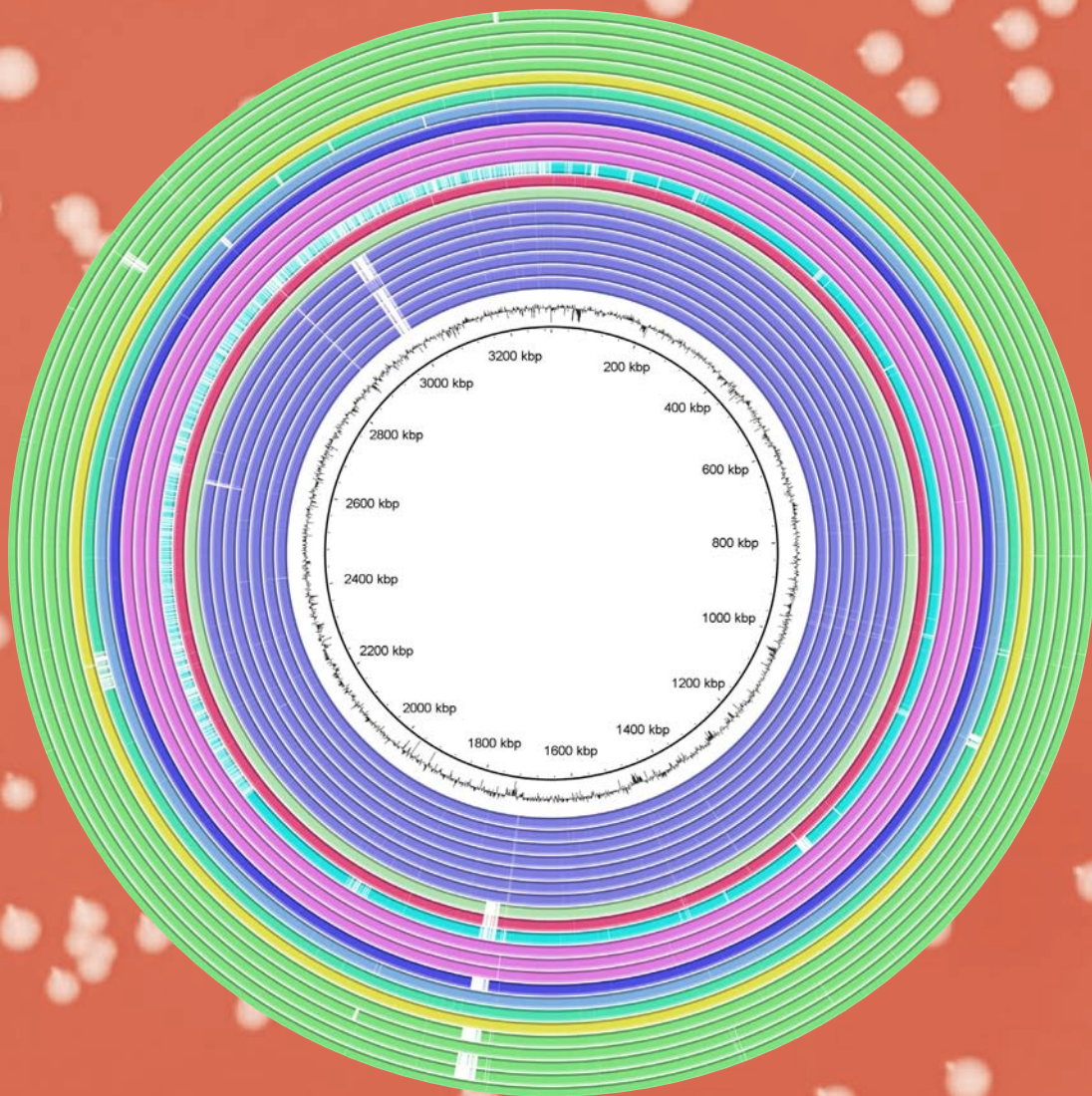


PROJEKTRAPPORT

Harmonisering av odling och PCR detektion av *Brucella*



René Kaden, Sevinc Ferrari, Martina Lindberg, Stina Bäckman och Tara Wahab

ABSTRACT

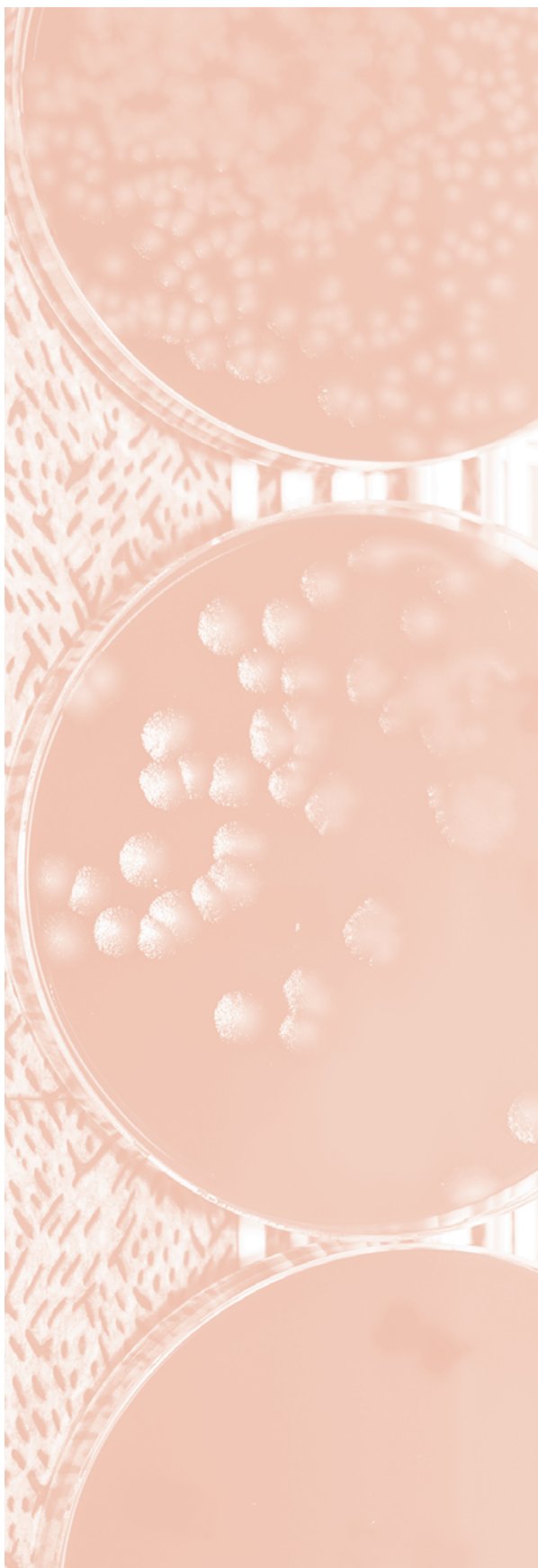
Forum for Biopreparedness Diagnostics (FBD) is a collaborative effort between four Swedish governmental institutes, National Food Agency, National Veterinary Institute, Swedish Institute for Communicable Disease Control and the Swedish Defence Research Agency. One of the main goals of this collaboration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

The aim of the project was to develop five different real-time PCR (qPCR) assays: one qPCR for the detection of the genus *Brucella* and four qPCR for the following species; *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella canis* and *Brucella suis*. These assays were validated during the project. Within the aim of the project sequencing of four different species of *Brucella* (*B. suis* BVA, *B. inopinata*, *B. ceti* and *B. neotomae*) was necessary since no sequence information was published in the public available databases such as NCBI when the project started. The project led to a validated genus-specific qPCR which encompasses all known species including all biovars of the genus *Brucella*. A species specific qPCR for the detection of *Brucella canis* and one approach for the detection of *Brucella abortus* were developed and validated. This project was performed as a part of the method harmonization between the different authorities included in the project.

Titel:	Harmonisering av odling och PCR detektion av <i>Brucella</i> Publ.nr. MSB686 ISBN 978-91-7383-440-7
Projektid:	2013
Projektgrupp:	René Kaden (SVA), Sevinc Ferrari (SVA), Martina Lindberg (Livsmedelsverket), Stina Bäckman (FOI) och Tara Wahab (SMI)
Kontaktperson i FBDs styrgrupp:	Annelie Lundin Zumpe (Livsmedelsverket)
Styrgrupp:	Viveca Båverud ordf. (SVA), Rickard Knutsson (SVA), Andreas Bråve (SMI), Ida Andersson (SMI), Mats Forsman (FOI), Mona Byström (FOI), Hans Lindmark (Livsmedelsverket) och Annelie Lundin Zumpe (Livsmedelsverket)
Finansiering:	Projektet har finansierats genom tilldelning av MSB anslag 2:4 Krisberedskap och en del av arbetet har genomförts i samarbete med projekt inom Resurslaboratorium för beredskapsdiagnostik (RUB)
Layout:	Tecknarn i Roslagen
Tryck:	TMG Tabergs

INNEHÅLL

Sammanfattning	4
1. Begrepp och förkortningar	4
2. Bakgrund	5
3. Syfte	7
4. Material och Metoder/Inventering	8
4.1 Stammar	8
4.2 Odling	9
4.3 Sekvensering	10
4.4 Inventering primrar och prober	11
4.5 Nydesignade primrar och prober	12
4.6 Realtids PCR	14
4.7 Validering	15
5. Resultat	16
5.1 Odling	16
5.2 Sekvensering	17
5.3 Validering qPCR	18
6. Diskussion	19
7. Implementering av resultat i diagnostiken	21
8. Slutsatser	21
9. Förslag på fortsatt verksamhet	21
10. Bilagor	22
Bilaga 1	22
Bilaga 2	23
Bilaga 3	25
11. Referenser	26



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 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 och relevanta virus 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 frågeställning om riskklass-3 bakterier eller virus.

Syftet med projektet var att utveckla fem olika realtids-PCR-metoder: en för detektion av alla arter av släktet *Brucella* och fyra artspecifika för *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella canis* och *Brucella suis*. Analysmetoderna har validerats under projektet. Inom projektet genomfördes även helgenomsekvensering av fyra olika arter av *Brucella* (*B. suis* BV4, *B. inopinata*, *B. ceti* och *B. neotomae*) eftersom sekvensinformation saknades i de offentliga tillgängliga databaserna såsom NCBI vid starten av projektet. Projektet ledde till en validerad genuspecific qPCR som omfattar alla kända arter, inklusive alla biovarer av släktet *Brucella*. En artspecifik qPCR för detektion av *Brucella canis* och en metod för detektion av *Brucella abortus* har utvecklats och validerats. Det här projektet ingick som en del av metodharmoniseringen mellan myndigheterna som ingår i FBD.

1. BEGREPP OCH FÖRKORTNINGAR

ATCC	American Type Culture Collection (USA)
Biovar	Serotyp
bp	baspar
BSL3	Biosafety level 3 (på svenska skyddsnivå 3)
BTWC	Biological Weapons Convention
CAPM	Collection of Animal Pathogenic Microorganisms (Tjeckien)
E	Amplifieringseffektivitet
FBD	Forum för beredskapsdiagnostik
FOI	Totalförsvarets forskningsinstitut
GE	Genomekvivalenter
IAC	Intern amplifieringskontroll
LOD	Limit of detektion, eller minsta detekterbara mängd
NATO	North Atlantic Treaty Organization
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
NCTC	National Collection of Type Cultures (UK)
OIE	World Organization for Animal Health
PhHv-1	Sälherpesvirus typ 1
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction (= realtids PCR)
SMI	Smittskyddsinstitutet, Folkhälsomyndigheten från januari 2014
SVA	Statens veterinärmedicinska anstalt
TINA	Twisted Intercalating Nucleic Acid
WHO	Världshälsoorganisationen

2. BAKGRUND

Brucellos är en bakteriell sjukdom som kan drabba olika djurarter och några *Brucella*-arter kan överföras mellan djur och människor (zoonos). Bakterierna är 0,6 x 1 µm stora kokkobacilli som växer fakultativt intracellulärt. De är icke-rörliga och bildar inga sporer, toxiner, fimbrier, flagella eller exoenzymer.

För närvarande finns 10 arter och 23 biovarer beskrivna. Dessa arter är mestadels värdspecifika. *Brucella abortus* förekommer till exempel hos nötkreatur, *Brucella melitensis* hos getter och får och *Brucella suis* hos svin. Smittan överförs vanligtvis via sperma, foster och flytningar, men också genom inhalation och infekterade livsmedel framförallt mjölk. Infekterade djur visar sällan symtom men under dräktigheten aborterar de sina foster följt av långvariga flytningar. Vaccination av djur förekommer, men tillåts inte i Sverige.

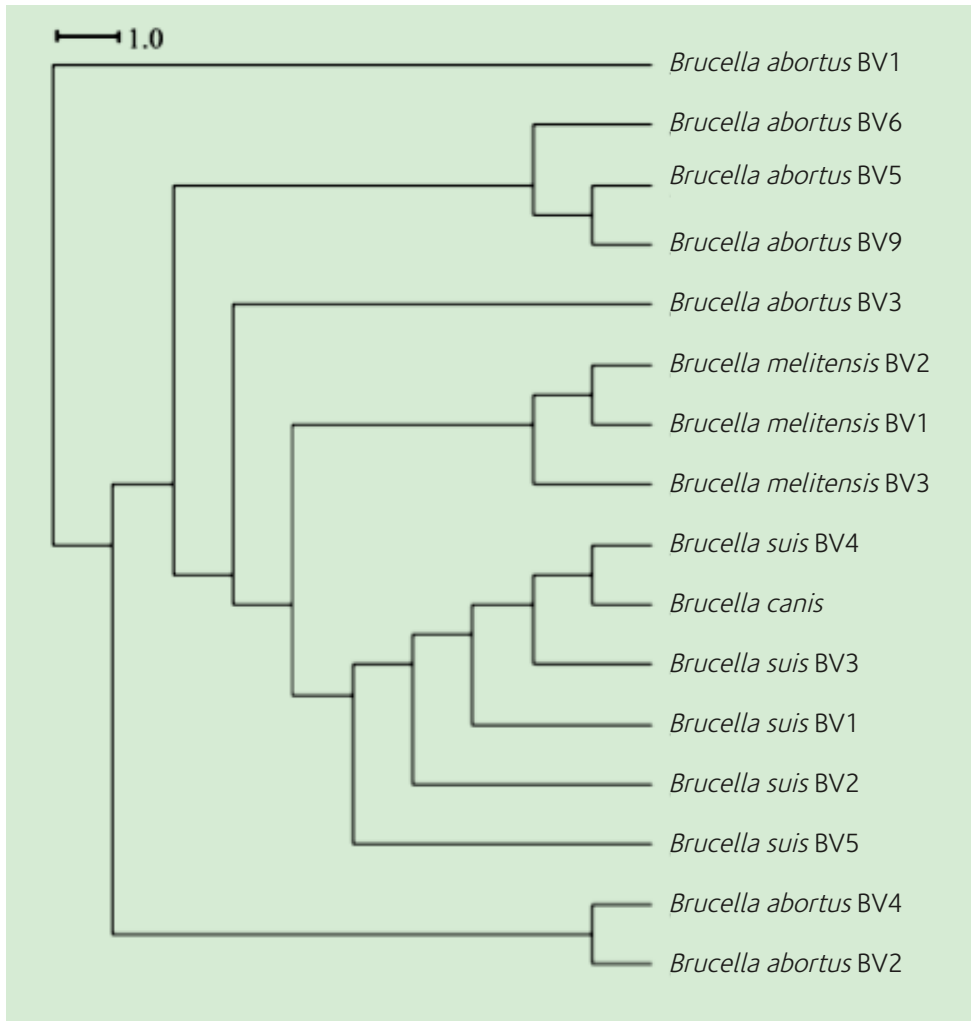
Brucellos hos människa är karakteriserad av långvarig undulerande (böljande) feber med långsamt stigande och sedermera fallande kurvor. Även med behandling är symtomen ofta återkommande och sjukdomen kan bli kronisk och vara i flera månader eller år. Dessutom finns påverkan på flera organ såsom t.ex. hjärna, muskler och leder. Mortaliteten hos människa är låg, men avsaknad av effektiv behandling är problematiskt och inget profylax finns. Dessutom är infektionsdosen låg (10-100 bakterier) och överlevnadstiden i miljön lång. *Brucella* är därför klassificerad som potentiellt biologiskt stridsmedel enligt World Health Organization (WHO), North Atlantic Treaty Organization (NATO) och Biological Weapons Convention (BTWC) och tillhör kategori B bakterier samt klassificeras som skyddsklass 3 enligt AFS 2005:1 (Pappas *et al.* 2006a; Arbetsmiljöverket 2005).

Brucella abortus och *Brucella suis* biovar 1 är associerade med nötkreatur (Jacques *et al.* 2005) och studier genomförda på SVA (opublicerad) har visat att vid anrikning i mjölk överlever bakterierna några månader och växer till en koncentration 10 gånger högre än i blodet. Risken för matförgiftning och smittspridning via mjölk och mejeriprodukter är därför hög när nötkreatur är infekterade (Danielsson-Tham 2007). Möjliga infektionskällor är till exempel djursperma, foder, illegal införsel och handel med mjölkprodukter och antagonistisk händelse. En sådan händelse skulle leda till en stor ekonomisk skada på ca \$ 500 miljoner per 100 000 personer (Kaufmann 1997). Ett utbrott skulle innebära att djur måste avlivas och att marken samt omgivningen förblir kontaminerad under några år (Pappas *et al.* 2006a).

Human brucellos är ovanlig i Sverige (13 fall under 2012). I Spanien och en del av Portugal samt Italien, Malta, Makedonien och Grekland är brucellos däremot endemisk (Pappas *et al.* 2006b). För närvarande finns även rapporterade fall hos djur i Nederländerna 2013, Frankrike och Belgien 2012 (OIE 2013). *Brucella* är den bakterie som orsakar flest laboratoriesmittor i världen (Pike 1976). I Sverige påvisades ett fall av *Brucella canis* 2011 (Holst *et al.* 2012) och mellan augusti 2013 och februari 2014 pågick ett aktuellt utbrott där *Brucella canis* har påvisats hos flera hundar. *Brucella canis* anses som mer sällsynt än *Brucella abortus* (SVA 2012).

Vid projektets start fanns molekylär diagnostik och odling harmoniserad för fem olika högpatogeta mikroorganismer (ej *Brucella*) inom FBD. Ett behov av heltäckande molekylär-diagnostiska och odlingsrelaterade metoder finns för de i FBD inbegripna myndigheterna. Detta så att kvalitetssäkrade metoder för påvisande av *Brucella* smitta hos människor och djur kan genomföras. För närvarande används i Sverige odling för att påvisa *Brucella* på genusnivå i djurprov medan konfirmering med PCR och typning görs av EURL i Frankrike. Metod för livsmedel saknas. För patientprov finns olika metoder som odling, serologi, MALDI-TOF och genus- och *Brucella abortus* specifik realtids-PCR detektion. Ett nationellt behov av framarbetande av nya molekylärbiologiska metoder finns således. För att främja harmonisering av metoder mellan myndigheter kommer de av FBD gruppen framtagna PCR metoderna valideras

och implementeras i varje enskild myndighets verksamhet. Tidigare projekt inom FBD har lett fram till skapandet av metod för validering av PCR metoder (FBD 2009, FBD 2013). Målet med det här projektet, var att ta fram detektionsmetoder för de mest relevanta humanpatogena, *Brucella*-arterna *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* och *Brucella canis* samt en genusspecifik PCR. Alla de aktuella arterna utom *canis* är uppdelade i biovarer (figur 1).



Figur 1. Fylogenetiskt träd baserad på analysen av helgenomsekvenser av typ- och referensstammar från *B. canis*, *B. suis*, *B. melitensis* och *B. abortus*.

Analys: Gegenees 2.0 (Ågren *et al.* 2012);
Visualisering: Splitstree4 4.13. (Huson & Bryant 2006).

3. SYFTE

Det övergripande målet med FBD är att skapa och förbättra förutsättningarna för att mer effektivt använda landets samlade kapacitet och kompetens för diagnostik av biologiska riskklass 3 agens, och att genom samordning kunna utföra kvalitetssäkrad diagnostik med god kapacitet och uthållighet i händelse av storskalig spridning av allvarlig smitta.

PROJEKTMÅL

Syftet med projektet är att vid samtliga medverkande myndigheter utveckla och implementera molekylärbiologisk metodik (realtids-PCR) och odlingsdiagnostik för diagnostik av *Brucella*.

Delmål 1: PCR analysmetoder de medverkande myndigheterna redan besitter är inventerade.

Delmål 2: De *Brucella*-arter vars DNA-sekvenser inte finns lagrade på NCBI databas är helgenomsekvenserade.

Delmål 3: Fyra specifika Realtids-PCR metoder för de mest relevanta humanpatogena *Brucella*-arterna är framtagna utifrån inventeringen i delmål 1. En femte screeningsrealtids-PCR är framtagen för ovan nämnda arter. (Om möjligt är det önskvärt att *Brucella* PCR kan inkorporeras i screen B enligt tidigare genomfört projekt nr 1 genom FBD.)

Delmål 4: De fem framtagna Realtids-PCR analyserna är validerade och implementerade i diagnostiken på myndigheterna. Validering ska ske enligt FBD's valideringsprotokoll och förbättringsförslag på protokollet ska ges till och diskuteras med valideringsprojektet.

Delmål 5: Vilka odlingsmedium som finns hos respektive myndighet är inventerade och en litteraturstudie gällande odlingsmedium är genomförd.

4. MATERIAL OCH METODER/INVENTERING

4.1 STAMMAR

En inventering av vilka stammar de olika myndigheterna har genomfördes och är listade i tabell 1.

Tabell 1. Stammar som användes inom projekt 15. TS= type strain, RefSt=Reference strain.

Stam	Nummer	Typ/ referensstam
<i>B. abortus</i> BV1	ATCC23448	TS+RefSt
<i>B. abortus</i> BV1	544	TS
<i>B. abortus</i> BV1	NCTC00624	-
<i>B. abortus</i> BV2	NCTC10501	RefSt
<i>B. abortus</i> BV3	NCTC10502	RefSt
<i>B. abortus</i> BV4	NCTC10503	RefSt
<i>B. abortus</i> BV5	NCTC10504	RefSt
<i>B. abortus</i> BV6	NCTC10505	RefSt
<i>B. abortus</i> BV7	NCTC10506	RefSt
<i>B. abortus</i> BV9	NCTC10507	RefSt
<i>B. canis</i>	ATCC23365	TS
<i>B. canis</i>	SVA <i>B. canis</i> fall	-
<i>B. canis</i>	NCTC10854	TS
<i>B. ceti</i>	NCTC12891	TS
<i>B. inopinata</i>	CAPM6436	TS
<i>B. melitensis</i> BV1	ATCC23456	TS
<i>B. melitensis</i> BV1	NCTC10094	TS+RefSt
<i>B. melitensis</i> BV2	NCTC10508	RefSt
<i>B. melitensis</i> BV3	NCTC10509	RefSt
<i>B. microti</i>	CAPM6434	TS
<i>B. neotomae</i>	ATCC23459	TS
<i>B. ovis</i>	ATCC25840	TS
<i>B. ovis</i>	NCTC10512	TS
<i>B. pinnipedialis</i>	NCTC12890	TS
<i>B. suis</i> BV1	ATCC23444	TS
<i>B. suis</i> BV1	NCTC10316	TS
<i>B. suis</i> BV1 China	NC12042-01	-
<i>B. suis</i> BV2	NCTC10510	RefSt
<i>B. suis</i> BV3	NCTC10511	RefSt
<i>B. suis</i> BV4	NC10385-02	Nej
<i>B. suis</i> BV5	NCTC11996	RefSt

4.2 ODLING

Vid diagnostisering av *Brucella* används odling tillsammans med MALDI-TOF och realtids-PCR som detektionsmetod. En inventering av de olika myndigheternas odlingsmedium samt litteraturstudie och utveckling av ett nytt recept gjordes. Bruc6 agar är utvecklad av sex olika Brucellamedier och innehåller näringsämnen som förbättrar tillväxt av *Brucella*. Antibiotikablandningen ska inte påverka tillväxt av *Brucella*, men ska inhibera bakgrundsfloran. Följande selektiva agarmedier användades inom projektet:

Brucella-agar enl. Farrell

TSA Oxoid (40 g/L)
Brucella supplement Oxoid (2 ampuller)
Nötblod citrat eller Serum (50 mL)
Nystatin (100000 IU)
Bacitracin (25000 IU)
Nalidixin (5 mg/L)
Cycloheximid (100 mg/L)
Vancomycin (20 mg) 8 mL
Polymixin B sulfat (5000 IU) 2 mL

Blod agar

Columbia blood agar base 43 g
L-tryptofan 0,1 g
Hästblod, defibrinerat 50 mL
Tillsätt vatten för slutvolym 1 L
pH 7,3 ± 0,2

BMB-plattor (Brucella medium base) Oxoid CM0169

22,5 g Brucellamedium i 400 mL H₂O
Brucella selective supplement Oxoid SR0083A
(1 ampull i 10 mL 50:50 MeOH:H₂O 37 °C i 10-15 min)
Inaktiverat hästserum 50 mL
Dextrose (D-glucose) 50 mL 25 %

Bruc6 agar

15 g Tryptone
5 g Soytone
5g Sodium chloride
5 ml Tween 40
1 g Glucose
5 g Yeast extract
1,4 mg Crystal violet
10 g Agar
20 mg Vancomycin
100 mg Nystatin
10 mg Nitrofurantion
Vatten till slutvolym 1 L

BAB-CITA

BAB-CS (Biolife) (5 % CS)
Vancomycin (20 mg/L)
Nystatin (100000 IU)
Colistin (7,5 mg/L)
Nitrofurantion (10 mg/L)
Amphotericin B (4mg/L)

4.3 SEKVENSERING

Sekvensinventeringen (figur 2) visade att fyra stammar behövde helgenomsekvenseras på grund av att information saknades i NCBI-databasen.

Sekvensinventering
<i>Brucella melitensis</i> (16M)
<i>Brucella melitensis</i> biovar 1 (16M)
<i>Brucella melitensis</i> biovar 2 (63/9)
<i>Brucella melitensis</i> biovar 3 (Ether)
<i>Brucella suis</i> (1330)
<i>Brucella suis</i> biovar 1 (1330)
<i>Brucella suis</i> biovar 2 (Thomsen)
<i>Brucella suis</i> biovar 3 (686)
<i>Brucella suis</i> biovar 4 (40)
<i>Brucella suis</i> biovar 5 (513)
<i>Brucella neotomae</i> (5K33)
<i>Brucella ceti</i> (B1/94)
<i>Brucella pinnipedialis</i> (B2/94)
<i>Brucella microti</i> (CCM 4915)
<i>Brucella abortus</i> (544)
<i>Brucella abortus</i> biovar 1 (544)
<i>Brucella abortus</i> biovar 2 (86/8/59)
<i>Brucella abortus</i> biovar 3 (Tulya)
<i>Brucella abortus</i> biovar 4 (292)
<i>Brucella abortus</i> biovar 5 (B3196)
<i>Brucella abortus</i> biovar 6 (870)
[<i>Brucella abortus</i> biovar 7 (63/75)]
<i>Brucella abortus</i> biovar 9 (C68)
<i>Brucella ovis</i> (63/290)
<i>Brucella canis</i> (RM6/66)
<i>Brucella inopinata</i> (BO1)

Ett ng DNA per stam användes för konstruktion av sekvenseringsbibliotek för Ion Torrent användes för konstruktionen Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit användes i AB Library Builder™ systemet för att konstruera biblioteket. Lab Chip XT™ användes för kvalitetskontroll av biblioteket. Biblioteket anrikades med kulor (beads) med hjälp av OneTouch™ 2 system. Det slutliga biblioteket sekvenserades i multiplex med hjälp av Ion 318 chip V2, 2 ml användes som kontroll av ISPs.

Allt data separerades i Torrent Suite™ och analyserades i CLC genomics arbetsflöde 6.0.1.

De fyra dataseten blev sammanförda de-novo med hjälp av CLC Genomics arbetsflödes standard och resulterade i contigs som annoterades med hjälp av BLAST annoteringsverktyg. Dessa genomdraft användes sedan tillsammans med de tillgängliga genomen på NCBI för att designa qPCR assayen.

Figur 2. Inventeringen av sekvenser som fanns i NCBI-databasen vid projektets start.
Grön: hela sekvensen finns, Gul: contiger finns, Röd: ingen sekvens finns.

4.4 INVENTERING PRIMRAR OCH PROBER

Innan nya qPCR-metoder utvecklades, inventerades befintliga analysmetoder (tabell 2). De markerade primrar och prob för *B. abortus* har fungerat väl och är validerad i projektet.

Tabell 2. Lista av befintliga primrar och prober.

Specificitet	Oligonukleotid	Sekvens	Fluorofor
1. Genus PCR	IS711-F	TGG TCT ATC TGT AAA TTT TTA TTA AG	FAM
	IS711-R	CTG TGG TTT TCC TCA ATC	
	IS711-P	TGC CAT CCA TCA TGT GAA CCT	
2. Genus PCR	iQBr 1F	GCT GCT TTG CTC CGT TTC A	FAM
	iQBr 1R	TTT ATG CTG ACC GCA GTC TTT	
	iQBr1- P	CGA TCT TCC GCG ACC CCT G	
3. Genus PCR	16S-F	CGG AAC TGC CTT TGA	FAM
	16S-R	CAC CTC TAC ACT CGG A	
	16S-P	ATT CCA CTC ACC TCT ACC ATA CTC AA	
4. Genus PCR	iQBr 1F	GCT GCT TTG CTC CGT TTC A	SYBR
	iQBr 1R	TTT ATG CTG ACC GCA GTC TTT C	
5. <i>B. abortus</i>	F	GCA CAC TCA CCT TCC ACA ACA A	FAM
	R	CCC CGT TCT GCA CCA GAC T	
	P	TGG AAC GAC CTT TGC AGG CGA GAT C	
6. <i>B. abortus</i>	F	GGT GTA TAT CAA CCA GCA G	FAM
	R	CCG TTC CAG TAA TTA AGA G	
	P	ATC TAT GTC GTC AAT ACT ACT GGC G	
7. <i>B. abortus</i>	iQBr16F	GCA CAC TCA CCT TCC ACA ACA A	SYBR
	iQBr16R	CCC CGT TCT GCA CCA GAC T	
8. <i>B. melitensis</i>	BME-F	TCG CAT CGG CAG TTT CAA	FAM
	BME-R	CCA GCT TTT GGC CTT TTC C	
	BME-P	CCT CGG CAT GGC CCG CAA	
9. <i>B. melitensis</i>	iQBr10F	AAC AAG CGG CAC CCC TAA AA	SYBR
	iQBr10R	CAT GCG CTA TGA TCT GGT TAC G	
10. <i>B. ovis</i>	BOV-F	CGC TAT CGA TGG CGT AGT TG	FAM
	BOV-R	CCC TGA TTT CAA GCC ATT CC	
	BOV-P	TGG CCT GAC GGA CGC GCT TAT C	
11. <i>B. ovis</i>	iQBr18F	CGC TAT CGA TGG CGT AGT TG	SYBR
	iQBr18R	CCC TGA TTT CAA GCC ATT CC	
12. <i>B. canis</i>	iQBr19F	AAA ATG CGG ATC GGC CTT	SYBR
	iQBr19R	TCC CGG CGC ATT GCT	
13. <i>B. suis, canis, neotomae</i>	iQBr23F	CAC ACG CCG ACA ATG ATA TGG	SYBR
	iQBr23R	CGC CGA GAT AAT GGC TCC TC	
14. <i>B. neotomae</i>	iQBr20F	ATG CGG ATG CCC GTT TC	SYBR
	iQBr20R	AAC CTG GCG TCT TTG TCT ATC ACT	

4.5 NYDESIGNADE PRIMRAR OCH PROBER

Gegenees 2.0.1 (Ågren *et al.* 2012) användes för att hitta genomiska biomarkörer specifika för de fyra underarterna av *Brucella*. Förutom de fyra draftade genomerna som producerades internt laddades 17 kompletta genom och 242 draftade genom ner från NCBI. För varje analys valdes en målgrupp med alla tillgängliga genomsekvenser av den underart som analysen riktade sig mot samt en bakgrundsgrupp med ett urval av genomsekvenser som representerar de övriga *Brucella* arterna. Gegenees hittar biomarkörer genom in-silico fragmentering av genom följt av en jämförelse mellan alla fragment med BLASTN. De fragment för vilka målgrupp genomerna gav genomgående högre BLAST-träffar än bakgrundsgenomerna tilldelades biomarkörpoäng. Denna poäng beräknades enligt ekvation 1. En poäng på noll eller mindre indikerar att det inte finns någon möjlighet att skilja mellan mål och bakgrund inom detta fragment medan en träff med poäng ett indikerar att fragmentet finns representerat endast i målgruppen.

Ekvation 1. Beräkning av biomarkörpoäng.

$$\text{Biomarkörpoäng} = 1 - \frac{\text{maxBLASTpoäng för bakgrundsgenom}}{\text{minBLASTpoäng för targetgenom}}$$

Analysen i Gegenees utfördes med de snabba inställningarna (fragmentstorlek 500, steglängd 500) och BLASTN. För alla fyra underarter av *Brucella*, extraherades listor med de fragment som hade en biomarkörpoäng över 0,05. Fragmentlistorna kurerades manuellt med hjälp av NCBI:s webbaserade BLAST-sökning mot både helgenomsekvenser (WGS) och nukleotid databasen (nt). Endast de fragment som visade betydande och konsekventa skillnader med andra underarter inom *Brucella* behölls. Genomen hos olika *Brucella*-arter är mycket lika. Initialt hittades endast 10 till 30 biomarkörer för respektive underart och endast två till fem återstod för varje art efter kurering. De flesta av de fragment som togs bort under kurering kunde endast skilja mellan arter med hjälp av varierande antal repeterade sekvenser (VNTRs) eller enstaka nukleotidskillnader (SNP:ar). De kurerade fragmenten diskriminerade i allmänhet mellan arter genom små insertioner, deletioner eller genom flera klustrade SNP:ar. Biomarkörpoängen för de kurerade fragmenten var relativt låga (0,07-0,15).

Alla signifikanta BLAST-träffar i fragmentlistorna laddades ner och alignades med hjälp Clustal Omega (Sievers *et al.* 2011). Denna flersekvensalignment användes för att, med hjälp av intern mjukvara, konstruera primrar och prober. T_m och eventuell sekundärstruktur bekräftades med Primer Express™ (Applied Biosystems). För varje art valdes ett primersystem ut för labvalidering. De övriga sparades utifall ett system inte fungerade som förväntat (tabell 3).

Tabell 3. Nydesignade primrar och prober. De gråmarkerade är primrar och prober som har fungerat väl och är validerade i det här projektet.

Specificitet	Oligonukleotid	Sekvens	Fluorofor
15. Genus PCR	generellEA-F	CGG CGA TTG GGC TGT CT	FAM (MGB)
	generellEA-R	GTA ACT GCG GTC TTG CCC C	
	generellEA-P	CCT TCA ATC TGC AGG CTG	
16. <i>B. abortus</i>	abortusEA-F	GCG CGA AAG GCA TGA AAG GT	FAM (MGB)
	abortusEA-R	TGG CGG GGT TTT CAA ACT GTT G	
	abortusEA-P	GAA TGG TAA CCC CAA TGC	
17. <i>B. melitensis</i>	melitensisEA-F	AAG GTC AGT TCC ATG CGC G	FAM (MGB)
	melitensisEA-R	TCA CGC TGG CCC CTT TG	
	melitensisEA-P	TGT TGA AGG TAA GCG TGT TCT GAT T	
18. <i>B. melitensis</i>	melitensisEA-F1	GCC GGA CAA ATC AGA TGC A	TAMRA
	melitensisEA-R1	CGT CAA AAC AAA GGA TTA GAG CG	
	melitensisEA-P1	CAT ATA CCT TAG AGC GCG TTT	
19. <i>B. melitensis</i>	melitensisEA-F2	GGA CAA TCG TTA TCG GCG AT	TAMRA
	melitensisEA-R2	GCC CTT GCC TGT GAT GAT AAC	
	melitensisEA-P2	CGA TCC GCA GGC GTT TCG TGG	
20. <i>B. canis</i>	canisEA-F	TTG AAT ACT ACC GCA GCG CG	FAM (MGB)
	canisEA-R	AAG CCG TCC AGA GAT AAA CGC	
	canisEA-P	GTA TAG GTA GGG CTT G	
21. <i>B. suis</i>	suisEA-F1	GAG CCG GGC AAT GCG ATT	TAMRA
	suisEA-R1	GAA ACC GAC CAG CCC GTT	
	suisEA-P1	ACC CGG CGC GCA TTC CGG CGG CAC T	
22. <i>B. suis</i>	suisEA-F2	TGG GTT CGC AAA CCA TGC	TAMRA
	suisEA-R2	GGG CTG GAT CGG CCA CTA	
	suisEA-P2	ATC ACA AAA GCG CAA AGA TCA CAC CGT	

4.6 REALTIDS-PCR

Realtids-PCR reagenser är listade i tabell 4. Som intern amplifieringskontroll (IAC) användes DNA från sälherpesvirus typ 1 (PhHv-1) (van Doornum *et al.* 2003). Följande reagenser blandades enligt proportionerna givna i tabell 4 till en slutlig volym motsvarande 20 µl x antal planerade reaktioner; Quanta PerfeCTa™ qPCR ToughMix inklusive referensfärgen low Rox, primrar och prober för aktuell genetiska markörer, primrar och prober för IAC samt vatten. Till PCR-reagensmixen sattes 0,2 µl PhHv-1 DNA med koncentration motsvarande $C_t \sim 32$.

Tabell 4. Reagensförhållanden.

Primer/prob mix	Volym
Vatten, DNAs och RNAs fritt	154 µl
100x Tris-EDTA buffer	2 µl
100 µM Forward primer	20 µl
100 µM Reverse primer	20 µl
100 µM Prob	4 µl
20xBrucella / 20 x IAC	Volym
Vatten, DNAs och RNAs fritt	5 µl
PerfeCTa qPCR ToughMix inkl low rox	12,5 µl
20 x Brucella (av Primer/prob mix, se ovan)	1,25 µl
20 x IAC (av Primer/prob mix, se ovan)	1,25 µl
Templat	5 µl

Den slutliga reaktionsvolymen inklusive templat motsvarade 25 µl. Temperaturprofilen var standard för TaqMan-prob; 1 cykel med 95 °C (3 min), 45 cykler med 95 °C (15 s) och 60 °C (45 s). Se tabell 2-3 för detaljerad information om genetiska markörer och oligonukleotider. De gråmarkerade primrarna och proberna för qPCR validerades genom inklusivitets- och exklusivitets-test samt bestämning av detektionsgräns (LOD).

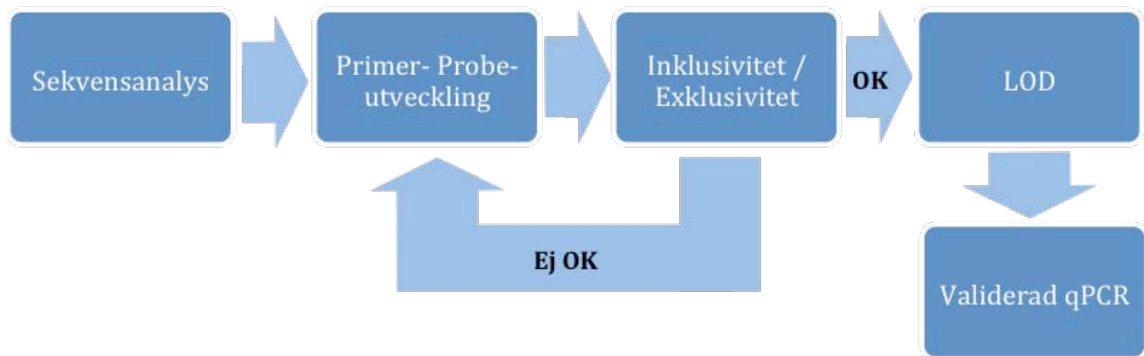
DNA koncentrationen på extraherat material fastställdes med en Nanodrop spektrofotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Realtids-PCR utfördes med ABI 7500 (Applied Biosystems, modell 7500 Fast). Data analyserades manuellt i linjär skala där tröskelvärde sattes till 0,12 och resultaten redovisades som erhållet Cycle threshold värde (C_t -värde), se tabell 8.

Initialt testades befintliga primrar och prober för *Brucella* genus och *B. abortus* (tabell 2). Därefter testades alla nydesignade primrar och prober (tabell 3).

4.7 VALIDERING

För validering av inklusivitet och exklusivitet av qPCR-metoderna användes 29 stammar från 10 arter och 23 biovarer av *Brucella* med som ska detekteras i ett inklusivitetstest samt DNA från 42 stammar av agens som inte ska detekteras i ett exklusivitetstest (tabell 6).

Som mått på specificiteten beräknades två procentsatser, dels en så kallad inklusivetsprocent och dels en så kallad exklusivetsprocent. För inklusivetsprocenten gäller följande: den del av testade stammar, tänkta att detekteras av analysen, som detekterades. På samma sätt gäller för exklusivetsprocenten; den del av testade stammar, tänkta att inte detekteras av analysen, som inte detekterades (figur 3).



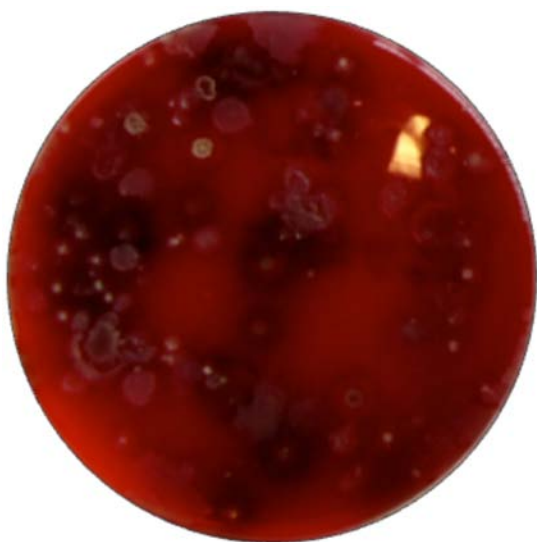
Figur 3. Flödeschema för valideringsprocessen.

För bestämning av LOD (enligt FBD projekt 18, 2013) analyserades successiva 10-faldiga spädningsserier motsvarande 10^6 - 10^2 och successiva 2-faldigaspädningar motsvarande 50–0,039 GE/reaktion. Triplikat av 10^6 - 10^4 och 6-plikat av övriga analyserades. LOD definierades som den lägsta detekterbara koncentration av DNA i spädningsserien där alla replikat är positiva. LOD bestämdes med biovar 1 i de fall där det finns fler biovarer hos en art och analysen repeterades tre gånger på SVA och två gånger på FOI.

5. RESULTAT

5.1 ODLING

Odlingen av bakgrundsfloran gjordes med spenat, skrap och köttfärs. Dessa matriser innehåller en hög halt av olika bakteriearter (figur 4).



Figur 4. Bakgrundsflora skrap på icke selektivt blodagar; 37 °C, 24 h.



Figur 5. *Brucella abortus* på Farrell agar, 37 °C, 5 d, 10 %.

BAB-CITA inhiberade bakgrundsfloran minimalt och *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. abortus* och *B. suis* växer inte lika bra på detta medium jämfört med Farrell agar och Bruc6 agar (tabell 5).

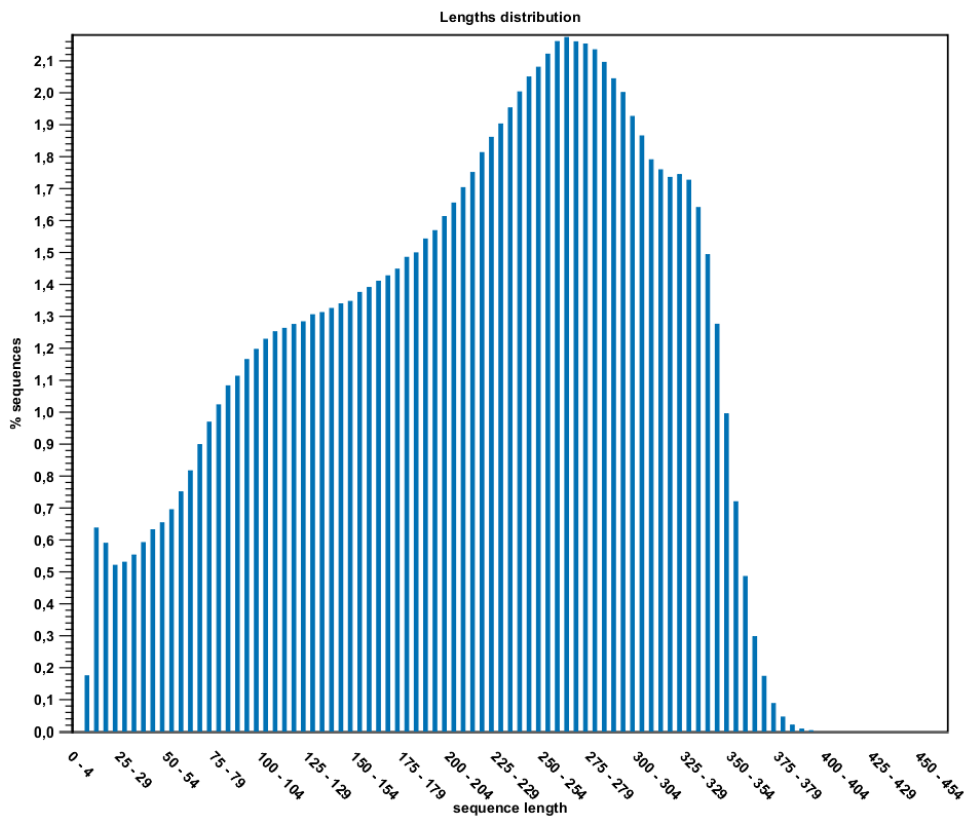
Tabell 5. Resultat av odlingen på olika selektiva agarmedier för *Brucella*.

	Farrell	BAB-CITA	Bruc6
Inhibering av bakgrundsfloran (köttfärs, skrap, spenat)	+++	+	++
Tillväxt av <i>Brucella</i> (stammar)	+++	++	+++

Odlingen gjordes på Farrell agar med blod och Farrell agar med serum. På Farrell agar som innehåller blod växte 100 % mer *Brucella abortus* BV1 bakterier än på serumplattor. Dessutom är det enklare att räkna cfu av vita kolonier på en mörk bakgrund (figur 5). Odling på Farrell agar med blod under 4-5 dagar vid 37 °C och 10 % CO₂ kan rekommenderas för selektiv odlingen av olika *Brucella*-arter från matriser med rik bakgrundsfloran.

5.2 SEKVENSERING

Figur 6 nedan visar läslängdernas spridning av rådatan. Typvärdet på spridningen är 262 bp och medellängden är 207 bp.



Figur 6. Spridning av läslängder av Ion Torrent dataset totalt.

Sekvenserna av *Brucella suis* biovar 4, *Brucella ceti*, *Brucella inopinata* och *Brucella neotomae* är registrerad på NCBI databasen under nummer: AZBG00000000, AZBH00000000, AZBI00000000 och AZBJ00000000 som tillhör till bioprov nummer 2427354, 2427355, 2427356 och 2427357 inom bioprojekt: PRJNA230241.

Tabell 6. Genomstatistik av de sekvenserade stammarna.

Genom	N50 contiglängd	Max contiglängd	Antal contigs >200 bp
<i>B. suis</i>	20456	116534	543
<i>B. ceti</i>	22062	76787	465
<i>B. inopinata</i>	23597	82630	462
<i>B. neotomae</i>	27041	123146	497

Trots att antalet contiger i sekvenseringsprodukterna är stort (tabell 6) kunde alla sekvenserna användas för ytterligare arbete för utvecklingen av qPCR-metoder (se Primerdesign).

5.3 VALIDERING QPCR

Den genus-specifika qPCR-metoden nummer 1 (tabell 2) som använts inom FBD tidigare detekterade inte *B. inopinata* medan den i projektet nyutvecklade genus-specifika qPCR-metoden nummer 15 (tabell 3) detekterade alla *Brucella*-arter och biovarer. Den tidigare *B. abortus* qPCR-metoden nummer 5 (tabell 2) detekterade alla biovarer av *B. abortus* och *B. suis*, medan den nyutvecklade *B. abortus* qPCR-metoden nummer 16 (tabell 3) detekterade alla *Brucella*-arter och biovarer. En äldre *B. abortus* qPCR-metod nummer 6 (tabell 2), som inte längre är i bruk, testades och visades sig detektera alla *B. abortus* biovarer. Tre nyutvecklade qPCR-metoder nummer 17-19 (tabell 3) för *B. melitensis* testades varav nummer 17 och 18 detekterade alla *Brucella*-arter och biovarer och metod nummer 19 detekterade *B. melitensis* biovar 1 och 2 men inte biovar 3. Två nyutvecklade qPCR-metoder för *B. suis* detekterade antingen alla *Brucella*-arter och biovarer (metod 21) eller inga (metod 22). Den nyutvecklade qPCR-metoden för *B. canis* (metod 20) detekterade båda *B. canis* stammarna. Ett nytt försök att förbättra qPCR-metoderna 19 och 22 för *B. melitensis* och *B. suis* med TINA (Twisted Intercalating Nucleic Acid) resulterade inte i mer specifik detektion.

Tabell 7. Resultat från valideringen redovisas med avseende på specificitet och känslighet (LOD).

PCR	Specificitet inklusivitet	Specificitet exklusivitet (n)*	LOD (Pos. Replikat)
15. <i>Brucella</i> genus	100 % [27n]	100 % [46n]	12 GE
6. <i>B. abortus</i>	100 % [9n]	100 % [64n]	6 GE
20. <i>B. canis</i>	100 % [2n]	100 % [71n]	1000 GE
19. <i>B. melitensis</i>	80 % [5n]	101 % [68n]	-
21. <i>B. suis</i>	386 % [7n]	70 % [66n]	-

*(n) = antal stammar inkluderade i testet (i specificitetspanelen ingick alla 27 *Brucella* stammar)

Resultat från valideringen redovisas i tabell 7. En detaljerad lista över resultaten finns i bilaga 1 och 2. Specificiteten för *Brucella* genus, *B. abortus*, och *B. canis* når 100 % för både inklusiviteten och exklusiviteten. Resultaten för *B. melitensis* och *B. suis* var inte tillfredsställande. För förtydligande beskrivs här *B. suis* som exempel; 7 *B. suis* stammar av 29 *Brucella* stammar skulle ha detekterats i inklusivitetstestet men istället detekterades 27 stammar vilket resulterade i en specificitet på 386 % för inklusiviteten. Vad gäller exklusivitetstestet exkluderades 46 stammar av 66 vilket resulterade i en specificitet på 70 %. Vad gäller *B. melitensis* kunde biovar 3 inte detekteras vilket resulterade i en specificitet på 80 % för inklusiviteten och 101 % för exklusiviteten.

6. DISKUSSION

Inom projektet har en *Brucella*-genusspecifik qPCR-metod, en artspecifik qPCR-metod för detektionen av *Brucella abortus* och en för *Brucella canis* utvecklades och validerades. Målet att inkludera alla respektive arter och biovarer men exkludera alla andra arter är uppfyllt för dessa tre PCR-metoder. Dessa analyser nådde 100 % vid inklusivitets- och exklusivitets-testet. Alla validerade qPCR metoder har redan använts i diagnostiken eller i Resurslaboratorium för beredskapsdiagnostik (RUB) övningen 2013. Det kunde visas att den utvecklade metodiken fungerar väl för detektion av respektive art från olika matriser.

De befintliga analysmetoderna för *Brucella* genus och *Brucella abortus* hade avgörande nackdelar. PCR-metoden för detektion av *Brucella abortus* gav positivt PCR resultat för även *Brucella suis* och *Brucella* genusspecifik qPCR detekterade inte *Brucella inopinata*.

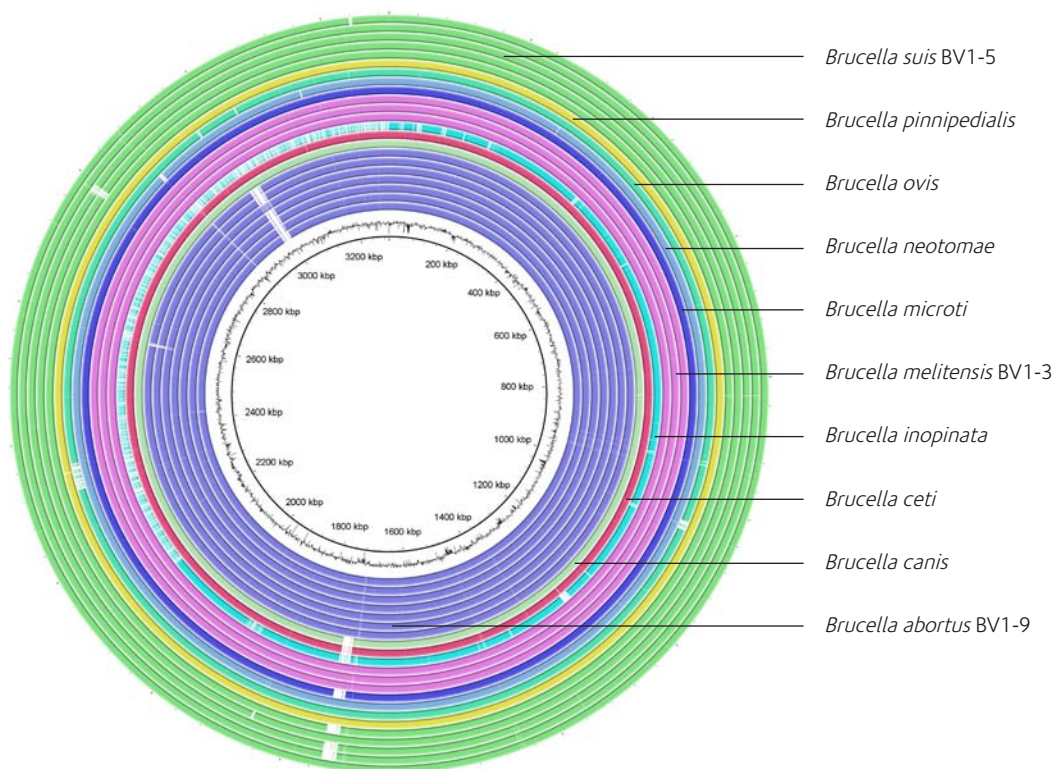
Detektionsgränsen för PCR-metoden för *Brucella canis* ligger 1000 GE högre än den för *Brucella abortus* (6 GE) och *Brucella canis* (12 GE). Målsekvensen för *Brucella canis* specifika primrar och prob ligger på en profag antirepressorgen på kromosom 1 som troligtvis enbart finns i ett fåtal kopior. Därför är detektionsgränsen sämre än den för genuset *Brucella* som hybridiseras med Omp2a gensekvensen. Inom projektiden utvecklades också realtids PCR-metoder för *Brucella melitensis* och *Brucella suis*. Båda var inte tillräckligt selektiva för att valideras vidare. Trots några nydesignade primrar och prober och användning av modifierade TINA primrar var det inte möjligt att utveckla PCR-metoder för *Brucella melitensis* och *Brucella suis* tills projektets slut. Det är svårt att hitta genregioner för hybridiseringen av primrarna och proberna för att särskilja dessa från de arter som ska exkluderas. Alla *Brucella*-arter är mer lika varandra än respektive arter av andra genusar.

Tabell 8. Resultat av DNA-DNA hybridisering inom genuset *Brucella* (Verger *et al.* 2000, Scholz *et al.* 2008, Scholz *et al.* 2010).

	Omärkta DNA från stam	DDH - % DNA likhet med märkt DNA från stam									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	<i>B. melitensis</i>	100	93	92	89	99	97	NA	94	99	80
2	<i>B. abortus</i>	87	100	100	94	89	103	NA	93	93	NA
3	<i>B. suis</i>	105	100	100	98	93	110	NA	99	95	78
4	<i>B. neotomae</i>	99	104	102	100	103	99	NA	95	82	NA
5	<i>B. ovis</i>	92	94	100	90	100	110	NA	86	97	NA
6	<i>B. canis</i>	99	96	102	92	94	100	NA	97	96	NA
7	<i>B. microti</i>	84	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	<i>B. pinnipedialis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	100	80	NA
9	<i>B. ceti</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	91	100	NA
10	<i>B. inopinata</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Alla 16S rDNA gener av alla *Brucella*-arter är 100 % lika varandra (Assadullah Samadi *et al.* 2010). Med DNA-DNA hybridisering visades likheten mellan *Brucella*-arter experimentellt på helgenomnivå (tabell 8).

Genom av alla *Brucella*-arter och biovarer är jämförda i figur 5 med hjälp av mjukvaran BRIG (Alighan *et al.* 2011). Vita arean visar skillnader mellan arterna. Några skillnader som finns i figur 7 finns bara i jämförelse av referens och typstammar. Om man inkluderar kliniska isolat blir det ännu färre genregioner som matchar för möjliga primrar och prober.



Figur 7. Jämförelse av helgenom från alla *Brucella*-arter och biovarer (BRIG).

16S rRNA analys, DDH och BLAST- analysen av hela genom visade att det är svårt att hitta genregioner som kan används för utveckling av detektionsmetoder med qPCR.

Resultatet från det här projektet pekar på att Farell agar är att föredra vid odling av *Brucella*. Mediet är högselektiv, men en nackdel är att odlingen tar lång tid (5 till 7 dagar vid 37 °C).

7. IMPLEMENTERING AV RESULTAT I DIAGNOSTIKEN

De tre realtids-PCRer som utvecklats och validerats inom projektet är färdiga att inkluderas i myndigheternas rutindiagnostik.

Under en övning i RUB användes den nyutvecklade *Brucella* genusspecifika qPCR för att detektera *Brucella* i ost, tiramisu, mjölk och från svabbar. Bestämningen på artnivå gjordes med *Brucella abortus* specifik qPCR som validerats i detta projekt.

Den *Brucella canis*-specifika qPCR användes i augusti 2013 för att detektera *Brucella canis* under utbrottet på en svensk kennel. Placentaprover odlades först på Farrell agar. Detta medium är mycket selektivt för *Brucella* men ett litet antal andra arter kan också växa på det. Under mikroskopet såg bakterierna ut som *Brucella*. Eftersom *Ochrobactrum* är släkt med *Brucella*, ser likadan ut och kan förekomma i samma organ hos djur, måste *Ochrobactrum* skiljas från *Brucella*. Detta gjordes med hjälp av den nyutvecklade *Brucella canis* qPCRn.

8. SLUTSATSER

Projektet har bidragit till en förbättrad beredskap avseende detektion av *Brucella*. Inom projektet har det framkommit att befintliga qPCR-metoder som finns uppsatta inom FBD för genus *Brucella* och *Brucella abortus* inte är tillräckligt selektiva för de arter som metoderna ska detektera. Vid projektstarten saknades PCR för *Brucella canis*, *Brucella melitensis* och *Brucella suis*. Efter detta projekt genomförts har alla fyra myndigheter en qPCR som kan användas för påvisning av alla 10 *Brucella*-arter. Dessutom är det möjligt att artbestämma *Brucella abortus* och *Brucella canis*. Odlingmetoden behöver förbättras ytterligare för en snabbare och säkrare analys av *Brucella* speciellt i provtyper med hög bakgrundsflora.

9. FÖRSLAG PÅ FORTSATT VERKSAMHET

Arbetet som utförts har framförallt inriktats på molekylärdiagnostisk verksamhet. På grund av eventuella felaktiga sekvenser som användes i dessa analyser är det rekommenderat att sekvensera alla arter som ska ingå i framtidens primerdesign på nytt. PCR för *Brucella melitensis* och *Brucella suis* bör utvecklas eftersom det är relevanta arter för human- och veterinärdiagnostiken. Båda är högpatorgena och tillhör säkerhetsklass-3. För diagnostik av veterinärmedicinska prov behövs en PCR för *Brucella ovis* utvecklas, en art som förekommer i getter och får. Dessutom bör PCR för *Brucella inopinata* utvecklas eftersom det är en humanpatogen art. Alla PCRer bör valideras om allteftersom nya *Brucella*-arter upptäcks. Projektgruppen rekommenderar att kontrollera taxonomin angående nya arter eller biovarer årligen.

10. BILAGOR

BILAGA 1.

Resultat från validering av inklusivitet och exklusivitet inom genus *Brucella*.

Nr	Organism	Beteckning	<i>Brucella</i> genus (Ct-värde)	<i>B. abortus</i> (Ct-värde)	<i>B. canis</i> (Ct-värde)
1	<i>B. abortus</i> BV1	ATCC23448	22,3	16,9	ND
2	<i>B. abortus</i> BV1	544	21,2	16,0	ND
3	<i>B. abortus</i> BV2	NCTC10501	21,1	15,9	ND
4	<i>B. abortus</i> BV3	NCTC10502	21,5	25,5	ND
5	<i>B. abortus</i> BV4	NCTC10503	21,5	16,1	ND
6	<i>B. abortus</i> BV5	NCTC10504	21,3	16,1	ND
7	<i>B. abortus</i> BV6	NCTC10505	20,5	15,6	ND
8	<i>B. abortus</i> BV7	NCTC10506	22,5	15,6	ND
9	<i>B. abortus</i> BV9	NCTC10507	23,4	16,2	ND
10	<i>B. canis</i>	ATCC23365	19,4	ND	17,9
11	<i>B. canis</i>	NCTC10854	21,1	ND	18,9
12	<i>B. ceti</i>	NCTC12891	21	ND	ND
13	<i>B. inopinata</i>	CAPM6436	19,8	ND	ND
14	<i>B. melitensis</i> BV1	ATCC23456	20,9	ND	ND
15	<i>B. melitensis</i> BV1	NCTC10094	19,8	ND	ND
16	<i>B. melitensis</i> BV2	NCTC10508	20,9	ND	ND
17	<i>B. melitensis</i> BV3	NCTC10509	20,8	ND	ND
18	<i>B. microti</i>	CAPM6434	19,9	ND	ND
19	<i>B. neotomae</i>	ATCC23459	19,6	ND	ND
20	<i>B. ovis</i>	ATCC25840	21,7	ND	ND
21	<i>B. ovis</i>	NCTC10512	20,3	ND	ND
22	<i>B. pinnipedialis</i>	NCTC12890	20,7	ND	ND
23	<i>B. suis</i> BV1	ATCC23444	21	ND	ND
24	<i>B. suis</i> BV1	NCTC10316	22,4	ND	ND
25	<i>B. suis</i> BV1 China	NC12042-01	20,3	ND	ND
26	<i>B. suis</i> BV2	NCTC10510	32,1	ND	ND
27	<i>B. suis</i> BV3	NCTC10511	21,5	ND	ND
28	<i>B. suis</i> BV4	NC10385-02	20,2	ND	ND
29	<i>B. suis</i> BV5	NCTC11996	21,3	ND	ND

BILAGA 2.

Resultat från validering av inklusivitet och exklusivitet - exklusivitetspanel.

Nr	Organism	Beteckning	<i>Brucella genus</i> (Ct-värde)	<i>B. abortus</i> (Ct-värde)	<i>B. canis</i> (Ct-värde)
30	<i>Bacillus anthracis</i>	7702	ND	ND	ND
31	<i>Bacillus anthracis</i>	4429	ND	ND	ND
32	<i>Campylobacter coli</i>	SLV-271	ND	ND	ND
33	<i>Campylobacter jejuni</i>	SLV-542	ND	ND	ND
34	<i>Enterobacter cloceae</i>	SLV-011	ND	ND	ND
35	<i>Enterococcus duran</i>	SLV-078	ND	ND	ND
36	<i>Escherichia coli</i>	U226	ND	ND	ND
37	<i>Escherichia coli</i>	B266	ND	ND	ND
38	<i>Escherichia coli</i>	L278	ND	ND	ND
39	<i>Escherichia coli</i>	UM245	ND	ND	ND
40	<i>Escherichia coli</i>	S262	ND	ND	ND
41	<i>Escherichia coli</i> O157	SLV-479	ND	ND	ND
42	<i>Escherichia coli</i> O157	EDL933	ND	ND	ND
43	<i>Escherichia coli</i> O113:H21	98NK2	ND	ND	ND
44	<i>Escherichia coli</i> O157:H-	493/89	ND	ND	ND
45	<i>Escherichia coli</i>	XL-1 blue	ND	ND	ND
46	<i>Escherichia coli</i> O26:H11	H2954/06	ND	ND	ND
47	<i>Escherichia coli</i> EIEC	121	ND	ND	ND
48	<i>Francisella tularensis</i>	T8	ND	ND	ND
49	<i>Fusarium culmorum</i>	F.c	ND	ND	ND
50	<i>Fusarium graminearum</i>	F.g	ND	ND	ND
51	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SLV-186	ND	ND	ND
52	<i>Listeria ivanovii</i>	SLV-348	ND	ND	ND
53	<i>Listeria monocytogenes</i>	SLV-513	ND	ND	ND
54	<i>Ochrobactrum anthropi</i>		ND	ND	ND
55	<i>Proteus mirabilis</i>	SLV-374	ND	ND	ND
56	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SLV-395	ND	ND	ND
54	<i>Ochrobactrum anthropi</i>		ND	ND	ND
55	<i>Proteus mirabilis</i>	SLV-374	ND	ND	ND
56	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SLV-395	ND	ND	ND

Forts.

Nr	Organism	Beteckning	<i>Brucella</i> genus (Ct-värde)	<i>B. abortus</i> (Ct-värde)	<i>B. canis</i> (Ct-värde)
57	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SLV-453	ND	ND	ND
58	<i>Salmonella dublin</i>	SLV-242	ND	ND	ND
59	<i>Salmonella typhimurium</i>	SLV-248	ND	ND	ND
60	<i>Shigella boydii</i>	33/08	ND	ND	ND
61	<i>Shigella dysenteriae</i>	15/08	ND	ND	ND
62	<i>Shigella flexneri</i>	100/08	ND	ND	ND
63	<i>Shigella sonnei</i>	99/08	ND	ND	ND
64	<i>Staphylococcus aureus</i>	SLV-438	ND	ND	ND
65	<i>Staphylococcus xylosum</i>	SLV-283	ND	ND	ND
66	<i>Vibrio cholerae</i>	CCUG 4070	ND	ND	ND
67	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CCUG 4224	ND	ND	ND
68	<i>Vibrio vulnificus</i>	CCUG 16397	ND	ND	ND
69	<i>Yersinia enterocolitica</i>	SLV-408	ND	ND	ND
70	<i>Yersinia pestis</i>	KIM	ND	ND	ND
71	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	TAVA81	ND	ND	ND

BILAGA 3.

Poster Medical Biodefense Conference München, 2013.

Development and validation of four species-specific and a genus-specific Real-Time PCR assay including all known species and biovars of *Brucella*

Rene Kaden^{1,5,6}, Sevinc Ferrari^{1,5,6}, Martina Lindberg^{2,5,6}, Stina Bäckman^{3,5}, Annelie Lundin Zumpe^{2,5,6} and Tara Wahab^{4,5}

¹National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden, ²National Food Agency, Uppsala, Sweden, ³Swedish Defence Research Agency, Umeå, Sweden, ⁴Swedish Institute for Communicable Disease Control, Solna, Sweden, ⁵Swedish Forum for Biopreparedness Diagnostics, Umeå, Uppsala and Solna, Sweden ⁶Swedish Joint Laboratory for Food Safety and Biopreparedness, Uppsala, Sweden.

INTRODUCTION

The aim of the study was the development of one real-time PCR (qPCR) for the detection of all known *Brucella* species and four separate qPCR approaches for the recognition of the most common but also the most harmful species *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella canis* and *Brucella suis*. All species within the genus *Brucella* share a genome similarity of approximately 99% with a range between 93.0% to 99.9% based on average nucleotide identity analysis. Complete genome sequences of all type strains and reference strains were considered for the development of primer and probes. The panel to validate the inclusivity and exclusivity of the qPCRs contained all known biovars of *Brucella* but also 42 species with a clinical relevance as well as environmental samples.

1) BRUCELLA: STRAINS AND ORIGIN

Species (Typ-/Referencestrains)	Biovar	NCTC	ATCC	CAPM
<i>Brucella abortus</i>	1	x	x	
	2-9	x		
<i>Brucella melitensis</i>	1	x	x	
	2,3	x		
<i>Brucella suis</i>	1	x	x	
	2-5	x		
<i>Brucella ovis</i>	-	x	x	
<i>Brucella canis</i>	-	x	x	
<i>Brucella neotomae</i>	-		x	
<i>Brucella microti</i>	-			x
<i>Brucella ceti</i>	-	x		
<i>Brucella pinnipedialis</i>	-	x		
<i>Brucella inopinata</i>	-			x

1) PRIMER / PROBE

Specificity	Genetic marker	Fluorophore
Genus <i>Brucella</i>	omp2	FAM
<i>Brucella abortus</i>	Unannotated	FAM
<i>Brucella melitensis</i>	Unannotated	FAM
<i>Brucella canis</i>	Prophage antirepressor	FAM
<i>Brucella suis</i>	Amidase gen	FAM
PhHV-1 (IAC)	gB gene	VIC

2) PCR-MIX

- PerfeCTa qPCR ToughMix
- Low rox
- 20xS *Brucella*
- 20xIAC
- Water
- Sample
- IAC

3) MULTIPLEX qPCR

All samples were analyzed as independent duplicate in addition to the triplicate approach at each plate at a 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems).

2) EXCLUSIVITY PANEL

Beside of proof of inclusivity and exclusivity within the genus *Brucella*, the qPCR was tested with DNA of 42 relevant, mainly clinical species including the closest related genus *Ochrobactrum*.

3) INTERNAL AMPLIFICATION CONTROL (IAC)

As IAC, Phocine Herpesvirus 1 (PhHV-1) aliquots with a known DNA concentration and a target-ct of 32 were used¹.

RESULTS

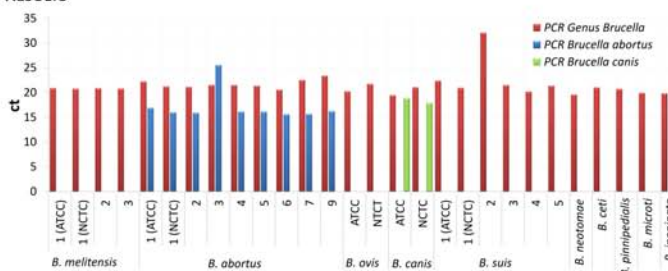


Fig. 1: Triplicate-averages for the ct values of qPCR experiments specific for *B. abortus*, *B. canis* and Genus *Brucella* including all known *Brucella* species and biovars

- The IAC within all PCR experiments varied between ct 30.5 – 36.0.
- Regarding the IAC, there was no more than 2% divergence within the triplicates of one PCR.
- All samples of the exclusivity panel as well as all NTCs were negative for the qPCRs shown in Fig. 1.

CASE REPORT

The species-specific qPCR that was developed for proof of *Brucella canis*, was used for diagnostic purposes in August 2013 for the first time.

Due to several abortions in a Swedish kennel that breeds Miniature Schnauzer, there was a suspicion of canine brucellosis. *Brucella* was cultured from a placenta sample of an abortion. The result was confirmed by a genus specific *Brucella* qPCR and the culture was typed as *Brucella canis* with the developed species-specific qPCR.

The same procedure was performed to detect *Brucella canis* in 3 of 17 probably infected dogs until September 2013. Samples that were tested were placenta, lymph nodes, blood, spleen and liver. The sampling is ongoing.

SUMMARY – FUTURE PERSPECTIVES

The developed methods that are shown in Fig. 1, were successfully tested regarding inclusivity and exclusivity with all *Brucella* species and all biovars as well as 42 species that all gave negative results.

To get information about the sensitivity of the methods the limit of detection is currently being tested. Furthermore, it would be time-saving and very convenient to combine the qPCRs as multiplex qPCR with different fluorophores. There should also exist PCRs for the other *Brucella* species as well as approaches to distinguish the biovars.

This project is part of ongoing work to develop and harmonise methods to increase the level of biopreparedness in Sweden performed within the Forum for Biopreparedness Diagnostics (FBD), involving four governmental institutes: the National Veterinary Institute (SVA), the Swedish Institute for Communicable Disease Control (SMI), the National Food Agency (NFA), and the Swedish Defence Research Agency (FDI). The developed methods were also tested at the Swedish Laboratory for Food Safety and Biopreparedness (RUB), a collaborative effort of the SVA and the NFA.



REFERENCE 1 van Doornum, G. J., Guldemeester, J., Osterhaus, A. D., and Niesters, H. G. (2003) Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture, *J Clin Microbiol* 41, 576-580.

11. REFERENSER

Projektgruppen tackar Erik Alm för hans hjälp med primer-/probedesignen.

- Alikhan, N.,F., Petty, N.,K., Ben Zakour, N.,L., Beatson, S.,A. (2011). , *BMC Genomics*, 12:402. PMID: 21824423.
- Arbetsmiljöverket (2005). Mikrobiologiska Arbetsmiljörisker – smitta, toxinpåverkan, överkänslighet. Arbetsmiljöverkets föreskrifter om mikrobiologiska arbetsmiljörisker – smitta, toxinpåverkan, överkänslighet samt allmänna råd om tillämpningen av föreskrifterna, *Swedish Work Environment Authority*, Solna, Sweden.
- Danielsson-Tham, M.-L. (2007). Matförgiftningar orsakade av mjölk och mejeriprodukter. in Veterinärkongressen. *Stockholm Sveriges Veterinärförbund/ Sveriges Veterinärmedicinska Sällskap*.
- FBD (2009). Ehrs, S., Garbom, S., Nilsson, C., Validering av multiplex Realtids PCR för harmonisering av molekylär detection av riskgrupp 3 bakterier inom FBD, Forum för beredskapsdiagnostik rapportserie, 2009/1.
- FBD (2013). Lavander, M., Karlsson, M., Åkerström, S., Boskani, T., Ågren, P. Validering av kvalitativa real-tids PCR-metoder, Forum för beredskapsdiagnostik rapportserie, 2013/18.
- Godfroid, J., Cloeckert, A., Liautard, J.-P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B., Letesson, J.-J. (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* **36**, 313-326.
- Holst, B.,S., Lofqvist, K., Ernholm, L., Eld, K., Cedersmyg, M., Hallgren, G. (2012). The first case of *Brucella canis* in Sweden: background, case report and recommendations from a northern European perspective. *Acta Vet Scand* **54**, 18.
- Huson, D.,H. and Bryant, D. (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Molecular Biology and Evolution*, **23**, 254-267.
- Kaufmann, A.,F., Meltzer, M.,I., Schmid, G.,P. (1997). The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable? *Emerg Infect Dis* **3**, 83-94.
- Oie World Organization for Animal Health (2013). Disease information.; Available from: <http://www.oie.int>.
- Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L., Akritidis, N. (2006a). Brucella as biological weapon. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2229-2236.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., Tsianos, E.V. (2006b). The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases* **6**, 91-99.
- Pike, R.,M. (1976). Laboratory-associated infections: summary and analysis of 3921 cases. *Health Lab Sci*, **13** 105-14.
- Samadi, A., Ababneh, M.,M., Giadinis, N.,D., Lafi, S.,Q. (2010). Ovine and Caprine Brucellosis (*Brucella melitensis*) in Aborted Animals in Jordanian Sheep and Goat Flocks. *Vet Med Int* 2010, 458695.

- Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H., Cloeckert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.,S., Whatmore, A.,M., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.-J., Nöckler, K. (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 375-382.
- Scholz, H., C., Nöckler, K., Gollner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Kämpfer, P., Cloeckert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.,S., Whatmore, A.,M., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.,J., De, B.,K. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 801-808.
- Sievers F, Wilm A., Dineen D.,G., Gibson T.,J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* **7**:539 doi:10.1038/msb.2011.75 www.clustal.org/omega.
- SVA (2012). Surveillance of infectious diseases in animals and humans in Sweden 2012, National Veterinary Institute, Department of Disease Control and Epidemiology: Uppsala.
- van Doornum, G., J., J., Guldemeester, J., Osterhaus, A.,D.,M.,E., Niesters, H.,G.,M. (2003). Diagnosing Herpesvirus Infections by Real-Time Amplification and Rapid Culture. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 576-580.
- Ågren, J., Sundström, A., Håfström, T., Segerman, B. (2012). Gegenees: Fragmented Alignment of Multiple Genomes for Determining Phylogenomic Distances and Genetic Signatures Unique for Specified Target Groups. *PLoS ONE* **7**, e39107.
- 



STATENS
VETERINÄRMEDICINSKA
ANSTALT

Smi

SMITTSKYDDSinSTITUTET



**LIVSMEDELS
VERKET**

SWEDISH NATIONAL
FOOD AGENCY



FOI

