

PROJEKTRAPPORT

Detektion av *Francisella tularensis*



Ann-Christin Andersson, Karin Malm, Malin Granberg, Anna Peterzon, Karin Sandstedt, Joakim Ågren

ABSTRACT

Forum for Biopreparedness Diagnostics (FBD) is a collaborative effort between four Swedish governmental institutes, National Food Agency, 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.

The aim of this project was to harmonize methods for cultivation and molecular detection of *Francisella tularensis* within FBD. In 2009, an evaluation of multiplex real-time PCR assays for a number of category A pathogens was performed within FBD. The result showed a need to further develop real-time PCR assays for *Francisella tularensis*. In this study, an improved probe-based real-time PCR assay was developed for specific detection of the entire *Francisella spp.*, *F. tularensis subspecies tularensis* (type A) and *F. tularensis subspecies holarctica* (type B) genus. In addition, a DNA reference collection was established for further harmonization of molecular detection of *F. tularensis*. Furthermore, harmonization of methods for storage of *F. tularensis* strains was performed as well as evaluation of sample preparation methods for different sample matrices (animal organs, blood, and water samples) using DNA-extraction robot.

In conclusion, increased preparedness was achieved by improved specificity for molecular identification of *F. tularensis*.

Titel:	Detektion av <i>Francisella tularensis</i> Publ. nr. MSB333, ISBN 978-91-7383-177-2
Projektid:	16 februari 2010 till 9 juni 2011
Projektledare:	Ann-Christin Andersson, Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI)
Projektgrupp:	Karin Malm, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Malin Granberg, Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI), Anna Peterzon, Smittskyddsinstitutet (SMI), Karin Sandstedt, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Joakim Ågren, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA)
Kontaktperson i FBDs styrgrupp:	Viveca Bäverud, e-post: Viveca.Baverud@sva.se Rickard Knutsson SVA, e-post Rickard.Knutsson@sva.se
Styrgrupp:	Mats Forsman ordf. 2010 (FOI), Mona Byström (FOI), Hans Lindmark (Livsmedelsverket), Annelie Lundin Zumpe, ordf. 2011 (Livsmedelsverket), Caroline Schönning (SMI), Andreas Bråve (SMI), Rickard Knutsson (SVA), Viveca Bäverud (SVA)
Finansiering:	Projektet har finansierats genom tilldelning av MSB anslag 2:4 Krisberedskap
Layout:	Tecknarn i Roslagen
Tryck:	Danagårds Grafiska

INNEHÅLL

1. Bakgrund	4
2. Syfte och mål	6
3. Material och metoder	7
3.1 Delprojekt 1	7
3.1.1 Odling	7
3.1.2 Infrysningmetod för sparande av stammar	7
3.1.3 Odling och DNA-extraktion av stammar till referensbibliotek	7
3.2 Delprojekt 2	7
3.2.1 Signatur- alternativt SNP-analys för detektion av <i>Francisella</i>	7
3.2.2 Utvärdering av kommersiella realtids-PCR mixar för SYBR Green baserad SNP-analys	8
3.2.3 Utvärdering av probebaserad SNP-analys	8
3.3 Delprojekt 3	8
3.3.1 DNA-extraktion av organprover med EZ1-extraktionsrobot	8
4. Resultat	9
4.1. Delprojekt 1	9
4.2. Delprojekt 2	9
4.2.1 Utvärdering av kommersiella realtids-PCR mixar för SYBR Green baserad SNP analys	9
4.2.2 Utvärdering av probebaserad SNP-analys för detektion av genus <i>Francisella</i>	13
4.3. Delprojekt 3	14
4.3.1 Utvärdering av provupparbetningsmetoder med extraktionsrobot EZ1 för olika provtyper	14
4.3.2 Utvärdering av extraktionsrobot EZ1 i BSL3-miljö	15
5. Diskussion	16
6. Slutsatser	20
7. Kompletterande dokument	20
8. Referenser	21
9. Begrepp och förkortningar	22

SAMMANFATTNING

Forum för beredskapsdiagnostik (FBD) är ett samarbete mellan fyra svenska myndigheter, Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Smittskyddsinstitutet (SMI) och Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI). Ett av FBD:s 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 laboratorieresultat.

Syftet med projektet var att inom FBD harmonisera odlingsmetodik och molekylärbiologisk detektion av *Francisella tularensis*. Under 2009 genomfördes inom FBD en utvärdering av multiplexa realtids-PCR-analyser för ett antal riskklass-3 organismer. Utvärderingen visade att det fanns ett behov av att vidareutveckla realtids-PCR analyser för *Francisella tularensis*. I denna studie har därför en förbättrad probebaserad realtids-PCR-analys utvecklats för specifik detektion av hela genuset *Francisella* spp, *F. tularensis* subspecies *tularensis* (typ A) och *F. tularensis* subspecies *holarctica* (typ B). Dessutom har en gemensam referenskollektion av DNA-byggt upp som kan användas för fortsatt harmonisering av metoder för detektion av *F. tularensis*. Vidare har harmonisering av metoder för odling och förvaring av *F. tularensis*-stammar utförts och provupparbetningsmetoder för extraktionsrobot för olika provmatriser för påvisande av *F. tularensis* (organ från djur, blod, och vattenprover) utvärderats. Slutligen har provupparbetning med extraktionsrobot i BSL3 laboratorium utvärderats.

Sammanfattningsvis har målen med projektet uppnåtts och beredskapsförmågan har höjts genom utveckling av en molekylär identifieringsmetod med bättre specificitet för *F. tularensis* som är harmoniserad mellan myndigheterna.

1. BAKGRUND

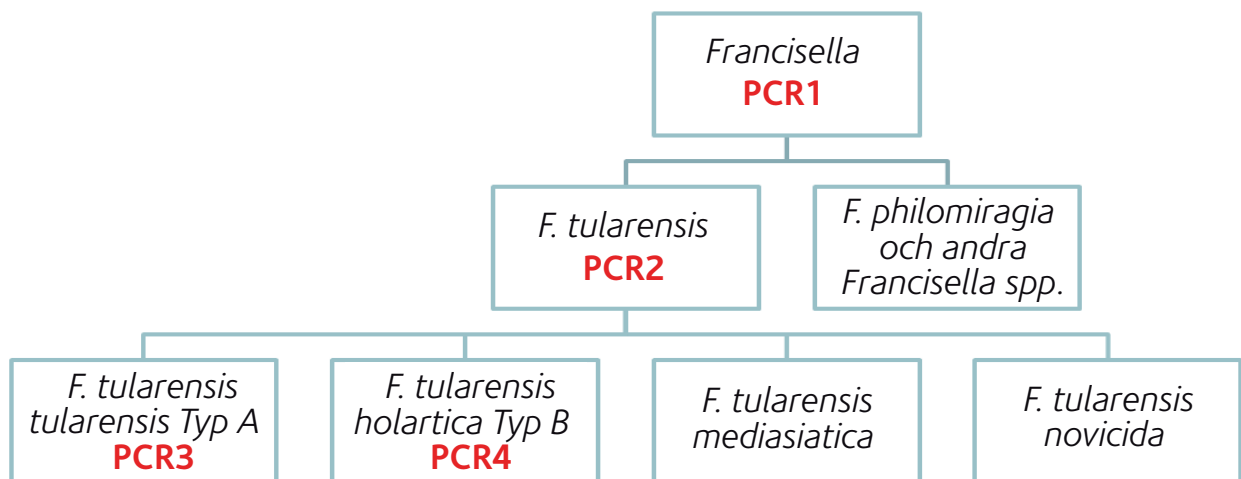
Bakterier tillhörande genus *Francisella* är små gramnegativa, obligat aeroba kockoida stavar. Inom detta genus återfinns för närvarande flera närbesläktade species, *F. philomiragia*, *F. novicida*, *F. tularensis*, *F. noatunensis* och *F. hispaniensis* (1). Nomenklatur och uppdelning av species inom genus *Francisella* befinner sig i en dynamisk process av förändring allt eftersom nya species upptäckts. Av alla identifierade species är det endast varianter av *F. tularensis* som är klinisk relevanta och som orsakar tularemi eller harpest.

F. tularensis förekommer i tre kända subspecies varav *F. tularensis* subspecies *tularensis* (typ A) och subspecies *holarctica* (typ B) kan orsaka allvarlig sjukdom hos människa. Subspecies *mediasiatica* är sällsynt och dess virulens är beskriven som moderat. *F. tularensis* subsp. *holarctica* har isolerats från hela norra halvklotet medan *F. tularensis* subsp. *tularensis* och subsp. *mediasiatica* endast förekommer i Nordamerika respektive Asien.

Tularemi som förekommer i de flesta länder på det norra halvklotet, kan spridas till människa via direktkontakt med infekterade djur, insektsbett, inandning av aerosol eller via kontaminerat livsmedel (inklusive vatten). Smittsamheten är mycket hög och antalet utbrott av sjukdomen har ökat de senaste åren (2). Sjukdomen förekommer idag inom hela EU med undantag för de brittiska öarna. I Sverige är incidensen högst i de mellersta delarna av landet, (Gävleborgs, Dalarnas, Värmlands och Örebro län) och lägst i södra Sverige. Till skillnad från andra länder, där fästingar är en viktig vektor för smittspridning, är mygg den viktigaste vektorn för smittspridningen i Sverige (3,4,5). Ett mycket stort antal djurarter, bland annat däggdjur, fåglar, amfibier, insekter, fästingar och encelliga djur kan infekteras av *F. tularensis*. Infektioner i Sverige ses främst hos skogshare och människor. Dödligheten bland flertalet gnagare som smittas av harpest är mycket hög. Kroniska infektioner kan dock finnas hos fälthare (6) vilket också utgör en smittkälla vid exempelvis hantering i samband med jakt.

Tularemi är i Sverige anmälningspliktig enligt smittskyddslagen. Antalet anmälda tularemi-fall varierar mycket från år till år, mellan år 2000 och 2009 varierade antalet inhemska fall per år från 24 till 617. De allra flesta av de rapporterade har insjuknat i Sverige. Tularemi är även på veterinärsidan en anmälningspliktig sjukdom.

Under 2009 (7) genomfördes inom FBD en utvärdering av multiplexa realtids-PCR analyser för ett antal riskklass-3 organismer, inklusive *F. tularensis*. För *F. tularensis* bygger de utvärderade analyserna på ett trestegsförfarande där det första steget är en screeningsassay för detektion av hela genuset, det andra steget en species-specifik assay och det tredje steget en specifik detektion av *F. tularensis* subsp. *tularensis* (typ A) respektive subsp. *holarctica* (typ B) (Figur 1).



Figur 1. Schematisk beskrivning av hierarkisk Francisella PCR för specifik identifiering av de sjukdomsframkallande varianterna, typ A och typ B

2009 års projekt visade att screeningsanalysen detekterade *F. tularensis* spp, *F. philomiragia* och *F. novicida* korrekt i 100 % av analyserna, men inte *F. noatunensis*. Den *F. tularensis*-specifika analysen visade 100 % inklusivitet och exklusivitet. De två subspecies-specifika analyserna hade 100 % inklusivitet men visade sig ha underkänd exklusivitet. Det fanns därför ett behov för fortsatt utveckling av realtids-PCR för specifik detektion av:

- hela genuset *Francisella* spp. (Screenings-assay)
- *F. tularensis* subspecies *tularensis* (typ A)
- *F. tularensis* subspecies *holartica* (typ B)

Vidare utvärderas också under 2009 metod för extraktion av nukleinsyra genom användande av extraktionsrobot (Qiagen EZ1) inom FBD (8). Ett antal olika matriser, såsom diverse livsmedel, vatten, miljö- och omgivningsprover analyserades med *Bacillus* spp. som modell. Utvärderingen gjordes av praktiska skäl i BSL2 laboratorium Under projektet identifierades ett behov av fortsatt utvärdering av extraktionsrobot för olika provmatriser med avseende på *F. tularensis* och ett behov av att i BSL3 laboratorium utvärdera extraktionsroboten för olika provmatriser. Dessutom identifierades behov av gemensam DNA-referenskollektion för att kunna harmonisera metoder inom FBD.

Sammantaget visade dessa två FBD studier (7, 8) på behovet att:

- Vidareutveckla realtids-PCR för specifik detektion av: hela genuset *Francisella* (screenings-assay) och specifik identifiering *F. tularensis* subspecies *tularensis* (typ A) och *F. tularensis* subspecies *holartica* (typ B).
- Utvärdera provupparbetning från olika matriser med extraktionsrobot med hjälp av spikningsprotokoll för *F. tularensis* samt att utvärdera provupparbetning med extraktionsrobot i BSL3 laboratorium.
- Harmonisera odlings- och infrysningsmetoder för sparande av stammar, samt skapande av en gemensam DNA-kollektion för referensstammar av *F. tularensis*.

Syftet med detta projekt var att adressera dessa identifierade behov och brister inom odling, provupparbetning, förvaringsbetingelser vid sparande av stammar och specifik realtids-PCR för *F. tularensis*.

2. SYFTE OCH MÅL

Syftet med detta projekt var att harmonisera detektion av *Francisella tularensis* från human- och veterinärmedicinska prover avseende odling, provupparbetning, realtids-PCR samt förvaringsbetingelser vid sparande av stammar.

Projektet delades in i följande tre delprojekt:

DELPROJEKT 1:

Målsättningen med delprojektet var att harmonisera odlings- och infrysningsmetoder för sparande av stammar, samt skapande av en gemensam DNA-kollektion för referensstammar av *F. tularensis* (S1).

DELPROJEKT 2:

Målsättningen med delprojektet var utveckling av realtids-PCR för specifik detektion av: hela genuset *Francisella* spp. (screenings-assay), specifik identifiering *F. tularensis* subspecies *tularensis* (typ A) och *F. tularensis* subspecies *holarctica* (typ B) genom:

- Utvärdering av signatur- alternativt kanonisk SNP (single nucleotid polyphormism) – analys för hierarkisk specifik detektion och identifiering av *Francisella*.
- Utvärdering av SYBR Green-baserad analys för detektion och identifiering.
- Utvärdering av om en kommersiell standardiserad realtids-PCR-mix kan ersätta nuvarande egentillverkade mix för detektion och identifiering.
- Utvärdering av probebaserad analys för detektion och identifiering.

DELPROJEKT 3:

Målsättningen med delprojektet var att utvärdera provupparbetning från olika matriser (kliniska prover, vatten och miljö- och omgivningsprover) med extraktionsrobot med hjälp av spikningsprotokoll för *F. tularensis* samt att utvärdera provupparbetning med extraktionsrobot i BSL3 laboratorium.

3. MATERIAL OCH METODER

3.1 DELPROJEKT 1

Harmonisering av *Francisella*-odling, infrysningsmetoder för sparande av stammar samt uppbyggnad av DNA-referensbibliotek.

3.1.1 Odling

Protokoll och recept för två olika odlingsmedier samt redan tillverkade odlingsplattor överfördes från FOI och SMI till SVA där odling utfördes. De medier som jämfördes var McLeod-agar (Modifierad Thayer-Martin agar, FOI) (9) och MIK 1872 (SMI). Vaccinstammen LVS (*F. tularensis* subspecies *holarctica* Live Vaccin Strain) användes som referensstam för *F. tularensis*. Odlingen utfördes vid 37°C i CO₂ (5 %) inkubator under ca 3-4 dagar.

3.1.2 Infrysningsmetod för sparande av stammar

Protokoll och recept för infrysningsmedium överfördes från FOI till SVA enligt följande: 10 g skummjörkspulver löses i 100 ml MQ-vatten, varefter det autoklaveras i 121°C under 20 min. Bakteriekolonierna från en agarplatta slammas i 5-10 ml steril skummjörk, fördelas i cryorör (ca 0,5 ml/rör) och bakteriesuspensionen förvaras i -80°C.

3.1.3 Odling och DNA-extraktion av stammar till referensbibliotek

Stammarna odlades i två dygn på McLeod agar vid 37°C i CO₂ inkubator varefter de avdödades genom inkubering i 65°C under 2 timmar (i 5 ml 0,9 % NaCl). De värmeinaktiverade lysaten fördelades i 2 ml eppendorfrör, 1 ml/rör, och frystes in i -80°C. Sterilkontroll gjordes samtidigt genom att 50 µl av varje värmeinaktiverat lysat spreds på McLeod agarplattor som kontrollerades för frånvaro av tillväxt efter minst 4 dygn (37°C, 5 % CO₂).

Innan DNA-extraktion utfördes tillsattes 1 µl av 5 µg/µl RNase (Qiagen) per 200 µl lysat och detta inkuberades i 37°C i 30 min. Extraktionen utfördes på EZ1 Advanced (Qiagen) enligt 2009 års rapport (8), DNA-koncentrationen bestämdes med hjälp av NanoDrop spektrofotometer (ND-1000 spectrophotometer, Life Science).

3.2 DELPROJEKT 2

Utveckling av realtids-PCR för specifik detektion av hela genuset *Francisella* spp. (screenings-assay) samt specifik identifiering *F. tularensis* subspecies *tularensis* (typ A) och *F. tularensis* subspecies *holarctica* (typ B).

3.2.1 Signatur- alternativt SNP-analys för detektion av *Francisella*

Protokoll och recept för två olika odlingsmedier samt redan tillverkade odlingsplattor överfördes från FOI och SMI till SVA där odling utfördes. De medier som jämfördes var McLeod-agar (Modifierad Thayer-Martin agar, FOI) (9) och MIK 1872 (SMI). Vaccinstammen LVS (*F. tularensis* subspecies *holarctica* Live Vaccin Strain) användes som referensstam för *F. tularensis*. Odlingen utfördes vid 37°C i CO₂ (5 %) inkubator under ca 3-4 dagar.

3.2.2 Utvärdering av kommersiella realtids-PCR mixar för SYBR Green baserad SNP-analys

Två olika mixar SsoFast EvaGreen (BIO-RAD) och Quanta FastSYBR (VWR) utvärderades enligt den publicerade metoden (10) men med tider och temperaturer modifierade enligt tillverkarnas rekommendationer. Tre stammar och primrar för tre SNP:ar användes vid utvärderingen. Förutom PCR med skillnad i C_q-värde (Quantification cycle value)(10) utvärderades också SsoFast mixen med en kompetitiv PCR (11, 12). PCR-amplifieringen utfördes under likadana förhållanden för båda metoderna.

PCR-amplifieringen gjordes i en totalvolym av 20 µl innehållande ca 1 ng DNA, 10 µl kommersiell mix och 400 nM av respektive primer. Amplifieringen utfördes med ABI17500 (Applied biosystems, modell 7500Fast) på SVA, respektive CFX96 (BIO-RAD) på FOI. PCR-protokollet för SsoFast mixen inleddes med en denaturering vid 98°C under 2 min, följt av 45 cykler med 98°C under 5 sek och 60°C 5 sek, programmet avslutades med en smältkurva mellan 65-95°C, med tider mellan 5-10s beroende på instrument. Protokollet för Quanta-mixen inleddes med denaturering vid 95°C under 2 min, följt av 45 cykler med 95°C under 15 sek och 60°C 20 sek, programmet avslutades med en smältkurva mellan 65-95°C (20 min).

Samtidigt utvärderades primrar enligt Svensson et al (10) mot samma primrar, men modifierade enligt Vogler et al. (11) (S3).

3.2.3 Utvärdering av probebaserad SNP-analys

Med hjälp av Allel ID (Premier Biosoft) designades primrar och prober (Taqman-MGB) för tidigare kända unika sekvenser avseende *Francisella* spp. (4), *F. tularensis* subspecies *tularensis* (10) och *F. tularensis* subspecies *holarctica* (10). För vardera SNP designades två allel-specifika prober, en för vardera allel status, derived respektive ancesster, samt två primrar, forward och reverse. Proberna justerades därefter manuellt (kortades) för att undvika ospecifik inbindning av allel-status. Eventuell korsreaktion med andra organismer kontrollerades via NCBI blast. PCR-amplifieringen utfördes enligt samma protokoll och likadana förhållanden som i 2009 års FBD rapport (7), men med en probe för vardera allel-status i samma reaktion (13).

LOD och amplifieringseffektivitet beräknades enligt 2009 års FBD rapport 1 (7) men realtids-instrumentets (CFX96 BIO-RAD) mjukvara användes vid beräkningarna, inställningar som användes var autocalculated single treshold mode.

Inklusivitets- och exklusivitetskontroll med kända stammar i panelerna (S4) utfördes enligt (7), men med ett replikat av vardera stam.

Två *F. noatunensis* stammar samt 15 stammar från referenskollektionen är inkluderade i kontrollen med tre replikat av vardera stam (6 av dessa ingick i 2009 års panel (S4)).

3.3 DELPROJEKT 3

Fortsatt metodutveckling av extraktionsrobot

3.3.1 DNA-extraktion av organprover med EZ1-extraktionsrobot

Matriser som användes vid utvärderingen av extraktionsroboten var infrysta vävnadsprover från vilt (hare) som tidigare diagnostiserats som positiva, samt negativa vävnadsprover (hare, häst) som spikats med LVS (som modell för *F. tularensis*).

Viable count utfördes vid bestämning av bakteriekoncentrationen i proverna. MIK 1872-agar användes vid odlingen av LVS.

Vävnaderna svabbades med bomullstops, som därefter klipptes av och fördes över till 1,5 ml engångsrör (Eppendorf) tillsammans med 570 µl G2-buffert och 30 µl Proteinase-K. Proven vortexades kraftigt och inkuberades på thermomixer (Eppendorf Thermomixer comfort) vid 56°C, 650 rpm i 15 minuter, därefter vid 95°C, 650 rpm i 5 minuter. Topsen togs bort och rören centrifugerades kort. Vid extraktion av prover som tidigare diagnostiserats som positiva fördes 195 µl av vätskan över till 2 ml-EZ1 robotrör tillsammans med 5 µl (5x10⁵/µl) sälherpesvirioner (PHhV-1). För spikade prover användes 185 µl av vävnadsvätskan tillsammans med 5 µl PHhV-1 och 10 µl LVS i spädningsserie från en mättad lösning av LVS i PBS. (S5, S6). För blod (homogent) togs 185 µl av provet direkt till 2 ml EZ1-robotrör tillsammans med 5 µl virioner och 10 µl LVS.

DNA extraherades på EZ1-robot (8), Extraktionskontroll med PCR utfördes enligt projektrapport 3 (8).

4. RESULTAT

4.1 DELPROJEKT 1

Med syfte att harmonisera odlingsmetoder mellan myndigheterna jämfördes odling av vaccinstammen LVS på två olika medier. De medier som jämfördes var McLeod-agar (FOI) och MIK1872 (SMI). Resultatet visade på en något snabbare tillväxt av LVS på MIK1872. Tillväxten på McLeod-agar varierade något beroende på vart mediet var tillrett (FOI eller SVA). Vidare har metod för infrysning standardiserats. Metoden bygger på infrysning i skummjolk, erfarenheten från FOI är att harpesterbakterien vid -70°C överlever åtminstone 30 år i detta infrysningsmedium.

Slutligen valdes 25 representativa *F. tularensis* referenstammar (S1 och phylogenetiskt träd för dessa stammar S2) och lysat från dessa stammar preparerades och frystes in för att säkerställa att framtida DNA-preparationer kan ske från samma odlingsbatch. Detta för att undvika variationer i arvsmassan som uppkommer vid odling. Fem µg DNA från varje stam har extraherats på FOI och distribuerats till SMI och SVA.

4.2 DELPROJEKT 2

4.2.1 Utvärdering av kommersiella Realtids-PCR mixar för SYBR Green baserad SNP analys

Två olika kommersiella mixars (SsoFast och Quanta) funktionalitet utvärderades med avsikt att modifiera delar av den publicerade metoden enligt Svensson et al. (10) för att förbättra möjligheterna till standardisering av metoden. Dessutom undersöktes om de primrar som använts i (10) kan ersättas med samma primrar men modifierade enligt Vogler (11). För jämförelse användes också primrar identiska med de som använts i (11). Primrar och modifieringar se (S3).

SsoFast mixen och primrar designade enligt (11) gav en signifikant skillnad i C_q-värde vid användandet av metod enligt (10) medan Quanta-mixen inte gav någon skillnad i C_q-värde (Tabell 1, figur 2). Förutom PCR med skillnad i C_q-värde utvärderades också SsoFast-mixen med en kompetitiv PCR (11, 12) Resultaten visar att även denna metod går att använda med SsoFast-mixen. (Tabell 1, figur 3) Primrar som använts i (11) gav ytterligare förbättrat resultat med större skillnad i T_m (melt temperature) (figur 4).

Tabell 1. Utvärdering av kommersiella mixar för identifiering av *F. tularensis*

Analys	Analys	SsoFast ^a skillnad i Cq (cykler)	SsoFast ^a skillnad i Tm (°C)	Quanta ^b skillnad i Cq (cykler)	Quanta ^b Skillnad i Tm (°C)
Subspecies Specifik	<i>F. tularensis</i> Typ A	X	2,5	< 1	X
	<i>F. tularensis</i> Typ B	~7	2	< 1	<1
Stam specifik	<i>F. tularensis</i> SCHU	x	5	X	X

a= SsoFast EvaGreen supermix, b= Quanta fast SYBR, x = ej analyserade

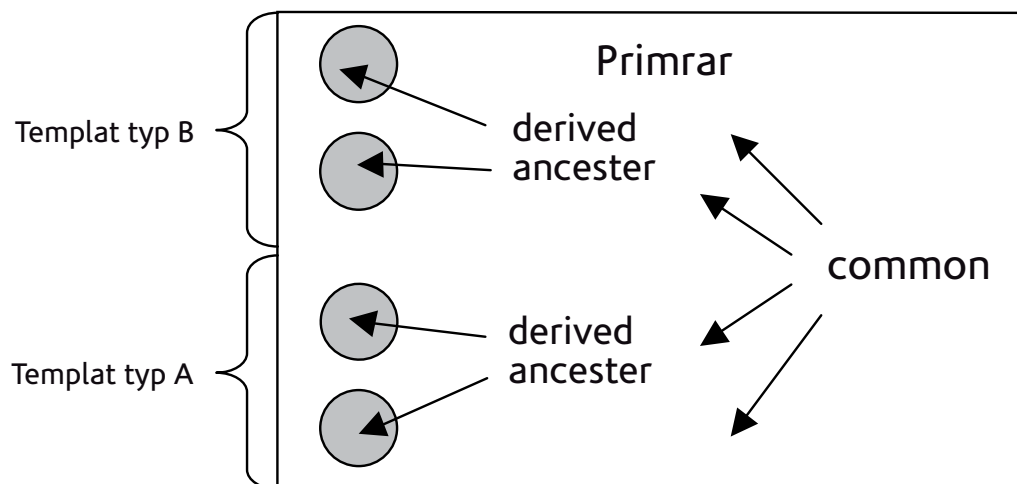
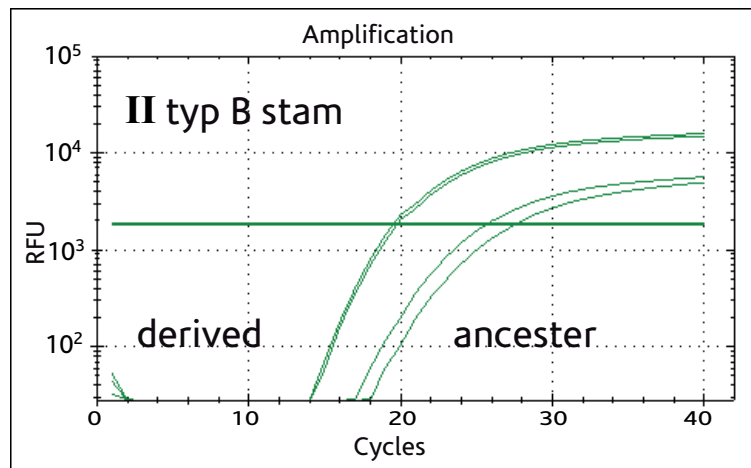
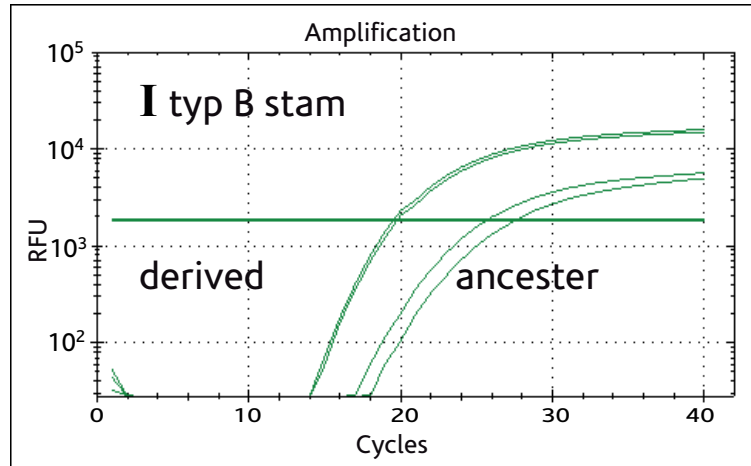
Stamspecifika analysen för SCHU finns med som exempel på hur resultatet kan se ut för en optimerad primer (11). Genusspecifika analysen för *Francisella* visas inte i tabellen då det endast bildas en DNA-produkt för derived primern om templatet är en *Francisella* stam, medan primern för ancestor inte ger någon produkt oavsett om templatet är en *Francisella* stam eller någon annan stam.

Figur 2. Exempel på resultat vid utvärdering av kommersiella mixen SsoFast EvaGreen supermix.

Bilden visar en typ B specifik analys med skillnad i C- värde (tabell 1), där två forward primers, derived och ancestor har satts till två separata reaktioner tillsammans med samma templat, reverse, common är samma för båda (schematisk beskrivning under de bägge diagrammen). Amplifieringen sker snabbare i reaktionen med den forward primer som passar bäst till templatet (ger lägre Cq-värde).

Diagram I visar när templatet består av en typ B stam i detta fall FSC200 (templatet i reaktionen med derived primern amplifieras snabbare).

I diagram II består templatet av en typA stam i detta fall FSC237 (templatet i reaktionen med ancestor primern amplifieras snabbare.)

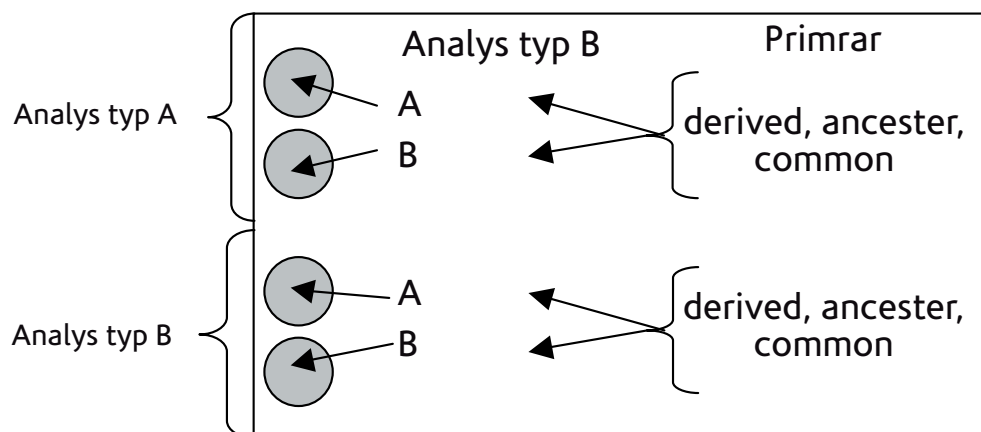
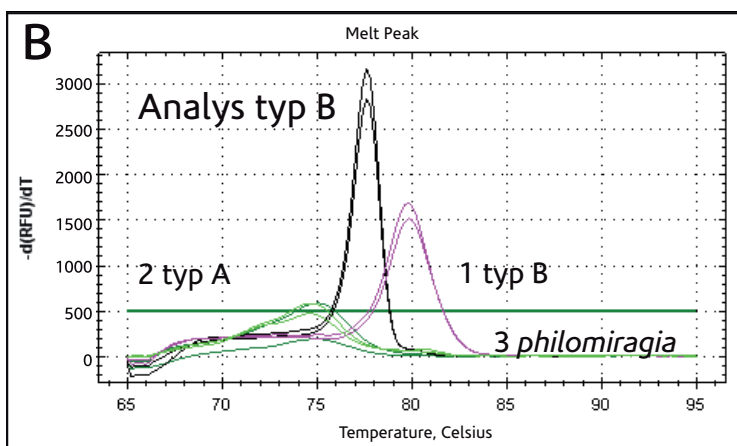
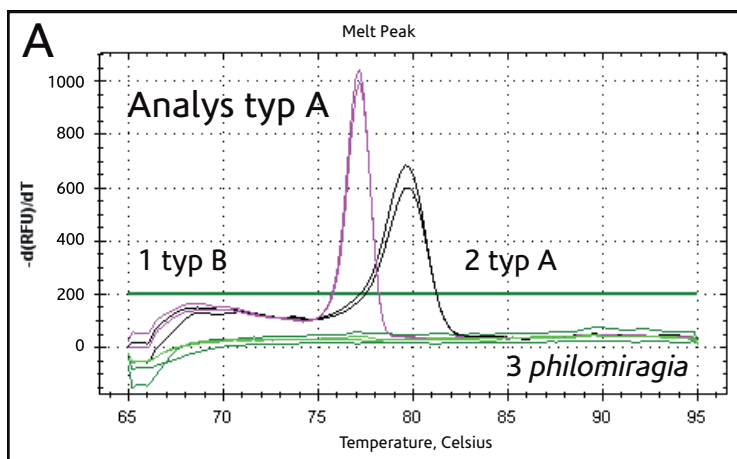


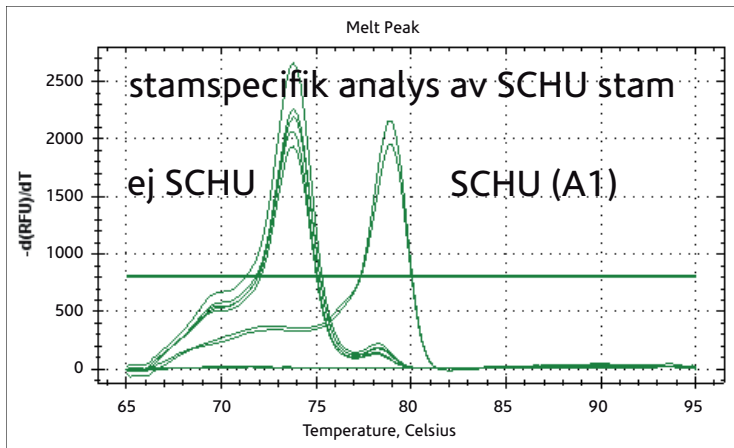
Figur 3. Exempel på resultat vid utvärdering av SsoFast EvaGreen supermix med kompetitiv PCR, vilken ger skillnad i T_m (smältpunkt), produkten för derived primer alltid med ett högre T_m än för anceser, denna är lika med den sökta.

Bilden visar två olika analyser typ A respektive typ B specifik. Varje diagram visar två separata reaktioner, där två forward primers derived och anceser har satts till samma reaktion tillsammans med templat och en gemensam reverse, (common) primer (Schematisk beskrivning under de bägge diagrammen. En DNA produkt kommer att bildas för den forward primer som stämmer bäst med templatet).

Diagram A visar en typ A specifik analys, när templatet består av 1. en typ B stam (FSC 200, T_m 77°C), 2. en typ A stam (FSC 237, T_m 80°C) 3. en *F. philomiragia* stam (FSC038, ingen DNA produkt bildas).

Diagram B visar en TypB analys med samma stammar som i Diagram A, resultatet för de båda typ A stammarna blir här det omvända.





Figur 4. Utvärdering av SsoFast EvaGreen supermix, kompetitiv PCR med primrar som använts för stamspecifik analys i Vogler et al (9).

Bilden visar flera separata reaktioner med andra *F.tularensis* stammar FSC041 typ A1, FSC054 typ A2 och FSC200 typ B samtliga med ett lägre T_m än SCHU stammen FSC237, vilken är den sökta.

4.2.2 Utvärdering av probebaserad SNP-analys för detektion av genus *Francisella*

Den probebaserade SNP-analysen utvärderades genom användande av en DNA-panel med 144 stammar (7) (1 replikat 5-10 ng) samt 15 stammar (3 replikat 10 ng/replikat) från referenskollektionen (6 av dessa återfanns i 2009 års DNA panel). Förutom dessa inkluderades två *F. noatunensis* stammar i utvärderingen, totalt 155 stammar. Fullständig förteckning över stammar finns i kompletterande dokument S4.

I tabell 2 redovisas resultat från utvärderingen med avseende på specificitet, amplifieringseffektivitet (E) och känslighet (LOD). Screeningsanalysen detekterade samtliga *Francisella* i 100 % av analyserna, men den detekterade även *Wolbachia persica*. Den subspecies-specifika analysen visade 100 % inklusivitet och exklusivitet.

Tabell 2. Resultat av utvärdering av SNP-baserad reelltids-PCR metodik för *Francisella*

Analys	Analys	Specificitet inklusivitet (n)	Specificitet exklusivitet (n)	E (GE-intervall)*	LOD GE (pos/replikat)
Genus Screening	<i>Francisella</i> (ej <i>noatunensis</i>) derived	100 % (N=42)	99 % ** (n=112)	101,4 % (10 ⁷ -10)	10(3/3)
	<i>Francisella noatunensis</i> ancestor	100 % (n=4)	100 % (n=151)	102 % (10 ⁷ -100)	1(3/3)
Subspecies Specifik	<i>F.tularensis</i> Typ A	100 % (n=5)	100 % (n=150)	100 % (10 ⁷ -100)	1(3/3)
	<i>F.tularensis</i> Typ B	100 % (n=26)	100 % (n=129)	98 % (10 ⁷ -10)	1(3/3)

n antal stammar inkluderade i utvärderingen

*(GE-intervall) de spädningar som användes vid effektivitetsberäkningar)

** ev. svag korsreaktion med *Wolbachia* (Cq36)

4.3 DELPROJEKT 3

4.3.1 Utvärdering av provupparbetningsmetoder med extraktionsrobot EZ1 för olika provtyper

I ett första försök upprättades ett spikningsprotokoll för extraktion av LVS (modell för *F. tularensis*) från Milli-Q-vatten (MQ, Millipore). Sambandet mellan resultat från koloniräkning (VC, Viable Count) och Cq-värde från realtids-PCR (S5) visade god överensstämmelse med tidigare erfarenheter av *F. tularensis*-specifik signatur-PCR (7) Slutsatsen av detta är att de bakterier som tillsattes också går att extrahera ut med hög effektivitet med extraktionsroboten.

Spikningsprotokoll upprättades för blod och MQ-vatten, proven spikades med en spädningsserie av LVS. Det *F. tularensis* specifika Cq-värdet var linjärt för båda matriserna från Cq 15 (0-spädning) till Cq 32 (10-5) men vid låga koncentrationer av bakterien observerades en antydning till fördröjning av Cq-värdet för blod (Cq 37) jämfört med MQ-vatten (Cq 34) se tabell 3. Vid försöket med extraktion av samma LVS-spädningsserie från lever, lunga, mjälte och benmärg visade Cq-värdet på en fördröjning med 2 cykler jämfört med blod och vatten. För samtliga matriser hade extraktions-kontrollen (PHhV-1) samma Cq-värde (~ 33) som amplifieringskontrollen (S6).

Tabell 3. Resultat extraktion av LVS från (häst)blod och MQ-vatten

Spädning	Vatten Cq-värde	Blod Cq-värde
0	15,1	15,7
10-1	18,5	18,6
10-2	22,2	22,2
10-3	26,2	26,1
10-4	29,6	29,4
10-5	32,2	32,4
10-6	34,8	36,2
10-7	38,0	38,1
Kontroll -LVS	-	-

4.3.2 Utvärdering av extraktionsrobot EZ1 i BSL3-miljö

Utvärderingen gjordes genom extraktion av vävnadsprover från infrysst hare (2008). Dessa prover var samtliga diagnostiserade som positiva med konventionella metoder (odling och indirekt immunofluorescence IIF). Samtliga prover som tidigare påvisats som positiva med konventionella metoder visade på positivt resultat med *F. tularensis*-specifik signatur-PCR (tul4, *lpnA*-genen). Däremot visade 3 av 7 prover negativt resultat när de ånyo testades med IIF, medan ingen av de 7 vävnaderna gick att odla efter upptag från frysen, se tabell 4.

Tabell 4. Resultat extraktion från vävnad (hare)

	hare 1			hare 2				
	PCR Cq-värde		odling	IIF	PCR Cq-värde		odling	IIF
	ospätt	10 ⁻¹			ospätt	10 ⁻¹		
lever	30	33	-	+	22	27	-	-
lunga	26	30	-	+	27	30	-	-
mjälte	16	19	-	+	x	x	x	x
benmärg	21	20	-	-	20	23	-	+

IIF = indirekt immunofluorescens

X= ingen mjälte är extraherad för hare 2

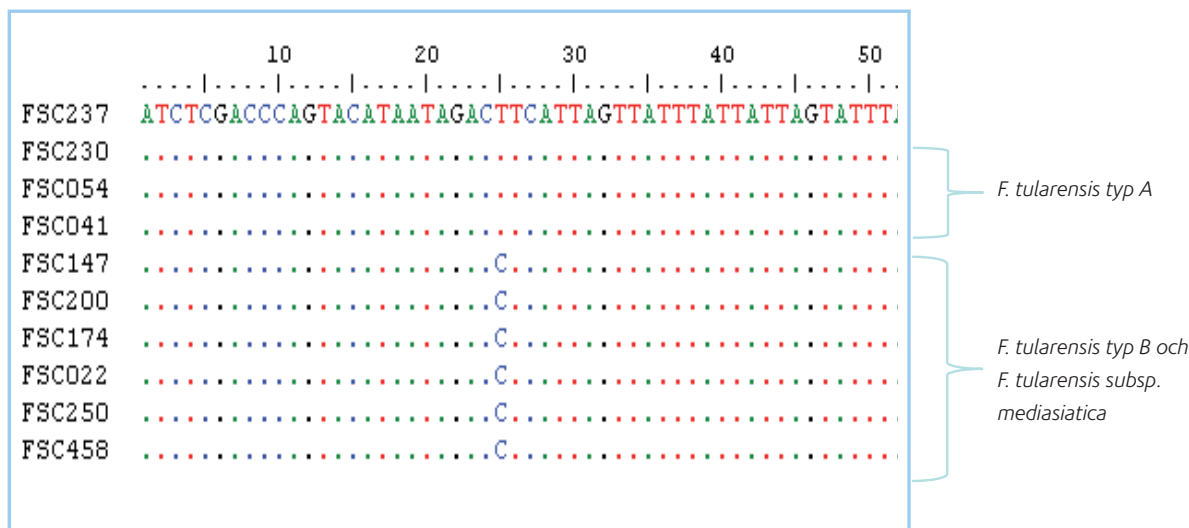
ingen intern extraktionskontroll är tillsatt

5. DISKUSSION

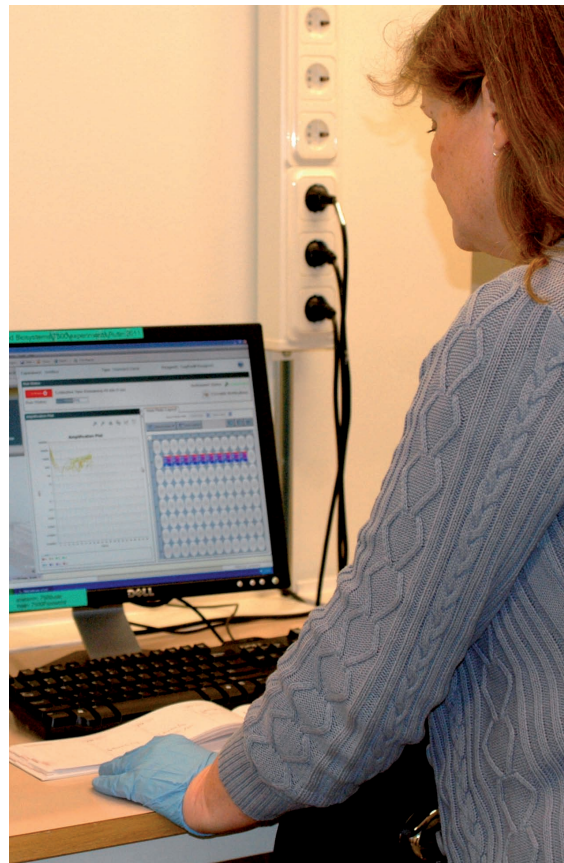
I detta projekt har brister och behov inom odling, provupparbetning, förvaringsbetingelser vid spårande av stammar och specifik realtids-PCR för *F. tularensis* adresserats. Sammantaget så har odlingsmetod och provupparbetning för PCR samt en förbättrad realtids-PCR harmoniserats och utvecklats.

Den hierarkiska realtids-PCR som utvecklats är baserad på punktmutationer i s.k SNPPar (figur 5). Skillnaden mot att använda hierarkisk SNP metodik och mer klassisk signatur-baserade realtids-PCR, som exempelvis beskrivs i (7), är att i signatur-baserade metoder söks ofta unika sekvenser/gener som bara finns i en eller ett fåtal bakteriestammar. Dessa blir då den unika signaturen för de aktuella stammarna. Alternativt är målsekvenserna konserverade gener, såsom 16S rDNA. Den taxonomiska upplösningen för signatur baserade metoder är ofta förutbestämd. I hierarkisk SNP-metodik står själva mutationerna i centrum och varje vald mutation skall vara nedärvd i alla stammar som ingår i den grupp som SNP:n definierar (Figur 5). Kombinationen av mutationer ger den unika signaturen eller SNP-profilen och följaktligen den taxonomiska tillhörigheten för varje isolat. Genom att använda hierarkisk metodik skapas en unik mönsterprofil för smittämnet ifråga. Detta minskar risken för både falsk negativ och falsk positiv identifiering. I detta projekt provades båda dessa metodikspår, men den bioinformatiska analysen visade att inte var möjligt att hitta enskilda specifika gensignaturer, men däremot flera specifika SNPPar. Därför fokuserades utvecklingsarbete på att utveckla en SNP baserad PCR för specifik identifiering av *F. tularensis*.

Figur 5. Exempel på en specifik-SNP, i detta fall *F. tularensis* typ A



Målsättningen var att utveckla realtids-PCR för specifik detektion av hela genuset *Francisella* spp. (screenings-assay) samt specifik identifiering av *F. tularensis tularensis* (typ A) och *F. tularensis holarctica* (typ B). En utvärdering av den utvecklade probebaserade SNP-PCR metoden utfördes med avseende på specificitet, effektivitet och känslighet. DNA som extraherats för att användas under 2009 års projekt (7) användes vid utvärderingen, dock fanns inte tillräckligt material för en fullständig utvärdering som kräver att minst 3 replikat ingår och inte heller tillräcklig mängd per analys, som under 2009 års projekt (7) var 10 ng.



Resultaten för samtliga stammar (S4) ingående i DNA panelen visar på en god inklusivitet och exklusivitet för samtliga analyser med undantag av *Wolbachia persica*. Vid screeninganalysen av *Francisella* hade samtliga 3 replikat av *Wolbachia persica* ett Cq-värde på 36. Detta kan vara en kontamination av DNA preparationen, alternativt en korsreaktion med *Francisella*. Om det senare är sant, är dock korsreaktionen väldigt svag och torde sakna praktisk betydelse. För att kunna göra en mer fullständig utvärdering av de ingående analyserna bör fler replikat av de stammar som ingår i panelen användas och även fler inklusivitets- och exklusivitetsstammar av *Francisella* spp.

Resultaten från utvärderingen av de kommersiella SYBRGreen baserade mixarna, SsoFast EvaGreen (BIO-RAD) och Quanta FastSYBR (VWR), visade att den egentillverkade mixen enligt Svensson et al (10) gick att byta ut mot Ssofast-mixen med bibehållet resultat (d.v.s. även med Ssofast mixen sker amplifieringen snabbare i reaktionen med den forward primer som passar bäst till templatet, vilket ger lägre Cq-värde). Detta är en fördel om metoden ska användas på flera olika myndigheter. Ssofast-mixen går också att använda enligt Voglers (11) metod med kompetitiv PCR. Både hantering och kostnad minskar då hela analysen sker i samma PCR-reaktion. Metoden är inte fullständigt optimerad eftersom det inte fanns resurser inom projektet att prioritera detta. Resultaten från utvärderingen visade att det finns potential att förbättra metoden ytterligare, främst med avseende på optimering av primrar, eftersom primrar som använts i (11) gav ytterligare förbättrat resultat med större skillnad i Tm än modifierade primrar från (10) som användes i utvärderingen i denna studie.

En annan målsättning (delprojekt 1) var att harmonisera odling, extraktion av DNA och procedur för sparande av stammar mellan de ingående myndigheterna i FBD. Protokoll för sparande av stammar och extraherat DNA från referensstammar har överförts mellan myndigheterna. Vid uppsättningen av odling på SVA användes LVS-stammen av *F. tularensis* på två olika odlingsmedier, Tull-agar (SMI) samt McLeod-agar (FOI). Resultatet visade på en något snabbare tillväxt av bakteriekolonierna på SMI:s Tull-agar. En skillnad mellan dessa odlingsmedier är att Tull-agar innehåller helblod medan McLeod-agar innehåller kommersiellt berett hemoglobin, detta kan vara en kostnads- och tillgänglighetsfråga vid harmonisering av odlingsmetodik. Tillväxt av bakteriekolonier på McLeod-agar berett på FOI visade på snabbare tillväxt än samma medium berett på SVA. Detta visar på att också var mediet är berett kan ha inverkan på odlingsresultatet.

En tredje målsättning var att utvärdera provupparbetning från olika matriser och provupparbetning i BSL3 laboratorium med extraktionsrobot med hjälp av spikningsprotokoll för *F. tularensis*. På grund av resursbrist och efter styrgruppen samtycke utfördes utvärderingarna endast på organ från djur, blod och vattenprover. Utvärderingen av extraktionsroboten i BSL3 laboratorium visade att samtliga vävnadsprover från infrysst hare där positivt resultat initialt påvisats med konventionella metoder (odling och indirekt immunofluorescence) gav positivt resultat med *F. tularensis*-specifik signatur-PCR. Däremot var endast 60 % av vävnadsproverna fortsatt positiva med indirekt immunofluorescens efter upptining och inga prover innehöll odlingsbar *F. tularensis*. Extraktion av DNA med påföljande PCR skulle därför kunna vara ett komplement för konfirmering av *F. tularensis*, speciellt i de fall då prover inte innehåller kultiverbara organismer.

Spikning av LVS i MQ-vatten och efterföljande extraktion med EZ1robot och påvisning med *F. tularensis*-specifik signatur-PCR resulterade i Cq-värden jämförbara med tidigare erfarenheter av *F. tularensis*-specifik signatur-PCR (7), vid motsvarande koncentrationer. Detta visar att extraktionseffektiviteten är i överensstämmelse med tidigare använda extraktionsmetoder. Vidare erhöles jämförbara Cq-värden med *F. tularensis*-specifik PCR vid extraktion från blod och MQ-vatten. Detta visar att extraktionseffektiviteten är jämförbar mellan blod och vatten. Ett visst koncentrationsberoende i extraktionseffektiviteten från blod kunde dock observeras. Vid låga koncentrationer av *F. tularensis* fanns en fördröjning

av C_q-värdet, vid extraktion från blod jämfört med MQ-vatten. Detta kan bero på att det finns en viss inhibering från blod alternativt att en viss mängd DNA inte går att extrahera ut, vilket blir tydligare vid låg koncentration av DNA. Vid försöket med extraktion av samma spädningsserie av *F. tularensis* från lever, lunga, mjälte och benmärg visade PCR-resultaten på en fördröjning med 2 cykler jämfört med blod och vatten. Det kan inte uteslutas att anledningen till fördröjningen av reaktionen kan vara att samma spädningsserie användes i bägge försöken, med förvaring i frys under 14 dagar mellan försöken. Denna förvaring alternativt upptining, kan ha påverkat resultatet genom lysering eller aggregering av organismerna.

Sammanfattningvis har inom detta projekt en ny SNP-baserad Realtids-PCR med bättre specificitet för *F. tularensis* än tidigare protokoll, utvecklats och harmoniserats mellan de ingående myndigheterna i FBD. Dessutom har metoder för odling, provupparbetning för PCR och förvaringsbetingelser vid sparande av stammar harmoniserats.

6. SLUTSATSER

- En *F. tularensis*-specifik realtids-PCR, baserad på SNP-detektion och prober har utvecklats. Ett protokoll för denna probebaserade identifiering av *F. tularensis*, som är kompatibelt med 2009 års utvärdering av multiplexa realtidsanalyser (7) finns på FBD:s interna projektrum (Wikin) under projekt 8. Resultaten visar att denna metod har en bättre specificitet jämfört med tidigare realtids-PCR protokoll för påvisande av *F. tularensis*. För att fullfölja validering enligt FBD:s valideringsprotokoll för realtids PCR-analys för detektion av bakterier (projekt 5 (15)) bör fler replikat och stammar analyseras.
- Utbyte av egenhändigt tillverkad PCR-mix mot den standardiserade mixen (Ssofast EvaGreen) vid SYBRGreen baserad realtids-PCR fungerar bra, men metoden kräver vidare optimering.
- Odlingsmetod är överförd till SVA från SMI och FOI, DNA från referensstammar är överförda av FOI till SVA och SMI.
- Provupparbetning av olika provmatriser (organ från djur, blod och (MQ)-vattenprover) med extraktionsrobot i BSL2 miljö för påvisande av *F. tularensis* har utvärderats. Extraktionsroboten fungerar bra, men vissa modifieringar skulle kunna göras av förbearbetningsprotokoll (blod). Provupparbetningsmetoder för kliniska- och omgivningsprover återstår att utvärdera.
- Provupparbetning av olika matraser med extraktionsrobot i BSL3 laboratorium har genomförts och ger motsvarande resultat som tidigare resultat med extraktionsrobot i BSL2 miljö för påvisande av *F. tularensis*.
- Sammanfattningsvis har målen med projektet uppnåtts och beredskapsförmågan har höjts genom att den utvecklade förbättrade metoden är harmoniserad mellan myndigheterna, men fullständig optimering och validering återstår eftersom det inte tids och resursmässigt varit möjligt att genomföra inom projektramen.

7. KOMPLETTERANDE DOKUMENTATION

Kompletterande dokument **S1-S6** finns på FBD:s interna Wiki, under projekt 8 2010, Detektion av *F. tularensis*. Finns även att tillgå vid förfrågan.

- S1** Referensstammar
- S2** Phylogenetiskt träd
- S3** Primrar och prober
- S4** Inklusivitet, exklusivitets-stammar
- S5** Extraktion från MQ vatten
- S6** Extraktion från organ

8. REFERENSER

1. Colquhoun DJ, et al, 2011. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms Vet. Res. 42:47. PMID:21385413.
2. SMI <http://www.referensmetodik.smi.se/w/Harpest> (tularemi).
3. Eliasson H, et al, 2002. The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. Emerg. Infect. Dis. 8:956-60. PMID:12194773.
4. Broman T, et al, 2011. Molecular detection of persistent *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in natural waters. Int J Microbiol.; Article ID 851946. PMID: 20885922.
5. Lundström JO, et al, 2011. Transstadial Transmission of *Francisella tularensis holarctica* in Mosquitoes, Sweden. Emerg Infect Dis 17:794-800. PMID:21529386.
6. SVA <http://www.sva.se/sv/Djurhalsa1/Vilda-djur/Viltsjukdomar1/Harpest/FrosthS>, (SVA).
7. Garbom S, Ehres S, et al, 2009. Validering av multiplex realtids-PCR för harmonisering av molekylär detektion av riskgrupp 3 bakterier inom FBD (FBD 2009/1).
8. Frost S, et al, 2009. Utvärdering av extraktionsrobot (FBD 2009/3) Publ.nr MSB281, ISBN 978-91-7383-149-9.
9. Sandström G, et al, 1984. Antigen from *Francisella tularensis*: Nonidentity Between Determinants Participating in Cell-Mediated and Humoral Reactions. Infect. Immun. 45:101-106.
10. Svensson K, et al, 2009. A real-time PCR array for hierarchical identification of *Francisella* isolates. PLoS One. 4:e8360 doi:10.1371.
11. Vogler AJ, et al, 2009. Phylogeography of *Francisella tularensis*: Global Expansion of a Highly Fit Clone. J Bacteriol. 191:2474-84. PMID:19251856.
12. Baohui Li, et al, 2004. Genotyping with TaqMAMA. Genomics. 83:311-20. PMID:14706460.
13. Van Ert MN, et al, 2007. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. PLoS ONE. 2:e461 doi:10.1371.
14. Bustin SA, et al, 2009. The MIQE Guidelines - Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR. Clin. Chem., 55: 611-22. PMID:19246619.
15. Farhadi L, et al, 2010. Kvalitetssäkring av provanalys inom FBD - Valideringsprotokoll för realtids PCR-analys för detektion av bakterier Publ.nr MSB283, ISBN 978-91-7383-151-2 (2010/5).

9. BEGREPP OCH FÖRKORTNINGAR

PCR	Polymerase chain reaction
Multiplex realtids-PCR	Principen enligt vilken flera realtids-PCR analyser utförs i samma reaktion
C _t -värde	Tröskelvärde (Cycle treshold value)
Cq-värde	Quantification cycle value- ersätter C _t -värde enligt MIQE Guidelines (14)
E	Amplifieringseffektivitet
LOD	Limit of detection, eller minsta detekterbara mängd
GE	Genomekvivalenter
IAC	Intern amplifierings kontroll
IEC	Intern extraktions kontroll
PHhV -1	Sälherpesvirus typ 1
T _m	Melt temperature (Smältpunkt) är den temperatur där hälften av DNA-strängarna i en PCR-produkt separerats och hälften av SYBRGreen molekylerna är i fri form
Kanonisk SNP	Phylogenetisk gren (eller evolutionär)
SNP	Single nucleotid polymorphism mutation i ett baspar (punktmutation)
DNA-signatur	En sekvens av DNA som är unik för varje individ
NC	Not Countable (övertäckt)
BSL2	Biosafety level 2 laboratorium för riskklass 2 organismer
BSL3	Biosafety level 3 laboratorium för riskklass 3 organismer
LVS	Live Vaccine Strain of <i>F. tularensis</i>

