

Projektbeskrivelse - Zika og mikrocefali

Introduktion og problemformulering

Efter zika(ZIKV) pandemiens start i 2015 har man set en stigning i antallet af børn født med mikrocefali i bl.a. Brasilien. Selvom der videnskabelig enighed om, at en ZIKV-infektion hos en gravid kan resultere i, at fostret udvikler mikrocefali mangler der stadig mere viden omkring den specifikke sammenhæng. Ved en ZIKV-infektion vil mængden af ZIKV-RNA øges hos den inficerede i takt med, at ZIKV trænger ind i flere og flere celler og får replikeret sit RNA. Jeg vil prøve at opstille et forsøg, der kan vise en eventuel sammenhæng mellem mængden af ZIKV-RNA i blodet hos gravide og udviklingen af mikrocefali hos fostre.

Baggrund

Mikrocefali er en hjernelidelse, hvor spædbørn fødes med et for lille kranium, eller at barnets hoved stopper med at vokse efter fødslen. Man har set at en ZIKV infektion hos gravide kan resultere i udviklingen af mikrocefali hos fostre¹. Generne NS4A og NS4B² i virus RNA-strengen kan ved en infektion omdirigere et nøgleproteins funktion i de inficerede celler, så proteinet ikke længere sørger for celledeling³. Dette resulterer i, at cellerne dør i stedet for at dele sig, så hjernen ikke udvikles som normalt.

Jeg har ikke selv haft mulighed for direkte at undersøge sammenhængen mellem en infektions størrelse og udviklingen af mikrocefali, da jeg ikke har haft adgang til blodprøver fra gravide inficeret med zikavirus. Derfor har jeg i stedet skitseret et forsøg, og ud fra et prøvedatasæt har jeg arbejdet med, hvordan man kan bearbejde resultaterne matematisk.

Jeg var i efteråret ude og udføre et qPCR forsøg på DTU med DNA pladsmider og det er metoden fra dette forsøg der er videreført.

Hypotese

Nulhypotese:

Der er ingen sammenhæng mellem mængden af ZIKV-RNA i blodet hos gravide og udviklingen af mikrocefali hos fostre

Alternativ hypotese:

Der er en sammenhæng mellem mængden af ZIKV-RNA i blodet hos gravide og udviklingen af mikrocefali hos fostre.

Materialer og metoder

På DTU lavede jeg qPCR på DNA pladsmider. Forsøget vil blive beskrevet her:

Først oprensede jeg DNA'et fra de simulerede prøver. Herefter fortyndede jeg prøverne, tilsatte mastermix og fordelte prøvemateriale fra en prøve i tre forskellige qPCR- rør, så prøverne blev kørt i triplikater. Dernæst lavede jeg en standardrække bestående af 5 prøver med en kendt RNA mængde. Til sidste kørte jeg prøverne i qPCR-maskinen.

Forsøget jeg udførte på DTU blev lavet med DNA pladsmider, mens en prøve fra en patient vil indeholde virus RNA. Man vil derfor udføre RT-qPCR på prøverne, så RNA først translateres til DNA før, man kører den normale qPCR

¹ <https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/infants-children/zika-microcephaly.html>

² <http://news.usc.edu/105296/2-zika-proteins-responsible-for-microcephaly-identified/>

³ <http://www.eurostemcell.org/story/neural-stem-cells-reveal-how-zika-virus-can-cause-microcephaly-and-potential-drug-treatment>

Jeg lavede herefter databehandling på et prøvedatasæt. Prøvedatasættet indeholder informationer om 20 patienter, deres Ct målinger i triplikater samt information om deres børn blev født med eller uden mikrocefali, samt resultater til at lave en Ct standardkurve. Først fremstillede jeg en Ct standardkurve. Ud fra Ct standardkurven omregnede jeg Ct måling 2 til antal RNA molekyler i patientens blod ud fra standardkurvens funktionsforskrift. For at undersøge om der var en signifikant forskel på resultaterne, eller om det blot skyldtes tilfældigheder, delte jeg de tyve patienter op i to grupper. En gruppe der fødte raske børn, og en gruppe der fødte børn med mikrocefali. For at teste om der var en signifikant forskel udførte jeg en uparret t-test. For at undersøge om jeg kunne bruge t-testen lavede jeg en F-test og undersøgte om de to patientgrupper var normalfordelte.

Resultater

Jeg har ud fra et prøvedatasæt lavet databehandling på resultater fra 20 patienter. Jeg har via en Ct standardkurve omregnet Ct 2 målingen for de 20 patienter til antal RNA-molekyler, hvilket kan ses på tabel 1. Ud fra resultaterne kan man se, at de første 7 patienter samt patient 16,6 og 10 fik raske børn, mens de andre patienter fødte børn med mikrocefali. De patienter der fødte syge børn havde alle Ct målinger mellem 23,01 og 13,01 og mellem 2347139 og 519225509 RNA-molekyler i blodet.

Der blev udført F-test, testet for normalfordeling samt udført en uparret t-test på både de transformerede og ikke transformerede data. De transformerede data havde varianshomogenitet, men var ikke normalfordelte, derfor blev der testet på de ikke transformerede data. De ikke transformerede data var normalfordelte, men havde ikke varianshomogenitet. Den uparrede t-test viste, at nulhypotesen skulle forkastes og at de to patientgrupper ikke havde samme middelværdi.

Diskussion og konklusion

Ud fra tabel 1 ligner det at der er en sammenhæng mellem mængden af RNA molekyler i patientens blodprøve og fostret udvikler mikrocefali. Ifølge den uparret t-test var der ingen sammenhæng mellem de to patientgruppers middelværdi. Forskellen mellem middelværdien af Ct måling 2 hos de to patienter er signifikant. Forskellen skyldes altså ikke tilfældigheder.

For at man kan udføre en t-test kræver det at der er varianshomogenitet og at begge populationer, patientgrupper, er normalfordelte. Hverken de transformerede eller de ikke transformerede data opfyldte begge kriterier og i princippet kunne man ikke udføre en uparret t-test. Jeg valgte at se bort fra dette og udførte alligevel en uparret t-test på de ikke transformerede data. Jeg kan derfor ikke bruge resultatet fra min uparret t-test.

Da resultaterne er simuleret er der ingen fejlkilder der kan have påvirket resultatet.

Alt i alt kan man ikke, ud fra mine data, påvise, at der er en sammenhæng mellem mængden af RNA molekyler i en patients blod og udviklingen mikrocefali hos fostre, selvom det ligner, at der er en. Man bør derfor undersøge sammenhængen mellem en ZIKV-infektion og den præcise årsag bag udviklingen af mikrocefali hos fostre.

Patient	Ct måling	Antal RNA-molekyler
5	28,02	49521
2	26,87	120071
15	26,57	151281
20	26,55	153629
11	24,98	514766
17	24,56	711364
4	23,45	1672503
19	23,01	2347139
16	21,91	5476067
6	21,06	10538486
10	20,87	12199155
8	20,76	13277696
18	20,12	21736570
7	18,34	85618672
13	18,34	85618672
9	17,45	169924976
1	15,78	614952668
12	14,23	2029029479
14	11,09	2278037973
3	13,01	5192255509

Figur 1. Tabel over hver patient, deres Ct måling og antallet af RNA-molekyler i deres prøve. De patienter, der fik et barn med mikrocefali er markeret med blå. Dataene er sorteret, så patienten med det laveste antal RNA-molekyler står øverst. Data fra prøve datasættet*