

PROJEKTRAPPORT

Kvalitetssäkring av realtids-PCR samt laboratoriesäkerhet för analys av högpatogeta bakterier inom Forum för Beredskapsdiagnostik.

Moa Lavander, Talar Boskani, Edvin Karlsson, Marie Karlsson, Paula Ågren och Sara Åkerström

ABSTRACT

In a national effort to harmonise methods and increase the level of biopreparedness the Forum for Biopreparedness Diagnostics (FBD) was founded in 2007. The FBD includes four Swedish governmental agencies: the National Food Agency (NFA), the National Veterinary institute (SVA), the Swedish Institute for Communicable Disease Control (SMI) and the Swedish Defence Research Agency (FOI). Within this forum the four agencies collaborate in matters concerning diagnostics to detect highly pathogenic bacterial species, performed at the BSL3 laboratories which are present at FOI, SMI and SVA. The NFA has access to the BSL3 laboratory at the SVA.

The FBD has three focus areas: 1) method development, 2) harmonisation of equipment and methods including quality assurance and 3) exercise and education.

Molecular methods, such as real time PCR, for detection and typing of highly pathogenic bacterial agents have been shared between the agencies. Methods have also been tested and developed to allow quick, sensitive and specific diagnostics in case of an outbreak or suspected dissemination of high risk pathogens.

One of the ultimate aims of the FBD is to enable cooperation in a crisis, where sample load is too great for any one agency to manage and the possibility to employ the gathered capacity of the authorities' BSL3 laboratories is valuable. A key to sharing sample load lies in harmonisation of quality assurance, since the agencies must be able to rely on assays and analyses performed at each other's laboratories. To fulfil this demand a quality manual has been developed and implementation at the authorities started in 2013. Parts of the methodology shared within the FBD are in-house-methods for real time qPCR analysis of high risk bacterial agents. A protocol for the validation process of PCR methods has been concluded upon and was tested and implemented in the project described in this report. This is an important initial step towards shared quality assurance; a prerequisite to be able to compare results of analyses reported from the agencies and to be able to utilise the joint capacity of the BSL3 laboratories in the event of a major biological crisis.

Titel:	Kvalitetssäkring av realtids-PCR samt laboratoriesäkerhet för analys av högpatogena bakterier inom Forum för Beredskapsdiagnostik. Publ.nr. MSB692 ISBN 978-91-7383-444-5
Projektid:	23 januari – 31 december 2013.
Projektgrupp:	Moa Lavander (projektledare) och Paula Ågren, Livsmedelsverket. Edvin Karlsson, Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI). Talar Boskani, Smittskyddsinstitutet (SMI). Marie Karlsson och Sara Åkerström, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA).
Resurspersoner:	Olga Stephansson och Ylva Lidén, SVA. Martha Schlichtherle och Maria Wijkander, SMI. Malin Granberg och Stina Bäckman, FOI. Jimmy Kjellén, Livsmedelsverket.
Kontaktperson i FBDs styrgrupp:	Viveca Bäverud, SVA.
Styrgrupp:	Ida Andersson, Andreas Bråve och Pontus Juréen, SMI. Mona Byström och Mats Forsman, FOI. Hans Lindmark och Annelie Lundin Zumpe, Livsmedelsverket. Viveca Bäverud (ordförande 2013) och Rickard Knutsson, SVA.
Finansiering:	Projektet har finansierats genom tilldelning av MSB anslag 2:4 Krisberedskap.
Layout:	Tecknarn i Roslagen
Tryck:	TMG Tabergs

INNEHÅLL

Sammanfattning	4
1. Begrepp och förkortningar	5
2. Bakgrund	6
2.1 Harmoniserad kvalitetssäkring för tillförlitlig analysmetodik	6
2.2 Behov av säker metodik för sterilisering av smittat material innan uttag från säkerhetslaboratorium	6
3. Syfte och mål	7
3.1 Övergripande mål	7
3.2 Projekt mål	7
4. Aktiviteter i projektet	8
4.1 Inventering av PCR-metodik vid myndigheterna	8
4.2 Revidering av valideringsprotokollet FBD005-1	8
4.3 Genomförande av valideringar och verifieringar	8
4.3.1 Framtagande av DNA-material och koncentrationsbestämning	8
4.3.2 Genomförande av valideringar	9
4.3.3 Genomförande av verifieringar	12
4.4 Kompetensutveckling vid Tataa samt studiebesök till Danmarks Tekniska Universitet	12
4.4.1 Validering av realtids-PCR, kurs vid Tataa Biocenter	12
4.4.2 DTU Food och Vet, Köpenhamn	12
4.5 Sterilisering och odlingskontroll av biologiskt material innan utslussning från säkerhetslaboratorium	13
4.5.1 Inventering av befintlig metodik för sterilisering av prov	13
4.5.2 Metodik att utvärdera för sterilisering av prov	14
5. Resultat och diskussion	15
5.1 Sammanfattning av resultat	15
5.2 Likartad men divergerad PCR-metodik vid myndigheterna	15
5.3 Reviderad och implementerad valideringsmanual för kvalitativ realtids-PCR	16
5.4 Genomförande av validering	16
5.4.1 PCR-metoder i FBD	16
5.5 Prestanda hos validerade PCR-metoder	18
5.6 Sterilisering av material innehållande högpatogena bakterier för utslussning från säkerhetslaboratorium	19
5.6.1 Värmeavdödning	19
5.6.2 Lysering med NucliSENS buffert och EZ1-extraktion	21
5.6.3 Filtrering med 0,2 µm spinnkolonner	22
6. Slutsatser	23
7. Förslag på fortsatt verksamhet	24
8. Bilagor	25
8.1 Inaktiveringsprotokoll	25
8.1.1 Inaktivering av <i>Burkholderia pseudomallei</i>	25
8.1.2 Inaktivering av <i>Bacillus anthracis</i>	26
9. Referenser	27

SAMMANFATTNING

Forum för beredskapsdiagnostik (FBD) grundades under 2007 för att stärka Sveriges beredskap för en B-händelse, det vill säga en händelse där sjukdomsframkallande mikroorganismer utgör en fara genom ett naturligt utbrott, en olycka eller avsiktlig spridning. FBD bildades av fyra myndigheter: Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI) samt Smittskyddsinstitutet (SMI). Inom FBD sker ett nära samarbete gällande diagnostisk förmåga och kapacitet att påvisa högpatogena sjukdomsframkallande bakterier vid myndigheternas säkerhetslaboratorier av skyddsnivå 3. Metoder testas och utvecklas för att tillåta snabb, känslig och specifik diagnostik i händelse av ett utbrott eller misstänkt avsiktlig spridning av allvarlig smitta. Den främsta analysmetodiken inom FBD är i nuläget realtids-PCR.

Projektet som redovisas i denna rapport fokuserar på kvalitetssäkring, vilket handlar om att metoderna som används för att påvisa högpatogena bakterier måste vara utvärderade för hur känsliga och tillförlitliga de är. Ett av FBDs främsta mål är att möjliggöra samarbete i kris, och dela analysbördan när provmängden är för stor för den enskilda myndigheten att klara av. För att kunna göra detta krävs att vi litar på varandras analysförmåga och metodiken ska därför vara kvalitetssäkrad. För analys av högpatogena agens finns väldigt få standardmetoder, eller kommersiella metoder, som redan är kvalitetssäkrade. De PCR-metoder som FBD-myndigheterna använder är in-housemetodik och måste därför kvalitetssäkras av myndigheterna själva.

Projektet som redovisas i denna rapport har praktiskt implementerat en valideringsmanual som tagits fram inom FBD genom att validera myndigheternas aktuella PCR-metoder för högpatogena agens.

Projektet har även utvärderat metoder för sterilisering av provmaterial som innehåller högpatogena bakterier. Syftet med detta är att materialet skall kunna tas ut från säkerhetslaboratorium i de fall när analysinstrument finns på laboratorier av lägre skyddsnivå, där högpatogena smittämnen inte får förekomma med risk för personalens och omgivningens hälsa. Upphettning, sterilfiltrering och lysning är alla metoder som kan användas för sterilisering av biologiska prover, med olika anpassningar beroende på agens och provtyp.

Detta projekt har resulterat i kvalitetssäkrad analysmetodik, vilket är ett viktigt steg i implementeringen av en harmoniserad kvalitetssäkring, och förbättrad laboratoriesäkerhet vid myndigheternas säkerhetslaboratorier.

1. BEGREPP OCH FÖRKORTNINGAR

Agens	Verksam eller utlösande faktor, används inom medicin i betydelsen smittämne (infektiös agens), till exempel en sjukdomsframkallande mikroorganism.
BSL 2	Biosafety level 2, skyddsnivå 2.
BSL 3	Biosafety level 3, skyddsnivå 3. Används bland annat för att beteckna säkerhetslaboratorium, det vill säga ett laboratorium som är anpassat för arbete med högpatorgena agens av riskklass 3. För "riskklasser" se nedan.
CFU	Colony forming unit, kolonibildande enhet. Varje koloni på odlingsplattan motsvaras av en levande och tillväxande bakterie i materialet som odlats på plattan.
Cq	Cycle of quantification, används synonymt med Ct. Anger vid vilken amplifieringscykel ett prov ger en positiv signal i en realtids-PCR. Uteblivet Cq-värde innebär att eftersökt agens inte har påvisats. Positiva kontroller har ofta Cq-värden mellan 25 och 35 beroende på metodens utformning.
Ct	Threshold cycle. Samma betydelse som Cq, se ovan.
Effektivitet (E)	Fraktionen av målDNA som kopieras i en cykel. Teoretisk maximal effektivitet $E = 100\%$ motsvarar dubbling av mängden PCR-produkt i varje cykel. Hög effektivitet innebär en mer robust analys som påvisar lågkopieprov bättre och är mindre känslig för kontamination och interferens. Vanligtvis uppnås minst 90 % effektivitet för templat utan matris.
Exklusivitet	Att en metod inte ger positiv signal för de agens som inte ska påvisas av metoden.
FOI	Totalförsvarets forskningsinstitut.
GE	Genomekvivalent.
Högpatorgen	Mycket smittsam och orsakar ofta livshotande sjukdom.
Inaktivering	Mikroorganismer sägs vara inaktiverade när de varken kan tillväxa eller orsaka smitta. För bakterier är inaktivering oftast synonymt med avdödning. Ett prov är inaktiverat när det inte innehåller några levande sjukdomsframkallande mikroorganismer, vilket kan åstadkommas till exempel genom upphettning.
In-house	Används om metod som är utvecklad lokalt till skillnad från kommersiella metoder eller metoder som finns etablerade via standardiseringsorgan så som ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) eller NMKL (Nordisk metodkommitté för livsmedel).
In silico	Med hjälp av datorer och lämplig mjukvara.
Inklusivitet	Att en metod ger positiv signal för de agens som ska påvisas av metoden.
IPC	Internal positive control, en intern positiv kontroll som sätts till ett prov för att mäta att metoden fungerar.
Kvalitativ	En kvalitativ metod kan påvisa förekomst av agens, men anger inte hur stor mängd som finns i det analyserade provet.
Kvantitativ	En kvantitativ metod ger ett mått på mängden av det agens som metoden påvisar.
LOD	Limit of detection, detektionsgräns. Bestäms i detta projekt som den lägsta mängd DNA som påvisas i samtliga replikat för minst fem upprepade försök.
Lysering	När en cells membran upplöses eller faller samman. Leder även till cellens död.
Matris	Det material som ett prov består av och i vilket man försöker påvisa bakterieförekomst vid misstanke om smitta. I ett blodprov är matrisen blod, i ett livsmedelsprov kan matrisen till exempel vara köttfärs.
Matta	När bakterietillväxten på en odlingsplatta är så riklig att man inte kan urskilja enskilda kolonier säger man att bakterierna bildat en matta.
Målsekvens	Även "mälgen" eller "mål-DNA". Den sekvens, eller gen, som en metod är designad för att påvisa.
qPCR	Quantitative PCR, används även om realtids-PCR generellt.
Patogen	Sjukdomsframkallande.
Provmatris	Se "matris", ovan.
Riskklasser	Mikroorganismer delas in i olika riskklasser beroende på om de kan orsaka infektion hos människa, hur smittsamma de är, hur allvarlig sjukdom de ger och om det finns bot eller möjlighet att förebygga infektion.
Riskklass 2	Måttlig infektionsrisk. Kan orsaka infektioner som ibland kan vara allvarliga men vanligen kan botas, förebyggas eller självlåka utan allvarliga men. Hanteras på BSL 2-laboratorium.
Riskklass 3	Hög infektionsrisk. Kan orsaka allvarliga infektioner med begränsade möjligheter att bota eller förebygga och som ofta har hög smittsamhet. Hanteras på säkerhetslaboratorium, BSL 3.
RUB	Resurslaboratorium för beredskapsdiagnostik, SVAs och Livsmedelsverkets gemensamma BSL 3-arbete för diagnostik av högpatorgena bakterier i livsmedelskedjan (livsmedel, vatten, foder, samt prover från djur och deras miljö).
Rxn	Förkortning av "reaktion".
SMI	Smittskyddsinstitutet.
Spika	Att tillsätta mikroorganismer till en provtyp, ofta med syftet att utvärdera en metods förmåga för att påvisa sagda mikroorganism.
Sterilisera	Att tillse att ett material eller föremål är helt fritt från levande mikroorganismer, till exempel bakterier.
SVA	Statens veterinärmedicinska anstalt.
Templat	Befintligt DNA eller RNA som polymeras utgår ifrån för att bygga upp kopior. I denna rapport avses dubbelsträngat DNA som extraherats från bakterier och som används som mall i PCR.
Vegetativ	En vegetativ bakterie är metaboliskt aktiv och tillväxer. Detta står i motsats till en spor som är en resistent och vilande cellform som måste "väckas till liv" för att bli vegetativ igen.

2. BAKGRUND

Forum för beredskapsdiagnostik (FBD) grundades under 2007 för att stärka Sveriges beredskap för en B-händelse, det vill säga en händelse där sjukdomsframkallande mikroorganismer utgör en fara genom ett naturligt utbrott, en olycka eller avsiktlig spridning. FBD bildades av fyra myndigheter: Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI) samt Smittskyddsinstitutet (SMI). Inom FBD sker ett nära samarbete gällande diagnostisk förmåga och kapacitet att påvisa högpato­gena sjukdomsframkallande bakterier vid myndigheternas säkerhetslaboratorier av skyddsnivå 3. Metoder testas och utvecklas för att tillåta snabb, känslig och specifik diagnostik i händelse av ett utbrott eller misstänkt avsiktlig spridning av allvarlig smitta.

Projektet som redovisas i denna rapport fokuserar på kvalitetssäkring, vilket handlar om att metoderna som används för att påvisa högpato­gena bakterier måste vara utvärderade för hur känsliga och tillförlitliga de är.

2.1 HARMONISERAD KVALITETSSÄKRING FÖR TILLFÖRLITLIG ANALYSMETODIK

Ett av FBDs främsta mål är att möjliggöra samarbete i kris, när provmängden är för stor för den enskilda myndigheten att klara av. Om t.ex. SVA får in analysförfrågan gällande 400 kliniska prover från djur skulle de kunna skicka hälften till säkerhetslaboratoriet vid SMI. Myndigheterna kan då hjälpas åt och dela analysbördan. För att kunna göra detta krävs att vi litar på varandras analysförmåga och metodiken ska därför vara kvalitetssäkrad.

Med anledning av detta har kvalitetssäkring genomgående legat i fokus inom FBD (Farhadi *et al.*, 2010; Kaipe *et al.*, 2013). En kvalitetsmanual för det gemensamma arbetet har sammanställts (FBD001) liksom flera styrande dokument för kvalitetssäkrade analyser (FBD002 - 009). Manualen och övriga dokument finns publicerade på FBDs interna hemsida, Wikin.

För analys av högpato­gena agens finns väldigt få standardmetoder, eller kommersiella metoder, som redan är kvalitetssäkrade. De PCR-metoder som FBD-myndigheterna använder är in-housemetodik och måste därför kvalitetssäkras av myndigheterna själva. Som ett led i en gemensam kvalitetssäkring har ett valideringsprotokoll (FBD005-1) tagits fram inom FBD (Kaipe *et al.*, 2013).

Projektet som redovisas i denna rapport har testat och praktiskt implementerat valideringsprotokollet för att utvärdera det och samtidigt validerat myndigheternas aktuella realtids-PCR-metoder för högpato­gena agens. Protokollet har även förbättrats för att bli tydligare och mer användarvänligt.

Detta är ett första viktigt steg mot harmoniserad kvalitetssäkring; en förutsättning för att kunna jämföra resultat av analyser som utförs vid myndigheterna och för att kunna använda den samlade kapaciteten hos säkerhetslaboratorierna vid en B-händelse.

2.2 BEHOV AV SÄKER METODIK FÖR STERILISERING AV SMITTAT MATERIAL INNAN UTTAG FRÅN SÄKERHETSLABORATORIUM

Allt material som innehåller, eller misstänks innehålla, högpato­gena bakterier hanteras vid säkerhetslaboratorium. Analysmetoder som används för att påvisa högpato­gena agens är i stor utsträckning anpassade för att kunna utföras inne på säkerhetslaboratoriet. Men viss apparatur som används för diagnostisering av prover finns på laboratorium av skyddsnivå 2. Det gäller till exempel instrument för helgenomsekvensering, MALDI-TOF och viss PCR. För att slussa ut ett provmaterial från säkerhetslaboratoriet inför analys med dessa metoder får materialet inte innehålla några levande smittsamma bakterier. Det måste med andra ord vara sterilt.

I arbetsmiljöverkets författning för Mikrobiologiska arbetsmiljörisiker – smitta, toxinpåverkan, överkänslighet, AFS 2005:1 (2005), definieras sterilisering som ”behandling för att åstadkomma frånvaro av livsdugliga agens”. Ett material är med andra ord sterilt om mikroorganismerna i det antingen avdödas eller avlägsnas. Avdödning kan till exempel göras genom upphettning eller genom kemisk lysning av bakteriecellerna. Om provmaterialet är en vätska kan denna steriliseras genom filtrering, något som ofta används för att kunna ta ut till exempel extraherat DNA för analyser utanför säkerhetslaboratoriet.

Metodik och rutin för sterilisering behöver testas och standardiseras för att kunna göras på ett säkert sätt vid myndighetslaboratorierna. Det är nödvändigt att veta vilken behandling som krävs för att ett material ska vara säkert att ta ut till laboratorier av lägre skyddsnivå. Helst ska metoden för sterilisering vara så pålitlig att utslussning kan ske utan att det behövs någon tidskrävande odlingskontroll. I dagsläget har myndigheterna en del olika metoder för sterilisering av provmaterial. Dessa har inventerats och ett urval av metoderna testats i detta projekt, med målsättningen att etablera tillförlitliga rutiner för sterilisering och utslussning av biologiskt material från säkerhetslaboratorium.

3. SYFTE OCH MÅL

3.1 ÖVERGRIPANDE MÅL

Det övergripande målet med FBD är att skapa goda förutsättningar för att mer effektivt använda landets samlade kapacitet för diagnostik av högpatogena mikroorganismer. I händelse av storskalig spridning av allvarlig smitta ska samordning myndigheterna emellan ge en stark beredskap och förmåga till uthållighet. Genom att ha en gemensam strategi för kvalitetssäkring ska myndigheterna kunna lita på varandras analyser och resultat, vilket är särskilt viktigt för att kunna stötta varandra med diagnostik om provmängden blir för stor för den enskilda myndigheten att klara av.

3.2 PROJEKTMÅL

Projektets mål är att implementera FBDs valideringsprotokoll för realtids-PCR på rent DNA (FBD005) genom att validera PCR-metoder som används för att påvisa högpatogena bakteriologiska agens. Dessutom ingår i projektet att utvärdera metodik för sterilisering av biologiskt material innehållande högpatogena bakterier, vilket är viktigt om analysinstrument finns utanför säkerhetslaboratoriet och provmaterial måste tas ut innan analys.

Delmål 1: Att det är bestämt vilken PCR-metodik som FBD ska använda och vilka PCRer som ska valideras under innevarande år.

Delmål 2: Att PCR-metoder är validerade för påvisande av DNA från *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* typ A och typ B, *Coxiella*, *Burkholderia pseudomallei* och *B. mallei* samt *Yersinia pestis* enligt FBD valideringsprotokoll (FBD005). Valideringen avser kvalitativ realtids-PCR som genomförs på spädningsserier av bakterie-DNA utan närvaro av matris.

Delmål 3: Att valideringsprotokollet (FBD005) är genomgången och förbättrat.

Delmål 4: Att metodik är utvärderad för tillförlitlig avdödning, alternativt avlägsnande, av alla bakterier i ett prov innan det kan tas ut från säkerhetslaboratorium för analys vid laboratorium av lägre skyddsnivå.

4. AKTIVITETER I PROJEKTET

4.1 INVENTERING AV PCR-METODIK VID MYNDIGHETERNA

För att kunna besluta vilka PCR-metoder som ska användas och valideras av FBD inleddes projektet med en inventering av de realtids-PCR-metoder myndigheterna använder för analys av prover vid misstanke om högpatogen bakteriesmitta. Inventeringen gällde hela PCR-metoden, det vill säga reagenser (inklusive primrar och prober), apparatur och PCR-program. En sammanställning av metodiken finns på FBDs interna hemsida "PCR metodjämförelse mellan FBD-myndigheterna".

4.2 REVIDERING AV VALIDERINGSPROTOKOLLET FBD005-1

Den tidigare versionen av valideringsprotokollet (FBD005-1) var utformad för både kvalitativ och kvantitativ PCR. Detta gjorde protokollet omfångsrikt och svåröverskådligt. För att få en mer användarvänlig manual valde projektgruppen att revidera protokollet till att bara gälla kvalitativa PCR-metoder. De PCR-metoder som används för detektion av högpatogena bakterier inom FBD är alla kvalitativa. Det vill säga de ger ett positivt eller negativt svar men säger inte hur stor mängd av eftersökt agens som finns i provet.

Protokollet består av två delar; en instruktion om vad en validering är och hur den genomförs, samt ett formulär där resultat från genomförd validering fylls i. För att tydliggöra detta har instruktionsdelen döpts om till "valideringsmanual" och formulärdelen till "valideringsrapport". Projektgruppen har förtydligat och förenklat dokumenten så att de ska vara användbara verktyg i valideringsarbetet. Vid varje myndighet har referenspersoner med stor erfarenhet av realtids-PCR och kvalitetsarbete läst igenom dokumenten och kommit med värdefulla synpunkter. Den reviderade valideringsmanualen med formulär för valideringsrapport publiceras på FBDs Wiki under namnet "Valideringsmanual: validering av kvalitativ realtids-PCR för detektion av bakterier" (FBD005-2).

4.3 GENOMFÖRANDE AV VALIDERINGAR OCH VERIFIERINGAR

4.3.1 Framtagande av DNA-material och koncentrationsbestämning

Extraherat DNA fanns att tillgå vid myndigheterna för flertalet agens, och för övriga gjordes nya extraktioner. DNA skickades sedan mellan myndigheterna för att ge alla tillgång till templat från de agens som ingår i metodiken. Mätningen av DNA visade på olika koncentration beroende på om Qubit (Invitrogen) eller Nanodrop (Thermo Scientific) användes. Erfarenhet från flera av myndigheterna visade att spädning efter de mätvärden som gavs av Qubit kunde resultera i orimligt låg detektionsgräns, varför Nanodropmätningarna antas ge ett mer rättvisande värde. Detta beror dock på egenskaper hos den DNA-extraktion som mäts, och kan inte sägas vara en generell sanning. Översikt över DNA-extraktioner visas i tabell 1.

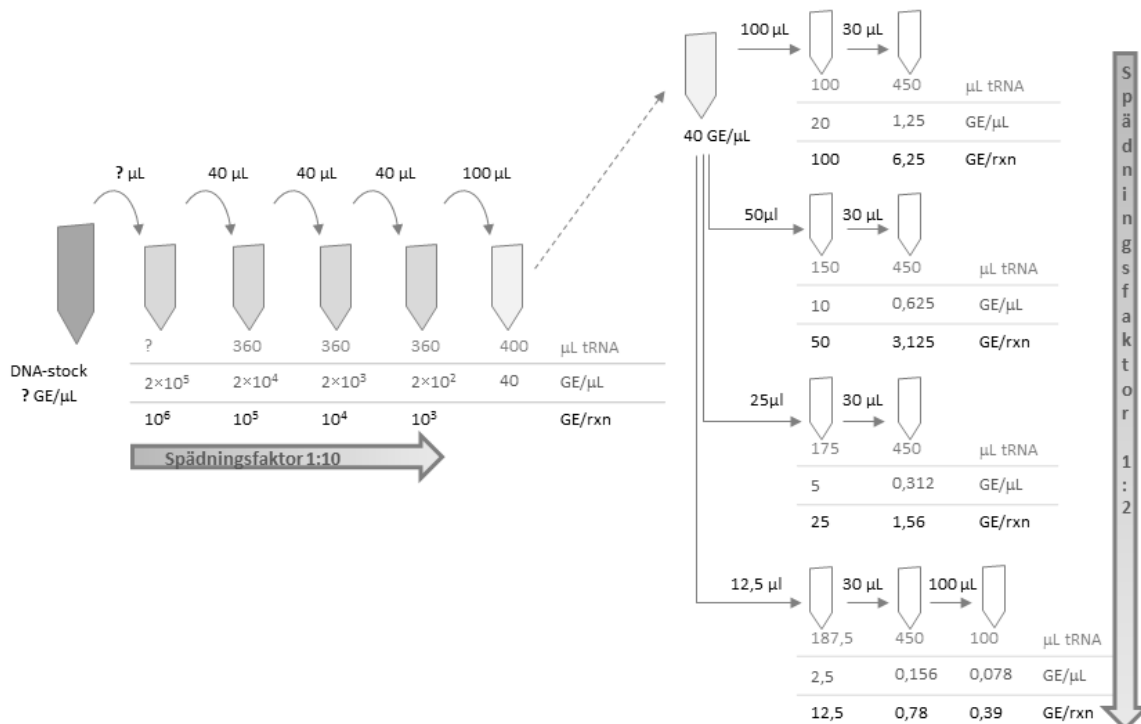
Tabell 1. Översikt över DNA-extraktioner som användes i valideringsarbetet.

Art	Stam	Extraktionsmetod ^a	Koncentration Qubit ng/μL	Koncentration Nano-drop ng/μL
<i>B. anthracis</i>	NCTC 10340	MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit, Epicentre	23,9	71,1
<i>B. mallei</i>	NCTC 10247	DNeasy blood & tissue kit, Qiagen.	18,4	15,2
<i>B. pseudomallei</i>	NCTC 13392	DNeasy blood & tissue kit, Qiagen.	53,1	43,1
<i>C. burnetii</i>	Nine mile phase II	Manuell fenolextraktion	212	236
<i>F. tularensis</i> Typ A	FSC041	EZ1 tissue kit, Biorobot EZ1, Qiagen	67,0	259
<i>F. tularensis</i> Typ B	FSC200	EZ1 tissue kit, Biorobot EZ1, Qiagen	27,5	39,7
<i>Y. pestis</i>	KIM5	DNeasy blood & tissue kit, Qiagen.	13,8	20,7

a. Extraktioner gjordes enligt tillverkarens instruktioner för respektive kit. Manuell fenolextraktion gjordes enligt Macellaro *et al.* (2009).

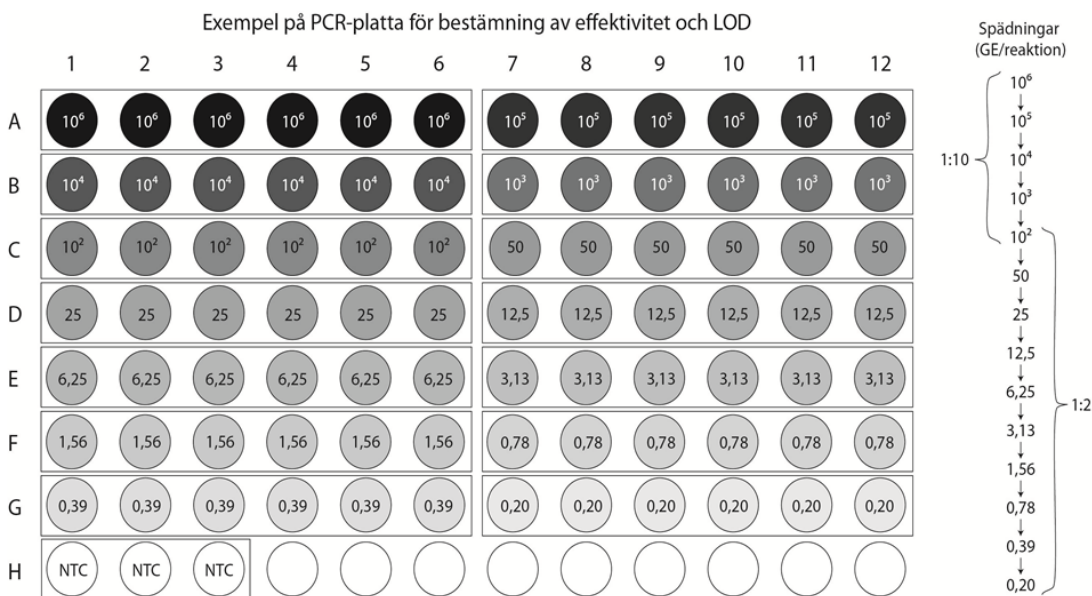
4.3.2 Genomförande av valideringar

För att få praktisk erfarenhet av det befintliga valideringsprotokollet FBD005-1 genomfördes en validering av PCR-metoden för *B. anthracis* som ett pilotförsök. Denna genomfördes vid FOI och parallellt gjordes en verifiering (se rubrik 4.3.3, nedan) vid Livsmedelsverkets och SVAs gemensamma Resurslaboratorium för beredskapsdiagnostik (RUB). I valideringen gjordes en spädningsserie på DNA från *B. anthracis* så att koncentrationen per PCR-reaktion varierade från 10^6 till <1 genomekvivalent (GE). Strategin för spädning visas i figur 1.



Figur 1. Spädningsserie för validering av reallids-PCR. Från stocklösning späds DNA i tRNA för att ge en serie som spänner från 10^6 till <1 GE/rxn (genomekvivalenter per reaktion), med tätare spädningar vid koncentrationer ≤ 100 GE/rxn.

I enlighet med det befintliga valideringsprotokollet (FBD 005-1) laddades spädningarna i triplikat för fem körningar, där minst en körning utförs av en annan laborant, samt i sex replikat i en sjuätte körning som används för att bestämma repeterbarheten inom en och samma platta. Figur 2 visar uppsättning av en PCR-platta med sex replikat av alla spädningar i spädningsserien. Efter att ha konsulterat Robert Sjöback vid Tataa Biocenter (se 4.4 sid 12) ändrades valideringsupplägget till att fem plattor körs, som laddas med spädningsserien i sex replikat (som i figur 2). Detta har förts in i den reviderade valideringsmanualen (FBD005-2).



Figur 2. Uppsättning av 96-brunnars PCR-platta för bestämning av effektivitet och LOD (limit of detection). Bilden visar hur en spädningsserie av DNA kan laddas. Siffrorna i brunnarna visar på antalet genomekvivalenter (GE) per brunn. NTC = no template control, brunn utan DNA-templat. Till höger i bilden visas spädningsserien, där högre koncentrationer späds i tiosteg (1:10) och koncentrationer från 100 GE/reaktion späds på hälften (1:2). Detta ger noggrannare bestämning av detektionsgränsen. Enligt FBD 005-2 körs denna plattuppsättning vid fem tillfällen av minst två olika laboranter för validering av kvalitativ realtids-PCR.

PCR-metoder för övriga agens validerades enligt den reviderade valideringsmanualen för kvalitativ realtids-PCR (FBD005-2). Översikt över validerade metoder finns nedan i tabell 6 och ifyllda valideringsrapporter finns på FBDs Wiki, med mer detaljerad information gällande reagenser, apparatur och PCR-program.

Parametrar som utvärderades i valideringen finns utförligt beskrivna i valideringsmanualen och är bland annat metodens effektivitet, precision och metodkänslighet (LOD, limit of detection).

Effektiviteten (E) anger fraktionen av måldNA som kopieras i en cykel. Teoretisk maximal effektivitet, E = 100 %, motsvarar dubbling av mängden PCR-produkt i varje cykel. Effektiviteten (E) bestäms genom att göra linjär regression på en standardkurva över C_q-värdena som erhålls från PCR på spädningsserien (figur 2). C_q står för cycle of quantification och anger vid vilken amplifieringscykel ett prov ger en positiv signal i en realtids-PCR.

I det linjära fönstret beräknas sedan effektiviteten med ekvationen: $E(\%) = (10 - 1k - 1) \times 100$
Där k är standardkurvas lutning.

Hög effektivitet (nära 100 %) innebär en mer robust analys som påvisar lågkopieprov bättre och är mindre känslig för kontaminering och interferens. Vanligtvis uppnås minst 90 % effektivitet för templat utan matris.

I valideringsmanualen (FBD005-2) definieras **LOD** som den lägsta koncentration som påvisas från mätningar vid minst fem körningstillfällen, ett exempel visas i tabell 2. Alla replikat av en viss koncentration av DNA (se figur 2) ska vara positiva för att en körning ska räknas som positiv för den koncentrationen.

Tabell 2. Bestämning av detektionsgräns (LOD). Exempel på en PCR-metod med LOD på 16 GE/μL. Vid varje körning inkluderas fem replikat för varje koncentration av DNA. Att en körning är positiv för en viss koncentration av DNA innebär att alla fem replikat i den körningen varit positiva. En körning räknas som negativ vid utebliven detektion för ett eller fler av replikaten.

Spädningsserie, DNA-koncentration	Körning 1	Körning 2	Körning 3	Körning 4	Körning 5
128 GE/μL	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
64 GE/μL	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
32 GE/μL	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
16 GE/μL	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
8 GE/μL	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ	Positiv
4 GE/μL	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
2 GE/μL	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ

De mått på **precision** som bestäms i valideringsmetoden (FBD005-2) är **repetierbarhet** och **reproducerbarhet**, vilka båda beräknas som variationskoefficienten i procentform enligt:

$$CV = \frac{STDAV}{\bar{x}} \times 100$$

STDAV är standardavvikelsen för C_q och \bar{x} är medelvärdet för C_q, vid en och samma koncentration av DNA i proven.

Skillnaden mellan de två precisionsmåten är att **repetierbarhet** visar PCR-metodens precision vid minsta grad av variation, det vill säga mellan de sex replikaten inom en och samma körning (figur 2). **Reproducerbarhet** beräknas som variationen för samma koncentration mellan minst fem körningar, som utförts under 5-20 dagar och av minst två laboranter. Både för repetierbarhet och reproducerbarhet görs jämförelsen mellan variationen hos C_q-värdena som erhålls för specifika koncentrationer av DNA.

En ytterligare del av valideringen är metodernas **specifitet**, som utgörs av deras **inkludivitet** och **exkludivitet**. Det vill säga att de påvisar den bakterie de ska påvisa och inte ger varken falskt positiva eller falskt negativa resultat. Specifiteten testades under tidigare projekt i FBD och finns redovisade i FBD-rapport 2009/1 (Ehrs *et al.*, 2009). Resultatet av denna studie finns också införda i de valideringsrapporter som sammanställts i årets projekt.

4.3.3 Genomförande av verifieringar

När en metod har validerats vid ett laboratorium ska andra laboratorier som använder samma metod genomföra en verifiering, för att se om metoden uppför sig på samma sätt som där den validerats. Verifieringen är inte lika omfattande som valideringen utan det räcker med att köra en platta med spädningsserie i sex replikat (se figur 2) för att jämföra metoden mot valideringen.

Om det är betydande skillnader mellan den validerade metoden och metoden vid det egna laboratoriet, till exempel att en metod körs som multiplex istället för singelplex, så räcker det inte med en verifiering. Då måste en ny validering genomföras.

4.4 KOMPETENSUTVECKLING VID TATAA BIOCENTER SAMT STUDIEBESÖK TILL DANMARKS TEKNISKA UNIVERSITET

4.4.1 Validering av realtids-PCR, kurs vid Tataa Biocenter

För att få en bra grund i vad det innebär med validering av realtids-PCR anlätades Tataa Biocenter för att ge en kurs med fokus på validering och utvärdering av valideringsdata med hjälp av mjukvaran GenEx. Tataa Biocenter är ett ledande kunskapscentrum för realtids-PCR och har varit med i utformningen av Valideringsprotokoll FBD005-1 under tidigare FBD-projekt (Kaipé *et al.*, 2013).

Under årets projekt höll Robert Sjöback från Tataa en halvdagskurs. Den presentation som han gav finns upplagd på FBDs Wiki. Inledningsvis gavs en bra introduktion till validering av PCR, med fokus på statistik och centrala begrepp. Därpå följde en praktisk kursdel om GenEx, en mjukvara som används för att göra statistiska beräkningar på data från PCR-körningar och som kan användas för att underlätta valideringsarbetet. GenEx är utformat för att kunna analysera data från flesta realtids-PCR-mjukvarorna, men ett problem som upptäcktes i efterhand är att programmet inte fungerar tillsammans med Step One realtids-PCR-maskinen, som används vid SMI. Detta har påtalats och kommer förhoppningsvis att vara åtgärdat i nästa version av GenEx.

Upplägget i valideringsprotokollet (FBD 005-1) diskuterades och projektgruppen fick en del praktiska råd. En rekommendation var att antalet replikat i PCR-plattorna bör ökas och istället kan antalet körningar minskas. För bestämning av effektiviteten är minst sex replikat att rekommendera (som visas i figur 2). I den reviderade valideringsmanualen (FBD005-2) ska fem körningar genomföras för spädningsserierna, med sex replikat av de inkluderade spädningarna. Det kan jämföras med tidigare (FBD005-1) där fem körningar skulle genomföras med spädningarna i tripliket och en sjätte körning med sex replikat. I övrigt bedömde expertis från Tataa att valideringsmanualen var tillfyllest för ändamålet att validera kvalitativa PCR-metoders prestanda för påvisande av DNA i frånvaro av matris.

4.4.2 DTU Food och Vet, Köpenhamn

Danmarks tekniska universitet (DTU) har ett brett kompetens- och ansvarsområde. De fungerar som en nationell resurs för bland annat diagnostik av livsmedelsburen smitta. Metodik för påvisande av patogena bakterier både utvecklas och valideras vid DTU. De ger dessutom aktivt stöd till privata laboratorier för att kvalitetssäkrad analysmetodik ska finnas på plats även där. Det sker i nuläget inget större arbete med högpatogena agens, men den kunskap som finns uppbyggd gällande andra agens kan i många delar appliceras på högpatogener.

Projektgruppen besökte Branko Kokotovic vid DTU Veterinärinstitutet (DTU Vet), där vi diskuterade beredskapsdiagnostik för högpatogena agens och fick en visning av laboratoriefaciliteterna. Vid DTU

Fødevareinstituttet (DTU Food) gav Charlotta Löfström en bra presentation om in-house-validering av metodik för påvisande av *Salmonella* och *Campylobacter*, där Realtids-PCR är en av analysmetoderna. Denna presentation finns på FBDs Wiki liksom en reserapport från studieresan.

Lärdomar kring kvalitetssäkring och analysmetodik från detta studiebesök var bland annat:

- Det är viktigt att validera hela metoden och inte bara PCRen. Variationen ligger sällan i PCR-steget utan snarare i odlingen, metodik för DNA-extraktion och i påverkan från provmatrisen.
- Lär känna metoden och validera den för flera olika matriser.
- Lär känna din matris. Vad är en lätt och vad är en svår provtyp? Exempelvis faeces är en svår provtyp och erfarenheten säger att en metod som fungerar för denna även fungerar för analys av till exempel kött.
- Om möjligt är det värdefullt att validera metoden för naturligt kontaminerade prover, då spikade prov beter sig annorlunda. Eftersom DTU Food får in väldigt mycket prover från den danska livsmedelsindustrin (främst kyckling och gris) har de många riktiga prover att utvärdera sina metoder på. Detta är ett problem i diagnostik av högpatoagena agens där tillgången till verkligt kontaminerade prover är låg.

4.5 STERILISERING OCH ODLINGSKONTROLL AV BIOLOGISKT MATERIAL INNAN UTSLUSSNING FRÅN SÄKERHETSLABORATORIUM

Med sterilisering menas i det här sammanhanget att inga levande bakterier ska finnas kvar i materialet. Bakterierna som ingår i FBDs diagnostik är olika tåliga. *F. tularensis* är väldigt känslig för värme och en kort upphettning till 58 °C kan vara tillräckligt för att inga levande bakterier ska återfinnas i materialet (Day *et al.*, 2008). Mjältbrandsbakterien *B. anthracis*, å andra sidan, bildar värmeståliga sporer. En sammanställning av studier av värmeinaktivering av mjältbrandssporer visar att det krävs höga temperaturer, tid och helst även fukt för effektiv avdödning. För ett inokulat om $2,4 \times 10^8$ sporer räckte det inte att hetta upp till 90 °C. Levande sporer fanns kvar i provet, även efter en timmes värmebehandling. Med kokning, 100 °C, var dock 5 min tillräckligt för avdödning av inokulat om $7,5 \times 10^8$ (Spotts Whitney *et al.*, 2003).

4.5.1 Inventering av befintlig metodik för sterilisering av prov

Vid säkerhetslaboratorierna används värme, lysning samt filtrering som metoder för sterilisering av provmaterial. En sammanställning visas i tabell 3. Innan utslussning av materialet från säkerhetslaboratorium görs rutinmässiga odlingskontroller. En del av provmaterialet sprids då på odlingsplattor, där bakterier får möjlighet att tillväxa under 3-7 dygn beroende på hur snabbväxande aktuellt agens är. Om odlingskontrollen visar att inga bakterier växer från materialet anses det sterilt och kan slussas ut från laboratoriet.

Tabell 3. Metodik för sterilisering av provmaterial. Översikt över metoder som används för sterilisering av provmaterial vid FBD-myndigheterna och för vilka agens dessa metoder används.

Agens	Värme		Filter	Lysering	Annat	Odlingskontroll*
	Temperatur	Tid		NucliSENS		
<i>B. anthracis</i>	99 °C	30 min	0,22 µm	Fungerar inte		Blodagar 7 dygn
<i>Brucella sp</i>	95 °C	15 min		Ja		Blodagar 5 % CO ₂ 7 dygn
<i>B. mallei</i>	95 °C	15 min		Ja		Blodagar 7 dygn
<i>B. pseudomallei</i>	95 °C	15 min		Ja		Blodagar 3 dygn
<i>C. burnetii</i> **	68 °C	3 h			Fenol-extraktion	Vakuolbildning i BGM-fibroblaster 3 veckor
<i>F. tularensis</i>	65 °C	2 h		Ja		McLeodagar 4 dygn
	95 °C	15 min		Ja		T5-agar 5 % CO ₂ 7 dygn
<i>Y. pestis</i>	95 °C	15 min	0,22 µm	Ja		Blodagar 7 dygn

* De agarplattor som används för odlingskontroll har utvärderats för harmonisering inom FBD (Thelaus *et al.*, 2012). Tiden som anges är totala inkubationstiden. Odlingsplattorna avläses redan tidigare, oftast dagligen fram till den sista inkubationsdagen.

** *Coxiella burnetii* är en svårödlad bakterie som i Sverige i dagsläget endast odlas vid FOI. Metodik för avdödning och avdödningskontroll av denna har testats i FBD och finns redovisad i FBD-rapport 2009/2 (Macellaro *et al.*, 2009).

4.5.2 Metodik att utvärdera för sterilisering av prov

Det fanns inte utrymme i projektet för att utvärdera steriliseringsmetodik för alla de bakteriearter som ingår i FBDs diagnostik. För att täcka in grampositiva och gramnegativa agens valdes *Bacillus anthracis*, i sporform och som vegetativa bakterier, samt *Burkholderia pseudomallei* att ingå i studien.

Den metodik som utvärderades var: värmeavdödning i 95 °C, lysering med NucliSENS lysisbuffert, sterilfiltrering med 0,22 µm Ultrafree[®]-MC filterkolonner (Millipore) och avdödning vid extraktion av DNA med EZ1 Biorobot (Frosth *et al.*, 2009). Protokoll finns som bilaga under rubrik 8.1.

5. RESULTAT OCH DISKUSSION

5.1 SAMMANFATTNING AV RESULTAT

- Beslut att myndigheterna i FBD ska använda sin ordinarie metodik för analys av prover vid misstanke om högpatoget smitta, med harmoniserad kvalitetssäkring.
- Reviderad ”Valideringsmanual för kvalitativa realtids-PCR-metoder för detektion av bakterier” (FBD005-2) har implementerats vid myndigheterna. Valideringsmanualen finns publicerad på FBDs interna hemsida, Wikin.
- Valideringar har genomförts för realtids-PCR för *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis*, *B. mallei*, *B. pseudomallei* och *C. burnetii*. Valideringsrapporterna finns på FBDs wiki.
- Personer vid alla myndigheter har genomfört valideringar enligt den reviderade valideringsmanualen (FBD005-2) och kan bistå när nya valideringar, eller verifieringar, ska genomföras.
- Test av avdödning och filtrering av högpatoget material för säker utslussning har genomförts. De metoder som gav fullgod sterilisering var lysering med NucliSENS lysisbuffert av *B. pseudomallei* samt sterilfiltrering av *B. anthracis* och *B. pseudomallei* med 0,22 µm spinnkolonner. Dessa metoder kan därför användas för direkt utslussning av material innan föregående odlingskontroll.

5.2 LIKARTAD MEN DIVERGERAD PCR-METODIK VID MYNDIGHETERNA

Ett av de tidiga projekten inom FBD var att dela realtids-PCR-metoder för påvisande av högpatogeta bakterier mellan myndigheterna. Metoderna var framtagna vid SMI och utvärderades, bland annat för specificitet, under 2009 i samband med att de sattes upp vid alla säkerhetslaboratorier inom FBD (Ehrs *et al.*, 2009). Tanken var att med harmoniserad metodik kan myndigheterna bättre lita på varandras resultat. För att se hur metodiken ser ut i dagsläget inleddes projektet med att inventera vilka metoder som används nu.

Inventeringen visade att metodiken har divergerat. De flesta myndigheterna använder sig av de metoder som delades under 2009, men med modifikationer. Detta beror bland annat på att laboratorierna har olika PCR-instrument vilket har betydelse för vilka fluoroforer och reagenser som används. PCR-metoderna var initialt uppsatta som multiplexa metoder med 2-4 målsekvenser. Vid SMI har alla metoder delats upp till duplexer med en målsekvens och en internkontroll. Vid FOI, där fokuserat arbete med typning av harpestbakterier pågår, används flera olika PCR-metoder för påvisande av *Francisella*. Detta är ett par exempel på hur metodiken skiljer sig åt mellan myndigheterna.

En PCR har ett antal variabler och sammantaget gör många små ändringar att metodiken mellan myndigheterna inte längre är harmoniserad. Men detta är inte det viktiga. Det viktiga är att myndigheterna har bra, tillförlitlig metodik och kunnig personal som är känner till metoderna och kan utföra analyserna. Grundat i detta beslutade FBDs styrgrupp att samma metodik ska användas i vardag och i kris, även om det innebär att metodiken varierar mellan myndigheterna. Detta gör att den harmoniserade kvalitetssäkringen blir än mer värdefull för att myndighetslaboratorierna ska kunna stötta varandra med analyskapacitet och lita på varandras analyser. Det centrala är med andra ord att analyserna som genomförs, oavsett vald metodik, ger samma och korrekta resultat vid alla myndighetslaboratorier.

5.3 REVIDERAD OCH IMPLEMENTERAD VALIDERINGSMANUAL FÖR KVALITATIV REALTIDS-PCR

Den reviderade valideringsmanualen för validering av kvalitativ realtids-PCR för detektion av bakterier (FBD005-2) finns på FBDs Wiki. Manualen implementerades vid myndigheterna i och med att projektgruppen validerade sju PCR-metoder (tabell 4 och 6). Manualen innehåller även ett valideringsprotokoll för rapportering där resultat från valideringarna dokumenteras. Även valideringsrapporter finns publicerade på FBDs Wiki.

5.4 GENOMFÖRANDE AV VALIDERING

5.4.1 PCR-metoder i FBD

I projektets uppdrag ingick att validera specifika PCR-metoder för högpatogeta agens med primrar och prober enligt tabell 4. PCR-metoderna har tidigare validerats med avseende på specificitet, men inte för övrigt prestanda (Andersson *et al.*, 2011; Ehrns *et al.*, 2009).

Tabell 4. Översikt över PCR-metoder som validerades i FBD under 2013.

PCR-metod	Agens	Målsekvens	Forward primer	Reverse primer	Prob	
Specifik 1 ^a	<i>B. anthracis</i>	5345	TTCCAATAAAATGTCTGTATC	CATGGTACTACTCAAACAAG	FAM- TCCTTCTATGTATGTACGAGTCTCTGA	
		pXO1 <i>pagA</i>	GAGTGATGAATATACATTTCG	GAAGCTTTATTAATCACTTCTTG	Cy5- TTCCGCTGATAATCATGTAACAATGTG	
		pXO2 <i>capD</i>	CTGTCTGGATAAGTGTTC	AAGCCACGTATTATTCTG	Tamra-AGTATCTTCTATCCGAATGGTGAACCT	
IPC (PhHV-1)	gB polymeras	GGGCGAATCACAGATTGAATC	GCGGTCCAAACGTACCAA	VIC-TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-MGBNFQ		
Specifik 2 ^a	<i>Y. pestis</i>	YPO1091	GTAGGATCGTAATTTTCG	CTCACGATTGAAGAAATTG	FAM TTGCAATACACAGTGCCTG	
		pPCP <i>pla1</i>	TCCTGCTACAAATGTTAATC	ACCTGCTTTATAATTCTCATC	Cy5 TGCCAATGAATATGACCTCAATGTG	
		pMT <i>caf1</i>	AGTGGTTCCTGTTTATAG	GCTCCAATTACAATTATGG	Tamra CAAGAGTAAGCGTACCAACAAGTAAT	
IPC (PhHV-1)	gB polymeras	GGGCGAATCACAGATTGAATC	GCGGTCCAAACGTACCAA	VIC-TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-MGBNFQ		
Specifik 3 ^a	<i>F. tularensis</i>	Tul4	CTTGGGCAACTGTAACAG	GCGATTACTCTTTGTCATAAAC	Fam CCGCTACAGAAGTTATTACCTTGCTT	
		<i>F. tularensis</i> typ B	3' reg ISFtu2	GCTACTGAGAAACTATTTTTG	AGTGGAAAAATAAATGACATTC	Tamra-AACCTAGTTCAACCTCAAGACTT
		IPC (PhHV-1)	gB polymeras	GGGCGAATCACAGATTGAATC	GCGGTCCAAACGTACCAA	VIC-TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-MGBNFQ
Specifik 4 ^a	<i>B. mallei</i>	<i>fliP</i>	GACTTTGCTAGAAGCCATTGG	AGCGACAGCAGCAGATG	FAM CGTGAAGCTCGTTGACCTGCC	
		<i>B.pseudo-mallei</i>	<i>mrpA</i>	GCGATATTCTTATGAAGTGTGG	ACAATCGAATCGGTGCCTAC	Tamra TCAATCTCCGATAGCCGCTTGC
		IPC (PhHV-1)	gB polymeras	GGGCGAATCACAGATTGAATC	GCGGTCCAAACGTACCAA	VIC-TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-MGBNFQ
Coxiella ^a	<i>Coxiella</i>	IS1111	CACGAGACGGGTTAAG	CACACGCTTCCATCAC	FAM-TCAGTATGTATCCACCGTAGCCA	
		IPC (PhHV-1)	gB polymeras	GGGCGAATCACAGATTGAATC	GCGGTCCAAACGTACCAA	VIC-TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-MGBNFQ
Francisella SNP typ A ^b	<i>F. tularensis</i> typ A	FtAvacj derived	GACTACTAGTTAAACAACATAAG	GCTGTGACATTACATAAGTG	FAM-CACTAATCCCCTATATAG MGBNFQ	
		FtA vacj anceser			VIC-CACTAATCCCCTCTATAG-MGBNFQ	
		IPC (PhHV-1)	gB polymeras	GGGCGAATCACAGATTGAATC	GCGGTCCAAACGTACCAA	Cy5-TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-MGBNFQ
Francisella SNP typ B ^b	<i>F. tularensis</i> typ B	FTB15 derived	CCATCAGCAGTAGTATAACCACCAA	TGGCGCAGATATGACTAAAGTC	FAM-TATTACTAGGAATGGCGCGC-MGBNFQ	
		FTB15 anceser			VIC-TACTAGGAATGGCGTGC-MGBNFQ	
		IPC (PhHV-1)	gB polymeras	GGGCGAATCACAGATTGAATC	GCGGTCCAAACGTACCAA	Cy5-TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-MGBNFQ

IPC = Internal positive control, en intern positiv kontroll i form av DNA från sälherpesvirioner (PhHV-1) som sätts till i varje prov för att se att det inte är något fel med själva PCR-reaktionen (van Doornum *et al.*, 2003).

a. (Ehns *et al.*, 2009)

b. (Andersson *et al.*, 2011)

Förutom de metoder som listas i tabell 4 ingår i FBDs gemensamma metodik PCRer för påvisande av de bakteriesläkten som de högpatogeta arterna tillhör. Dessa har varit indelade i Screen A, som påvisar släktena *Bacillus*, *Francisella* samt *Yersinia*, och Screen B, som påvisar *Coxiella* samt *Burkholderia*. Tanken med dessa multiplexa PCRer är att ett okänt prov som innehåller ett B-agens snabbt ska kunna analyseras för flera olika bakteriesläkten. Men denna analysförfrågan uppkommer väldigt sällan, och i så fall troligen endast i ringtest. Vid en analysförfrågan i samband med ett utbrott eller annan misstanke om högpatoget smitta gäller det vanligtvis ett bestämt agens. Vidare innehåller de multiplexa metoderna tre eller fyra prober och alla fluoroforer ger inte lika bra signal. Till exempel är FAM en starkare och mer lättanalyserad fluorofor än Tamra. För att få bättre metoder för påvisande av nämnda bakteriesläkten föreslog därför projektgruppen att Screen A och Screen B skulle delas upp i en PCR per agens där målgenerna dels påvisar bakteriesläkte och dels internkontrollen (PhHV-1) och där proben för bakteriesläkte alltid har en FAM-inmärkning, se tabell 5. Validering även av dessa metoder inleddes men hann inte avslutas inom ramarna för projektet.

Tabell 5. PCR för bakteriesläkten. Primrar och prober för påvisande av bakterier tillhörande de släkten där de högpatogeta arterna ingår. PhHV-1 är sölherpesvirus som används som internkontroll (IPC) för att se att PCR-reaktionen har fungerat som den ska.

Släkte	Målsekvens	Forward primer	Reverse primer	Prob
<i>Bacillus</i> ^a	<i>rpoB</i>	ACCTCTTCTATCAGTGG	CCCGTAAAGTCTTCAATC	FAM-CATTTCTCGCAAACCCTCATCAAG
	PhHV-1 gB polymeras	GGGCGAATCACAGATTGAATC	GCGGTTCCAAACGTACCAA	VIC-TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-MGBNFQ
<i>Burkholderia</i> ^a	<i>fliC</i>	GCAGATCTCGGAAGTG	CGTCGAGGATGTTCTTG	FAM TATCGCTTCGAGACGAACTAC
	PhHV-1 gB polymeras	GGGCGAATCACAGATTGAATC	GCGGTTCCAAACGTACCAA	VIC-TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-MGBNFQ
<i>Francisella</i> ^a	<i>ISFtu2</i>	CCCTGATTACAAGAAGTC	CTTGGTTATCATCTTTATCATATC	FAM-TGATTCAACAATAGCAAGAGCACAT
	PhHV-1 gB polymeras	GGGCGAATCACAGATTGAATC	GCGGTTCCAAACGTACCAA	VIC-TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-MGBNFQ
<i>Yersinia</i> ^a	<i>inv</i>	TTGACACAACCTTAGGCAATATGG	ACTGGTCAATGGTGCCTATAA	FAM CGTTATCACGGATCACAATGACGGCA
	PhHV-1 gB polymeras	GGGCGAATCACAGATTGAATC	GCGGTTCCAAACGTACCAA	VIC-TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-MGBNFQ

a. (Ehrs *et al.*, 2009)

5.5 PRESTANDA HOS VALIDERADE PCR-METODER

Resultat från de genomförda valideringarna sammanfattas i tabell 6.

Tabell 6. Sammanfattning av prestanda hos validerade realtids-PCR-metoder. Redovisad inklusivitet och exklusivitet undersöktes i tidigare FBD-projekt (Ehrs *et al.*, 2009). GE/rxn = genomekvivalenter per reaktion.

Agens	Mål	Inklusivitet (%)	Exklusivitet (%)	Effektivitet ^b (%)	LOD ^c (GE/rxn)	Repetierbarhet ^d (%)	Reproducerbarhet ^d (%)	Validerad vid
<i>B. anthracis</i> ^a (Specifik 1)	5345	100	99	103	3,13	3,64	2,44	FOI
	pXO1	100	96	103	1,56	3,36	2,37	
	pXO2	100	99	104	3,13	1,19	2,84	
<i>Y. pestis</i> (Specifik 2)	YPO1091	100	96	104	6,25	3,6	2,2	RUB
	pPCP1	100	96	109	0,78	1,7	1,7	
	pMT1	100	95	93	100	4,5	2,5	
<i>F. tularensis</i> (Specifik 3)	Tul4	100	87	106	6,25	1,36	0,96	FOI
	3' reg ISFtu2	100	88	105	6,25	1,64	1,95	
<i>B. mallei</i>	<i>fliP</i>	100	100	100	6,25	1,96	2,53	RUB
<i>B. pseudomallei</i>	<i>mrpA</i>	100	99	103	25	2,76	2,68	RUB
<i>Coxiella</i>	IS1111	100	100	101	0,39	0,86	1,47	FOI
<i>F. tularensis</i> Typ A	FtAVacJ derived	100	100	91	25	5,9	5,0	RUB
<i>F. tularensis</i> Typ B	FtB15 derived	100	100	99,5	6,25	1,62	2,16	SMI

- a. För validering av PCR för *B. anthracis* användes protokoll FBD005-1. För övriga den reviderade Valideringsmanualen FBD005-2.
- b. Godkänd effektivitet är 90-110 %. Högsta reella effektivitet är 100 % men högre värden erhålls när standardkurvan uppvisar ett flackt utseende, vilket kan bero på interferens i reaktionen (särskilt om matris finns närvarande i provet) eller vara en artificiell effekt av PCRens sammansättning (Tataa Biocenter). I detta fall är ingen matris tillsatt varför det senare är orsaken till den högre effektiviteten.
- c. Detektionsgränsen, LOD, är den lägsta koncentration som gemensamt detekteras i alla körningar i valideringen (minst fem). I varje enskild körning ska alla sex replikat av en viss koncentration vara positiva för att det ska räknas som detektion.
- d. Repeterbarheten visar på graden av variation i mätvärden mellan de sex replikaten inom en och samma körning. Reproducerbarheten visar på graden av variation för samma koncentration mellan fem körningar, som utförts av minst två olika laboranter. Ett lågt värde, som t ex repeterbarheten (0,86 %) för *Coxiella* visar att det är stor överensstämmelse mellan replikaten. Ett högre värde, som repeterbarheten (5,9 %) för *F. tularensis* typ A visar på större variation mellan replikaten.

Valideringsrapporterna läggs på FBDs interna hemsida, Wikin, där de kan laddas ner till myndigheterna för att jämföras med verifieringsresultat för respektive PCR.

Generellt har metoderna god prestanda; de är känsliga, effektiva och har god precision. Det finns dock några undantag.

PCR-metod Specifik 2 påvisar tre målsekvenser hos *Y. pestis* med väldigt varierande detektionsgräns. Den kromosomala målsekvensen (YPO1091) har LOD 6,25 genomekvivalenter (GE) per reaktion (rxn), pPCP1 LOD = 0,78 och pMT LOD = 100 GE/rxn. Plasmiden pPCP1 är endast 9610 baspar stor medan pMT1 är 100984 baspar (Hu *et al.*, 1998) vilket kan bidra till att de är olika lättextraherade från ett bakteriematerial. Man vet även att antalet plasmider varierar mellan olika stammar av *Y. pestis* och pPCP1 kan förekomma i många kopior (Rajanna *et al.*, 2010). Det varierande LOD för de olika målgenerna kan därför vara en naturlig följd av att de förekommer i olika kopianantal i bakteriematerialet. Detta måste tas i åtanke när metodbeskrivningar görs – kräver ett positivt analys svar att alla tre markörer är positiva?

Vidare har PCR-metoden för påvisande av *F. tularensis* TypA en effektivitet som endast är 91 %. För godkänd effektivitet rekommenderas 90 – 110 %. Den låga effektiviteten kan bero på att metoden är en kompetitiv PCR där två prober konkurrerar om inbindning till målsekvensen. De skiljer sig endast åt för enstaka baser (Andersson *et al.*, 2011). Detta gör att det sker inbindning av bägge prober till målsekvensen, men den som har 100 % likhet till mål-DNA (i detta fall FtAvacJ derived-FAM) kommer att binda in bättre än den konkurrerande proben (FtAvacJ anceser-VIC). Därmed kommer FAM-signalen att bli starkare än VIC-signalen. Men amplifiering för sekvens där VIC-proben är inbunden kommer att ske parallellt och därför går en del av reagenserna (primrar, prober, polymeras etc.) till detta. Det kan vara anledningen till den lägre effektiviteten.

Detektionsgränsen för *B. pseudomallei* är 25 GE/rxn, vilket är högt. PCR-metoden för påvisande av *B. pseudomallei* är en triplex med FAM-prob för *B. mallei*, VIC-prob för internkontrollen och Tamra-prob för *B. pseudomallei*, där den senare även är den svagaste fluoroforen. Det vore därför bra att undersöka om det går att förbättra känsligheten genom att dela upp PCR-metoden till en duplex, med FAM-prob för *B. pseudomallei* och VIC för internkontrollen.

En annan faktor som haltar är exklusiviteten. För att bestämma metodens exklusivitet körs PCR med DNA-templat från bakterier som inte ska påvisas. När exklusiviteten är lägre än 100 % betyder detta att metoden ger falskt positiva analysresultat. Detta har inte testats i innevarande års projekt, utan vid tidigare studier (Andersson *et al.*, 2011; Ehrs *et al.*, 2009). Exklusivitetstestet har genomförts en gång per PCR-metod och bör följas upp med genomgång av resultat och kompletterande tester.

Precisionen (repetierbarhet och reproducerbarhet) varierar från någon enstaka procent till som högst 5,9 %. Dessa siffror anses bra i sammanhanget, där valideringen gäller kvalitativ PCR. Om det däremot skulle vara ett mål att kvantifiera DNA-innehållet i provet är en repetierbarhet på 5,9 % högt och optimering av metoden skulle behövas.

5.6 STERILISERING AV MATERIAL INNEHÅLLANDE HÖGPATOGENA BAKTERIER FÖR UTSLUSSNING FRÅN SÄKERHETSLABORATORIUM

Värmeavdödning, lysering och sterilfiltrering utvärderades med syfte att definiera säkra metoder för sterilisering av material som ska slussas ut från säkerhetslaboratorium. Metodbeskrivning över försöken finns bifogade (bilaga 1). Test genomfördes vid säkerhetslaboratorierna vid SMI och SVA. I genomförandet deltog, förutom projektmedlemmarna, Olga Stephansson, SVA och Maria Wijkander, SMI.

5.6.1 Värmeavdödning

Alla försök med värmeavdödning genomfördes vid SMI och RUB. Vid båda laboratorierna upprepades försöken minst tre gånger, i triplikat varje gång, samt utfördes av minst två olika laboranter.

Eftersom sporer är mycket värmetåliga, rekommenderas inte värmeavdödning när *B. anthracis* misstänks förekomma i sporform och testades inte heller ut i projektet. Upphettning som avdödningsmetod undersöktes för vegetativa celler från *B. anthracis* och *B. pseudomallei*. Bakterier odlades upp på agarplatta och slammades i fysiologisk koksaltlösning. Bakteriesuspensionen inkuberades sedan vid 95 °C och odlades på agarplattor dels innan upphettning och sedan efter 15 och/eller 30 minuter vid 95 °C. Plattorna inkuberades i 37 °C under en vecka med avläsning av bakterietillväxt efter 24 h, 48 h och 7 dygn.

Tabell 7. Värmeavdödning av vegetativa *B. anthracis*. Bakteriesuspension spreds på blodagarplatta före och efter inkubering i värme (95 °C eller 99 °C) under 30 minuter. Bakterierna fick sedan tillväxa i 37 °C under en veckas tid. Bakterietillväxt och kolonibildning graderas i tabellen som: matta (+++), enstaka kolonier (+) eller ingen växt (-).

Utfört vid och temperatur	RUB 95 °C		SMI 95 °C		SMI 99 °C	
	0	30	0	30	0	30
Vegetativa <i>B. anthracis</i>	+++	-	+++	+	+++	+

Vid SMI har värmeavdödning av vegetativa celler av *B. anthracis* tidigare testats och gett mycket goda resultat; 30 min i 99 °C har gett fullgod avdödning av alla testade stammar (Talar Boskani, opublicerade data). I försöken som gjordes i detta projekt växte dock kolonier ut på platta efter 30 min i både 95 °C och 99 °C. Undersökning pågår för att se om något är fel med den termomixer (värmeblock med skakfunktion) som användes vid SMI. Vid SVA gav 30 min i 95 °C fullgod avdödning (tabell 7).

Tabell 8. Värmeavdödning av *B. pseudomallei*. Bakteriesuspension har spridits på blodagarplatta före och efter inkubering i värme under 15 och 30 minuter. Bakterierna fick sedan tillväxa i 37 °C under en veckas tid. Bakterietillväxt och kolonibildning graderas i tabellen som: matta (+++), många kolonier (++) , enstaka kolonier (+) eller ingen växt (-).

Utfört vid och temperatur	RUB 95 °C			SMI 95 °C		
	0	15	30	0	15	30
<i>B. pseudomallei</i> (2 mL rör)	+++	-	++	*	*	*
<i>B. pseudomallei</i> (1,5 mL rör 650 rpm)	+++	+	-	+++	-	-

*Värmeavdödning i 2 mL rör ej utförd vid SMI.

När *B. pseudomallei* inkuberades i 30 min vid 95 °C sågs full avdödning efter 30 minuter, om 1,5 mL skruvlöcksrör och ett värmeblock med skakfunktion användes. Denna avdödningsmetod fungerade bra både vid SMI och vid SVAs och Livsmedelsverkets gemensamma laboratorium RUB. I ett första försök vid RUB användes 2 mL rör och stationär inkubering i 95 °C. Detta gav full avdödning efter 15 min men efter 30 min kunde levande bakterier återfinnas på odlingsplattorna. Resultatet var detsamma i tre försök som gjordes i triplikat av två olika laboranter (tabell 8). Eftersom 2 mL rör inte passar lika tätt mot värmeblockets väggar så blir värmeöverföringen mycket sämre än för 1,5 mL rören. Troligen finns levande bakterier längs rörväggen i 2 mL rören, som inte utsätts för tillräcklig värme eftersom 2 mL rör sticker upp ur värmeblocket (figur 3).

Efter 30 min värmebehandling är det mycket kondens inne i röret, vilket kan leda till att laboranten gärna snärtar ner den vätskan till provrörets botten. På så sätt hamnar levande bakterier från 2 mL rörets väggar i den vätska som sprids på odlingsplatta. Det är med andra ord viktigt att använda rör som passar till värmeblocket, skakinkubering och tillräckligt med tid för att få säker avdödning.

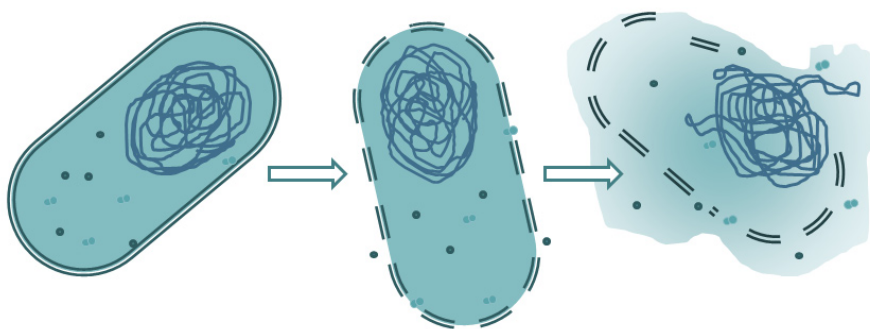


Figur 3. Inkubering av rör i värmeblock. Vänstra bilden visar ett 1,5 mL och ett 2 mL skruvlöcksrör. I högra bilden är tre rör av varje sort placerade i ett värmeblock (termomixer). De större rören (2 mL) sticker upp ur blocket och bakterier som fastnat på rörets väggar undgår hettan från blocket. Risken är därför stor att levande bakterier finns kvar i röret även efter en längre tids värmebehandling (>30 min).

5.6.2 Lysering med NucliSENS buffert och EZ1-extraktion

Alla försök med lysering genomfördes vid SMI och RUB. Vid båda laboratorierna upprepades försöken minst tre gånger, i triplikat varje gång, samt utfördes av minst två olika laboranter.

Inför DNA-extraktion måste bakterierna först lyseras, detta steg är nödvändigt för att DNAt ska bli tillgängligt i lösning (figur 4). Därpå används olika metoder för att utvinna DNAt ur materialet. Lysering kan åstadkommas till exempel genom kokning eller tillsats av kemikalier eller enzymer. En effekt av lysering är förstås att bakterierna dör.



Figur 4. Illustration av en gramnegativ bakterie som lyseras. Längst till vänster har bakterien ett intakt dubbelmembran som omgärdar cellens inre – cytoplasman. Bakteriecens kromosom visas som ett nystan i cytoplasman. Vid lysering spricker cellmembranet och innehållet läcker ut i lösning. På så sätt blir DNA och andra cellmolekyler tillgängliga för påvisande med olika typer av molekylärbioologiska eller kemiska analysmetoder.

Inom FBD används **EZ1** Biorobot rutinmässigt för extraktion av DNA från bakterier. Utvärderingen som gjorts i detta projekt visar på full avdödning av den gramnegativa bakterien *B. pseudomallei* men bristfällig avdödning av *B. anthracis* med EZ1 (tabell 9).

	Innan EZ1	Efter EZ1
Vegetativa <i>B. anthracis</i>	+++	++
<i>B. pseudomallei</i>	+++	-

Tabell 9. Avdödning av *B. anthracis* och *B. pseudomallei* vid EZ1-extraktion. Bakteriesuspension spreds på blodagarplatta före och efter extraktion med EZ1. Bakterierna fick sedan tillväxa i 37 °C under en veckas tid. Bakterietillväxt och kolonibildning graderas i tabellen som: matta (+++), många kolonier (++) eller ingen växt (-).

Resultatet från EZ1-extraktionen visar att denna metod inte ger tillräcklig lysering av *B. anthracis*. Detta innebär även att det DNA som PCR-metoderna ska påvisa inte blir tillgängligt i extraktionen, vilket försämrar metodernas känslighet. Grampositiva bakterier har tjockare och tuffare cellväggar än gramnegativa bakterier. Av de högpatoena bakterier som analyseras inom FBD är i nuläget *B. anthracis* den enda grampositiva. För att ge fullständig lysering av mjältbrandbakterierna kan mekaniska, kemiska eller enzymatiska förbehandlingssteg, innan EZ1-extraktion, vara intressanta att utvärdera inom FBD.

Tabell 10. Avdödning av *B. pseudomallei* med NucliSENS lysisbuffert. Bakteriesuspension spreds på blodagarplatta dels utan att behandlas med lysisbuffert och dels efter 0, 15 och 30 minuter i NucliSENS lysisbuffert. Bakterierna har sedan fått tillväxa på platta i 37 °C under en veckas tid. Bakterietillväxt och kolonibildning graderas i tabellen som: matta (+++) eller ingen växt (-).

	Innan lysering	Inkubering i NucliSENS		
		0 min	15 min	30 min
<i>B. pseudomallei</i>	+++	-	-	-

NucliSENS lysisbuffert har vid SMI visat sig fungera väl för avdödning av gramnegativa agens, vilket nu testades på *B. pseudomallei* vid säkerhetslaboratorierna vid SVA och SMI. Slammade bakterier inkuberades i lysisbufferten under 30 minuter, med provtagning för odling efter 0, 15 och 30 minuter. Odlingresultatet visar på full avdödning momentant i NucliSENS lysisbuffert (tabell 10).

5.6.3 Filtrering med 0,2 µm spinnkolonner

Alla försök med sterilfiltrering genomfördes vid SMI och RUB. Vid båda laboratorierna upprepades försöken minst tre gånger, i triplikat varje gång, samt utfördes av minst två olika laboranter.

Tabell 11. Sterilfiltrering med 0,22 µm spinnkolonnfilter. Suspension av vegetativa bakterier eller sporer i fysikalisk saltlösning samt DNA-extraktioner gjorda med EZ1 har spridits på odlingsplatta före och efter filtrering. Bakterierna har sedan fått tillväxa på platta i 37 °C under en veckas tid. Bakterietillväxt och kolonibildning graderas i tabellen som: matta (+++), många kolonier (++) eller ingen växt (-).

Prov	Spinnkolonnfilter 0,22 µm	
	Före	Efter
Vegetativa <i>B. anthracis</i> suspension	+++	-
<i>B. anthracis</i> sporer suspension	+++	-
EZ1 extraktion av vegetativa <i>B. anthracis</i>	++	-
<i>B. pseudomallei</i> suspension	+++	-
EZ1 extraktion av <i>B. pseudomallei</i>	-	-

Filtrering med spinnkolonner med en porstorlek á 0,22 µm ger sterilisering av lösningar som innehåller både *B. anthracis* och *B. pseudomallei* (tabell 11). Utbyte av DNA har testats vid filtrering av DNA-extraktioner genom 0,2 µm filter och är gott; ca 95 % (Joakim Ågren, SVA, opublicerade data). För andra agens än de här testade kan dock 0,22 µm porstorlek i filtret vara för stort. Agens som bildar mindre bakterieceller kan passera igenom ett sådant filter. Det gäller *Francisella* och *Coxiella* (källa: Anna Macellaro, FOI), där andra filter måste utvärderas. Det finns filterkolonner med en porstorlek á 0,1 µm som är lämpliga för detta och bör testas inom FBD.

6. SLUTSATSER

En viktig lärdom från metodinventeringen vid myndigheterna är att metodik divergerar med tiden. Eftersom anpassningar sker för att passa den egna maskinparken och verksamheten kommer förändringar av ursprunglig metod att ske över tid. Inom FBD har därför en gemensam strategi för kvalitetssäkring av analysmetoderna blivit ett medel för att man ska kunna lita på varandras analyser även när metoderna skiljer sig åt.

Arbetet med validering inom FBD har visat att det är en tämligen kostsam och tidskrävande procedur. Det går åt mycket material och reagenser för det praktiska genomförandet av valideringarna. Det är därför värdefullt att, om en metod validerats vid ett myndighetslaboratorium, kan det räcka med en mindre omfattande verifiering vid övriga laboratorier. På så sätt sparas både tid och material. Tillvägagångssätt för verifiering finns beskrivet i Valideringsmanualen FBD005-2.

Projektgruppen har reviderat valideringsmanualen för att denna ska vara så användarvänlig som möjligt. En slutsats från detta arbete är att det tar tid, men är viktigt, att åstadkomma tydliga protokoll. Det var även tydligt att det var i det skedet när man arbetade praktiskt med manualen vid genomförandet av valideringen och skrivandet av valideringsrapporterna som det verkligen gick att utvärdera hur dokumenten fungerar som verktyg för kvalitetssäkringsarbetet. Ett protokoll måste testas av laborativ personal innan det går att säga om det är tillräckligt tydligt.

Det har varit värdefullt att kunna ta in personer som inte ingår i FBD, men som arbetar med Realtids-PCR och kvalitetssäkring vid myndigheterna, som referenspersoner. Eftersom personerna i projektet efter några genomläsningar blir alltmer blinda för texten har referenspersonerna bättre kunnat se om den reviderade manualen är tydlig och bidra till ett ytterligare förbättrat dokument.

En värdefull effekt med projektarbetet inom FBD är att det ger god kontakt mellan personal som arbetar laborativt med analys av högpatogeta agens vid myndigheternas säkerhetslaboratorier. Detta leder till bra utbyte av kunskap, strategier och metoder för förbättrad laboratoriesäkerhet och stärkt nationell analysförmåga.

7. FÖRSLAG PÅ FORTSATT VERKSAMHET

Inom detta projekt har Realtids-PCR-metoder validerats för rent DNA i spädningsserier. Det är dock ännu viktigare att kvalitetssäkra hela metoden, med de provupparbetningssteg som föregår PCR-analys. FBD bör därför utarbeta en strategi för validering när inte bara de agens som ska påvisas ingår i analysmaterialet, utan även relevant provtyp. Detta varierar mellan myndigheterna och kan inkludera kliniskt provmaterial, som blod från djur och människa, livsmedel, vatten och olika typer av miljöprover.

I de PCR-metoder som tagits fram för detektion av bakteriesläkten (och som inte ingått inom ramarna för detta projekt) är exklusivitet och inklusivitet i vissa fall bristfällig. Inklusiviteten för de högpato­gena arterna är fullgod, men eftersom exklusiviteten haltar liksom inklusiviteten för andra arter inom släktena är detta något som FBD bör beakta och följa upp.

Sekvensering av bakteriegenom har ökat lavinartat på senare tid och många har tillkommit i publika databaser sedan de primrar och prober som ingår i FBDs PCRer designades. Det måste därför fortlöpande kontrolleras *in silico* om de är up-to-date med rådande sekvensdata vad gäller specificiteten (exklusivitet och inklusivitet).

Ett problem med att validera PCR-metodik för högpato­gena bakterier är att det kan vara svårt att få tag på DNA i tillräcklig mängd från aktuella agens. Det är svårt att odla vissa av bakterierna, särskilt *Coxiella*, och generellt är det tidskrävande att arbeta vid säkerhetslaboratorium varför nytt DNA-material inte tas fram i en handvändning. Det är därför värdefullt om myndigheterna även framgent kan bistå varandra med DNA-material. Eftersom aktiviteten för agens varierar mellan de tre säkerhetslaboratorierna, det arbetas till exempel mer med *Francisella* vid FOI och med *B. anthracis* vid SVA, så kan man hjälpa till och komplettera varandras tillgång på DNA.

Något som efterfrågas, även internationellt, när det gäller diagnostik av högpato­gena agens är tillgång till referensmaterial och även ringtest för att kunna utvärdera den egna analysmetodiken. För att se till att förmågan till analys är god inom FBD är det önskvärt med organisering av och deltagande i ringtester under kommande år.

8. BILAGOR

8.1 INAKTIVERINGSPROTOKOLL

8.1.1 Inaktivering av *Burkholderia pseudomallei*.

Alla försök upprepas i tre gånger i triplikat, av minst två olika personer. Odling görs på blodagarplattor.

Test av avdödning med **koklysat (9 blodagar-plattor)**

- Slamma upp en vit ögla i 300 µL NaCl (**x3**).
- Sprid 50 µL för odlingskontroll (0 minuter).
- Koka i 95 °C i 30 min.
- Sprid 100 µL för odling efter 15 minuter och 100 µL efter 30 minuter.
- Odlingsplattorna inkuberas i 37 °C med avläsning efter 24 h, 48 h och 1 vecka.

Test av avdödning med **lysisbuffert** i rumstemperatur (**9 blodagarplattor**)

- Slamma upp en vit ögla *B. pseudomallei* i 2mL Nuclisens lysisbuffert (Biomerieux, artikelnummer 200292). (**x3**).
- Sprid 100 µL för odlingskontroll direkt efter slamning (0 minuter).
- Vänta i 20 min, röret i rumstemperatur.
- Sprid 100 µL för odlingskontroll vid 10 och 20 minuter.
- Odlingsplattorna inkuberas i 37 °C med avläsning efter 24 h, 48 h och 1 vecka.

Test om EZ1-extraktion avdödar bakterier i NaCl: **OBS med filtrering (4 blodagarplattor)**

- *B. pseudomallei* slammas till OD=1, ($1,3 \times 10^8$ CFU/mL) i NaCl.
- Sprid 50 µL för odlingskontroll (**en platta**, även odlingskontroll för nedan).
- Tag från slamning 195 µL och tillsätt till rör med 5 µL sälherpesvirioner.
- Extrahera i EZ1 på P3.
- Filtrera allt extraherat DNA med genom Ultrafree[®]-MC Centrifugal Filter Devices with microporous membranes (Millipore). 12000 rpm i 3 min.
- Odlingskontroll på 45 µL, 5 µL används till PCR (OBS! tag av till PCR först, ibland blir det något mindre än 50 µL i extraktionen.)
- Odlingsplattorna inkuberas i 37 °C med avläsning efter 24 h, 48 h och 1 vecka.

Test om EZ1-extraktion avdödar bakterier i NaCl: **OBS utan filtrering (3 blodagarplattor)**

- Tag från samma slamning som ovan 195µL och tillsätt till rör med 5 µL sälherpesvirioner.
- Extrahera i EZ1 på P3.
- Odlingskontroll på 45 µL, 5 µL används till PCR (OBS! tag av till PCR först, ibland blir det något mindre än 50 µL i extraktionen.)
- Odlingsplattorna inkuberas i 37 °C med avläsning efter 24 h, 48 h och 1 vecka.

8.1.2 Inaktivering av *Bacillus anthracis*.

Alla försök upprepas tre gånger i triplikat. Stam 4229 används. All odling görs på hästblodagar.

Filtrering av *B. anthracis* sporer från stock (sporer, $4,4 \times 10^6$ sporer/mL) **6 blodagarplattor**:

3 st Ultrafree[®]-MC Centrifugal filterkolonner (Millipore)

- 50 µL av stocken filtreras direkt genom Ultrafree[®]-MC filterkolonner (Millipore)”.
- Odlingskontroll – sprid hela volymen på blodagar.
- Läs av odlingsplattorna efter 24 h, 48 h och 1 vecka.

Kombinerat protokoll för att testa avdödning av vegetativa celler av *B. anthracis* med koklysat, EZ1 och filtrering före eller efter extraktion.

Stryk upp *B. anthracis* 4229 från sporstock (eller annan stock) på blodagarplatta dagen innan försöket och odla över natt i 37 °C.

Totalt **18** blodagarplattor för detta test.

9 rör med virioner, **9** elueringsrör.

3 st NaCl-rör för slamning med 800 µL NaCl.

6 st Ultrafree[®]-MC Centrifugal Filter Devices with microporous membranes (Millipore).

- Slamman upp två vita öglor i 800 µL NaCl (**x3**).
- Sprid 50 µL för odlingskontroll (**3** plattor).
- Inkubera i värmeblock 95 °C i 30 min på skak 650 rpm.
- Sprid 50 µL för odlingskontroll (**3** plattor).

Resterande koklysat behandlas på tre olika sätt:

1. Bara EZ1-extraktion

- Extrahera 195 µL + 5 µL virioner.
- Sprid hela volymen på odlingsplatta (50 µL) (**3** plattor).

2. EZ1-extraktion med filtrering efter

- Extrahera 195 µL + 5 µL virioner.
- Filtrera hela volymen (50 µL) genom Ultrafree[®]-filter 12000 rpm i 3 min.
- Sprid hela volymen (ca 50 µL) på odlingsplatta (**3** plattor).

3. EZ1-extraktion med filtrering före

- Filtrera 300 µL av koklysatet genom Ultrafree-filtren 12000 rpm i 3 min.
- Sprid 50 µL på odlingsplatta (**3** plattor).
- Extrahera 195 µL + 5 µL virioner.
- Sprid hela volymen (50 µL) på odlingsplatta (**3** plattor).
- Odlingsplattor inkuberas i 37 °C med avläsning efter 24 h, 48 h och 1 vecka.

9. REFERENSER

- (2005). AFS 2005:1. Mikrobiologiska arbetsmiljörisker – smitta, toxinpåverkan, överkänslighet. ISBN 91-7930-443-5. In, (Arbetsmiljöverkets författningssamling).
- Andersson, A., Malm, K., Granberg, M., Peterzon, A., Sandstedt, K., and Ågren, J. (2011). Detektion av *Francisella tularensis*. In Forum för beredskapsdiagnostik rapportserie.
- Day, J. B., Trujillo, S., Hao, Y. Y., and Whiting, R. C. (2008). Thermal resistance of *Francisella tularensis* in infant formula and fruit juices. *J Food Prot* 71, 2208-2212.
- Ehrs, S., Garbom, S., Nilsson, C., Peterzon, A., Edvinsson, B., and Larsson, P. (2009). Validering av multiplex realtids PCR för harmonisering av molekylär detektion av riskgrupp 3 bakterier inom FBD. In Forum för beredskapsdiagnostik rapportserie.
- Farhadi, L., Rodin, S., Ehrs, S., Thebo, L., Wikstrom, P., and Salman, R. (2010). Kvalitetssäkring av provanalys inom FBD. In Forum för beredskapsdiagnostik rapportserie.
- Frosth, S., Backman, S., Farhadi, L., Lundin Zumpe, A., Stephansson, O., and Ågren, J. (2009). Utvärdering av extraktionsrobot 2009. In Forum för beredskapsdiagnostik rapportserie.
- Kaipe, C., Widfeldt, M., Boskani, T., Lundström, J., Granberg, M., Karlsson, M., Klint, M., Dini, L., Wikstrom, P., and Ehrs, S. (2013). Fortsatt kvalitetssäkring av provanalys inom FBD. In Forum för beredskapsdiagnostik rapportserie.
- Macellaro, A., Allard-Bengtsson, U., Aspan, A., Bölske, G., Larsson, E., and Wollin, R. (2009). Odling och framtagande av referensmaterial för *Coxiella burnetii* samt PCR ringtest 2009. In Forum för beredskapsdiagnostik rapportserie.
- Spotts Whitney, E. A., Beatty, M. E., Taylor, T. H., Jr., Weyant, R., Sobel, J., Arduino, M. J., and Ashford, D. A. (2003). Inactivation of *Bacillus anthracis* spores. *Emerg Infect Dis* 9, 623-627.
- Thelaus, J., Kuoppa, K., Sahlin, A., Eld, K., and Wahab, T. (2012). Harmonisering av metoder för odling av högpatogena bakterier på BSL-3 laboratorium. In Forum för beredskapsdiagnostik rapportserie.
- 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.



STATENS
VETERINÄRMEDICINSKA
ANSTALT

Smi

SMITTSKYDDSinSTITUTET



**LIVSMEDELS
VERKET**

SWEDISH NATIONAL
FOOD AGENCY



FOI