

Det helsevitenskapelige fakultet

Hepatitt E-virus (HEV) diagnostikk: RNA ekstraksjon, revers transkripsjon og revers transkriptase PCR (RT-PCR)

Validering og optimalisering av metoder for påvisning av HEV-infeksjon

Karoline Borgen

Veileder: Christine Hanssen Rinaldo, Professor II, Institutt for klinisk medisin

Biveileder: Stian Henriksen, Spesialbioingenør, Avdeling for mikrobiologi og smittevern

MED-3950 masteroppgaven/Kull 2013 profesjonsstudiet i medisin, Tromsø, juni 2018

1 Forord

Hensikten med oppgaven var å finne, validere og optimalisere en metode for hepatitt E-virus (HEV) RNA deteksjon og kvantisering i blod som kan tas i bruk ved Avdeling for mikrobiologi og smittevern ved Universitetssykehuset Nord-Norge. Det er estimert at 20 millioner smittes av viruset årlig, og at seroprevalensen av HEV i Norge er 14 %.

Høsten 2015 tok jeg kontakt med Christine Hanssen Rinaldo da hun hadde lagt ut problemstillinger som kunne være aktuell for 5. årsoppgaver via Universitetets nettportal. Problemstillingen vedrørende HEV fanget min interesse med en gang, da den innebar mye praktisk laboratoriearbeid som jeg syntes hørtes veldig spennende ut. Da prosjektbeskrivelsen ble skrevet skulle formålet med oppgaven være å estimere seroprevalens av HEV i normalbefolkningen i Tromsø ved å analysere 2200 serumprøver fra Tromsø 7 undersøkelsen. Vi endret imidlertid problemstillingen underveis da et doktorgradsarbeid ved avdelingen skulle ta for seg bl.a. dette, og endte med etablering av en metode for HEV RNA deteksjon som mål i stedet for.

En stor takk rettes til min veileder og biveileder. Til biveileder Stian Henriksen for opplæring med utstyr og instrumenter, godt selskap på laboratoriet og for at han alltid var tilgjengelig på telefon (og rask på føttene) når undertegnede hadde problemer med utførelse av forsøk. Til veileder Christine Hanssen Rinaldo for hennes uendelige tålmodighet, gode diskusjoner og betraktelige bidrag til revisjon av manuskript. En takk går også til Irene Beate Olsøy, for spennende samtaler rundt temaet HEV.

Forsøkene ble utført på lab ved Avdelingen for mikrobiologi og smittevern fra høsten 2016 til våren 2017, med god hjelp av biveileder Stian Henriksen.

Karoline Borgen, juni 2018

Innholdsfortegnelse

1 Forord	I
2 Sammendrag	IV
3 Innledning	1
3.1 Hepatitt E.....	1
3.2 RT-PCR.....	3
3.3 Problemstilling.....	4
3.3 Begrensninger med oppgaven	4
4 Materiale og metode	5
4.1 Materiale benyttet.....	5
4.1.1 1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays	5
4.1.2 1st World Health Organization International Reference Panel for Hepatitis E Virus RNA Genotypes for Nucleic Acid Amplification Technique (NAT)-Based Assays.....	5
4.1.3 QCMD panel på HEV RNA	5
4.1.4 Standardrekker med HEV RNA fra Altona	5
4.1.5 TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix fra Applied Biosystems.....	6
4.2 Metoder	6
4.2.1 NucliSENS easyMAG RNA ekstraksjon.....	6
4.2.2 Manuell ekstraksjon med QIAamp Viral RNA mini	6
4.2.3 Kommersielt HEV RT-PCR kit.....	7
4.2.4 In-house HEV RT-PCR.....	8
5 Resultater	9
5.1 Analytisk sensitivitet med modifisert kommersiell HEV RT-PCR	9
5.2 Analytisk sensitivitet av in-house HEV RT-PCR	10
5.3 Optimalisering av in-house HEV RT-PCR	11
5.3.1 Revers transkripsjonstest.....	11
5.3.2 2-steps versus 3-steps amplifikasjon	13
5.3.3 Optimalisering av primerkonsentrasjon	14
5.3.4 Optimalisering av probe konsentrasjon	15
5.4 Relasjon mellom IU og Geq	15
5.5 Analytisk sensitivitet ved bruk av kommersiell RNA standard	16
5.6 Testing av Easy mag versus QIAamp Viral RNA Mini RNA ekstraksjon.....	18
5.7 Testing av QCMD panel	20
5.8 Testing av genotype panel	21
6 Diskusjon	23
7 Konklusjon	26
8 Referanseliste	27
Figurliste.....	29
Tabelliste	29
9 Vedlegg	30

2 Sammendrag

Bakgrunn: Hepatitt E-virus (HEV) er et lite (28-35 nm), nakent, icosahedralt virus med et enkelttrådet RNA genom med positiv polaritet, som er klassifisert i familien *Hepeviridae*. Det er estimert at 20 millioner smittes av viruset årlig, og at seroprevalensen av HEV i Norge er 14 %. Selv om tallene kan tyde på at infeksjoner med HEV er relativt vanlig også i Nord-Norge, manglet Universitetssykehuset i Nord-Norge metoder for påvisning av HEV-infeksjon.

Formål: Finne, validere og optimalisere en metode for HEV RNA deteksjon og kvantisering i blod som kan tas i bruk ved Avdeling for mikrobiologi og smittevern ved Universitetssykehuset Nord-Norge.

Metode: Oppgaven sammenligner resultater fra en kommersiell HEV RT-PCR test, RealStar HEV RT-PCR, med resultater fra en tidligere publisert og mye benyttet in-house HEV RT-PCR metode. Da den modifiserte versjonen av RealStar HEV RT-PCR ikke er validert for bruk, valideres og optimaliseres de ulike stegene i in-house RT-PCR metoden som RNA ekstraksjon, revers transkripsjon og RT-PCR.

Resultater: RealStar HEV RT-PCR kvantiterte noe høyere enn in-house PCR, uten at vi vet om det er mer korrekt. Metodene har imidlertid lik sensitivitet. Begge metoder hadde 100 % rett på QCMD panelet og detekterte alle genotypene i genotypepanelet. Den mest effektive RNA ekstraksjon får en ved manuell ekstraksjon ved bruk av QIAamp med carrier RNA, men her er input volum begrenset til 140 µl. Også for EasyMag ekstraksjon gir 140 µl den mest effektive ekstraksjon men et høyere input volum gir høyere RNA konsentrasjon. Revers transkripsjon på 30 minutter gir bedre resultat enn 5 og 15 min reaksjonstid, men som et kompromiss mellom økt sensitivitet og tidsbruk vil vi benytte 15 min. 2-stegs amplifikasjon gir bedre resultat enn 3-stegs amplifikasjon. Mastermixen bør sammensettes av 400 nM eller 900 nM forward primer og 900 nM revers primer. For å unngå forbyttinger vil vi benytte 900 nM av både forward og revers primer. Dessuten vil vi benytte 250 nM probe som ga best resultat.

Konklusjon: Da den optimaliserte in-house HEV RT-PCR metode gir 100 % score både på QCMD panel og genotypepanel, konkluderer vi med at denne metoden kan tas i bruk til HEV diagnostikk ved Avdelingen for mikrobiologi og smittevern ved Universitetssykehuset i Nord-Norge.

3 Innledning

3.1 Hepatitt E

Leverbetennelse (hepatitt) er en av de mest vanlige av de alvorlige infeksjonssykdommene og skyldes oftest infeksjon med hepatitt A-virus (HAV), hepatitt B-virus (HBV), hepatitt C-virus (HCV), cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV) eller hepatitt E-virus (HEV) (1). HEV ble først oppdaget i 1983, da en frivillig lot seg infisere av en avføringsprøve fra en person rammet av hepatitt som ikke var smittet av HAV eller HBV (2). Viruset ble beskrevet som "*waterborne or enterically transmitted non-A, non-B hepatitis*" frem til 1991, da genomet til viruset ble sekvensert og fikk navnet HEV (2-4). Til tross for dette finnes det flere holdepunkter for at sykdommen har eksistert lenge før. Et av de første beskrevne utbrudd var muligens i Tyskland i 1794, da mange utviklet hepatitt, men særlig gravide døde (5). Det er estimert at 20 millioner smittes av viruset årlig, 3 millioner får en symptomatisk HEV-infeksjon og 56 600 dør – de fleste av disse i Afrika og Asia (6). En studie fra Skottland tyder på at HEV er den vanligste årsaken til akutt hepatitt i vår del av verden, da HEV var årsak til akutt hepatitt 31 ganger oftere enn HAV og 7 ganger oftere enn HBV (1).

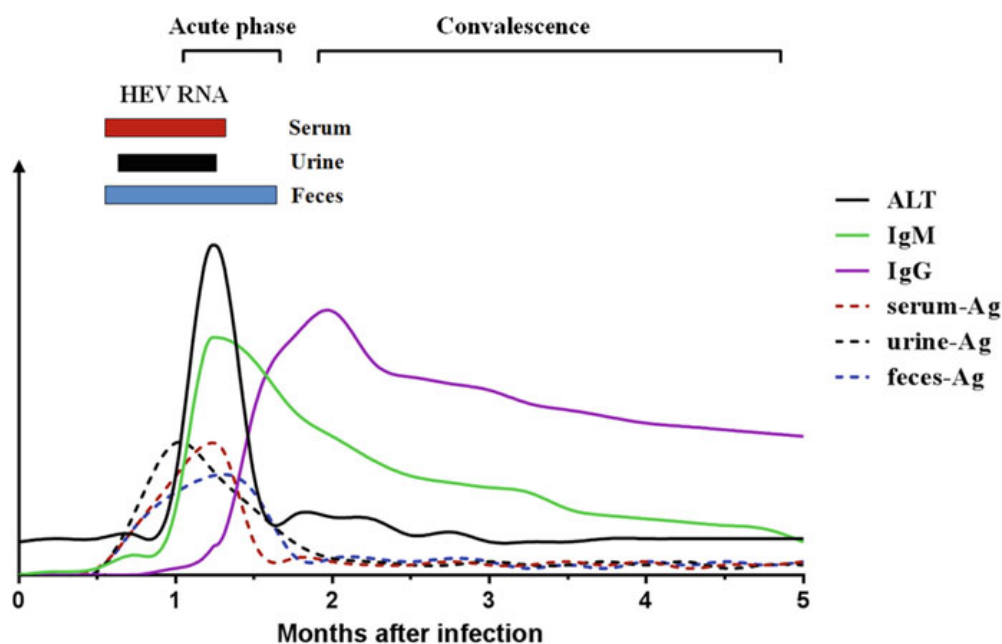
HEV er et lite (28-35 nm), nakent, icosahedralt virus med et enkelttrådet RNA genom med positiv polaritet, som er klassifisert i familien *Hepeviridae* (7). Foreløpig finnes det syv kjente genotyper som alle er av samme serotype. Genotype 1 og 2 smitter kun mennesker, da via forurenset vann og er årsak til humane epidemier som kan omfatte mer enn 30 000 personer. Genotype 3 og 4 kan isoleres både fra mennesker og dyr i utviklingsland og industriland (8). Genotype 3 fører til majoriteten av humane infeksjoner i industrialiserte land i Europa, Japan og USA, men siden 2008 har genotype 4 blitt funnet stadig oftere i pasienter og grisebesetninger i Europa (7, 9-11).

HEV genotype 1 og 2 smitter som tidligere nevnt via forurenset vann men også vertikalt, mens de andre genotypene i hovedsak smitter ved inntak av kjøtt som ikke er tilstrekkelig varmebehandlet, via direkte kontakt med smittede dyr, ved organtransplantasjon og blodoverføringer. Flere studier er utført på vertikal smitte. Khuroo et al gjorde en studie på vertikal transmisjon, hvor 8 barn født av mødre med HEV-infeksjon ble fulgt (12). Seks av ungene viste tegn på HEV-infeksjon, hvorav HEV ble påvist via PCR hos fem av disse. Det er verdt å nevne at to av barna ble født med

alvorlig hypotermi samt hypoglykemi og døde innen et døgn. I tillegg ble ett barn født med alvorlig hepatisk nekrose.

HEV vil vanligvis føre til en asymptomatisk selv-eliminerende infeksjon, men kan utvikle seg til en plutselig og kraftig hepatitt. Symptomene på akutt HEV-infeksjon er de samme som ved HAV- eller HBV-infeksjon; feber, kvalme, oppkast, gulsott, ledd- og magesmerter (13). HEV-infeksjon kan også gi kronisk leverinfeksjon med utvikling av skrumplever, nevrologiske symptomer og andre ekstrahepatiske manifestasjoner, men dette er mest vanlig hos immunsupprimerte pasienter (14).

En HEV-infeksjon diagnostiseres ved påvisning av HEV RNA i blod eller avføring eller ved påvisning av HEV antistoffer. HEV RNA vil være tilstede i serum, avføring og urin i den akutte fasen. Det vil også anti-HEV IgM antistoff som kan vare i 4-5 måneder (**Figur 1**), og anti-HEV IgG antistoffer kan være tilstede i mer enn 10 år og representerer tidligere eksponering (15). Ved diagnostikk av akutt HEV-infeksjon er deteksjon av HEV RNA spesielt viktig i tidlig fase av sykdommen før HEV antistoffer er dannet og hos immunsupprimerte pasienter som kan ha en svært forsinket utvikling av antistoffer. Diagnosen kronisk HEV-infeksjon krever undersøkelse av HEV RNA i blod og er definert som tilstedeværelse av HEV RNA i minst tre måneder (16).



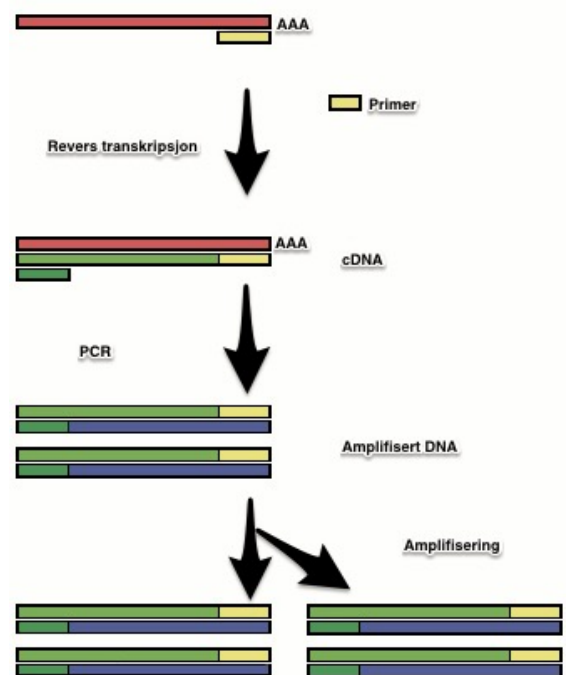
Figur 1: Dynamiske endringer i HEV markører etter infeksjon (15)

I Norge er genotype 3 endemisk, og Folkehelseinstituttet estimerer at seroprevalensen av HEV i Norge er 14 % etter en studie utført på 1400 blodgivere. I samme studie ble dessuten antistoffer funnet hos 73 % av 663 undersøkte svin (17). Studier fra ellers i Europa viser at seroprevalensen i Sveits er på 4,9 % (18) og i Tyskland 14,5 % (19). I Danmark var seroprevalensen på 12,7 % i 2011, mens en studie fra 1983 viste en forekomst på 50,3 % blant bønder (20). Noen områder i Europa har høyere seroprevalens, som Abruzzo i sentrale Italia med 49 % og vest/sentrale Polen med 50 % (16). Noen studier viser også en nedgang i seroprevalens i løpet av årene. I Nederland har seroprevalensen blant blodgivere gått ned fra 46,6 % i 1988, til 27,3 % i 2000 og til 20,9 % i 2011 (21). I 2013 var en av 600 blodgivere i Nederland viremisk for HEV (16).

Selv om tall fra Norge og resten av Europa kan tyde på at infeksjoner med HEV er relativt vanlig også i Nord-Norge, manglet Universitetssykehuset i Nord-Norge metoder for påvising av HEV-infeksjon.

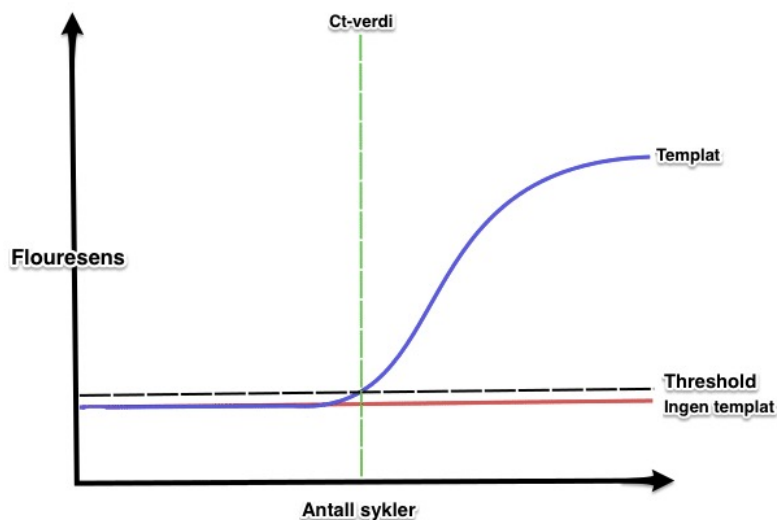
3.2 RT-PCR

Revers transkriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) er en metode for å detektere RNA. Metoden benytter først enzymet revers transkriptase (RT) for å omdanne RNA til komplementært DNA (cDNA). Ved å heve temperaturen til mellom 93 og 98°C, denaturerer cDNA slik at det splittes i to enkeltråder. Temperatur senkes og primere kan nå binde til spesifikk mål sekvens. Dobbeltrådet PCR produkt dannes ved at DNA syntetiseres fra primer. Amplifikasjonen er eksponentiell. Ved kvantitativ RT-PCR benyttes også en probe som binder til målsekvens. Ved dannelse av PCR produkt spaltes probe og avgir fluoresens. Etter hvert som mer PCR produkt dannes, vil PCR maskinen kunne lese av fluoresensen fra reaksjonene. (22).



Figur 2: Skjematisk fremstilling av RT-PCR.

For å kunne lese av et resultat settes et threshold nivå. Det vil alltid være noe fluoresens tilstede uavhengig av amplifikasjon, så nivået settes over bakgrunnsfluoriseringsen, slik at man kan skille bakgrunnsstøy fra relevante resultater. Når mengden PCR produkt blir stor nok vil fluoresensen avgitt være høyere enn bakgrunnsfluoresensen, og kurven fra templatet vil krysse det satte thresholdet. Punktet hvor kurven fra templatet krysser thresholdet kalles threshold cycle (Ct), og representerer tiden – antall syklere – det tar før nivået av PCR produkt er mulig å detektere (**Figur 2**). Jo lavere Ct-tid, jo større mengde PCR produkt og dermed også mer RNA i templatet. Ved å ta med en standardkurve kan man kvantitere templat som genomekvivalenter (Geq)/ml eller international unit (IU)/ml. Da metoden ikke er helt eksakt bør det være mer enn 0,5 log forskjell i Geq/ml eller IU/ml for å si at det er en signifikant forskjell mellom to prøver.



Figur 3: Illustrasjon av Ct-verdi

3.3 Problemstilling

Målet med oppgaven er å etablere en metode for påvisning av HEV-RNA i serum ved Avdeling for mikrobiologi og smittevern på Universitetssykehuset i Nord-Norge. Dette gjøres ved å først sammenligne to metoder, en kommersiell test og en in-house metode, og deretter validere og optimalisere ulike steg av in-house metoden som RNA ekstraksjon, revers transkripsjon og HEV RT-PCR.

3.3 Begrensninger med oppgaven

RNA er svært ustabil, og kontaminering med hud og/eller omgivelser vil kunne gi feil resultat. For kjøring med kommersielt kit var ikke en maskin som metoden var validert for tilgjengelig, det ble derfor kjørt med en modifisert metode i stedet for.

4 Materiale og metode

4.1 Materiale benyttet

4.1.1 1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays

Standarden var laget av Ferguson et al ved å ta blod fra en japansk blodgiver med HEV-infeksjon (genotype 3a) og fortynne det i humant plasma uten HEV RNA (23). Plasmaet ble fordelt i rør med volum på 5 ml og ble frysetørket. Vi løste røret i 0.5 ml sterilt nukleasefritt dH₂O. Reagenset inneholdt da 250 000 internasjonale units (IU)/ml, det vil si 250 IU/μl. Vi fordelte innholdet på 5 rør og frøys ned rørene på -80°C inntil bruk.

4.1.2 1st World Health Organization International Reference Panel for Hepatitis E Virus RNA Genotypes for Nucleic Acid Amplification Technique (NAT)-Based Assays

Panelet inneholdt stammer fra alle de 4 vanligste genotypene som infiserer mennesker. Det var totalt 11 stammer; 1a (2 stammer), 1e, 2a, 3b, 3c, 3e, 3f, 4c, 4g pluss et humant isolat som minner om kanin HEV. Stammene kom fra blod- og/eller plasmadonasjoner og kliniske prøver, som vil si enten plasma eller avføring. Prøvene har en oppgitt mengde HEV RNA (log₁₀ IU/ml), og panelet har kodennummer 8578/13.

4.1.3 QCMD panel på HEV RNA

Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) er en uavhengig internasjonal ekstern kvalitetmålingsorganisasjon. De tilbyr paneler med ulike virus og bakterier som hjelper laboratorier med å opprettholde og forbedre kvaliteten på sine deteksjonsmetoder (24). Vi kunne kjøpe inn et panel fra 2015 med 8 prøver som inneholdt 0.6 ml plasma med eller uten HEV RNA.

4.1.4 Standardrekker med HEV RNA fra Altona

Ferdige standardrekker med 4 ulike fortynninger av HEV RNA (10⁴, 10³, 10² og 10¹ IU/μl) laget ved in vitro transkripsjon og kalibrert mot den internasjonale standarden. Ved å benytte denne standardrekken kan man kvantitere HEV RNA. Produktkoden er ALTONA-27100-ST.

4.1.5 TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix fra Applied Biosystems.

Ved RT-PCR benyttes en mastermiks. Taqman Fast Virus 1-Step Master Mix fra Applied Biosystems inneholder AmpliTaq® Fast DNA Polymerase, Thermostable MMLV enzyme, dNTPs inkludert dATP, dGTP, dCTP, og dTTP, RNaseOUT™ Recombiant Ribonuclease hemmer, ROX™ dye (passive reference) og buffer komponenter optimalisert for maksimal sensitivitet og toleranse for mange vanlige RT-PCR hemmere.

For å lage mastermiks ble 900 nM forward primer (JVHEVF; 5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'), 900 nM revers primer (JVHEVR; 5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3') og 250 nM probe (JVHEP; 5'-TGATTCTCACCTTCGC-3') benyttet sammen med TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix.

4.2 Metoder

4.2.1 NucliSENS easyMAG RNA ekstraksjon

NucliSENS easyMAG er et automatisert system for total nukleinsyre ekstraksjon fra ulike prøver og volum. Prøvene ble ført i maskinen og tilsatt en lyseringsløsning. Det ble alltid tatt med en negativ kontroll under ekstraksjon. Deretter ble prøvene tilsatt magnetiske silica-kuler som band opp nukleinsyrer. Kulene ble vasket og RNA eluert ut i et ønsket volum elueringsbuffer. Det ferdige ekstraherte RNA-et ble pipettert manuelt til PCR-brønner.

4.2.2 Manuell ekstraksjon med QIAamp Viral RNA mini

QIAamp Viral RNA mini kit inneholdt QIAamp Mini Spin Columns, 2ml Collection Tubes, Buffer AVL, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AVE og Carrier RNA (poly A). I tillegg trengs etanol (96-100 %), 1.5 ml mikrosentrifugerør, mikrosentrifuge og sterie, RNasefrie pipettespisser. Pipettespisser byttes mellom hvert steg, og hansker brukes gjennom hele prosedyren.

Først forbereder man reagentene. 310 µl Buffer AVE tilsettes røret som inneholder 310 µg frysetørret carrier RNA for å oppnå en løsning med 1 µg/ µl. For hver prøve trengte man 0.56 ml Buffer AVL og 5.6 µl carrier RNA-AVE. Buffer AW1 og AW2 kommer i kittet som et konsentrat. Buffer AW1 tilsettes 25 ml etanol per 19 ml AW1 konsentrat. Buffer AW 2 tilsettes 30 ml etanol per 13 ml AW2 konsentrat.

Prosedyre:

1. 560 µl av Buffer AVL som inneholdt carrier RNA ble pipettert til en 1.5 ml mikrosentrifugerør.
2. 140 µl prøvemateriale ble tilsatt Buffer AVL-carrier RNA i mikrosentrifugerøret, og ble videre blandet ved å puls-vortekse røret i 15 sekunder.
3. Materialet ble inkubert i romtemperatur i 10 minutter ble så kjapt sentrifugert.
4. 560 µl etanol ble tilsatt prøven, og igjen puls-vortekset vi den i 15 sekunder før den kjapt ble spunnet ned.
5. 630 µl av løsningen fra forrige steg ble pipettert til en QIAamp Mini column som igjen ble plassert i et samlingsrør. Lokket lukkes, og prøven ble sentrifugert på 8000 rpm i 1 minutt.
6. Samlingsrøret ble byttet etter steg 5, og deretter gjentok vi steg 5.
7. Samlingsrør ble byttet. QIAamp Mini column ble åpnet, og 500 µl av Buffer AW1 ble tilsatt. Prøven ble sentrifugert på 8000 rpm i 1 minutt.
8. Samlingsrør ble byttet. QIAamp Mini column ble åpnet, og 500 µl av Buffer AW2 ble tilsatt. Prøven ble sentrifugert på 14 000 rpm i 3 minutter.
9. QIAamp Mini column ble plassert i et rent 1.5 ml mikrosentrifugerør. 60 QIAamp Mini column ble åpnet, og 500 µl av Buffer AW1 ble tilsatt. Prøven ble sentrifugert på 8000 rpm i 1 minutt. Buffer AVE ble tilsatt, prøven ble inkubert i romtemperatur i 1 minutt og så sentrifugert på 8000 rpm i 1 minutt. Mikrosentrifugerøret inneholdt nå det ekstraherte RNAet.

4.2.3 Kommersielt HEV RT-PCR kit

RealStar HEV RT-PCR kit 2.0 fra Altona Diagnostics er en nukleinsyreamplifikasjonstest for deteksjon og kvantitering av HEV RNA. Start-materiale er ekstrahert RNA, vanligvis fra plasma, avføring eller spinalvæske. Testen skal i første omgang utføres på RNA ekstrahert fra plasma. Testen er basert på real-time RT-PCR teknologi. Proben er merket med fluroforen FAM. Metoden inkluderer en internkontroll for å identifisere mulig hemming ved RT-PCR og for å sjekke at komponenter i kittet fungerer. Proben for intern kontroll (IC) er merket med fluroforen JOE. Dette muliggjør parallell deteksjon av HEV spesifikt RNA og internkontroll. Metoden har en egen positiv og negativ kontroll. Metoden er utviklet og validert ved bruk av ulike real-time PCR maskiner inkludert *ABI Prism 7500 SDS* fra Applied Biosystems, og utføres i et reaksjonsvolum på 50 µl.

Da Avdeling for mikrobiologi og smittevern ved Universitetssykehuset Nord-Norge ikke har PCR maskin som metoden er validert for eller annen PCR maskin som benytter et reaksjonsvolum på 50 µl, ble reaksjonsvolum skalert ned 50 % for å kunne benytte metoden med PCR maskinen Applied biosystems fast 7500. Metoden ble derfor kjørt i en modifisert form. For å kunne kvantitere RNA ble HEV RNA standardrekke fra Altona benyttet. Mastermiks ble laget som vist i **Tabell 1** og 12.5 µl tilsatt til hver brønn. Deretter ble 12.5 µl RNA fra hver prøve tilsatt slik at totalt reaksjonsvolum var 25 µl. Det ble alltid benyttet minst en positiv og en negativ kontroll. PCR ble kjørt som beskrevet i **Tabell 2**.

Antall reaksjoner	1	12
Master A	2,27 µl	27 µl
Master B	9,09 µl	109 µl
Intern kontroll	1,14 µl	14 µl
Sum	12,5 µl	250 µl

Tabell 1: Mastermiks fra Altona RealStar kit med modifisere volum

Steg	Stadium	Antall sykler	Temperatur	Tid
Transkripsjon	1	1	50°C	5 minutt
RT inaktivering/initiell denaturering	2	1	95°C	20 sekund
Amplifikasjon	3	45	95°C	3 sekund
			60°C	30 sekund

Tabell 2: Standard oppsett for HEV-RT PCR-kjøring

4.2.4 In-house HEV RT-PCR

Metoden baserer seg på en allerede utviklet in-house RT-PCR fra Jothikumar et al 2006 (25). Garson et al modifiserte metoden i 2012, ved å gjøre en endring på sammensetningen av proben (26). Prinsippet er det samme som beskrevet for kommersiell HEV RT-PCR bortsett fra at internkontroll mangler og at vi benyttet et reaksjonsvolum på 30 µl. Mastermiks ble laget som beskrevet i **Tabell 3** og 15 µl ble pipettert til hver brønn. Deretter ble 15 µl RNA tilsatt. Ferdig RNA standardrekke fra RealStar (ALTONA-27100-ST) ble tatt med for å kunne kvantitere RNA i prøvene.

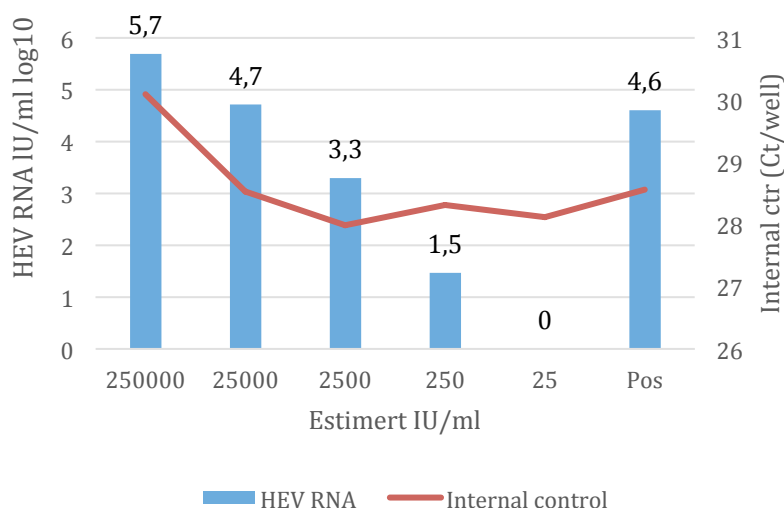
Antall reaksjoner	1	12
TaqMan Fast Virus 1-Step Mmix	7,5 µl	90 µl
Forward primer	0,27 µl	3,24 µl
Revers primer	0,27 µl	3,24 µl
Probe	1,5 µl	18 µl
dH2O	5,46 µl	65,52 µl
Sum	15 µl	180 ul

Tabell 3: Mastermiks for in-house PCR

5 Resultater

5.1 Analytisk sensitivitet med modifisert kommersiell HEV RT-PCR

I følge pakningsvedlegget til RealStar HEV RT-PCR har metoden en analytisk sensitivitet på 0.31 IU/µl (**Vedlegg 1**). Den analytiske sensitiviteten eller deteksjonsgrense defineres som den konsentrasjon av HEV spesifikt RNA som gir en positiv rate på 95%. For å teste analytisk sensitivitet til modifisert Realstar HEV RT-PCR i vår lab benyttet vi WHO HEV standard som templat. Da vi ikke vet hvor mye RNA som tapes under RNA ekstraksjon, antar vi at vi ikke mister noe RNA under ekstraheringen. Det lages en 10-folds seriefortynning som ender opp med prøver som antas å inneholde 25 000, 2500, 250 og 25 IU/ml. Dessuten tar vi med en ufortynnet prøve som antas å inneholde 250 000 IU/ml.



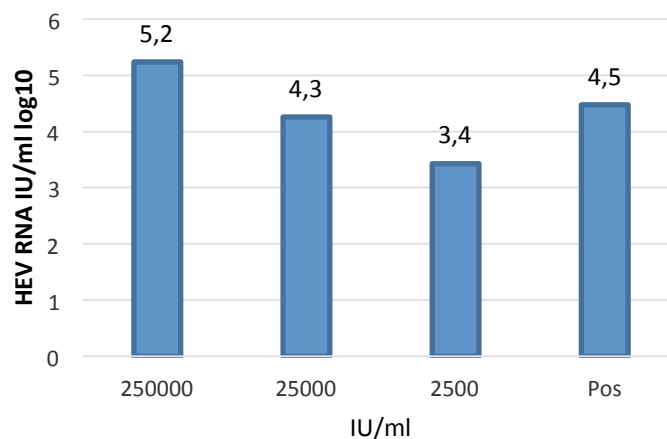
Figur 4: Test av deteksjonsgrense for kommersielt kit.

Verdiene på X-aksen er teoretisk og basert på 0 % tap ved ekstraksjon (**Figur 4**). Resultatene viser at metoden detekterer fra 250 000 IU/ml til 250 IU/ml, men ikke 25 IU/ml. Det er omtrent en log differanse mellom de tre høyeste konsentrasjonene av seriefortynnet HEV RNA standard, noe som viser at metoden gir et tilsynelatende lineært resultat for høye HEV RNA konsentrasjoner.

Vi konkluderer med at metoden fortsatt gir et lineært resultat og har god sensitivitet selv når den brukes med halverte volum. Hvis vi forutsetter at vi ikke har mistet RNA ved RNA ekstraksjon, er sensitiviteten lavere enn angitt i pakningsvedlegget. Sannsynligvis har vi imidlertid mistet RNA og kan ikke sammenlikne disse resultatene.

5.2 Analytisk sensitivitet av in-house HEV RT-PCR

Da vi kun har mulighet til å kjøre en modifisert form av kommersielt HEV RT-PCR kit, bestemmer vi oss for å teste en in-house metode fra Jothikumar et al 2006 som var modifisert av Garson et al i 2012 (25, 26). Dette er en mye brukt metode som vil være en mye rimeligere løsning enn et kommersielt kit. Metoden mangler imidlertid internkontroll. Som for testing med kommersiell HEV RT-PCR benyttet vi en selvlaget standardrekke av WHO HEV standard som antas å inneholde 250 000, 25 000, 2500 IU/ml. Denne gang var imidlertid ikke 250 og 25 IU/ml med.



Figur 5: In-house PCR 15 µl RNA + 15 µl mastermiks.

Metoden viser seg å gi et tilnærmet lineært resultat, med en reduksjon i 0.9 log for hver fortytning (**Figur 5**). Sammenliknet med kommersiell HEV RT-PCR, viser in-house metoden seg å kvantitere litt lavere på 250 000 og 25 000 IU/ml; 5.2 log versus 5.7 log og 4,3 log versus 4,7 log. Metoden kvantiterer marginalt høyere på 2500; 3.4 log versus 3.3 log.

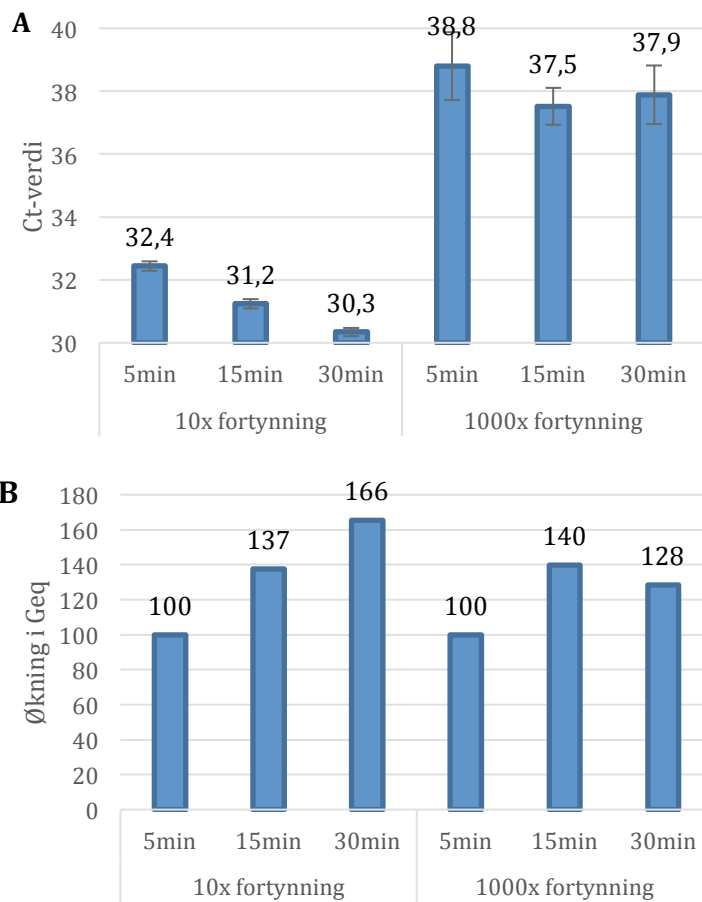
Vi konkluderer med at in-house RT-PCR metoden gir et lineært resultat og har god sensitivitet, men da vi manglet de to laveste konsentrasjonene av HEV standard kan vi ikke sammenligne sensitivitet med kommersiell HEV RT-PCR.

5.3 Optimalisering av in-house HEV RT-PCR

I samråd med leger og andre på FOU ble det enighet om å satse på en in-house RT-PCR, da sykehuset mangler real-time maskin for å kjøre kommersiell HEV RT-PCR etter validert protokoll. Det tas utgangspunkt i in-house PCR allerede utviklet av Garson et al, modifisert fra Jothikumar et al (25, 26). Det ønskes å optimalisere metoden for å oppnå best mulig sensitivitet.

5.3.1 Revers transkripsjonstest

Ved HEV RT-PCR er revers transkripsjon det første trinnet i amplifiseringen. For kommersiell HEV RT-PCR er dette trinnet 10 minutter ved 50°C. Både Jothikumar et al og Garson et al brukte 30 minutter ved 50°C for revers transkripsjon (25, 26). Leverandør av mastermiks anbefaler et program med revers transkripsjon i 5 minutter ved 50°C. For å undersøke om det å øke tiden ville øke sensitiviteten til metoden ble 5, 15 og 30 minutter revers transkripsjonstid testet. Som templat ble det benyttet WHO RNA som var 10x fortynt og 1000x fortynt og dermed hadde en estimert konsentrasjon på 25 000 og 250 IU/ml.



Figur 6: Resultat fra revers

transkripsjonstest. To ulike fremstillinger av resultatet fra testen. Hver betingelse ble kjørt i tre brønner. For å kunne kjøre alle reaksjonene på samme kjøring i et real-time PCR instrument, ble revers transkripsjons-trinnet utført i en standard PCR maskin.

(A) Ct-tid: På y-aksen vises Ct-tiden. Verdien viser hvor mange sykler det tok i gjennomsnitt før threshold nivå ble nådd.

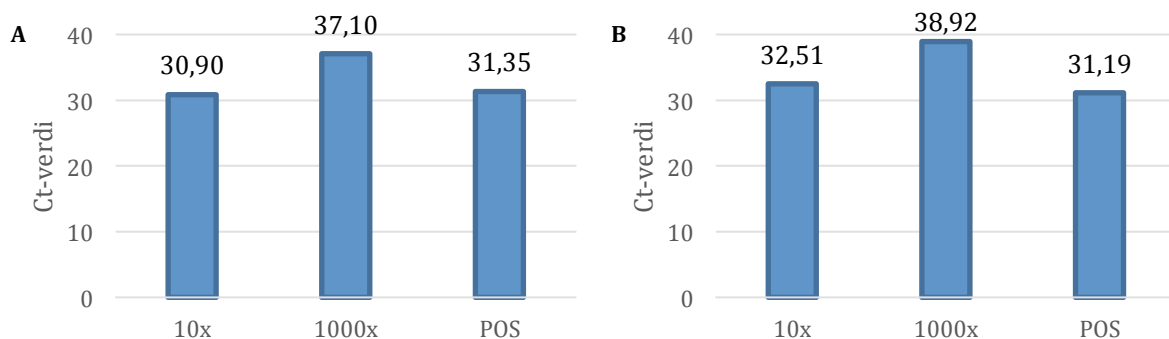
(B) Økning i Geq: På y-aksen vises økningen i antall genomekvivalenter. Verdien viser den gjennomsnittlige økningen i Geq ved de forskjellige betingelsene.

Resultatene viser at Ct-verdien minker med økende tid for revers transkripsjon (**Figur 6A**). Fra 5 til 15 min går Ct-verdien ned 1,2 og 1,3 avhengig av RNA mengde. For lav konsentrasjon er 15 og 30 minutt relativt likt; 0,4 Ct i forskjell. For høy konsentrasjon går Ct-verdien ned 0,9 fra 15 til 30 minutt. Effekten er mer tydelig hvis vi ser på økningen vi får i Geq (**Figur 6B**).

Vi konkluderer at lengre tid ved revers transkripsjon øker sensitiviteten ved høye konsentrasjoner, men vi har kun testet til og med 30 minutter. For lav RNA konsentrasjon er det lite forskjell men 15 minutter gir best resultat. Som et kompromiss mellom å spare tid og øke sensitivitet vil vi heretter benytte 15 minutt for revers transkripsjon.

5.3.2 2-steps versus 3-steps amplifikasjon

PCR sykling kan gjøres som en 2-steps eller en 3-steps amplifikasjon. I Garson et al brukes en 2-steps amplifikasjon, det vil si at temperaturen er lik for primer/probe annealing og elongering av PCR produkt (60°C), men øker for denaturering (95°C). I Jothikumar et al brukes en 3-steps amplifikasjon med litt lavere temperatur til annealing (50°C) enn for elongering (60°C) og denaturering (95°C). Leverandør av mastermiks anbefaler en 2-steps amplifisering. Det er ønskelig å undersøke om det å gjøre en 3-steps amplifikasjon med en lavere annealing temperatur vil øke sensitivitet. Det legges derfor til et steg i PCR-programmet med 10 sekund på 50°C for 3-steps annealing.



Figur 7: Amplifikasjon. Y-aksen viser Ct-verdi, verdiene er gjennomsnittet fra 3 brønner. X-aksen viser de to fortyningene samt den positive kontrollen som var med.

(A) 2-steps amplifikasjon.

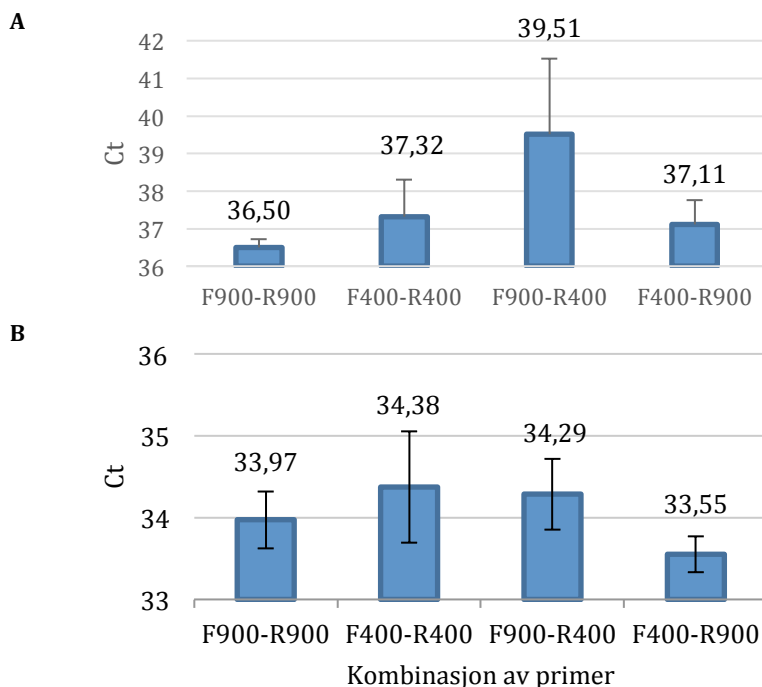
(B) 3-steps amplifikasjon.

Resultatene viser at 2-steps amplifikasjon gir litt lavere Ct-verdi enn 3-steps amplifikasjon; 1,6 i Ct-verdi for 10x fortyning og 1,8 for 1000x fortyning (**Figur 7**). De positive kontrollene har tilnærmet lik Ct-verdi for begge betingelsene.

Vi konkluderer at 2-steps amplifisering gir best resultat og vil fortsette med det.

5.3.3 Optimalisering av primerkonsentrasjon

I Garson et al 2012 benyttes 400 nM av forward og revers primer. Leverandøren av mastermiks som benyttes foreslår å undersøke to konsentrasjoner av primere. Etter deres anbefaling sammenlignes RT-qPCR med kombinasjoner av 400 nM og 900 nM av forward (F) og revers (R) primere. Primere ble testet som F400-R400 nM, F900-R400 nM, F900-R900 nM og F400-R900 nM, med bruk av 250 nM probe som tidligere. For hvert par tas det med 2 negative kontroller som kvalitetskontroll. Som templat brukes RNA fra WHO standard som er 1000x fortynnet, det vil si som har en estimert konsentrasjon på 250 IU/ml.



Figur 8:

Primerkonsentrasjon.

Hvert primerpar kjøres i 4 brønner. Y-aksen viser Ct-verdi, mens X-aksen er de forskjellige kombinasjonene av primere.

(A) Resultat fra første forsøk.

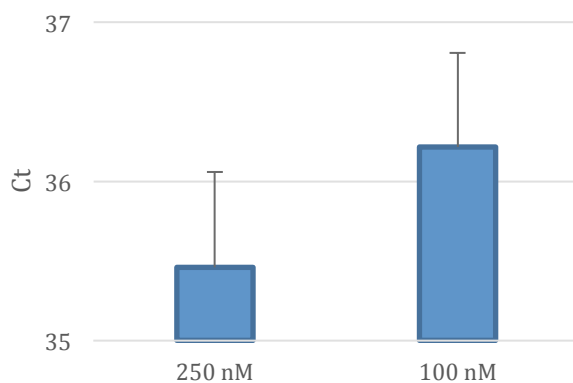
(B) Resultat fra andre forsøk.

Resultatene fra første forsøk viste at det er mindre enn en Ct i forskjell mellom de ulike primerkonsentrasjonene med unntak av F900-R400, der det er et stort standardavvik (**Figur 8A**). Kombinasjonen F900-R900 ga best resultat, tett fulgt av F400-R900 og deretter F400-R400. Forsøket ble gjentatt, men denne gang med RNA fra WHO standard som var 100x fortynnet, altså med en estimert konsentrasjon på 2500 IU/ml. Det var også her lite forskjell i resultater, maksimalt 0.76 Ct (**Figur 8B**). Denne gangen kom F400-R900 marginalt bedre ut enn F900-R900.

Vi konkluderer med at mastermiksen bør sammensettes av forward primer med 400 eller 900 nM og revers primer med 900 nM. Vi bestemte oss for å heretter benytte kombinasjonen F900-R900.

5.3.4 Optimalisering av probe konsentrasjon

I Garson et al 2012 benyttes 200 nM probe. Leverandør av mastermiks foreslår å undersøke to konsentrasjoner av probe; 100 nM og 250 nM probe. Som templat benyttes RNA fra WHO standard 1000x fortynnet.



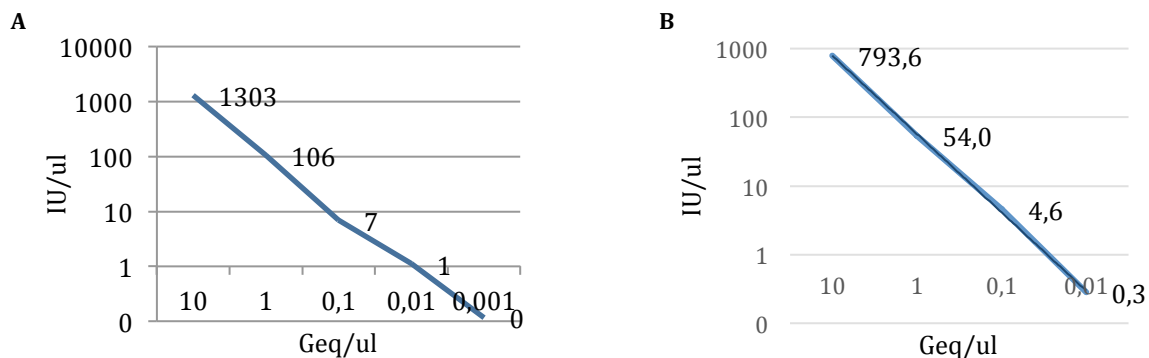
Figur 9: Optimalisering av probekonsentrasjon. Betingelsene ble kjørt i 4 brønner hver. Resultatet viser den gjennomsnittlige Ct-verdien fra kjøringen.

Resultatene viste at 250 nM ga 0.75 Ct bedre resultat enn 100 nM probe (**Figur 9**).

Vi konkluderer med at 250 nM probe gir best sensitivitet av de to konsentrasjonene forsøket er gjort med.

5.4 Relasjon mellom IU og Geq

For diagnostikk av HEV gis resultatet ut som IU/ml. For å få en bedre forståelse på hva dette betyr, skal en se på relasjonen mellom IU og Geq. Som templat brukes et plasmid med HEV cDNA i 3 fortynninger (10^5 Geq/ μ l, 10^4 Geq/ μ l og 10^3 Geq/ μ l). Som tidligere brukes RNA standarder for referanse i form av standardkurve.



Figur 10: Relasjon mellom IU og Geq. Grafene viser relasjonen mellom international units (IU) og genomekvivalenter (Geq), og er fremstilt med logaritmisk Y-akse. Plasmidene ble kjørt i dublett, grafene viser den gjennomsnittlige verdien av kjøringene.
(A) Resultat fra 1. forsøk. (B) Resultat fra 2. forsøk.

Resultatene viser at 10 gangers reduksjon av Geq/ μ l gir en omtrentlig 10 gangers reduksjon i IU/Geq (**Figur 10A**). Gjennomsnittlig var det 104 IU/Geq. Forsøket ble gjentatt, og trenden er lik som i første forsøk der 10 ganges reduksjon av Geq/ μ l gir en omtrentlig 10 gangers reduksjon i IU/Geq (**Figur 10B**). Gjennomsnittlig var det nå 52 IU/Geq.

Vi konkluderer med at relasjon mellom Geq/ μ l og IU/ml varierer litt fra fortytning til fortytning og fra kjøring til kjøring, men ser ut til å være ca. 52 – 104 IU/Geq.

5.5 Analytisk sensitivitet ved bruk av kommersiell RNA standard

For å finne sensitivitet av RT-PCR reaksjon uavhengig av RNA ekstraksjon, benyttes RNA standard fra Altona (10 000 IU/ μ l) som templat. Først blandes 10 μ l av standarden med 990 μ l nukleasefritt vann. Dette gir en 100 x fortytning (100 IU/ μ l). 10 μ l fra dette røret blandes så med 990 μ l nukleasefritt vann (10 000 x fortytnet = 1 IU/ μ l = 1000 IU/ml). Dette røret brukes som utgangspunkt for å lage 2-folds fortyttingsrekker. 200 μ l fortytnet standard blandes med 200 μ l nukleasefritt vann, tas så ut 200 μ l som blandes med 200 μ l nukleasefritt vann etc. En ender opp med rør med 1000, 500, 250, 125, 62.5 og 31.25 IU/ml. Hver konsentrasjon kjøres i 5 brønner. Det tas også med en negativ kontroll som kjøres i 2 brønner.

Forsøket viser at metoden er svært sensitiv (**Tabell 4**). HEV RNA med konsentrasjon ned til og med 0.03125 IU/ μ l detekteres. Dette var den laveste konsentrasjonen som ble testet. Forsøket ble derfor gjentatt med en lengre fortynningsrekke for å finne grensen for deteksjon (**Tabell 5**).

Input konsentrasjon [IU/ μ l]	Antall replikater	Antall positive	Hit rate [%]
1,0	5	5	100
0,5	5	5	100
0,25	5	3	60
0,125	5	1	20
0,0625	5	4	80
0,03125	5	2	40

Tabell 4: Hit rate ved optimaliserte betingelser. Hit rate er regnet ut ved å dele antall positive prøver på antall replikater.

Input konsentrasjon [IU/ μ l]	Antall replikater	Antall positive	Hit rate [%]
1,0	9	9	100
0,5	10	7	70
0,25	10	5	50
0,125	10	4	40
0,0625	10	4	40
0,03125	10	0	0
0,0156	10	0	0
0,0078	10	0	0

Tabell 5: Hit rate ved optimaliserte betingelser fra 2. Forsøk

Input konsentrasjon [IU/ μ l]	Antall replikater	Antall positive	Hit rate [%]	Hit rate fra RealStar HEV RT-PCR pakningsinnlegg [%]
1,0	14	14	100	100
0,5	15	12	80	
0,25	15	10	67	
0,125	15	5	33	
0,0625	15	8	53	
0,03125	15	2	13	5,8 (0,0316 IU/ μ l)
0,0156	15	0	0	0
0,0078	15	0	0	0

Tabell 6: Sammenlagte resultat fra testing av sensitivitet og sammenlikning med RealStar HEV RT-PCR

Resultatene viser at den optimaliserte in-house PCR-en kan detektere ned til og med 0,03125 IU/ μ l, dog er hit raten bare 13 % ved denne konsentrasjonen. Vi konkluderer med at in-house PCR og RealStar HEV RT-PCR kit har en sensitivitet som kan sammenliknes (**Tabell 6**).

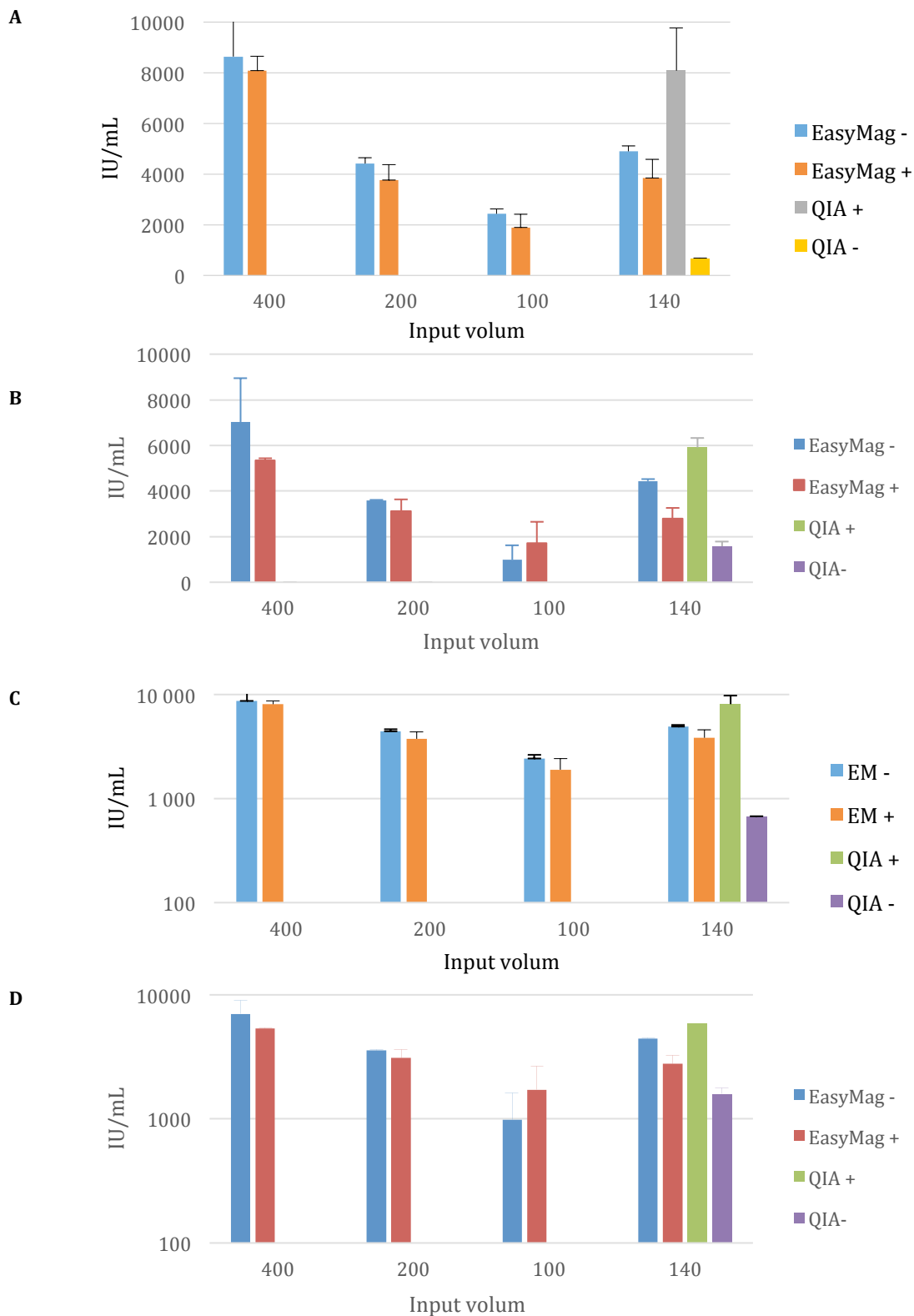
5.6 Testing av Easy mag versus QIAamp Viral RNA Mini RNA ekstraksjon

Forskjellige metoder brukes for ekstraksjon av RNA. Mens noen benytter automatisert ekstraksjon, benytter andre manuelle metoder. Vi ønsket å sammenligne ekstraksjon med automatisert EasyMag i forhold til manuell QIAamp med spiking. Til ekstraksjon benyttet vi WHO RNA standard med fortynnet til antatt konsentrasjon 2500 IU/ml. Til spiking benyttes carrier RNA som følger med kit fra Qiagen. For ekstraksjon på EasyMag brukes fire forskjellige inn-volum; 400, 200, 140 og 100 μ l. Ut-volum i EasyMag settes til 100 μ l. QIAamp har kun inn-volum på 140 μ l. Forsøket ble gjort to ganger.

Resultatene viser en lineær sammenheng mellom hva som puttes i ekstraksjon og hva som kommer ut, med unntak av 140 μ l som gir høyere resultat enn 200 μ l (**Figur 11A**). Dette kan tyde på at 140 μ l er det mest optimale inn-volumet til ekstraksjon da man får den mest effektive konsentrasjonen, men et høyere input volum gir høyere RNA konsentrasjon. Resultatene viser ellers at ekstraksjon med EasyMag ikke påvirkes positivt ved tilsetting av carrier RNA.

Forsøket ble gjentatt – denne gangen kom EasyMag ekstraksjon med spiking for 100 μ l litt høyere ut enn ekstraksjon av samme volum uten spiking, men for de andre volumene hadde spiking ingen positiv effekt (**Figur 11B**). Ekstraksjon med et inn-volum på 140 μ l gav også her høyere resultat enn et inn-volum på 200 μ l. Resultatene er også gitt med logaritmisk skala på Y-aksen (**Figur 11C og 11D**), hvor vi ser at forskjellen mellom noen av ekstraksjonsvolumene er mindre enn 0.5 log, og dermed ikke er signifikant.

Vi konkluderer med at ekstraksjon med QIAamp med spiking fungerer litt bedre enn EasyMag når volumet er 140 μ l. QIAamp er imidlertid mye mer arbeidskrevende enn EasyMag ekstraksjon, og EasyMag vil bli brukt videre. Bruk av carrier RNA er kun nødvendig ved ekstraksjon med QIAamp. Ekstraksjon med et inn-volum på 140 μ l er tilsynelatende det mest optimale volumet av de volum som har blitt testet men en inn-volum på 400 μ l gir ut mest RNA.



Figur 11: Automatisert ekstraksjon versus manuell ekstraksjon. Automatisert ekstraksjon ble utført med EasyMag. Manuell ekstraksjon ble utført med QIAamp.

(A) Resultat fra første forsøk. (B) Resultat fra andre forsøk. (C) Resultat fra første forsøk gitt med logaritmisk Y-akse. (D) Resultat fra andre forsøk gitt med logaritmisk Y-akse.

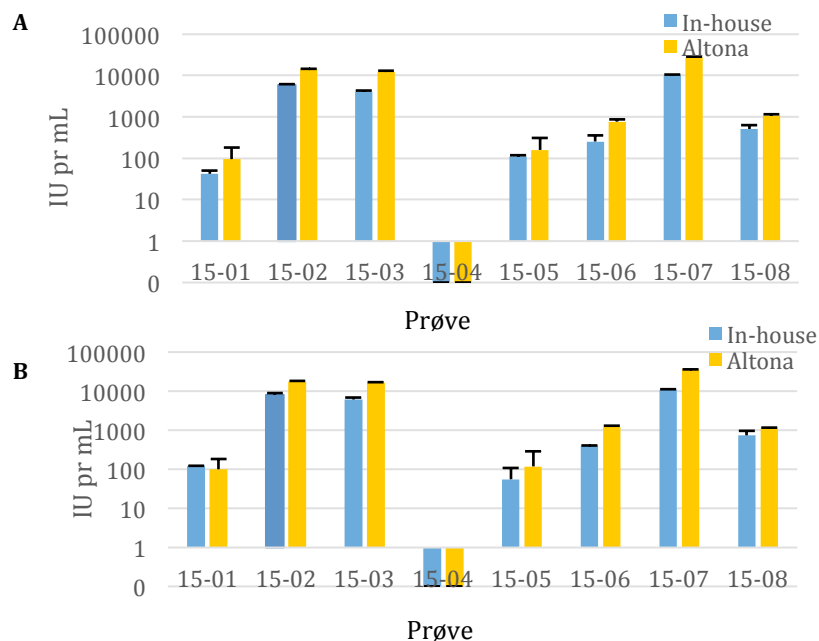
5.7 Testing av QCMD panel

Prøvene fra QCMD panel (**Tabell 7**) ble ekstraheret på EasyMag. Det brukes to forskjellige inn-volum, 200 og 400 µl, men ut-volum er 100 µl. Prøvene kjøres med in-house PCR og modifisert RealStar HEV RT-PCR.

Sample code	Sample Content	Sample Matrix	Detection Frequency	Sample Status	Resultat Altona kit	Resultat modifisert Garson
HEVRNA15-01	HEV Type gg3c	Plasma	Detected	EDUCATIONAL	+	+
HEVRNA15-02	HEV Type gg3f	Plasma	Frequently Detected	CORE	+	+
HEVRNA15-03	HEV Type gg3c	Plasma	Frequently Detected	CORE	+	+
HEVRNA15-04	HEV Negative	Plasma	Negative	CORE	-	-
HEVRNA15-05	HEV Type gg3f	Plasma	Detected	EDUCATIONAL	+	+
HEVRNA15-06	HEV Type gg3c	Plasma	Detected	EDUCATIONAL	+	+
HEVRNA15-07	HEV Type gg3c	Plasma	Frequently Detected	CORE	+	+
HEVRNA15-08	HEV Type gg3f	Plasma	Detected	CORE	+	+

Tabell 7: Detaljer om QCMD panel samt resultater fra kit og in-house PCR

Resultatet viste at panelet inneholdt 7 prøver positive for HEV RNA, og en prøve som var negativ for HEV RNA. Både modifisert RealStar RT-PCR og in-house PCR fikk rett resultat på alle prøvene, uavhengig av om in volum var 200 eller 400 µl. Vi konkluderer med at begge metoder har lik deteksjonsrate på QCMD panel. Metodene kvantiterte relativt likt, men resultater fra RealStar HEV RT-PCR lå litt høyere enn fra in-house PCR (**Figur 12**).



Figur 12: Kvantitering av panel fra QCMD

IU/ml detektert fra QCMD-panelet. Y-aksen er gitt i logaritmisk skala.

(A) Inn-volum på 400 µl.
(B) Inn-volum på 200 µl

5.8 Testing av genotype panel

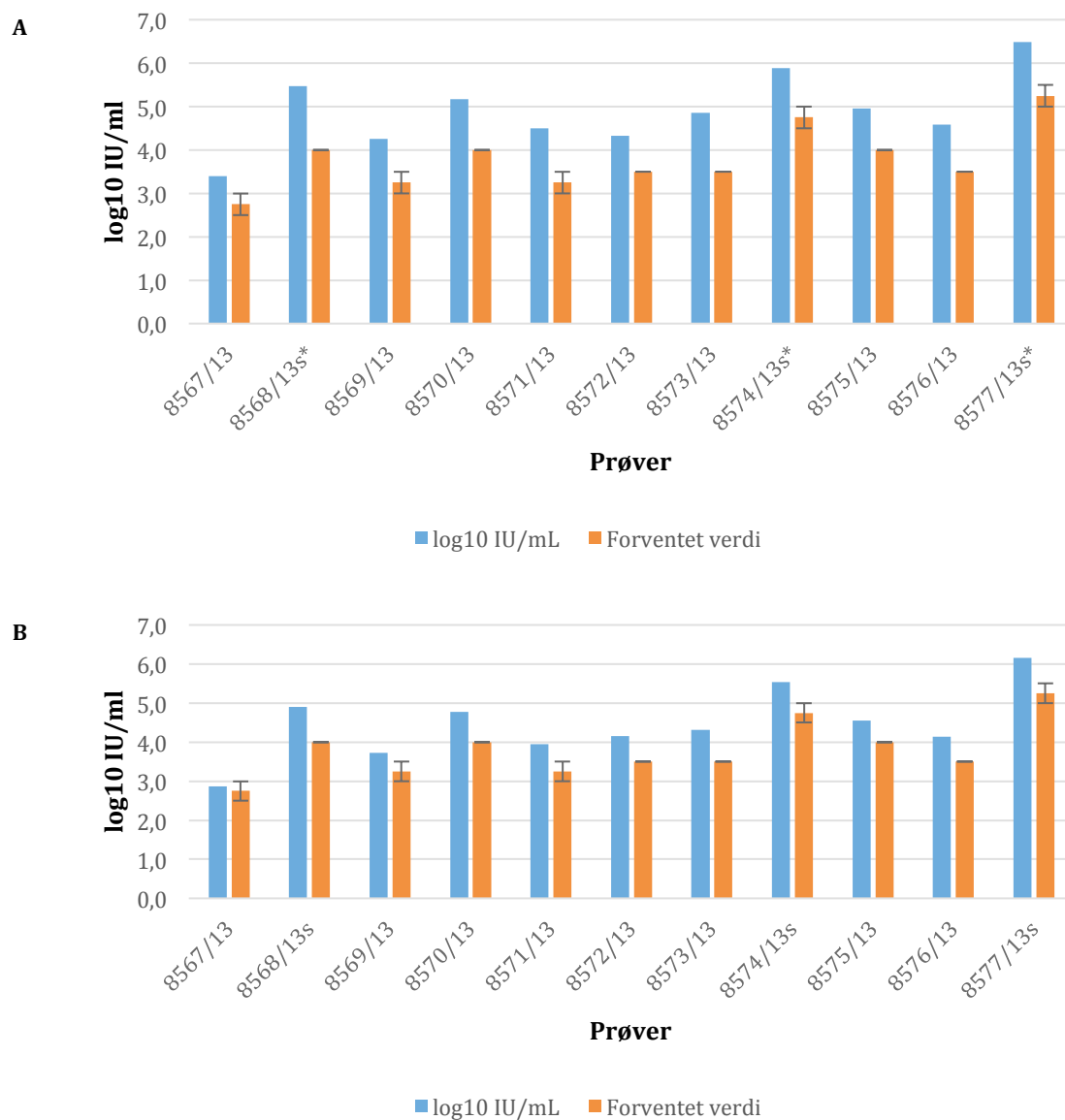
Prøvene fra genotypepanelet (**Tabell 8**) ble ekstrahert på EasyMag. Det brukes innvolum 400 µl og 100 µl, utvolum var 100 µl. Prøvene ble kjørt med både in-house PCR og modifisert RealStar HEV RT-PCR for å se at begge metoder kan detektere de forskjellige genotypene.

Code	Genotype	Origin	Sample type	Anti-HEV IgM/IgG	Nominal concentration (log ₁₀ IU/ml)	Resultat kommersielt kit	Resultat in-house PCR
8567/13	1a	India	Plasma	n.d.	≈ 2.5 - 3.0	+	+
8568/13s	1a	India	Stool	n.a.	≈ 4.0	+	+
8569/13	1e	Sudan	Plasma	+/-	≈ 3.0 - 3.5	+	+
8570/13*	3b	Japan	Plasma	-/-	≈ 4.0	+	+
8571/13*	3c	Sweden	Plasma	-/-	≈ 3.0 - 3.5	+	+
8572/13*	3e	Germany	Plasma	-/-	≈ 3.5	+	+
8573/13*	3f	Sweden	Plasma	-/-	≈ 3.5	+	+
8574/13s	3 (rabbit)	France	Stool	n.a.	≈ 4.5 - 5.0	+	+
8575/13*	4c	Japan	Plasma	-/-	≈ 4.0	+	+
8576/13*	4g	Japan	Plasma	-/-	≈ 3.5	+	+
8577/13	2	Mexico	Stool	n.a.	≈ 5.0 - 5.5	+	+
8577/13s	2	Mexico	Stool	n.a.	≈ 3.5 - 4.0	+	+
Candidate BRP*	3f	Germany	Plasma	+/+	≈ 4.5	+	+

Tabell 8: Detaljer om stammer av HEV evaluert i studien, samt resultat fra kit og in-house PCR. n.d. not determined. n.a. not applicable. *Samples obtained from blood/plasma donors.

Resultatene viser at både RealStar HEV RT-PCR og in-house PCR detekterer alle prøvene (Tabell 8).

Vi konkluderer med at både RealStar HEV RT-PCR og in-house PCR detekterer genotype 1-4. I tillegg kvantiterte begge assay høyere enn forventet (Figur 13).



Figur 13: Kvantitering av genotypepanel.

(A) RealStar HEV RT-PCR: Kvantitering fra RealStar HEV RT-PCR sammenliknet med forventet verdi.

(B) In-house HEV RT-PCR: Kvantitering fra in-house PCR sammenliknet med forventet verdi.

6 Diskusjon

HEV RT-PCR er en viktig diagnostisk metode for diagnostikk av akutt- og kronisk HEV hepatitt. I denne oppgaven har vi sett at modifisert RealStar HEV RT-PCR fungerer godt da metoden detekterer alle prøver i QCMD panel og i genotype panel. Da vi på grunn av tilgang til real-time PCR maskin bare kan kjøre maks 30 ul reaksjonsvolum, kan vi ikke kjøre dette som en akkreditert metode med 50 ul reaksjonsvolum. Vi velger derfor å benytte mest tid på å teste og optimalisere en mye brukt og mye rimeligere in-house RT-PCR metode. Våre resultater gjør at vi endrer tid for revers transkripsjon fra 5 minutter som anbefalt av leverandør av mastermiks til 15 minutt, vi bestemmer oss for å bruke 900 nM av både forward og revers primer og 250 nM av probe og vi gjør en 2-steps PCR. Vi ser at vi kan gjøre RNA ekstraksjon med både manuell QIAamp kit og automatisert EasyMag ekstraksjon og bestemmer oss for å benytte automatisert ekstraksjon. Vi finner at in-house RT-PCR metoden har en sensitivitet på 0.03125 IU/ μ l som er tilnærmet sensitivitet oppgitt for RealStar HEV RT-PCR. Vi finner at det er mellom 52 og 104 IU per Geq. Tilslutt viser vi at in-house RT-PCR metoden detekterer alle prøver i QCMD panel og genotype panel.

Årsaken til at vi opprinnelig ønsket å benytte RealStar HEV RT-PCR er at flere studier viser at denne metoden har den beste sensitiviteten av de kommersielle kittene på markedet. Vollmer et al har i en studie fra 2014 sammenliknet sensitiviteten til RealStar HEV RT-PCR, hepatitisE@ceeramTools og ampliCube HEV RT-PCR (27). Av disse tre hadde RealStar HEV RT-PCR den høyeste sensitiviteten. Abravanel et al sammenliknet RealStar og Ceeram i 2013, også der hadde RealStar HEV RT-PCR høyere sensitivitet (28).

Ved bruk av in-house PCR fikk vi et tilnærmet lineært resultat, metoden var svært sensitiv men kvantiterte noe lavere enn ved kommersielt kit. Også in-house PCR metode detekterte alle genotypene, samt fikk korrekt resultat ved bruk av testpanelet fra QCMD. Ser man på andre studier som sammenlikner kommersielle kit med in-house PCR, er den gjennomgående trenden at sensitiviteten er noe bedre ved bruk av kommersielle kit. Vollmer et al har i en annen studie fra 2012 sammenliknet RealStar HEV RT-PCR med to in-house PCR, deriblant in-house PCR fra Jothikumar et al, og fant at RealStar HEV RT-PCR hadde den høyeste deteksjonsraten (29). Jothikumar et al kom ut som den beste in-

house PCR av de to som ble testet, og er en metode som ble forbedret av Garson et al i etterkant. En liknende studie ble gjort av Cattoir et al i 2013, som også fant at RealStar HEV RT-PCR hadde bedre sensitivitet enn to in-house PCR hvorav en var basert på Jothikumar et al (30). Også Cattoir et al fant at metoden basert på Jothikumar et al var den mest sensitive av in-house PCR som ble testet. Mokhtari et al sammenliknet in-house PCR fra Jothikumar med tre andre publiserte in-house metoder, samt kommersielt kit fra Ceeram, og konkluderte med anbefaling av metode fra Jothikumar et al og det kommersielle kittet (31).

Basert på litteratur om metoder for påvisning av HEV RNA tyder det altså på at metoder basert på og forbedret fra Jothikumar et al er blant de mest optimale for in-house PCR. Metoden er også blant de mest brukte. Artikkelen er publisert på internett via Elsevier Science, hvor man videre kan se at artikkelen har blitt sitert i andre publiserte artikler 312 ganger. Mange av disse bruker metoden i sine publikasjoner. Et eksempel på dette er Baylis et al (2013) studie for å etablere en internasjonal standard for HEV, hvor 10 av de 17 laboratoriene som oppga hvilken metode de brukte enten brukte in-house PCR fra eller modifisert fra Jothikumar et al (32).

Fra våre forsøk vedrørende optimalisering tyder resultatene fra revers transkripsjon på at å øke tid på dette trinnet øker sensitiviteten, i alle fall opp med tid opp til 30 minutter. RNA kan ha signifikante sekundærstrukturer som påvirker muligheten for revers transkriptase til å generere cDNA. Det virker naturlig at det å benytte mer tid på dette resultatet vil generere mer cDNA. Imidlertid er tid også en viktig faktor i en travel diagnostisk hverdag og vi valgte derfor å kun øke tiden fra 5 til 15 minutter for revers transkripsjon i videre forsøk, som et kompromiss mellom å spare tid og å øke sensitivitet.

Analyser av ulike primer konsentrasjon viser at in-house RT-PCR metoden er robust, da de ulike testede primerkonsentrasjonene bare gir små endringer i resultater. Resultatene viser at 400 nM av forward primer og 900 nM av revers primer gir best resultat tett fulgt av 900 nM av forward primer og 900 nM av revers primer. Vi bestemte oss for å benytte 900 nM av begge primerne da dette minker sannsynlighet for forbytting av primere ved tillaging av mastermiks som vil være en mulig feilkilde. Vi

bestiller alltid forward or revers primere samtidig og hvis vi skulle bruke bare 400 nM av forward primer, ville vi sannsynligvis alltid kastet rest av forward primere når revers primer var oppbrukt. Derfor vil valget vårt ikke være av økonomisk betydning.

Etter to forsøk hvor en så på sensitiviteten av den optimaliserte in-house PCR metoden ved å benytte en ferdig ekstrahert RNA standard med eksakt konsentrasjon, kunne vi detektere ned til og med 0.03125 IU/ μ l. Denne sensitiviteten kan med det sammenlignes sensitivitet oppgitt i RealStar HEV RT-PCR kittet. Da en ser noe variasjon hit raten mellom de to forsøkene, burde flere forsøk gjøres for å finne mer nøyaktig sensitivitet. Det hadde også vært interessant å kjøre modifisert RealStar HEV RT-PCR på denne RNA standarden.

Ved ekstraksjon av 140 μ l gir QIAamp litt høyere utbytte enn EasyMag. Forskjellen er liten, og vil ikke rettferdiggjøre bruk av en arbeidskrevende manuell metode foran automatisert metode. Ved bruk av EasyMag kan man gi inn et volum opp til og med 1000 μ l. Ofte vil en tenke at jo mer materiale som benyttes desto høyere vil utbyttet bli. En svært interessant og viktig observasjon vi gjorde var at et inn-volum på 140 μ l ga samme eller bedre utbytte enn et inn-volum på 200 μ l. Dette kan tyde på at for mye prøvemateriale eller spiking gir metting av kuler, og dermed et dårligere utbytte. Selv om ekstraksjon av 400 μ l ikke er like effektiv, gir dette imidlertid den høyeste RNA konsentrasjon.

Forsøkene i oppgaven er reproducerbar. Noen av forsøkene burde vært gjentatt flere ganger men dette lot seg ikke gjøre på grunn av den begrensede tiden. For eksempel burde analytisk sensitivitet av in-house RT-PCR med RNA ekstrahert av WHO standard vært gjentatt (**Figur 5**) og da burde også de laveste konsentrasjonene vært tatt med. Da arbeidet startet med oppgaven brukte alle kommersielle kitt vi fant et reaksjonsvolum på 50 μ l, men det vil i fremtiden kunne være relevant å undersøke nyere kommersielle kit som er validert for PCR maskinene tilgjengelig ved avdelingen.

7 Konklusjon

Forskene viser at både modifisert RealStar HEV RT-PCR og in-house PCR modifisert fra Garson et al fungerer godt. Begge metoder hadde rett på QCMD panelet og detekterte alle genotypene i genotypepanelet. RealStar HEV RT-PCR kvantiterte noe høyere enn in-house PCR, men metodene har en god sensitivitet som kan sammenliknes. Da den modifiserte versjonen av RealStar HEV RT-PCR ikke er validert, konkluderes det med at optimalisert in-house PCR er den beste metoden å ta i bruk.

8 Referanseliste

1. Harvala H, Wong V, Simmonds P, Johannessen I, Ramalingam S. Acute viral hepatitis - should the current screening strategy be modified? *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2014;59(3):184-7.
2. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. 1983;20(1):23-31.
3. Khuroo MS. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *The American journal of medicine*. 1980;68(6):818-24.
4. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*. 1991;185(1):120-31.
5. Teo CG. Fatal outbreaks of jaundice in pregnancy and the epidemic history of hepatitis E. *Epidemiology and infection*. 2012;140(5):767-87.
6. Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2012;55(4):988-97.
7. Johne R, Dremsek P, Reetz J, Heckel G, Hess M, Ulrich RG. Hepeviridae: an expanding family of vertebrate viruses. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;27:212-29.
8. Perez-Gracia MT, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E: an emerging disease. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;22:40-59.
9. Hakze-van der Honing RW, van Coillie E, Antonis AF, van der Poel WH. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PloS one*. 2011;6(8):e22673.
10. Midgley S, Vestergaard HT, Dalgaard C, Enggaard L, Fischer TK. Hepatitis E Virus Genotype 4, Denmark, 2012. *Emerging Infectious Diseases*. 2014;20(1):156-7.
11. Monne I, Ceglie L, G DIM, Natale A, Zamprogna S, Morreale A, et al. Hepatitis E virus genotype 4 in a pig farm, Italy, 2013. *Epidemiology and infection*. 2015;143(3):529-33.
12. Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet (London, England)*. 1995;345(8956):1025-6.
13. Aggarwal R. Diagnosis of hepatitis E. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013;10(1):24-33.
14. Kamar N, Izopet J, Dalton HR. Chronic Hepatitis E Virus Infection and Treatment. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2013;3(2):134-40.
15. Zhao C., Wang Y. Hepatitis E Virus: Laboratory Diagnosis of HEV Infektion. In: Cohen IR, Lajtha NS, Lambris JD, Paoletti R, eds. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer; 2016.
16. European Association for the Study of the Liver. Electronic address eee, European Association for the Study of the L. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J Hepatol*. 2018;68(6):1256-71.
17. Dudman SGea. Strategimøte 2015: Laboratoriediagnostikk ved nye og utbruddsaktuelle virusinfeksjoner. *Folkehelseinstituttet*. 2015:39-41.

18. Kaufmann A, Kenfak-Foguena A, Andre C, Canellini G, Burgisser P, Moradpour D, et al. Hepatitis E virus seroprevalence among blood donors in southwest Switzerland. *PloS one*. 2011;6(6):e21150.
19. Wenzel JJ, Sichler M, Schemmerer M, Behrens G, Leitzmann MF, Jilg W. Decline in hepatitis E virus antibody prevalence in southeastern Germany, 1996-2011. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014;60(4):1180-6.
20. Christensen PB, Engle RE, Hjort C, Homburg KM, Vach W, Georgsen J, et al. Time Trend of the Prevalence of Hepatitis E Antibodies among Farmers and Blood Donors: A Potential Zoonosis in Denmark. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;47(8):1026-31.
21. Hogema BM, Molier M, Slot E, Zaaier HL. Past and present of hepatitis E in the Netherlands. *Transfusion*. 2014;54(12):3092-6.
22. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009;67(1):6-20.
23. Ferguson M, Walker D, Mast E, Fields H. Report of a collaborative study to assess the suitability of a reference reagent for antibodies to hepatitis E virus. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*. 2002;30(1):43-8.
24. About QCMD. [cited 2018 03.06]. Available from: <https://www.qcmd.org/index.php?pageId=2&pageVersion=EN>.
25. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *Journal of virological methods*. 2006;131(1):65-71.
26. Garson JA, Ferns RB, Grant PR, Ijaz S, Nastouli E, Szypulska R, et al. Minor groove binder modification of widely used TaqMan probe for hepatitis E virus reduces risk of false negative real-time PCR results. *Journal of virological methods*. 2012;186(1-2):157-60.
27. Vollmer T, Knabbe C, Dreier J. Comparison of real-time PCR and antigen assays for detection of hepatitis E virus in blood donors. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(6):2150-6.
28. Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Lhomme S, Dubois M, Peron JM, Alric L, et al. Performance of two commercial assays for detecting hepatitis E virus RNA in acute or chronic infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(6):1913-6.
29. Vollmer T, Diekmann J, Johne R, Eberhardt M, Knabbe C, Dreier J. Novel Approach for Detection of Hepatitis E Virus Infection in German Blood Donors. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(8):2708-13.
30. Cattoir L, Van Hoecke F, Van Maerken T, Nys E, Ryckaert I, De Boule M, et al. Hepatitis E virus serology and PCR: does the methodology matter? *Archives of virology*. 2017;162(9):2625-32.
31. Mokhtari C, Marchadier E, Haim-Boukobza S, Jebblaoui A, Tesse S, Savary J, et al. Comparison of real-time RT-PCR assays for hepatitis E virus RNA detection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2013;58(1):36-40.
32. Baylis SA, Hanschmann KM, Blumel J, Nubling CM, Group HEVCS. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(4):1234-9.

Figurliste

Figur 1: Dynamiske endringer i HEV markører etter infeksjon.....	2
Figur 2: Skjematisk fremstilling av RT-PCR.....	3
Figur 3: Illustrasjon av Ct-verdi.....	4
Figur 4: Test av deteksjonsgrense for kommersielt kit.....	9
Figur 5: In-house PCR 15 µl + 15 µl mastermiks.....	10
Figur 6: Resultat fra revers transkripsjonstest.....	12
Figur 7: Amplifikasjon.....	13
Figur 8: Primerkonsentrasjon.....	14
Figur 9: Optimalisering av probekonsentrasjon.....	15
Figur 10: Relasjon mellom IU og Geq.....	16
Figur 11: Automatisert ekstraksjon versus manuell ekstraksjon.....	19
Figur 12: Kvantitering av panel fra QCMD.....	21
Figur 13: Kvantitering av genotypepanel.....	22

Tabelliste

Tabell 1: Mastermiks fra Altona RealStar kit med modifiserte volum.....	8
Tabell 2: Oppsett for PCR-kjøring.....	8
Tabell 3: Mastermiks for in-house PCR.....	9
Tabell 4: Hit rate ved optimaliserte betingelser.....	17
Tabell 5: Hit rate ved optimaliserte betingelser fra 2. forsøk.....	17
Tabell 6: Sammenlagt resultat fra testing av sensitivitet og sammenlikning med RealStar HEV RT-PCR.....	17
Tabell 7: Detaljer om QCMD panel samt resultater fra kit og in-house PCR.....	20
Tabell 8: Detaljer om stammer av HEV evaluert i studien, samt resultater fra kit og in-house PCR.....	21

9 Vedlegg

Vedlegg 1: Hit rate fra RealStar HEV RT-PCR med validert metode

Table 1: RT-PCR results used for the calculation of the RealStar® HEV RT-PCR Kit 1.0

Input Conc. [IU/μl]	Number of Replicates	Number of Positives	Hit Rate [%]	IC
10	18	18	100	Valid
3.162	18	18	100	Valid
1	17	17	100	Valid
0.316	16	14	87,5	Valid
0.1	18	14	77,8	Valid
0.0316	17	1	5,8	Valid
0.01	18	0	0	Valid
0.00316	18	0	0	Valid

The analytical sensitivity of the RealStar® HEV RT-PCR Kit 1.0 was determined by

Probit analysis.

- For the detection of HEV specific RNA, the analytical sensitivity is 0.31 IU/μl [95% confidence interval (CI): 0.20 - 0.74 IU/μl]

10 Sammendrag av kunnskapsevalueringer

Det ble besluttet å ikke ta med GRADE, da sjekklisterne som skal fylles ut ikke er appliserbare til nøkkelartiklene brukt i denne oppgaven.