- Randolph, S. E. and D. Šumilo (2007). "11. Tick-borne encephalitis in Europe: dynamics of changing risk." *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe* 1: 187.
- Riley, H. D., Jr. (1997). "History of the cytomegalovirus." *South Med J* 90(2): 184-190.

- Ronaghi, M. (2001). "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing." Genome Res 11(1): 3-11.
- Ronaghi, M., et al. (1998). "A sequencing method based on real-time pyrophosphate." Science 281(5375): 363, 365.
- Royo, J. L., et al. (2007). "Pyrosequencing protocol using a universal biotinylated primer for mutation detection and SNP genotyping." Nat Protoc 2(7): 1734-1739.
- Royuela, E., et al. (2006). "Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus." Journal of Virological Methods 133(1): 14-19.
- Sacks, J. M., et al. (1989). "Prevalence estimation from pooled samples." Am J Vet Res 50(2): 205-206.
- Saiki, R. K., et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science 230(4732): 1350-1354.
- Schwaiger, M. and P. Cassinotti (2003). "Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA." Journal of Clinical Virology 27(2): 136-145.
- Shojaie, F. and M. Dehestani (2010). The simulation of virus life cycle with quantum gates. Comput Biol Med. United States, 2010 Elsevier Ltd. 40: 359-362.
- Skarpaas, T., et al. (2006). "Tickborne encephalitis virus, Norway and Denmark." Emerg Infect Dis 12(7): 1136-1138.
- Skarpaas, T., et al. (2004). "First human cases of tickborne encephalitis, Norway." Emerg Infect Dis 10(12): 2241-2243.
- Soleng, A. and V. Kjelland "Borrelia burgdorferi sensu lato and Anaplasma phagocytophilum in Ixodes ricinus ticks in Brønnøysund in northern Norway." Ticks and Tick-borne Diseases(0).
- Sonal Panse, e. b. P. A. (2010). "The Differences Between Lytic and Lysogenic Cycle." from <http://www.brighthub.com/science/genetics/articles/30611.aspx>.
- Stefanoff, P., et al. (2013). "Virus Detection in Questing Ticks is not a Sensitive Indicator for Risk Assessment of Tick-Borne Encephalitis in Humans." Zoonoses and Public Health 60(3): 215-226.
- Stöcher, M., et al. (2004). "Automated detection of five human herpes virus DNAs by a set of LightCycler PCRs complemented with a single multiple internal control." Journal of Clinical Virology 29(3): 171-178.

Suss, J. (2003). Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. Vaccine. Netherlands, 2002 Published by Elsevier Science Ltd. 21 Suppl 1: S19-35.

Süss, J. (2011). "Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia—An overview." Ticks and Tick-borne Diseases 2(1): 2-15.

Süss, J., et al. (2006). "TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in *Ixodes ricinus* removed from humans." International Journal of Medical Microbiology 296, Supplement 1(0): 63-68.

Verheyen, J., et al. (2012). "Extraction of viral nucleic acids: comparison of five automated nucleic acid extraction platforms." J Clin Virol 54(3): 255-259.

Wang, Y., et al. (2013). "Lytic cycle: A defining process in oncolytic virotherapy." Applied Mathematical Modelling 37(8): 5962-5978.

Wikipedia.org. "Wikipedia.org." from [http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction](http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction).

Wójcik-Fatla, A., et al. (2011). "Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from the Lublin region (eastern Poland)." Ticks and Tick-borne Diseases 2(1): 16-19.

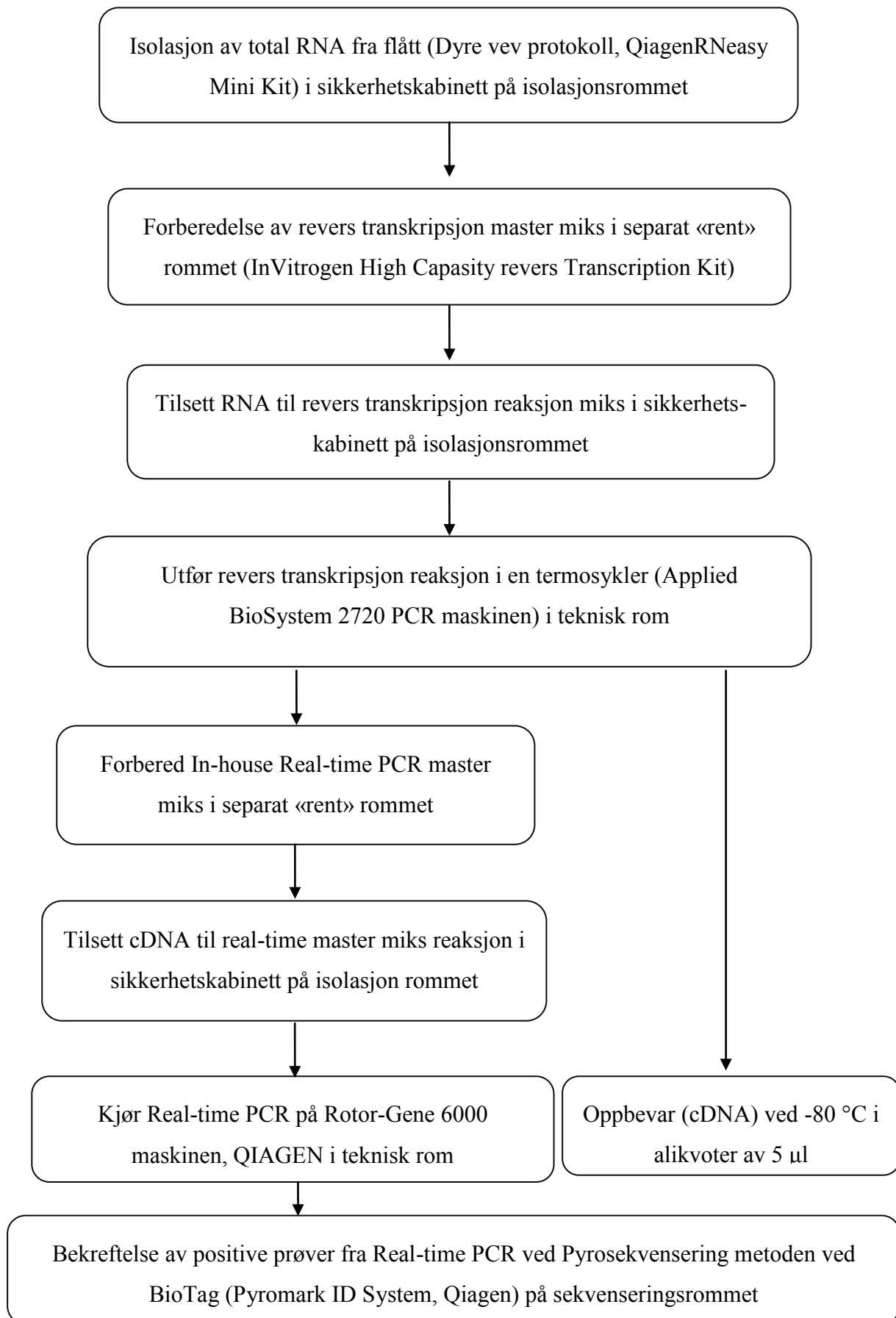
Zhang, S., et al. (2010). Monitoring human cytomegalovirus infection with nested PCR: comparison of positive rates in plasma and leukocytes and with quantitative PCR. Virology 50(1): 73-79.

Zhang, W., et al. (2003). "Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue." Nat Struct Biol 10(11): 907-912.

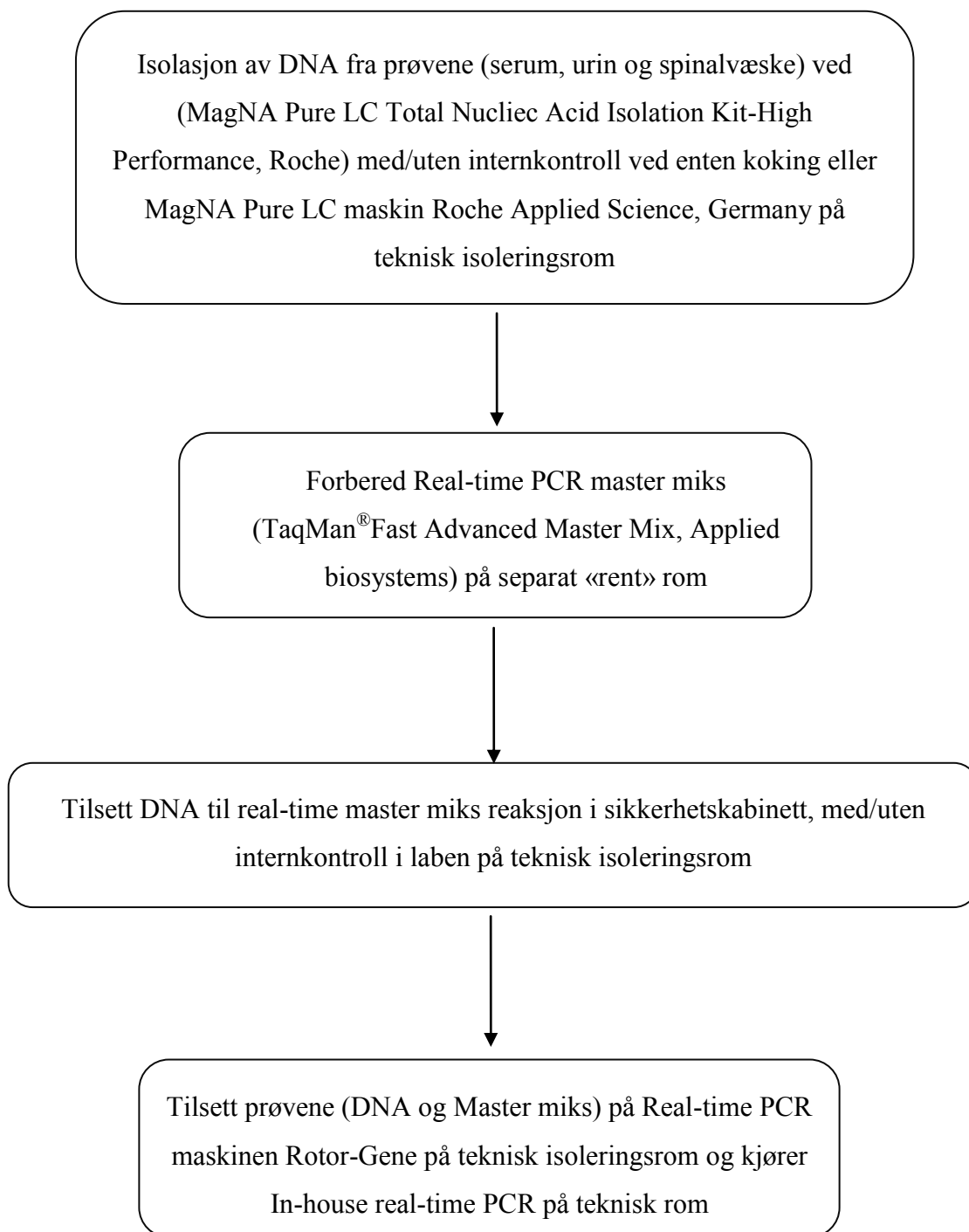
Zilber, L. A. (1939). "Spring (spring–summer) epidemical tick-borne encephalitis." (56): 9-37.

Zweyberg Wirgart, B., et al. (1998). "Sequence variation within three important cytomegalovirus gene regions in isolates from four different patient populations." J Clin Microbiol 36(12): 3662-3669.

## Appendiks A: Flowskjema arbeid for TBEV



## Appendiks B: Flowskjema arbeid for CMV





## Appendiks C: RNeasy mini Kit for opprensning av total RNA fra dyreceller og vev.

- C1- RNeasy mini Kit prosedyre.

RNA i høstede vev er ikke beskyttet før vevet er brutt ned og homogenisert i trinn 1.

Frosset vev må holdes kjølig under håndtering for det tilsettes lysesløsning med RNase inhibitorer. Den aktuelle prosedyre skal utføres så raskt som mulig og alle de resterende trinnene foregår i romtemperatur.

**1.** Overfør vev til homogeniseringsrør med buffer RLT (Appendiks C2) (ikke bruk mer enn 30 mg vev).

Flått har et hardt skall som må knuses, derfor valgte vi en prosedyre med stål kuler.

For lettere homogenisering ble det anbefalt å bruke 350 µl RLT buffer (se tabell nedenfor).

Nymfer ble overført med pøse til et eppendorfrør som inneholder 4 stål kuler (beads) og 350 µl RLT buffer.

Buffer RLT mengden for vev avbrudd og Homogenisering

Utgangsmateriemengden (mg)	Mengden av Buffer RLT (µl)
<20	350
20–30	600

Knust ved hjelp av en Precellys® 24 vev homogenisator.

- 20 sekunder med 5500 rpm x1.

**2.** Sentrifuger lysatet i 3 min ved maks hastighet (14000 rpm) (Eppendorf Centrifuge 5417C, Hamburg, Germany). Fjern forsiktig supernatanten med pipettering, og overfør den til et nytt eppendorfrør. Bruk bare denne supernatant (lysate) i de påfølgende trinn i prosedyren.

I noen preparater, vil meget små mengder av uoppløselig materiale være tilstede etter 3 min sentrifugering. Dette må ikke komme med når man overfører supernatanten til et nytt eppendorfrør da det kan hemme binding av RNA til membranen i spinnkolonnen.

**3.** Tilsett 1 volum (likt volum) av 70% etanol (350 µl) til den supernatanten, og bland øyeblikkelig ved 5 ganger pipettering i røret før blandingen overføres til spinnkolonnen. Ikke sentrifuger. Fortsette umiddelbart til trinn 4.

Merk: Volumet av lysate kan være mindre enn 350 µl grunnet tap under homogenisering og sentrifugering i trinn 1 og 2.

Merk: bunnfall kan være synlig etter tilsetning av etanol. Dette påvirker ikke prosedyren.

- Bland godt med pipetteringen før prøven settes på kolonnen.

**4.** Overføre opptil 700 µl av prøven til en RNeasy spinnkolonne plassert i et 2 ml oppsamlingsrør. Lukk lokket forsiktig på kolonnen, og sentrifuger i 15 s på  $\geq 8000 \times g$  (14,000 rpm). Kast supernatanten.

Bruk om igjen oppsamlingsrøret i trinn 5.

Hvis prøvevolumet overstiger 700 µl, sentrifuger suksessive allikvoter i samme RNeasy spinnkolonnen. Kast supernatanten etter hvert sentrifugering.

**5.** Tilsett 700 µl buffer RW1 (Appendiks C2) til RNeasy spinnkolonnen. Lukk lokket forsiktig, og sentrifuger i 15 s på  $\geq 8000 \times g$  (14,000 rpm) for å vaske vekk cellerester fra spinnkolonnemembran. Kast supernatanten.

Bruk om igjen oppsamlingsrøret i trinn 6.

Merk: Etter sentrifugering, fjern forsiktig RNeasy spinnkolonnen fra oppsamlingen røret slik at kolonnen ikke komme i kontakt med supernatanten. Pass på å tømme oppsamlingsrøret helt.

**6.** Tilsett til 500 µl buffer RPE (Appendiks C2) som inneholder 70% etanol til RNeasy spinnkolonnen.

Lukk lokket forsiktig, og sentrifuger i 15 s på  $\geq 8000 \times g$  (14,000 rpm) for å vaske spinnkolonnemembran. Kast supernatanten.

Bruk om igjen oppsamlingsrøret i trinn 7.

**7.** Tilsett 500 µl buffer RPE til RNeasy spinnkolonnen. Lukk lokket forsiktig, og sentrifuger i 2 min på  $\geq 8000 \times g$  (14,000 rpm) for å vaske spinnkolonnemembran.

Den lange sentrifugering tørker spinnkolonnemembran, som sikrer at ikke blir rester av etanol er overført under RNA eluering. Etanol rester kan forstyrre nedstrøms reaksjoner.

Merk: Etter sentrifugering, fjernes forsiktig RNeasy spinnkolonnen fra oppsamlingsrøret slik at kolonnen ikke komme i kontakte med supernatanten. Ellers vil overføringen av etanol til det nye oppsamlingsrøret kunne skje. Overføring av etanol til elueringsrøret vil kunne føre til lavere utbytte av RNA på grunn av etanol vil hindre oppløsning av RNA fra membranen.

**8.** Plasser RNeasy spinnkolonnen i et nytt 2 ml oppsamlingsrør, og kast det gamle. Lukk lokket forsiktig, og sentrifuge ved full hastighet i 1 minutt for å fjerne alt rester av etanol fra RPE bufferen (valgfritt).

**9.** Plasser RNeasy spinnkolonnen i en ny 1,5 ml eppendor frør. Tilsett 40 µl 10 mM Tris pH 8,8 midt på spinnkolonnemembranen. Lukk lokket forsiktig og sentrifuger i 1 min på  $\geq 8000 \times g$  (14,000 rpm) for å eluere ut RNA.

**10.** Gjentar trinn 9 ved hjelp av eluatet fra trinn 9. Dette er for å få et høyere utbytte av RNA). Bruk om igjen eppendorfrøret fra trinn 9.

Ved å bruke eluatet fra trinn 9, vil RNA volumet kunne bli redusert med 15-30% i forhold til det som oppnås ved hjelp av et høyere volum av eluat i trinn 9 første gang. Men dersom man repeterer trinn 9 kan dette gi en høyere RNA konsentrasjonen i det endelige eluatet.

- C2- RNeasy mini kit buffer beskrivelse:

- I. RLT buffer er RNeasy lyserings buffer som inneholder en høy konsentrasjon av guanidin isothiocyanate. Dette bidrar til bindingen av RNA til silikamembran.
- II. RW1 buffer inneholder et guanidin salt og etanol. Denne blir benyttet som en stringent vaskebuffer som effektivt fjerner biomolekyler som karbohydrater, proteiner, fettsyrer osv., som er ikke-spesifikt bundet til silikat membran.
- III. RPE buffer med 70% etanol er en mild vaskebuffer. Dens viktigste funksjon å fjerne spor av salter, som fortsatt er på kolonnen på grunn av buffere brukt tidligere i protokollen. Etanol, som er tilsatt, er en viktig bestanddel av RPE bufferen.

## Appendiks D: TBEV PCR standard reagensmengder oppsett og betingelsene.

- D1- TBEV Revers Transkripsjon master miks reaksjon:

Komponent	Mengde ( $\mu\text{L}$ ) / 1x prøve
10X RT Buffer	2,0
25X dNTPMix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	8,2
<b>Total mix</b>	<b>15 <math>\mu\text{L}</math></b>

*15  $\mu\text{L}$  (RT) Mix + 5  $\mu\text{L}$  (ca. 500 ng) RNA = 20  $\mu\text{L}$  Total volume/rør*

- D2- TBEV Revers Transkripsjon PCR betingelsene:

Temperatur°C	Tid
25°C	10 min.
37°C	120 min.
85°C	5 min.
4°C	∞

- D3- TBEV Real-time PCR master miks reaksjon:

Komponent	Mengde (µL) / 1x prøve
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
10X AB Buffer	2,5
25X dNTP	0,2
25 µM 320 F	0,25
25 µM 373 R + Biotin	0,25
25 µM 339 Probe	0,3
pt-Taq enzym <sup>14</sup>	0,19 (Units)
RNase-free H <sub>2</sub> O	15,81
<b>Total mix</b>	<b>22 µL</b>

*22 µL Mix + 3 µL cDNA = 25 µL Total volume/rør*

---

<sup>14</sup> Platinum®Taq DNA Polymerase enzym fra Invitrogen™.

**10X AB Buffer inneholder:**

75 ml 1 M Tris pH 8.8

20 ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>

0.2 ml Tween 20

4.8 ml RNase free water

**Total** 100 ml

- D4- TBEV Real-time PCR betingelsene:

Temperatur°C	Tid	Antall sykluser
95°C	2 min.	1
95°C	15 sek.	48
60°C	45 sek.	
72°C	30 sek.	1

## Appendiks E: Prosedyren til pyrosekvenseringen.

### Lag Master mix:

Irxn:                   40 µl ddH<sub>2</sub>O Bruk filtrert H<sub>2</sub>O  
                          17 µl Binding Buffer)  
                          3µl streptavidin (Må ristes godt opp på Whirlymixer)

Sett Master mix i kjøleskap til det skal brukes.

### Lag Primer Mix:

Irxn:                   43µl Annealing buffer  
                          0,8 TBE 320F seq. primer  
                          1,2 DD vann

Sett i kjøleskap til det skal brukes.

### NÅR PCR ER FERDIG:

1. Ta ut master mix fra kjøleskap, rist godt opp på vortex (for å slemme opp streptavidin kuler). Fordel 60µl på ferdige nummererte stripsrør i samme antall som prøver. Ta med til sikkerhetskabinettet og overfør 20µl Real-time PCR produkt til rørene.
2. Rist stripsene med lokk på riste maskin i 10 minutter i romtemperatur (RT).
3. Ta ut primer mix fra kjøleskap, og fordel 45µl fra denne i hver brønn i pyrosekvenserings platen i samme antall og rekkefølgen som prøvene i stripsene.

## GJØR KLAR TIL VASK:

4. Sett plastkarene på sine merkede plasser i vakuumpumpen, og fyll i:  
vaskebuffer, NaOH, DDH<sub>2</sub>O og 70% Etanol i de respektive karene.
5. Slå på varmeblokk 80°C.
6. Slå på vakuumpumpen, sjekk at filterne i vakuumpumpen ikke er tett ved å sette vaskeanordningen i karet med destillert H<sub>2</sub>O, og la den gå i ca. 20 sek til det strømmer væske gjennom filterne og ut i slangen.
7. Sett pyrosequenseringsplaten m/ primer mix i stativ med brønn nr. 1 øverst til venstre.  
NB! merk avskåret hjørne ved brønn 1.
8. Finn frem Enzym + Substrat til tining (Flasker lagres ferdig løst ved -20°C, lages ny ved behov fra tørrstoff etter oppskrift fra leverandør)
9. Når stripsene med master mix og PCR produkt er ferdig ristet etter 10 min, tas stripsene med til sikkerhetskabinettet. Der fjerner man forsiktiglukkene (for å unngå kontaminering av prøvene) og kast dem. Deretter settes stripsene i vakuumpumpen med rør nr. 1 øverst til venstre (viktig å ha riktig orientering på rørene).
10. Slå på vakuumpumpen: Sjekk at vakuumpumpen er OK (over rødt felt)
  - A. Sett filterholder (som er koblet til vakuumpumpen) i rørene ca. 1 min. Se etter at rørene blir sugd helt tomme. Rist på holderen av og til for at kuler skal festes godt til filterne.
  - B. Sett filteranordningen i etanol ca. 5 sek til du ser at det kommer væske i slangen (Presipitering av løst materiale).
  - C. Sett filteranordningen i NaOH ca. 5 sek til du ser at det kommer væske i slangen (Denaturering av ds DNA bundet til kuler).
  - D. Sett filteranordningen i vaskebuffer ca. 5 sek til du ser at det kommer væske i slangen (Vasker av rester av PCR produkt og primere).
  - E. Snu vaskeanordningen 180° og slå av pumpe og vakuumpumpe.



11. Sett vaskeanordningen i brønnene på sekvenseringsplaten med primer mix. Her er det viktig at rekkefølgen på prøvene i stripsene er lik med det man har skrevet opp for sekvenseringsplaten. (Her blandes streptavidin kuler som bærer enkelttrådig biotinyleret PCR produkt med primer mix).
12. La dette stå i 5 min ved romtemperatur og rist litt av og til for å løsne streptavidin kuler med enkelt trådet DNA fra filteret før sekvenseringsreaksjon.
13. Kast stripsene i gul riskavfallsbøtte i sikkerhetsbenk.

Når det er gått 5 min settes filter ordningen i vannkaret for rensing og lar den suge gjennom destillert vann i noen minutter. Deretter setts den så på plass til tørk.

Prøveplaten settes i varmeblokk 80°C i 2 min (for å binde primer til enkelt trådet DNA - PCR produkt). Settes deretter til avkjøling på benk til den får romtemperatur

Vask så alle beholdere for etanol, vann, NaOH og vaskebuffer fra vakuum maskinen før de settes til tørk.

#### GÅ TIL PC:

Slå på Pyrosekvenserings maskinen.

Start Ikonet PyroMark ID,

Logg inn.

Velg SQA-run (Sequence analysis), gå til sist kjørte test, Duplicate run step.

Skriv inn alle prøvene.

Maskinen beregner hva du trenger av substrat (S) + enzym (E) + mengde av nukleotidene C, T, G og A til kjøringen.

Finn frem klossen til pyrosekvensering maskinen (Figur A), sett på bunnen for å hindre at det lekker ut væske fra produsenten. Fyll i brønnene med den angitte mengde

E mix (Enzym), S mix (Substrat), nukleotidene C, T, G og A i de mengdene maskinen har beregnet i de angitte brønnene (Figur A).



**Figur A: PyroMark Q96 klossen og mal.** Malen viser hvor man skal sette de forskjellige materialer i brønnene.

Ta av bunnen av klossen først. Sett så klossen i maskinen med etiketten alltid mot deg.. Sett sekvensering platen i maskinen, lukk lokkene og start kjøring. Sekvenseringsreaksjonen er skjematisk fremstilt i figur 1.11 foran i teksten.

Når programmet er ferdig, merker du prøvene som skal analyseres og får ut et ferdig pyrogram slik som beskrevet i figur 1.11 og 1.12

Rengjør klossen 3x med destillert vann, sjekk at den ikke er tett ved å presse vann gjennom dysene.

## Appendiks F: CMV nukleinsyre isoleringsmetoder

- F1- MagNA Pure LC Total Nukleinsyre Isolasjon Kit-High Performance

### Kitinnhold:

- Vaskebuffer I (for fjerning av PCR inhibitorer)
- Vaskbuffer II (for fjerning av salter, proteiner osv.)
- Vaskbuffer III (for fjerning av salter osv.)
- Lysis / Binding Buffer (for lysering og binding av totale nukleinsyre)
- Proteinase K (for fordøyelsen av proteiner)
- Proteinase K Buffer II (til rekonstituering av Proteinase K)
- Magnetiske Glass Partikler (MGPs) Suspensjon (for binding av totale nukleinsyre)
- Elueringsbuffer (for eluering av ren totale nukleinsyre)

Prinsippet trinnene av MagNA Pure LC total nukleinsyre isolasjon prosedyren er følgende:



**Figur B: MagNA Pure LC Total nukleinsyre isolasjon Kit-High Performance prosedyretrinnene (Roche Applied Science, Germany). Figuren viser fremgangsmåte som gjennomgår i MagNA Pure LC apparatet med isolasjon kittet.**

- 1) Prøvematerialet pipetteres til brønnene av prøver kassetten.
- 2) Lysis / bindingsbuffer tilsettes til prøven, noe som resulterer i fullstendig cellelyse og frigjøring av nukleinsyrer. Nukleaser er denaturert.
- 3) Proteinase K tilsatt til prøvene og proteiner er fordøyd.
- 4) Nukleinsyrer binder seg til silica overflaten av de tilsatte MGPs, grunnet kaotropisk salt betingelser, isopropanol og den høye ionestyrke av Lysis / bindingsbuffer.
- 5) MGPs med bundne nukleinsyrer er magnetisk adskilt fra gjenværende lyserte prøve.
- 6) MGPs med bundne nukleinsyrer blir vasket gjentatte ganger med vaskebuffer for å fjerne ubundne stoffer, f.eks, proteiner (nukleaser), cellemembraner, PCR inhibitorer, som for eksempel heparin eller hemoglobin], og for å redusere kaotropisk saltkonsentrasjon.
- 7) MGPs med bundne totale nukleinsyre er igjen magnetisk separert fra vaskebufferen inneholdende gjenværende prøven rusk.
- 8) Rensede totale virale nukleinsyrer elueres fra MGPs i brønnene av Eluering kassetten. MGPs beholdes i Reaksjon spissen og forkastet.

- F2- CMV nukleinsyre isolering ved koking metoden:

Temperatur°C	Tid
94°C	10 min.
4°C	∞

## Appendiks G: CMV PCR standard reagensmengder oppsettet og betingelsene.

- G1- CMV Real-time PCR master mix:

Komponent	1x prøve (uten IK)	1x prøve (med IK)
2x TaqMan Fast Advanced MMX	10	10
10 $\mu$ M Probe PCMV	0,5	0,5
10 $\mu$ M CMV-Run control probe	0,4	0,4
10 $\mu$ M Primer CMV-AR	0,6	0,6
10 $\mu$ M Primer CMV-BF	0,6	0,6
H <sub>2</sub> O	2,9	0,9
Internkontroll	-	2
<b>Total mix</b>	15 $\mu$ L	15 $\mu$ L

*15  $\mu$ L Mix + 5  $\mu$ L DNA = 20  $\mu$ L Total volume*

- G2- CMV Real-time PCR betingelsene:

Temperatur <sup>o</sup> C	Tid	Antall sykluser
95 <sup>o</sup> C	10 sek.	1
95 <sup>o</sup> C	3 sek.	45
60 <sup>o</sup> C	30 sek.	
40 <sup>o</sup> C	10 sek.	1

## Appendiks H: CMV PCR tillegg resultat

- H1- CMV Real-time PCR fortynningsresultat:

*Oversikt over CMV prøvene som ble kjørt med forskjellige fortynninger. Prøver nr. 12 er den sterkeste prøven og prøve nr. 23 er CMV positiv kontroll.*

#	Prøve ID	Fortynning konsentrasjon	Fortynning uten int.ktr. (Ct)	Fortynning res. <u>med</u> int.ktr. (Ct)	
				Ekstr. trinn	PCR trinn
12	RH-12	10 <sup>-0</sup>	28,44	27,03	28,45
12	RH-12	10 <sup>-1</sup>	32,34	29,73	Neg
12	RH-12	10 <sup>-2</sup>	33,78	31,23	31,88
12	RH-12	10 <sup>-3</sup>	35,53	33,25	34,01
12	RH-12	10 <sup>-4</sup>	36,49	39,31	Neg
12	RH-12	10 <sup>-5</sup>	Neg	40,88	Neg
12	RH-12	10 <sup>-6</sup>	Neg	-	Neg
12	RH-12	10 <sup>-7</sup>	42,24	-	Neg
23	RH-Pos-1	10 <sup>-0</sup>	-	32,69	35,68
23	RH-Pos-1	10 <sup>-1</sup>	-	32,53	36,52
23	RH-Pos-1	10 <sup>-2</sup>	-	31,55	Neg

(-) Betyr ikke testet.

- H2- CMV Real-time PCR resultat for spinalvæske gamle prøver kjørt med både MagNA Pure LC og koking:

*Oversikt over CMV PCR resultater for de tre spinalvæske prøvene som ble ekstrahert både med MagNA Pure LC og koking. Tabellen viser prøvene som kom positive ved bruk av MagNA Pure LC og var negative med koking.*

#	Prøve ID	Agens	Prøve mat.	Ekstraksjon metode	Res. <u>uten</u> int.ktr (Ct)	Ekstraksjon metode	Res. <u>uten</u> int.ktr (Ct)
36	SMVI-12	CMV	Sp.vs.	MagNA	34,94	Koking	Neg
37	SMVI-13	CMV	Sp.vs.	MagNA	32,89	Koking	Neg
38	SMVI-14	CMV	Sp.vs.	MagNA	33,92	Koking	Neg