

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Martin SAGADIN

**RAZVOJ IN UPORABA MOLEKULARNE METODE  
ZA DOLOČANJE NOROVIRUSNEGA BREMENA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Martin SAGADIN

**RAZVOJ IN UPORABA MOLEKULARNE METODE ZA  
DOLOČANJE NOROVIRUSNEGA BREMENA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF MOLECULAR METHOD  
FOR THE DETERMINATION OF NOROVIRAL LOAD**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Tatjana Avšič-Županc, za somentorja znan. sod. dr. Andrej Steyer in za recenzenta doc. dr. Tomaž Accetto.

Mentorica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ-ŽUPANC

Somentor: znan. sod. dr. Andrej STEYER

Recenzent: doc. dr. Tomaž ACCETTO

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ-ŽUPANC

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: znan. sod. dr. Andrej STEYER

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: doc. dr. Tomaž ACCETTO

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo in mikrobiolosko biotehnologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Martin Sagadin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.2+578.7:578.835.3:577.2.083(043)=163.6
KG	virusi/norovirusi/človeški norovirusi/ <i>Caliciviridae</i> /RT-PCR v realnem času/ kvantifikacija/ norovirusno breme/molekularne metode/ diagnostične metode
AV	SAGADIN, Martin
SA	AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (mentorica)/STEYER, Andrej (somentor)/ACCETTO, Tomaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2012
IN	RAZVOJ IN UPORABA MOLEKULARNE METODE ZA DOLOČANJE NOROVIRUSNEGA BREMENA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 49 str., 11 pregl., 14 sl., 37 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Norovirusi so najpogosteji virusni povzročitelji gastroenteritisov pri ljudeh. Bolezen povzročajo pri odraslih in otrocih. Za njih je značilna visoka infektivnost, kar jim omogoča hitro in uspešno širjenje med ljudmi. Hujše zaplete norovirusnih okužb občasno opazimo le pri imunsko oslabljenih ljudeh in bolnikih po transplantacijah, kjer se lahko pojavi kronična driska, ki lahko traja tudi več mesecev. Za diagnostiko se uporablja predvsem molekularne metode. Namen diplomske naloge je bil razviti molekularno metodo, za določitev norovirusnega bremena v iztrebkih bolnikov. Pripravili smo standardno RNA za določanje koncentracije norovirusov genske skupine II, genotipa 4. Pri tej metodi mora biti učinkovitost reakcije RT-PCR v realnem času med 90 in 110 %. Dosegli smo učinkovitost 102 %. Kot prikaz uporabnosti metode smo določili norovirusno breme pri 30 bolnikih s kronično in 30 bolnikih z akutno norovirusno okužbo. Ugotovili smo, da se pri bolnikih s kronično norovirusno okužbo izloča manj virusov kot pri bolnikih z akutno okužbo. Mediana norovirusnega bremena pri kroničnih bolnikih je bila $3,11 \times 10^5$ kopij RNA na $\mu\text{l}$ osamljene nukleinske kisline, pri akutnih bolnikih pa $1,06 \times 10^7$ kopij RNA na $\mu\text{l}$ osamljene nukleinske kisline. Nukleinske kisline smo osamili z avtomatskim izolatorjem iPrep (Invitrogen).

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN	Dn
DC	UDC 578.2+578.7:578.835.3:577.2.083(043)=163.6
CX	viruses/noroviruses/human noroviruses/ <i>Caliciviridae</i> /real-time RT-PCR/quantification/noroviral load/molecular methods/diagnostic methods
AU	SAGADIN, Martin
AA	AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (supervisor)/ STEYER, Andrej (co-advisor)/ ACCETTO, Tomaž (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2012
TI	DEVELOPMENT AND APPLICATION OF MOLECULAR METHOD FOR THE DETERMINATION OF NOROVIRAL LOAD
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	IX, 49 p., 11 tab., 14 fig., 37 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Human noroviruses are the most frequent cause of viral gastroenteritis in children and adults. Their main characteristic is high infectivity which allows them quick and successfull spread among humans. Chronic diarrhea that can last for several months and other severe complications are rare and seen only in immunocompromised patients and those who have undergone transplantation. The reference method for determining noroviruses in fecal specimens is real-time RT-PCR. The aim of the graduation thesis was to develop a molecular method for determination of noroviral load in feces of patiens. RNA standard was prepared for determining the norovirus concentration (genogroup II genotype 4 – GII.4) in samples. It is important that the efficiency of real-time RT-PCR is between 90 and 110%. For the developed method, efficiency of 102% was achieved. Noroviral load in 30 chronic and 30 acute patients was determined. It was shown that patients with chronic noroviral infection excret less noroviruses as patients with acute infection. Median noroviral load in patients with chronic infection was $3,11 \times 10^5$ RNA copies per $\mu\text{l}$ of isolated nucleic acid and $1,06 \times 10^7$ RNA copies per $\mu\text{l}$ of isolated nucleic acid in patients with acute infection. Nucleic acid was isolated with automatic isolator iPrep.

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 POMEN NOROVIRUSOV PRI LJUDEH .....	2
2.2 ZGRADBA NOROVIRUSOV .....	2
2.3 TAKSONOMIJA IN FILOGENIJA .....	4
2.4 BOLEZEN IN PATOGENEZA .....	6
2.5 EPIDEMIOLOGIJA .....	7
2.6 DIAGNOSTIKA .....	8
2.6.1 Dokazovanje virusov z elektronsko mikroskopijo .....	8
2.6.2 Dokazovanje virusnih antigenov .....	9
2.6.3 Dokazovanje nukleinskih kislin .....	9
2.6.4 Princip delovanja RT-PCR v realnem času .....	10
2.6.4.1 5' nukleazne sonde .....	11
2.6.4.2 Molekularni oddajniki .....	11
2.6.4.3 Sonde FRET (ang. fluorescence resonance energy transfer) .....	12
2.7 KVANTIFIKACIJA .....	13
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>14</b>
3.1 MATERIALI .....	14
3.1.1 Komercialni kompleteti .....	14
3.1.2 Naprave za PCR in PCR v realnem času .....	17
3.1.3 Materiali za analizo pridelkov PCR .....	17
3.1.4 Začetni oligonukleotidi in sonda .....	17
3.1.5 Klinični vzorci .....	18
3.2 METODE DELA .....	18
3.2.1 Priprava standarda RNA .....	18
3.2.1.1 Izbira regije norovirusnega genoma za pripravo standarda .....	18

3.2.1.2	Pomnoževanje odseka DNA za standard.....	20
3.2.1.3	Pridobivanje rekombinantnega plazmida z odsekom DNA .....	21
3.2.1.4	Bakterijska transformacija (prenos plazmida z insertom v kompetentne celice).....	23
3.2.1.5	Preverjanje uspešnosti transformacije in osamitev plazmida .....	23
3.2.1.6	Prepis DNA v RNA .....	25
3.2.1.7	Preverjanje količine in čiščenje prepisane RNA .....	26
<b>3.2.2</b>	<b>Preverjane ponovljivosti rezultatov med reakcijami in znotraj reakcije.</b>	<b>27</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Izgube RNA pri osamitvi .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Ugotavljanje števila kopij RNA in norovirusnega bremena akutnih in kroničnih bolnikov.....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>29</b>
4.1	ČISTOST TRANSKRIPTA .....	29
4.2	IZRAČUN ŠTEVILA KOPIJ PREPISANE RNA .....	29
4.3	PREVERJANJE USPEŠNOSTI POMNOŽEVANJA TRANSKRIPTA S TARČNIM RT-PCR V REALNEM ČASU IN PONOVLJIVOST REZULTATOV....	29
4.4	UGOTAVLJANJE NOROVIRUSNEGA BREMENA PRI BOLNIKIH .....	33
4.5	OCENA NOROVIRUSNEGA BREMENA V IZHODNEM KLINIČNEM VZORCU.....	37
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>39</b>
5.1	PRIPRAVA STANDARDA RNA ZA KVANTIFIKACIJO NOROVIRUSOV	39
5.2	UČINKOVITOST REAKCIJE .....	39
5.3	UGOTAVLJANJE NOROVIRUSNEGA BREMENA PRI BOLNIKIH .....	40
<b>6</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>45</b>
<b>ZAHVALA</b>		

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljeni začetni oligonukleotidi in sonda.....	17
Preglednica 2: Potek reakcije RT-PCR z uporabljenimi reagenti iz kompleta SuperScript One-Step RT-PCR System with PlatinumTaq (Invitrogen).....	21
Preglednica 3: Potek reakcije PCR za dokaz plazmida v bakterijskih celicah in uspešno kloniranega inserta.....	24
Preglednica 4: Potek reakcije PCR v realnem času za dokaz želenega vključka.....	25
Preglednica 5: Potek reakcije RT-PCR v realnem času z uporabljenimi reagenti iz kompleta AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents (Applied Biosystems). ..	27
Preglednica 6: Meritve koncentracije RNA s spektrofotometrom NanoDrop (Thermo Scientific).....	29
Preglednica 7: Prikaz ponovljivosti rezultatov znotraj reakcije RT-PCR v realnem času..	30
Preglednica 8: Prikaz ponovljivosti rezultatov med reakcijami RT-PCR v realnem času ..	31
Preglednica 9: Norovirusno breme pri bolnikih z akutnim obolenjem. ....	35
Preglednica 10: Norovirusno breme pri bolnikih s kroničnim obolenjem. ....	36
Preglednica 11: Učinkovitost izolacije norovirusnih nukleinskih kislin iz suspenzije blata .....	38

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Elektronskomikroskopski posnetek norovirusov (EM slika..., 2012).....	2
Slika 2: Prikaz ikozaedrične strukture kapside norovirusov (Glass in sod., 2009) .....	3
Slika 3: Prikaz organizacije norovirusnega genoma (sev Norwalk) (Hardy, 2005).....	4
Slika 4: Filogenetska analiza norovirusov (Glass in sod., 2009).....	5
Slika 5: Prikaz različnih vrst sond, ki se uporabljajo pri RT-PCR v realnem času (Espy in sod., 2006). ....	12
Slika 6: Poravnavo nukleotidnih zaporedij različnih sevov norovirusov s prikazom mest naleganj začetnih oligonukleotidov NoV2-F in NoV2-R.....	19
Slika 7: Poravnavo zaporedij različnih sevov norovirusov s prikazom mest naleganj začetnih oligonukleotidov Cog2-F, Cog2-Fm, Cog2-R ter sonde Ring2TP. ....	19
Slika 8: Prikaz plazmidnega vektorja pJET1.2/blunt (Fermentas, 2011) .....	20
Slika 9: Povprečje rezultatov znotrajreakcijskih ponovitev s standardnimi odkloni.....	31
Slika 10: Povprečja rezultatov medreakcijskih ponovitev s standardnimi odkloni.....	32
Slika 11: Prikaz krivulj pomnoževanja redčitvene vrste standarda iz programa StepOne Software v2.0 (Applied Biosystems).....	32
Slika 12: Standardna krivulja, ki jo izriše program StepONE Software v2.0 (Applied Biosystems) .....	33
Slika 13: Vrednosti Ct v odvisnosti od desetiškega logaritma koncentracij redčitvene vrste standarda.....	34
Slika 14: Prikaz koncentracije RNA pri kvantifikaciji bolnikov z akutno in kronično okužbo .....	37

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

cDNA	komplementarna DNA (iz ang. complementary DNA)
Ct	cikel praga detekcije (iz ang cycle threshold)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (iz ang. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksiribonukleotid fosfat
EDTA	etilendiaminetetraocetna kislina
ELISA	encimskoimunski test (iz ang. Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
kDa	kilodalton
nm	nanometer
ORF	odprt bralni okvir (iz ang. open reading frame)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (iz ang. polymerase chain reaction)
RdRp	od RNA odvisna RNA polimeraza (iz ang. RNA dependent RNA polymerase)
RNA	ribonukleinska kislina (iz ang. ribonucleic acid)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo s predhodnim obratnim prepisom (iz ang. reverse transcription polymerase chain reaction)
Tm	temperatura tališča (iz ang. melting temperature)
µl	mikroliter

## 1 UVOD

Leta 1929 je Zahorsky prvič opisal zimsko bolezen z bruhanjem (iz ang. winter vomiting disease). Bolezen se je pojavljala predvsem v hladnih mesecih in je potekala nenasno. Glavna simptoma sta bila driska in bruhanje. Bolezen pa je tudi sčasoma sama izzvenela. Šele leta 1972 je Kapikian s sodelavci odkril vzrok te bolezni z imunsko elektronsko mikroskopijo. Kot povzročitelja so identificirali virus, ki so ga poimenovali po mestu Norwalk v ameriški zvezni državi Ohio, kjer so virus odkrili v iztrebkih osnovnošolskih otrok med epidemijo leta 1968. Virus Norwalk in druge njemu podobne viruse so poimenovali po geografskih področjih kjer so bili najdeni in so jih uvrstili v rod virusi podobni virusu Norwalk (iz ang. Norwalk-like viruses). Kasneje so jih preimenovali v rod *Norovirus*, ki spada v družino *Caliciviridae* (Zahorsky, 1929; Kapikian in sod., 1972; Lopman in sod., 2002).

Diagnostika teh virusov je bila do nedavnega otežena, saj se norovirusi v celičnih kulturah ne pomnožujejo. Kot temeljna diagnostična metoda se je uporabljala elektronska mikroskopija. Z razvojem molekularnih metod za dokazovanje nukleinskih kislin pa je postala temeljna diagnostična metoda za dokazovanje norovirusov verižna reakcija s polimerazo s predhodnim obratnim prepisom (RT-PCR) (Koopmans in sod., 2003).

### 1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil razviti molekularno metodo s katero lahko določimo norovirusno breme pri bolnikih z norovirusnimi okužbami. Z uporabo te metode smo hoteli ugotoviti, ali se norovirusi pri akutno in kronično obolelih osebah pojavljajo v isti ali različni koncentraciji.

## 2 PREGLED OBJAV

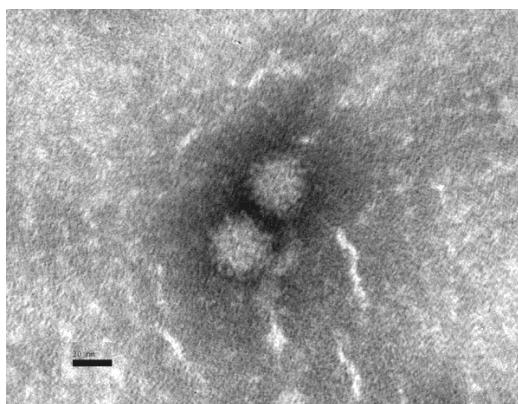
### 2.1 POMEN NOROVIRUSOV PRI LJUDEH

Sporadični in epidemični gastroenteritisi so po svetu pogost vzrok obolenosti in smrtnosti pri ljudeh vseh starostnih skupin. Pripisujejo jim več kot 1,8 milijona smrtnih žrtev pri otrocih do petega leta starosti. Povzročitelji gastroenteritisov so mnoge bakterije, paraziti in virusi (Patel in sod., 2009).

Pri ljudeh so med virusnimi povzročitelji gastroenteritisov najprej prepoznali noroviruse. Prepoznavna njihove pomembnosti je bila dolgo omejena zaradi pomanjkanja preprostih, dostopnih in občutljivih diagnostičnih metod (Roger in sod., 2009). Boljši vpogled v norovirusno epidemiologijo nam je omogočil šele razvoj molekularnih metod za diagnostiko norovirusnih okužb (Jiang in sod., 1992b; De Leon in sod., 1992; Morillo in Timenetsky, 2011). Z začetkom uporabe molekularnih metod so ugotovili, da so norovirusi poglavitni vzrok epidemičnih gastorenteritisov po vsem svetu, saj povzročajo več kot 90 % nebakterijskih in približno 50 % vseh epidemičnih gastroenteritisov (Patel in sod., 2008).

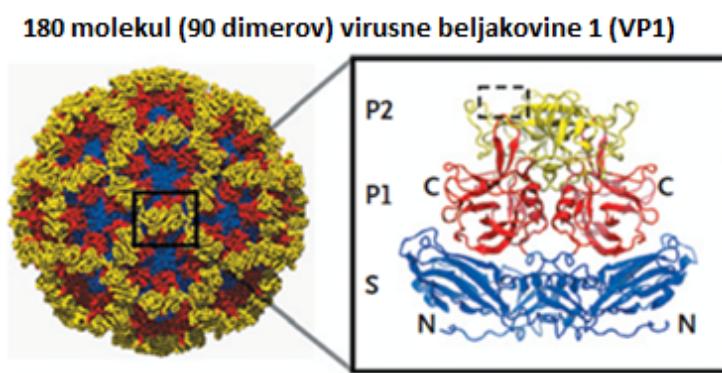
### 2.2 ZGRADBA NOROVIRUSOV

Norovirusi v premeru merijo med 27 in 30 nm in nimajo ovojnice (Slika 1). Njihova nukleokapsida je zaokrožena in kaže ikozaedrično simetrijo (Morillo in Timenetsky, 2011). Sestavljena je iz 90 dimernih molekul virusne beljakovine 1 (VP1) (Slika 2). Na obodu kapside nimajo značilne čašaste vdolbine, kot jih imajo drugi virusi iz te družine, po čemer je dobila družina ime (iz lat. calyx – čaša) (Glass in sod., 2009).



Slika 1: Elektronskomikroskopski posnetek norovirusov (EM slika..., 2012).

Norovirusni genom predstavlja linearna, enovijačna, pozitivno usmerjena (virusna RNA predstavlja matrico za neposreden prevod RNA v aminokislinsko zaporedje) molekula ribonukleinske kisline (RNA) dolga približno 7500 baz (Slika 3). Vsebnost citozina in gvanina je med 45 in 56 %. Na 5' koncu genoma je vezana beljakovina VPg, ki ima pomembno vlogo pri infektivnosti in začetku prevajanja genoma. Genom se na 3' koncu zaključi s poli-A repom, ki molekuli RNA daje stabilnost in ji pomaga pri prevajanju. Genom je sestavljen iz treh odprtih bralnih okvirjev (iz ang. ORF – open reading frame): ORF1, ORF2 in ORF3 (Morillo in Timenetsky, 2011).



Slika 2: Prikaz ikozaedrične strukture kapside norovirusov. Slika v levem delu prikazuje ikozaedrično strukturo kapside norovirusov. Različne barve prikazujejo tri različne domene virusne beljakovine VP1. Desni del slike prikazuje dimer virusne beljakovine VP1 in vse tri njene domene (S, P1, P2). Del beljakovine, označen s črtano črto predstavlja mesto vezave na antigene histokrvnih skupin. (Glass in sod., 2009)

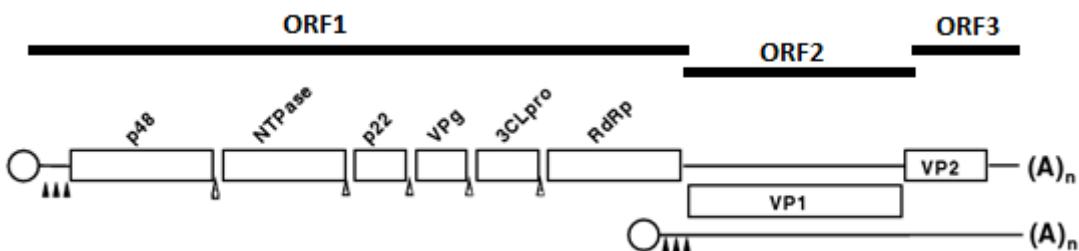
ORF1 se nahaja na 5' koncu genoma in kodira poliprotein iz 1789 aminokislin z molekulsko maso 194 kDa. Virusna proteaza ga cepi (Morillo in Timenetsky, 2011), da nastane 6 beljakovin: p48, nukleozid trifosfataza, p22, VPg, proteaza in od RNA odvisna polimeraza RNA (iz ang. RdRp-RNA dependent RNA polymerase) (Koo in sod., 2010).

ORF2 kodira kapsidno beljakovino VP1 (iz ang. VP1-viral protein 1) iz 530 aminokislin z molekulsko maso 60 kDa. VP1 je strukturalna beljakovina s pomembno vlogo pri virusnem pomnoževanju (Morillo in Timenetsky, 2011). Nukelokapsida je sestavljena iz 180 molekul kapsidne virusne beljakovine VP1, razporejenih v 90 dimerov (Glass in sod., 2009). Dimeri beljakovine VP1 so sestavljeni iz dveh podenot: S in P. Podenota P je nadalje sestavljena iz dveh domen, P1 in P2 (Slika 2). Domena P2 se veže na celične receptorje in je ključna za določanje antigenskih lastnosti virusa, hkrati pa je tudi najbolj variabilna

regija kapsidne beljakovine VP1, saj je aminokislinsko zaporedje med različnimi genotipi identično le v 8 %, za razliko od domene P1, kjer je aminoskislinsko zaporedje identično v 11 %. Podenota S je pomembna pri sestavi ikozaedrične nukleokapside in je najmanj variabilna, saj so aminokislinska zaporedja različnih sevov med seboj 30-odstotno identična (Chakravarty in sod., 2005).

Tretji odprtji bralni okvir (ORF3) se nahaja na 3' koncu molekule RNA in nosi zapis za 212 aminokislin dolgo molekulo bazične beljakovine VP2 z molekulsko maso 23 kDa (Morillo in Timenetsky, 2011). Vloga beljakovine VP2 v pomnoževalnem krogu ni poznana. Znano je le, da ima manjšo struktурno vlogo. V vsakem virusnem delcu se nahaja v eni ali dveh kopijah (Hardy, 2005)

Poleg genomske molekule RNA imajo norovirusi še podgenomsko molekulo RNA, ki je prav tako pozitivno usmerjena. Podgenomska RNA je kratek odsek genoma, ki ima najverjetnejšo funkcijo pri začetku pomnoževanja virusov in se prevede v beljakovino VP1 in nekaj molekul beljakovine VP2. Če se izražata le beljakovini VP1 in VP2, se lahko samodejno tvorijo virusom podobni delci (iz ang. virus-like particle-VLP) (Glass in sod., 2009).



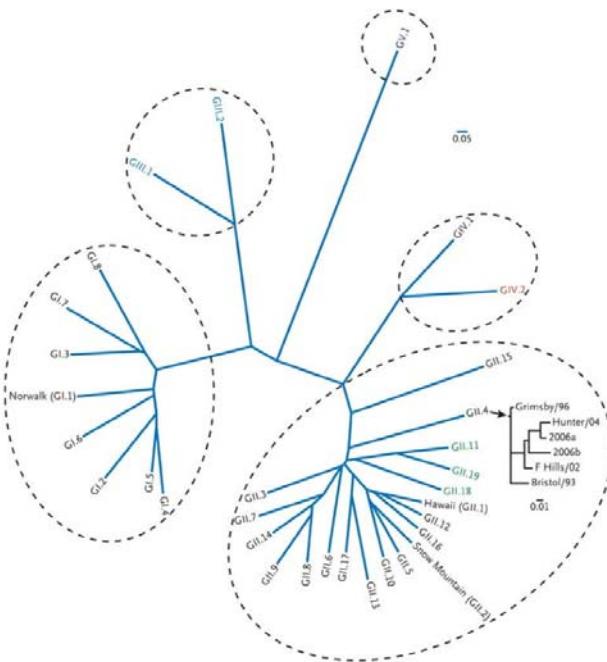
Slika 3: Prikaz organizacije norovirusnega genoma (sev Norwalk). Na ORF1 so označene nestrukturne beljakovine. Mesta, na katerih proteaza cepi poliprotein so označena z votlimi trikotniki. Trije polni trikotniki prikazujejo mesto začetka prevajanja. Krog ponazarja mesto vezave nestrukturne beljakovine VPg. Pod shemo genomske RNA je prikazana še podgenomska RNA (Hardy, 2005).

## 2.3 TAKSONOMIJA IN FILOGENIJA

Na podlagi elektronskomikroskopskih posnetkov so noroviruse opisovali kot pikornaviruse ali parvoviruse. Kasneje so na podlagi strukturnih lastnosti in sestave virusne kapside iz ene glavne strukturne beljakovine ugotovili, da so bolj podobni virusom iz družine

*Caliciviridae*. Nadaljnji podrobnejši opisi niso bili mogoči zaradi nezmožnosti gojenja virusa na celičnih kulturah, zato je taksonomski status norovirusov ostal negotov. Velik preboj na tem področju je bil leta 1990, ko so s prikazom sorodnosti na podlagi nukleotidnih zaporedij natančneje opredelili uvrstitev v taksonomske kategorije. Sledila je splošna prepoznavna norovirusov in drugih sorodnih malih okroglih virusov (iz ang. small round structured viruses-SRSV) kot članov družine *Caliciviridae* (Green in sod., 2000).

Leta 2005 se je uveljavil nov sistem razvrščanja norovirusov. Noroviruse so po analizah 164 nukleotidnih zaporedij ORF2 razporedili v 5 genskih skupin (GI-GV), ki jih sestavlja vsaj 31 genotipov (Slika 4): 8 genotipov v genski skupini GI, 17 v GII, 2 v GIII, 1 v GIV in 1 v GV. Genske skupine označujemo z veliko črko G ter rimske številko (I-V); genotipe pa označujemo z arabsko številko (npr. GII.4 pomeni genotip 4 v genski skupini II). Tipski predstavnik norovirusov je uvrščen v gensko skupino I in genotip 1 (GI.1) (Morillo in Timenetsky, 2011). Sevi v istem genotipu imajo 69 do 97-odstotno podobnost nukleotidnega zaporedja, medtem ko je med sevi iz različnih genskih skupin ta podobnost 51-56-odstotna (Donaldson in sod., 2010). Noroviruse, ki jih najdemo pri ljudeh uvrščamo v genske skupine GI, GII in GIV. Številne norovirusne predstavnike so dokazali tudi pri različnih živalskih vrstah. Prašičje noroviruse uvrščamo v gensko skupino GII, goveje v gensko skupino GII, mišje v GV, levje v gensko skupino GIV (Glass in sod., 2009).



Slika 4: Filogenetska analiza norovirusov (Glass in sod., 2009)

## 2.4 BOLEZEN IN PATOGENEZA

Bolezen, ki jo povzročajo norovirusi so sprva imenovali »zimsko bruhanje« (iz ang. Winter-vomiting) (Koo in sod., 2010). Bolezen se prične po 10 do 51 urah, z bruhanjem, trebušnimi krči, povišano telesno temperaturo, vodeno drisko in pogosto še z glavobolom, mrzlico in vsesplošno slabostjo (Glass in sod., 2009). Ker norovirusi niso invazivni patogeni, se simptomi, ki vključujejo krvavo ali sluzasto drisko ter visoko telesno temperaturo pojavijo le redko. Pri tretjini oseb se okužba klinično ne izraža (Koo in sod., 2010). Bolezen večinoma traja 2 do 3 dni. Pri bolnišničnih okužbah in okužbah otrok pa se lahko simptomi pojavljajo tudi 4 do 6 dni (Glass in sod., 2009).

Pri imunsko oslabljenih osebah se lahko pojavijo hujše oblike bolezni, predvsem kot dehidracija, izguba telesne teže in kronična driska, ki lahko traja tudi več mesecev do enega leta. Prav tako se lahko pojavi diseminirana intravaskularna koagulacija (iz ang. DIC- disseminated intravascular coagulation) (Koo in sod., 2010). Norovirusi se pri imunsko oslabljenih osebah in transplantirancih lahko izločajo več kot eno leto. Pri bolnikih po transplantaciji organov predstavljajo še dodatno težavo, saj lahko gastrointestinalni simptomi poleg norovirusne okužbe pomenijo tudi zgodnji znak zavrnitve organa ali stranske učinke zdravil (Glass in sod., 2009).

Znanje o patogenezi norovirusov je nezadostno, saj znanstvenikom v zadnjih 40-ih letih še ni uspelo najti načina za uspešno gojenje norovirusov na celičnih kulturah. V študijah, ki so potekale konec sedemdesetih in v začetku osemdesetih letih 20. stoletja na prostovoljcih, so ugotovili, da se pri okužbah z norovirusi pojavijo histopatološke spremembe v tankem črevesu obolelih. Pri bolnikih so ugotovili vnetje notranje plasti sluznice in morfološke spremembe celic črevesnega epitelija. Zmanjšana je tudi encimska aktivnost na površini mikrovilov. Driska, ki je ena izmed glavnih simptomov norovirusne okužbe, nastane zaradi difuzije vode in ionov iz subepitelijskih kapilar v črevesno svetlino, kar je posledica oslabljenih tesnih stikov med epitelijskimi celicami. Normalen histološki videz se ponovno vzpostavi po dveh tednih od okužbe (Troeger in sod., 2009).

Znanstveniki so v študijah opazili, da nekateri ljudje kljub izpostavljenosti virusom ne zbolijo. Iz tega sklepajo, da obstaja nek mehanizem naravne zaščite. Ugotavljajo pa, da ta zaščita ne sodi med imunske mehanizme, saj zbolevnost med prostovoljci ni bila povezana s titrom protiteles. Ta očiten paradoks so pojasnili z določitvijo genetskih faktorjev, ki

vplivajo na vezavo virusom podobnih delcev na človeške črevesne celice in rdeče krvničke. Dokazali so, da norovirusi prepoznajo antigene krvnih skupin (iz ang. histo-blood group antigens). Prepoznavna je sevno-specifično. Antigeni krvnih skupin so kompleksni oligosaharidi povezani z beljakovinami ali lipidi in se nahajajo v sluzničnem epiteliju prebavnega trakta. Prav tako jih lahko dokažemo kot proste oligosaharidne antigene v slini, mleku in črevesni vsebini. Pri vezavi norovirusov so pomembne vse glavne družine krvnih skupin (ABO, Lewis in H). Znanih je vsaj 8 različnih specifičnih vezavnih vzorcev norovirusov na antigene krvnih skupin, vendar popolnoma razumemo le vezavni vzorec za virus Norwalk (GI.1). Na določen genotip so ljudje odporni, če virus določenega genotipa ne prepozna antigenov histo-krvnih skupin. Čeprav so ljudje zaradi teh vezavnih vzorcev odporni na okužbo z določenim genotipom virusa, pa še ne pomeni, da so odporni tudi na ostale (Glass in sod., 2009). Posamezniki, t. i. »sekretorji«, ki imajo gen za funkcionalen encim alfa-1,2-fukoziltransferazo (FUT2), izražajo antigene krvnih skupin ABH in so dovetni za okužbo z norovirusi. Posamezniki, t. i. »nesekretorji« z mutiranim genom FUT2, pa so odporni na okužbo. Pri njih se antigeni krvnih skupin ne izražajo, zato se virusi nanje ne morejo vezati. Osebe, ki ne razvijejo protiteles proti posameznemu norovirusnemu sevu, verjetno nimajo genetske zmožnosti za okužbo (Poljšak-Prijatelj in Zimšek Mijovski, 2011).

## 2.5 EPIDEMIOLOGIJA

Ljudje se z norovirusi v večini primerov okužijo po oralni poti. Najpogosteje so okužbe z osebnim kontaktom, kontaminirano hrano, vodo in prenosom po zraku, lahko pa tudi s prenosom virusa z okuženih površin (Said in sod., 2008; Morillo in Timenetsky, 2011).

Norovirusi se uspešno širijo zaradi mnogih dejavnikov, ki jim omogočajo širjenje in obstojnost v okolju. Za okužbo zdrave odrasle osebe zadostuje že 10 do 100 virusnih delcev. Uspešno se širijo tudi zaradi svoje odpornosti na kisline in dezinfekcijska sredstva. Virusne delce s površin le s težavo odstranimo, saj navadna čistilna sredstva ne zadostujejo. S površin jih uspešno odstranimo le z uporabo natrijevega hipoklorita v koncentraciji nad 5000 delcev v milijonu delov raztopine (iz ang. ppm-parts per million). Druga dezinfekcijska sredstva, kot je na primer etanol, niso tako učinkovita. Pri širjenju

okužb je pomembno dejstvo, da okužbe lahko potekajo tudi asimptomatsko, saj asimptomatski bolniki prav tako širijo virus (Said in sod., 2008).

S pomočjo nukleotidnih zaporedij, ki so jih zbrali v desetih letih iz celega sveta so ugotovili, da se na 2 do 4 leta pojavi nov pandemski sev. V preteklih letih so to bili sevi genske skupine II genotipa 4 (GII.4), katerim pripisujejo več kot 80% vseh norovirusnih izbruhanov v Združenih državah Amerike (Glass in sod., 2009). Tudi v Evropi so ugotovili, da največ izbruhanov povzročajo norovirusi genske skupine II genotipa 4. Prav tako pa se vsako drugo leto pojavi nova različica tega virusa, ki čez nekaj let izgine (Kroneman in sod., 2008).

Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije se je v zadnjih nekaj letih (2006-2010) število prijavljenih norovirusnih drisk v Sloveniji povečalo. Leta 2006 so na IVZ prejeli 722 prijav norovirusnih drisk, leta 2010 pa že 2102 prijav. Tudi število zabeleženih izbruhanov je iz leta v leto večje (leta 2006 so zabeležili 17 izbruhanov, leta 2010 pa 51). Izbruhi so se pojavljali predvsem v domovih starejših občanov, v hotelsko-gostinskih obratih, v zdraviliščih, bolnišnicah in šolah (IVZ, 2006; IVZ, 2007; IVZ, 2008; IVZ, 2009; IVZ, 2010).

## 2.6 DIAGNOSTIKA

### 2.6.1 Dokazovanje virusov z elektronsko mikroskopijo

Človeških kalicivirusov ni mogoče gojiti na celičnih kulturah, zato je temeljno diagnostično metodo predstavlja elektronska mikroskopija. Vzorce za pregled z elektronskim mikroskopom pripravijo po metodi negativnega kontrastiranja. Metoda ima slabo občutljivost, saj lahko z njo ugotovimo virus le v vzorcih, v katerih je koncentracija višja od  $10^6$  virusnih delcev na mililiter pripravljene suspenzije. Noroviruse je z elektronsko mikroskopijo tudi težje prepoznati, saj nimajo značilne kalicivirusne čašaste strukture, kot drugi predstavniki družine *Caliciviridae*. Viruse lahko s to metodo dokažemo le še približno 48 ur po prenehanju bolezenskih znakov (Lopman in sod., 2002).

## 2.6.2 Dokazovanje virusnih antigenov

Da bi pridobili večje količine kapsidnih beljakovin, so znanstveniki uporabili ekspresijski sistem bakulovirusov. Beljakovine, ki so jih s tem pridobili, se same sestavijo v virusom podobne delce, ki so strukturno in antigensko podobni norovirusom, ki jih najdemo v iztrebkih. Virusom podobne delce so na preprost način osamili iz celičnih kultur. Ker so zelo stabilni pri nizkih temperaturah, jih uporablajo pri razvoju diagnostičnih metod, ki temeljijo na dokazovanju virusnih antigenov (Jiang in sod., 1992a; Prasad in sod., 1999).

Za dokazovanje norovirusnih antigenov v vzorcih se uporablajo komercialno dostopni encimsko-imunski testi, ELISA (iz ang. enzyme-linked immunosorbent assay). Z njimi dokazujemo norovirusno kapsidno beljakovino neposredno iz iztrebka. Slabost teh testov je nizka diagnostična občutljivost in zato je njihova uporaba omejena na dokazovanje norovirusov pri izbruhih (Morillo in Timenetsky, 2011).

Najpogosteje uporabljam sistem dvojnih protiteles ali tako imenovano »sendvič« metodo. Z njo lahko dokažemo manj kot 1 ng virusnega antiga v ml kužnine. Prva protitelesa, ki so vezana na nosilec, vežejo antigen, ki ga želimo dokazati. Na nastali kompleks se vežejo druga protitelesa, ki so označena z encimom. Na koncu dodamo še substrat, ki po delovanju encima spremeni barvo. Z opazovanjem spremembe barve ali z merjenjem optične gostote pri predpisani valovni dolžini ugotovimo, ali je antigen prisoten ali ne (Marin, 2007).

## 2.6.3 Dokazovanje nukleinskih kislin

Prva, ki sta uspela uspešno pomnožiti RNA virusa Norwalk z verižno reakcijo s polimerazo s predhodnim obratnim prepisom (RT-PCR) sta bila Jiang in De Leon s sodelavci leta 1992. S tem je dokazovanje norovirusnih nukleinskih kislin postala glavna raziskovalna in diagnostična metoda (Jiang in sod., 1992b; De Leon in sod., 1992; Lopman in sod., 2002). Popolna določitev nukleotidnega zaporedja človeških kalicivirusov je privedla do razvoja mnogih parov začetnih oligonukleotidov za uporabo pri RT-PCR. Opazili so, da lahko z RT-PCR dokažejo virus tudi do dva tedna po okužbi ali celo več, kar do takrat z elektronsko mikroskopijo ni bilo mogoče (Lopman in sod., 2002).

Velik izziv je bil pripraviti primerno občutljive in specifične začetne oligonukleotide s katerimi bi lahko dokazovali vse norovirusne seve, ki povzročajo okužbe pri ljudeh, saj je genetska raznolikost znotraj družine *Caliciviridae* velika. Večino začetnih oligonukleotidov so zato sestavili tako, da nalegajo na dobro ohranjene predele virusne RNA. Pri norovirusih je ta predel v genu, ki kodira virusno od RNA odvisno polimerazo RNA. Za razlikovanje med genskimi skupinami se uporabljajo začetni oligonukleotidi, ki so specifični za del genomske RNA, ki kodira kapsidno beljakovino (Lopman in sod., 2002).

Razvoj verižne reakcije s polimerazo v realnem času (iz ang. real time polymerase chain reaction- real time PCR) je v diagnostiko vnesel veliko novosti, saj ta metoda omogoča pomnoževanje nukleinskih kislin ob istočasnem zaznavanju pomnožka s fluorescentnimi barvili ter kvantitativno določanje tarčne nukleinske kisline. Metoda je hitrejša kot običajne verižne reakcije s polimerazo (PCR). Zaradi vseh opisanih lastnosti je postal PCR v realnem času nepogrešljiva metoda za pojasnjevanje mnogih infekcijskih bolezni (Espy in sod., 2006).

#### **2.6.4 Princip delovanja RT-PCR v realnem času**

Z RT-PCR v realnem času pomnožimo določen odsek norovirusnega genoma. Ker je genom norovirusov molekula RNA, se mora le-ta najprej obratno prepisati v komplementarno molekulo DNA (iz ang. complementary DNA – cDNA). Ta prepis izvedemo z encimom reverzna transkriptaza. Lahko se izvede posebej ali v isti reakciji, kot bo potekalo pomnoževanje nukleinskih kislin. Zato govorimo o enostopenjskih in dvostopenjskih reakcijah (Wong in Medrano, 2005).

RNA iz nastalega hibrida RNA in cDNA se po prepisu razgradi s pomočjo iste reverzne transkriptaze. Polimeraza DNA nato prepiše cDNA v dvovijačno DNA. Po prepisu se morata verigi v dvovijačni DNA ločiti, zato je potrebna denaturacija. Za ločitev verig je potrebna temperatura od 90 do 95 °C. Sledi faza naleganja pri kateri začetni oligonukleotidi nalegajo na specifična mesta tarčne DNA. Ta faza običajno poteka pri temperaturah okoli 50 °C in je odvisna od sestave začetnega oligonukleotida. Po zaključku faze naleganja temperaturo povišamo za toliko, da dosežemo najučinkovitejšo delovanje encima polimeraze in je odvisna od vrste polimeraze (običajno 72 °C). S tem omogočimo

toplotno stabilni polimerazi, da začne s podaljševanjem verige DNA v smeri od 5' konca proti 3' koncu. Pri tem dobimo iz prvotne molekule cDNA dve med seboj komplementarni molekuli DNA, na katere se v naslednjem ciklu po denaturaciji ponovno vežejo isti začetni oligonukleotidi. Tarčni deli DNA se na ta način eksponentno pomnožujejo (Class in sod., 2007).

Pri verižnih reakcijah s polimerazo v realnem času dodamo v začetno reakcijsko mešanico tudi ustrezeno sondu, ki nam omogoča sprotno spremljanje nastalih pomnožkov. Obstajajo različne vrste sond: 5' nukleazne sonde (oz. t.i. sonde *TaqMan*), molekularni oddajniki (iz ang. molecular beacons), sonde FRET (iz ang. fluorescence resonance energy transfer) oziroma tako imenovane LightCycler sonde (Slika 5). Najpogosteje se uporabljajo 5' nukleazne sonde (Espy in sod., 2006).

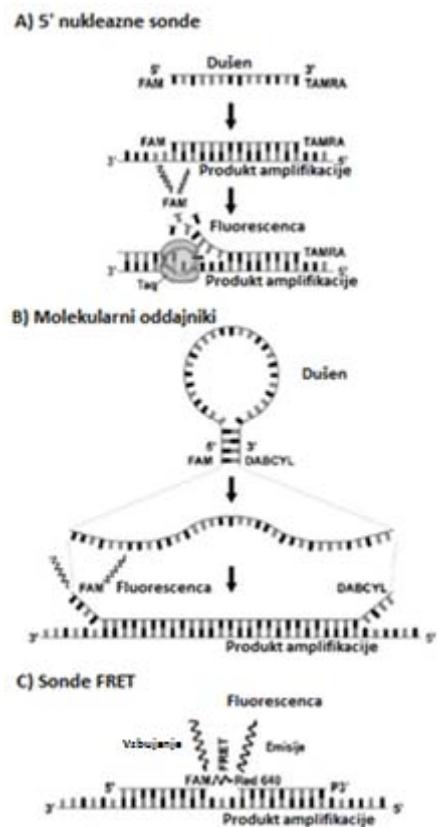
#### 2.6.4.1 5' nukleazne sonde

5' nukleazne sonde oz. sonde *TaqMan* so kratki oligonukleotidi (DNA), ki imajo na 5' koncu vezano fluorescentno barvilo in na 3' koncu dušilno barvilo (iz ang. quenching dye). Ko sta vezana skupaj, fluorescentno barvilo prejeto svetlobno energijo odda v obliki fluorescence, ki jo sprejme dušilno barvilo in jo odda v obliki toplote. Za oddajanje svetlobnega signala, ki ga senzor naprave prepozna, se mora sonda najprej vezati na komplementarno verigo DNA pri ustreznih temperaturah, nato mora encim polimeraza *Taq* s svojo 5'-3' eksonukleazno aktivnostjo odcepiti 5' konec sonde, kar povzroči odcepitev fluorescentnega barvila od dušilnega barvila. Višja je koncentracija PCR pomnožka, močnejša bo fluorescensa (Espy in sod., 2006).

#### 2.6.4.2 Molekularni oddajniki

Molekularni oddajniki delujejo podobno kot 5' nukleazne sonde vendar pri njih ni potrebno, da jih polimeraza *Taq* razcepi. Tudi te sonde so kratki oligonukleotidi, ki imajo na 5' koncu vezano fluorescentno barvilo in na 3' koncu dušilno barvilo. Konci sonde so oblikovani tako, da so med seboj komplementarni in se pri nizkih temperaturah povežejo v zanko. Pri taki povezavi sta fluorescentno in dušilno barvilo blizu skupaj, zato ne zaznamo fluorescence. Vmesno nukleotidno zaporedje je oblikovano tako, da nalega na specifično zaporedje pomnožka PCR. Pri visokih temperaturah sta tako sonda kot pomnožek PCR

enoverižna. Z nižanjem temperature pa se sonda poveže s pomnožkom. To povzroči, da se konca sonde razkleneta, posledično se oddaljita tudi fluorescentno in dušilno barvilo, kar omogoči oddajanje fluorescence (Espy in sod., 2006).



Slika 5: Prikaz različnih vrst sond, ki se uporabljajo pri RT-PCR v realnem času (Espy in sod., 2006).

#### 2.6.4.3

#### Sonde FRET (ang. fluorescence resonance energy transfer)

Sonde FRET sta dve kratki nukleotidni zaporedji, ki sta oblikovani tako, da nalegata na tarčno zaporedje ena zraven druge v postavitvi glava-rep. Zgornja sonda (iz ang. upstream probe) ima na 3' koncu vezano fluorescentno barvilo; spodnja sonda (iz ang. downstream probe) pa ima na 5' koncu vezano sprejemno barvilo (iz ang. acceptor dye). Če obe sondi nalegata na tarčno DNA, bo fluorescentno barvilo na 3' koncu absorbiralo vzbujevalno svetlobo, sprejemno barvilo na 5' koncu druge sonde pa bo sprejelo svetlobno energijo iz fluorescentnega barvila iz 3' konca in bo nato samo oddalo svetlobo daljše valovne dolžine. Svetlobo bo zaznal senzor naprave (Espy in sod., 2006).

Rezultate verižnih reakcij s polimerazo v realnem času lahko sproti spremljamo na zaslonu. Kot rezultat nam program poda krivuljo in vrednost cikla praga detekcije-C<sub>t</sub> (iz ang. cycle threshold), ki nam pove, v katerem ciklu se pojavi signal sonde, ki preseže signale ozadja. Nižja kot je vrednost C<sub>t</sub>, več kopij izhodiščne DNA je bilo v vzorcu (Class, 2007).

## 2.7 KVANTIFIKACIJA

Kvantifikacija nukleinskih kislin ima danes velik pomen pri spremljanju stanja v živem organizmu (*in vivo*). Pomembna je pri odkrivanju in spremljanju mnogih bolezni. Uporablja se za prepoznavanje nevroblastomov, raka prostate, mikrometastaz pri kolorektalnem raku ter levkemiji. Prav tako se uporablja tudi za razločevanje med različnimi tipi limfomov. Pomembno vlogo ima pri določanju števila bakterij in virusov v vzorcih. Poleg tega se uporablja za analizo tkivno specifičnih izražanj genov ter za določanje profilov mRNA citokinov (Bustin, 2002).

Kvantifikacijo izvedemo s standardno krivuljo, ki jo dobimo z redčitveno vrsto zunanje standardne molekule RNA. Število kopij RNA v vzorcu lahko nato izračunamo z linearno regresijo standardne krivulje (Bustin in Mueller, 2005). Iz umeritvene krivulje lahko izračunamo tudi koeficient linearne regresije (R<sup>2</sup>), ki nam pove kako dobro se meritve prilegajo premici, ter naklon krivulje iz katerega lahko izračunamo učinkovitost pomnoževanja pomnožkov PCR. V idealnih razmerah je učinkovitost pomnoževanja 100-odstotna. To pomeni, da se z vsakim ciklom reakcije pomnožek PCR podvoji. V tem primeru je naklon krivulje -3,32 (Ginzinger, 2002; VanGuilder in sod., 2008). Enačba za učinkovitost pomnoževanja je (Rutledge in sod., 2003):

$$E = 10^{\frac{-1}{k}} - 1 \quad \dots(1)$$

E – učinkovitos pomnoževanja

k – naklon standardne krivulje.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Komercialni kompleti

Komercialni komplet za reakcijo RT-PCR SuperScript One-Step RT-PCR System with PlatinumTaq (Invitrogen)

- Encimska mešanica SuperScript RT/Platinum *Taq* Mix
- 2X reakcijska mešanica
- 5 mM magnezijev sulfat

Komercialni komplet za čiščenje produktov PCR Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System

- raztopina za vezavo DNA na membrano
- spiralna raztopina
- voda v kateri ni zaznane nukleazne aktivnosti
- kolone z membrano – Wizard SV Minicolumns
- zbiralne epruvete

Komercialni komplet za pridobivanje rekombinantnega plazmida z odsekom gena v reakciji PCR CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas)

- plazmidni vektor pJET1.2/blunt
- ligaza T4 DNA
- 2X reakcijski pufer
- encim, ki ustvari tope konce – DNA Bluntin Enzyme
- pJET1.2 Forward sequencing primer (5'-CGACTCACTATAAGGGAGAGC GGC-3')
- pJET1.2 Reverse sequencing primer (5'-AAGAACATCGATTTCATGG CAG-3')
- kontrolni produkt PCR
- voda v kateri ni zaznane nukleazne aktivnosti

Komercialni komplet kemično kompetentnih celic *E. coli* One Shot TOP10 *E. coli* (Invitrogen)

- kemijsko kompetentne celice *E. coli* TOP10
- kontrolna DNA pUC19
- medij S.O.C

Komercialno gojišče Luria-Bertani (LB) z ampicilinom

Za namnožitev bakterij *E. coli* smo uporabili komercialno gojišče *E. coli* FastMedia (Fermentas).

Komercialni komplet za reakcijo PCR s polimerazo *Tfi*

- polimeraza DNA *Tfi*
- 5X reakcijski pufer *Tfi*
- 50 mM magnezijev klorid

Komercialni komplet za osamitev plazmidne DNA iz bakterijskih celic *E. coli* – PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)

- pufer za pripravo bakterijske suspenzije
- RNaza A
- pufer za lizo
- pufer za precipitacijo
- spiralni pufer W9
- spiralni pufer W10
- elucijski pufer TE
- izolacijska kolona

Komercialni komplet za reakcijo PCR – Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen)

- reakcijska mešanica Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG
- 50 mM magnezijev klorid

- referenčno barvilo ROX

Komercialni komplet za prepis DNA v RNA TranskriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Fermentas)

- encimska mešanica TranscriptAid
- 5X reakcijski pufer TranscriptAid
- DNaza I brez RNaz
- nukleotidi
- 3M natrijev acetat
- voda DEPC
- 0,5 M EDTA s pH 8,0

Restrikcijski encim XbaI FastDigest XbaI (Fermentas)

- restrikcijski encim XbaI
- 1X pufer FastDigest

Komercialni komplet za reakcije RT-PCR AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents (Applied Biosystems)

- 2X pufer za RT-PCR
- 25X encimska mešanica za RT-PCR
- voda v kateri ni zaznane nukleazne aktivnosti

Komercialni komplet za avtomatsko osamitev nukleinskih kislin z aparatom iPrep (Invitrogen), iPrep PureLink Virus Kit (Invitrogen)

- kartuše z reagenti
- 2 ml epruvete
- 1,5 ml elucijske epruvete
- nastavki v držalih za nastavke

### 3.1.2 Naprave za PCR in PCR v realnem času

- naprava za PCR: GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- napravi za PCR v realnem času: StepOne (Applied Biosystems) in StepOnePlus (Applied Biosystems)

### 3.1.3 Materiali za analizo pridelkov PCR

- E-Gel EX 2% (Invitrogen)
- standardna lestvica DNA GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)
- naprava za fotografiranje agaroznih gelov GelDoc-It TS Imaging System (UVP)

### 3.1.4 Začetni oligonukleotidi in sonda

Preglednica 1: Uporabljeni začetni oligonukleotidi in sonda.

Začetni oligonukleotid	Mesto naleganja (glede na AF145896)	Nukleotidno zaporedje 5'-3'	Vir
NoV2-F	4922-4941	GGH CCA KCA TTY TAC AGC AA	ta naloga*
NoV2-R	5155-5136	TTR TTG AYC TCT GGV ACG AG	ta naloga*
Cog2-F	5003-5025	GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	Kageyama in sod., 2003
Cog2-Fm	5003-5026	CAA GAG CCA ATG TTC AGA TGC ATG	ta naloga*
Cog2-R	5100-5080	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	Kageyama in sod., 2003
Sonda			
Ring2TP	5048-5067	FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-BHQ	Kageyama in sod., 2003

\*začetne oligonukleotide smo oblikovali za pripravo in dokazovanje standarda in tarčnega dela genoma norovirusov v tej diplomski nalogi

Degenerirani nukleotidi: H ustreza A, C ali T; K ustreza G ali T; Y ustreza C ali T; R ustreza A ali G; V ustreza A, C ali G; B ustreza C, G ali T; N ustreza A, C, G ali T.

### 3.1.5 Klinični vzorci

Izbrali smo 30 vzorcev iztrebkov bolnikov, ki so jih prejeli na preiskavo za določitev gastroenteritičnih virusov v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Pri teh bolnikih so po predhodnem testiranju dokazali izločanje norovirusov več kot 2 tedna (kronični izločevalci). Dodatno smo vključili 30 vzorcev bolnikov z akutno norovirusno okužbo. Vzorce bolnikov s kronično norovirusno okužbo so v laboratorij prejeli iz Interne klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Vsi bolniki so imeli predhodno transplantacijo ledvic. Vzorce akutnih bolnikov smo izbrali izmed vzorcev, ki so jih na preiskavo na gastroenteritične viruse poslali iz Infekcijske klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

## 3.2 METODE DELA

### 3.2.1 Priprava standarda RNA

#### 3.2.1.1 Izbira regije norovirusnega genoma za pripravo standarda

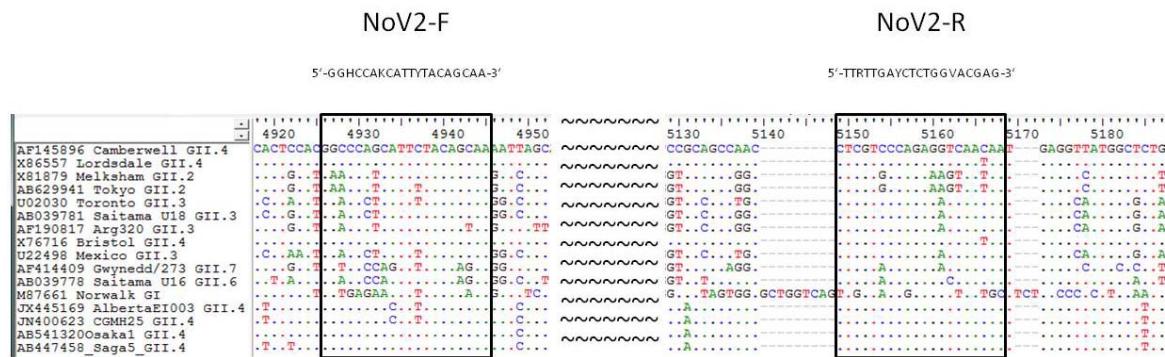
Standard RNA smo pripravili iz norovirusnega seva, ki smo ga določili v iztrebku bolnika s kronično norovirusno okužbo. Nukleinske kisline smo osamili z avtomatskim izolatorjem iPrep (Invitrogen) in kompletom iPrep PureLink Virus Kit (Invitrogen). Predhodno so z analizo nukleotidnega zaporedja polimerazne in kapsidne regije določili, da je bolnik okužen z norovirusom genske skupine II, genotip 4 (GII.4).

Za pripravo standarda smo se odločili za področje v genomu norovirusov, ki je tarčno mesto za molekularno dokazovanje norovirusov s PCR v realnem času. Tarčno področje je med 5003. in 5100. nukleotidom (glede na genom referenčnega seva Camberwell, številka v genski banki AF145896). To je najbolj ohranjeno področje v celotnem genomu, primerno za dokazovanje širokega nabora različnih genotipov znotraj genske skupine II (Kageyama in sod., 2003).

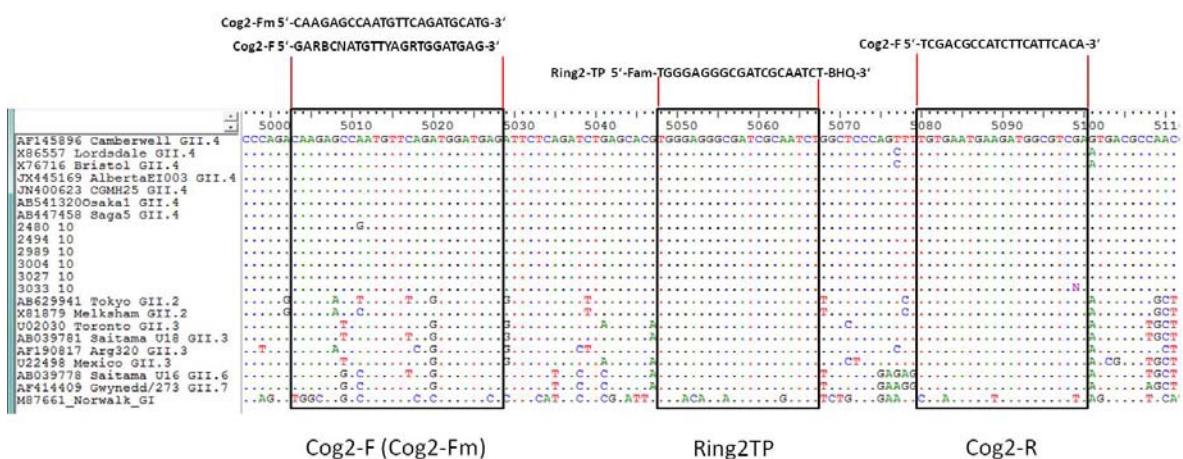
Iz genske banke smo pridobili nukleotidna zaporedja različnih genotipov genske skupine II, jih poravnali v programu BioEdit in izbrali ustrezeno mesto naleganja novih začetnih

oligonukleotidov NoV2-F in NoV2-R (Preglednica 1). Z njimi smo pomnožili celotno tarčno področje za dokazovanje norovirusov genske skupine II s PCR v realnem času.

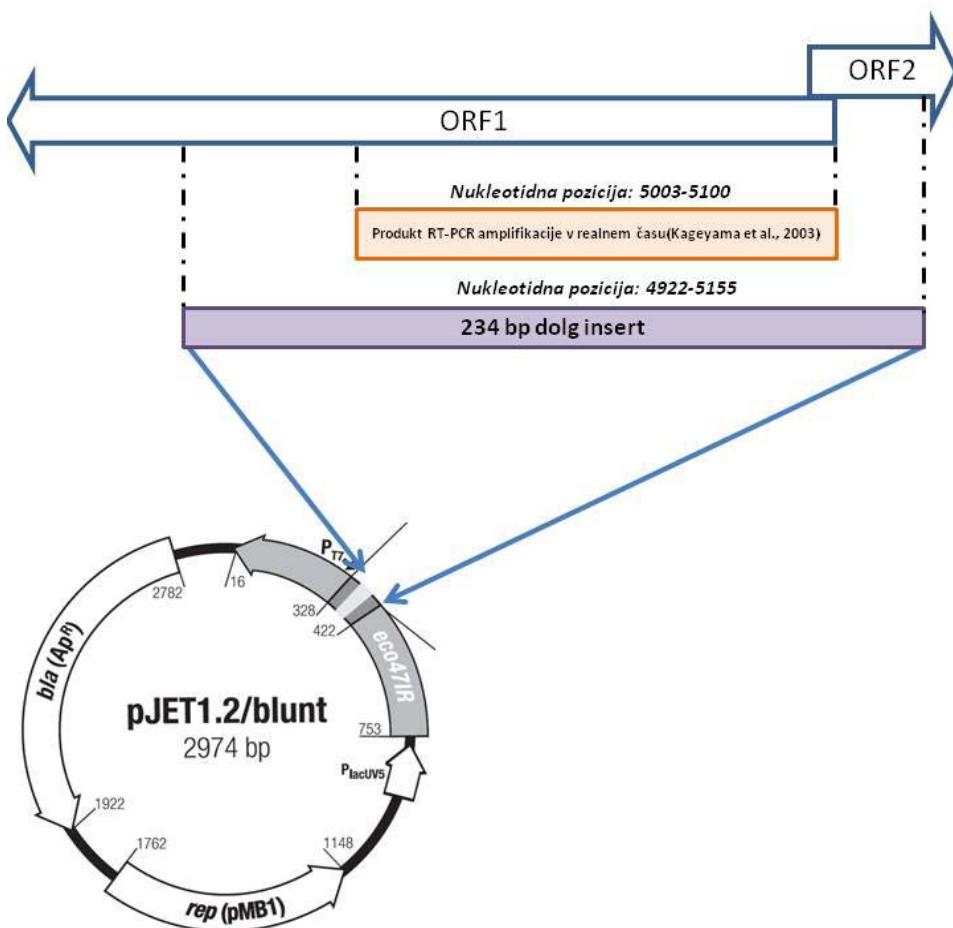
Ustreznost izbire začetnih oligonukleotidov smo preverili v prosto dostopnem programu (IDT, Integrated DNA Technologies, Inc.), v katerem smo preverili tvorbo dimerov, lasnice in določili Tm. V genski banki smo preverili še specifičnost začetnih oligonukleotidov (NCBI-Blast).



Slika 6: Poravnavo nukleotidnih zaporedij različnih sevov norovirusov s prikazom mest naleganj začetnih oligonukleotidov NoV2-F in NoV2-R.



Slika 7: Poravnavo zaporedij različnih sevov norovirusov s prikazom mest naleganj začetnih oligonukleotidov Cog2-F, Cog2-Fm, Cog2-R ter sonde Ring2TP.



Slika 8: Prikaz plazmidnega vektorja pJET1.2/blunt. Slika prikazuje plazmidni vektor iz kompleta CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, 2011). Na vrhu slike sta prikazana dela odprtih bralnih okvirjev 1 in 2 (ORF 1 in ORF 2) ter mesto naleganja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabljali.

### 3.2.1.2 Pomnoževanje odseka DNA za standard

Z začetnima oligonukleotidoma NoV2-F/NoV2-R smo z enostopenjsko reakcijo RT-PCR pomnožili 234 nukleotidov dolg odsek, ki smo ga vstavili v vektor. Za prepis in pomnožitev tega fragmenta smo uporabili komercialni komplet za enostopenjsko reakcijo RT-PCR SuperScript One-Step RT-PCR System with PlatinumTaq (Invitrogen). Reakcijsko mešanico smo pripravili po naslednjem postopku:

- 25 µl 2X reakcijskega pufra
- 1 µl začetna oligonukleotida NoV2-R v koncentraciji 50 µM
- 1 µl encimske mešanice

- 17 µl vode brez nukleazne aktivnosti

Pred pričetkom reakcije RT-PCR, smo 5 µl osamljene RNA iz izbranega kliničnega vzorca in 1 µl pozitivno usmerjenega začetnega oligonukleotida v koncentraciji 50 µM (NoV2-F) denaturirali v napravi za PCR 5 minut pri temperaturi 95 °C. Denaturirani RNA smo dodali 44 µl reakcijske mešanice. Potek reakcije je prikazan v preglednici 2.

Preglednica 2: Potek reakcije RT-PCR z uporabljenimi reagenti iz kompleta SuperScript One-Step RT-PCR System with PlatinumTaq (Invitrogen).

	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
Reverzna transkripcija	45	30'	1
Prekinitev delovanja reverzne transkriptaze in aktivacija polimeraze	94	2'	1
Denaturacija	94	15"	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	50	30"	45
Podaljševanje verige	72	30"	
Dokončanje pomnoževanja	72	5'	1

Pomnožene pridelke RT-PCR smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo v gelu EGel EX 2 % (Invitrogen). Z ustreznim molekularnim označevalcem smo potrdili velikost pomnoženega odseke, 234 nukleotidov.

Pridelki RT-PCR smo očistili s komercialnim kompletom Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) in čistost pridelka ponovno preverili z agarozno gelsko elektroforezo v gelu EGel EX 2 % (Invitrogen).

### 3.2.1.3 Pridobivanje rekombinantnega plazmida z odsekon DNA

Pomnoženi odsek smo vstavili v vektor, ki je vseboval promotor T7 pred mestom kloniranja. V plazmid pJET1.2/blunt, ki je del komercialnega kompleta CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, 2011) smo vnesli predhodno pomnoženi odsek (Slika 8).

Za uspešno pridobitev rekombinantnega plazmida smo morali zagotoviti ustrezeno molarno razmerje fragmenta in plazmida. Za najbolj optimalno reakcijo kloniranja je potrebno doseči razmerje 3:1 (vključek:vektor). Množino vektorja (0,05 pmol) smo poznali, saj jo je podal proizvajalec kompleta. Koncentracijo našega odseka, ki je znašala 111,5 ng/μl, smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop (Thermo Scientific). Iz dobljene koncentracije smo izračunali molarnost inserta, ki smo ga morali prenesti v reakcijo po naslednjih enačbah:

$$M \text{ (pmol)} \times N \times \frac{660 \text{ pg}}{\text{pmol}} \times \frac{1 \mu\text{g}}{10^6 \text{ pg}} = m \text{ (\mu g)} \quad \dots(2)$$

$$V = \frac{m}{c} \quad \dots(3)$$

**M** – množina

**N** – nukleotidna dolžina segmenta DNA

**660 pg/pmol** – konstanta povprečne molske mase nukleotidov

**m** – masa

**V** – volumen

**c** – koncentracija m

S prvo enačbo smo izračunali maso pomnožka, z drugo enačbo pa smo izračunali volumen pomnožka, ki smo ga morali prenesti v reakcijo ligacije.

Pridobivanje rekombinantnega plazmida smo pričeli s kompletom CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas). V prvi reakciji smo pripravili insert, ki smo ga kasneje vstavili v priložen vektor (pJET1.2/blunt). Insert smo inkubirali z encimom, ki zapolni 5' in 3' konce, da dobimo tope konce. Reakcijsko mešanico smo pripravili po naslednjem postopku:

- 10 μl 2X reakcijskega pufra
- 2 μl pomnožka PCR (0,15 pmol)
- 5 μl vode v kateri ni zaznane nukleazne aktivnosti
- 1 μl encima (DNA Blunting Enzyme)

Pripravljeno reakcijsko mešanico smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in kratko centrifugirali, da smo zbrali reakcijsko mešanico na dnu mikrocentrifugirke. Reakcijsko mešanico smo inkubirali 5 minut pri 70 °C in jo nato ohladili na ledu. Hladni

reakcijski mešanici, smo dodali 1 µl plazmidne DNA pJET1.2/blunt in 1 µl T4 ligaze DNA. Reakcijsko mešanico smo ponovno premešali in kratko centrifugirali ter jo pustili 10 minut pri sobni temperaturi.

### 3.2.1.4 Bakterijska transformacija (prenos plazmida z insertom v kompetentne celice)

Po inkubaciji smo 2 µl reakcije za kloniranje prenesli v mikrocentrifugirko z odtaljenimi kompetentnimi celicami iz kompleta TOPO One Shot TOP10 *E. coli* (Invitrogen), narahlo premešali in na ledu inkubirali 5 minut. Mikrocentrifugirko smo po inkubaciji prenesli v vodno kopel na 42 °C za 30 sekund in ponovno ohladili na ledu. Celicam smo dodali 250 µl na sobno temperaturo ogretega medija S.O.C. ter mikrocentrifugirko pritrtili na rotacijsko mešalo nastavljeno na 200 obratov/minuto v inkubator pri 37 °C za 1 uro. Po inkubaciji smo 100 µl transformiranih celic nacepili na ogrete petrijevke s pripravljenim gojiščem LB z dodanim ampicilinom – *E. coli* FastMedia (Fermentas) in inkubirali preko noči na 37 °C.

### 3.2.1.5 Preverjanje uspešnosti transformacije in osamitev plazmida

Uspešnost transformacije smo preverili tako, da smo v treh ponovitvah s plošče odvzeli 3 kolonije, ki so zrasle preko noči in jih resuspendirali v 250 µl fosfatnega pufra. V 200 mikrolitrsko mikrocentrifugirko smo prenesli 50 µl suspenzije in jo denaturirali 5 minut pri 95 °C. Iz denaturiranih bakterijskih celic smo nato izvedli reakcijo PCR z začetnimi oligonukleotidi iz kompleta CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas) in polimerazo DNA iz kompleta *Tfi* DNA Polymerase (Invitrogen) ter deoksiribonukleotidi 10 mM dNTP Mix (Invitrogen). Reakcijsko mešanico smo pripravili po naslednjem postopku:

- 10 µl 5X PCR pufra
- 1 µl 10 mM deoksiribonukleotidov
- 1 µl začetnega oligonukleotida pJET 1.2 Forward Sequencing Primer
- 1 µl začetnega oligonukleotida pJET 1.2 Reverse Sequencing Primer
- 2 µl MgCl<sub>2</sub>
- 1 µl polimeraze *Tfi*
- 33 µl vode brez nukleazne aktivnosti

- 1 µl suspenzije denaturiranih bakterijskih celic

Preglednica 3: Potek reakcije PCR za dokaz plazmida v bakterijskih celicah in uspešno kloniranega inserta.

	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
Aktivacije polimeraze <i>Tfi</i>	94	4'	1
Denaturacija dvojne vijačnice	94	30"	
Prileganje začetnih oligonukleotidov	60	30"	30
Podaljševanje novonastalih verig DNA	72	1'	

Po potrditvi prisotnosti plazmida z ustrezno dolgim vključkom v bakterijskih celicah v vseh treh ponovitvah, smo iz njih osamili plazmid s komercialnim kompletom PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) po navodilih proizvajalca. Želeni insert smo dokazali z reakcijo RT-PCR v realnem času, v kateri smo uporabili začetne oligonukleotide in sondi, ki se uporablajo za dokaz zaporedja, ki ga vsebuje naš insert. Osamljene plazmide smo redčili do redčitve  $10^{-8}$  v stopnjah po  $10^{-1}$ . Reakcijsko mešanico smo pripravili s kompletom Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen) po naslednjem postopku (Preglednica 4):

- 12,5 µl mešanice Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG
- 0,5 µl 10 µM začetnega oligonukleotida Cog2-F
- 0,5 µl 10 µM začetnega oligonukleotida Cog2-R
- 0,25 µl 10µM sonde Ring2TP
- 0,5 µl referenčnega barvila ROX
- 8,75 µl vode v kateri ni zaznane nukleazne aktivnosti
- 2 µl redčitve izoliranega plazmida

Preglednica 4: Potek reakcije PCR v realnem času za dokaz želenega vključka.

	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
Inkubacija UDG* mešanice	50	2'	1
Inaktivacija encimov UDG in aktivacija polimeraze	95	2'	1
Denaturacija dvojne vijačnice	95	15"	
Prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje novonastalih verig DNA	56	30"	45

\*UDG je encim uracil DNA glikozilaza, ki prepreči kontaminacijo reakcije PCR z drugimi, neželenimi fragmenti DNA.

S to reakcijo PCR smo želeli ugotoviti prisotnost vključka pravilne dolžine v plazmidu v vseh treh ponovitvah. S pomočjo spektrofotometra NanoDrop (Thermo Scientific) smo izmerili koncentracijo plazmida in za nadaljnje delo izbrali ponovitev, ki je imela najvišjo koncentracijo plazmida (v ng/µl).

### 3.2.1.6 Prepis DNA v RNA

S komercialnim kompletom TranskriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Fermentas) smo prepisali naš vključek iz DNA v RNA. Predhodno smo morali plazmidno DNA cepiti z restriktijskim encimom XbaI iz komercialnega kompleta FastDigest XbaI (Fermentas).

Reakcijo smo pripravili po naslednjem protokolu:

- 2 µl 10X reakcijskega pufra FastDigest
- 17 µl plazmida
- 1 µl encima FastDigest XbaI

Restriktijsko mešanico smo inkubirali 5 minut pri 37 °C. Za inaktivacijo restriktijskega encima smo mešanico inkubirali še 20 minut pri 65 °C. Po končani restriktijski reakciji smo izvedli prepis inserta iz DNA v RNA v dveh volumsko različnih reakcijah (20 in 40 µl). Reakcijski mešanici smo pripravili po naslednjem protokolu:

- 4 µl 5X reakcijskega pufra TranscriptAid
- 8 µl mešanice nukleotidov ATP/CTP/GTP/UTP
- 2 µl encimske mešanice TranscriptAid

- 6 µl DNA (plazmid z vključkom) v koncentraciji 63,5 ng/µl

Za 40 µl reakcijske mešanice smo volumen komponent podvojili. Reakcijske mešanice smo dobro premešali in centrifugirali, da smo zbrali vse kapljice na dnu mikrocentrifugirke in jih nato inkubirali v napravi za PCR, 2 uri pri 37 °C.

### 3.2.1.7 Preverjanje količine in čiščenje prepisane RNA

Po reakciji prepisa DNA v RNA smo v reakcijsko mešanico dodali še encim DNaza I brez RNaz, premešali in inkubirali 15 minut pri 37 °C. Po inkubaciji smo DNazo I inaktivirali z dodatkom 0,5 M EDTA s pH 8,0 ter mešanico inkubirali 10 minut pri 65 °C. Za večji izplen RNA smo zgoraj opisan postopek prepisa DNA v RNA ponovili ter dobljene pridelke združili v eno mikrocentrifugirko. Morebitne ostanke DNA smo preverili z reakcijo PCR v realnem času po zgoraj opisanem protokolu z reagenti iz kompleta Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Za odstranitev DNA smo iz vzorcev osamili RNA na dva načina: z reagentom TRIzol LS (Invitrogen) po navodilih proizvajalca in s čiščenjem RNA z litijevim kloridom (LiCl), ki obori RNA. Za čiščenje z LiCl smo reakcijski mešanici dodali enak volumen 5,0 M LiCl in preko noči inkubirali v zmrzovalniku pri -20 °C. Po inkubaciji smo mešanico centrifugirali 15 minut pri 16000×g pri 4 °C. Supernatant smo po centrifugiranju odlili in sprali RNA s 400 µl 70-odstotnega sterilnega etanola ter ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. Etanol smo odlili in oborjeno RNA posušili. Posušeno RNA smo nato resuspendirali v 30 µl vode DEPC. Rezultate obeh čiščenj smo preverili s spektrofotometrom NanoDrop (Thermo Scientific). Ugotovili smo, da je čiščenje z LiCl učinkovitejše, saj so z reagentom TRIzol LS (Invitrogen) izgube RNA bile večje. Vsebnost DNA smo ponovno preverili po zgoraj opisanem protokolu z reagenti iz kompleta Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Prisotnost RNA smo potrdili z reakcijo RT-PCR v realnem času s komercialnim kompletom AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents (Applied Biosystems) po naslednjem protokolu (Preglednica 5):

- µl 2X RT-PCR reakcijskega pufra
- 0,5 µl 10 µM pozitivno usmerjenega začetnega oligonukleotida (Cog2-F)
- 0,5 µl 10 µM negativno usmerjenega začetnega oligonukleotida (Cog2-R)

- 0,25 µl 10 µM sonde Ring2TP
- 0,4 µl polimerazne mešanice
- 1,35 µl vode v kateri ni zaznane nukleazne aktivnosti
- 2 µl 1000x redčenega vzorca RNA v koncentraciji 0,4 ng/µl

Preglednica 5: Potek reakcije RT-PCR v realnem času z uporabljenimi reagenti iz kompleta AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents (Applied Biosystems).

	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
Reverzna transkripcija	45	10'	1
Prekinitev delovanja reverzne transkriptaze in aktivacija polimeraze	95	10'	1
Denaturacija	95	15"	
Prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige	56	45"	45

Rezultati te reakcije so nakazovali, da je v našem vzorcu visoka koncentracija RNA. Iz koncentracije in znane dolžine naše RNA smo nato s pomočjo pretvornika dostopnega na internetu (Endmemo, 2012) izračunali število kopij RNA na µl vzorca.

Iz vzorca z zanim številom kopij smo naredili redčitveno vrsto. Vzorce smo redčili v nosilni RNA (iz ang. carrier RNA) koncentracije 10 ng/µl, da bi zagotovili obstojnost RNA pri redčenju in zagotovili podobno okolje kot v primeru osamljene nukleinske kisline iz kliničnega vzorca. Redčitveno vrsto smo naredili do redčitve  $10^{-11}$  v stopnjah po  $10^{-1}$ . Redčitveno vrsto smo uporabili kot standard za kvantitativno določanje RNA. Uspešno pripravo standarda smo potrdili z reakcijo RT-PCR po zgoraj opisanem protokolu, ki se je razlikoval le po uporabi pozitivno usmerjenega začetnega oligonukleotida (namesto začetnega oligonukleotida Cog2-F smo uporabili Cog2-Fm, ki vsebuje manj denaturiranih baz kot je razvidno iz slike 7 in se zaradi tega bolje nalega na našo RNA, kar priomore k višji učinkovitosti reakcije).

### 3.2.2 Preverjane ponovljivosti rezultatov med reakcijami in znotraj reakcije

Preverili smo ponovljivost rezultatov znotraj reakcije RT-PCR v realnem času in ponovljivost med reakcijami RT-PCR v realnem času. Ponovljivost rezultatov znotraj

reakcije RT-PCR v realnem času smo preverili tako, da smo redčitveno vrsto nanesli v petih ponovitvah znotraj iste reakcije. Ponovljivost med reakcijami RT-PCR v realnem času pa smo preverili v petih ločenih reakcijah pri katerih smo redčitveno vrsto nanesli le enkrat. Vse reakcije smo pripravili po protokolu s kompletom AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents (Applied Biosystems) opisanim zgoraj.

### **3.2.3 Izgube RNA pri osamitvi**

Za oceno norovirusnega bremena, smo morali določiti učinkovitost osamitve RNA. To smo storili tako, da smo v negativni vzorec suspenzije iztrebka dodali 10 µl standarda RNA redčitve  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  in  $10^{-6}$  ter osamili RNA z avtomatskim izolatorjem iPrep (Invitrogen) in kompletom za celokupno osamitev nukleinskih kislin virusov, iPrep PureLink Virus Kit (Invitrogen), ki se uporablja za osamitev RNA iz suspenzij iztrebkov za diagnostične namene. Izgube pri osamitvi smo nato določili s kvantifikacijo z uporabo našega standarda.

### **3.2.4 Ugotavljanje števila kopij RNA in norovirusnega bremena akutnih in kroničnih bolnikov**

Primerjavo norovirusnega bremena med akutnimi in kroničnimi bolniki smo naredili z vzorci pozitivnimi na noroviruse, ki so bili poslani na preiskavo na gastroenteritične viruse v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Iztrebke bolnikov smo resuspendirali v sterilnem fosfatnem pufru v razmerju 1:10 (0,5g iztrebka v 4,5 ml pufra). Nukleinske kisline smo osamili z avtomatskim izolatorjem iPrep (Invitrogen) z uporabo kompleta iPrep PureLink Virus Kit (Invitrogen) iz 200 µl suspenzije iztrebkov. Elucijski volumen osamljenih nukleinskih kislin je zanšal 100 µl. Norovirusno breme smo ugotovili s primerjavo rezultatov reakcije RT-PCR v realnem času kliničnih vzorcev in standardno krivuljo, ki smo jo dobili iz redčitvene vrste našega standarda. Norovirusno breme smo ugotavliali v enojnih reakcijah, brez ponovitev. Predhodno je bilo v diagnostiki z uporabo notranje kontrole ugotovljeno, da vzorci nimajo inhibitornih lastnosti za reakcijo RT-PCR.

## 4 REZULTATI

### 4.1 ČISTOST TRANSKRIPTA

Pri pripravi standarda RNA je pomembno, da vzorec ne vsebuje DNA. S prvotnim odstranjevanjem DNA z DNazo I in nato obarjanjem RNA z litijevim kloridom nismo odstranili vse DNA, zato smo standard RNA ponovno izpostavili podaljšanem delovanju DNaze I in nato preostalo RNA ponovno oborili z litijevim kloridom. Po ponovljenem čiščenju tarčne DNA nismo več zaznali. S tem smo odstranili tarčno DNA iz postopka priprave transkripta, ki bi lahko vplival na rezultate kvantifikacije.

### 4.2 IZRAČUN ŠTEVILA KOPIJ PREPISANE RNA

Koncentracijo očiščene RNA smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop (Thermo scientific). Za izračun števila kopij RNA smo uporabili povprečno koncentracijo treh ponovljenih meritev, ki je znašala 381,2 ng/µl (Preglednica 6).

Preglednica 6: Meritve koncentracije RNA s spektrofotometrom NanoDrop (Thermo Scientific).

Meritve koncentracije	Koncentracija (ng/µl)
1	373,3
2	384,4
3	385,8
Povprečje	381,2
Standardni odklon	6,8

Iz povprečne koncentracije RNA v vzorcu smo izračunali število kopij RNA na mikroliter standarda, ki znaša  $2,394 \times 10^{12}$  kopij RNA/µl.

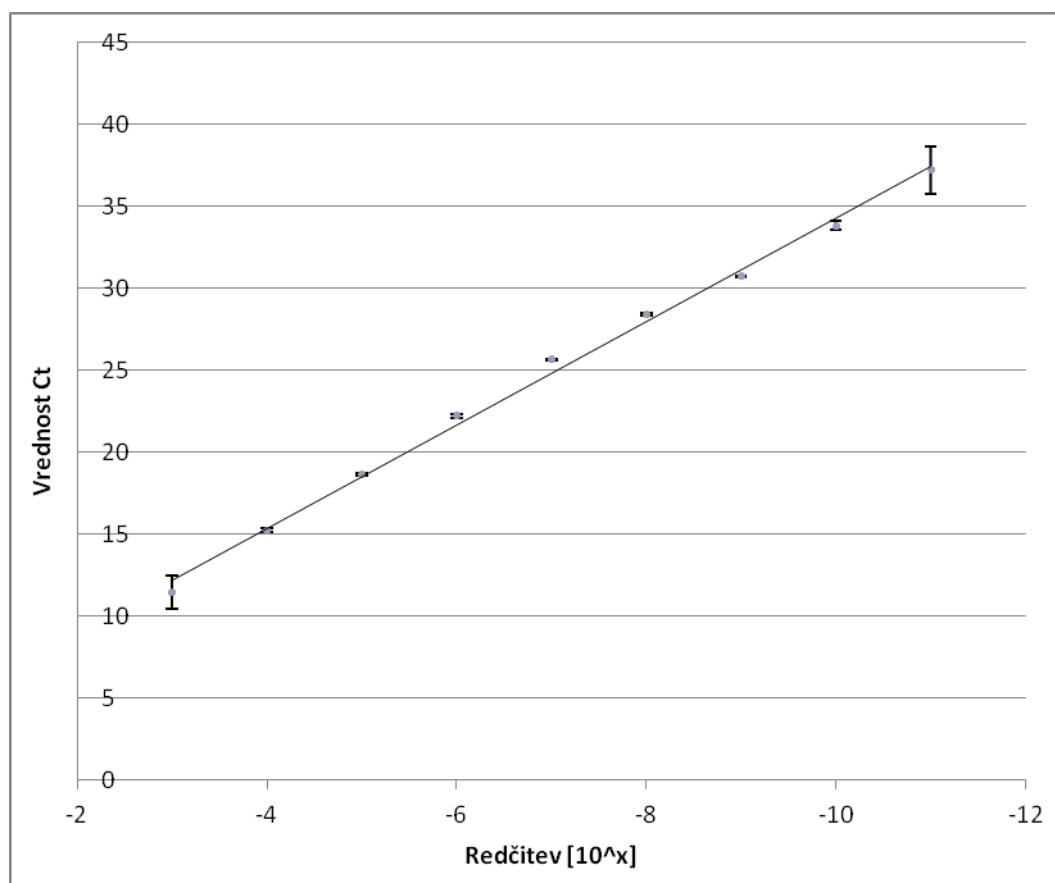
### 4.3 PREVERJANJE USPEŠNOSTI POMNOŽEVANJA TRANSKRIPTA S TARČNIM RT-PCR V REALNEM ČASU IN PONOVLJIVOST REZULTATOV

Za uspešnost pomnoževanja transkripta smo uporabili tarčni RT-PCR v realnem času, ki smo ga uporabljali za dokazovanje norovirusov GII v kliničnih vzorcih z uporabljenim začetnim oligonukleotidon Cog2-Fm. Ponovljivost rezultatov smo primerjali znotraj ene reakcije in med reakcijami.

Ponovljivost znotraj reakcije in med reakcijami je bila zadovoljiva, saj je prišlo le do manjših odstopanj med posameznimi reakcijami. Kot je razvidno iz preglednic 7 in 8 oziroma slik 9 in 10, je do največjih odstopanj prišlo predvsem pri redčitvah  $10^{-11}$ , kar je bilo pričakovano, saj vzorec pri tej redčitvi vsebuje najmanjše število kopij RNA in že majhno odstopanje privede do večje razlike pri rezultatih. Do večjega odstopanja je prišlo tudi pri preverjanju znotrajreakcijskih ponovitev, pri redčitvi  $10^{-3}$ . To napako najverjetneje lahko pripisemo človeškemu faktorju pri pipetiranju. Kot je razvidno iz preglednice 7 je največje odstopanje pri drugi ponovitvi. Pri ostalih ponovitvah je bilo odstopanje manjše.

Preglednica 7: Prikaz ponovljivosti rezultatov znotraj reakcije RT-PCR v realnem času. Prikazani so rezultati Ct.

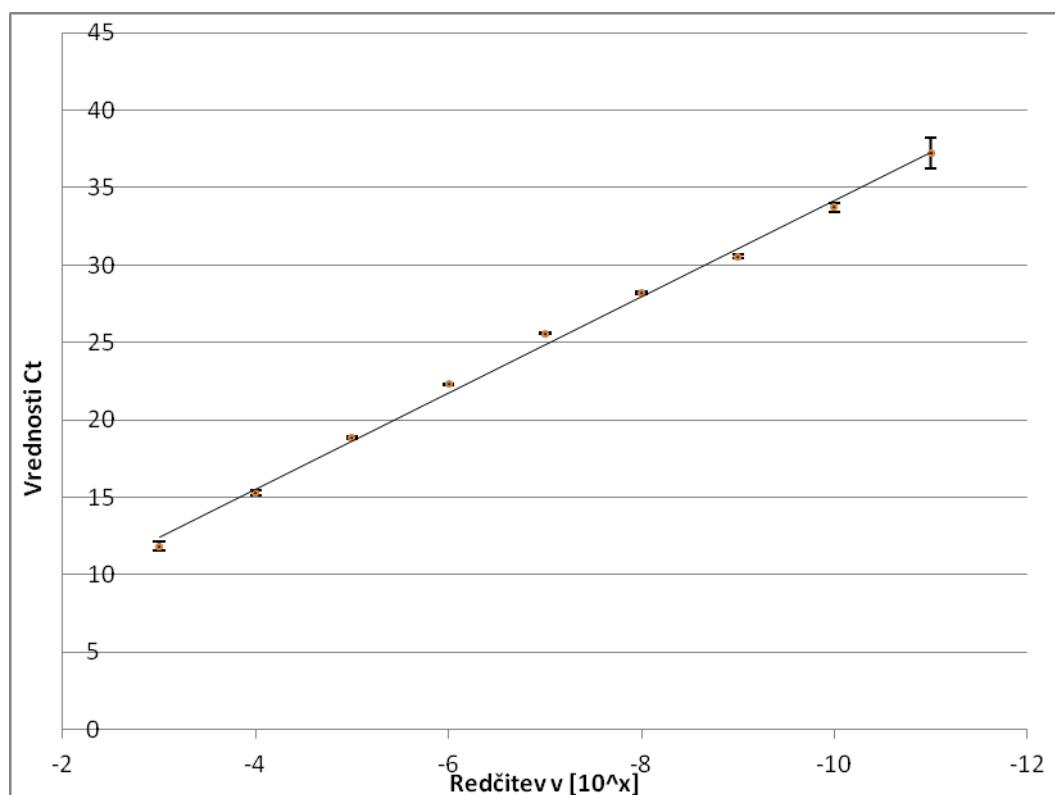
Ponovitev		1	2	3	4	5	Povprečje	Standardni odklon
Redčitev	Koncentracija RNA (kopij RNA/ $\mu$ l)							
$10^{-3}$	$2,394 \times 10^9$	11,69	10,36	11,77	11,73	11,75	11,46	0,62
$10^{-4}$	$2,394 \times 10^8$	15,07	15,24	15,20	15,33	15,26	15,22	0,10
$10^{-5}$	$2,394 \times 10^7$	18,61	18,67	18,47	18,72	18,69	18,63	0,10
$10^{-6}$	$2,394 \times 10^6$	22,02	22,10	22,34	22,31	22,26	22,20	0,14
$10^{-7}$	$2,394 \times 10^5$	25,60	25,56	25,68	25,59	25,72	25,63	0,07
$10^{-8}$	$2,394 \times 10^4$	28,33	28,40	28,45	28,53	28,39	28,42	0,07
$10^{-9}$	2394	30,65	30,68	30,80	30,72	30,68	30,71	0,06
$10^{-10}$	239,4	33,41	33,92	34,10	33,98	33,69	33,82	0,27
$10^{-11}$	23,94	36,14	38,73	38,83	36,14	36,14	37,20	1,45



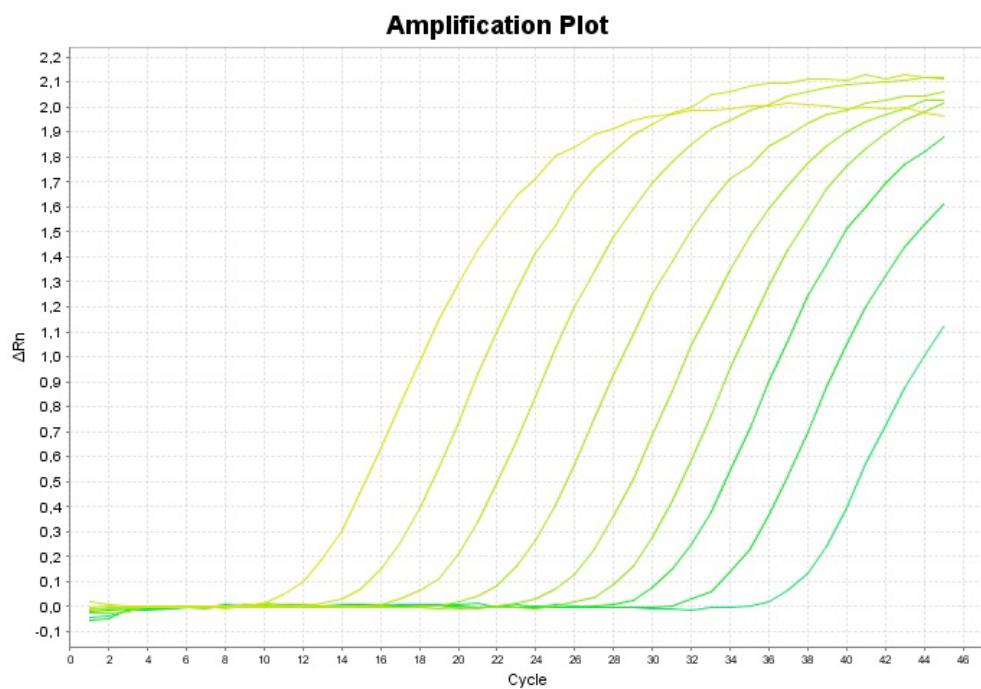
Slika 9: Povprečje rezultatov znotrajreakcijskih ponovitev s standardnimi odkloni.

Preglednica 8: Prikaz ponovljivosti rezultatov med reakcijami RT-PCR v realnem času. Prikazani so rezultati Ct.

Ponovitev		1	2	3	4	5	Povprečje	Standardni odklon
Redčitev	Koncentracija RNA (kopij RNA/ $\mu$ l)							
$10^{-3}$	$2,394 \times 10^9$	11,81	11,48	12,08	12,12	11,77	11,85	0,26
$10^{-4}$	$2,394 \times 10^8$	15,29	15,44	15,56	15,16	15,15	15,32	0,18
$10^{-5}$	$2,394 \times 10^7$	18,89	18,89	18,73	18,82	18,84	18,83	0,07
$10^{-6}$	$2,394 \times 10^6$	22,30	22,40	22,23	22,33	22,30	22,31	0,06
$10^{-7}$	$2,394 \times 10^5$	25,60	25,54	25,64	25,58	25,58	25,59	0,04
$10^{-8}$	$2,394 \times 10^4$	28,35	28,22	28,20	28,16	28,10	28,21	0,09
$10^{-9}$	2394	30,65	30,52	30,63	30,33	30,68	30,56	0,14
$10^{-10}$	239,4	33,46	33,77	33,54	34,24	33,62	33,73	0,31
$10^{-11}$	23,94	37,98	35,76	38,10	37,59	36,72	37,23	0,98

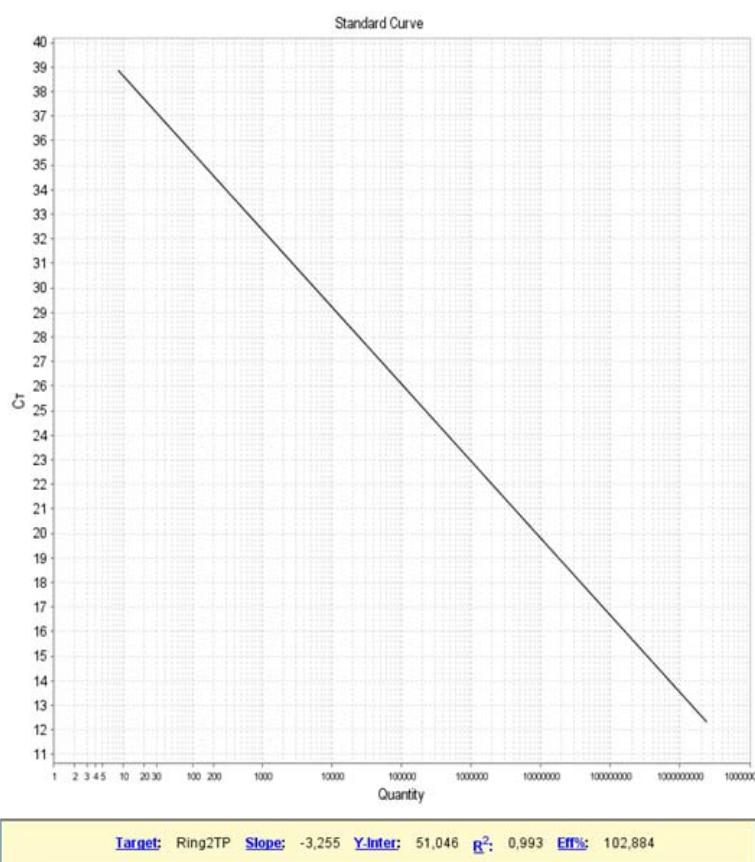


Slika 10: Povprečja rezultatov medreakcijskih ponovitev s standardnimi odkloni.



Slika 11: Prikaz krivulj pomnoževanja redčitvene vrste standarda iz programa StepOne Software v2.0 (Applied Biosystems).

Učinkovitost pomnoževanja smo določili s programom StepOne Software v2.0 (Applied Biosystems). Ugotovljena učinkovitost je bila mnogo nižja od željene učinkovitosti (pod 90%), zato smo zamenjali začetni oligonukleotid Cog2-F s Cog2-Fm. S tem začetnim oligonukleotidom se je učinkovitost reakcije povišala. Določili smo, da je učinkovitost pomnoževanja 102,9-odstotna (Slika 12). To je sprejemljiva učinkovitost, saj mora biti učinkovitost za kvantifikacijo med 90 in 110-odstotkov.

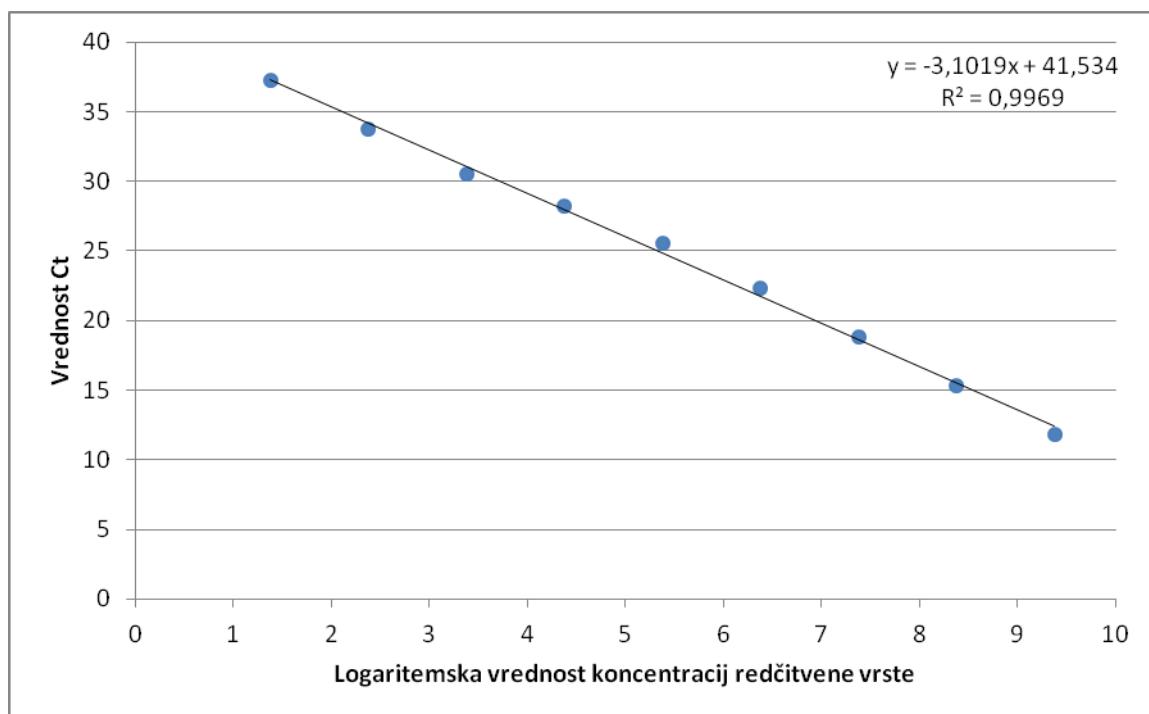


Slika 12: Standardna krivulja, ki jo izriše program StepONE Software v2.0 (Applied Biosystems). Na spodnjem delu slike je razvidna učinkovitost pomnoževanja v odstotkih (Eff% - iz ang. efficiency).

#### 4.4 UGOTAVLJANJE NOROVIRUSNEGA BREMENA PRI BOLNIKIH

Norovirusno breme smo določali pri 30 naključno izbranih bolnikih z akutno norovirusno okužbo in pri 30 naključno izbranih bolnikih s kronično norovirusno okužbo. Izračunali smo ga z linearno regresijo z enačbo za standardno krivuljo, ki smo jo dobili iz podatkov vrednosti Ct redčitvene vrste in desetiških logaritmov koncentracij (Slika 13). Ugotovili smo, da je norovirusno breme pri bolnikih z akutno okužbo višje kot pri bolnikih s

kronično okužbo (Preglednici 9, 10 in Slika 14). Mediana števila kopij RNA na  $\mu\text{l}$  osamljene nukleinske kisline je pri bolnikih z akutno norovirusno okužbo  $1,06 \times 10^7$  kopij RNA na  $\mu\text{l}$  osamljene nukleinske kisline, pri bolnikih s kronično norovirusno okužbo pa  $3,11 \times 10^5$  kopij RNA na  $\mu\text{l}$  osamljene nukleinske kisline. Tudi razpon med najvišjim in najnižjim norovirusnim bremenom pri bolnikih se razlikuje. Pri akutnih bolnikih je razpon števila kopij RNA na  $\mu\text{l}$  osamljene nukleinske kisline med  $4,81 \times 10^4$  in  $4,96 \times 10^9$ , pri kroničnih bolnikih pa je med  $3,94 \times 10^3$  in  $2,18 \times 10^7$  kopij RNA na  $\mu\text{l}$  osamljene nukleinske kisline.



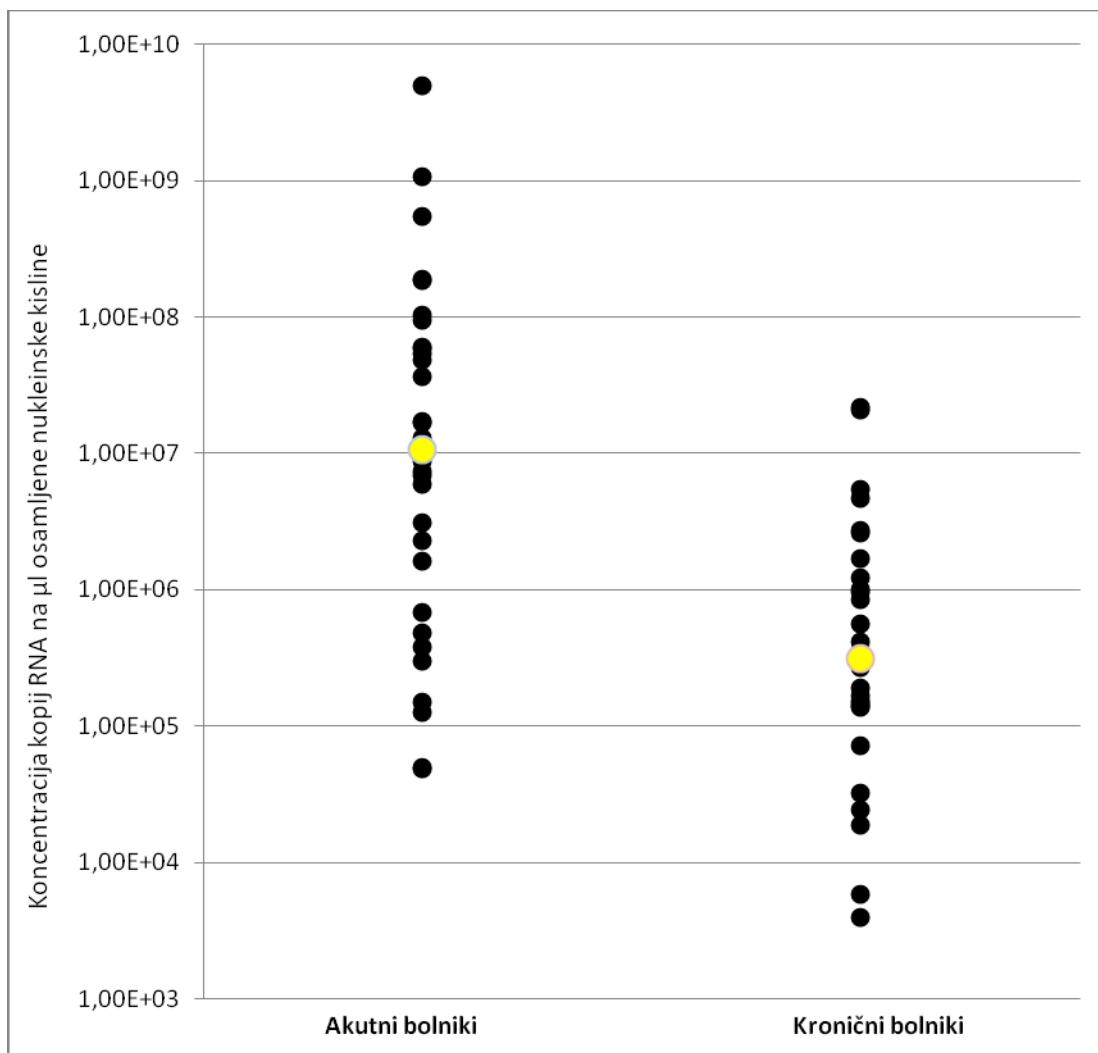
Slika 13: Vrednosti Ct v odvisnosti od desetiškega logaritma koncentracij redčitvene vrste standarda. V zgornjem desnem kotu je prikazana enačba s katero lahko izračunamo norovirusno breme pri bolnikih.

Preglednica 9: Norovirusno breme pri bolnikih z akutnim obolenjem.

Vzorec	Rezultat RT-PCR v realnem času (Ct)	Število kopij RNA na $\mu\text{l}$ osamljene nukleinske kisline	Ocena števila norovirusnih delcev na gram iztrebka
1348/11	19,11	$1,69 \times 10^7$	$2,80 \times 10^{12}$
1196/11	20,53	$5,91 \times 10^6$	$9,75 \times 10^{11}$
1182/11	21,81	$2,28 \times 10^6$	$3,77 \times 10^{11}$
1161/11	25,72	$1,25 \times 10^5$	$2,07 \times 10^{10}$
1107/11	20,24	$7,33 \times 10^6$	$1,21 \times 10^{12}$
1101/11	22,28	$1,61 \times 10^6$	$2,66 \times 10^{11}$
1085/11	23,91	$4,80 \times 10^5$	$7,93 \times 10^{10}$
1064/11	15,87	$1,88 \times 10^8$	$3,10 \times 10^{13}$
1028/11	26,96	$4,99 \times 10^4$	$8,24 \times 10^9$
1020/11	25,47	$1,51 \times 10^5$	$2,49 \times 10^{10}$
995/11	19,10	$1,71 \times 10^7$	$2,82 \times 10^{12}$
975/11	21,39	$3,12 \times 10^6$	$5,15 \times 10^{11}$
969/11	17,43	$5,90 \times 10^7$	$9,73 \times 10^{12}$
859/11	11,46	$4,96 \times 10^9$	$8,18 \times 10^{14}$
828/11	24,24	$3,76 \times 10^5$	$6,21 \times 10^{10}$
765/11	16,78	$9,56 \times 10^7$	$1,58 \times 10^{13}$
719/11	27,01	$4,81 \times 10^4$	$7,94 \times 10^9$
715/11	17,70	$4,83 \times 10^7$	$7,96 \times 10^{12}$
684/11	20,00	$8,75 \times 10^6$	$1,44 \times 10^{12}$
652/11	20,31	$6,95 \times 10^6$	$1,15 \times 10^{12}$
626/11	23,44	$6,81 \times 10^5$	$1,12 \times 10^{11}$
618/11	24,56	$2,97 \times 10^5$	$4,89 \times 10^{10}$
611/11	17,40	$6,03 \times 10^7$	$9,95 \times 10^{12}$
607/11	15,89	$1,85 \times 10^8$	$3,05 \times 10^{13}$
553/11	19,48	$1,29 \times 10^7$	$2,12 \times 10^{12}$
541/11	14,44	$5,43 \times 10^8$	$8,96 \times 10^{13}$
531/11	16,66	$1,04 \times 10^8$	$1,72 \times 10^{13}$
530/11	18,07	$3,67 \times 10^7$	$6,05 \times 10^{12}$
481/11	13,52	$1,07 \times 10^9$	$1,77 \times 10^{14}$
436/11	17,56	$5,36 \times 10^7$	$8,84 \times 10^{12}$
Ekstremi	11,46	$4,96 \times 10^9$	$8,18 \times 10^{14}$
Ekstremi	27,01	$4,81 \times 10^4$	$7,94 \times 10^9$
Mediane	19,74	$1,06 \times 10^7$	$1,75 \times 10^{12}$

Preglednica 10: Norovirusno breme pri bolnikih s kroničnim obolenjem.

Vzorec	Rezultat RT-PCR v realnem času (Ct)	Število kopij RNA na $\mu\text{l}$ osamljene nukleinske kisline	Ocena števila norovirusnih delcev na gram iztrebka
2046/09	24,69	$2,69 \times 10^5$	$4,44 \times 10^{10}$
2078/09	18,77	$2,18 \times 10^7$	$3,60 \times 10^{12}$
2333/09	21,57	$2,73 \times 10^6$	$4,50 \times 10^{11}$
2577/09	18,83	$2,09 \times 10^7$	$3,44 \times 10^{12}$
3212/09	24,50	$3,10 \times 10^5$	$5,12 \times 10^{10}$
1064/10	20,83	$4,73 \times 10^6$	$7,80 \times 10^{11}$
1741/10	25,58	$1,39 \times 10^5$	$2,30 \times 10^{10}$
2153/10	24,49	$3,12 \times 10^5$	$5,15 \times 10^{10}$
2481/10	25,17	$1,89 \times 10^5$	$3,11 \times 10^{10}$
398/09	25,45	$1,53 \times 10^5$	$2,53 \times 10^{10}$
849/09	30,38	$3,94 \times 10^3$	$6,51 \times 10^8$
1646/09	25,60	$1,37 \times 10^5$	$2,26 \times 10^{10}$
2068/09	22,20	$1,71 \times 10^6$	$2,82 \times 10^{11}$
2835/09	23,14	$8,51 \times 10^5$	$1,40 \times 10^{11}$
3092/09	28,28	$1,87 \times 10^4$	$3,09 \times 10^9$
677/10	21,62	$2,63 \times 10^6$	$4,34 \times 10^{11}$
1083/10	25,34	$1,66 \times 10^5$	$2,74 \times 10^{10}$
1606/10	22,91	$1,01 \times 10^6$	$1,67 \times 10^{11}$
2443/10	25,51	$1,47 \times 10^5$	$2,42 \times 10^{10}$
336/09	24,10	$4,17 \times 10^5$	$6,89 \times 10^{10}$
2211/09	27,94	$2,41 \times 10^4$	$3,98 \times 10^9$
2463/09	24,30	$3,60 \times 10^5$	$5,94 \times 10^{10}$
2662/09	26,47	$7,18 \times 10^4$	$1,19 \times 10^{10}$
3058/09	29,86	$5,80 \times 10^3$	$9,57 \times 10^8$
3335/09	24,61	$2,86 \times 10^5$	$4,72 \times 10^{10}$
222/10	20,65	$5,40 \times 10^6$	$8,92 \times 10^{11}$
855/10	22,65	$1,22 \times 10^6$	$2,02 \times 10^{11}$
2016/10	22,96	$9,73 \times 10^5$	$1,60 \times 10^{11}$
2295/10	23,70	$5,62 \times 10^5$	$9,27 \times 10^{10}$
2827/10	27,55	$3,22 \times 10^4$	$5,32 \times 10^9$
Ekstremi	18,77	$2,18 \times 10^7$	$3,60 \times 10^{12}$
Ekstremi	30,38	$3,94 \times 10^3$	$6,51 \times 10^8$
Mediane	24,50	$3,11 \times 10^5$	$5,14 \times 10^{10}$



Slika 14: Prikaz koncentracije RNA pri kvantifikaciji bolnikov z akutno in kronično okužbo. Rumena pika prikazuje vrednost mediane.

#### 4.5 OCENA NOROVIRUSNEGA BREMENA V IZHODNEM KLINIČNEM VZORCU

Za oceno norovirusnega bremena v izhodnem kliničnem vzorcu smo najprej ocenili učinkovitost izolacije. Kot je razvidno iz preglednice 11 je povprečna učinkovitost osamitve RNA približno 3 %, prihaja pa do velikih razlik pri učinkovitosti izolacije pri različnih koncentracijah nukleinskih kislin. Iz preglednice je tudi razvidno, da je učinkovitost v veliki meri odvisna od začetne koncentracije nukleinskih kislin v vzorcu.

Preglednica 11: Učinkovitost izolacije norovirusnih nukleinskih kislin iz suspenzije blata

Koncentracija RNA pred izolacijo v številu kopij RNA/ $\mu$ l	Koncentracija RNA po izolacijo v številu kopij RNA/ $\mu$ l	Učinkovitost (%)
$2,394 \times 10^{10}$	$4,45 \times 10^8$	1,86
$2,394 \times 10^8$	$8,46 \times 10^6$	3,53
$2,394 \times 10^6$	$1,05 \times 10^5$	4,39
Povprečna učinkovitost (%)		3,26

Pri podani oceni norovirusnega bremena v izhodnem kliničnem vzorcu smo upoštevali potek priprave vzorca za diagnostiko, ki obsega redčitev vzorca v sterilnem fosfatnem pufru v razmerju 1:10. Upoštevali smo tudi volumen suspenzije, iz katere smo osamili nukleinske kisline (200  $\mu$ l), volumen elucije osamljenih nukleinskih kislin (100  $\mu$ l), povprečno učinkovitost osamitve ter volumen osamljenih nukleinskih kislin, ki smo jih prenesli v reakcijo RT-PCR v realnem času (2  $\mu$ l). Za izračun števila kopij norovirusne RNA na gram iztrebka, smo število kopij RNA na  $\mu$ l osamljene nukleinske kisline množili s faktorjem  $1,65 \times 10^5$ . S tem smo ocenili, da je mediana norovirusnega bremena pri bolnikih z akutno okužbo  $1,75 \times 10^{12}$  norovirusnih delcev na gram iztrebka, mediana norovirusnega bremena pri bolnikih s kronično okužbo pa  $5,14 \times 10^{10}$ .

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 PRIPRAVA STANDARDA RNA ZA KVANTIFIKACIJO NOROVIRUSOV

Kvantifikacija tarčnih nukleinskih kislin poteka s pomočjo standardne krivulje, ki jo dobimo iz redčitvene vrste zunanjega standarda. Za zunanji standard lahko izberemo DNA ali RNA. Kljub temu, da je priprava standarda RNA kompleksnejši proces kot priprava standarda DNA, smo se v tem diplomskem delu odločili za pripravo standarda RNA, saj lahko z njim natančneje določimo količino virusov v vzorcih z osamljeno RNA. Z uporabo standarda DNA bi lahko kvantificirali tarčno RNA, vendar rezultat ne bi bil natančen, saj s standardom DNA ne upoštevamo delovanja reverzne transkriptaze. V primeru, da reverzna transkripcija ne bi bila učinkovita in se ne bi vse molekule RNA prepisale v DNA, bi z uporabo standarda DNA dobili napačne rezultate. Z uporabo standarda RNA upoštevamo tako reverzno transkripcijo kot tudi pomnoževanje prepisane DNA.

Pri pripravi standarda RNA je tudi pomembno, da po prepisu DNA v RNA odstranimo vso prisotno DNA, da v nadaljevanju ne moti reakcije oziroma, da zaradi prisotne DNA ne dobimo napačnih rezultatov. Pri tem smo imeli nekaj težav, saj DNaza I priložena kompletu TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Fermentas) ni razgradila vse prisotne DNA. Zato smo uporabili čiščenje RNA z litijevim kloridom, ki obarja enovijačno RNA, DNA pa ne. S tem smo si zagotovili, da je v našem standardu prisotna izključno RNA.

Pripravljen standard smo redčili in shranjevali v raztopini nosilne RNA, s čimer smo ga zaščitili pred morebitno prisotnimi RNazami. Nosilne RNA so majhne molekule RNA s poli-A repom, ki predstavljajo dodaten substrat za RNaze, s tem se zmanjša verjetnost, da bi RNaze razgradile molekule standarda RNA.

### 5.2 UČINKOVITOST REAKCIJE

Učinkovitost reakcije smo določili s programom StepOne Software v2.0 (Applied Biosystems). Po prvem določanju učinkovitosti reakcije smo dobili rezultat pod mejo sprejemljivosti (pod 90 %). Odločili smo se analizirati vse komponente, ki bi morebiti

vplivale na učinkovitost reakcije. Na učinkovitost vpliva mnogo faktorjev, kot so na primer izbor začetnih oligonukleotidov, pogoji pri katerih poteka reakcija, kvaliteta in količina RNA. Na učinkovitost reakcije lahko vpliva tudi stanje začetnih oligonukleotidov in sond, saj lahko le-ti sčasoma razpadajo zaradi večkratnega odtajevanja in zamrzovanja. Sonde pa lahko začnejo razpadati tudi zaradi izpostavitve svetlobi.

Reakcijo, ki smo jo uporabili za kvantifikacijo, so predhodno že optimizirali za uporabo v diagnostični metodi kvalitativnega dokazovanja norovirusov genske skupine II. Zato smo preverili le začetne oligonukleotide. Pozitivno usmerjen začetni oligonukleotid Cog2-F vsebuje nekaj degeneriranih nukleotidov (Preglednica 1). Posumili smo, da je to vzrok za nizko učinkovitost reakcije. Zato smo pripravili nov pozitivno usmerjen začetni oligonukleotid Cog2-Fm (Slika 7), ki ne vsebuje nobenega degeneriranega nukleotida in je specifičen za noroviruse genske skupine II genotipa 4 (GII.4). Le-ta je najpogostejši genotip norovirusov, ki povzroča okužbe pri ljudeh. Z novim začetnim oligonukleotidom smo zvišali učinkovitost reakcije na 102 %, kar je znotraj sprejemljivih mej učinkovitosti, ki so potrebne za kvantifikacijo.

V literaturi je namreč sprejemljiva učinkovitost reakcije med 90 in 110 %. Če je učinkovitost nižja od 90 % lahko to vpliva na občutljivost reakcije, s tem pa bi bila kvantifikacija vprašljiva, saj ne bi dobili realnih rezultatov. Za nizke učinkovitosti je v večini primerov odgovorna slaba vezava začetnih oligonukleotidov na tarčna zaporedja, lahko tudi tvorba dimerov med začetnimi oligonukleotidi. Razlaga za vrednosti višje od 110% je najverjetneje previsoka koncentracija tarčne molekule v vzorcu in zaradi tega napake pri pripravi redčitvene vrste (McGee in sod., 2007).

### 5.3 UGOTAVLJANJE NOROVIRUSNEGA BREMENA PRI BOLNIKIH

Norovirusno breme smo določali pri bolnikih z akutno okužbo ter bolnikih s kronično okužbo, saj smo predvidevali, da je norovirusno breme pri bolnikih z akutno okužbo višje kot pri bolnikih s kronično okužbo. Rezultati kažejo na to, da smo našo domnevo potrdili, saj je po naših rezultatih mediana norovirusnega bremena pri bolnikih s kronično okužbo stokrat višja kot pri bolnikih s kronično okužbo. Kvantitativno določanje norovirusov pri

bolnikih s kronično okužbo je pomembno, saj se pri večini primerov klinični znaki ne kažejo, vendar to ne pomeni, da ne predstavljajo potencialnega vira okužbe za okolico. V tem diplomskem delu smo pregledali vzorce bolnikov po presaditvi ledvic s kronično norovirusno okužbo. Ti bolniki se pogosto vračajo na preglede v bolnišnice in s tem predstavljajo grožnjo za okužbo z norovirusi pri drugih bolnikih, pri katerih bi, zaradi narave njihove primarne bolezni, taka okužba lahko vodila do hujših zapletov ali celo smrti.

Rezultate kvantifikacije norovirusov smo podali v enoti: število kopij RNA na mikroliter osamljene nukleinske kisline iz vzorcev. Rezultate smo podali tudi v enoti: število norovirusnih delcev na gram iztrebka. Slednji podatki niso zanesljivi saj metode za iztrebke ne moremo normalizirati – v iztrebkih ni mogoče uporabiti neke tarčne molekule, s kvantifikacijo katere bi lahko določili neko univerzalno enoto vzorčenja in bi jo lahko uporabili kot notranji standard. Take molekule so na primer hišni geni (iz ang. housekeeping genes), ki jih lahko uporabljamо kot notranji standard pri vzorcih, ki so v večini sestavljeni iz celic (npr. kri, tkivo). Iztrebek ima pri različnih bolnikih različno sestavo – vsebuje lahko različno količino vode, sploh pri driskah, kar nam še dodatno oteži normalizacijo. Tudi število epitelnih celic v iztrebkih, katerih gene bi lahko uporabili kot standard, ni konstantno.

Metodo določanja norovirusnega bremena smo v diplomskem delu uporabili le pri bolnikih, pri katerih je bila predhodno dokazana okužba z norovirusi genske skupine II genotipa 4 (GII.4). Omejitev na ta genotip je bila potrebna zaradi spremembe začetnega oligonukleotida, pri katerem smo širokospektralnost z degeneriranimi oligonukleotidi močno zmanjšali, celo omejili na genotip GII.4 (Slika 7), a hkrati dosegli višjo učinkovitost pomnoževanja, ključno za kvantitativno metodo. Za kvantitativno določanje drugih genotipov ali genskih skupin norovirusov bi morali našo metodo predhodno preveriti. Kritična je predvsem specifičnost na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje našega standarda. V kolikor začetni oligonukleotidi ne bi bili ustrezno nalegali na tarčna zaporedja, bi morali ponovno pripraviti standard s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za določen genotip oziroma gensko skupino.

Prikazana metoda se lahko uporablja tudi za določanje norovirusnega bremena v drugih kužninah - izbruhaninah in likvorjih, in drugih vzorcih – pitne in okoljske vode. Težave bi lahko povzročila le nizka koncentracija norovirusov v tovrstnih vzorcih in vrednosti Ct izven območja kvantifikacije metode.

## 6 SKLEPI

Diagnostične metode, ki se uporablajo za dokazovanje norovirusov so kvalitativne. Te metode nam podajo le podatek, ali so v vzorcu prisotni norovirusi ali ne. Zato smo razvili metodo, s katero lahko poleg dokaza, da so v vzorcu prisotni norovirusi, prikažemo tudi njihovo koncentracijo.

Z opisano metodo smo testirali 30 bolnikov z akutno ter 30 bolnikov s kronično norovirusno okužbo ter primerjali norovirusna bremena posameznih skupin med seboj. Po primerjavi rezultatov smo ugotovili, da je norovirusno breme pri bolnikih z akutno norovirusno okužbo večinoma višje kot pri bolnikih s kronično okužbo.

Ocenili smo tudi število norovirusnih delcev v izhodnem kliničnem vzorcu. Ti rezultati niso zanesljivi, saj metode za iztrebke ne moremo normalizirati.

S to metodo lahko norovirusno breme določamo samo pri bolnikih, ki so okuženi z norovirusi genske skupine II genotipa 4 (GII.4). Za določanje norovirusnega bremena pri bolnikih okuženimi z drugimi genotipi, bi morali preveriti značilnost začetnih oligonukleotidov. Če le-ti ne bi bili ustrezni, bi morali ponovno pripraviti standard in z njim določiti norovirusno breme.

## 7 POVZETEK

Norovirusi so najpogosteji povzročitelji virusnih gastroenteritisov po vsem svetu. Za diagnostiko norovirusov so pred razvojem molekularnih diagnostičnih metod uporabljali predvsem elektronsko mikroskopijo. Danes se večinoma uporablajo kvalitativne molekularne metode. V diplomskem delu smo razvili metodo, s katero kvantitativno določimo noroviruse.

Predstavili smo postopek, s katerim smo pripravili standard za določevanje norovirusnega bremena z verižno reakcijo s polimerazo s predhodnim obratnim prepisom v realnem času (RT-PCR v realnem času).

Za prikaz uporabnosti metode smo norovirusno breme določili pri 30 bolnikih z akutno ter 30 bolnikih s kronično norovirusno okužbo. Rezultate smo primerjali med seboj in ugotovili, da se pri bolnikih s kronično okužbo izloča manjše število norovirusov kot pri bolnikih z akutno okužbo.

Ocenili smo tudi število norovirusov na gram iztrebka. Pri teh podatkih gre zgolj za oceno norovirusnega bremena, saj metode za določevanje virusnega bremena v iztrebkih ne moremo normalizirati.

Metoda, ki smo jo razvili, se lahko uporablja tudi za dokazovanje norovirusnega bremena v drugih kužninah (likvorji in izbruhanine), kot tudi vzorcih pitne in okoljske vode.

## 8 VIRI

Bustin S.A., Mueller R. 2005. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. Clinical Science, 109: 365-379.

Bustin S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of Molecular Endocrinology, 29: 23-39.

Chakravarty S., Hutson A. M., Estes M.K., Prasad B.V.V. 2004. Evolutionary trace residues in noroviruses: Importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly and strain diversity. Journal of Virology, 79,1: 554-568.

De Leon R., Matsui S.M., Baric R.S., Herrmann J.E., Blacklow N. R., Greenberg H.B., Sobsey M.D. 1992. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. Journal of Clinical Microbiology, 30: 3151-3157.

Donaldson E.F., Lindesmith L.C., Lobue A.D., Baris R.S. 2010. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. Nature Reviews Microbiology, 8: 231-241.

EM slika norovirusov, EQA1a. 2012. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov (interno gradivo).

Endmemo. 2012. BioTools: DNA/RNA copy number calculator. Free on line converters, calculators.

<http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php> (februar, 2012)

Epsy M.J., Uhl R.L., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill III F.R., Smith T.F. 2006. Real-Time PCR

in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. Clinical Microbiology Reviews, 19, 1: 165-256.

Fermentas. 2011. CloneJET PCR cloning kit. Product information. Foster City, Fermentas: 18 str.

Ginzinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Experimental Hematology. 30, 6: 503-512.

Glass R.I., Parashar U.D., Estes M.K. 2009. Norovirus gastroenteritis. New England Journal of Medicine, 361: 1776-1785.

Green K.Y., Ando T., Balayn M.S., Berke T., Clarke I.N., Estes M.K., Matson D.O., Nakata S., Neill J.D., Studdert M.J., Thiel H-J. 2008. Taxonomy of the Caliciviruses. Journal of Infections Diseases, 181, Suppl 2: S322-S330.

Hardy M.E. 2005. Norovirus protein structure and function. Federation FEMS Microbiology Letters, 253: 1-8.

IVZ. 2006. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2005. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 37-38.

[http://www.ivz.si/gradiva\\_nalezljive\\_bolezni?pi=5&\\_5\\_Filename=1511.pdf&\\_5\\_MediaId=1511&\\_5\\_AutoResize=false&pl=105-5.3](http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=1511.pdf&_5_MediaId=1511&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3). (avgust, 2012).

IVZ. 2007. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2006. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 43-44.

[http://www.ivz.si/gradiva\\_nalezljive\\_bolezni?pi=5&\\_5\\_Filename=1510.pdf&\\_5\\_MediaId=1510&\\_5\\_AutoResize=false&pl=105-5.3](http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=1510.pdf&_5_MediaId=1510&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3). (avgust, 2012).

IVZ. 2008. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2007. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 39-40.

[http://www.ivz.si/gradiva\\_nalezljive\\_bolezni?pi=5&\\_5\\_Filename=1509.pdf&\\_5\\_MediaId=1509&\\_5\\_AutoResize=false&pl=105-5.3](http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=1509.pdf&_5_MediaId=1509&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3). (avgust, 2012).

IVZ. 2009. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2008. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja:49-49.

[http://www.ivz.si/gradiva\\_nalezljive\\_bolezni?pi=5&\\_5\\_Filename=2491.pdf&\\_5\\_MediaId=2491&\\_5\\_AutoResize=false&pl=105-5.3](http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=2491.pdf&_5_MediaId=2491&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3). (avgust, 2012).

IVZ. 2010. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2009. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 49-49.

[http://www.ivz.si/gradiva\\_nalezljive\\_bolezni?pi=5&\\_5\\_Filename=4112.pdf&\\_5\\_MediaId=4112&\\_5\\_AutoResize=false&pl=105-5.3](http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=4112.pdf&_5_MediaId=4112&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3). (avgust, 2012).

Jiang X., Wang M., Graham D.Y., Estes M.K. 1992a. Detection of Norwalk virus stool by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 2529-2534.

Jiang X., Wang M., Graham D.Y., Estes M.K. 1992b. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology*, 66, 11: 6527-6532.

Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hosmino F.B., Takeda N., Katayama K. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on Real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1548-1557.

Kapikian A.Z., Wyatt R.G., Dolin R., Thornhill T.S., Kalica A.R., Chanock R.M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, 10: 1075-1081.

Koo L.H., Ajami N., Atmar R.L., Dupont H.I. 2010. Noroviruses: The principal cause of foodborne disease worldwide. *Discovery Medicine*, 10, 50: 61-70.

Koopmans M., Vennema H., Heersma H., van Strien E., van Duynhoven Y., Brown D., Reacher M., Lopman B. 2003. Early identification of common-source foodborne virus outbreaks in Europe. Emerging Infectious Diseases, 9: 1136-1142.

Kroneman A., Verhoef L., Harris J., Vennema H., Duizer E., van Duynhoven Y., Gray J., Iturriza M., Böttiger B., Falkenhorst G., Johnsen C., von Bonsdorff C. H., Maunula L., Kuusi M., Pothier P., Gallay A., Schreier E., Höhne M., Koch J., Szücs G., Reuter G., Krisztalovics K., Lynch M., McKeown P., Foley B., Coughlan S., Ruggeri F. M., Di Bartolo I., Vainio K., Isakbaeva E., Poljsak-Prijatelj M., Hocevar Grom A., Zimsek Mijovski J., Bosch A., Buesa J., Sanchez Fauquier A., Hernández-Pezzi G., Hedlund K. O., Koopmans M. 2008. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. Journal of Clinical Microbiology, 46, 9: 2959-2965.

Lopman B.A., Brown D.W., Koopmans M. 2002. Human caliciviruses in Europe. Journal of Clinical Virology, 24: 137-160.

McGee P., Bustin S., Exner M., Anderson M. 2007. How Reliable is your qPCR data. New Jersey, Drug discovery & development: 6 str.  
<http://www.dddmag.com/articles/2007/10/how-reliable-your-qpcr-data> (marec, 2012).

Morillo S.G., Timenetsky M.C.S.T. 2011. Norovirus: an overview. Associação Médica Brasileira, 57, 4: 453-458.

Patel M.M., Hall A.J., Vinje J., Parashar U.D. 2009. Noroviruses: A comprehensive review. Journal of Clinical Virology, 44: 1-8.

Patel M.M., Widdowson M-A., Glass I.R., Akazawa K., Vinje J., Parashar U.D. 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. Emerging Infectious Diseases, 14, 18: 1224-1231.

Poljsak-Prijatelj M., Zimšek Mijovski J. 2011. Kalicivirusi. V: Medicinska virologija. Poljak M., Petrovec M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 251-260.

Prasad B.V.V., Hardy M.E., Dokland T., Bella J., Rossmann M.G., Estes M.K. 1999. X-ray crystallographic structure of the norwalk virus capsid. American Association for the Advancement of Science, 286, 5438: 287-290.

Rutledge R.G., Cote C. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. Nucleic Acids Research, 31, 16: e93, doi: 10.1093/nar/gng093: 6 str.

Said M.A., Trish M.P., Sears C.L. 2008. Gastrointestinal flu: Norovirus in health care and long-term care facilities. Clinical Infections Diseases, 47: 1202-1208.

Troeger H., Loddenkemper C., Schneider T., Schreier E., Epple H.-J., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J.-D. 2008. Structural and funcitional changes of the duodenum in human norovirus infection. An international Journal of Gastroenterology and Hepatology, 58: 1070-1077.

VanGuilder H. D., Vrana K.R., Freeman W.M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. BioTehnikes, 44, 5: 619-626.

Zahorsky J. 1929. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. Archives of Pediatrics, 46: 391-395.

## ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem somentorju znan. sod. dr. Andreju Steyerju. S svojimi izkušnjami in znanjem me je zblížal z delom v laboratoriju in mi zelo pomagal pri nastanku diplomske naloge. Zahvaljujem se mu tudi za skrben, temeljit in zelo hiter pregled le-te. Vedno si je vzel čas za vsa moja vprašanja in težave, zato mu bom vedno hvaležen.

Zahvaljujem se tudi vodji Laboratorija za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov asist. strok. svet. dr. Mateji Poljšak-Prijatelj, da mi je omogočila opravljanje diplomskega dela v svojem laboratoriju. Prav tako bi se ji rad zahvalil za hiter in temeljit pregled diplomske naloge in vso pomoč.

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Tatjani Avšič-Županc za hiter pregled diplomske naloge in vso prijaznost, razumevanje in dobro voljo.

Hvala tudi recezantu doc. dr. Tomažu Accettu za natančen, objektiven in hiter pregled diplomske naloge.

Posebna zahvala gre tudi Ireni Šest in Marku Kolencu iz Laboratorija za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov za vso pomoč in prijetno družbo med delom v laboratoriju.

Še posebej bi se rad zahvalil Adeli, za vso strokovno pomoč in nasvete, ko sva se z Andrejem znašla v zagati.

Za pomoč in prijetno druženje na inštitutu se zahvaljujem tudi Barbari iz Laboratorija za parazitologijo.

Hvala tudi vsem prijateljem in sošolcem, ki so mi polepšali študentske dni.

Največja zahvala pa gre moji družini. Brez njih mi zagotovo ni bi uspelo! Še posebej hvala pokojni mami in očetu, brez njiju danes ne bi bil to kar sem. Hvala tudi Stanki ter Danieli za brezpogojno podporo in spodbudo ter vso pomoč.