FORUM FÖR
BEREDSKAPSDIAGNOSTIK

PROJEKTRAPPORT

Validering av multiplex realtids PCR för harmonisering av molekylär detektion av riskklass 3 bakterier inom FBD

Sara Ehrs, Statens veterinärmedicinska anstalt • Sara Garbom, Livsmedelsverket • Catarina Nilsson, Livsmedelsverket • Anna Peterzon, Smittskyddsinstitutet • Benjamin Edvinsson, Smittskyddsinstitutet
Pär Larsson, Totalförsvarets Forskningsinstitut

FBD 2009/1

ABSTRACT

The main goal with FBD is to improve multidisciplinary cooperation in order to harmonize methods, education, training and exercises for diagnostic preparedness applications regarding dangerous pathogens.

Forum for Biopreparedness Diagnostics (FBD) is a collaborative effort between four Swedish governmental institutes, National Food Administration, National Veterinary Institute, Swedish Institute for Infectious Disease Control and the Swedish Defence Research Agency. One of the main goals of this collaboration is harmonisation of methods and equipment between the participating authorities to increase the level of biopreparedness in Sweden.

Crisis management, including medical countermeasures and decontamination procedures upon a deliberate or natural spread of BSL-3 bacteria often depends on a rapid preliminary laboratory result. Molecular methods, such as PCR, provide a rapid tool to investigate a set of samples for the presence of a set of suspected bacterial species.

The present study was conducted to evaluate the use of multiplex real-time PCR for detection of *Bacillus anthracis, Yersinia pestis, Francisella tularensis, Burkholderia mallei, Burkholderia pseudomalle*i and *Coxiella burnetii*. The diagnostic algorithm is a two-step procedure, where the first step includes multiplex detection of up to three different bacteria on a genus level in a single reaction. The second step includes multiplex detection of up to three biomarkers in a reaction, and here positive samples are analyzed using specific assays to confirm the finding at a species level, and to analyze important virulence markers. The method includes an internal amplification control, constituted by seal herpes virus type 1 DNA (PhHV-1), to minimize the risk for false negative results due to PCR failure. The performance of the method was evaluated by investigating its specificity using reference strains and common laboratory findings, limit of detection, and amplification efficiency. In summary, a two-step multiplex real-time PCR algorithm minimizes the number analyzes required for a large number of samples with a possible content of a set of highly pathogenic bacteria of potential bioterrorism risk.

Titel:	**Validering av multiplex realtids PCR för harmonisering av molekylär detektion av riskklass 3 bakterier inom FBD** Publ.nr. MSB681 ISBN 978-91-7383-435-3
Projekttid:	1 april till 31 december 2009
Projektledare:	Sara Garbom, Livsmedelsverket Sara Ehrs, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA)
Projektgrupp:	Catarina Nilsson, Livsmedelsverket, Benjamin Edvinsson, Smittskyddsinstitutet (SMI), Anna Peterzon, Smittskyddsinstitutet (SMI)
Kontaktperson i FBDs styrgrupp:	Benjamin Edvinsson, e-post: benjamin.edvinsson@smi.se
FBDs styrgrupp 2009:	Pär Larsson (FOI), Mats Forsman (FOI), Mona Byström (FOI), Cecilia Dahlberg (Livsmedelsverket), Marianne Boysen (Livsmedelsverket), Annelie Lundin Zumpe (Livsmedelsverket), Benjamin Edvinsson (SMI), Ida Andersson (SMI), Ralfh Wollin (SMI), Viveca Båverud (SVA), Rickard Knutsson, ordf, (SVA)
Finansiering:	Projektet har finansierats genom tilldelning av MSB:s anslag 2:4 Krisberedskap
Layout:	Tecknarn i Roslagen
Tryck:	Danagårds Grafiska

INNEHÅLL

1. Sammanfattning 3
2. Begrepp och förkortningar 4
3. Bakgrund 5
4. Syfte 9
5. Material och Metoder 10
6. Resultat 12
7. Diskussion 16
8. Slutsats 18
9. Rekommendationer för nästkommande projekt 18
10. Referenser 19

Bilaga 1 20
Bilaga 2 22
Bilaga 3 32
Bilaga 4 34

1. SAMMANFATTNING

Forum för BeredskapsDiagnostik (FBD) är ett samarbete mellan fyra svenska myndigheter, Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Smittskyddsinstitutet (SMI) och Totalförsvaret forskningsinstitut (FOI). Ett av forumets huvudmål är harmonisering av metoder och utrustning mellan de deltagande myndigheterna för att öka beredskapen i Sverige inför en eventuell B-händelse. Vid en avsiktlig eller naturlig spridning av riskklass 3 bakterier är en fungerande krisberedskap, med avseende på medicinska motåtgärder och dekontaminationsförfaranden, beroende av snabba preliminära laboratorieresultat. Till skillnad från odlingsdiagnostik, som ofta ses som en gyllene standard, erbjuder molekylär diagnostik metoder som snabbare kan analysera en större mängd prover med riskklass 3 bakteriefrågeställning.

I aktuell studie har en multiplex reltids PCR metodik för detektion av *Bacillus anthracis, Yersinia pestis, Francisella tularensis, Burkholderia mallei, Burkholderia pseudomallei och Coxiella burnetii* validerats. Den diagnostiska metoden utnyttjar en hierarkisk strategi. Som ett första steg kan upp till tre olika bakterier detekteras på genusnivå i en reaktion. I ett andra steg utnyttjas multiplex detektion för att konfirmera resultaten på speciesnivå genom detektion av upp till tre species-specifika sekvenser som kan inkludera viktiga virulensmarkörer. Metoden innefattar även en intern amplifieringskontroll, bestående av DNA från PhHV-1 (sälherepsvirus typ 1), för att minska risken för falska negativa resultat på grund av inhiberad eller på annat sätt misslyckad PCR. Prestandan hos metoden har validerats med avseende på specificitet, känslighet (LOD) och amplifieringseffektivitet. Som en övning ur beredskapssynpunkt har även ett ringtest med samtliga myndigheter utförts. Sammanfattningsvis, en tvåstegs multiplex realtids PCR algoritm som minimerar antalet analyser och är lämplig för en stor mängd prover med frågeställning avseende högpatogena bakterier med möjlig bioterrorrisk.

2. BEGREPP OCH FÖRKORTNINGAR

Utvärdering	Systematiskt skilja fungerande system/metod från icke fungerande system/metod
Validering	Bekräftelse genom undersökning och framläggande av bevis att de särskilda kraven för en specifik, avsedd användning har uppfyllts.
PCR	Polymerase chain reaction
Realtids PCR	Kontinuerlig uppsamling av fluorescensdata från PCR . Också kallad quantitative PCR, eller qPCR, då nukleinsyra kan kvantifieras med denna metod.
Multiplex realtids PCR	Principen enligt vilken flera realtids PCR analyser utförs i samma reaktion
C_t-värde	Cycle treshold value
E	Amplifieringseffektiviet
LOD	Limit of detection, eller minsta detekterbara mängd
GE	Genomekvivalenter
IAC	Intern amplification control (intern amplifieringskontroll)
IC	Internal control (intern kontroll)
PHhV-1	Sälherepsvirus typ1
QA	Quality assurance

3. BAKGRUND

Forum för Beredskapsdiagnostik (FBD) har som långsiktigt mål att samordna landets diagnostiska kapacitet vid B-händelse där antalet prover överskrider den enskilda myndighetens kapacitet. FBD kan dock aldrig ha en autonom operativ funktion, utan är endast verksamt på initiativ av en eller flera myndigheter vid behov. Avlastning kan ske genom att inkomna prover skickas från en myndighet till en annan, och där den andra myndigheten efter analys lämnar ett svar till avsändarmyndigheten som sedan förmedlar detta svar till remitterande läkare eller annan organisation. Men, för att en sådan process ska fungera i praktiken krävs ett omfattande utvecklings- och harmoniseringsarbete samt regelbunden övning.

I stora drag kan en komplett analyskedja för molekylär diagnostik (exkluderat provtransport mellan myndigheter) delas in i följande steg:

1. Provregistrering
2. Införsel av prov till P3-laboratorie
3. Nukleinsyraextraktion
4. Molekylär analys
5. Tolkning av data
6. Svar till avsändarmyndighet

Utöver 1-6 krävs ett system för logistik för storksalig provhantering, och att 1-6 kan utföras på de fyra myndigheterna utefter en gemensamt utarbetad kvalitetsstandard.

För molekylär analys kan ett antal olika varianter av polymeras chain reaction (PCR) utföras, för att snabbt och med god känslighet detektera en bakteries arvmassa i ett prov. På senare år har användningen av realtids PCR blivit mer utbredd, vilket är en snabbare metod än ”klassisk” PCR och med större möjlighet att detektera flera olika bakterier eller olika delar av en bakteries arvsmassa i en och samma reaktion. Metoden kan även användas för kvantifiering och kallas då quantitative PCR, qPCR. Principen enligt vilken flera analyser kan göras i samma reaktion kallas multiplex PCR och har sin främsta fördel i att antalet reaktioner som behöver utföras för en fullständig analys minskar, vilket kan ha stor betydelse för kapacitet och tidsåtgång vid analys av en stor provserie.

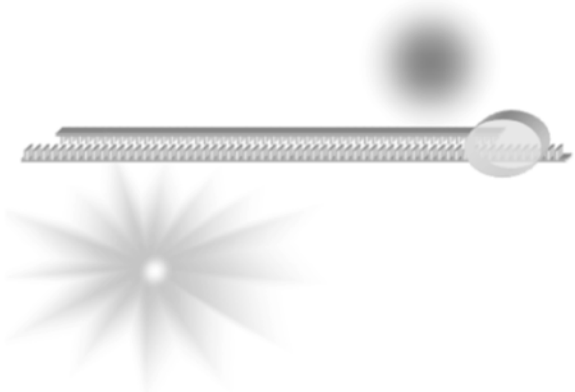
Utförandet av realtids PCR kan dock variera beroende på vilken plattform, det vill säga typ av instrument, som används för själva analysen, även om de reagenser som ingår kan vara de samma eller i vissa fall kräva mindre modifikationer. En ambition i framtagandet av ny PCR-metodik bör därför vara att metodiken är harmoniserad, det vill säga den kan användas på olika plattformar antingen i ett multiplext format eller som ett så kallad singelplex format (endast en analys utförs i en reaktion). Som exempel kan nämnas att vissa plattformar stödjer 96 analyser med goda möjligheter för multiplexa analyser, medan andra plattformar stödjer 384 analyser men med begränsade möjligheter för multiplex analys. Det är därför mycket viktigt att metodiken är flexibel för att framtiden kunna användas på fler laboratorium i Sverige, och på alla marknadens plattformar.

FBD använder i nuläget bakterier i riskklass 3 som modellorganismer för utvecklandet av dessa analyser. Detta sätter särskilda krav på biosäkerhet vid transport och provanalys, och innefattar följande agens:

- ***Bacillus anthracis,*** som orsakar mjältbrand, och är även ett känt som bioterroragens som skickade som sporer i ”antrax-brev” efter 9/11 2001. [1]
- ***Francisella tularensis,*** subspecies *tularensis* (typ A) och subspecies *holartica* (typ B), orsakar en harpest, som kan ses som en mildare form av pest. [2]
- ***Yersinia pestis,*** orsakar pest och var troligen orsaken till digerdöden på 1600-talet.[3]
- ***Burkholderia pseudomallei,*** orsakar melioidos som ofta ses som lunginflammation, men som även kan leda till vävnadssmältningar, var i lungsäckarna och benröta. [4]
- ***Burkholderia mallei,*** orsakar rots, vilket kan manifestera som luftvägssymptom och hudinfektioner och kan anta akut men även kronisk form [5]
- ***Coxiella burnetii,*** orsakar allvarlig lunginflammation och tros även kunna ge upphov till kroniska symptom, för närvarande ett stort problem i Nederländerna. [6]

För ovanstående agens har realtids PCR-metodik, så kallade assays, tagits fram av SMI. Dessa assays bygger på TaqMan-kemi (se bild 1 för detaljerad information), och som medger att metoden kan användas för att utföra analyser och generera ett resultat med alla nuvarande realtids PCR-instrument på marknaden (se bild 2).

Bild 1: Figur 1 visar det s.k. annealingsteget i PCR, då primer (till vänster) och Taq-polymeras (oval) har bundit uppströms om proben. En TaqMan-prob är en kort oligonukleotid märkt med en fluorescerande reporter-molekyl i 5′ och en så kallad quencher-molekyl i 3´. Quencher-molekylen har en avståndsberoende egenskap att släcka fluorescens från reporten, dvs. inget ljus avges då proben är intakt.



Figur 2 visar elongeringsfasen. Under amplifiering av en genetisk markör klyvs TaqMan-proben till följd av Taq-polymerasets exonukleasaktivitet, TaqMan-proben bryts ner, varvid reporter-molekyl och quencher-molekyl separeras, vilket resulterar i en ökning av mätbar fluorescens. Genom att märka prober med olika fluoroforer kan man i en reaktion identifiera amplifiering av flera olika målsekvenser och det är sådan co-amplifiering som multiplex realtids PCR syftar till [7].

För diagnostiskt syfte ställs dock höga krav på en realtids PCR. En sådan assay ska vara specifik (dvs. inte ge ett positivt utfall om eftersökt agens inte finns i det material som undersöks), ha en god limit of detection (LOD) för att upptäcka extremt låga mängder av genetiskt material, samt ha relevanta kontrollsystem. Traditionellt används i PCR en positiv kontroll för att säkerställa att analysen fungerar, och en negativ kontroll för att säkerställa att inga kontaminationer har skett som kan ge upphov till falska positiva resultat. Falska positiva resultat kan även förekomma om en undermåligt validerad metod används, och som korsreagerar (ger positivt resultat) för närbesläktat men ej eftersökt agens.

Metoden har då undermålig specificitet. Dock kan även falska negativa resultat erhållas om PCR:en av någon anledning inte skulle fungera. En icke-fungerande PCR kan bero på en mängd faktorer, t.ex. att det av någon anledning fattas reagens i en analys, eller att provet som analyseras innehåller ämnen som inhiberar PCR:en. Då en mängd olika provmaterial och/eller olika mängder av provinnehåll analyseras är det speciellt viktigt att PCR funktionen i varje analys kontrolleras. Detta görs vanligen med en så kallad intern amplifieringskontroll (IAC), se bild 2 [8]. För att en IAC ska kunna spegla potentiell inhibition av den diagnostiska PCR:en är det viktigt att dessa båda PCR:er fungerar med jämförbar amplifieringseffektivitet. Amplifieringseffektivitet (E) är ett mått som kan anges i %, olika assays bör ligga inom intervallet 90-100% för att kunna anses jämförbara. I viss mån är även amplifieringseffektiviteten kopplad till LOD då en PCR bör fungera med så hög effektivitet som möjligt för att detektera små mängder arvsmassa. Detta kan dock mer ses som en indikation på god LOD och det återstår därför alltid att fastställa LOD experimentellt genom att analysera minsta tänkbara mängd material i ett prov [9].

Metodiken har utvärderats på SMI, varvid man redan innan projektets start kunnat konstatera att processen fungerar och fyller sitt syfte. Ingående bakterier detekteras enligt en ”hierarkisk” algoritm, se **bild 3**. En multiplex PCR-metodik har som främsta syfte att minska antalet reaktioner som behöver analyseras då agens är okänt, då det är möjligt att utföra tre analyser med en PCR. Men som nämnt ovan kan analyserna även utföras duplext, vilket kan vara mer optimalt för vissa instrument, men då krävs det tre separata PCR:er för att erhålla samma resultat.

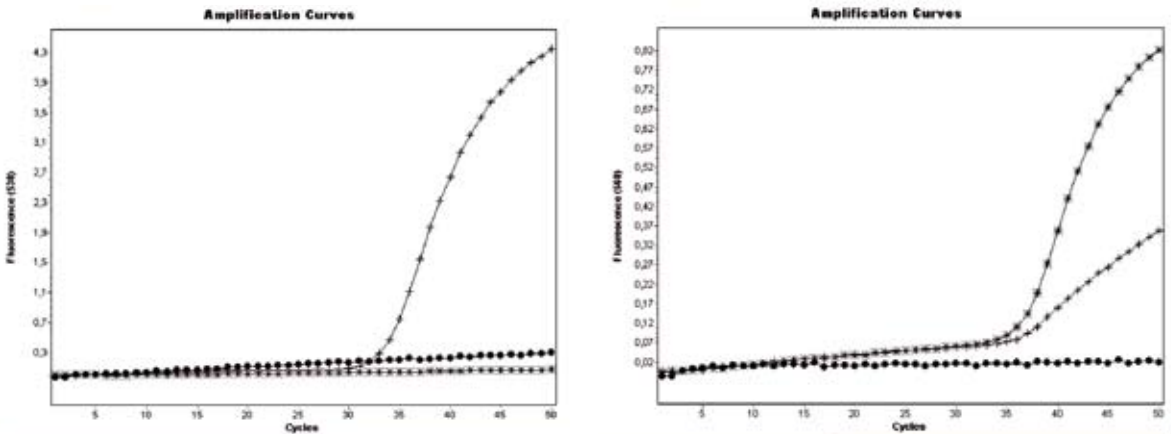


*Bild 2: Figur 1 visar resultat från analys av Bacillus anthracis i tre olika prover; + visar ett positiv resultat i form av ökande fluorescens vilket indikerar förekomst av eftersökt agens. • och * visar negativa analysresultat då ingen ökning av fluorescens registrerats. Realtids PCR: ens funktion kontrollers med en IAC, figur 2, där * och + visar positivt resultat för IAC, dvs att PCR:en fungerar. IAC i • är negativ, vilket visar att PCR:en för detta prov inte har fungerat. Provet måste därför analyseras om då Bacillus anthracis inte kan uteslutas. Om analysen enligt figur 1 hade utförts utan IAC hade • tolkats som negativt och därmed gett ett falskt negativt resultat.*

För att minimera antalet analyser som behöver utföras för en stor provserie kan en hierarkisk PCR utföras. En sådan analys kan liknas vid en tvåstegsraket, varvid en första analys fokuseras på detektion av upp till tre olika genus, ”familjer”, av bakterier. Om denna första så kallade screening ger positivt utfall tas provet vidare för en specifik analys, varvid resultat i den första analysen konfirmeras samt att ytterligare faktorer såsom virulensmarkörer, kan påvisas. Det är ofta nödvändigt att påvisa virulensmarkörer för att med säkerhet kunna skilja högpatogena bakterier från en mindre farlig släkting, se bild 3.

Den främsta anledningen till att utföra en screening är att en specifik analys kan inkludera upp till tre PCR analyser, som för t.ex. *B. anthracis*, vilket för stora provserier skulle mångdubbla antalet

PCR analyser som behöver utföras för prover där innehållet är okänt, och kan inkludera någon av ovanstående bakterier. Men om en stor provserie misstänkt innehålla ett specifikt agens så finns naturligtvis möjligheten att storskaligt utföra enbart en specifik analys, varvid screening och övriga specifika analyser exkluderas.

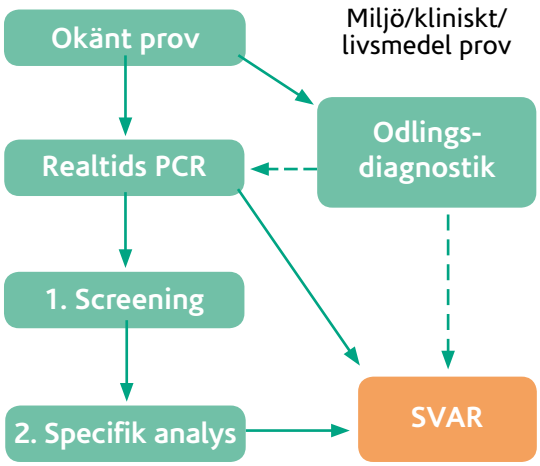


Bild 3: Hierarkisk realtids PCR. I en första analys, 1, finns möjlighet att söka (utföra s.k. screening) efter Bacillus anthracis, Francisella tularensis och Yersinia pestis. Om denna screening är negativ kan ett negativt svar lämnas för samtliga tre bakterier baserat på en analys. Om provet är positivt för t.ex. B. anthracis utförs en specifik analys, 2, där närvaro av B. anthracis fastställs genom att i en realtids PCR analysera en genetisk markör som är specifik för B. anthracis i kombination med påvisandet av två olika virulensfaktorer[10]. B. anthracis har dock nära men betydligt mindre farliga släktingar, såsom Bacillus cereus, vilka båda ingår i genuset Bacillus och kan vara förvirrande lika varandra vid en odlingsanalys. Screeningsteget detekterar hela genuset Bacillus, och i det efterföljande specifika analyssteget diskrimineras B. anthracis från B. cereus. Metoden kan således även användas för att snabbt fastställa att ett odlingsfynd är en Bacillus species, men inte B. anthracis.

PCR för diagnostiskt syfte är dock, likt diagnostik i allmänhet, en avvägning mellan kostnad och erhållet resultat. En multiplex realtids PCR kräver TaqMan prober som kan avge olika våglängder vid fluorescens, speciella reagens (mastermix) som motsvarar de krav som ställs på ett multiplext system, samt instrument som kan läsa de aktuella våglängderna. Ur ett beredskapsperspektiv är det också viktigt att beakta parametrar som lagerhållning av reagens med avseende på volymer och hållbarhetstider.

4. SYFTE

Projektet syftar till att inom ramarna för FBDs verksamhet validera metodik för multiplex realtids PCR diagnostik av ovan nämnda riskgrupp 3 bakterier, enligt följande delprojekt:

DELPROJEKT 1:

Metoden valideras med avseende på

- specificitet genom exklusivitetstest (falska positiva resultat pga. korsreaktion) och inklusivitetstest (metoden ska detektera eftersökt agens)
- LOD (förmågan att detektera små mängder av eftersökt agens)
- Amplifieringseffektivitet
- Bruk av IAC som kontroll på PCR:ens funktion

DELPROJEKT 2:

Metoden ringtestas genom att en kodad panel med okänt innehåll skickas till de fyra myndigheterna varvid innehållet analyseras med validerad metodik. Delprojektet inkluderar *Burkholderia sp.* och *Coxiella*.

DELPROJEKT 3:

Utvärdera stabilitet över tid för frysförvaring av TaqMan-prober

5. MATERIAL OCH METODER

Realtids PCR utfördes i en reaktionsvolym om 25µl och med reagenser listade i tabell 1. Som IAC användes DNA från sälherepsvirus typ1 (PhHV-1) detekterad med en realtids PCR publicerad av van Doornum et al [11]. Quanta Perfecta™ Multiplex qPCR SuperMix, referensfärgen ROX, primrar och prober för aktuella genetiska markörer, primrar och prob för IAC, PhHV-1 DNA samt vatten blandades enligt proportioner givna i tabell 1 till en slutlig volym motsvarande 20 µl × antalet planerad reaktioner. Till varje brunn på en PCR-platta med 96-håls format tillsattes 20 µl av realtids PCR reagensmixen följt av 5 µl templat. Temperaturprofilen var standard för TaqMan-prob; 1 cykel med 95°C (3-5min), 45 cykler med 95°C (15s) och 60°C (45-60 s). Se **bilaga 1** för detaljerad information om genetiska markörer och oligonukleotidsekvenser.

Tabell 1. Reagensförhållanden

Reagens	Volym för 25µl-reaktion	Slutkoncentration
Quanta PerfeCta TM Multiplex qPCR SuperMix (2X)	12,5	1X
Quanta Low ROX (50X)	0,5µl	1X
primer, prob (IAC)	varierande	500nM, 100nM
primer, prob (Målsekvens)	varierande	500nM, 100nM
Destillerat H2O	varierande	
IAC (DNA från PhHV-1)	1µl	Koncentration motsvarande Ct=30
Templat	5µl	varierande
Slutvolym	25µl	

SPECIFICITET

Enligt ISO-rekommendationer [12] för validering av inklusivitet och exklusivitet av en PCR metod bör DNA från 50 stammar av det agens som ska detekteras analyseras i ett inklusivitetstest, och på motsvarande sätt bör DNA från 30 stammar av agens som inte ska detekteras analyseras i ett exklusivitetstest, bilaga 2. DNA koncentrationen på extraherat material fastställdes med en Nanodrop spektrofotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). En Magnatrix pipetetteringsrobot (Nordiag, Oslo, Norge) användes för att pipettera PCR reagenser till 96-håls realtids PCR plattor (Applied Biosystems, modell Fast optical 96-well reaction plate), och vidare för att tillsätta templat i en koncentration av 10ng/reaktion. Realtids PCR utfördes med ABI7500 (Applied Biosystems, modell 7500Fast). Data analyserades manuellt i linjär skala och redovisades som erhållet Cycle treshold värde (C_t-värde), bilaga 2.

Som mått på specificiteten beräknades två procentsatser, dels en s.k. inklusivitetsprocent och dels en s.k. exklusivitetsprocent. För inklusivitetsprocenten gäller följande; den del av testade stammar, tänkta att detekteras av analysen, som detekterades. På samma sätt gäller för exklusivitetsprocenten; den del av testade stammar, tänkta att *inte* detekteras av analysen, som *inte* detekterades. För förtydligande följer ett exempel; 35 stammar av genuset Francisella analyserades med analys ”*Francisella* spp”, 94 % av dessa detekterades. Vidare analyserades 129 icke-*Francisella* stammar varav 90 % ej detekterades (se tabell 2).

LOD OCH AMPLIFIERINGSEFFEKTIVITET (E)

För bestämning av LOD och amplifieringseffektivitet analyserades 10 gångers spädningsserier motsvarande 10^7 till 1 genom ekvivalent (GE)/ reaktion. Varje spädningssteg analyserades i triplikat och C_t-värde plottades mot den logaritmiska GE koncentrationen. Efter linjär regression av kurvan användes lutningens värde för att beräkna amplifieringseffektiviteten enligt

$$\text{Effektivitet (\%)} = (10^{(-1/\text{lutning})}-1)*100$$

LOD definierades som den lägsta detekterbara koncentration av DNA i spädningsserien, och där minst ett triplikat är positiv.

RINGTEST

Från extraherat DNA från *Coxiella* och *Burkholderia sp.* sattes fyra identiska testpaneler samman, bestående av 10 eppendorfrör med ett innehåll av *Coxiella* eller *Burkholderia sp.* DNA. Rören kodades med siffror 1-10 för att innehållet skulle förbli okänt för mottagaren, och för att omöjliggöra jämförelse mellan myndigheter annat än för avsändaren fick varje myndighet innehållet numrerat med olika ordningsföljder. Utskicket gjordes från SMI till övriga myndigheter, och analyserades på SMI av en person som inte varit delaktig i arbete med att sammanställa testpanelen. Medföljande instruktioner samt svarsformulär finns bifogade i bilaga 3 respektive 4.

STABILITET AV TAQMAN PROB

Fluoroforers hållbarhet över tid studerades; dels förvaring i -20°C med endast en upptining till rumstemperartur, och dels förvaring i -20°C med sex cykler av frys-tining från -20°C till rumstemperatur. Vid varje upptining utfördes PCR analys på en spädningsserie av DNA. Innan tolkning av data justerades treshold till ett fluoroforspecifikt värde. Vid varje analys användes samma värde för att kunna jämföra C_t-värden mellan analystillfällena. Som modell användes PCR-metoden *B. anthracis* inklusive IAC för att analysera stabilitet av TaqMan prober med följande fluoroforer:

- Cy5
- Tamra
- FAM
- VIC och Hex (IAC)

DNA för *B. anthracis* och sälherpes, för samtliga analystillfällen frystes in som alikvoter i -70°C vid första testtillfället. *B. anthracis* DNA erhölls från SVA och är DNA preparerat från prover från mjältbrandsutbrottet bland boskap i Veddige i december 2008. På samma sätt frystes alikvoter av prober, primrar och övriga reagenser in i -20°C så att det, med undantag för prob- alikvoten som frys-tinas, användes nytt ej frys-tinat reagens vid varje analys. Vid varje testtillfälle späddes DNA från en ny alikvot till fyra olika koncentrationer (motsvarande 10^5 – 100 GE) och varje spädning testades i triplikat.

Stabilitetstest görs för följande tidpunkter:

- Ej frys-tinad prob: maj, juli, september och november 2009 samt januari, april, juli och oktober 2010
- Frys-tinad prob: maj, juli, september och november 2009 samt januari och april 2010

6. RESULTAT

SPECIFICITET, AMPLIFIERINGSEFFEKTIVITET OCH LOD

I tabell 2 redovisas resultat från validering med avseende på specificitet, amplifieringseffektivitet och känslighet (LOD).

Tabell 2. Resultat för validering av multiplex realtids PCR metodik

PCR	Analys	Specificitet inklusivitet (n) [a]	Specificitet exklusivitet (n) [a]	E	LOD (Pos. replikat)
Screen A	*Francisella* spp	94 % (n=35)	90 % (n=129)	94 %	1 (3/3)
	Bacillus spp	93 % (n=42)	86 % (n=122)	95 %	100 (3/3)
	Yersinia sp	83 % (n=18)	91 % (n=128)	92 %	100 (3/3)
Screen B	*Burkholderia* sp	100 % (n=19)	100 % (n=61)	110 %	10 (3/3)
	Coxiella	100 % (n=6)	100 % (n=74)	72 %	10 (3/3)
Specifik 1	*B. anthracis* - BA	100 % (n=11)	99 % (n=133)	102 %	100 (3/3)
	B. anthracis – pX01	100 % (n=7)[b]	96 % (n=133)	99 %	100 (1/3)
	B. anthracis – pX02	100 % (n=7)[b]	99 % (n=133)	100 %	100 (3/3)
Specifik 2	*Y. pestis* - YOP	100 % (n=11)	95 % (n=133)	91 %	100 (3/3)
	Y. pestis – pla1	100 % (n=11)	96 % (n=133)	90 %	10 (3/3)
	Y. pestis – caf1	100 % (n=11)	96 % (n=133)	94 %	100 (3/3)
Specifik 3	*F.tularensis* sp	100 % (n=25)	87 % (n=144)	101 %	10(3/3)
	F. tularensis typA[c]	100 % (n=5)	88 % (n=139)	95 %	1 (2/3)
	F. tularensis typB	100 % (n=19)	88 % (n=127)	94 %	10 (3/3)
Specifik 4	*B. mallei*	100 % (n=8)	100 % (n=71)	104 %	100 (1/3)
	B. pseudomallei	100 % (n=9)	99 % (n=70)	114 %	10 (2/3)

[a] *n=antal stammar inkluderade i testet.*
[b] *Attenuerade stammar av B.anthracis saknar endera av plasmiderna. Plasmidförekomst i analyserade stammar har bestämts med pyrosekvensering av Wahab el at [13].*
[c] *korsreaktion med F. philomiragia, F. novicida samt F. mediasiatica har kunnat fastställas*

RINGTEST

Från ringtestet har resultat samlats in från alla deltagande myndigheter och sammanställts i tabell 3.

Tabell 3. Resultat från ringtest. Svarstiden mättes från att proverna ankom till mottagaren till dess att svar inkom till SMI. K = korrekt detektion, EK = Ej korrekt detektion.

Myndighet	SVA	FOI	SMI	SLV
Svarstid	18 h	3 h, 50 min	6 h	23 dygn[a]
Prov 1 - *Coxiella*	K	K	K	K
Prov 2 – B. *pseudomallei*	K	K	K	EK[b]
Prov 3 – B. *pseudomallei*	K	K	K	K
Prov 4 - *Coxiella*	K	K	K	K
Prov 5 – *B. mallei*	K	K	K	K
Prov 6 – *negativ*	K	K	K	K
Prov 7 – *negativ*	K	K	K	K
Prov 8 – *Coxiella*	K	K	K	K
Prov 9 – *negativ*	K	K	K	K
Prov 10 – *Coxiella*	K	K	K	K

[a] På grund av miss i kommunikationen deltog inte Livsmedelsverket i den delen av ringtestet
[b] detektion av både B. mallei och B. pseudomallei

STABILITET AV TAQMAN PROB

Hittills (januari 2010) erhållna stabilitets-resultat från TaqMan prob förvarade i -20°C och TaqMan prob utsatt för frys-tining redovisas i bild 3 respektive bild 4.

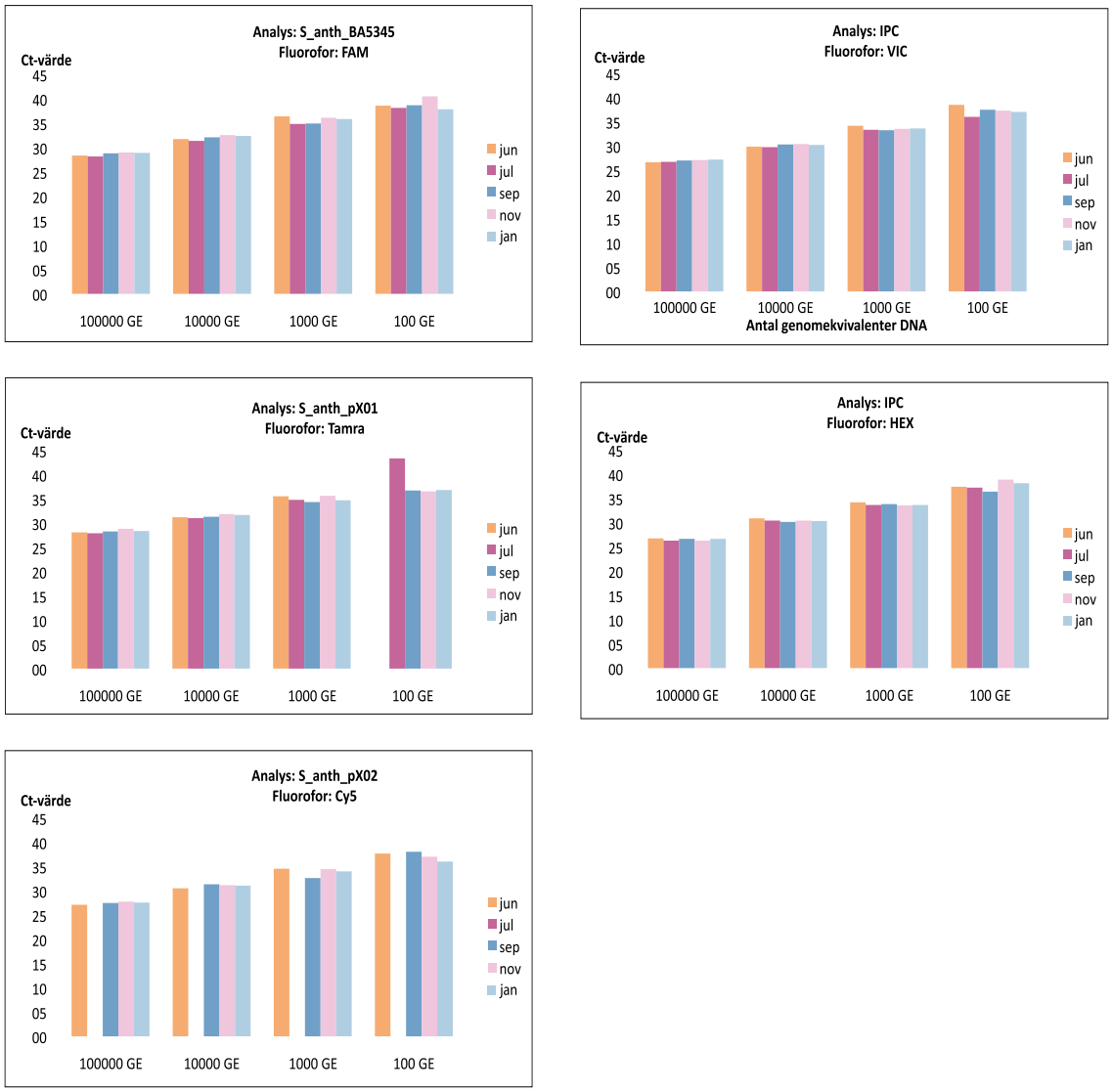


Bild 4: Resulterande Ct-värden efter att prob förvarats i -20ºC följt av en upptining till rumstemperatur.

[a] data saknas på grund av tillfälligt analysproblem

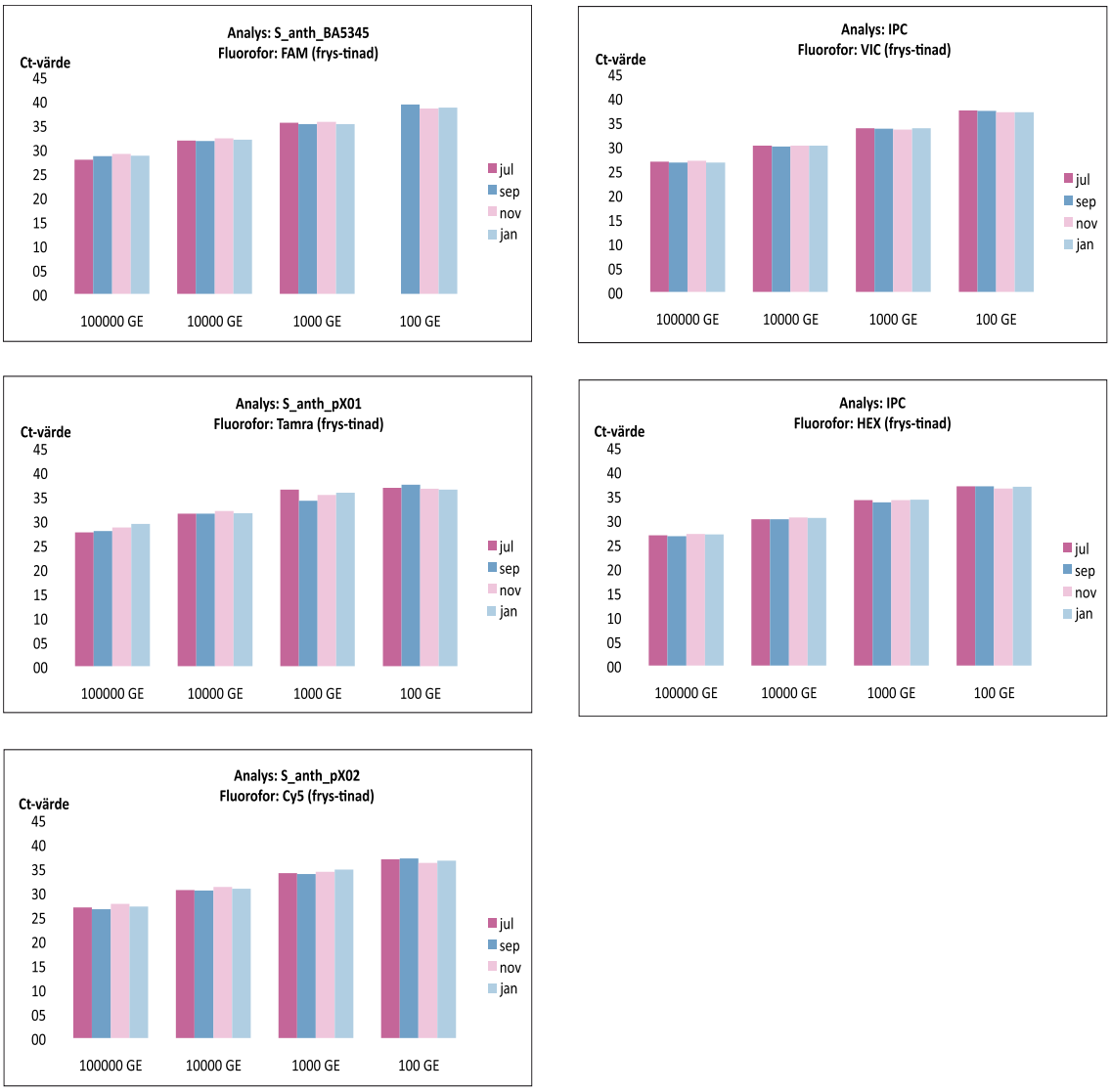


Bild 5: Resulterande Ct-värden efter att prob förvarats i -20ºC följt en frys-tinings cykel vid varje testtillfälle.

7. DISKUSSION

Den algoritm för multiplex realtids PCR som applicerats i detta projekt bygger på att minimera antalet provanalyser med en initial screening (screening A och B) på genusnivå (*Bacillus sp., Francisella sp., Yersinia sp. och Burkholderia sp.*) eller för direkt detektion av en species där tillräcklig data om genus och species saknas (*Coxiella*). Vid en eventuell positiv screening konfirmeras resultatet med speciesspecifika markörer (se bild 3). Syftet har dock varit att validera de ingående oligonukleotidernas prestanda i kombination med en IAC, vilket gör att metoden som ska kunna användas både duplext (en specifik PCR samt en intern amplifieringskontroll) eller mutliplext beroende på det enskilda laboratoriets förutsättningar, så som plattform och provkvantitet.

En validering med avseende på specificitet, effektivitet och känslighet utfördes. Resultaten för inklusivitetstester på samtliga analyser visar god inklusivitet. De analyser som ej uppnår 100 % är framför allt analyserna som ingår i screen A.

Innan några slutsatser dras från detta resultat bör det dock fastställas vad en inklusivitetsprocent för en screeninganalys innebär. Utförandet av en s.k. screening på genusnivå har som främsta syfte att i en och samma reaktion initialt detektera närvaror av upp till tre stycken riskklass 3 agens. Ett krav som då ställs på screeninganalysen är att den med all säkerhet detekterar det, inom sitt genus, riskklass 3 agens som sedan konfirmeras specifikt. Till exempel måste en analys som screenar efter *Bacillus* sp utan tvivel detektera samtliga stammar av *B. anthracis*. Ur detta perspektiv uppfyller samtliga screeninganalyser 100 % inklusivitet. Vidare är det önskvärt att en screeninganalys har ett så stort detektionsspektrum som möjligt, främst för att kunna ställa differentialdiagnoser där det exempelvis kan fastställas att ett okänt prov innehåller en *Bacillus* sp men att *B. anthracis* är uteslutet. Differentialdiagnoser av denna art är speciellt hjälpsamma i fall där en riskklass 3 bakterie, t.ex. *B. anthracis*, har en nära släkting som är betydligt mindre farlig men efter odling är förvirrande lika, t. ex *B. cereus*.

Från resultaten kan fastslås att; 1) *Bacillus* sp – analysen till 100 % detekterar *B. anthracis*, *B. cereus* samt *B. thuringiensis* men ej övriga testade *Bacillus* sp, 2) *Francisella* spp – analysen detekterar till 100 % *F. tularensis* sp, *F. philomiragia* och *F. novicida* men ej *F. noatunensis*, 3) *Yersinia* sp – analysen detekterar till 100 % *Y. pestis*, *Y.pseudotuberculosis* samt *Y. entorecolitica* men ej övriga testade *Yersinia* sp. För att uppnå en mer omfattande screening bör eventuellt dessa analyser breddas i sitt detektionsspektrum. En strategi kan vara att basera PCR: er på den bakteriella 16S-genen som ofta är relativt konserverad inom ett genus.

De analyser som vid exklusivitetstest når 100 % är *Burkholderia* sp, *Coxiella burnetii* och *B. mallei*. Det är dock anmärkningsvärt att Ct-värden som bidrar till lägre exklusivitet i de andra analyserna indikerar endast ett fåtal GE. Detta kan tolkas som kontamination i material som skickats ut, kontamination mellan prover vid analys, en korsreaktion, möjligen en problematisk datatolkning vilket kan leda till en subjektiv bedömning, eller i vissa fall en kombination av olika faktorer. Resultaten är dock mycket viktiga för efterföljande projekt, och det är av yttersta vikt att material för validering har produceras och/eller kvalitetskontrollerats med referensmetodik. Det ses även som en hög prioritering att minska graden av manuellt arbete genom att ersätta detta med automatiserade lösningar och med kvalificerad utrustning, vid t.ex. DNA extraktion eller förberedelse för PCR, för att minska graden av inverkan från den mänskliga faktorn vid hantering av ett stort antal prover på kort tid.

I ett fall, specifik analys för *F. tularensis* typ A, har en korsreaktion kunnat påvisas bioinformatiskt. Analysen baseras på en så kallad deletion i genen *pdpD*, specifik för typ A, över vilken proben var designad att binda. Korsreaktionen beror på en 8 bp lång sekvens, komplementär till probens 3´ ände,

som repeteras i icke-typA species insert vilket leder till att proben binder specifikt även till dessa. En ny metod för att skilja *F tularensis* typ A och typ B behöver därför designas och valideras. Den nya metoden bör baseras på en för *F. tularensis* typ A unik DNA sekvens som kan användas som målsekvens för PCR:en.

För att anses jämförbara bör samtliga assays ha en amplifieringseffektivitet inom intervallet 90-100 %. Som tidigare nämnts kan amplifieringseffektiviteten ses som en indikation på analysens känslighet men LOD har även experimentellt fastställs. För att uppnå en standardisering av analyser inom FBD ses det som prioriterat att fastställa QA-rekommendationer för en assays prestanda och även för optimering då en assay ej uppfyller dessa rekommendationer.

Ett ringtest genomfördes som en övning i FBDs avlastningsfunktion då en myndighet vid en B-händelse kan överskrida sin provkapacitet. Ringtestet inkluderade skickande och mottagande av extraherat material, provregistrering, molekylär analys, tolkning av data samt utsvarning till avsändarmyndighet. Resultatet föll gott ut då samtliga myndigheter erhöll ett oskadat paket innehållandes 10 prover som korrekt kunde analyseras och svar avges till SMI. Syftet med en avlastningsaktion är att prover skickas från avsändarmyndigheten och svar erhålls utefter kvalitetssäkrade och standardiserade metoder. Detta speglar FBDs långsiktiga mål med en samordnad diagnostisk kapacitet mellan myndigheter och för att nå målet ses regelbundna övningar samt upprättande av standardiseringar för storskalig provhantering vara av yttersta vikt. Övningar med större provkvantitet samt inkluderat säkerhetsklass 3-arbete och nukleinsyraextraktion är föremål för framtida projekt. Men för att dessa mer storskaliga övningar ska kunna genomföras bör standardisering för ringtest upprättas och material för ringtest QA-certifieras.

En annan parameter för en lyckad avlastningsfunktion inom FBD är tillgången till reagenser för samtliga myndigheter. Lagerhållning och kostnad för detta måste då givetvis tas i beaktande. I validerad metodik används TaqMan-prober vars stabilitet i frysförvaring är okänd. Stabiliteten av en prob kan bero av flera faktorer så som fluoroforinmärkning, oligonukleotidsekvens och eventuellt syntesprocess, eller en kombination av dessa faktorer. I studien har ett bibehållet C_t-värde för ett visst antal analyserade GE tolkats som probstabilitet. Hittills erhålla resultat indikerat ej någon signifikant ökning i C_t-värde, varken för fryst eller frys-tinad prob, vilket antyder att prob och övriga reagenser behållits intakt och att lagerhållning kan ses som ett fungerande koncept. Om senare mätningar skulle ge ett förändrat resultat bör det klargöras vilken eller vilka faktorer som påverkar stabiliteten. Till exempel om analyser med Cy5-inmärkt prob skulle ge ökande C_t-värden måste det utredas om problematiken är kopplad till just färgen Cy5 eller om andra faktorer spelar in.

8. SLUTSATS

Multiplex realtids PCR i 96-hålsformat möjliggör identifikation av upp till 3 genetiska markörer samt en internkontroll i samma reaktion. Detta medger att exempelvis 96 st. antrax-analyser kan utföras med en körning och på ett instrument som stödjer 96-hålsformat.

9. REKOMMENDATIONER FÖR NÄSTKOMMANDE PROJEKT

ÖVERGRIPANDE:

- Graden av manuellt arbete (hands-on) bör minskas genom att introducera automatiserade lösningar (hands-off) för att öka uthållighet och öka kvalité
- Tolkning av data bör automatiseras
- Kapacitet per tidsenhet bör mätas och ställas i relation till FBDs krav på kapacitet
- Nukleinsyraextraktion bör inkluderas i processen i nästkommande projekt
- Ett system för logistik kring provhantering och utsvarning bör inkluderas för att säkerställa kvalité vid stora provmängder
- QA-rekommendationer för standardisering och SOP för utförande av analys inom FBD måste utarbetas
- QA-rekommendationer för ringtest bör fastställas och utskick av material för ringtest måste QA-certifieras enligt sådana rekommendationer
- För att fullfölja validering enligt ISO-rekommendationer för inklusivitetsdata bör ytterligare stammar analyseras

DETALJERADE:

- Utveckling av ny *F. tularensis* typA – specifik analys.
- Analys av data bör kunna utföras med en mjukvarustödd presence/absence funktion, och det bör fastställas hur data tolkas och var gränsvärden för positivt och negativt utfall dras, dvs. subjektiva tolkningar bör i största möjliga mån undvikas.
- Data bör kunna exporteras
- Sälherpes som IAC behöver kvalitetssäkras med avseende på att säkerställa produktion, beredskapslager, hållbarhetstider, stabilitet och renhetsgrad (eliminera cell-linjerester och extravirlat DNA)
- Probstablilitet, kostnad för lagerhållning av reagens bör utredas vidare
- Pre-PCR metodiken bör vidareutvecklas för att minimera hands-on. T.ex. kan reagens frystorkas i plattan för att minimera variation och arbetsinsats pre-PCR, men detta måste valideras enligt QA-rekommendationer

- Vissa prover måste analyseras om då det i nuläget inte går att fastslå om det rör sig om kontamination eller korsreaktivitet. Det går heller inte att fastställa om en eventuell kontamination skett innan utskick, eller under analysens gång. Optimeringsprocedurer och standardisering, inklusive ringtest, måste utföras med en kvalitetsnivå som strävar efter att en parameter utvärderas i varje steg.
- Frågeställningen om andelen falska positiva och falska negativa resultat bör inkluderas i nästkommande projekt som ett led i QA-arbetet
- Kunskapshöjning inom det bioinformatiska området för att hitta nya biomarkörer.

10. REFERENSER

1. *Antwerpen, M.H., et al., Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for Bacillus anthracis. Mol Cell Probes, 2008. 22(5-6): p. 313-5.*
2. *Tarnvik, A. and M.C. Chu, New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1105: p. 378-404.*
3. *Woron, A.M., et al., Development and evaluation of a 4-target multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and characterization of Yersinia pestis. Diagn Microbiol Infect Dis, 2006. 56(3): p. 261-8.*
4. *Neubauer, H., et al., Development and clinical evaluation of a PCR assay targeting the metalloprotease gene (mprA) of B. pseudomallei. Zoonoses Public Health, 2007. 54(1): p. 44-50.*
5. *Scholz, H.C., et al., Detection of the reemerging agent Burkholderia mallei in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliP-based polymerase chain reaction assay. Diagn Microbiol Infect Dis, 2006. 54(4): p. 241-7.*
6. *Delsing, C.E. and B.J. Kullberg, Q fever in the Netherlands: a concise overview and implications of the largest ongoing outbreak. Neth J Med, 2008. 66(9): p. 365-7.*
7. *Arya, M., et al., Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Rev Mol Diagn, 2005. 5(2): p. 209-19.*
8. *Paterson, R.R., Internal amplification controls have not been employed in fungal PCR hence potential false negative results. J Appl Microbiol, 2007. 102(1): p. 1-10.*
9. *Dorak, M.T., Real-time PCR. 2006: Taylor & Francis Group, US.*
10. *Hurtle, W., et al., Detection of the Bacillus anthracis gyrA gene by using a minor groove binder probe. J Clin Microbiol, 2004. 42(1): p. 179-85.*
11. *van Doornum, G.J., et al., Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture. J Clin Microbiol, 2003. 41(2): p. 576-80.*
12. *ISO/FDIS 22118, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens -- Performance characteristics (under development).*
13. *Wahab, T., et al., Pyrosequencing Bacillus anthracis. Emerg Infect Dis, 2005. 11(10): p. 1527-31.*

BILAGA 1

Specificitet	Genetisk markör	Oligonu-kleotid	Sekvens	Fluorofor
Screen A				
Bacillus spp	*rpoB*	A_bac_rpoBF	ACCTCTTCTTATCAGTGG	
Bacillus spp	*rpoB*	A_bac_rpoBR	CCCGTAAAGTCTTCAATC	
Bacillus spp	*rpoB*	A_bac_rpoBCy5	CATTTCTCGCAAACCCTCATCAAG	Cy5
Francisella spp	*ISFtu2*	A_fra_AISFtu2F	CCCTGATTTACAAGAAGTC	
Francisella spp	*ISFtu2*	A_fra_ISFtu2R	CTTGGTTATCATCTTTATCATATC	
Francisella spp	*ISFtu2*	A_fra_ISFtu2Tamra	TGATTCAACAATAGCAAGAGCACAT	Tamra
Yersinia sp	*Inv*	A_yer_AiQYp1F	TTGACACAACCTTAGGCAATATGG	
Yersinia sp	*Inv*	A_yer_AiQYp1R	ACTGGTCAATGGTGCGCTATAA	
Yersinia sp	*inv*	A_yer_invFam	CGTTATCACGGATCACAATGACGGCA	Fam
Screen B				
Burkholderia sp	*FliC*	B_burk_FliCF	GCAGATCTCGGAAGTG	
Burkholderia sp	*FliC*	B_burk_FliCR	CGTCGAGGATGTTCTTG	
Burkholderia sp	*FliC*	B_burk_FliCFam	TATCGCTTCGCAGACGAACTAC	Fam
Coxiella	*IS1111*	B_cox_IS1111aF	CACGAGACGGGTTAAG	
Coxiella	*IS1111*	B_cox_IS1111aR	CACACGCTTCCATCAC	
Coxiella	*IS1111*	B_cox_IS1111aTamra	TCAGTATGTATCCACCGTAGCCA	Tamra
Specifik 1				
B. anthracis	*BA-5345*	S_anth_5345F	TTCCCAATAAATGTCTGTATC	
B. anthracis	*BA-5345*	S_anth_5345R	CATGGTACTACTCAAACAAG	
B. anthracis	*BA-5345*	S_anth_BA5345Fam	TCCTTCTATGTATGTACGAGTCTCTGA	Fam
B. anthracis	*pagA-pX01*	S_anth_pX01pagAF	GAGTGATGAATATACATTTGC	
B. anthracis	*pagA-pX01*	S_anth_pX01pagAR	GAAGCTTTATTAATCACTTCTTG	
B. anthracis	*pagA-pX01*	S_anth_pX01pagACy5	TTCCGCTGATAATCATGTAACAATGTG	Cy5
B. anthracis	*capD-pX02*	S_anth_pX02capDF	CTGTCTGGATAAGTGTTTC	
B. anthracis	*capD-pX02*	S_anth_pX02capDR	AAGCCACGTATTTATTCTG	
B. anthracis	*capD-pX02*	S_anth_ pX02capDTamra	AGTATCTTCTATCCGAATGGTGAACCT	Tamra
Specifik 2				
Y. pestis	*YPO1091*	S_pest_YPO1091F	GTAGGATCGGTAATTTCG	
Y. pestis	*YPO1091*	S_pest_YPO1091R	CTCACGATTGAAGAAATTG	
Y. pestis	*YPO1091*	S_pest_YPO1091Fam	TTGCCAATACCAGTGCGTG	Fam
Y. pestis	*pPCP1-pla*	S_pest_PlaF	TCCTGCTACAAATGTTAATC	
Y. pestis	*pPCP1-pla*	S_pest_PlaR	ACCTGCTTTATAATTCTCATC	
Y. pestis	*pPCP1-pla*	S_pest_plaCy5	TGCCAATGAATATGACCTCAATGTG	Cy5

Specificitet	Genetisk markör	Oligonu-kleotid	Sekvens	Fluorofor
Y. pestis	*pMT1-caf1*	S_pest_caf1F	AGTGGTTCCTGTTTTATAG	
Y. pestis	*pMT1-caf1*	S_pest_caf1R	GCTCCAATTACAATTATGG	
Y. pestis	*pMT1-caf1*	S_pest_caf1RTamra	CAAGAGTAAGCGTACCAACAAGTAATT	Tamra
Specifik 3				
F.tularensis sp	*Tul4*	S_tul_Tul4F	CTTGGGCAACTGTAACAG	
F.tularensis sp	*Tul4*	S_tul_Tul4R	GCGATTACTTCTTTGTCATAAAC	
F.tularensis sp	*Tul4*	S_tul_Tul4Fam	CCGCTACAGAAGTTATTACCTTGCTT	Fam
F. tularensis typA	*pdpD*	S_tultul_pdpDF	GGTTGGTTTAACCAAATC	
F. tularensis typA	*pdpdD*	S_tultul_pdpDR	CTCAGAGACATCAATTAAAAG	
F. tularensis typA	*pdpdD*	S_tulhol_pdpDCy5	CTGAGCAGAATTTTCTAGAAGACCTTC	Cy5
F. tularensis typA	*Junction 3' region-ISFtu2*	S_tulhol_hol-F	GCTACTGAGAAACTATTTTTG	
F. tularensis typB	*Junction 3' region-ISFtu2*	S_tulhol_hol-R	AGTGGAAAAATAAATGACATTC	
F. tularensis typB	*Junction 3' region-ISFtu2*	S_tulhol_hol-Tamra	AACCTAGTTCAACCTCAAGACTT	Tamra
Specifik 4				
B. mallei	*FliP*	S_mal_FliPF	GACTTTGCTAGAAGCCCATTGG	
B. mallei	*FliP*	S_mal_FliPR	AGCGACAGCACGACGATG	
B. mallei	*FliP*	S_mal_FliPFam	CGTGAAGCTCGTTGACCTGCCC	Fam
B. pseudomallei	*mrpA*	S_pse_mrpAF	GCGATATTCCTTATGAAGTGTGG	
B. pseudomallei	*mrpA*	S_pse_mrpAR	ACAATCGAATCGGTGCCTAC	
B. pseudomallei	*mrpA*	S_pse_mrpATamra	TCAATCTCCGATAGCCGCCTTGC	Tamra
IPC				
PhHV-1	*gB-polymerase gene*	IPCF	GGGCGAATCACAGATTGAATC	
PhHV-1	*gB-polymerase gene*	IPCR	GCGGTTCCAAACGTACCAA	
PhHV-1	*gB-polymerase gene*	IPCP	TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC	Vic/Hex

BILAGA 2

Godkänd inklusivitet
Underkänd exklusivitet eller underkänd inklusivitet

Analysfel i PCR:
Erhållet Ct-värde för ej exponentiell kurva
Stam ej analyserad för assay

			Yersinia sp	*Francisella* sp	*Bacillus* sp	*Y. pestis* (caf1)	*Y.pestis* (pla1)	*Y. pestis* (YPO1091
Nr	**Organism**	**Beteckning**						
1	*Bacillus anthracis*	NCTC 109	38,1	39,0	18,9	38,3	nd	39,0
2	*Bacillus anthracis*	NCTC 1328	38,1	35,0	20,5	nd	nd	38,5
3	*Bacillus anthracis*	NCTC 2620	nd	nd	23,3	nd	nd	nd
4	*Bacillus anthracis*	NCTC 5444	nd	nd	20,5	nd	nd	nd
5	*Bacillus anthracis*	NCTC 7752	38,6	34,8	21,0	36,5	nd	37,1
6	*Bacillus anthracis*	NCTC 7753	39,3	34,2	19,9	nd	nd	nd
7	*Bacillus anthracis*	NCTC 8234	nd	36,4	19,6	nd	nd	nd
8	*Bacillus anthracis*	NCTC 10340	nd	nd	28,0	nd	nd	nd
9	*Bacillus anthracis*	ATCC 4229	nd	nd	21,0	nd	nd	nd
10	*Bacillus anthracis*	ATCC 7702	nd	38,0	20,5	38,6	nd	37,1
11	*Bacillus anthracis*	Kliniskt isolat dec-09, 76342	nd	nd	26,3	nd	nd	nd
12	*Bacillus cereus*	ATCC9946	nd	nd	16,6	nd	nd	nd
13	*Bacillus cereus*	ATCC33019		36,1	16,7	nd	nd	nd
14	*Bacillus cereus*	ATCC33018	nd	nd	24,2	nd	nd	nd
15	*Bacillus cereus*	ATCC7997	nd	37,9	18,5	nd	36,8	nd
16	*Bacillus cereus*	ATCC11778	nd	35,2	16,7	nd	nd	nd
17	*Bacillus cereus*	5	nd	nd	24,5	nd	nd	nd
18	*Bacillus cereus*	ATCC14579	nd	37,0	16,4	nd	nd	nd
19	*Bacillus cereus*	ATCC 10702 (Biotracer)	nd	nd	23,2	nd	nd	nd
20	*Bacillus cereus*	ATCC 10987 (Biotracer)	nd	nd	26,8	nd	nd	nd
21	*Bacillus cereus*	Biotracer A	nd	nd	19,1	nd	nd	nd
22	*Bacillus cereus*	Biotracer B	nd	nd	21,4	nd	nd	nd
23	*Bacillus cereus*	Biotracer C	nd	nd	21,2	nd	nd	nd
24	*Bacillus cereus*	NVH1518-99 (FFI)/ KBM1	nd	nd	18,5	nd	nd	nd
25	*Bacillus cereus*	NVH0597-99 (FFI)/KBM2	nd	nd	19,0	nd	nd	nd
26	*Bacillus cereus*	NVH0500-00 (FFI)/ KBM3	nd	nd	18,2	nd	nd	nd
27	*Bacillus cereus*	NVH360-97 (FFI)/ KBM4	nd	nd	18,7	nd	nd	nd
28	*Bacillus cereus*	NVH1280-99 (FFI)/KBM5	nd	nd	18,6	nd	nd	nd
29	*Bacillus cereus*	NVH1039-00 (FFI)/ KBM6	nd	nd	22,0	nd	nd	nd
30	*Bacillus cereus*	"Stam Jocke" F	nd	nd	18,3	nd	nd	nd
31	*Bacillus coagulans*	1992 /KBM9	nd	nd	35,6	nd	nd	nd
32	*Bacillus coagulans*	Nöt-90/ KBM12	nd	nd	nd	nd	nd	nd
33	*Bacillus licheniformis*	Lamm-89/ KBM11	nd	nd	nd	nd	nd	nd
34	*Bacillus licheniformis*	Häst-91 / KBM13	nd	nd		nd	nd	nd

B. anthracis (BA-5345)	*B. anthracis* (pXO1)	*B. anthracis* (pXO2)	*F. tula-rensis* sp	*F. tularensis* typA	*F. tularensis* typB	*Coxiella*	*Burk-holderia* sp	*B. mallei*	*B. pseudo-mallei*
20,2	23,3	27,5	nd	nd	nd				
22,3	22,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
24,2	24,9	23,0	nd	nd	nd				
22,0	nd	20,7	nd	nd	nd				
22,6	nd	21,0	nd	nd	nd				
21,5	nd	20,5	nd	nd	nd				
20,7	20,4	nd	nd	nd	nd				
30,0	30,5	29,8	nd	nd	nd				
21,9	nd	20,5	nd	nd	nd				
22,0	21,6	nd	nd	nd	nd				
26,3	26,0	25,5		nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	40,6				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd		nd	38,5	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd		nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd		nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd		nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd		nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				

Godkänd inklusivitet
Underkänd exklusivitet eller underkänd inklusivitet
Analysfel i PCR:
Erhållet Ct-värde för ej exponentiell kurva
Stam ej analyserad för assay

			Yersinia sp	*Francisella* sp	*Bacillus* sp	*Y. pestis* (caf1)	*Y.pestis* (pla1)	*Y. pestis* (YPO1091
Nr	**Organism**	**Beteckning**						
35	*Bacillus licheniformis*	Am nöt /KBM16	nd	nd	nd	nd	nd	nd
36	*Bacillus subtilis*	ATCC106051	nd	nd	34,7	nd	nd	nd
37	*Bacillus subtilis*	ATCC6633-9	nd	nd	32,0	nd	nd	nd
38	*Bacillus subtilis*	7137-A-12	nd	nd	36,6	nd	nd	nd
39	*Bacillus subtilis*	ATCC9372	nd	36,3	35,4	nd	nd	nd
40	*Bacillus thurigensis*	22499	nd	nd	17,1	nd	nd	nd
41	*Bacillus thurigensis biovar israeliensis*	Berliner 1915, DSMZ5724	nd	nd	21,3	nd	nd	nd
42	*Bacillus thurigensis biovar kurstaki*	Kurstaki	nd	nd	18,5	nd	nd	nd
43	*Bordatella bronciseptica*	CCUG 219	nd	nd	nd	nd	nd	nd
44	*B. cenocepacia*	CCUG 46446	nd	nd	nd	nd	nd	nd
45	*Burkholderia glumae*	CCUG 20835	nd	nd	nd	nd	nd	nd
46	*Burkholderia mallei*	NCTC 120	nd	30,4	nd	nd	nd	nd
47	*Burkholderia mallei*	NCTC 3708						
48	*Burkholderia mallei*	NCTC 3709						
49	*Burkholderia mallei*	NCTC 10229						
50	*Burkholderia mallei*	NCTC 10245						
51	*Burkholderia mallei*	NCTC 10247						
52	*Burkholderia mallei*	NCTC 10248						
53	*Burkholderia mallei*	NCTC 10260						
54	*B. pseudomallei*	NCTC 7431	nd	nd	nd	nd	nd	nd
55	*B. pseudomallei*	NCTC 8707	nd	nd	nd	nd	nd	nd
56	*B. pseudomallei*	NCTC 6700						
57	*B. pseudomallei*	NCTC 10247						
58	*B. pseudomallei*	NCTC 4846						
59	*B. pseudomallei*	NCTC 8708						
60	*B. pseudomallei*	NCTC 3783						
61	*B. pseudomallei*	NCTC 8061						
62	*B. pseudomallei*	NCTC 1688						
63	*B. thailandensis*	CCUG 48851	nd	nd	nd	nd	nd	nd
64	*B. vietinamiensis*	CCUG 34169	nd	nd	nd	nd	nd	nd
65	*Campylobacter coli*	SLV-271	nd	nd	nd	nd	nd	nd
66	*Campylobacter jejuni*	SLV-542	nd	nd	nd	nd	nd	nd
67	*Coxiella - lysat*	Ct 21						
69	*Coxiella* DNA ifrån ringtest (ej isolat)	Caprine foetal fluid , Ct 29 D						

B. anthracis (BA-5345)	*B. anthracis* (pXO1)	*B. anthracis* (pXO2)	*F. tula-rensis* sp	*F. tularensis* typA	*F. tularensis* typB	*Coxiella*	*Burk-holderia* sp	*B. mallei*	*B. pseudo-mallei*
nd	nd	nd			nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd		nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	37,5	33,3	37,5	35,6	nd	28,2	26,5	nd
						nd	27,9	25,3	nd
						nd	24,9	22,4	nd
						nd	25,8	23,6	32,0
						nd	26,9	24,6	nd
						nd	26,3	23,9	nd
						nd	28,5	26,9	nd
						nd	25,9	23,5	nd
nd	nd	nd	nd		nd	nd	25,6	nd	23,8
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	24,6	nd	23,7
						nd	25,0	nd	23,6
						nd	25,2	nd	23,8
						nd	26,0	nd	24,2
						nd	25,7	nd	24,1
						nd	26,1	nd	24,5
						nd	25,0	nd	23,4
						nd	23,8	nd	22,7
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	23,1	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
						30,3	nd	nd	nd
					33,9	nd	nd	nd	nd

Godkänd inklusivitet
Underkänd exklusivitet eller underkänd inklusivitet
Analysfel i PCR:
Erhållet Ct-värde för ej exponentiell kurva
Stam ej analyserad för assay

			Yersinia sp	*Francisella* sp	*Bacillus* sp	*Y. pestis* (caf1)	*Y.pestis* (pla1)	*Y. pestis* (YPO1091
Nr	**Organism**	**Beteckning**						
70	*Coxiella DNA ifrån ringtest* (ej isolat)	Caprine placenta Ct 22 E						
71	*Coxiella DNA ifrån ringtest* (ej isolat)	Bovine placenta, Ct 23 H						
72	*Coxiella DNA ifrån ringtest* (ej isolat)	Placenta Ct 14 I	nd	nd	nd	nd	nd	nd
73	*Coxiella DNA ifrån ringtest* (ej isolat)	Placenta Ct 14 J						
74	*Enterobacter cloceae*	SLV-011	nd	nd	nd	nd	nd	nd
75	*Enterococcus duran*	SLV-078	nd	nd	nd	nd	nd	nd
76	*Escherichia coli*	U226	nd	nd	nd	nd	nd	nd
77	*Escherichia coli*	B266	nd	nd	nd	nd	nd	nd
78	*Escherichia coli*	L278	nd	nd	nd	nd	nd	nd
79	*Escherichia coli*	UM245	nd	nd	nd	nd	nd	nd
80	*Escherichia coli*	S262	nd	nd	nd	nd	nd	nd
81	*Escherichia coli K1*	XL-1 blue	nd	nd	nd	nd	nd	nd
82	*Escherichia coli EIEC*	121	nd	nd	nd	nd	nd	nd
83	*Escherichia coli O113:H21*	98NK2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
84	*Escherichia coli O157*	SLV-479	nd	nd	nd	nd	nd	nd
85	*Escherichia coli O157*	EDL933	nd	nd	nd	nd	nd	nd
86	*Escherichia coli O157:H-*	493/89	nd	nd	nd	nd	nd	nd
87	*Escherichia coli O26:H11*	H2954/06	nd	nd	nd	nd	nd	nd
88	*EHV2 (Ekvint herpes virus)*	Från MOD (VIP)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
89	*FHV (Felint herpes virus)*	Från MOD (VIP)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
90	*F. noatunesis*	NV1 Ö383 Norge	nd	nd		nd	nd	nd
91	*F. noatunesis*	Lysekil torsk 2 njure Ö391	nd	nd	nd	nd	nd	nd
92	*F. novicida-like*	110, fx2, FSC159	nd	10,4		nd	33,9	nd
93	*F. novicida-like*	Houston, 2766, fx1, FSC160, 156	39,3	13,3		38,3	35,3	38,9
94	*F. novicida-like*	F58, FSC 545	39,7	14,4	nd	nd	nd	38,6
95	*F. novicida-like*	FNSp1, FSC454	nd	26,0	nd	nd	nd	nd
96	*F. philomiragia*	CCUG 12603, FSC145	36,6	27,6		37,0	35,4	nd
97	*F. philomiragia*	Swiss, E6588 , FSC154	nd	28,2	nd	nd	nd	nd
98	*F. philomiragia*	ATCC 25016, 075-1, FSC037	nd	20,9	nd	38,5	38,0	nd
99	*F. philomiragia*	ATCC 25018, 077-1, FSC039	nd	21,1		nd	nd	nd

B. anthracis (BA-5345)	*B. anthracis* (pXO1)	*B. anthracis* (pXO2)	*F. tula-rensis* sp	*F. tularensis* typA	*F. tularensis* typB	*Coxiella*	*Burk-holderia* sp	*B. mallei*	*B. pseudo-mallei*
					27,1	nd	nd	nd	nd
					27,8	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	19,1	nd	nd	nd
						19,0	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	13,8	14,8	nd				
nd	nd	nd	12,5	13,2	36,4				
nd	nd	nd	16,5	32,3	33,5				
nd	nd	nd	33,9	29,2	34,0				
nd	nd	nd	30,0	31,0	36,8				
nd	nd	nd	31,3	32,5	35,0				
nd	nd	nd	33,9	nd	35,3				
nd	nd	nd	34,6	nd	36,0				

Godkänd inklusivitet
Underkänd exklusivitet eller underkänd inklusivitet
Analysfel i PCR:
Erhållet Ct-värde för ej exponentiell kurva
Stam ej analyserad för assay

			Yersinia sp	*Francisella* sp	*Bacillus* sp	*Y. pestis* (caf1)	*Y.pestis* (pla1)	*Y. pestis* (YPO1091
Nr	**Organism**	**Beteckning**						
100	*F. tularensis holartica*	FSC 130	nd	13,6	32,6	nd	nd	nd
101	*F. tularensis holartica*	FSC 133	nd	13,3		nd	nd	nd
102	*F. tularensis holartica*	FSC 150	nd	13,1	nd	nd	nd	nd
103	*F. tularensis holartica*	FSC 151	nd		nd	nd	nd	nd
104	*F. tularensis holartica*	FSC 152	nd	12,3		nd	nd	nd
105	*F. tularensis holartica*	T4, SBL vaccin	nd	15,7		nd	nd	nd
106	*F. tularensis holartica*	T8, Fästing	nd	21,6	nd	nd	nd	nd
107	*F. tularensis holartica*	T14, V74/85		21,9	nd	nd	nd	nd
108	*F. tularensis holartica*	T11, O2385/84	nd	16,4	nd	nd	nd	nd
109	*F. tularensis holartica*	T13, Finland	nd	21,6	nd	nd	nd	nd
110	*F. tularensis holartica*	T26, V1173/02	nd	13,3		nd	nd	nd
111	*F. tularensis holartica*	T27, V851/03	nd	21,3		nd	nd	nd
112	*F. tularensis holartica*	T28, V955/03	nd	21,3	nd	nd	nd	nd
113	*F. tularensis holartica*	T29, V1019/03	nd	21,6	nd	nd	nd	nd
114	*F. tularensis holartica*	T30, V114/05	nd	21,6	nd	nd	nd	nd
115	*F. tularensis holartica*	T31, V553/05	nd	21,7	nd	nd	nd	nd
116	*F. tularensis holartica*	T32, V729/05	nd	22,0	nd	nd	nd	nd
117	*F. tularensis holartica*	T33	nd	21,7		nd	nd	nd
118	*F. tularensis holartica*	T34, V909/00	nd	22,0	nd	nd	nd	nd
119	*F. tularensis mediasiatica*	FSC 147	nd	16,7	nd	nd	nd	nd
120	*F. tularensis tularensis*	FSC 041	39,2	14,5	nd	nd	nd	nd
121	*F. tularensis tularensis*	FSC 042	nd	14,0		nd	nd	nd
122	*F. tularensis tularensis*	FSC 046		14,3	nd	nd	nd	nd
123	*F. tularensis tularensis*	FSC 054	nd	14,1		nd	nd	nd
124	*F. tularensis tularensis*	FSC 237	41,6	15,5	28,9	nd	nd	nd
125	*Fusarium culmorum*	F.c	nd	nd	nd	nd	nd	nd
126	*Fusarium graminearum*	F.g	nd	nd	nd	nd	nd	nd
127	*Klebsiella pneumonaie*	SLV-186	nd	nd	nd	nd	nd	nd
128	*Listeria ivanovii*	SLV-348	nd	nd	nd	nd	nd	nd
129	*L. monocytogones*	SLV-513	nd	nd	nd	nd	nd	nd
130	*Proteus mirabilis*	SLV-374	nd	nd	nd	nd	nd	nd
131	*P. aeruginosa*	SLV-395	nd	nd	nd	nd	nd	nd
132	*P. aeruginosa*	SLV-453	nd	nd	nd	nd	nd	nd
133	*Salmonella dublin*	SLV-242	nd	nd	nd	nd	nd	nd

B. anthracis (BA-5345)	*B. anthracis* (pXO1)	*B. anthracis* (pXO2)	*F. tula-rensis* sp	*F. tularensis* typA	*F. tularensis* typB	*Coxiella*	*Burk-holderia* sp	*B. mallei*	*B. pseudo-mallei*
nd	nd	nd	18,4		19,3				
nd	nd	nd	18,1	nd	19,1				
nd		nd	17,9	nd	18,9				
nd		nd	17,9		19,0				
nd	nd	nd	17,1		18,3				
nd	nd	nd	20,5	nd	21,6	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	25,5	nd	29,9				
nd	nd	nd	25,6	nd	29,0				
nd	nd	nd	21,6	nd	22,5				
nd	nd	nd	25,4	nd	28,8				
nd	nd	nd	17,7	nd	18,7				
nd	nd	nd	25,0	nd	28,2				
nd	nd	nd	25,5	nd	28,6				
nd	nd	nd	25,3	nd	28,7				
nd	nd	nd	25,4	nd	28,8				
nd	nd	nd	25,2		28,7				
nd	nd	nd	25,6	nd	29,2				
nd	nd	nd	25,6	nd	29,1				
nd	nd	nd	25,7	nd	29,4				
nd	nd	nd	19,7	19,8	36,0				
nd	nd	nd	17,7	17,6	36,3	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	17,3	17,6	nd				
nd	nd	nd	17,3	18,4	nd				
nd	nd	nd	17,3	17,8	45,0				
nd		nd	18,8	19,0	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Godkänd inklusivitet
Underkänd exklusivitet eller underkänd inklusivitet
Analysfel i PCR:
Erhållet Ct-värde för ej exponentiell kurva
Stam ej analyserad för assay

			Yersinia sp	*Francisella* sp	*Bacillus* sp	*Y. pestis* (caf1)	*Y.pestis* (pla1)	*Y. pestis* (YPO1091
Nr	**Organism**	**Beteckning**						
134	*S. typhimurium*	SLV-248	nd	nd	nd	nd	nd	nd
135	*Shigella boydii*	33/08	nd	nd	nd	nd	nd	nd
136	*Shigella dysenterieae*	15/08	nd	nd	nd	nd	nd	nd
137	*Shigella flexneri*	100/08	nd	nd	nd	nd	nd	nd
138	*Shigella sonnei*	SLV-197	nd	nd	nd	nd	nd	nd
139	*S. aureus*	SLV-438	nd	nd	nd	nd	nd	nd
140	*S. xylosus*	SLV-283	nd	nd	nd	nd	nd	nd
141	*Taylorella equigenitalis*	CCUG 16464	nd	nd	nd	nd	nd	nd
142	*Taylorella equigenitalis*	CCUG 10786	nd	nd	nd	nd	nd	nd
143	*Vibrio cholerae*	CCUG 4070	nd	nd	nd	nd	nd	nd
144	*V. parahaemolyticus*	CCUG 4224	nd	nd	nd	nd	nd	nd
145	*Vibro vulnificus*	CCUG 16397	nd	nd	nd	nd	nd	nd
146	*Wolbachia persica*	ATCC VR-331	nd	33,0	nd	nd	nd	nd
147	*Yersinia enterocolitica*	SLV-408	37,2	nd	nd	nd	nd	nd
148	*Yersinia frederiksenii*	949021	nd	nd	nd	nd	nd	nd
149	*Yersinia intermedia*	SLV-472	nd	nd	nd	nd	nd	nd
150	*Yersinia kristensenii*	2147	nd	nd	nd	nd	nd	nd
151	*Yersinia pestis*	KIM	23,5		nd	22,5	17,9	22,7
152	*Yersinia pestis*	144-03	20,7	nd	nd	19,4	15,1	20,2
153	*Yersinia pestis*	570-04	22,0	nd	nd	20,0	16,3	21,3
154	*Yersinia pestis*	2028-04	23,1	nd	nd	21,2	17,4	22,2
155	*Yersinia pestis*	2868-03	22,0	nd	nd	20,3	16,4	21,2
156	*Yersinia pestis*	8775-03	22,4	nd	nd	37,9	17,0	21,4
157	*Yersinia pestis*	8779-04	22,2	32,0	15,0	40,9	16,8	21,2
158	*Yersinia pestis*	10029-03	23,1	nd	nd	21,2	16,6	22,0
159	*Yersinia pestis*	10030-01	22,5	28,0	nd	21,3	17,0	21,5
160	*Yersinia pestis*	10329-02	23,8	30,0	33,0	21,6	17,5	22,6
161	*Yersinia pestis*	10330-03	24,0	nd	nd	21,7	18,2	22,8
162	*Yersinia pseudotb*	SVA	18,8	nd	nd	nd	nd	nd
163	*Yersinia pseudotb*	typ 6 nr 1	20,4	nd	nd	nd	nd	nd
164	*Y. pseudotuberculosis*	TAVA81	19,8	nd	nd			

B. anthracis (BA-5345)	*B. anthracis* (pXO1)	*B. anthracis* (pXO2)	*F. tula-rensis* sp	*F. tularensis* typA	*F. tularensis* typB	*Coxiella*	*Burk-holderia* sp	*B. mallei*	*B. pseudo-mallei*
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	34,9	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd		nd	nd				
43,4	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	nd	nd	40,2				
nd	nd	nd	nd	nd	nd				
nd	nd	nd	38,6	nd	nd				
nd	nd	nd	37,6	nd	nd				
nd	nd	nd	38,2	nd	nd				
nd	nd	nd	37,4	nd	39,9				
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

BILAGA 3

Ringtest för molekylär detektion av *Coxiella, Burkholderia mallei* och *Burkholderia pseudomallei*

BESKRIVNING

En panel innehållande tio (10) eppendorfrör med ett innehåll av extraherat DNA från antingen *Coxiella, Burkholderia mallei, Burkholderia pseudomallei* eller negativa prover skickas från SMI vardera till SVA, Livsmedelsverkat och FOI. Eppendorfrören är märkta med siffror, 1-10, för att innehållet ska vara okänt för mottagaren som förväntas fastställa innehållet med PCR-analys, och innehåller en volym av 100 ul. Övningen har följande syften och förväntade resultat:

- Mätning av tid från det att provet skickas från SMI, till dess att analyssvar inkommit till SMI
- Mätning av analyssvarens kvalité med avseende på korrekt identifiering av innehåll
- Generera erfarenhet av ringtest av molekylär diagnostik inom FBD för att i framtiden kunna utföra denna typ av övning i större skala, och med fler prover.

Från SMI till SVA och Livsmedelsverket skickas paneler med budbil. Från SMI till FOI skickas panelen med vanlig post. Panelen innehåller inget levande material, men för att säkerställa att innehållet inte skadas används dubbla kuvert, varav det yttersta är vadderat.

Panelerna har satts samman av Sandra Rodin på SMI, och på SMI sker analys av annan person som inte varit delaktig i förberedelserna inför detta ringtest. Analysresultatet rapporteras i exceldokumentet Analysresultat_FBD_ringtest_Burk_Coxdetektion (blå fält) och skickas till Sandra Rodin via e-mail sandra.rodin@smi.se.

Rapporten förväntas innehålla följande uppgifter:

1. Tid för mottagande av prov.
2. En bedömning om paketets skick, dvs eventuella skador dokumenteras.
3. Tid för slutförd analys.
4. Resultat av qPCR-analys med avseende på *Coxiella, Burkholderia mallei* och *Burkholderia pseudomallei.*

BILAGA 4

Ringtest FBD:

qPCR-analys med avseende på *Coxiella*, *Burkholderia mallei* och *Burkholderia pseudomallei*

Laboratorium _____
(FOI/Livsmedelsverket/SLV/SMI)

Ankomstdag _____

Ankomsttid _____

Paketets skick _____ Om skadat, beskrivning av skadan:
(utan anmärkning/skadat) _____

Analysdag _____ _____

Analysresultat

	Agens som detekterats:	Målgen/-element för PCR	Singleplex/ duplex/multiplex	Referens för PCR-metod	Ev. kommentar
Prov 1					
Prov 2					
Prov 3					
Prov 4					
Prov 5					
Prov 6					
Prov 7					
Prov 8					
Prov 9					
Prov 10					

Ifylls av SMI:

Skickat _____

Svar inkom _____

Dag _____ Tid _____

Analysresultat	**Korrekt/ej korrekt**
Prov 1	
Prov 2	
Prov 3	
Prov 4	
Prov 5	
Prov 6	
Prov 7	
Prov 8	
Prov 9	
Prov 10	

STATENS VETERINÄRMEDICINSKA ANSTALT

SMITTSKYDDSINSTITUTET

LIVSMEDELSVERKET
NATIONAL FOOD ADMINISTRATION

FOI