

## PROJEKTRAPPORT

Säkrande av kritisk mikrobiologisk diagnostikförmåga och reagensförsörjning under störda förhållanden och höjd beredskap



Emelie Salomonsson • Linnéa Blom • Stina Bäckman • Christina Forsberg  
Camilla Fridh Meyer • Håkan Kron • Christer Larsson • Lisa Lindberg Rosendal  
Johnny Lindgren • Sandra Söderholm • Andreas Tellström • Paula Ågren

## Om Forum för beredskapsdiagnostik (FBD)

Samverkan inom nätverket Forum för beredskapsdiagnostik (FBD) pågår sedan 2007 mellan Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Folkhälsomyndigheten (Fohm) och Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI). Från 2017 har Försvarsmakten och från 2019 har även Polismyndigheten deltagit i FBD-nätverkets gemensamma projekt med syfte att stärka den civil-militära samverkan och förmågan till beredskapsdiagnostik i kris och krig. Ett av forumets huvudmål är harmonisering av kunskap, 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 smittämnen tillhörande riskklass-3 eller smittämnen som av andra anledningar kan orsaka stor samhällspåverkan är en fungerande krisberedskap, med avseende på medicinska motåtgärder och dekontaminationsförfaranden, beroende av snabba laboratorieresultat. Även vikten av robust analyskedja för laboratorieanalyser och behov av alternativa material och metoder vid störda förhållanden samt förmågan att samverka och samverkans betydelse av hur en kris hanteras i Sverige adresseras inom FBD nätverket. Långsiktigt etableras former för en nationell beredskapsplan och försörjningsberedskap för sektorsövergripande laboratorieanalyser vid kris och höjd beredskap.

Titel:	Säkrande av kritisk mikrobiologisk diagnostikförmåga och reagensförsörjning under störda förhållanden och höjd beredskap
Projektid:	1 april 2019 – 31 december 2021
Projektledare:	Emelie Salomonsson, Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI)
Projektgrupp:	Emelie Salomonsson (FOI), Linnéa Blom, Livsmedelsverket, Stina Bäckman (FOI), Christina Forsberg, Nationellt forensiskt centrum (NFC), Camilla Fridh Meyer, Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA), Håkan Kron, Försvarsmakten (FM), Christer Larsson (FM), Lisa Lindberg Rosendal (SVA), Johnny Lindgren (FM), Sandra Söderholm, Folkhälsomyndigheten (Fohm), Andreas Tellström (FM) och Paula Ågren, Livsmedelsverket
Resurspersoner:	Joann Börjesson (SVA), Olga Stephansson (SVA), Oskar Karlsson Lindsjö (Fohm), Stefan Nord (FOI) och Henric Stenbeck (FM)
Styrgrupp (under hela eller delar av projekttiden):	Andreas Bråve och Shaman Muradrasoli, Fohm. Mona Byström, Mats Forsman och Johanna Thelaus, FOI. Romanico Arrighi, Moa Lavander och Maria Sitell, Livsmedelsverket. Henrik Ericsson och Rickard Knutsson, SVA. Cecilia Vahlberg, Polisen. Folke Cerenius, Toni Dufvenberg, Niklas Edner, Viveca Eriksson, Jenny Gyll, Jan Karlsson, Maria Muribi och Anders Sandberg, Försvarsmakten.
Finansiering:	Projektet har finansierats genom tilldelning av Regeringens anslag 2:4 Krisberedskap som fördelas av Myndigheten för samhällsskydd och beredskap (MSB)
ISBN	
Layout framsida	Frida Larzenius (FOI)
Foton framsida	FOI

# FÖRKORTNINGAR/ORDLISTA

<b>Agarosgel</b>	En gelémassa som gör att molekyler av olika storlekar vid gelelektrofores passerar med olika hastighet
<b>Agens</b>	Verksam eller utlösande faktor, används inom medicin i betydelsen t.ex. en sjukdomsframkallande mikroorganism
<b>Anrikning</b>	Att öka koncentrationen av specifika bakterier genom tillväxt i utvalt näringsmedium
<b>B-händelse</b>	Används som uttryck för en händelse, naturlig eller avsiktlig, med mikroorganismer och då oftast med avseende på sjukdomsframkallande mikroorganismer
<b>Bioinformatik</b>	Storskalig analys av biologiska data, exempelvis DNA-, RNA och proteinsekvenser med hjälp av datorer och datorprogramvara
<b>BSL2</b>	Biosafety level 2, skyddsnivå 2
<b>BSL3</b>	Biosafety level 3, skyddsnivå 3. Används för att beteckna säkerhetslaboratorium
<b>CBRN</b>	Kemiska, biologiska, radiologiska och nukleära ämnen
<b>CFU</b>	Colony forming units. Enhet som används vid kvantifiering av växande mikroorganismer
<b>Ct</b>	Cycle threshold (cykeltröskelvärde)
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>Eluering</b>	Lösa ut ett ämne som har bundits till t.ex. en kolonn.
<b>Exklusivitet</b>	Att en metod inte ger positiv signal för de agens som inte ska påvisas i metoden
<b>Gelelektrofores</b>	En metod som separerar molekyler med avseende på deras laddning, storlek och massa genom att man lägger en elektrisk spänning över gelen där man laddat provet
<b>Inaktivering</b>	Oftast synonym med avdödning. Mikroorganismer sägs vara inaktiverade när de varken kan tillväxa eller orsaka smitta
<b>Inhibera</b>	Hämma
<b>Inklusivitet</b>	Att en metod ger positiv signal för de agens som ska påvisas av metoden.
<b>MALDI-TOF</b>	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight, en form av masspektrometri

<b>Matris</b>	Det material som ett prov består av och i vilket man försöker påvisa bakterieförekomst vid misstanke om smitta
<b>Odlingsmedium</b>	Näringsämne som används för att odla mikroorganismer. Finns i fast och flytande form
<b>Patogen</b>	Sjukdomsframkallande
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction, en metod som används för att amplifiera kopior av en viss DNA-sekvens
<b>Primer</b>	Små segment av kvävebaser, används inom PCR och fungerar som startpunkten för DNA-replikation
<b>Probe</b>	Fluorescensmärkta DNA-oligonukleotider
<b>Reagens</b>	Ett ämne eller blandning av ämnen som åstadkommer en viss kemisk förändring
<b>Realtids-PCR</b>	PCR som mäts i realtid och där detektionen sker med hjälp av fluorescerande molekyler
<b>Riskklass 2</b>	Måttlig infektionsrisk. Kan orsaka infektioner som vanligtvis kan botas, förebyggas eller självläka utan allvarliga men
<b>Riskklass 3</b>	Hög infektionsrisk. Kan orsaka allvarliga infektioner med begränsade möjligheter att bota eller förebygga och som ofta har hög smittsamhet
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>Spika</b>	Att tillsätta mikroorganismer till en provtyp, ofta med syftet att utvärdera en metods förmåga för att påvisa sagda mikroorganismer.
<b>Spinnkolonn</b>	Ett rör innehållande ett material för en kemisk separation genom centrifugering
<b>Sporer</b>	Överlevnadsfas hos vissa bakterier som kan klara av extrema förhållanden såsom värme, strålning och uttorkning
<b>SYBR green</b>	Ett cyaninfärgämne som används för infärgning och binder till dubbelsträngat DNA
<b>Typning</b>	Artbestämning
<b>Vegetativ</b>	En vegetativ bakterie är metaboliskt aktiv och tillväxer. Detta står i motsats till en spor som är resistent i ett "vilande stadie"
<b>Värmedenaturering</b>	Bakterien utsätts för hög värme där RNA/DNA och proteiner tappar sin funktion
<b>Värmeinaktivering</b>	Se inaktivering. Här åsyftas inaktivering med en lägre temperatur (70°C) till skillnad mot vid värmedenaturering (95°C)



## INNEHÅLL

Sammanfattning.....	4
1 Bakgrund.....	5
2 Övergripande Projekt mål .....	6
2.1 Delmål 1.....	6
2.2 Delmål 2.....	6
2.3 Delmål 3.....	6
2.4 Delmål 4.....	6
2.5 Delmål 5.....	6
2.6 Delmål 6.....	6
3 Delmål 1 - Behovsanalys.....	7
3.1 Mål.....	7
3.2 Upplägg.....	7
3.3 Resultat och Planering.....	8
3.3.1 Aktivitetslista för 2020 .....	8
3.3.2 Aktivitetslista för 2021 .....	8
4 Delmål 2 - Utvärdering av alternativa extraktionsmetoder och återbruk av spinnkolonner .....	9
4.1 RNA-extraktion - SARS-CoV-2 .....	9
4.1.1 Studieupplägg.....	9
4.1.2 Hämmande effekt.....	10
4.1.3 Utvärdering med patientprover .....	11
4.2 DNA-extraktion – <i>Francisella tularensis</i> och <i>Bacillus cereus</i> .....	12
4.2.1 Studieupplägg.....	13
4.2.2 Resultat.....	13
4.3 Återbruk av spinnkolonner för DNA-extraktion .....	15
4.3.1 Studieupplägg.....	15
4.3.2 Resultat.....	15
4.4 Diskussion.....	16
5 Delmål 3 – Odling och typning.....	17
5.1 Studieupplägg.....	17
5.1.1 Kunskapsinhämtning .....	17
5.1.2 Workshop .....	18



5.2	Resultat.....	18
5.3	Diskussion.....	20
6	Delmål 4 – Konventionell PCR .....	22
6.1	Inventering .....	22
6.2	Utvärdering av primers.....	23
6.3	Diskussion.....	23
7	Delmål 5 – Utvärdering av fältmässig indikatoranalys av dricksvatten.....	24
7.1	Beskrivning av de tre analysmetoderna.....	24
7.1.1	3M-Petrifilm .....	24
7.1.2	IDEXX Colilert-18.....	24
7.1.3	Aquagenx.....	25
7.2	Studieupplägg.....	25
7.2.1	3M-Petrifilm .....	26
7.2.2	IDEXX Colilert.....	26
7.2.3	Aquagenx.....	26
7.3	Resultat.....	27
7.4	Diskussion.....	27
8	Delmål 6 – övning: Alternativ snabbmetod för extraktion av SARS-CoV-2 .....	29
8.1	Övningsupplägg .....	29
8.2	Resultat och diskussion .....	29
9	Slutsatser .....	30
9.1	Sammanfattning av resultat .....	30
9.2	Framåtblickande.....	30
9.3	Projektresultat i förhållande till projektets ursprungliga mål.....	31
9.4	Samverkansvinster .....	31
10	Bilagor .....	32
10.1	Bilaga 1 – Diskussionsunderlag till myndigheter.....	32
10.2	Bilaga 2 – Inbjudan till workshop 2019 .....	34
10.3	Bilaga 3 – Agenda till workshop 2019 .....	35
10.4	Bilaga 4 – Extraktionsmetoder .....	36
10.5	Bilaga 5 – Protokoll för utvärdering av alternativa DNA-extraktionsmetoder.....	37

10.6	Bilaga 6 – Inbjudan till workshop – 2021 .....	39
10.7	Bilaga 7 – Inventering av möjlighet till analys med konventionell PCR.....	40
10.8	Bilaga 8 – Inbjudan till övning .....	43
11	Referenser .....	44

## SAMMANFATTNING

Denna rapport sammanfattar arbetet som bedrivits inom projektet *Säkrande av kritisk mikrobiologisk diagnostikförmåga och reagensförsörjning under störda förhållanden och höjd beredskap*.

Målet med projektet har varit att identifiera, utifrån ingående myndigheters behov, kritiska mikrobiologiska/molekylärbiologiska analysmoment som måste fungera även under störda förhållanden och höjd beredskap. Samt klargöra strategier för att upprätthålla dessa analyser och identifiera behov av att utveckla alternativa metoder.

För att identifiera kritiska delmomenten i analyskedjan som måste kunna utföras även under störda förhållanden så som kris och krig utfördes en behovsanalys. Behovsanalysen delades upp i två delar varav den första delen utfördes myndighetsvis medan den andra delen utfördes vid en myndighetsgemensam workshop. Utfallet från den myndighetsgemensamma workshopen har utgjort grunden för det fortsatta arbetet i projektet.

Som en första del i projektet genomfördes en inventering och utvärdering av alternativa extraktionsmetoder för DNA och RNA som inte är instrument- eller reagenskitsberoende. I samband med uppstarten av detta delmål drabbades världen av covid-19-pandemin och en global brist på testpinnar och extraktionsreagenser blev verklighet. För att möta det akuta behovet riktades delmålet om och projektet arbetade fokuserat med att utvärdera alternativa RNA-extraktionsmetoder för SARS-CoV-2. Den metod som uppvisade bäst resultat i utvärderingen sattes upp vid en myndighet och användes därefter för att stötta en region i Sverige. I ett senare skede hölls även en övning där ingående myndigheter fick möjlighet att analysera positiva SARS-CoV-2-prover med metoden. Vidare har försök gjorts för att undersöka möjligheten till att tvätta och återanvända spinnkolonner som används vid manuella kitbaserad extraktionsmetoder.

För att se över behovet av odlingssubstrat som är mer generella och kan användas brett samt alternativa metoder för artbestämning anordnades en workshop för kunskapsinhämtning och inventering gällande substrat, odling och typning vid de ingående FBD-myndigheterna. En viktig slutsats som gjordes efter genomförd workshop var att det behövs både fler övningar/utbildningar samt en långsiktig planering för kunskapsöverföring av klassisk mikrobiologi. I nuläget riskerar denna kompetens att försvinna vilket i långa loppet kan påverka beredskapen för hur man ska hantera en situation där användning av instrument eller kommersiella reagenser inte längre är möjligt.

Då konventionell PCR är mindre reagensberoende kan denna typ av analys vara ett alternativ vid störda förhållanden. Inventering har genomförts vid FBD-myndigheterna för att se över möjligheterna för egentillverkning av reagenser och detektion med hjälp av gelelektrofores. Därtill har en översyn av primers för konventionell PCR utförts.

Slutligen, tillgång till säkert dricksvatten är avgörande för människors hälsa och överlevnad. För Försvarmakten är det av stor vikt att kunna vara självförsörjande och därmed ha möjlighet att kunna producera eget dricksvatten och utföra kvalitetskontroller för att fastställa vattnets tjänlighet. Inom ramen för detta projekt har vi utvärderat tre olika metoder för indikatoranalys av dricksvatten med fokus på fältmässig användning. Resultatet från utvärderingen visar på att de tre metoderna är likvärdiga i kvalitet, men att en av de tre metoderna är mer användarvänlig.

Projektet har varit kunskaphöjande i realtid i och med covid-19-pandemin då brist på reagens och förbrukningsvaror blivit en verklighet.



# 1 BAKGRUND

Mikrobiologisk/molekylärbiologisk diagnostik är beroende av avancerad analysutrustning och reagenser som i många fall endast kan erhållas från en eller ett fåtal leverantörer, ofta belägna utanför Sveriges gränser. Detta gör analyser sårbara för samhällsstörningar vilka innebär avbrott eller fördröjning av leveranser till eller inom Sverige. Inom ramen för detta projekt har de civila myndigheterna tillsammans med Försvarsmakten och Polismyndigheten (avdelningen Nationellt Forensiskt Centrum, NFC) definierat vilka kritiska analyser som måste kunna utföras även under störda förhållanden. För dessa analyser har nuvarande förmåga och sårbarheter identifierats, så som nödvändiga reagenser och instrumentering. Åtgärder för att stå emot sådana sårbarheter tagits fram och prioriterats. Åtgärder kan till exempel vara: framtagande av leverantörsberoende metoder, strategier för lagerhållning eller uppbyggnad av förmåga att tillreda kritiska reagenser vid myndigheternas laboratorier. Genom att etablera analyskapacitet som är fältmässig, lätthanterlig och innehåller reagenser och provtagningsmaterial med god hållbarhet och nationell tillgänglighet möjliggörs upprätthållande av analysförmåga både vid de civila myndighetslaboratorierna och vid Försvarsmaktens fältanalyslaboratorium, fältsjukhus och preventivmedicinsk grupp. I och med covid-19-pandemin blev projektet högaktuellt när både testpinnar och kommersiella reagenser blev bristvaror i hela världen. Kravet på testning och smittspårning ökade behovet av alternativa metoder varpå projektets verksamhet riktades om för att bistå samhället i detta arbete.

Samverkan inom nätverket Forum för beredskapsdiagnostik (FBD) pågår sedan 2007 mellan Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Folkhälsomyndigheten (Fohm) och Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI). Från 2017 har Försvarsmakten och från 2019 har även Polismyndigheten, avdelningen Nationellt Forensiskt Center (NFC), deltagit i FBD nätverkets gemensamma projekt med syfte att stärka den civil-militära samverkan och förmågan till beredskapsdiagnostik i kris och höjd beredskap. De olika myndigheternas kompetens- och ansvarsområden kompletterar i mycket varandra och täcker tillsammans områdena humanmedicin, veterinärmedicin, foder, livsmedel (inklusive dricksvatten), forensiska analyser, försvarsforskning, CBRN-prover och CBRN operativ förmåga. 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. Då även bakterier i riskklass 2 kan vara viktiga att detektera under höjd beredskap har projektet valt att även inkludera några inom denna klass som framför allt orsakar gastroenteriter.

## **2 ÖVERGRIPANDE PROJEKTMÅL**

Identifiera kritiska mikrobiologiska/molekylärbiologiska moment som måste fungera även under störda förhållanden och höjd beredskap, klargöra strategier för att upprätthålla dessa analyser samt identifiera behov av att utveckla alternativa metoder.

### **2.1 DELMÅL 1**

Utföra en behovsanalys som identifierar analyser/delmoment som är av särskild vikt för att kunna upprätthålla analysförmåga vid kris eller höjd beredskap.

### **2.2 DELMÅL 2**

Inventera och utvärdera alternativa extraktionsmetoder för DNA och RNA som inte är beroende av ett unikt instrument eller kommersiella reagens-kit.

### **2.3 DELMÅL 3**

Behovsanalys för att se över behovet av substrat som är mer generella och kan användas brett. Inventera alternativa metoder till typning med MALDI-TOF eller PCR.

### **2.4 DELMÅL 4**

Utvärdera möjligheten för olika myndigheter att kunna analysera med konventionell PCR, gjuta agarosgeler samt detektera med UV-ljus.

### **2.5 DELMÅL 5**

Utvärdering av fältmässig metod för indikatoranalys av dricksvatten.

### **2.6 DELMÅL 6**

Övning där inbjudna myndigheter får analysera SARS-CoV-2-prover med en alternativ extraktionsmetod (utvärderad under delmål 2).

## 3 DELMÅL 1 - BEHOVSANALYS

### 3.1 MÅL

Att genomföra en behovsanalys med avseende på att identifiera delmoment i analyskedjan som civila myndigheter respektive Försvarmakten måste kunna utföra även under störda förhållanden såsom kris eller höjd beredskap. För dessa analyser identifieras nuvarande förmåga och sårbarheter som exempelvis nödvändiga reagenser och instrumentering, samt förslag på åtgärder för att minimera sårbarheterna. Åtgärder kan till exempel vara framtagande av leverantörsberoende metoder, strategier för lagerhållning eller uppbyggnad av förmåga att tillreda kritiska material vid myndigheternas laboratorier.

### 3.2 UPPLÄGG

Behovsanalysen delades upp i två delar där den första delen utfördes myndighetsvis. Varje myndighet fick ta del av ett diskussionsmaterial med ett antal frågor kopplade till att identifiera kritiska analysmoment samt fundera kring eventuella åtgärder för att säkra förmåga. Utskickat diskussionsmaterial finns i bilaga 1.

Den andra delen av behovsanalysen utfördes myndighetsgemensamt. Representanter från respektive myndighet bjöds in till en workshop den 28 augusti 2019 för att gemensamt diskutera och resonera kring frågorna ovan. Totalt deltog ca 30 personer från Försvarmakten, Polisen (NFC), Fohm, FOI, Livsmedelsverket och SVA. Inbjudan och agenda till workshop finns i bilaga 2 respektive 3.

Efter workshopen sammanställdes analysmoment som identifierats som kritiska samt föreslagna åtgärder för att upprätthålla dessa. Resultatet från workshopen har legat till grund för fortsatt arbete i projektet under 2020-2021. Figur 1 visar en översikt över behovsanalysens olika moment.



*Figur 1. Upplägg för behovsanalysen.*

### **3.3 RESULTAT OCH PLANERING**

Nedan listas de aktiviteter som planerades baserat på underlag från workshopen.

#### **3.3.1 Aktivitetslista för 2020**

- Utvärdering av alternativa extraktionsmetoder för DNA och RNA
- Litteraturstudie och inhämtning av information från respektive myndighet rörandes odling, substrat och alternativa typningsmetoder.

#### **3.3.2 Aktivitetslista för 2021**

- Utvärdering av protokoll för tvätt och återbruk av spinnkolonner
- Workshop med avseende på substrat, odling och typning.
- Utvärdering av fältmässig metod för indikatoranalys av dricksvatten i fält.
- Inventering av möjlighet till analys med konventionell PCR.
- Bioinformatisk kvalitetsbestämning av befintliga primers för konventionell PCR.
- Övning med alternativ extraktionsmetod för SARS-CoV-2.

## **4 DELMÅL 2 - UTVÄRDERING AV ALTERNATIVA EXTRAKTIONSMETODER OCH ÅTERBRUK AV SPINKOLONNER**

Mikrobiologisk/molekylärbiologisk diagnostik är beroende av avancerad analysutrustning och reagenser som i många fall endast kan erhållas från en eller ett fåtal leverantörer, ofta belägna utanför Sveriges gränser. Detta gör analyserna sårbara för samhällsstörningar vilka innebär avbrott eller fördröjning av leveranser till, eller inom, Sverige.

DNA- och RNA-extraktion är ett steg som är gemensamt för många analyser och innebär att man renar fram DNA eller RNA från ett prov. Den vanligaste metoden bygger på silica-kolonner med ett filter som vid höga koncentrationer av salt och/eller alkohol binder DNA eller RNA. Övrigt innehåll i provet såsom proteiner, fetter, kolhydrater och liknande tvättas bort med saltlösning och alkohol. Rent DNA eller RNA som binder till filtret tvättas slutligen loss med en saltfattig elueringsbuffert. Numera är extraktionssteget ofta automatiserat där man använder en extraktionsrobot och färdiga reagens-kit. Det finns flera olika sorters instrument men gemensamt för alla är att produktionen ligger utanför Sveriges gränser. Under pandemin med covid-19 blev detta extra tydligt då extraktionsreagenser blev en bristvara och leveranser försenades eller uteblev. Behovet av en alternativ metod blev uppenbart. Förutom reagenser för RNA-extraktion har även andra produkter som handsprit, handskar, skyddsutrustning och plastprodukter varit en bristvara under pandemin. Därmed har rengöring och återbruk av plastprodukter för laborativt ändamål blivit en fråga av intresse.

### **4.1 RNA-EXTRAKTION - SARS-COV-2**

Under våren 2020 rapporterades om en överhängande risk för att det i samband med ökad efterfrågan på PCR-analys för SARS-CoV-2 skulle kunna ta slut på RNA-extraktionskit. För att möta upp behovet av en alternativ extraktionsmetod inför PCR av SARS-CoV-2 utfördes en skyndsamt utvärdering med avseende på att hitta en alternativ metod som var snabb, enkel, säker och ekonomisk hållbar.

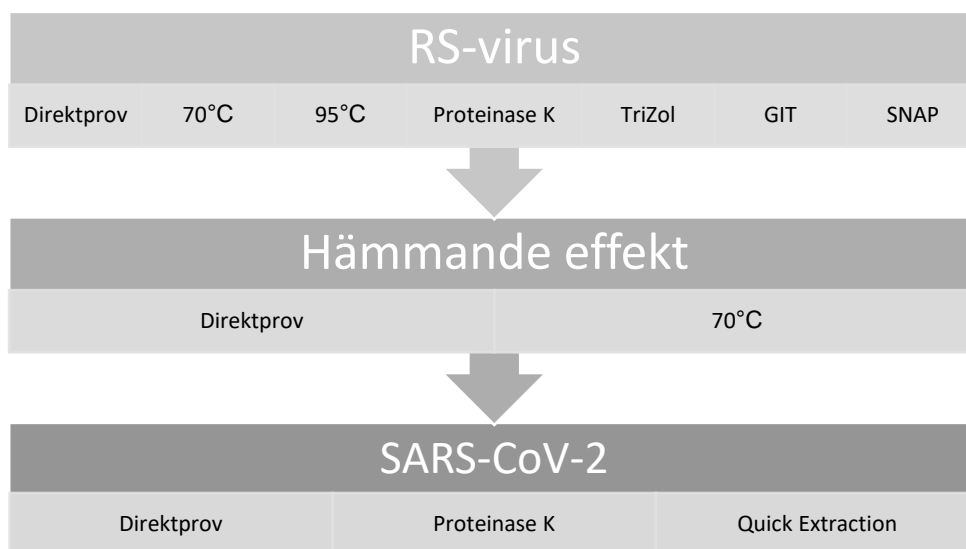
Utvärderingen skedde i samråd med en region i Sverige och utgick från deras behov.

#### **4.1.1 Studieupplägg**

I den första delen av utvärderingen gjordes en snabb inventering av potentiella alternativa metoder varpå sju olika protokoll valdes ut (direktprov, värmeinaktivering med 70°C och värmedenaturering med 95°C, Proteinase K, TriZol, GIT och SNAP, se bilaga 4 för metodbeskrivning). En enklare utvärdering med RS-virus (Respiratory syncytial virus) som modellorganism utfördes (data är inte inkluderat i rapporten). Syftet med att använda RS-virus som modellsystem var att förenkla det laborativa arbetet då arbete med SARS-CoV-2 krävde nya riskbedömningar och rutiner innan verksamheten kunde starta igång. Utöver den huvudsakliga metodutvärderingen valdes även två

metoder ut (direktprov och värmeinaktivering med 70°C) för att undersöka om provbakgrunden (matris) skulle kunna ha en hämmande effekt på analysen.

Utifrån resultat samt kunskapsinhämtning via omvärldsbevakning valdes tre metoder ut (direktprov, Proteinase K och Quick Extraction) för fortsatt utvärdering med patientprover innehållande SARS-CoV-2 i olika koncentrationer. Metoden Quick Extraction inkluderades i ett senare skede av utvärderingen utifrån preliminära data som visade på att metoden ev. skulle kunna fungera (1) (se bilaga 4 för metodbeskrivning). Resultatet utvärderades och jämfördes med den aktuella regionens befintliga kit-baserade- och automatiserade robotextraktion. Detta för att säkerställa resultat samt fastställa ev. begränsningar av den alternativa metoden. Sedan togs ett beslut i samråd med regionen gällande vilken metod som skulle användas. Beslutet grundades på resultat från utvärderingen, användarvänlighet samt krav på att metoden skulle innefatta ett inaktiverande steg. Se figur 2 för en schematisk överblick över utvärderingen.



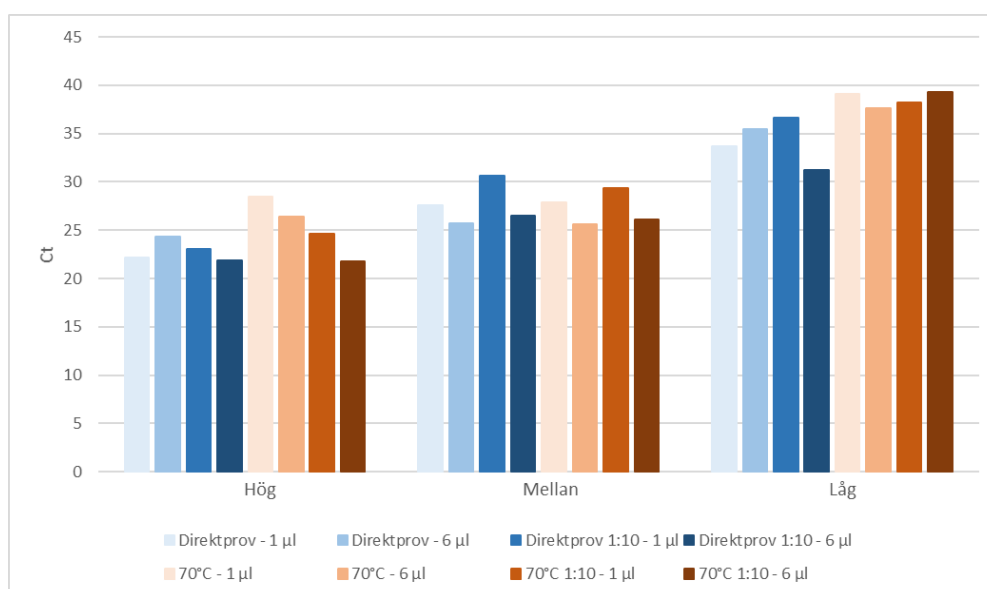
**Figur 2.** Schematisk översikt över utvärderingens olika delar.

#### 4.1.2 Hämmade effekt

Olika provbakgrunder som till exempel blod, jord, vatten eller saliv, kan innehålla ämnen som kan störa provupparbetning och analys av ett prov vilket kan leda till falskt negativa resultat. För att säkerställa att provmatrisen inte skulle ha en hämmande effekt på själva analysreaktionen valdes två metoder ut (direktprov och värmeinaktivering med 70°C) för att undersöka om volymen prov eller spädning av provet skulle kunna påverka resultatet. Tre patientprover innehållandes olika virusnivåer som representerade hög- (Ct 17,7), mellan- (Ct 25,6) och lågkoncentration (Ct 30,8) valdes ut (Ct-värdena är utifrån extraktion med robot). Proverna extraherades med de två utvalda metoderna och

analyserades med realtids-PCR. I PCR-steget testades två olika provvolymmer (1 µl och 6 µl) samt ospätt prov i förhållande till en 1:10-spädning.

Resultatet visade på att vid höga viruskoncentrationer uppnåddes bäst resultat med en liten provvolym alternativt genom att späda provet men då krävdes en större volym prov (se figur 3). Vid lägre virusnivåer blev det tydligare att spädningen spelade en större roll men att man fortfarande behövde ta en större volym av det spädda provet. Vidare visade utvärderingen på att direktprov är att föredra framför ett värmeinaktiverande steg men det ska tas i beaktning att utvärderingen har utförts med ett mindre antal prov (tre stycken) och endast i duplikat. I dialog med aktuell region konstaterades dock att metoden ”direktprov” inte var ett fungerande alternativ då extraktionen behövde innehålla ett inaktiverande steg för att fungera i regionens provhantering.



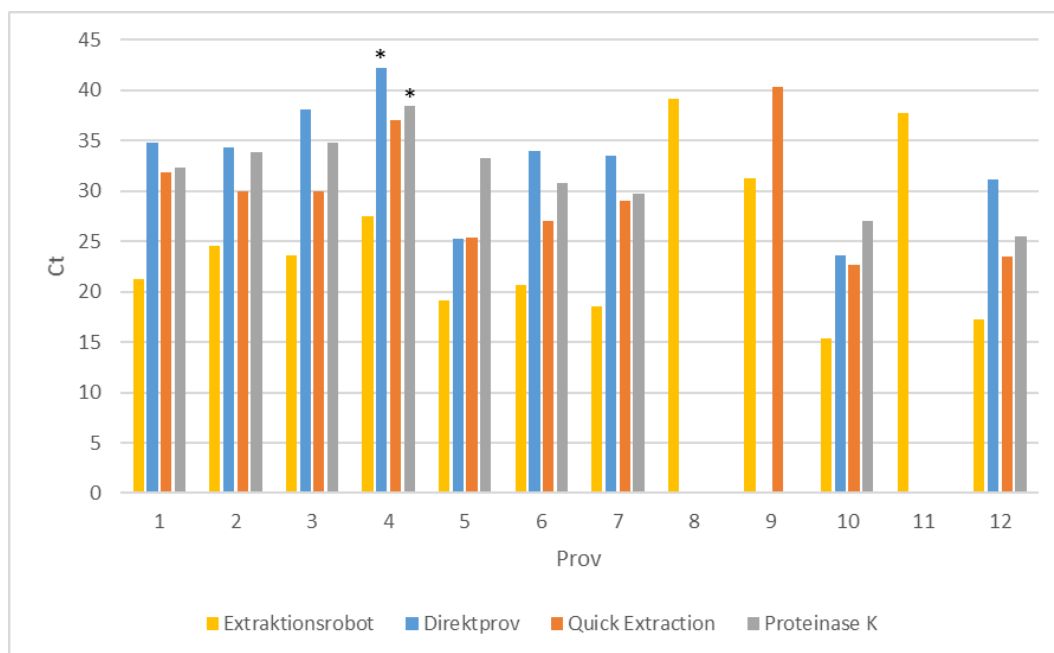
**Figur 3.** Stapeldiagram som visar betydelsen av provvolym och spädning av prov för att minska den hämmande effekten av provmatrisen. Hög-, mellan- och låg korrelerar till viruskoncentrationen i provet. Varje prov har analyserats i duplikat och diagrammet visar medel i Ct-värde.

#### 4.1.3 Utvärdering med patientprover

I en vidare utvärdering extraherades tolv patientprover innehållande olika virusnivåer (Ct-värden mellan 15,41-39,14 med extraktionsrobot). Tre olika alternativa metoder (direktprov, Proteinase K och Quick Extraction) användes och proverna analyserades med realtids-PCR. Två av proverna med Ct-värden 37,74 respektive 39,14 kunde inte identifieras med någon av de alternativa metoderna. Däremot kunde Quick Extraction som enda alternativ metod identifiera ett prov med Ct-värde 31,20. Överlag pekar utvärderingen på att extraktion med Quick Extraction-metoden genererar lägre Ct-

värden i PCR-analysen i jämförelse med direktprov och Proteinase K (se figur 4). Dock ska det tas i beaktning att utvärderingen har gjorts med ett mindre antal prov (tolv stycken) och endast i duplikat.

Quick Extraction-metoden som uppvisade bäst känslighet sattes upp vid en myndighet och användes operativt under tre månader för att bistå en region med analyskapacitet. Metoden har även delgetts andra regioner och myndigheter. Det ska tilläggas att även andra alternativa metoder har använts vid andra myndigheter och regioner under pandemin för analys av SARS-CoV-2.



**Figur 4.** Jämförelse mellan RNA-extraktion med robot och alternativa extraktionsmetoder. Varje prov har utförts i duplikat och diagrammet visar medel i Ct-värde. \* = endast det ena av de duplicerade proverna gav resultat.

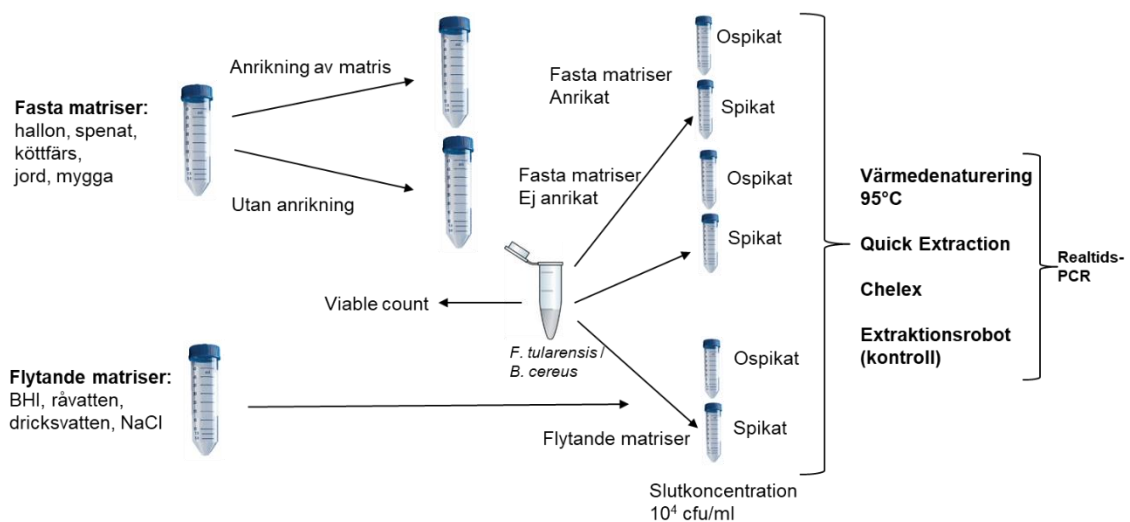
## 4.2 DNA-EXTRAKTION – FRANCISELLA TULARENSIS OCH BACILLUS CEREUS

Ett övergripande fokus för FBD är 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. Eftersom extraktion av DNA och RNA har identifierats som ett steg som är kritiskt för många analyser och där den diagnostiska förmågan kan påverkas i händelse av inställda reagens- eller instrumentleveranser utfördes en utvärdering av alternativa DNA-extraktionsmetoder. Utvärderingen gjordes med avseende på biologiska riskklass 3-bakterierna *Francisella tularensis* som orsakar harpest och den sporbildande bakterien *Bacillus anthracis* som orsakar mjältbrand.



### 4.2.1 Studieupplägg

Utvärderingen började med en inventering av kända alternativa extraktionsmetoder. I samråd med representanter från de olika ingående myndigheterna valdes tre metoder ut: värmedenaturering med 95°C, Quick Extraction och Chelex (för protokoll se bilaga 5). Urvalet baserades bland annat på metodernas svårighetsgrad och ingående kemikalier utifrån perspektivet att de ska kunna utföras på ett BSL3-laboratorie där säkerhetskrav och utrymme kan vara begränsande. För att förenkla det laborativa arbetet användes två modellstammar, *F. tularensis* FSC458 och *B. cereus* 2085 (vegetativ form), vilket möjliggjorde att utvärderingen kunde utföras på ett BSL2-laboratorie även om frågeställningen gällde riskklass 3-bakterier. Att använda en modellorganism i samband med en utvärdering kan förenkla det laborativa arbetet men det är av ytterst vikt att den slutgiltiga metoden även valideras för det skarpa smittämnet. Utvärderingen omfattade både fasta och flytande provmatriser med olika egenskaper som exempelvis pH, salt, fetthalt och som är representativa för myndigheternas ansvar och analysarbete. Även näringsbuljongen BHI (brain heart infusion) inkluderades som kontroll då detta medium används för provberedning och anrikning (se protokoll, bilaga 5). Figur 5 visar en schematisk bild av försöksupplägget. De extraherade proverna utvärderades med realtids-PCR.



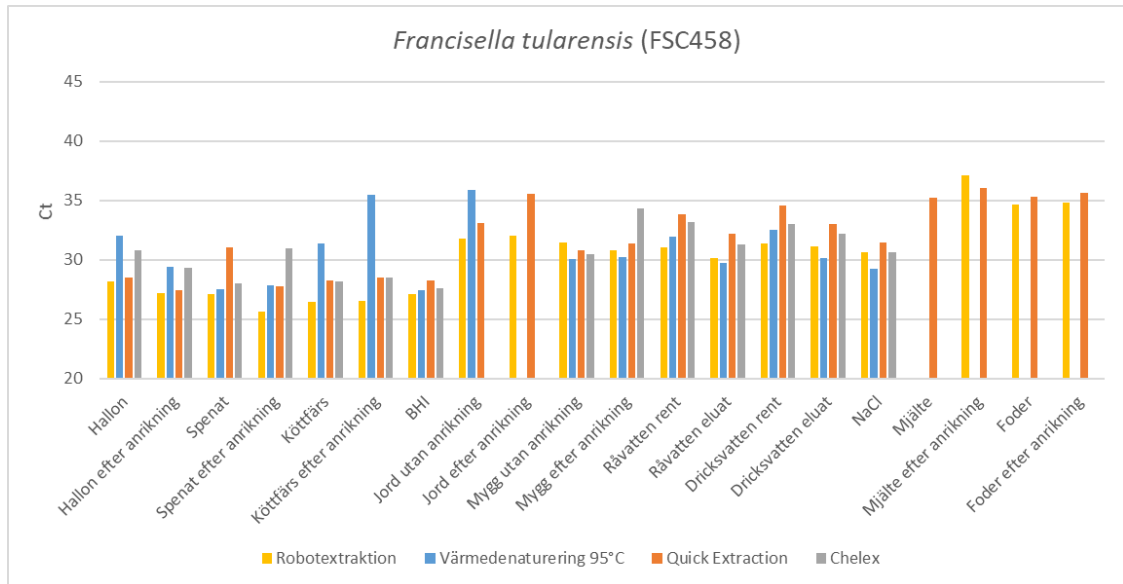
Figur 5. Schematisk översikt över provberedning och experimentellt upplägg.

### 4.2.2 Resultat

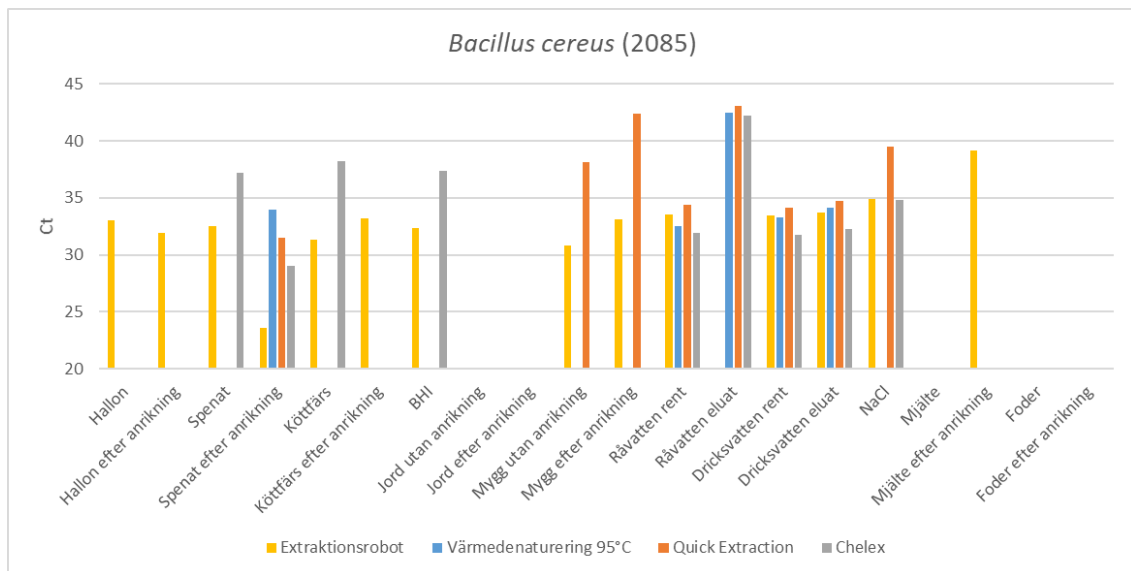
För analys av *F. tularensis* fungerar Quick Extraction-metoden bra både på livsmedel-, miljö-, djur- och fodermatriser (Figur 6A). Anmärkningsvärt är att värmedenaturering fungerar bra på vattenprover vilket är en viktig observation att ta med sig i samband med till exempel fältarbete där tillgången på instrument och reagenser kan vara begränsad. Även Chelex-metoden fungerade bra på vissa matriser men utifrån metodens komplexitet bör den väljas bort i förmån för snabbare och enklare metoder. För analys av *B. cereus* är ingen av de testade metoderna fullt tillfredsställande varpå vidare

metodutveckling krävs (Figur 6B). *B. cereus* är en grampositiv bakterie vilka kännetecknas av en tjock cellvägg varpå extraktionen kräver ytterligare steg för att lyckas slå sönder cellerna och göra DNA åtkomligt. Noterbart är dock att även här fungerar värmedenaturering på vattenprover.

**A.**



**B.**



**Figur 6A och B.** Jämförelse mellan DNA-extraktion med robot och med alternativa extraktionsmetoder. Varje prov har utförts i duplikat och diagrammet visar medel i Ct-värde. **A.** *Francisella tularensis*. **B.** *Bacillus cereus*.

### 4.3 ÅTERBRUK AV SPINKOLONNER FÖR DNA-EXTRAKTION

Under störda förhållanden kan tillgången på kit-baserad extraktionsutrustning vara begränsad eller helt stoppad. Här har vi undersökt möjligheten att tvätta och återanvända silica-kolonner som är den mest kritiska beståndsdel i ett extraktionskit. Ett potentiellt problem med att återanvända spinnkolonner till extraktionskit är att kvarvarande DNA/RNA från tidigare extraktioner kan finnas kvar och, beroende på vad provet ska användas till, störa eller i värsta fall förstöra experiment och analyser. En metod som har utvärderats är att hydrolysera kvarvarande DNA/RNA med stark saltsyra, skölja bort saltsyran med vatten och slutligen återställa kolonnens kemiska egenskaper med en buffertlösning (2).

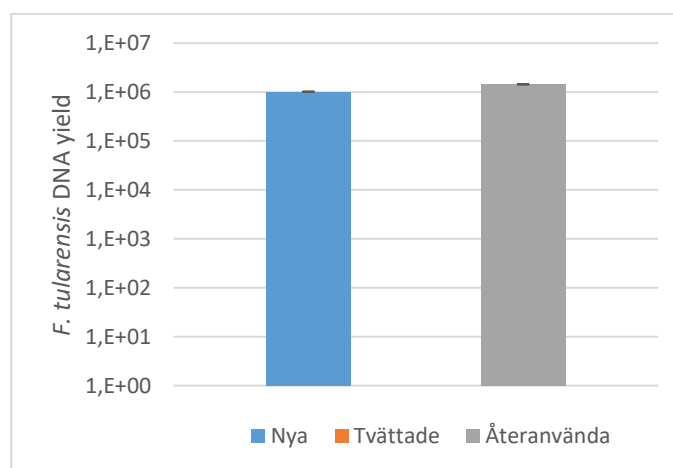
#### 4.3.1 Studieupplägg

Spinnkolonner kan inhiberas av stora mängder DNA eller protein. För att få en utmanande men ändå definierad provmatris användes en övernattskultur av *Escherichia coli* i LB-medium som spikades med DNA från  $1 \times 10^7$  CFU/ml *F. tularensis*. För utvärderingen användes 12 spinnkolonner från QIAGENs Blood & Tissue kit enligt protokollet för Gramnegativa bakterier. Efter eluering sänktes kolonnerna ner i 1M HCl i 24 timmar varefter de tvättades med vatten och rekonditionerades med i medföljande QBT-buffert i kitet. För att undersöka förekomsten av kvarvarande DNA, eluerades sex kolonner med elueringsbuffert. Kvarvarande sex kolonner användes för ytterligare en extraktion för att utvärdera hur väl kolonnerna går att återanvända. Proverna utvärderades med realtids-PCR.

#### 4.3.2 Resultat

Resultatet visar på att metoden inte lämnar några detekterbara spår av tidigare extraktion samt att DNA-utbytet med en tvättad, rekonditionerad kolonn är helt likvärdigt med en ny (se figur 7).

Försöken visar att kolonner går att återanvända på ett enkelt sätt.



**Figur 7.** Inget kvarvarande DNA kunde påvisas i de tvättade kolonnerna och utbytet mellan nya och återanvända kolonnerna skiljde sig inte.

## 4.4 DISKUSSION

I en kris med inställda leveranser av exempelvis reagens, laboratoriemateriel och instrument eller där ett trasigt instrument inte kan repareras eller servas på grund av att den tekniska kompetensen finns utanför landets gränser kan man behöva tillämpa alternativa metoder eller återbruka material. Den första frågan att ställa sig är huruvida analysen ifråga är kritisk och vad konsekvensen blir om den inte går att utföra? Syftar analysen till att identifiera individer som bär på smitta eller för att få en uppfattning om hur stor andel av en population som är eller har varit exponerade? Om analysen ifråga är nödvändig och följderna av att den blir inställd till exempel är allvarlig smittspridning och sjukdom behöver man undersöka vilka möjliga alternativ det finns till den befintliga metoden. Beroende på om analysen ifråga berör ett fåtal sällanprover eller, som under pandemin med covid-19, analys i samband med storskalig provtagning kan den alternativa metodens komplexitet behöva vägas in. Metoden måste vara hanterbar utifrån rådande situation (komplexitet, tidsåtgång, säkerhet, kostnad). Med specialiserade instrument, tillhörande reagens/material och validerade metoder har man en hög känslighet och väl dokumenterad prestanda av befintliga analysmetoder. I en kris där man inte har tillgång till instrument och reagenser och kanske saknar prover för en fullskalig validering kan man behöva förlita sig på enklare metoder och därmed behöva tvingas sänka kraven på till exempel känslighet. Detta är en ytterst svår fråga men av största vikt att diskutera ur ett beredskapsperspektiv. Med en bra utvecklad och genomarbetad beredskapsdiagnostik där det finns kunskap om alternativa metoder/material och dess begränsningar kan man göra väl avvägda beslut och prioriteringar när krisen kommer.

## 5 DELMÅL 3 – ODLING OCH TYPNING

I samband med störda förhållanden som kan påverka till exempel el eller försörjningskedjor till laboratorier och som innebär att ordinarie mer avancerade metodik inte fungerar finns det fortfarande möjlighet att göra enklare odling och typning av bakterier. Odling och isolering av bakterier är en metod som inte kräver tillgång till kommersiella kit. Däremot krävs kunskap kring produktion och användning av lämpliga substrat samt kompetens och erfarenhet av hur man identifierar bakterier utifrån morfologi eller med hjälp av enklare typning. Ofta sker typning med MALDI-TOF, en form av masspektrometri, vilket är en snabb och enkel metod men som är helt instrumentberoende. Typning som bygger på till exempel biokemi, gramfärgning och mikroskopering kan vara fördelaktiga vid störda förhållanden för att utesluta eller säkerställa förekomst av patogena bakterier. Detta kräver emellertid rutiner för lagerhållning av förbrukningsartiklar samt enklare apparatur och upprätthållande av kompetens.

### 5.1 STUDIEUPPLÄGG

För att få information utfördes en kunskapsinhämtning samt en behovsanalys i form av en workshop. Under workshopen diskuterades frågor gällande substrat som är mer generella och kan användas brett, vad som bör finnas i lager, vilka myndigheter som har substratavdelningar där substrat kan tillredas och hur dessa kan samverka. Målet var att ta fram förslag till substratavdelningar gällande vilka substrat som kan lagerhållas i syfte att förstärka inför en kris samt att se över alternativa metoder till typning med MALDI-TOF eller PCR med fokus på patogener i riskklass 3 samt ett fåtal i riskklass 2 såsom *E. coli* (patogena subspecies), *Campylobacter* och *Salmonella*.

#### 5.1.1 Kunskapsinhämtning

Projektgruppen har sett över substrat som är mer generella och kan användas brett.

Kunskapsinhämtningen kompletterades med projektmedlemmarnas gedigna erfarenhet. I syfte att avgränsa och underlätta informationsinhämtning i senare skede har webbsidorna ”Referensmetodik för laboriediagnostik vid kliniska laboratorier” (3), nedan kallad Referensmetodik, och ”Veterinärmedicinsk bakteriologi: information om betydelsefulla arter” (4), nedan kallad Vetbact, använts. Referensmetodik och Vetbact baseras på klassisk bakteriologi och är generellt skrivna. För att svara på frågan om vilka substrat och medier som är nödvändiga för odling och artbestämning har minimikriterier för var och en av de i målet förekommande agens tagits i beaktande.

Genomgång har gjorts av vilka av de i FBD ingående myndigheter som har möjlighet att tillverka substrat och lagerhålla dehydrerade medier (nedan kallade pulver), övriga kemikalier och agar.

### 5.1.2 Workshop

För att tillvarata kompetens som finns hos de olika myndigheterna samlades deltagare i en workshop (se inbjudan bilaga 6). På grund av den rådande pandemin av covid-19 var det inte möjligt att träffas och workshopen hölls digitalt. Innan workshopen gjordes en genomgång av informationssäkerheten.

På workshopen deltog personer som arbetar med tillverkning av substrat samt personer som arbetar med odling och typning av bakterier på laboratorier. Totalt deltog 16 personer från Försvarmakten, Fohm, FOI, Livsmedelsverket och SVA. Det första som diskuterades var vad som alltid bör finnas i lager för generell odling av bakterier. Vidare diskuterades selektiva medier och kriterier för enkel artbestämning och typning alternativt möjlighet att utesluta förekomst av specifika bakterier. En annan viktig och aktuell fråga som togs upp var hur kompetens för klassisk bakteriologi kan överföras till nya medarbetare när nya metoder och användandet av nya instrument tar över.



*Bakteriekolonier på agarplatta. Foto: SVA*

## 5.2 RESULTAT

Vid kunskapsinhämtningen visade det sig att många medier som använts under lång tid i klassisk bakteriologi fortfarande är aktuella, speciellt de generella. Nya substrat har tillkommit och därmed nya möjligheter att odla fram bakterier genom selektiv odling. Exempelvis chromplattor blir vanligare och kan göras mer specifika. Under workshopen framkom att det finns möjlighet hos myndigheterna att använda mer generella agar och medier vid odling och artbestämning under störda förhållanden.

Myndigheterna har olika uppdrag och varierande behov varvid de har skiftande strategier för lagerhållning och tillverkning av sina respektive behov av agar och reagenser. Exempel på lämpliga pulver att ha på lager för generell odling kan vara colombiaagarbas (CAB), blodagarbas (BAB) no 2, tryptonsoyaagar (TSA), brain heart infusion (BHI) och McLeod. För att få ett färdigt substrat behöver vissa av dessa pulver blandas med agar, vilket också behöver lagerhållas. Till flera av medierna är det lämpligt att tillsätta blod, kemikalier och antibiotika. Många kemikalier och antibiotika går att lagerhålla, men blod är en färskvara och kan därför bli problematisk att få tag på under en kris.

På grund av informationssäkerhet i samband med workshopen kunde inte detaljer inom vissa frågeställningar diskuteras och resonemanget blev mer allmänt. Dock kunde ett stort värde ses i att personal från flera laborativa myndigheter samlades och diskuterade substratfrågor. Flera av deltagarna hade inte tidigare deltagit i FBD-sammanhang. Det framfördes positiv återkoppling rörande att frågor om substratproduktion och klassisk mikrobiologi lyfts gemensamt myndigheter emellan. Vidare framkom ett behov av utbildningsinsatser då arbetssättet vid en störning kan avvika från ordinarie förhållanden. Det är viktigt för laboratoriepersonal att ha kunskap och erfarenhet av hur respektive bakterie växer på olika agarplattor samt morfologin. Förutom kunnig personal behövs även lämplig apparatur, såsom autoklav, mikroskop, pH-meter och inkubator.

Det räcker dock inte med mikroskopering och morfologi för att typa bakterier. I samband med kunskapsinhämtningen och workshopen diskuterades vad som krävs för att artbestämma bakterier under störda förhållanden då tillgång till ordinarie metoder, exempelvis MALDI-TOF och PCR inte finns att tillgå. Gramfärgning och makroskopisk kolonimorfologi är grunden för vidare artbestämning. Snabbtester exempelvis oxidas och katalas, är också enkla att utföra direkt. Om bakterien är odlad på blodagar kan hemolys eller ej hemolys avläsas. Med hjälp av dessa tester, tillsammans med gramfärgning och makroskopisk kolonimorfologi går det att utesluta vissa bakterier, vilket är ett viktigt resultat i diagnostiken. Det finns fortfarande laboratoriepersonal på de olika myndigheterna med goda kunskaper i klassisk bakteriologi, men problemet är att kunskapen inte används regelbundet och på sikt riskerar att tappas.

Som ett resultat av workshopen framkom behovet av utbildningsinsatser angående grunder i klassisk bakteriologi (se listan nedan). Dessutom krävs kunskap för att kunna avgöra vilka bakterier som är relevanta beroende på till exempel matris och anamnes.

Identifierade moment inom klassisk bakteriologi där utbildningsinsatser behövs:

- primärodling
- läsa av primärodling
- kunskap i kolonimorfologi
- utföra snabbtester
- renodla utvalda bakteriekolonier
- gramfärga
- läsa gramfärgade preparat
- utföra biokemiska tester (jäsningsbuljonger)
- tolka resultat inklusive jäsningscheman.

För att momenten i listan ska fungera är det av stor vikt att substraten tillverkas på ett korrekt sätt. Det är också av vikt att nämna att tillverkning av små satser substrat kan vara en utmaning som kräver speciell kompetens.

En förfrågning skickades ut till FBD-myndigheterna gällande tillverkning och lagerhållning av substrat. Två av myndigheterna har enhet/sektion som arbetar med tillverkning av substrat och dessa har även lagerhållning (se tabell 1). Det finns även ett aktivt samarbete mellan två myndigheter gällande substratproduktion. Övriga myndigheter köper in substrat externt.

*Tabell 1. Översikt vilka myndigheter som har tillverkning och lagerhållning av substrat.*

Myndighet	Tillverkning	Lager
1	Ja	Ja
2	Nej	Nej
3	Ja	Ja
4	Nej	Nej
5	Nej	Nej

### 5.3 DISKUSSION

Med klassiska odlings- och typningsmetoder kan bakterier endast typas till en viss nivå, men lika viktigt är att kunna utesluta misstänkta patogener. Som exempel kan nämnas att det utan ordinarie typningsmetoder kan vara svårt att subtypa *Bacillus*. Det kan i vissa fall vara tillräckligt trots detta, om det finns en god klinisk bild. Adekvat nivå på artbestämningen måste göras så att en motåtgärd kan sättas in. Viktigt att ta med sig från workshopen är det framtida behovet av utbildningsinsatser i klassisk bakteriologi. Idag sker nästintill all artbestämning inom viss diagnostik med MALDI-TOF vilket gör att den klassiska bakteriologin faller i glömska. Dessutom utbildas inte ny laboratoriepersonal i att artbestämma med gamla klassiska metoder i samma utsträckning på arbetsplatser idag. Så länge det inte finns någon eller några andra tekniker eller metoder som är lika robusta och resurssnåla (vad gäller materiel och beroenden) som klassisk bakteriologi, är det artbestämning med klassiska metoder vi har att falla tillbaka på vid störda förhållanden. Då är det viktigt att vi återkommande utbildar laboratoriepersonalen i klassisk bakteriologi. Under workshopen ställde deltagarna spontana frågor i ämnet och delade med sig av sina kunskaper vilket ledde till en viss kunskapshöjning bland deltagarna.

Selektiva agarsorter för odling av specifika agens, exempelvis i BSL-3 laboratorier, är styrt av respektive myndighets metoder. Vid störda förhållanden kan det vara svårt att få tag på materiel som till exempel selektiv agar. Under covid-19 pandemin har det varit tydligt att det kan vara svårt att få leveranser av förbrukningsvaror till laboratorier. Förslagsvis bör de ingående myndigheterna se över



sina rutiner för lagerhållning av ingående ingredienser i både generella och selektiva agarsorter. Lika viktigt är att lagerhålla förbrukningsartiklar såsom petriskålar, pipettspetsar och handskar.

Detta arbete kan betraktas som ett generellt förberedande arbete och går inte i denna rapport in i detalj på varje enskild myndighet. Arbetet har påverkats av rådande omständigheter och vid de ingående myndigheterna har det arbetats med snarlika och omgripande frågeställningar som denna problemformulering ligger inom. Det finns därför ett behov av att fortsätta detta arbete, mer i detalj, på varje myndighet och i samarbete myndigheter emellan.

## 6 DELMÅL 4 – KONVENTIONELL PCR

Realtids-PCR är en snabb och enkel metod inom diagnostik. Vid realtids-PCR sker detektion av PCR-produkten med hjälp av fluorescerande molekyler såsom SYBR green eller TaqMan-probe. Metoden är dock beroende av tillgång till dessa kommersiella molekyler. I händelse av begränsad tillgång kan en alternativ metod vara konventionell PCR där detektionen istället sker med hjälp av agarosgelelektrofores vilket innebär att molekyler med utifrån storlek och laddning vandrar olika långt i ett elektriskt fält. I dagsläget används konventionell PCR allt mer sällan.

### 6.1 INVENTERING

För att undersöka möjligheten till att analysera med konventionell PCR, gjuta agarosgeler samt detektera med UV-ljus vid de olika myndigheterna gjordes en enklare inventering med fokus på kompetens och utrustning. Utskickat frågeformulär finns att se i bilaga 7, där även myndigheternas möjlighet till egenproduktion av primer och prober undersöktes. Resultatet av inventeringen av sammanställts i tabell 2 och 3.

*Tabell 2. Sammanställning över utrustning och kompetens kopplat till att analysera med konventionell PCR.*

	Myndighet				
	1	2	3	4	5
Instrument för analys med konventionell PCR	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Utrustning för att gjuta agarosgeler	Nej	Ja	Ja	Ja	Ja
Kompetens för att gjuta agarosgeler	Nej	Ja	Ja	Ja	Ja
Utrustning för gelelektrofores	Nej	Ja	Ja	Ja	Ja
Utrustning för att kunna utvärdera geler	Nej	Ja	Ja	Ja	Ja
Avancerad utrustning för utvärdering t.ex. Bioanalyser	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Kompetens för analys/utvärdering med konventionell PCR	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

Tabell 3. Sammanställning över utrustning och kompetens kopplat till att egenproduktion av primers och prober.

Myndighet	Utrustning för att tillverka primers	Kompetens för att tillverka primers	Utrustning för att tillverka prober	Kompetens för att tillverka prober
1	Nej	Nej	Nej	Nej
2	Nej	Nej	Nej	Nej
3	Nej	Nej	Nej	Nej
4	Nej	Nej	Nej	Nej
5	Ja	Ja	Ja	Ja

## 6.2 UTVÄRDERING AV PRIMERS

Primers för konventionell PCR skiljer sig från primers för realtids-PCR utifrån längden av de DNA-fragment som de ger upphov till. Utvärdering med agarosgelelektrofores kräver längre fragment för att det ska vara möjligt att visuellt bedöma med hjälp av UV-ljus. Eftersom konventionell PCR inte används som rutin vid myndigheterna är det av vikt att säkerställa befintliga primers prestanda. Med hjälp av ett bioinformatiskt analysprogram och befintliga genomdatabaser har varje primer utvärderats med avseende på inklusivitet och exklusivitet vilket betyder att de ska kunna identifiera korrekt agens samt exkluderar närbesläktade subspecies för att utesluta falskpositiva resultat.

Resultatet av utvärderingen skickas i separat rapport till respektive myndighet.

## 6.3 DISKUSSION

Instrument, utrustning och kompetens för att analysera med konventionell PCR finns hos majoriteten av myndigheterna även om metoden alltmer sällan används. En metod som inte används riskerar emellertid att falla bort i prioriteringar där underhåll av instrument och utrustning uteblir och uppdatering eller validering av protokoll inte längre är relevant. Kompetens en färskvara där en analysmetod i värsta fall tenderar att finnas i någon enskild persons goda minne och därmed försvinner i samband med en pensionsavgång eller vid byte av arbetsplats. I frågan rörandes analyser och beredskap måste man se till att underhålla utvalda metoder, instrument och utrustning som inte används på daglig basis för att när krisen kommer snabbt kunna ställa om ifall att situationen så kräver. Likaså är frågan kring egenproduktion av vissa kritiska reagens såsom primers och prober högst relevant. Pandemin med covid-19 har pekat på en sårbarhet i samhället med uteblivna leveranser och produktion utanför landets gränser.

## 7 DELMÅL 5 – UTVÄRDERING AV FÄLTMÄSSIG INDIKATORANALYS AV DRICKSVATTEN

Tillgång till säkert dricksvatten är avgörande för människors hälsa och överlevnad. I syfte att vara självförsörjande är det av största vikt att Försvarsmakten har förmåga att producera eget dricksvatten såväl vid nationell samt internationellt insats. Grunden för säkerställande av dricksvattnets kvalitet är provtagning enligt Livsmedelsverkets föreskrift 2001:30 (5). Vattenprover skickas till ackrediterat laboratorium som analyserar vattnet enligt mikrobiologiska och kemiska parametrar. Huvudkällan till sjukdomsframkallande mikroorganismer påträffade i dricksvatten härstammar från fekal förorening (förorening från avföring). Detta ger incitamentet till att grunda bedömningen av den mikrobiologiska dricksvattenkvaliteten genom att mäta förekomsten av indikatorbakterien *E. coli*. Förekomst av denna bakterie ger ett mått på graden av fekal förorening och därmed, indirekt en god grund för bedömningen av vattnets tjänlighet. Påvisas 10 *E. coli*-bakterier i ett 100 ml dricksvattenprov bedöms vattnet otjänligt.

I egenkontrollprogram vid utredningar av smittsam sjukdom eller vid störda förhållanden där vattenprover inte kommer fram till externt laboratorium finns behov att kunna mäta förekomst av *E. coli* i fält. I nuläget använder Försvarsmakten en metod för att analysera indikatororganismer i vatten baserad på membranfiltrering och odling på 3M-Petrifilm. Denna metod används i stationärt fältlaboratorium. I denna undersökning jämfördes membranfiltrering och odling på 3M-Petrifilm med metoderna IDEXX Colilert och Aquagenx. Vattenprover med kända bakteriestammar analyseras parallellt. Förutom metodernas analysförmåga jämfördes fältmässiga aspekter som användarvänlighet, utrustningskrav och tidsaspekter.

### 7.1 BESKRIVNING AV DE TRE ANALYSMETODERNA

#### 7.1.1 3M-Petrifilm

Den metod som används i Försvarsmakten idag baseras på membranfiltrering (Figur 8B). En bestämd volym med prov pumpas genom filter som sedan inkuberas på en selektiv petrifilmsplatta från företaget 3M. Plattorna levereras torkade och innehåller ett vattenlösligt geleringsmedel, näringsämnen för den mikroorganism som ska odlas samt en indikator som förenklar avläsning av kolonierna. Kvantifiering sker manuellt genom kolonibedömning och räkning av CFU. Blå kolonier med gasbildning räknas som *E.coli* (EC), röda och blå kolonier med gasbildning räknas som totala koliformer (TC).

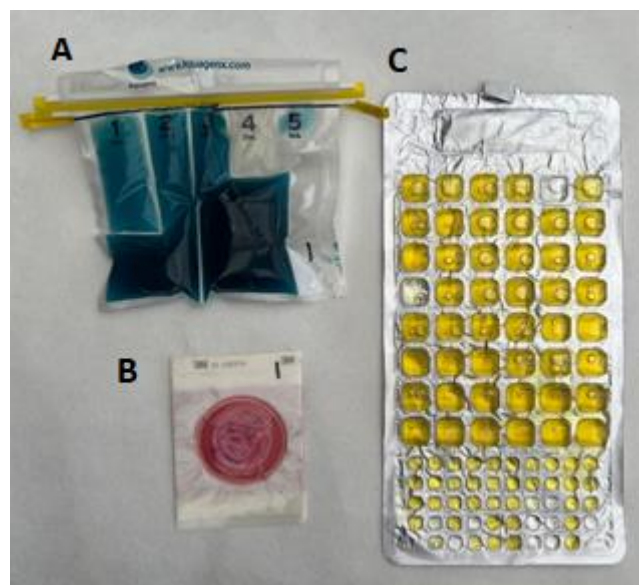
#### 7.1.2 IDEXX Colilert-18

Colilert-18 har förmåga att i en analys detektera och kvantifiera både *E. coli* och totala koliforma bakterier i vattenprovet. När koliforma bakterier metaboliserar enzymsubstratet ONPG resulterar detta

i ett gult färgomslag (se figur 8C). När *E. coli* metaboliserar enzymsubstratet MUG så resulterar det i fluorescens vid belysning med UV-ljus. indikatorn finns som torkat pulver och innehåller enzymsubstrat, indikatorn samt selektivt tillväxtfrämjande ämnen. För kvantifiering omvandlas antalet brunnar med omslag till Most Probable Number (MPN) via en tabell. MPN anger det troliga antalet bakterier per given volym prov.

### 7.1.3 Aquagenx

Aquagenx EC+TC MPN-kit detekterar och kvantifierar samtidigt *E. coli* (EC) och totala koliforma (TC) bakterier i ett 100 ml prov. Den använder ett pulvertillväxtmedium med ett glukossubstrat som kallas X-Gluc. När *E. coli* metaboliserar substratet i Aquagenx tillväxtmedium blir färgen på vattnet blå vilket indikerar närvaron av *E. coli* (Figur 8A). Tillväxtmediet innehåller också ett fluorogent galaktosidssubstrat som kallas MUGal. Om det finns totala koliformer så metaboliseras detta fluorogena substrat och provet fluorescerar blått under UV-ljus (365 nm). För kvantifiering matchas kombinationen av brunnar med omslag Aquagenx färgkodade MPN-tabell.



Figur 8. De tre metoderna A. Aquagenx, B. Membranfiltrering och C. Colilert

## 7.2 STUDIEUPPLÄGG

Sju stycken prover med en diversitet av bakteriestammar analyserades, se tabell 4. Beredning gjordes genom att lösa upp innehållet med 1 ml MilliQ för att sedan spädas upp till 800 ml. Baserat på Livsmedelsverkets tidigare erfarenheter från dessa bakteriestammar spädades vissa prov ytterligare 1:10 eller 1:100 innan analys för att begränsa antalet kolonier i provet.

**Tabell 4.** Sammanställning över referensprover innehållandes olika bakteriesammansättningar

Prov	Mikroorganismer	Volym
1	<i>E. coli</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Phialophora fastigiata</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10 ml
2	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Clostridium perfringens</i> <i>Streptomyces sp.</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100 ml
3	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>S. saprophyticus</i>	100 ml
4	<i>K. pneumoniae</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Acremonium strictum</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Staphylococcus warnerii</i>	1 ml
5	<i>E. coli</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterococcus hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. saprophyticus</i>	100 ml
6	<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterococcus durans</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	1 ml
7	<i>E. coli</i> , <i>S. marcescens</i>	100 ml
8	Nollprov	

### 7.2.1 3M-Petrifilm

En timme före provberedning fuktades Petrifilmerna med 1 ml MilliQ och förvarades i kyl. Membranfiltrering utfördes genom att 100 ml prov filtrerades genom ett 0,45 µm MF-Millipore™ membranfilter där bakterier stannar på filtret. Därefter placerades filtret på en fuktad 3M Petrifilm™ och inkuberades i 36°C i 24 timmar.

### 7.2.2 IDEXX Colilert

100 ml av provet blandades med ampullen med reagens. Blandningen hälldes i en Quanti-Tray™-bricka som förseglades och inkuberades i 35°C i 18 timmar. Vid tiden för undersökningen rådde pandemirestriktioner vilket medförde att vi ej hade tillgång till IDEXX Quanti-Tray Sealer utan förseglade brickorna med ett strykjärn. Denna begränsning gjorde att läckage uppstod mellan vissa brunnar varpå enbart närvaro/frånvaro av *E. coli* och koliforma bakterier kunde bedömas. Efter inkubering avlästes brickornas färgomslag i synligt ljus samt i 365 nm UV-ljus, med avseende på fluorescens.

### 7.2.3 Aquagenx

100 ml av provet blandades med ampullen med reagens. Blandningen hälldes i Aquagenx påse med fem skilda fack. Påsen förslöts och inkuberades i 35°C i 20 timmar. Efter inkubering avlästes påsarnas färgomslag i synligt ljus samt i 365 nm UV-ljus, med avseende på fluorescens. Kombinationen av de olika fackens omslag matchades med Aquagenx MPN-tabell för att få fram ett MPN-värde.

## 7.3 RESULTAT

Resultaten från de mikrobiologiska undersökningarna sammanfattas i tabell 5 nedan.

Tabell 5. Sammanställning av resultat från de tre olika metoderna med avseende *E.coli* (EC) och totalantal koliforma bakterier (TC).

Provnummer	3M-Petrifilm		Colilert		Aquagenx		
	EC	TC	EC	TC	EC	TC	MPN (TC)
1	28	28	Ja	Ja	Ja	Ja	32,6
2	<1	28	Nej	Ja	Nej	Ja	48,3
3	6	13	Ja	Ja	Ja	Ja	13,6
4	<1	6	Nej	Ja	Nej	Ja	4,7
5	10	50	Ja	Ja	Ja	Ja	4,7
6	2	13	Ja	Ja	Ja	Ja	13,6
7	>100	>100	Ja	Ja	Ja	Ja	>100
8	-	-	Nej	Nej	Nej	Nej	-

## 7.4 DISKUSSION

Alla tre systemen är i grunden bra och täcker den bakteriologisk frågeställning gällande förekomst av *E. coli*. I de parametrar där jämförelse fullt ut var möjlig, d.v.s. *E. coli* samt koliforma bakterier, visas samstämmiga resultat mellan Colilert samt Aquagenx. Colilert och Aquagenx ger ett relativt lättolkat resultat då de båda bygger på färgomslag. Analysen av de odlade membranfiltren ställer emellertid lite högre krav på bakteriologisk och laboratorisk färdighet. I den genomförda laborationen odlades membranfiltreringen enbart för frågeställning *E. coli* och koliforma bakterier men membranfiltreringen ger även möjlighet till analys av flera parametrar som heterotrofer samt jäst/mögel. Sådana frågeställningar är inte möjligt i de andra analysmetoderna.

I sitt utförande är Aquagenx utan tvekan den mest användarvänliga lösningen. Colilert ställer vissa krav på kringutrustning såsom avläsningskammare eller specialutrustning för förslutning. Under vår laboration saknades den utrustningen. Colilerten förslöts därför med strykjärn och avlästes med UV-lampa. Membranfiltreringen är i utformningen både otympligare och känsligare. Den ställer krav på förberedelser då agarplattor skall aktiveras. För ett bra förfarande bör ett litet fältlaboratorium upprättas. Erfarenheterna av membranfiltreringsmetoden är stor inom Försvarmakten då metoden nyttjats internationellt i insatsområden. Det har även varit uppsatt på Förvarmedicincentrum i Göteborg för utbildning. Erfarenheter av Colilert samt Aquagenx är mera begränsad. Fler parallella laborationer med resultatjämförelse vore en bra väg att gå. Framför allt i ännu mera fältmässiga förhållanden än vad vi genomförde i denna studie. Det vore även intressant att jobba mot okända

naturvatten. Man skulle då kunna använda metoderna parallellt och för referens skicka analys till godkänt ackrediterat laboratorium.



## 8 DELMÅL 6 – ÖVNING: ALTERNATIV SNABBMETOD FÖR EXTRAKTION AV SARS-COV-2

Som en del i arbetet kring alternativa extraktionsmetoder erbjöds de ingående myndigheterna i FBD-nätverket att delta i en övning där man fick möjlighet att jämföra sin befintliga automatiserade extraktionsmetod med den alternativa Quick Extraction-metoden. Inbjudan och övningsbeskrivning finns i bilaga 8.

### 8.1 ÖVNINGSUPPLÄGG

Kravet på att få delta i övningen var att myndigheten själv hade tillstånd att få arbeta med SARS-CoV-2 samt hade tillgång till egna prover. Två myndighetslabb anmälde sig till övningen. 45 prover samt kontroller extraherades med myndighetens befintliga extraktionsmetod (robot) samt med den alternativa Quick Extraction-metoden. Varje prov analyserades i duplikat med myndighetens egna uppsatta Realtids-PCR för identifiering av SARS-CoV-2. Viktigt att notera är att de 45 proverna är unika för varje labb och därmed inte jämförbara.

### 8.2 RESULTAT OCH DISKUSSION

Resultaten från övningen visar på att den alternativa metoden fungerar bra på prover med högre viruskoncentrationer och ett Ct-värde under 30 (värden utifrån extraktionsrobot), se tabell 6. När det kommer till prover med lägre viruskoncentrationer är den alternativa metoden mindre känslig. Man kan också se att det skiljer sig mellan de två myndighetslabben. Myndighet 1 kan detektera fler prover med Ct-värden mellan 30-40 vilket skulle kunna ha sin förklaring i att labben använder olika protokoll för Realtids-PCR, har olika instrument eller olika mängder hämmare i proven. Utifrån resultat kan man ta slutsatsen att Quick Extraction-metoden är stabil för prover med ett Ct-värde under 33 men att vid lägre virusnivåer är den mindre känslig än de automatiserade robotextraktionerna.

*Tabell 6. Jämförelse mellan robotextraktion och Quick Extraction. Siffrorna visar på antal positivt identifierade prover utav totalantal. Siffror inom parentes visar att det ena av det duplicerade provet har identifierats.*

Myndighet	Ct < 30 (robot)		Ct 30-35 (robot)		Ct 35-40 (robot)	
	Extraktions-robot	Quick Extraction	Extraktions-robot	Quick Extraction	Extraktions-robot	Quick Extraction
1	29/29	29/29	13/13	13/13	3/3	(2)/3
2	19/19	19/19	16/16	7(10)/16	7(9)/10	1(3)/10

## 9 SLUTSATSER

### 9.1 SAMMANFATTNING AV RESULTAT

Utifrån behovsanalysen som genomfördes i delmål 1 identifierades kritiska analysmoment och en projektplan togs fram som låg till grund för fortsatt arbete. Under delmål 2 utvärderades alternativa extraktionsmetoder både för SARS-CoV-2, för att stötta i arbetet under pandemin med covid-19, men även övergripande för biologiska riskklass 3-agens, utifrån den ursprungliga projektplanen. Studien visade att extraktionsmetoden Quick Extraction gav goda resultat både för SARS-CoV-2 och *F. tularensis*, men att även andra metoder fungerade väl såsom värmedenaturering på vattenprover. I delmål 2 ingick också ett moment att utvärdera möjligheten till återbruk av spinnkolonner. Här visade resultaten att tvättmetoden inte lämnar några detekterbara spår av tidigare extraktion samt att DNA-utbytet med en tvättad och rekonditionerad kolonn är helt likvärdigt med en ny. I delmål 3 inhämtades kunskap kring odling och typning genom en myndighetsgemensam workshop. Resultatet från workshopen pekar på vikten av utbildning och övningar inom klassisk bakteriologi i syfte att artbestämma med hjälp av odling och enklare typning. Vidare, under delmål 4 undersöktes myndigheternas möjlighet till att utföra konventionell PCR och en utvärdering av befintliga primers genomfördes. Resultaten från primeranalysen har skickats i separata rapporter till respektive myndighet. I delmål 5 utvärderades tre system för fältmässig indikatoranalys av dricksvatten. Här visade sig alla tre systemen vara likvärdiga med avseende på kvalitet och känslighet men Aquagenx bedömdes vara mer användarvänliga utifrån ett fältmässigt perspektiv. Till sist, delmål 6 utgjordes av en övning av Quick Extraction-metoden för SARS-CoV-2. Två myndigheter deltog i övningen och resultaten visade att metoden fungerar bra på prover med högre viruskoncentrationer.

### 9.2 FRAMÅTBlickande

Pandemin i covid-19 har visat på hur viktigt arbetet med att utveckla/ utvärdera alternativa analysmetoder oberoende av kommersiella reagenser är för att stärka samhällets beredskapsdiagnostik. Detta projekt har identifierat områden där det finns behov av fortsatt arbete för att stärka analysförmågan i händelse av kris. Både extraktion och PCR är metoder som är generella och återkommande steg i många analyser och därmed av största vikt att upprätthålla. Likaså kan odling och enklare typning i brist på mer avancerad diagnostik bidra till att vidmakthålla verksamheten. Genom att identifiera kritiska moment, utvärdera/utveckla alternativa metoder för dessa samt öka redundansen genom utbildning av personal kan vi öka samhällets förmåga att upprätthålla en fungerande beredskapsdiagnostik även under störda förhållande.

### **9.3 PROJEKTRESULTAT I FÖRHÅLLANDE TILL PROJEKTETS URSPRUNGLIGA MÅL**

Samtliga sex delmål anses vara uppfyllda. Det trots de utmaningar som pandemin inneburit. Utöver de initiala målen inkluderades även utvärdering av extraktionsmetod för SARS-CoV-2 och utvärdering av primers.

### **9.4 SAMVERKANSVINSTER**

Möjligheten att få diskutera frågeställningar rörande analyser och reagenser ur ett beredskapsperspektiv i ett större sammanhang där fler aktörer ingår har ökat värdet i projektet. Både workshops, inventeringar och övning har bidragit till att fler medarbetare på respektive myndighet har varit delaktiga i underlaget till projektgruppens arbete.

## 10 BILAGOR

### 10.1 BILAGA 1 – DISKUSSIONSUNDERLAG TILL MYNDIGHETER

Underlag för behovsanalys

2019-05-15  
FBD-projekt 26

**Behovsanalys med avseende på kritiska analyser och/eller kritiska generiska moment som ingår i de viktigaste analyserna.**

Mikrobiologisk/molekylärbiologisk diagnostik är beroende av avancerad analysutrustning och reagenser som i många fall endast kan erhållas från en, eller ett fåtal, leverantörer, ofta belägna utanför Sveriges gränser. Detta gör analyserna sårbara för samhällsstörningar vilka innebär avbrott eller fördröjning av leveranser till, eller inom, Sverige.

I FBD-projekt 26, *”Säkrande av kritiska mikrobiologisk/molekylärbiologisk diagnostik förmåga och reagensförsörjning under störda förhållanden, höjd beredskap och krig”*, ingår att de civila myndigheterna tillsammans med FM och Polismyndigheten definierar vilka kritiska analyser som måste kunna utföras även under störda förhållanden, höjd beredskap och krig.

För dessa analyser identifieras sedan nuvarande förmåga och sårbarheter, så som nödvändiga reagenser och instrumentering. Åtgärder för att stå emot sådana sårbarheter tas fram och prioriteras. Åtgärder kan till exempel vara: framtagande av leverantörsberoende metoder, strategier för lagerhållning eller uppbyggnad av förmåga att tillreda kritiska material vid myndigheternas laboratorier.

- Som en del i arbetet ska varje myndighet gå igenom, identifiera och sammanställa just deras behov samt fundera kring ev. åtgärder.
- Den 28 augusti kommer berörda myndigheter att bjudas in till en gemensam workshop på SVA i Uppsala för att gemensamt diskutera och resonera kring frågan.
- Resultatet av behovsanalysen kommer att ligga till grund för fortsatt arbete inom projektet.

**Att tänka på inför behovsanalysen på respektive myndighet:**

- Inga resultat ska kommuniceras via e-post utan varje myndighet beslutar vilken information som ska tas med till workshopen.
- Vilka ska delta vid mötet för att få en helhetsbild?
- Tänk på säkerheten kring de frågor som ska diskuteras. Behövs det vidtas några åtgärder t.ex. inga telefoner på mötet? Följ myndighetens rutiner. (Vid workshopen kommer det att vara krav på att alla deltagare är säkerhetsklassade.)
- Hur ska resultatet dokumenteras och förvaras? Detta är upp till varje enskild myndighet att besluta.
- Mer information kring workshop och upplägg kommer i juni.

### Diskussionsunderlag inför arbete på respektive myndighet

1. Vilka agens och/eller matriser behöver er myndighet upprätthålla analyser för vid störda förhållanden eller höjd beredskap?  
Svara på de av punkterna a-g nedan som är relevant för er myndighet.
  - a. Vatten (dricksvatten, råvatten, badvatten etc.)
  - b. Livsmedel
  - c. Humanprover
  - d. Djurprover
  - e. Foderprover
  - f. Miljöprover
  - g. Annat relevant
2. Är det någon/några analys(er)/delmoment i analys(er), t.ex. DNA extraktion som är kritisk för att upprätthålla förmågan?
3. Under vilka förhållanden/förutsättningar ska dessa analyser upprätthållas?
4. Finns det idag några specifika reagenser, kit och instrument som är kritiska för verksamheten?
5. Vilka åtgärder behövs om det t.ex. blir svårt med elförsörjning och MALDI-TOF eller PCR inte fungerar eller om transporter av kit/reagenser uteblir? Finns det alternativa metoder t.ex. odling uppsatta vid myndigheten? Kan reagenser förvaras i rumstemperatur?
6. Vad finns det för resurser vid myndigheten idag med avseende på lagerhållning av reagenser, substratavdelning etc.? Finns det in-house eller beställs det från ett annat labb/företag?

## 10.2 BILAGA 2 – INBJUDAN TILL WORKSHOP 2019

FÖRSVARSMAKTEN  
FÖRSVARSMEDICINCENTRUM



FÖRSVARSMAKTEN  
TOTALFÖRSVARETS  
SKYDDSCENTRUM

### Inbjudan

#### Möjligheter för mikrobiologisk och molekylärbiologisk diagnostisk förmåga under störda förhållanden

Välkommen att delta i en workshop i Uppsala som arrangeras inom Forum för beredskapsdiagnostik (FBD) projekt 26.

**Målet med denna workshop är att:** Identifiera delmoment i analyskedjan som måste kunna utföras under störda förhållanden.

**Säkerhet/Sekretess:** Samtliga deltagare skall vara säkerhetsklassade. Deltagare som inte är svensk medborgare måste höra av sig snarast till XXX. Vi lägger ifrån oss teknisk utrustning som datorer och telefoner i brusbox under workshopen.

**Förberedelser:** Alla går igenom den behovsanalys som utförts på respektive myndighet, avseende kritiska analyser och generiska moment i analyskedjan.

**När:** 28:e augusti 2019.

**Var:** Statens Veterinärmedicinska Anstalt, Uppsala.

**Hur:** Registrering i SVA reception 08:00-08:30, Sluttid 16:00.

**Resa:** Arrangeras av respektive myndighet.

**Boende:** Arrangeras av respektive myndighet.

**Lunch:** Vi bjuder på lunch.

Anmäl deltagande senast fredag 16 augusti med namn till XXX. Vid anmälan, meddela också om du vill äta eventuell specialkost. Ta med ID-handling att visa vid inpassage.

Varmt välkomna!

## 10.3 BILAGA 3 – AGENDA TILL WORKSHOP 2019

# Agenda



### Möjligheter för mikrobiologisk och molekylärbiologisk diagnostisk förmåga under störda förhållanden

Agenda workshop för projekt 26 inom Forum för beredskapsdiagnostik (FBD).

**Allt arbete under WS sker utan elektroniska hjälpmedel och kommunikationsmedel.**

**Onsdag 28/8**

**08.00 – 08.25:** Registrering för deltagare i receptionen

**08.30 – 09.15:** Välkomnande samt presentation av FBD och representerade myndigheter. Kort namnrunda för deltagarna och indelning i tre grupper därefter byte av lokal.

**09.15 – 11.15:** Gruppdiskussion kring det frågematerial som delats ut.

**11.15 – 12.15:** Lunch

**12.15 – 13.45:** Gemensam diskussion

**13.45 – 14.15:** Go`fika!!

**14.15 – 15.15** Gästföreläsare: Erik Salaneck, föreläser i sin roll som infektionsläkare på Uppsala Universitetssjukhus, om behov och rutiner vid misstänkt smitta eller utbrott.

**15.15 – 15.30:** Avslutning och summering

Varmt välkomna!

## 10.4 BILAGA 4 – EXTRAKTIONSMETODER

### Värmeinaktivering

- Inkubera provet i 5 min på värmeblock i 70°C/95°C.

### Proteinase K

Proteinase K 25 µg/µl

- Tillsätt 5µl Proteinase K till 100 µl prov.
- Inkubera i 56°C i 30 min.
- Inkubera i 70°C i 5 min.

### TRIzol

- Tillsätt 300 µl TRIzol LS och 100 µl kloroform till 100 µl prov.
- Vortexa.
- Låt stå 10 min.
- Centrifugera i 16000 x g i 20 min i 4°C.
- Ta vara på H<sub>2</sub>O-fasen.

### GIT (Guanidine IsoThiocyanate)

Extraktionslösning: 5,5 M guanidine isothiocyanate, 25 mM sodium citrate, 25 mM sodium lauryl-sarcosine

- Tillsätt 1 µl extraktionslösning till 100 µl prov.
- Vortexa.
- Låt stå i rumstemperatur i 30 min.
- Centrifugera i 8000 x g 4°C i 10 min.
- Spara supernatanten.

### SNAP

Blanda följande reagenser (SNAP):

- 36 µl EDTA
- 1,25 µl SDS
- 10 µl 2-mercaptoethanol
- 955 µl formamid
- Centrifugera 1 ml prov i 16000 x g i 30 s.
- Sug av och kasta supernatanten.
- Tillsätt 100 µl SNAP-lösning och mixa.
- Låt stå i rumstemperatur i 1 min.
- Centrifugera i 16000 x g i 5 min i rumstemperatur.
- För över supernatanten till ett nytt rör.

### Quick Extraction

- Tillsätt 20 µl Quick Extract DNA solution till 20 µl prov.
- Inkubera 5 min på värmeblock i 95°C.



## 10.5 BILAGA 5 – PROTOKOLL FÖR UTVÄRDERING AV ALTERNATIVA DNA-EXTRAKTIONSMETODER

### Material

- *Bacillus cereus*, (F2085)
- *Francisella tularensis* LVS (FSC458)
- PBS + 0,02 % tween att slamma *B. cereus* i
- NaCl (fys) att slamma LVS i
- Spädningsrör, eppendorf för att späda slamning till rätt CFU
- Plattor för VC. (*Francisella* BHI-plattor (T5) eller Mcleod och blodagar för *B. cereus*).
- Matriser enligt lista nedan
- Glaskulor
- Virioner till extraktionsrören.
- Rör (50 mL Falcon)
- 0,22 µm filter
- OD-mätare WPA CO8000 och optiska rör
- PCR-reagenser
- Qubit för mätning av kvalitet och mängd av extraktion
- Kamera/telefon för att fota till rapport
- Reagenser till de olika extraktionsmetoderna (se separat protokoll)

## Dag 0

Stryk upp *Bacillus cereus* och *Francisella tularensis* LVS.

## Dag 1 (Spika matriser)

I säkerhetsbänk, för att undvika kontaminering:

Slamma bakterierna till OD = 1. *B. cereus* i PBS + 0,02 % tween och LVS i NaCl (fys).

**Francisella** LVS OD = 1, motsvarar  $6 \times 10^9$  CFU/mL. Späd:

- I. 167  $\mu$ L av  $6 \times 10^9$  + 833  $\mu$ L NaCl  $\rightarrow 1 \times 10^9$
- II. 100  $\mu$ L av  $1 \times 10^9$  + 900  $\mu$ L NaCl  $\rightarrow 1 \times 10^8$  CFU/mL
- III. 100  $\mu$ L av  $1 \times 10^8$  + 900  $\mu$ L NaCl  $\rightarrow 1 \times 10^7$  CFU/mL
- IV. 100  $\mu$ L av  $1 \times 10^7$  + 900  $\mu$ L NaCl  $\rightarrow 1 \times 10^6$  CFU/mL Denna används till spikning
- V. 100  $\mu$ L av  $1 \times 10^6$  + 900  $\mu$ L NaCl  $\rightarrow 1 \times 10^5$  CFU/mL
- VI. 100  $\mu$ L av  $1 \times 10^5$  + 900  $\mu$ L NaCl  $\rightarrow 1 \times 10^4$  CFU/mL
- VII. 100  $\mu$ L av  $1 \times 10^4$  + 900  $\mu$ L NaCl  $\rightarrow 1 \times 10^3$  CFU/mL Dessa 3 späd. används till VC
- VIII. 100  $\mu$ L av  $1 \times 10^3$  + 900  $\mu$ L NaCl  $\rightarrow 1 \times 10^2$  CFU/mL

**Gör VC:** platta 3  $\times$  100  $\mu$ L, av  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$  och  $1 \times 10^4$ . (9 plattor Francisella-BHI/McLeod, odla i klocka med påse för CO<sup>2</sup> eller bara i påse i 37 grader 1-7 dagar)

**B. cereus** OD =1 motsvarar  $1,26 \times 10^8$  CFU/mL Späd:

- I. 793  $\mu$ L av  $1,26 \times 10^8$  + 207  $\mu$ L PBS + tween  $\rightarrow 1 \times 10^8$  CFU/mL
- II. 100  $\mu$ L av  $1 \times 10^8$  + 900  $\mu$ L PBS + tween  $\rightarrow 1 \times 10^7$  CFU/mL
- III. 100  $\mu$ L av  $1 \times 10^7$  + 900  $\mu$ L PBS + tween  $\rightarrow 1 \times 10^6$  CFU/mL Denna används till spikning
- IV. 100  $\mu$ L av  $1 \times 10^6$  + 900  $\mu$ L PBS + tween  $\rightarrow 1 \times 10^5$  CFU/mL
- V. 100  $\mu$ L av  $1 \times 10^5$  + 900  $\mu$ L PBS + tween  $\rightarrow 1 \times 10^4$  CFU/mL
- VI. 100  $\mu$ L av  $1 \times 10^4$  + 900  $\mu$ L PBS + tween  $\rightarrow 1 \times 10^3$  CFU/mL Dessa 3 späd. används till VC
- VII. 100  $\mu$ L av  $1 \times 10^3$  + 900  $\mu$ L PBS + tween  $\rightarrow 1 \times 10^2$  CFU/mL

**Gör VC:** platta 3  $\times$  100  $\mu$ L, av  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$  och  $1 \times 10^4$ . (9 plattor Blodagar odla över natt 37 grader)

1. Väg upp 2 g matris av de fasta provtyperna (detta protokoll utan anrikning) i 50 mL falconrör med 10 glaskulor, tillsätt 18 mL BHI, vortexa/skaka 2 min.
2. Låt stå minst 2 min
3. Tag direkt från matrISRÖREN för ospikade prover.  
Tag av 5 mL till ett 15 mL rör som tas in i säkerhetsbänk – detta ska spikas: tillsätt 50  $\mu$ L av LVS  $1 \times 10^6$  CFU/mL resp. 50  $\mu$ L av *B. cereus*  $1 \times 10^6$  CFU/mL så att slutkoncentrationen blir  $10^4$  cfu/mL för båda dessa agens. Blanda genom att vortexa ordentligt och låt stå minst 2 min innan röret öppnas.

- 
1. För fasta provtyper med anrikning Väg upp 2 g matris av de i 50 mL falconrör med 10 glaskulor, tillsätt 18 mL BHI, vortexa/skaka 2 min.
  2. Anrika i 37 °C över natt (18-24 h).
  3. Fortsätt dag 2: Skaka 2 min låt stå minst 2 min.
  4. Tag direkt från matrISRÖREN för ospikade prover.  
Tag av 5 mL till ett 15 mL rör som tas in i säkerhetsbänk – detta ska spikas: tillsätt 50  $\mu$ L av LVS  $1 \times 10^6$  CFU/mL resp. 50  $\mu$ L av *B. cereus*  $1 \times 10^6$  CFU/mL så att slutkoncentrationen blir

10<sup>4</sup> cfu/mL för båda dessa agens. Blanda genom att vortexa ordentligt och låt stå minst 2 min innan röret öppnas.

---

1. Pytsa upp 5 mL av respektive **flytande provtyp** i 15 mL rör för spikning och 5 mL i 15 mL rör för ospikad matris. Rör som ska spikas tas in i säkerhetsbänk för att undvika korskontaminering och ospikade prover tas från rör ute på vanlig bänk.
  2. Tillsätt 50 µL av LVS 1 × 10<sup>6</sup> CFU/mL resp. 50 µL av B. cereus 1 × 10<sup>6</sup> CFU/mL så att slutkoncentrationen blir 10<sup>4</sup> cfu/mL för båda dessa agens. Blanda genom att vortexa ordentligt och låt stå minst 2 min innan röret öppnas.
  3. Tag direkt från matrörerna för ospikade prover.
- 

### Värmedenaturering av provet

- a. Sätt 195 µL till rör med 5 µL virioner:
  - i. Ospikat prov: ett rör för varje extraktionsmetod
  - ii. Spikat prov: två rör för varje extraktionsmetod
- b. 95 °C i 10 minuter (värmeblock)

### Direktlysering med chelex

- a. Sätt 195 µL till rör med 5 µL virioner:
  - i. Ospikat prov: ett rör för varje extraktionsmetod
  - ii. Spikat prov: två rör för varje extraktionsmetod
- b. Bered en lyseringsbuffert enligt instruktion.
- c. Tillsätt 200 µl lyseringsbuffert till materialet i ett mikrofugrör, lyseringsbufferten ska täcka materialet. Flaskan med lyseringsbuffert skall stå på omrörning vid upptag.
- d. Vortexa.
- e. Låt stå vid rumstemperatur i 30 minuter vortexa tre gånger under tiden.
- f. Inkubera vid 56 °C i 60 minuter (värmeblock).
- g. Vortexa.
- h. Inkubera vid ca 100 °C i 30 minuter (värmeblock).
- i. Förvara extraktet i kyl för fortsatt analys. Extraktet långtidsförvaras i frys alt. lågtemperaturfrys. Om extraktet ska användas igen, vortexas det och centrifugeras, ca 11 000 x g (RCF), max 1 minut.



### Quick Extraction DNA solution


- a) 20 µl prov och 20 µl QuickExtract DNA solution i ett epprör.
- b) Koka i 95°C i (5 min) 10 min (värmeblock)

### Positiv extraktionskontroll


Extrahera med EZ1 eller annat instrument som används vid labbet.

## 10.6 BILAGA 6 – INBJUDAN TILL WORKSHOP – 2021

# Inbjudan



Välkommen att delta i en digital workshop som arrangeras inom Forum för beredskapsdiagnostik (FBD) projekt 26

**När:** 25 mars 2021 kl 9-12  
**Var:** Digitalt (teams)

**Workshopen är för dig som arbetar med:**

- Substrattillverkning (1-2 personer per myndighet)
- Klassiska bakteriologiska odlingsmetoder och typning av bakterier (1-2 personer per myndighet)

**Anmälan:** Skicka en lista per myndighet med namn och e-mailadress till de som är utsedda att vara med till XXX senast 18 mars

**Bakgrund:**

Projekt 26 titel: Säkrande av kritisk mikrobiologisk/molekylärbiologisk diagnostikförmåga och reagensförsörjning under störda förhållanden, höjd beredskap och krig

Projektmål: Identifiera kritiska mikrobiologiska/molekylärbiologiska moment som måste fungera även under störda förhållanden och höjd beredskap, klargöra strategier för att upprätthålla dessa analyser samt identifiera behov av att utveckla alternativa metoder. I första hand avses metodik på generell nivå (genetiska, immunologiska, biokemiska/odling och morfologiska metoder) som ska kunna appliceras både på stationärt laboratorium och/eller i fält.

Litteraturstudie och annan informationsinhämtning kring odling och typning av bakterier. Odling av bakterier är en metod som inte kräver tillgång till kommersiella kit. Typning sker idag ofta med Maldi-Tof, som är en snabb och enkel metod. Typningsmomentet är helt beroende av detta automatiserade instrument. Agarplattor behövs för att odla/isolera bakterier. Enklare typningar som t.ex. biokemiska typningar och mikroskopering/gramfärgning kan vara fördelaktiga vid störda förhållanden både för att utesluta och säkerställa förekomst av patogena bakterier.

Odling av bakterier: Litteraturstudie där projektgruppen ser över substrat som är mer generella och kan användas brett. Behovsanalys av vad substratavdelningarna bör ha på lager görs. Översikt av vilka myndigheter som har substratavdelningar där substrat kan tillredas och hur dessa kan samverka behövs också.

Typning av bakterier: Som en del i projektarbetet ska projektgruppen se över alternativa metoder till typning med Maldi-Tof eller PCR. Studien kommer att fokusera patogener klassade för BSL3 samt ett fåtal för BSL2 såsom *Escherichia coli* (patogena subspecies) och *Salmonella*.

**Syfte med workshopen:** Ge projektgruppen inspel från de olika myndigheterna med kunskap runt tillverkning/ lagerhållning av substrat och kunskap runt klassisk bakteriologi. Detta är ännu mer aktuellt just nu då det är brist på laboratoriemateriel och reagenser.

**Dagordning:**

1. Introduktion till projektet
2. Diskussion substrat, vad bör vi ha i lager?
  - a. Primärodling
  - b. Selektiva medier/agar
  - c. Typning/artbestämning (minimikriterier)
  - d. Till vilken nivå ska vi typa?
3. Hur kan man överföra kompetens för klassisk bakteriologi (typning) till nya medarbetare när nya metoder och maskiner tar över
4. Övrigt

**Förberedelser (fundera på innan):**

- Substrat: Vilka generella agarsorter finns alltid på lager?
- Bakteriologi: Vilken grundkompetens/vilka moment (gramfärgning etc.) behövs för klassisk bakteriologi?

Varmt välkomna!



## 10.7 BILAGA 7 – INVENTERING AV MÖJLIGHET TILL ANALYS MED KONVENTIONELL PCR



### Inventering

#### Möjlighet till att analysera med konventionell PCR och/eller producera egna primers/prober

##### **Inventering för projekt 26 inom Forum för beredskapsdiagnostik (FBD).**

**Svar åter till XXX alternativt lägg upp svaren på FBDs wiki-sida senast den 16 april.**

1. Vi har tillgång till PCR-apparater för analys med konventionell PCR.  
(ja) (nej)
2. Vi har tillgång till utrustning för att gjuta våra egna agarosgeler.  
(ja) (nej) (nej, vi köper färdiga geler)
3. Vi har kompetens för att gjuta våra egna agarosgeler.  
(ja) (nej)
4. Vi har utrustning för att köra gelelektrofores.  
(ja) (nej)
5. Vi har utrustning för att kunna utvärdera geler.  
(ja) (nej)
6. Vi har mer avancerad utrustning (kit-beroende) för att kunna analysera PCR-produkter såsom Bioanalyser, Fragment analyser etc.  
(ja) (nej)
7. Vi har kompetens för analys och utvärdering med konventionell PCR.  
(ja) (nej)
8. Vi har utrustning för att tillverka egna primers.  
(ja) (nej)
9. Vi har kompetens för att tillverka egna primers.  
(ja) (nej)
10. Vi har utrustning för att tillverka egna prober.  
(ja) (nej)
11. Vi har kompetens för att tillverka egna prober.  
(ja) (nej)

**Stort tack / Projektgrupp 26**

## 10.8 BILAGA 8 – INBJUDAN TILL ÖVNING



### Övning

#### Alternativ snabbmetod för extraktion av SARS-CoV-2

**Övning i samarbete med projekt 26 inom Forum för beredskapsdiagnostik.**

Deltagande myndigheter utför övningen på respektive labb.

Anmäl deltagande till XXX senast 31 maj.

**Krav:** Tillgång till samt tillstånd för att arbeta med covid19-prover (tillhandahålls ej av projektet).

**Mål:** Jämförelse av QuickExtraction-metoden med befintliga extraktionsmetoder t.ex. EZ1 eller QIA-symphony.

**Metod QuickExtraction:**

- 20 µl prov och 20 µl QuickExtract DNA solution i ett epprör (safe lock).
- Koka i 95°C i 5 min (värmeblock).
- Tillsätt 5 µl prov till 15 µl PCR-mix  
(Det går bra att använda den PCR-metod som ni standardmässigt använder vid myndigheten för denna sorts prover. Under utvärderingen användes Luna Universal Probe One-Step RT qPCR kit)

**Inköp reagens:** DNA extraction solution 1.0 från Lucigen, Cat# QE09050 (50 ml, kostnad ca 4300 SEK) samt reagens till befintlig extraktionsmetod och PCR-reaktion.

**Antal prover (önskvärt):** 45 st prov i duplikat (gärna prov med olika virus-koncentrationer så att både låga och höga koncentrationer testas) samt kontroller (3 st positiva och 3 st negativa)

**Tid:** Resultat sammanställs (protokoll till befintlig metod, ct-värde, kurvor och kommentarer, observera att proverna ska vara anonymiserade - inga prov-ID) och rapporteras till XXX alternativt lägg upp svaren på FBDs wiki-sida senast den **30 augusti**.

**Stort tack / Projektgrupp 26**

## 11 REFERENSER

1. Ladha *et al.*, A 5-min RNA preparation method for COVID-19 detection with RT-qPCR. medRxiv preprint, doi: 10.1101/2020.05.07.20055947 (2020).
2. Siddappa *et al.*, Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. *BioTechniques* 42, 186-192, doi: 10.2144/000112327 (2007).
3. Referensmetodik för laboratoriediagnostik vid kliniska laboratorium  
[http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Referensmetodik\\_för\\_laboratoriediagnostik\\_vid\\_kliniskt\\_mikrobiologiska\\_laboratorier](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Referensmetodik_för_laboratoriediagnostik_vid_kliniskt_mikrobiologiska_laboratorier)
4. VetBact - Veterinärmedicinsk bakteriologi: information om betydelsefulla arter  
[www.vetbact.org](http://www.vetbact.org)



