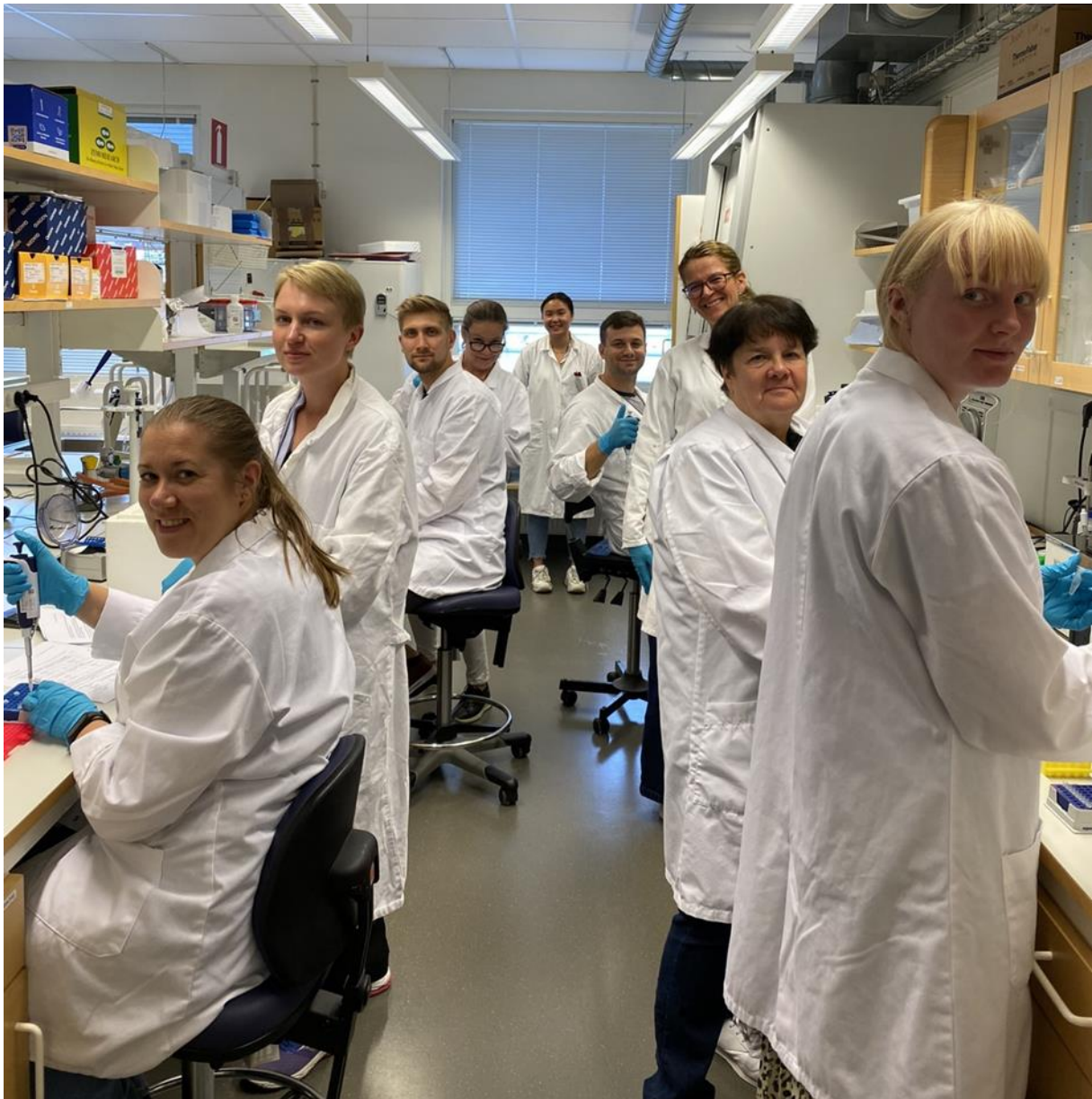


PROJEKTRAPPORT

Nya och alternativa provtagnings- och analysmetoder för
stärkt beredskap



Emelie Salomonsson • Linnea Blom • Christian Bolin • Stina Bäckman
Christina Forsberg • Mikhayil Hakhverdyan • Johannes Hedman • Linda Jansson
Lisa Lindahl • Tova Lindh • Eva Lundmark • John Pettersson • Erica Sellstedt
Margareta Wendel • 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). Sedan 2017 har Försvarsmakten och från 2019 har även Polismyndigheten deltagit i FBD-nätverkets gemensamma projekt. Syftet är 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:	Nya och alternativa provtagnings- och analysmetoder för stärkt beredskap
Projekttid:	1 april 2022 – 31 december 2024
Projektledare:	Emelie Salomonsson, Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI)
Projektgrupp:	Emelie Salomonsson (FOI), Linnea Blom, Livsmedelsverket, Christian Bolin, Försvarsmakten (FM), Stina Bäckman (FOI), Christina Forsberg, Nationellt forensiskt centrum (NFC), Mikhayil Hakhverdyan, Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA), Johannes Hedman (NFC/Lunds universitet (LU)), Linda Jansson (NFC/LU), Lisa Lindahl (LU), Tova Lindh (LU), Eva Lundmark (FOI), John Pettersson, Folkhälsomyndigheten (Fohm), Erica Sellstedt (SVA), Margareta Wendel (FM) och Paula Ågren, Livsmedelsverket
Resurspersoner:	Sofie Bergstrand (NFC/LU), Emilie Boson (LU), Elin Lundkvist (NFC), Milena Mirow (LU), Niam Nihlsson (LU)
Styrgrupp (under hela eller delar av projekttiden):	Andreas Bråve och Johan Aarum, Fohm. Mats Forsman och Johanna Thelaus, FOI. Moa Lavander och Maria Sitell, Livsmedelsverket. Henrik Ericsson och Rickard Knutsson, SVA. Cecilia Vahlberg, NFC. Niklas Edner, Viveca Eriksson, Jenny Gyll och Henrik Mattsson, FM. Johannes Hedman, LU.
Finansiering:	Projektet har finansierats genom tilldelning av Regeringens anslag 2:4 Krisberedskap som fördelas av Myndigheten för samhällsskydd och beredskap (MSB)
Foto framsida	Johannes Hedman



FÖRKORTNINGAR/ORDLISTA

Agarosgel	En gelémassa som gör att molekyler av olika storlekar vid gelelektrofores passerar med olika hastighet
Agens	Verksam eller utlösande faktor, används inom medicin i betydelsen t.ex. en sjukdomsframkallande mikroorganism
Alikvot	Del av totalvolym eller liknande
Assay	Analysmetod
B-händelse	Används som uttryck för en händelse, naturlig eller avsiktlig, med mikroorganismer och då oftast med avseende på sjukdomsframkallande mikroorganismer
BSL3	Biosafety level 3, skyddsnivå 3. Används för att beteckna säkerhetslaboratorium
CBRN	Kemiska, biologiska, radiologiska och nukleära ämnen
CFU	Colony forming units. Enhet som används vid kvantifiering av växande mikroorganismer
Ct	Cycle threshold (cykeltröskelvärde), samma sak som Cq
Cq	Quantification cycle, samma sak som Ct
DNA	Deoxyribonucleic acid
dsDNA	double strand DNA /dubbelsträngat DNA
Elektroferogram	Diagram över storlekar på DNA-fragment för att skapa en DNA-profil.
Eluering	Lösa ut ett ämne som har bundits till t.ex. en kolonn.
Eukaryot	Organism med definierad cellkärna
Exklusivitet	Att en metod inte ger positiv signal för de agens som inte ska påvisas i metoden
Exonukleasaktivitet	förmågan hos vissa enzymer att klippa bort nukleotider från ändarna på en DNA- eller RNA-sträng
Extraktion	Framrening av DNA
Gelelektrofores	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
Gramfärgning	Färgningsteknik för att skilja på grupper av bakterier

Hemolys	Lysering av röda blodkroppar, t ex vid odling av bakterier på agarplatta.
hpPCR	Hyperplex PCR, RT-PCR-baserad analysteknik utvecklad av det svenska företaget Apex Bio
Inaktivering	Oftast synonym med avdödning. Mikroorganismer sägs vara inaktiverade när de varken kan tillväxa eller orsaka smitta
Inklusivitet	Att en metod ger positiv signal för de agens som ska påvisas av metoden
Katalas	Enzym hos vissa bakterier som bryter ner väteperoxid till syre och vatten. Kan användas laborativt för att klassificera bakterier. Positivt resultat ger gasbildning.
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight, en form av masspektrometri
Mastermix	Komponentblandning för PCR
Matris	Det material som ett prov består av och i vilket man försöker påvisa bakterieförekomst vid misstanke om smitta
Mikrofugrör	litet plaströr som används för att centrifugera mycket små prover vid höga hastigheter
NTC	No Template Control – medger detection av contamination i en PCR-reaktion
Odlingsmedium	Näringsämne som används för att odla mikroorganismer. Finns i fast och flytande form
Oxidastest	Test för identifiering av gramnegativa bakterier. Påvisar närvaro av cytokrom C-oxidas genom färgomslag av reagenset.
Patogen	Sjukdomsframkallande
PCR	Polymerase Chain Reaction, en metod som används för att amplifiera kopior av en viss DNA-sekvens
Polymeras	Enzymer som katalyserar syntesen av DNA- eller RNA-polymerer vars sekvens är komplementär till den ursprungliga mallen
Primer	Små segment av kvävebaser, används inom PCR och fungerar som startpunkten för DNA-replikation
Probe	Fluorescensmärkta DNA-oligonukleotider
qPCR	Quantitative PCR, se realtids-PCR
Reagens	Ett ämne eller blandning av ämnen som åstadkommer en viss kemisk förändring



Realtids-PCR	PCR som mäts i realtid och där detektionen sker med hjälp av fluorescerande molekyler
RNA	Ribonucleic acid
Spika	Att tillsätta mikroorganismer till en provtyp, ofta med syftet att utvärdera en metods förmåga för att påvisa sagda mikroorganismer.
Spinnkolonn	Ett rör innehållande ett material för en kemisk separation genom centrifugering
Sporer	Överlevnadsfas hos vissa bakterier som kan klara av extrema förhållanden såsom värme, strålning och uttorkning
ssDNA	Single strand DNA / enkelsträngat DNA
Strandedness	Avser om DNA är enkel- eller dubbelsträngat
Supernatant	Vätska eller ett medium som ligger kvar över en pellet efter centrifugering och som består av lättare eller mindre material
Typning	Artbestämning
Virion	Den infekterande delen av ett virus
Värmedenaturering	Bakterien utsätts för hög värme där RNA/DNA och proteiner tappar sin funktion

INNEHÅLL

Sammanfattning	4
1 Bakgrund	6
2 Projekt mål och delmål	7
3 Provtagning.....	8
3.1 Alternativa tops och användning av insatsör i snabbprotokoll för DNA-extraktion	8
3.1.1 Utvärdering av insatsör i DNA-extraktions protokoll/procedur.....	9
3.1.2 Jämförelse mellan sju tops av olika material.....	10
3.2 Jämförelse mellan flockade nylontops och bomullstops med tio olika provtagare	11
3.3 Utvärdering av tre olika flockade nylontops	13
3.4 Sammanfattande slutsatser: provtagning.....	14
4 DNA/RNA-extraktion	15
4.1 Sammanställning av DNA/RNA-extraktionsmetoder	15
4.2 Utveckling och utvärdering av ett in-house DNA/RNA-extraktionsprotokoll.....	16
4.2.1 Utveckling av in house-protokollet TMB Magnetic.....	16
4.2.2 Jämförelse av olika typer av magnetkuler.....	21
4.2.3 Jämförelse av detektionsgräns mellan TMB Magnetic och NucliSens miniMAG.....	22
4.2.4 Utvärdering av olika provvolym för RNA-extraktion.....	23
4.3 Utvärdering av DNA/RNA-extraktionsrobot med protokollen NucliSens miniMAG och TMB magnetic	24
4.3.1 Anpassning av protokoll till robot GenePure Pro.....	24
4.3.2 Utbyte för automatiserad DNA/RNA-extraktion	27
4.3.3 Hämmartålighet	30
4.4 Utvärdering av DNA/RNA-utbyte för 22 olika extraktionsmetoder	32
4.4.1 <i>B. cereus</i>	35
4.4.2 <i>S. enterica</i>	37

4.4.3	<i>S. cerevisiae</i>	40
4.4.4	Mengovirus.....	43
4.5	Optimering och utvärdering av snabbprotokoll för DNA-extraktion.....	46
4.5.1	Chelex-baserad DNA-extraktion.....	46
4.5.2	Alkalin DNA-extraktion.....	47
4.5.3	Jämförelse mellan fyra snabbprotokoll	47
4.6	Kvalitetsbestämning av DNA efter extraktion	48
4.7	Sammanfattande slutsatser: DNA/RNA-extraktion	51
5	Rening och koncentration av DNA	53
5.1	Utvärdering av nya och alternativa metoder för rening och koncentration av DNA	53
5.1.1	Koncentration av DNA med tolv olika metoder	53
5.1.2	Utvärdering av DNA-bärare för användning i utfällning av DNA.....	56
5.1.3	Rening av extrakt innehållande hämmare med sju olika metoder.....	58
5.1.4	Användarvänlighet	59
5.2	Sammanfattande slutsatser: rening och koncentration av DNA.....	61
6	PCR-reagenser	62
6.1	Sammanställning av DNA-polymeraser och RT-enzym	62
6.2	Utreda hållbarhet på PCR-reagenser	62
6.2.1	Studieupplägg.....	62
6.2.2	Resultat.....	63
6.3	Tillverkning och utvärdering av DNA-polymeraser	64
6.4	Sammanfattande slutsatser: PCR-reagenser	70
7	PCR-baserade analysmetoder	71
7.1	Validering av PCR för <i>Vibrio</i> spp.....	71
7.2	Hyperplex-PCR för analys med bred frågeställning	72
7.2.1	Utveckling av panel för parallell detektion av patogena bakterier, eukaryoter och virus	

7.2.2	Utvärdering av hyperplex-PCR-panel för patogen-detektion.....	76
7.3	Sammanfattande slutsatser: PCR-baserade analysmetoder	79
8	Utbildning och träning.....	80
8.1	Odling och Typning.....	80
8.1.1	Studieupplägg.....	81
8.2	PCR-analys i krisberedskap.....	81
9	Slutsatser.....	84
9.1	Framåtblickande	84
9.2	Projektresultat i förhållande till projektets ursprungliga mål	84
9.3	Samverkansvinster.....	84
10	Bilagor	85
10.1	Bilaga 1 – Morfologi på plattor hos utvalda BSL3-agens	85
10.2	Bilaga 2 – Egenskaper hos utvalda BSL3-agens.....	89
10.3	Bilaga 3 – Gramfärgningsutbildning.....	92
10.4	Bilaga 4 – Recept färglösningar till samt utförande av gramfärgning.....	94
10.5	Bilaga 4 – Inbjudan till PCR-utbildning 2023.....	95
10.6	Bilaga 5 – Inbjudan till PCR-utbildning 2024.....	96
11	Referenser.....	97

SAMMANFATTNING

Denna rapport sammanfattar arbetet som bedrivits inom projektet *Nya och alternativa provtagnings- och analysmetoder för stärkt beredskap*.

Målet med projektet har att utifrån genomförd behovsanalys välja ut analysmoment som har identifierats som kritiska och som måste kunna upprätthållas vid kris och störda förhållanden. För prioriterade analyser och delmoment utveckla, utvärdera, öva och utbilda detta laborativt vilket resulterar i stärkt förmåga att vidmakthålla kritiska analyser. Arbetet omfattar både sammanställningar av tidigare studier och erfarenheter, utvärderingar av befintliga metoder, förbrukningsmaterial och reagens liksom utveckling av nya alternativa metoder. Fokus har legat på två olika moment i analyskedjan; provtagning och analys.

Bomullstops används framför allt i samband med mikrobiell provtagning på ytor och vid säkring av biologiska brottsplatsspår. Under delmål 1 utvärderades olika topsvarianter som ett alternativ till dagens bomullstops i händelse av leveransproblem. Studien visade på att flockade nylontops gav bäst DNA-utbyte och var mest användarvänliga. I delmål 2 har fokus legat på DNA/RNA-extraktion, ett moment som är gemensamt för många olika analyser och som därmed skulle kunna ge stora konsekvenser i händelse av utebliven tillgång på reagens. Som ett första steg sammanställdes olika extraktionsmetoder, både kommersiella och enkla leverantörsberoende in house-protokoll, med hänvisningar till rapporter, utvärderingar och erfarenheter. Därtill utvärderades 22 olika DNA/RNA-extraktionsmetoder med avseende på utbyte, andel dsDNA och fragmentering där både automatiserade kit-baserade metoder, ex. Malstroem 9600 och EZ1 DNA Tissue, och enkla in house-protokoll, ex. Guanidine thiocyanat och Proteinase K, presterade väl. Överlag gav klassisk organisk extraktion med phenol och chloroform högst utbyten. Eftersom denna metod endast kräver enklare reagens anses den vara ett gott alternativ att ta till vid leveransstörningar eller andra kriser. Som en del i arbetet utvecklades också ett in house-protokoll, TMB magnetic, som ett alternativ till det kommersiella extraktionskitet, NucliSens miniMAG, där TMB magnetic uppvisade lika bra detektionsgräns som det kommersiella kitet för extraktion av RNA-virus. TMB magnetic uppfyller också kraven i relevanta ISO-standarder för extraktion av RNA-virus. Vidare, i delmål 3, utvärderades 12 olika metoder för koncentrerings och rening av DNA och sju metoder för rening av extrakt innehållande hämmare. Utvärderingen som, förutom prestanda, även innefattar tidsåtgång och metodens komplexitet ska underlätta vid beslut om ersättning av befintlig metod.

Som nästa steg i arbetet, delmål 4, har PCR varit i fokus. PCR är grunden i nutida DNA/RNA-analys för detektion av patogena mikrober. Även här sammanställdes information och erfarenheter av olika DNA-polymeras och RT-enzym. Vidare undersöktes hållbarheten/stabiliteten på två olika mastermixar med avseende på förvaring i olika temperaturer (rumstemperatur, kyl och frys) och användning av dessa efter passerat utgångsdatum. Resultatet visar på att båda mastermixarna är stabila i alla förvaringstemperaturer och minst i åtta månader efter passerat utgångsdatum. Som en del i arbetet har även egentillverkning av DNA-polymeras testats och utvärderats med gott resultat. Detta för att kunna hantera en eventuell långvarig leveransstörning som skulle kunna påverka tillgången till DNA-polymeras och därmed hindra laboratoriernas arbete.

I samband med störda förhållanden som kan påverka till exempel el- eller materialförsörjning till laboratorier och som innebär att ordinarie mer avancerad metodik inte fungerar finns det fortfarande möjlighet att göra enklare odling och typning av bakterier. Under delmål 5 har medarbetare från flera myndigheter fått möjlighet att höja sin kunskap i odling och morfologi av BSL3-agens samt typning med gramfärgning genom att delta i en workshop på SVA som gick under våren 2024.

Realtids-PCR är en effektiv metod för att detektera och kvantifiera mikrober, men det kräver att man på förhand misstänker ett specifikt agens som analys kan inriktas mot. Hyperplex PCR (hpPCR) är en svensk uppfinning som tillhandahålls av företaget *Aplex Bio* och som möjliggör parallell detektion av upp till 100 olika DNA- eller RNA-fragment samtidigt. I delmål 6 har projektet tillsammans med *Aplex Bio* utvecklat och utvärderat en metod baserad på denna teknik med avseende på FBD-myndigheternas behov. I de initiala försöken uppvisar hpPCR-panelen lovande resultat men det finns ytterligare utvecklingsbehov.

Slutligen, för att ytterligare stärka beredskapsdiagnostiken vid de olika laboratorierna, anordnades en utbildning, *PCR-analys i krisberedskap*, vid Lunds universitet för att ge personal vid myndigheterna djupgående teoretisk och praktisk kunskap inom PCR-baserad DNA/RNA-analys med specifikt fokus på kvalitetssäkring och felsökning under störda förhållanden. Föreläsningar blandades med laborativa experiment, diskussioner samt en praktisk övning som gick ut på att identifiera okända agens med begränsade laborativa resurser.

1 BAKGRUND

Problematiken med försörjning av reagenser och material kopplat till diagnostik av smittämnen blev tydlig under covid-19-pandemin när brist på kemikalier och förbrukningsartiklar blev en verklighet. Mikrobiologisk/molekylärbiologisk diagnostik är i dag 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 som innebär avbrott eller fördröjning av leveranser till eller inom Sverige. För att förbättra beredskapen och förstärka uthålligheten i laboratorieförmågan behöver robustheten i hela analyskedjan förbättras och alternativ till gängse, och därtill kraftigt importberoende, metoder identifieras och utvärderas. Syftet med projektet är att laborativt utveckla och utvärdera prioriterade alternativa metoder och reagenser (även egenproduktion) som kan användas som alternativ vid allvarlig samhällsstörning som medför kraftig minskad tillgång till reagenser.

2 PROJEKTMÅL OCH DELMÅL

Utifrån tidigare genomförd behovsanalys i FBD-projekt 24, *Säkrande av kritisk mikrobiologisk diagnostikförmåga och reagensförsörjning under störda förhållanden och höjd beredskap*, välja ut alternativa metoder som kan säkerställa att kritiska analyser kan upprätthållas även under störda förhållanden. För utvalda metoder utveckla, utvärdera, öva och utbilda laborativt för stärkt förmåga att vidmakthålla kritiska analyser vid kris och störda förhållanden.

Delmål 1

Utvärdera topsvarianter som alternativ till dagens bomullstops, dels för att minska beroendet av enskilda leverantörer i händelse av störningar i tillverkning och leverans, men också för att underlätta provhanteringen.

Delmål 2

Sammanställa resultat och erfarenheter från tidigare utvärderingar samt laborativt utveckla och utvärdera nya och alternativa metoder (kommersiella och leverantörsberoende) för DNA- och RNA-extraktion.

Delmål 3

Utvärdera olika metoder för rening och koncentration av DNA och RNA med syfte att ha alternativa metoder att tillgå under störda förhållanden.

Delmål 4

Sammanställa resultat och erfarenheter från tidigare utvärderingar av olika polymeras. Undersöka hållbarheten på olika polymeras samt utveckla metodik för syntes och utvärdering av DNA-polymeras av olika varianter.

Delmål 5

Genomföra ett övningstillfälle i form av en workshop där deltagare får möjlighet att öva Gramfärgning och avläsning av odling på platta med BSL3-patogener. Genomföra två intensivutbildningar i PCR-analys med fokus mot nya och alternativa metoder.

Delmål 6

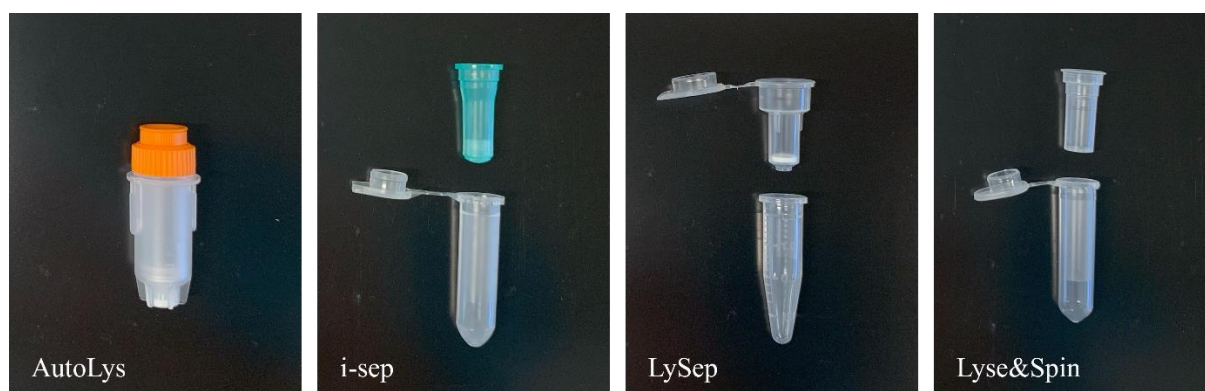
Verifiera och implementera IQ-Check Vibrio PCR Detection för detektion av *Vibrio* spp. Utveckla och utvärdera en metod för parallell detektion av flera relevanta agens med hyperplex-PCR, som tillhandahålls av företaget *Aplex Bio*.

3 PROVTAGNING

Mikrobiell provtagning på ytor och säkring av biologiska brottsplatsspår utförs ofta med olika typer av tops. Vanliga topsmaterial är bomull, skumgummi och flockad nylon. Vid leveransproblem och andra störningar som minskar tillgången till de tops som brukar användas finns behov av att snabbt kunna ställa om och använda andra typer av tops. Därför behöver tops av olika material och från olika tillverkare utvärderas med avseende på DNA-utbyte och användbarhet. Om ytorna inte innehåller orenheter kan det vara möjligt att extrahera DNA direkt från topsen med hjälp av rationella snabbprotokoll. Topsmaterialet kan då behöva tas bort innan analys för att inte störa pipettering som ibland utförs av robotar. Att inkludera insatsrör (Figur 1), små korgar som placeras i mikrofugrör, i snabbprotokoll är ett enkelt sätt att kunna ta ut och slänga topsmaterialet efter att DNA:t extraherats.

3.1 ALTERNATIVA TOPS OCH ANVÄNDNING AV INSATSÖR I SNABBPROTOKOLL FÖR DNA-EXTRAKTION

I denna studie utvärderades och jämfördes sju olika tops av olika material (Tabell 1) och fyra olika typer av insatsrör (AutoLys, *Hamilton Company*; Sampletype i-sep SQ-MB, *Biotype*; PrepFiler LySep Column, *Thermo Fisher Scientific*, Investigator Lyse&Spin Basket, *Qiagen*) med avseende på upptag och DNA-extraktion av humansaliv. Saliv innehåller två typer av kärnbärande celler (epitelceller och vita blodkroppar). Här används saliv som modell för biologiska spår på ytor och utfallen anses relevanta även för andra typer av celler. Såväl färsk saliv som saliv intorkat på plast- och glasytor som säkrats med tops ingick i studien. En viktig frågeställning var om användningen av insatsrör minskade DNA-utbytet jämfört med att utföra DNA-extraktion direkt i mikrofugröret.



Figur 1: Foton av de fyra insatsrör som utvärderades.

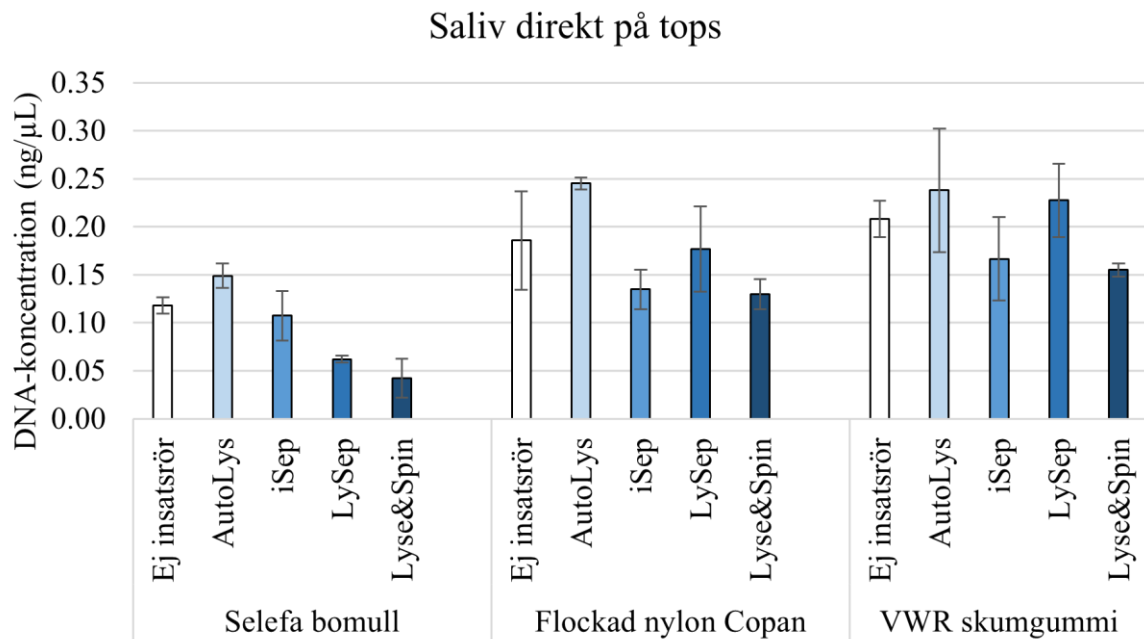
Beroende på material och fabrikat hos topsen användes olika volymer natriumklorid (NaCl) för att veta topsen innan provtagning (Tabell 1). Proven extraherades med en variant av NFC:s snabbprotokoll ChelexDirekt där 200 µL chelex-buffert samt 2 µL Proteinase K (10 mg/mL) tillsattes. Efter lysering centrifugerades rören enligt följande: prov utan insatsrör 11000 rcf, max 1 min; AutoLys 2000 rcf, 10 min; i-sep 13400 rcf, 1 min; LySep 11000 rcf, 1 min; Lyse&Spin 20000 rcf, 1 min. Därefter kunde insatsröret med topsen tas ut och kastas. Extrakten kvantifierades med qPCR (QuantStudio 5, *Thermo Fisher Scientific*).

Tabell 1. Beskrivning av samtliga topsvarianter som utvärderades samt vilka volymer NaCl som användes vid provtagning/spårsäkring.

Tops	Material	Volym NaCl för att veta topsen
Selefa Cotton Tipped Applicator (<i>OneMed</i>)	Bomull	60 µL
4N6FLOQ Swabs Genetics (<i>Copan</i>)	Flockad nylon, DNA-fri	20 µL (10 – 60 µL vid utvärdering av volym NaCl)
VWR Critical Swab medium foam head (<i>VWR</i>)	Skumgummi	Doppades, överflöd pressades bort mot rörets kant
HydraFlock 6" Sterile, 20 mm Breakpoint (<i>Puritan</i>)	Flockad nylon	20 µL
PurFlock Ultra 6" Sterile, 20 mm Breakpoint Ultra (<i>Puritan</i>)	Flockad nylon	20 µL
Pushoff technology swab (<i>afib diagnostics</i>)	Bomull, DNA-fri	60 µL
Pushoff technology swab (<i>afib diagnostics</i>)	Rayon, DNA-fri	60 µL
Dry swab (<i>Copan</i>)	Polyester	60 µL

3.1.1 Utvärdering av insatsör i DNA-extraktions protokoll/procedur

För alla tre topstyper (bomull, skumgummi och flockad nylon) gav användningen av insatsrör likvärdigt DNA-utbyte som DNA-extraktion utan insatsrör i de flesta av jämförelserna ($p > 0,05$) (Figur 2). Utbytet var överlag högre för flockad nylontops och skumgummitops jämfört med bomullstops ($p < 0,016$) (Figur 2). Användning av LySep gav PCR-hämning i kombination med bomullstops och flockad nylontops, vilket visade sig genom att Cq-värdena för den interna PCR-kontrollen var kraftigt förskjutna.

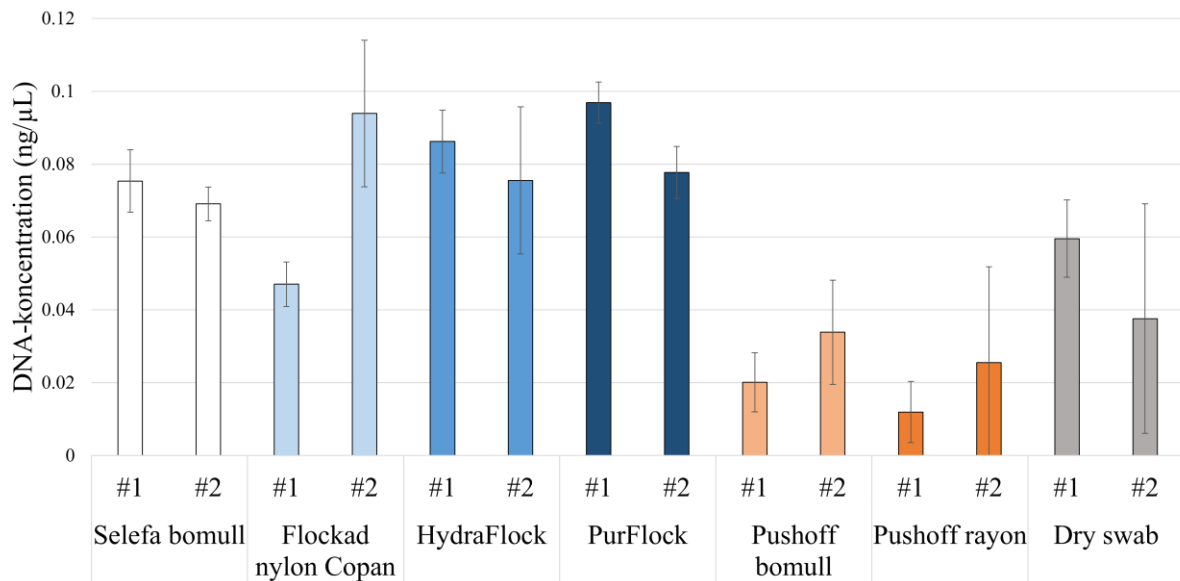


Figur 2. Medelvärde av DNA-koncentration för Selefa bomullstops, flockad nylontops (Copan) och VWR skumgummitops som extraherats med och utan olika typer av insatsrör. 5 μ L saliv pipetterades direkt till topsen. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.

Utvärderingen av insatsrörens användarvänlighet gav inga entydiga svar då samtliga varianter vad behäftade med utmaningar. AutoLys-röret är ämnat för robotextraktion och upplevdes som minst användarvänligt. Skruvkorken försvårar manuell hantering och storleken gör att det inte går att centrifugera röret i en bordscentrifug. i-sep-, LySep- och Lyse&Spin-rören var likvärdiga i utformning och användarvänlighet, men Lyse&Spin-rören behövde ibland centrifugeras ytterligare gånger under extraktionen för att extraktet skulle rinna igenom. Efter genomförd extraktion då insatsrören från i-sep och Lyse&Spin avlägsnats gled locken till provrören upp eftersom fästet mellan rör och lock töjts ut av insatsröret under värmeinkuberingen. Locken till i-sep-rören gled upp betydligt lättare än locken till Lyse&Spin-rören. Locket till LySep-rören satt fast i insatsröret som kastades, vilket innebar behov av en extra överföring av extraktet till ett nytt mikrofugrör.

3.1.2 Jämförelse mellan sju tops av olika material

Vid utvärdering av de sju topsvarianterna var det två olika personer som spårsäkrade fläckar. Dessa båda uppnådde överlag likvärdiga DNA-utbyten ($p>0,007$, Figur 3). Jämfört med bomullstoppen (Selefa) gav de två pushoff-topsen lägre DNA-utbyten ($p<0,007$). För 4N6FLOQ Swab Genetics utvärderades olika volymer NaCl för vätning innan spårsäkring, 10 till 60 μ L. Lägre volym gav något högre DNA-utbyte, men den enda signifikanta skillnaden noterades mellan 10 och 60 μ L ($p=0,017$).



Figur 3. Medelvärde av DNA-koncentration för sju topsvarianter då två operatörer (#1 och #2) säkrat 5 μ L saliv från 2x2 cm glasytor. Selefa bomullstopps användes som referens. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.

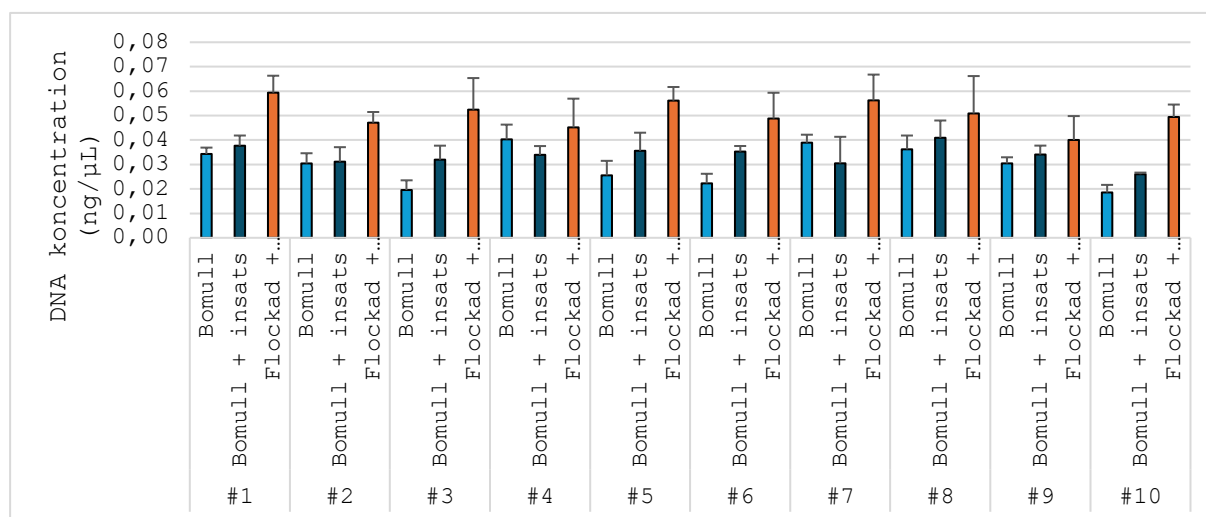
Topsvarianterna utvärderas också med avseende på användarvänlighet. De flockade nylontopsen kunde smidigt brytas av och ned i rör, vilket upplevdes som en stor fördel jämfört med bomullstoppen som behövde klippas med sax. Däremot var det svårt att veta den flockade nylontopsen från Copan (4N6FLOQ Swab Genetics) eftersom denna inte absorberade NaCl direkt, istället rann lösningen lätt av topsytan. De flockade topsen HydraFlock och PurFlock absorberade vätskan mycket snabbare än den från Copan, i synnerhet HydraFlock. De båda pushoff-topsen absorberade vätskan mycket fort men upplevdes som ”klen” under spårsäkringen eftersom pinnen sviktade mycket mer än hos övriga tops. Funktionen där huvudet pressas av från pinnen med hjälp av ett yttre rör upplevdes smidigare än att behöva klippa bomullstoppen med sax, men inte lika smidig som att bryta av huvudet direkt som för de flockade topsen. Dry swab-polyestertopsen bedömdes vara likvärdig med Selefa-topsen i fråga om funktion och användarvänlighet.

3.2 JÄMFÖRELSE MELLAN FLOCKADE NYLONTOPS OCH BOMULLSTOPS MED TIO OLIKA PROVTAGARE

Studien syftade till att jämföra DNA-utbytet då identiska fläckar säkrades med bomullstopps (Selefa, OneMed) respektive flockad nylontops (4N6FLOQSwabs Genetics, Copan). Tio provtagare med lång erfarenhet av spårsäkring med bomullstopps på ytor och varierande vana vid flockad nylontops ingick i studien. Intorkad humansaliv topsades från metallyta (aluminiumburk). Spårsäkrarna fick följande

instruktioner: ”Topsa som du brukar göra” för bomullstops respektive ”Vät topsen med en liten droppe koksalt och säkra spåret” för flockad nylontops. För bomullstops klipptes ”toppen” av bomullen medan den flockade nylontopsen bröts av inför DNA-extraktion. DNA extraherades med ChelexDirekt (200 µL chelex-buffert, med respektive utan Lyse&Spin-rör) och kvantifierades med qPCR.

Spårsäkring med flockade nylontops resulterade i högre DNA-utbyte ($0,051 \pm 0,011$ ng/µL) jämfört med bomullstops ($0,029 \pm 0,009$ ng/µL utan insatsrör och $0,034 \pm 0,007$ ng/µL med insatsrör, $p < 0,0001$) för samtliga tio spårsäkrare (Figur 4). Det var ingen skillnad i DNA-utbyte från flockade nylontops mellan erfarna (#1-5, $0,052 \pm 0,010$ ng/µL) och oerfarna användare (#6-10, $0,049 \pm 0,012$ ng/µL, $p = 0,49$). Användning av insatsrör med bomullstops gav något högre DNA-koncentrationer jämfört med bomullstops utan insatsrör ($p = 0,02$). Detta var väntat eftersom en större volym lyseringsbuffert (300 µL) sattes till 2-3 prover utan insatsrör från spårsäkrare #3, #5, #6, #9 och #10, där den största skillnaden också kan ses. Den interna PCR-kontrollen (IPC) visade inga tecken på hämning för någon av grupperna ($p = 0,93$)



Figur 4. Medelvärde av DNA-koncentrationen för bomullstops, bomullstops med insatsrör och flockad nylontops med insatsrör för tio olika provtagare (#1-10). Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=4$.

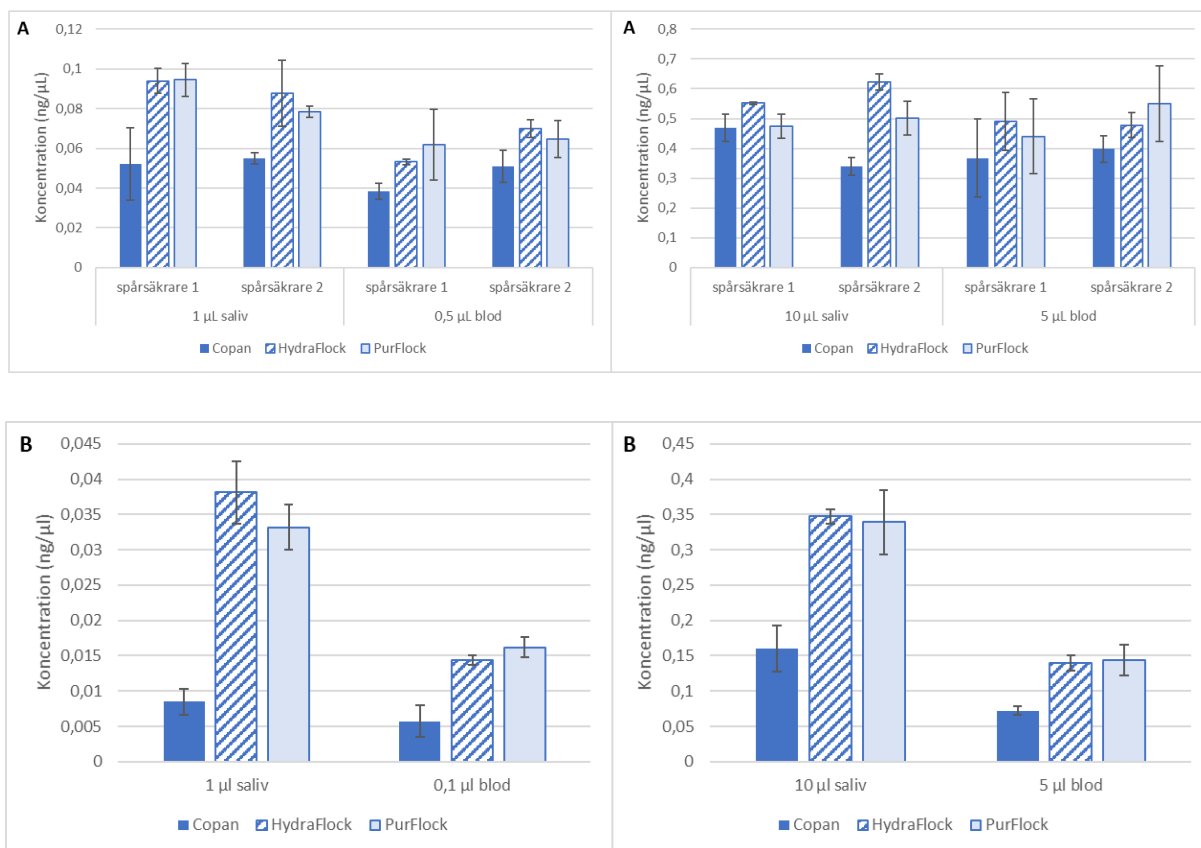
Alla spårsäkrare var överens om att det var mer smidigt att bryta av de flockade nylontopsen än att klippa toppen på bomullshuvudet med sax. Däremot upplevdes det mindre smidigt att veta den flockade nylontopsen eftersom denna inte absorberar NaCl direkt. De spårsäkrare som saknade erfarenhet av den flockade nylontopsen tyckte att det kändes ”konstigt” att spårsäkra med denna, inte minst för att den lämnade kvar vätska på aluminiumburken. Insatsrören Lyse&Spin upplevdes som hårda att öppna vid extraktionens början. Inga prover med flockad nylontops och insatsrör behövde centrifugeras mer än en gång för att skilja lysatet från topsen. Ett prov (av totalt 40) med bomullstops och insatsrör fick centrifugeras 4 gånger innan lysatet åkte igenom insatsrörets botten. Mot slutet av extraktionen då

insatsröret avlägsnats, var det svårt att stänga mikrofugröret eftersom fästet mellan rör och lock töjts ut av insatsröret. Detta gjorde att locken gled uppåt och öppnades igen.

3.3 UTVÄRDERING AV TRE OLIKA FLOCKADE NYLONTOPS

Studien syftade till att jämföra DNA-utbyte och användarvänlighet för tre olika flockade nylontopsar för att kunna ha flera alternativ i händelse av leveransstörningar. De utvärderade topsarna var HydraFlock 6" Sterile, 20 mm Breakpoint, PurFlock Ultra 6" Sterile, 20 mm Breakpoint Ultra (båda från *Puritan*) och 4N6FLOQ Swabs Genetics (*Copan*). Intorkat humant blod och saliv användes som provmaterial. Innan säkring vättes topsen med 20 µL NaCl. Efter spårsäkring bröts huvudet på de flockade topsen av och ner i mikrofugrör. Spårsäkring utfördes av två personer. Försöket upprepades med etylenoxid-behandlade HydraFlock och Purflock Ultra, samt med 4N6FLOQSwabs av en spårsäkrare. Fem blanka tops av varje sort bröts också av och ner i mikrofugrör. Proverna kvantifierades med qPCR (PowerQuant System) och typbestämdes med PowerPlex Fusion 6C System enligt tillverkarens beskrivning. Vid kvantifiering och typbestämning spikades också extrakten som innehöll blanka tops med standard-DNA (2800M Control DNA (*Promega Corporation*)).

Gällande förmågan att absorbera spårsäkringsvätska (NaCl) var HydraFlock och PurFlock betydligt bättre än 4N6FLOQSwabs Genetics. För den sistnämnda topstypen krävdes en stunds arbete för att "jobba in" vätskan med ampull eller pipett. HydraFlock absorberade NaCl direkt medan PurFlock Ultra absorberade vätskan något långsammare. Skaffet på 4N6FLOQSwabs är grövre jämfört med HydraFlock och PurFlock Ultra, vilket medför att 4N6FLOQSwabs känns mer stabil medan Puritan-topsen upplevs mer följsamma under spårsäkringen. Förfarandet då topshuvudet bryts av och ner i ett rör bedömdes vara lika smidigt med de tre topstyperna. Varken HydraFlock eller PurFlock är garanterat DNA-fria idag men *Puritan* har möjlighet att behandla dessa tops med etylenoxid enligt standard ISO18385 för minimering av eventuell DNA-kontamination. HydraFlock och PurFlock uppvisade likvärdiga eller högre DNA-utbyten jämfört med *Copan*-tops (Figur 5). Spårsäkrare ett och två uppvisade likvärdiga DNA-koncentrationer. Endast ett replikat uppvisade hämning vid kvantifieringen (10 µL saliv spårsäkrat med HydraFlock). Däremot gav HydraFlock och PurFlock förhöjt bakgrundsbrus vid analys med PowerPlex Fusion, vilket kan påverka DNA-analysen negativt. HydraFlock och PurFlock anses därmed ej kompatibla med forensisk DNA-profilering, men kan tillämpas om analysen skall utföras med qPCR eftersom inga störningar iakttoogs för denna metod.



Figur 5. Medelvärde av DNA-koncentration (ng/μL) för saliv och blod spårsäkrat med de olika flockade topsen Copan, HydraFlock och PurFlock. A visar resultat för ej etylenoxid-behandlade tops och B visar resultat för etylenoxid-behandlade tops (gäller HydraFlock och PurFlock). Felstaplarna representerar standardavvikelsen, n=3 (A) respektive n=5 (B).

3.4 SAMMANFATTANDE SLUTSATSER: PROVTAGNING

Denna delstudie har ökat laboratorieberedskapen och minskat beroendet av enskilda leverantörer via undersökning och redovisning av prestandan för alternativa tops av olika material. Samtliga sju utvärderade topsvarianter anses ändamålsenliga för provtagning av intorkade biologiska material på icke-absorberande ytor. Vissa skillnader i utbyte och kompatibilitet med olika analysmetoder iakttoogs. Flockade nylontops gav överlag högst DNA-utbyte, men i flera fall var utbytena likvärdiga för dessa och bomullstopp. Pushoff bomull och Pushoff rayon gav lägst DNA-utbyten. De flockade nylontopsen HydraFlock och PurFlock gav höga DNA-utbyten och fungerade väl för qPCR-analys men resulterade i förhöjt bakgrundsbrus vid analys med kapillärelektrofores. Copan-topsen är således ett bättre alternativ för exempelvis forensisk DNA-analys.

Av de fyra utvärderade insatsrören anses Lyse&Spin vara det bästa alternativet för manuell DNA-extraktion, baserat på både utbyte och användarvänlighet. Övriga rör är också tillämpliga, med de begränsningar som anges ovan.

4 DNA/RNA-EXTRAKTION

Effektiv utvinning av DNA/RNA från olika typer av celler och virioner är avgörande för att kunna detektera små mängder sjukdomsframkallande agens i komplexa prover. Automatiserade metoder ger generellt jämna resultat och ökar provgenomströmningen, men är i de flesta fall beroende av enskilda leverantörer som säljer både reagens och robotar. Alternativa metoder behövs för att säkerställa att laboratorieförmågan kan upprätthållas även vid leveransproblem eller andra kriser som slår ut rutinmetoderna. De alternativa metodernas prestanda måste vara känd innan behovet att implementera dem uppstår. Kompletterande eller ersättande metoder som bygger på in-house-protokoll med lägre beroende av enskilda leverantörer kan också med fördel implementeras innan en kris uppstår. Här utvecklades och utvärderades ett in-house-protokoll för DNA/RNA-extraktion med magnetkulor. En robot för automatiserad DNA-extraktion som är öppen för användning av olika kit och in-house-metoder utvärderades med avseende på prestanda för olika metoder. Vidare utvärderades och jämfördes 22 olika metoder för DNA/RNA-extraktion för olika relevanta agens. Dessutom undersöktes hur olika DNA-extraktionsmetoder påverkar DNA-kvaliteten gällande ”strandedness” och fragmentering. Utöver de laborativa studierna sammanställdes information om laboratoriernas tidigare erfarenheter och lärdomar av olika DNA/RNA-extraktionsmetoder i ett dokument som delades mellan samtliga deltagande myndigheter.

4.1 SAMMANSTÄLLNING AV DNA/RNA-EXTRAKTIONSMETODER

Laboratoriernas samlade erfarenhet av metoder för DNA/RNA-extraktionsmetoder har sammanställts i ett dokument som delats med de ingående myndigheterna. Listan innehåller namn och beskrivningar av metoder samt för vilka agens de har använts med framgång. Dessutom ingår information om extraktionsprincip, utbyte, resulterande DNA-integritet, arbetsinsats samt kostnad. Totalt beskrivs 21 olika metoder som används av de olika myndigheterna. Såväl automatiserade som manuella metoder ingår, och både kommersiella metoder och in-house-protokoll. Listan ska kunna användas för att hitta alternativ till laboratoriernas nuvarande metoder och därmed öka möjligheten att bibehålla analysförmågan i händelse av kris, endera genom att implementera en ny metod eller genom att ta hjälp av en annan myndighet.

4.2 UTVECKLING OCH UTVÄRDERING AV ETT IN-HOUSE DNA/RNA-EXTRAKTIONSPROTOKOLL

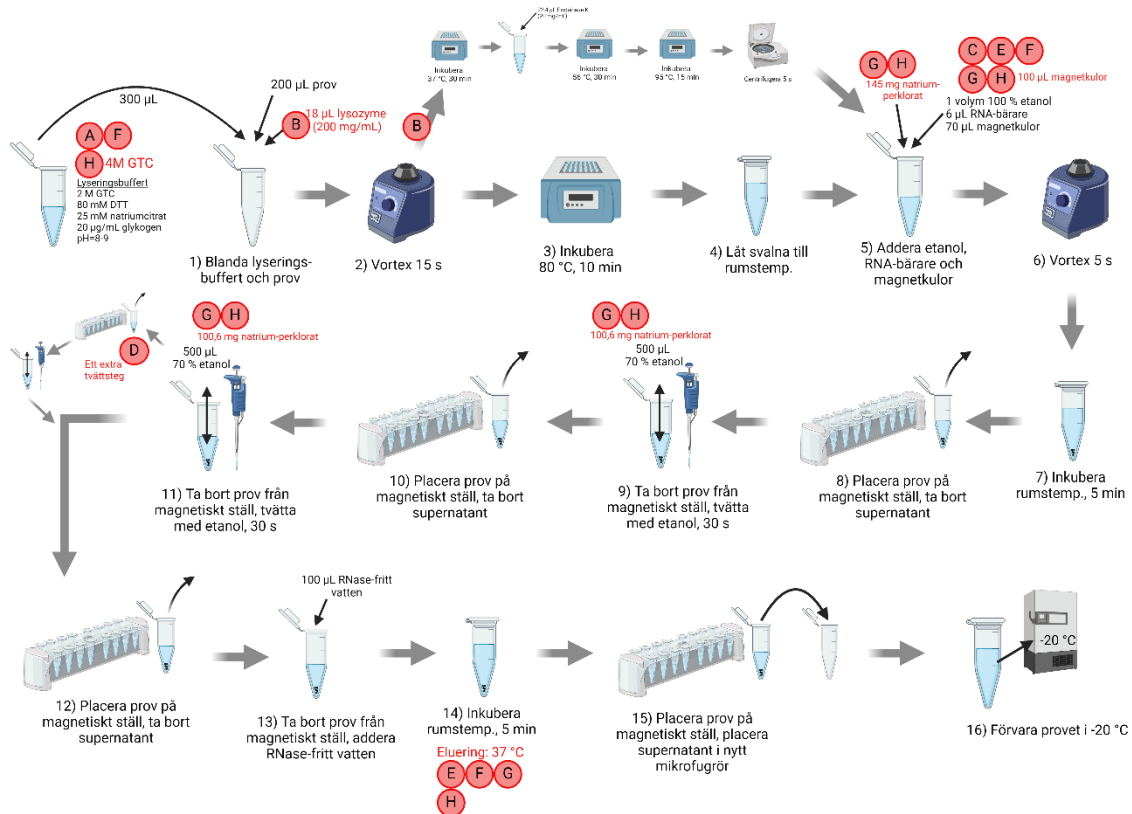
Målet med arbetet var att utveckla en leverantörsoberoende extraktionsmetod för virus med likvärdigt DNA- och RNA-utbyte samt hämmartålighet som det etablerade kommersiella extraktionskitet NucliSens miniMAG (*bioMérieux*). Metoden skulle, liksom NucliSens miniMAG, baseras på DNA/RNA-extraktion och -rening med guanidine thiocyanate och magnetiska kulor. Därtill skulle metoden ha en möjlig provvolym på 500 µL för att uppnå de krav som finns för att metoden ska kunna användas inom standarderna ISO 15216-1 och ISO 15216-2. Eftersom metoden utvecklades för att minska beroendet av specifika leverantörer utvärderades även effekten av magnetkulor av olika fabrikat samt magnetkulor med passerat utgångsdatum. Det undersöktes även om tvättning av magnetkulorna hade någon påverkan på utbytet. Vidare undersöktes även detektionsgränsen i jämförelse med NucliSens miniMAG.

4.2.1 Utveckling av in house-protokollet TMB Magnetic

Protokollet beskrivet i He et al (2017), baserat på guanidine thiocyanate och magnetkulor, användes som utgångspunkt för utveckling av en in-house metod, TMB Magnetic (Figur 6). Grundprotokollet från He et al. (2017) jämfördes med NucliSens miniMAG (*bioMérieux*) för extraktion av en 3-agenscocktail bestående av *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* och Mengovirus. Dessa organismer valdes som modellorganismer för gramnegativa respektive grampositiva bakterier samt RNA-virus. 3-agenscocktailen utformades i två mängder; en hög samt en låg, enligt Tabell 2 nedan. Flertalet försök utfördes där diverse ändringar av grundprotokollet gjordes enligt Tabell 3 samt Figur 6 nedan. Jämförelser av DNA/RNA-utbytet gjordes sedan mot såväl grundprotokollet (1) som NucliSens miniMAG (*bioMérieux*). Samtliga extraktioner genomfördes i triplikat och extrakten analyserades med qPCR (QuantStudio 5, *Thermo Fisher Scientific*).

Tabell 2. Koncentrationer av *S. enterica*, *B. cereus* samt Mengovirus i 3-cocktailen med hög samt låg mängd, som användes vid utveckling av metoden TMB magnetic. Mengovirus späddes från en stock framtagen av Livsmedelsverket.

	Hög mängd	Låg mängd
<i>S. enterica</i>	2,15×10 ⁵ cfu/mL	2,15×10 ³ cfu/mL
<i>B. cereus</i>	2,15×10 ⁵ cfu/mL	2,15×10 ³ cfu/mL
Mengovirus	71,4x-spädning	7140x-spädning



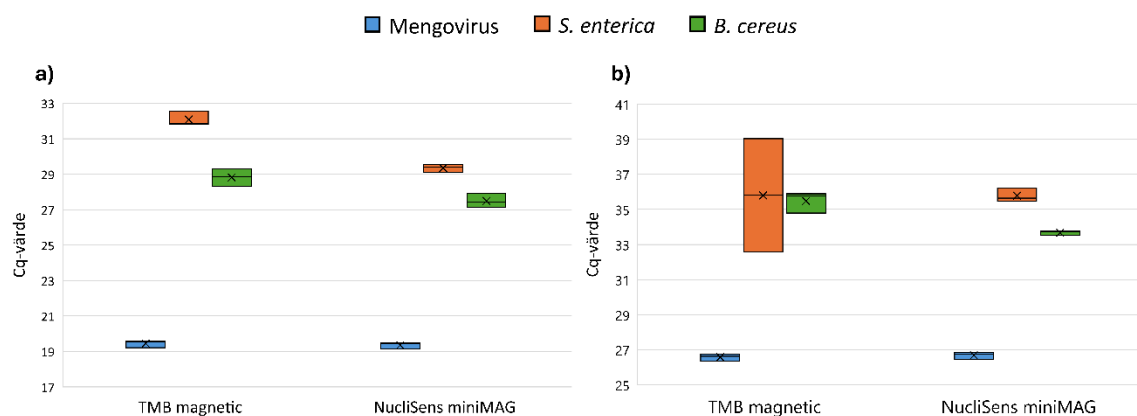
Figur 6. Utveckling av en in house-metod för DNA/RNA-extraktion, TMB magnetic. Flödesschemat visar grundprotokollet (1). Röd text och punkterna med bokstäverna A-H representerar de försök och ändringar som gjordes under optimering av TMB magnetic.

Tabell 3. Beskrivning av de parametrar som utvärderades vid optimering av in-house-protokollet TMB magnetic. Numreringen av stegen kopplar till flödesschemat i Figur 6. I tabellen visas de värden som användes i grundprotokollet samt de värden som utvärderades i optimeringsförsöken. Totalt utfördes åtta optimeringsförsök, kallade A-H. RT = rumstemperatur

Försök	Ändring i steg nr:	Ändring av:	Grund-protokollet	Ändring till:
A	1	Koncentration av guanidine thiocyanate i lyseringsbuffert	2 M	4 M
B	1	Addering av Proteinase K	-	448 µg
	2	Addering av lysozyme	-	3,6 mg
C	5	Volym magnetkuler	70 µL	100 µL
D	11-12	Ett extra tvättsteg	2 tvättsteg	3 tvättsteg
E	5	Volym magnetkuler	70 µL	100 µL
	14	Elueringstemperatur	RT	37 °C
F	1	Koncentration guanidine thiocyanate i lyseringsbuffert	2 M	4 M

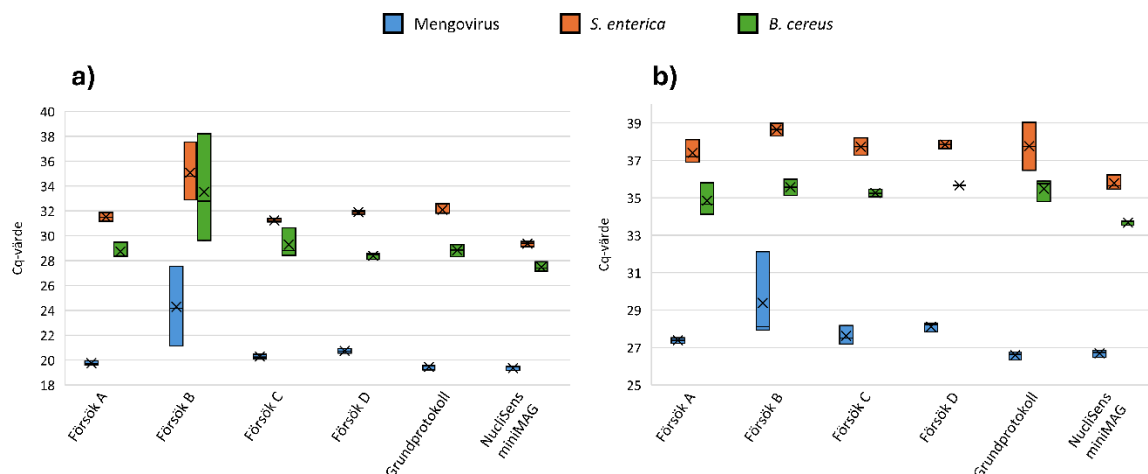
G	5	Volym magnetkolor	70 µL	100 µL
	14	Elueringstemperatur	RT	37 °C
	5, 9, 11	Addering av natriumperklorat i samband med magnetkolor samt tvättning	-	145 mg i samband med magnetkolor, 100,6 mg i tvättning
	5	Volym magnetkolor	70 µL	100 µL
H	14	Elueringstemperatur	RT	37 °C
	1	Koncentration guanidine thiocyanate i lyseringsbuffert	2 M	4 M
	5, 9, 11	Addering av natriumperklorat i samband med magnetiska klorer samt tvättning	-	145 mg natriumperklorat i samband med magnetiska klorer, 100,6 mg i tvättning
	5	Volym magnetiska klorer	70 µL	100 µL
	14	Elueringstemperatur	RT	37 °C

Grundprotokollet (1) gav något lägre utbyten (högre Cq-värden) än NucliSens miniMAG för bakterierna, framför allt för *S. enterica*, gällande båda provmängderna (Figur 7). För Mengovirus var utbytena (Cq-värden) likvärdiga för de båda metoderna.



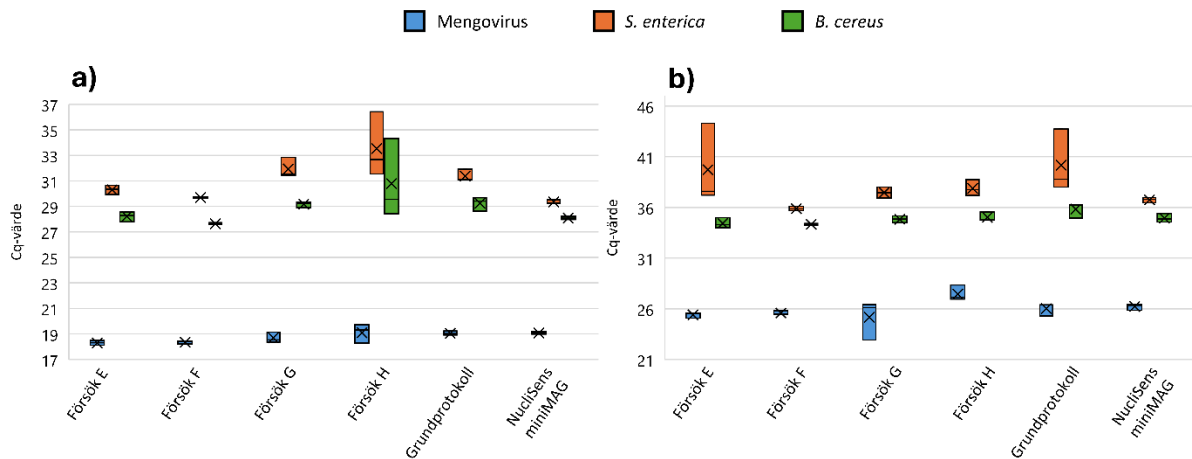
Figur 7. Erhållna Cq-värden efter extraktion med grundprotokollet (1) samt NucliSens miniMAG, a) hög mängd av 3-agens-cocktail, b) låg mängd av 3-agens-cocktail. Kryssat representerar medelvärdet. n=3.

Optimeringsförsöken A-D uppvisade inga förbättringar i utbyte jämfört med NucliSens miniMAG för något av agensen (Figur 8). Däremot gav Försök A och C lägre Cq-värden för den höga mängden *S. enterica* jämfört med grundprotokollet, vilket tyder på att en ökning av koncentration guanidine thiocyanate i lyseringsbufferten samt att en ökning av volymen kulor kan ge ett förbättrat DNA-utbyte. Tillägg av Proteinase K och lysozyme i lyseringen samt ett extra tvättsteg gav dock ingen positiv effekt på utbytet.



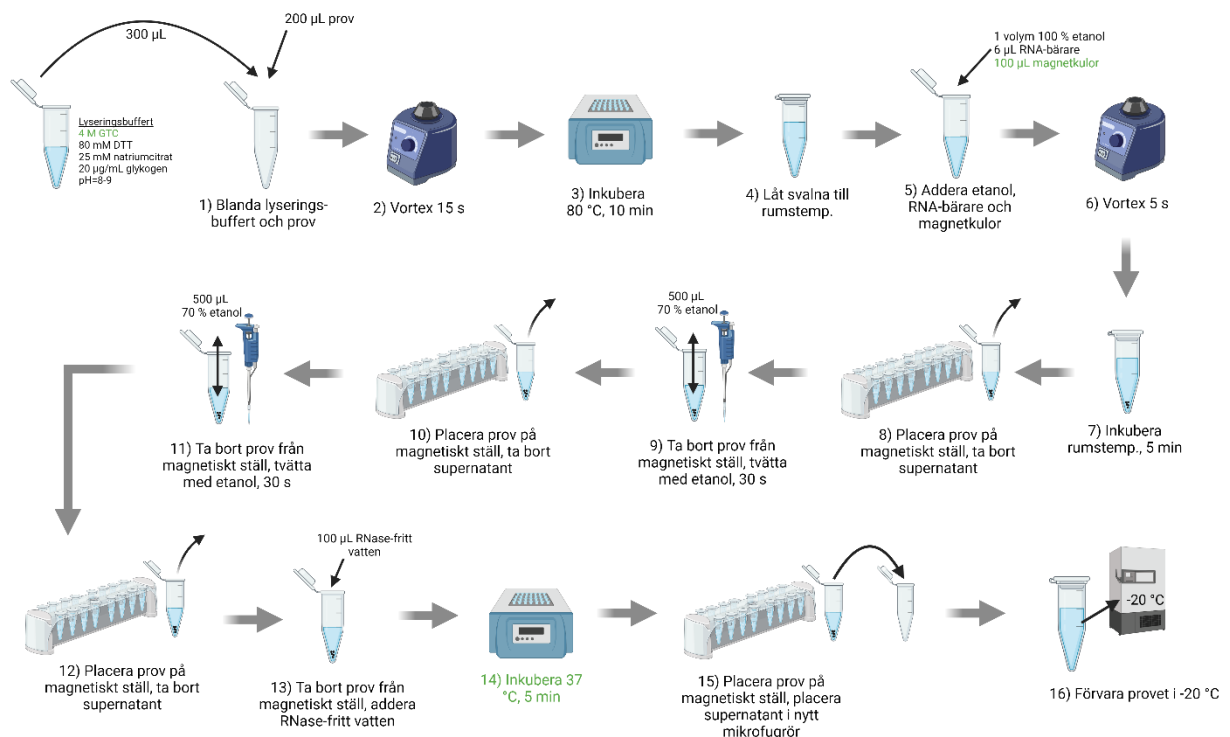
Figur 8. Erhållna Cq-värden för försök A-D vid optimering av TMB magnetic, a) hög mängd av 3-agens-cocktail, b) låg mängd av 3-agens-cocktail. Krysset representerar medelvärdet. n=3.

Optimeringsförsök E-H gav något lägre eller likvärdiga Cq-värden som grundprotokollet för samtliga agens och mängder, med undantag för försök H där spridningen var stor både med hög mängd *S. enterica* och *B. cereus* och vid låg mängd *S. enterica* och Mengovirus (Figur 9). Sammantaget kan en kombination av ökad koncentration guanidine thiocyanate i lyseringsbuffert, ökad volym magnetkulor samt ökad elueringstemperatur ha en viss positiv påverkan på utbytet. Försök E och F gav likvärdiga Cq-värden som NucliSens miniMAG för samtliga agens och mängder. Den stora spridningen i försök G och H tyder på att addering av natriumperklorat inte förbättrar prestandan.



Figur 9. Erhållna Cq-värden för försök E-H för optimering av TMB magnetic, a) hög mängd, b) låg mängd. Kryset representerar medelvärdet. n=3.

Utifrån erhållit resultat gjordes följande ändringar i det optimerade TMB magnetic-protokollet: Koncentrationen guanidine thiocyanate i lyseringsbufferten ökades från 2 M till 4 M, volymen magnetkylor ökades från 70 μ L till 100 μ L och en högre temperatur användes vid den avslutande inkuberingen, 37 $^{\circ}$ C istället för rumstemperatur (RT) (Figur 10).



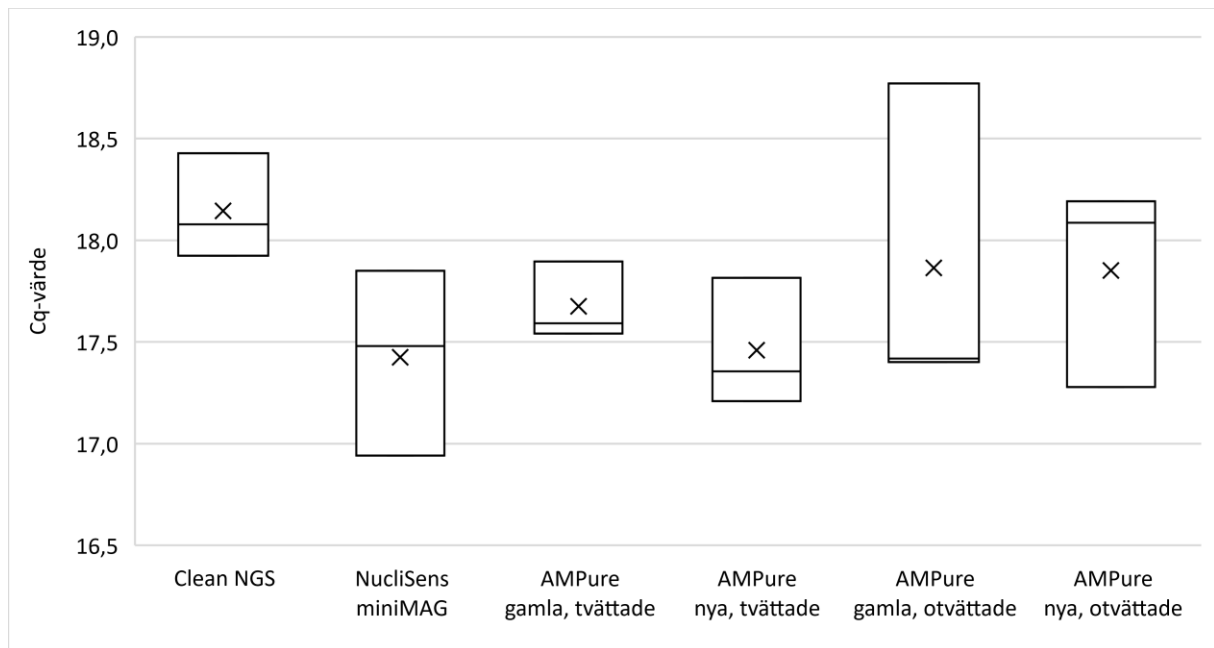
Figur 10. Flödesschema för det optimerade TMB-magnetic-protokollet. Den gröna texten visar de parametrar som skiljer sig mot grundprotokollet.

Det slutgiltiga TMB magnetic-protokollet (Figur 10)

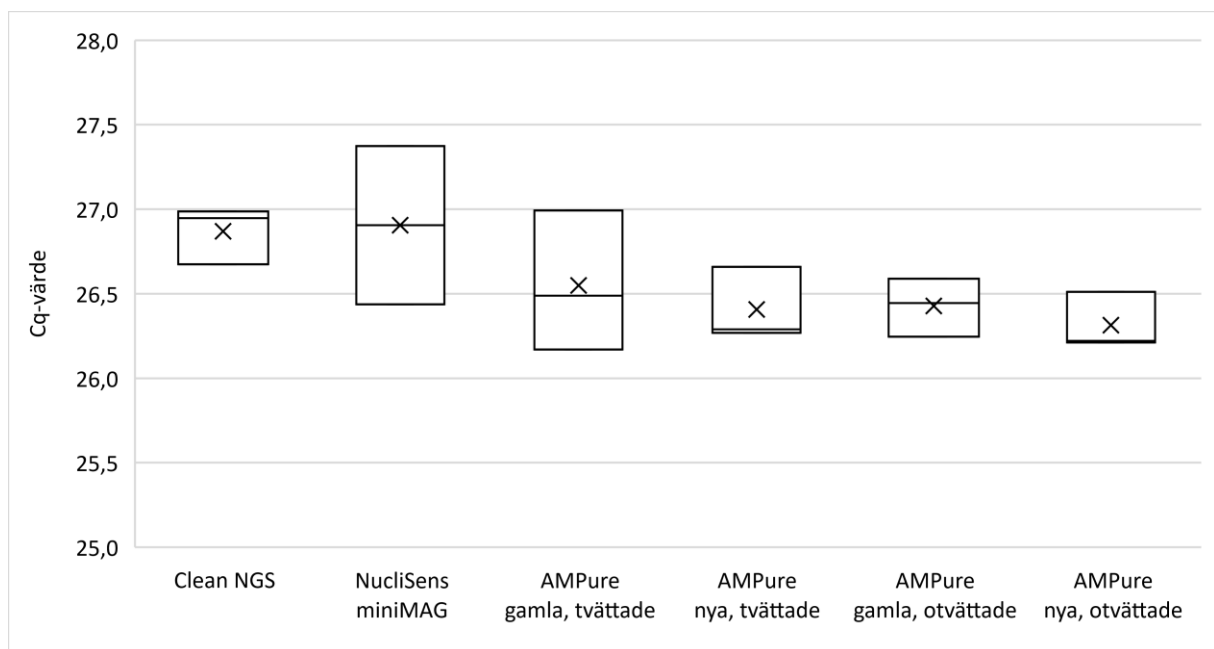
1. Lysering sker med en lyseringsbuffert bestående av 4 M guanidine thiocyanate, 80 mM DTT (dithiothreitol), 25 mM natriumcitrat och 20 µg/mL glykogen. pH i lyseringsbuffert ställs till 8-9 med väteklorid samt vätehydroxid.
 2. 300 µL lyseringsbuffert adderas till 200 µL prov och vortexas i 15 s.
 3. Provet inkuberas därefter i 80 °C, 10 min, och får sedan svalna till RT i ca. 15 min.
 4. En volym 100 % etanol (500 µL), 6 µL RNA-bärare (Carrier-ACRYL, Top-Bio) och 100 µL magnetiska kulor (exempelvis AMPure XP Bead, Beckman Coulter, Inc.) adderas till provet följt av en kort vortex.
 5. Provet inkuberas därefter i RT i 5 min.
 6. Provet placeras i ett magnetiskt ställ, varpå supernatanten avlägsnas. Provet tas bort från det magnetiska stället och tvättas med 500 µL 70 % etanol i 30 s. genom att pipettera upp och ner. Provet placeras återigen i det magnetiska stället, varpå supernatanten avlägsnas och tvättningen med 70 % etanol upprepas.
 7. Efter att supernatanten återigen avlägsnats och provet inte står i det magnetiska stället adderas 100 µL RNase-fritt vatten.
 8. Provet inkuberas sedan i 37°C i 5 min, innan det placeras i ett magnetiskt ställ och supernatanten förs över till ett nytt mikrofugrör.
 9. Extraktet förvaras i -20 °C.
-

4.2.2 Jämförelse av olika typer av magnetkulor

Tre olika sorters magnetkulor jämfördes för användning tillsammans med in-house-metoden TMB magnetic; Clean NGS (*CleanNA*), magnetkulor från NucliSens miniMAG-kit (*bioMérieux*) samt AMPure XP Bead (*Beckman Coulter, Inc.*). För AMPure XP Beads jämfördes även magnetkulor med passerat utgångsdatum (utgångsdatum ett år och elva månader innan försöket, förvarade i kyl enligt rekommendation) med nya kulor, samt otvättade och tvättade kulor. Protokoll för tvättning av magnetkulor finns på en gemensam myndighetsarea. Jämförelsen gjordes på en 2-cocktail bestående av en 33x-spädning av Mengovirus samt humansaliv med avseende på DNA/RNA-utbyte. Extraktionen genomfördes enligt grundprotokollet från He et al. (2017). Resultatet visar inga substantiella skillnader mellan de olika fabrikaten av magnetkulor (Figur 11-12). AMPure-kulor som passerat utgångsdatum gav likvärdigt DNA/RNA-utbyte som ”nya” kulor. Tvättade AMPure-kulor gav också likvärdiga utbyte som otvättade kulor. Metoden bedöms således vara robust med avseende på typ och hantering av magnetkulor.



Figur 11. Erhållna Cq-värden vid undersökning av eventuell effekt av olika sorters magnetkolor för TMB magnetic, för Mengovirus, där krysset representerar medelvärdet, n=3.

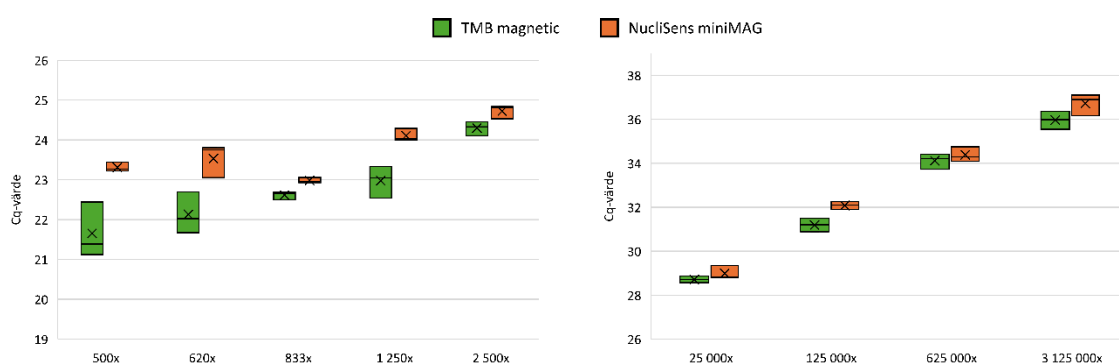


Figur 12. Erhållna Cq-värden vid undersökning av eventuell effekt av olika sorters magnetkolor för extraktion med TMB magnetic, för humansaliv, där krysset representerar medelvärdet, n=3.

4.2.3 Jämförelse av detektionsgräns mellan TMB Magnetic och NucliSens miniMAG

För undersökningen av detektionsgräns med TMB magnetic och NucliSens miniMAG blandades 10, 8, 6, 4 samt 2 μ L av en 10x-spädning av en stock Mengovirus i 490, 492, 494, 496 respektive 498 μ L PBS,

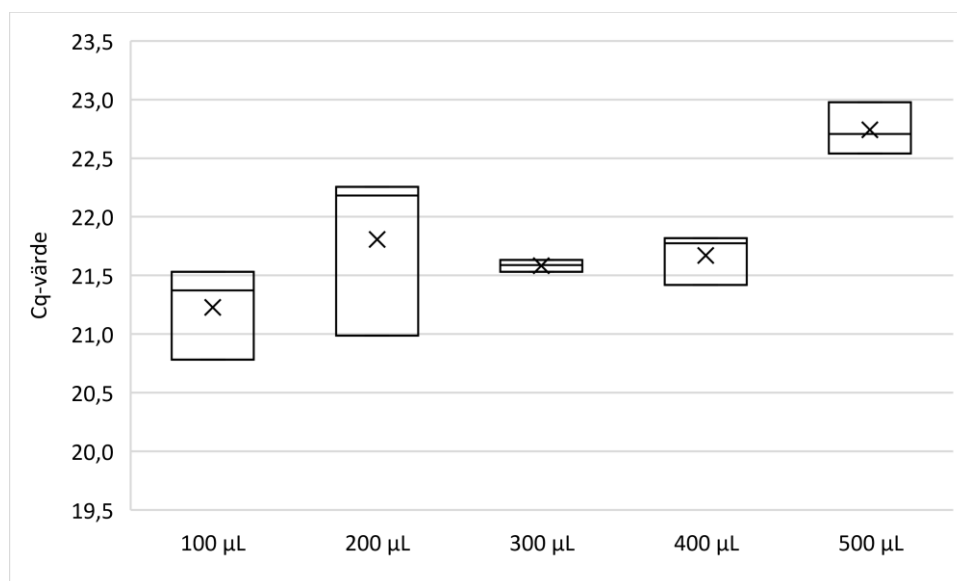
vilket resulterade i 500x-, 620x-, 833x-, 1 250x- respektive 2 500x-spädningar av stocken. Försöket upprepades med 25 000x-, 125 000x-, 625 000x- samt 3 125 000x-spädningar. Extraktionerna genomfördes enligt det optimerade TMB magnetic-protokollet. TMB magnetic och NucliSens miniMAG möjliggjorde båda detektion av samtliga testade Mengovirus-spädningar ner till spädning 3 125 000x av stocken (Figur 13). Det optimerade TMB magnetic-protokollet gav konsekvent lägre Cq-värden jämfört med NucliSens miniMAG, vilket pekar på ett högre RNA-utbyte för TMB magnetic. In house-metoden TMB magnetic uppvisar således minst lika bra detektionsgräns och utbyte för Mengovirus som den kommersiella NucliSens miniMAG-metoden.



Figur 13. Erhållna Cq-värden vid undersökning av detektionsgräns av TMB magnetic, där krysset representerar medelvärdet, n=3.

4.2.4 Utvärdering av olika provvolym för RNA-extraktion

Enligt ISO-standarderna ISO 15216-1 och ISO 15216-2 måste en RNA-extraktionsmetod för virus i livsmedel kunna hantera provvolym up till 500 µL. För undersökning av provvolym blandades 10 µL av en 10x-spädning av en stock Mengovirus med 90, 190, 290, 390 samt 490 µL PBS (Gibco) för att få provvolym på 100, 200, 300, 400 respektive 500 µL. Provvolymer mellan 100-400 µL gav likvärdiga resultat, medan provvolymen 500 µL gav högre Cq-värden (medel-Cq ca 22,7) jämfört med 100 µL (medel-Cq ca 21,2) (Figur 14). Detta innebär att TMB magnetic fungerar för provvolym up till 500 µL, men att större volymer kan leda till något sämre utbyte. Inga jämförelser mot NucliSens miniMAG med avseende på provvolym har genomförts.



Figur 14. Erhållna Cq-värden för utvärderingen av provvolym för TMB magnetic, där krysset representerar medelvärdet, n=3.

4.3 UTVÄRDERING AV DNA/RNA-EXTRAKTIONSROBOT MED PROTOKOLLEN NUCLISENS MINIMAG OCH TMB MAGNETIC

Roboten GenePure Pro (Tectum) är utvecklad för automatiserad DNA/RNA-extraktion. Extraktionsroboten är programmerbar och inte låst till specifika reagenser/kit vilket minskar leverantörsberoendet jämfört med de flesta andra kommersiellt tillgängliga robotarna som endast är kompatibla med återförsäljarens egna kit. Detta möjliggör användandet av flera olika metoder inklusive såväl kommersiella kit som in-house-protokoll. GenePure Pro är en fullt automatisk robot, vilket betyder att reagenser och prov laddas och när roboten väl startas fullföljer roboten samtliga steg i extraktion och rening av DNA/RNA utan manuella insatser. Roboten extraherar DNA/RNA med hjälp av magnetstavar fästa i en rörlig axel i taket av roboten som förflyttar DNA/RNA mellan brunnarna med hjälp av magnetkylor. Protokollen NucliSens miniMAG och TMB magnetic utvärderades på GenePure Pro med avseende på DNA/RNA-utbyte, hämmartålighet och generell användbarhet. I studien jämfördes robotens DNA/RNA-utbyte med manuellt utförda extraktioner med motsvarande metoder.

4.3.1 Anpassning av protokoll till robot GenePure Pro

GenePure Pro är utformad med sex brunnar per prov, där lyseringen sker i den första brunn och magnetkylor förvaras i den sista, vilket leder till att elueringen sker i brunn 5. Detta betyder alltså att

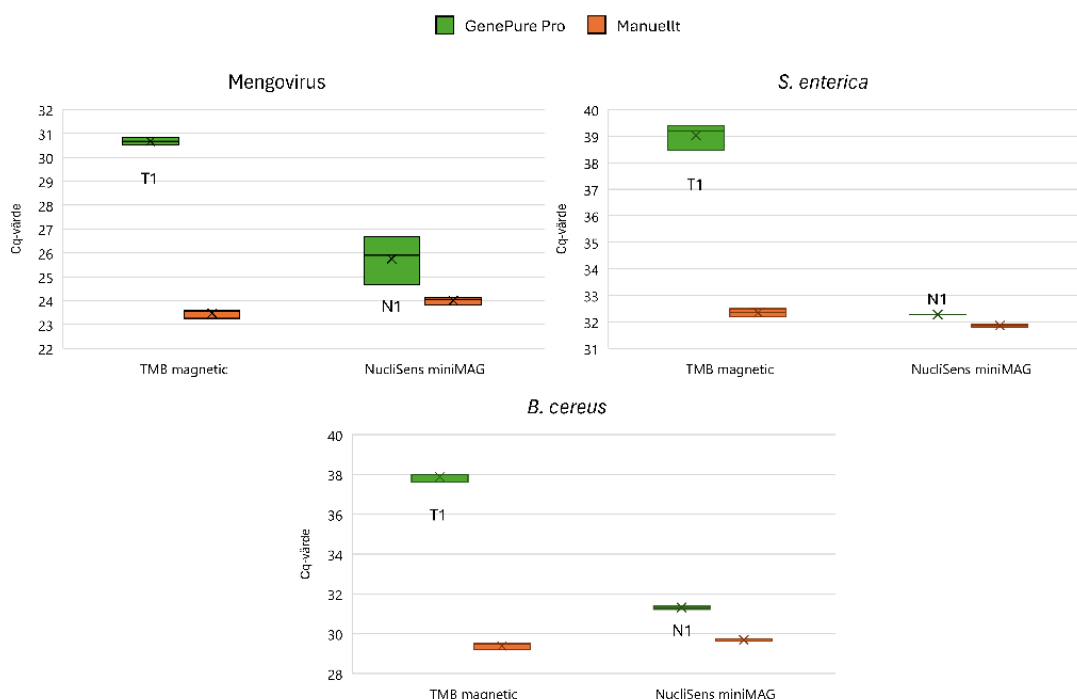
roboten möjliggör för tre tvättsteg. Samtliga ingående reagens behöver sättas till innan roboten startas. Protokollen för NucliSens miniMAG samt TMB magnetic behövde därför anpassas till roboten. De utvärderade justeringarna av protokollen finns i Tabell 4. De olika protokollen körda på roboten jämfördes med manuellt genomförda extraktioner enligt originalprotokollen.

Table 4. Anpassning av protokollen TMB magnetic och NucliSens miniMAG för att kunna köra den på roboten GenePure Pro.

TMB magnetic	
Justering T1	Exkludera tillsats av 100 % etanol samt RNA-bärare. Exkludera steget när prov svalnar till rumstemperatur. Andra inkubering i 80 °C istället för rumstemperatur då det sker i samma brunn som lysering och temperaturen hinner inte gå ner till rumstemperatur.
Justering T2	Addera 100 % etanol samt RNA-bärare i lyseringsbuffert. Exkludera steget när prov svalnar till rumstemperatur. Andra inkubering i 80 °C istället för rumstemperatur då det sker i samma brunn som lysering och temperaturen hinner inte gå ner till rumstemperatur.
Justering T3	Pausa roboten efter första inkubering för att addera 100 % etanol och RNA-bärare. Exkludera steget när prov svalnar till rumstemperatur. Andra inkubering i 80 °C istället för rumstemperatur då det sker i samma brunn som lysering och temperaturen hinner inte gå ner till rumstemperatur.
NucliSens miniMAG	
Justering N1	Exkludera centrifugering samt en tvätt med Wash 1 och en tvätt med Wash 2, vilket resulterar i en tvätt med varje tvättbuffert. 750 µL Lyseringsbuffert istället för 2 mL samt 500 µL av samtliga tvättbuffert.
Justering N2	Exkludera centrifugering samt en tvätt med Wash 1 och en tvätt med Wash 2, vilket resulterar i en tvätt med varje tvättbuffert. Första inkubering i 80 °C istället för rumstemperatur. 750 µL Lyseringsbuffert istället för 2 mL samt 500 µL av samtliga tvättbuffert.

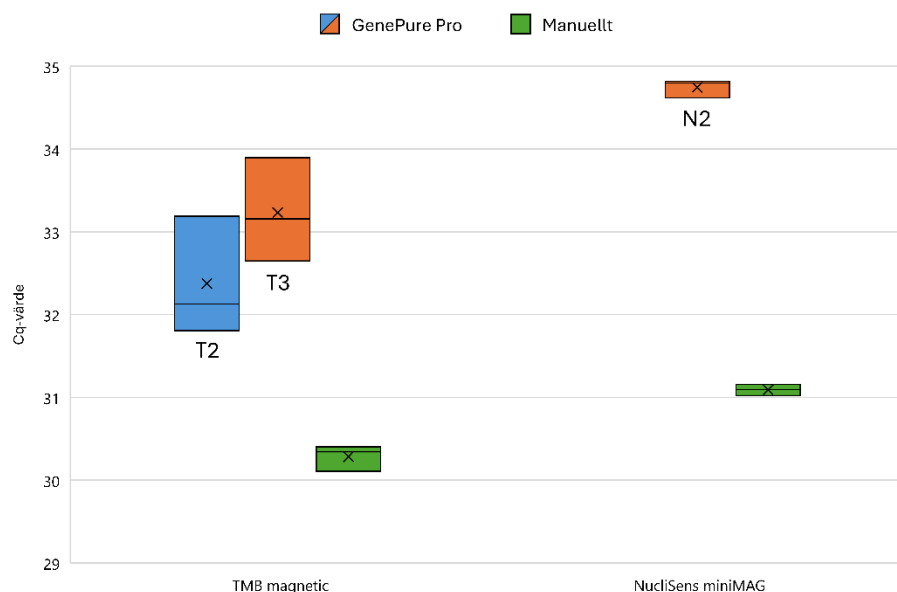
Anpassningen av protokollen till roboten gjordes med samma 3-agenscocktail som i avsnitt 4.2.1 men endast på den höga nivån, samt på rent humansaliv. Extraktionerna genomfördes i triplikat och extrakten analyserades med qPCR-assayer enligt Bilaga 1. Vid justeringarna T1 och N1 gav roboten lägre utbyten jämfört med manuell extraktion i samtliga försök (Figur 15). Skillnaden i Cq-värden mellan robotextraktion och manuellt genomförd extraktion var avsevärt större för TMB magnetic (medel-Cq

skiljde med 6-9 cykler) jämfört med NucliSens miniMAG (medel-Cq skiljde med 0,4-1,7 cykler), vilket innebär att automatisering gav lägre DNA/RNA-förluster för den sistnämnda extraktionsmetoden.



Figur 15. Erhållna Cq-värden vid justering av protokollen TMB magnetic och NucliSens miniMAG för att anpassas till roboten GenePure Pro, där krysset representerar medelvärdet, $n=3$.

För justering N2 med humansaliv var skillnaden i Cq-värden större mellan robotextraktion och manuellt genomförd extraktion med NucliSens miniMAG (3,7 Cq-värden i skillnad för medelvärdet) än för justering N1 (Figur 16). N2 gav således sämre utbyte än N1. För TMB magnetic gav dock justering T2 något mindre skillnad i Cq-värden mellan automatiserad och manuell extraktion jämfört med T3. Fortsatta försök med GenePure Pro utfördes därför enligt justeringarna T2 respektive N1. Fullständiga protokoll finns på en gemensam myndighetsarea.



Figur 16. Erhållna Cq-värden för humansaliv vid justering av protokollen TMB magnetic och NucliSens miniMAG för att anpassas till roboten GenePure Pro, där krysset representerar medelvärdet, n=3.

4.3.2 Utbyte för automatiserad DNA/RNA-extraktion

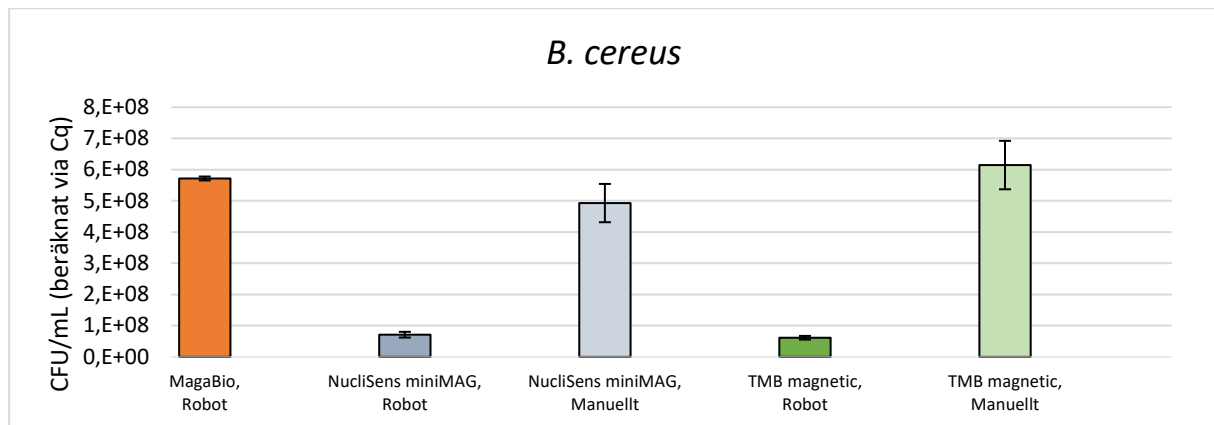
Utvärderingen av DNA/RNA-utbytet gjordes med en 5-agenscocktail bestående av *S. enterica*, *B. cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*, Mengovirus samt humansaliv, i en hög samt låg mängd enligt Tabell 5 nedan. Dessa organismer valdes som modellorganismer för gramnegativa respektive grampositiva bakterier, eukaryota celler, RNA-virus samt humana celler. För att ha något att förhålla resultaten till tillverkades standarder för samtliga agens. Kulturer för *S. enterica*, *B. cereus* och *S. cerevisiae* med kända mängder mikrober (cfu/mL) extraherades med QIAamp DNA Mini kit (det generella bakterieprotokollet för *S. enterica* och protokollet för grampositiva bakterier för *B. cereus*) och Yeast DNA Extraction Kit (Thermo Scientific) för *S. cerevisiae*. Extrakten spädades därefter till DNA-koncentrationer som teoretiskt motsvarade 5×10^9 , 5×10^8 , 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 och 5×10^3 cfu/mL för *S. enterica* och *B. cereus*, och 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 och 1×10^4 cfu/mL för *S. cerevisiae*. Observera att de angivna mängderna utgår från mängden koloniformande enheter i ursprungspreparationerna. DNA-extraktionens effektivitet påverkar de faktiska DNA-koncentrationerna i extrakten. Spädningsserierna analyserades sedan som standarder och användes för att kvantifiera utbytet för respektive mikrob för det olika DNA/RNA-extraktionsprotokollen. DNA-utbytet anges således i cfu/mL, men är framräknat via Cq-värden i qPCR från standardkurvorna. För att förtydliga detta anges koncentrationerna som "cfu/mL (beräknat via Cq)" på y-axlarna i figurerna nedan. Mengovirus extraherades och spädades därefter $1:10^1$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$ och $1:10^5$. För Mengovirus sattes spädningen $1:10^5$ till 1 detektionsenhet, spädningen $1:10^4$ till 2 detektionsenheter o.s.v. För

humansaliv användes standarder bestående av 2800M Control DNA (*Promega Corporation*) som späts till 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} och 10^{-4} ng/ μ L.

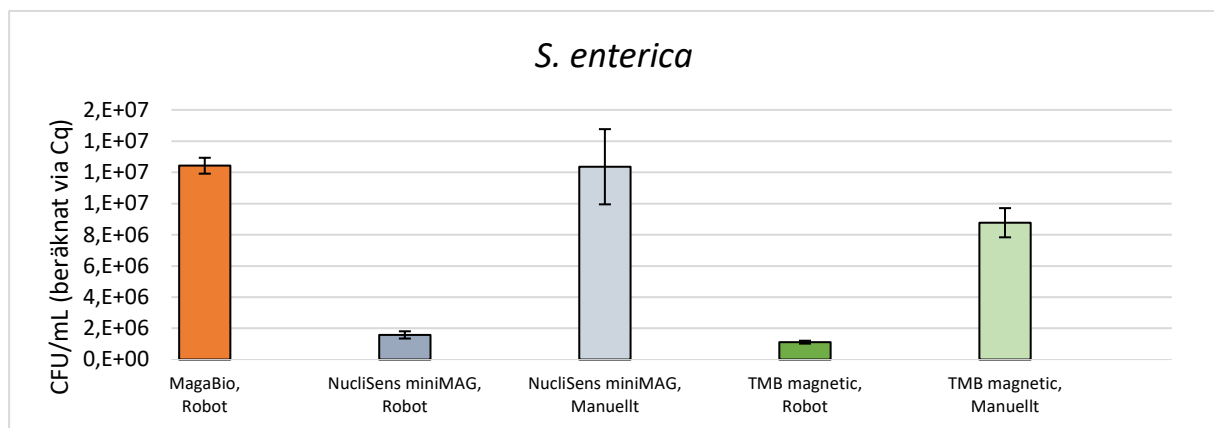
Tabell 5. Koncentrationer av *S. enterica*, *B. cereus*, *S. cerevisiae*, Mengovirus samt humansaliv i 5-agens-cocktailen med hög samt låg mängd, som användes vid utvärdering av DNA/RNA-utbyte för TMB magnetic och NucliSens miniMAG med roboten GenePure Pro. Observera att de angivna mängderna (cfu/mL) utgår från mängden koloniformande enheter i ursprungspreparationerna.

	Hög mängd	Låg mängd
<i>S. enterica</i>	$1,2 \times 10^8$ cfu/mL	$1,2 \times 10^4$ cfu/mL
<i>B. cereus</i>	$1,2 \times 10^8$ cfu/mL	$1,2 \times 10^4$ cfu/mL
<i>S. cerevisiae</i>	$2,4 \times 10^6$ cfu/mL	$2,4 \times 10^4$ cfu/mL
Mengovirus	210x-spädning	21 000x-spädning
Humansaliv	4,2x-spädning	420x-spädning

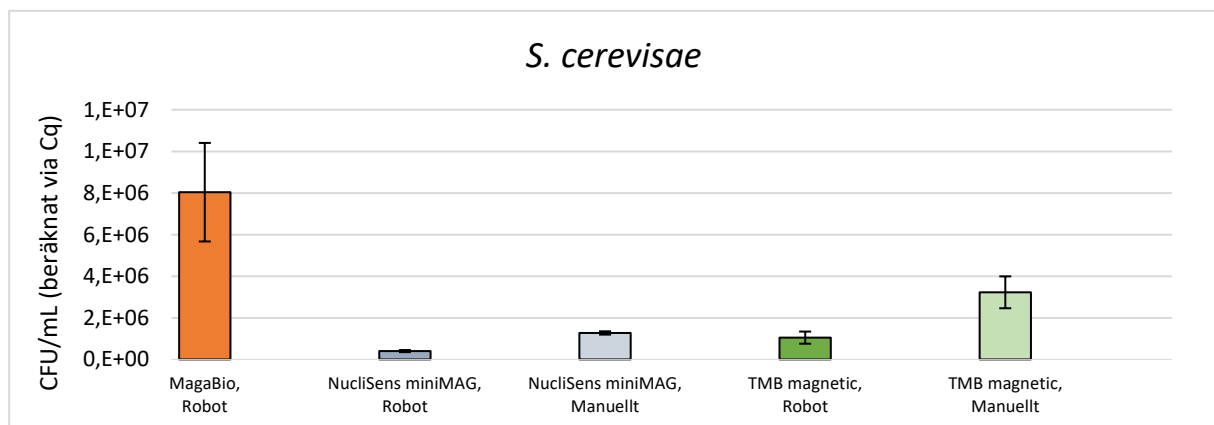
Kitet MagaBio plus Virus DNA/RNA Purification Kit III (*BioFlux*) är ett designat för GenePure Pro och inkluderades därför i utvärderingen som referensmetod. Extraktionen utfördes enligt tillverkarens protokoll. Robotextraktioner med NucliSens miniMAG och TMB magnetic utfördes enligt justering T2 och N1 beskrivna ovan. Extraktionerna genomfördes i triplikat och extrakten analyserades med qPCR (QuantStudio 5, *Thermo Fisher Scientific*). DNA/RNA-utbytet var betydligt högre för de manuellt genomförda extraktionerna jämfört med robotextraktionerna för samtliga agens och för både NucliSens miniMAG och TMB magnetic (Figur 17-21). För *S. cerevisiae* var skillnaden inte lika stor som för övriga agens (Figur 19). Automatiserad extraktion med MagaBio plus Virus DNA/RNA Purification Kit III gav likvärdiga DNA/RNA-utbyten som de manuellt genomförda extraktionerna för samtliga agens förutom för *S. cerevisiae* där MagaBio gav betydligt högre DNA-utbyte. GenePure Pro gav således acceptabelt utbyte med det skräddarsydda MagaBio-kitet, medan de övriga två metoderna skulle behöva ytterligare anpassningar för att kunna användas tillsammans med roboten.



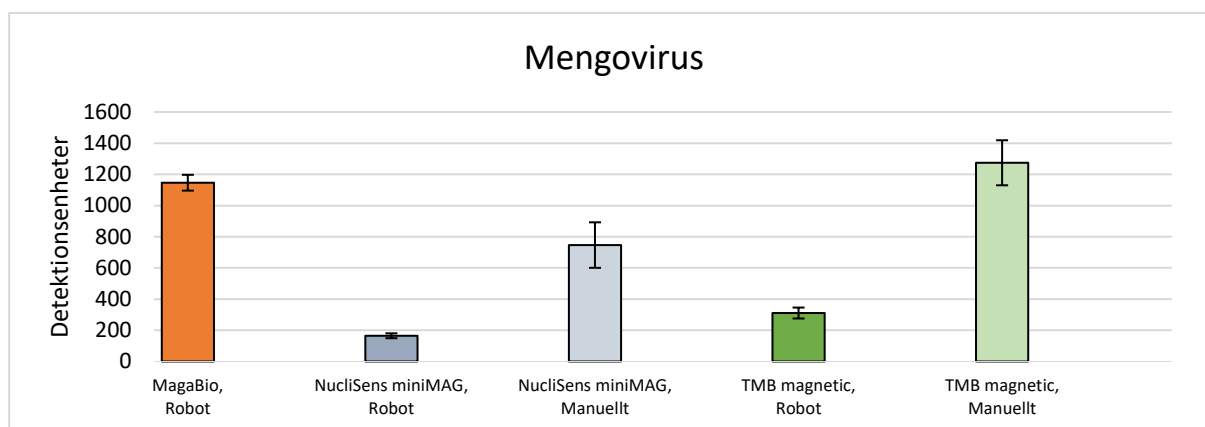
Figur 17. Medelkoncentration (CFU/mL) efter extraktion med MagaBio plus Virus DNA/RNA Purification Kit III, robotextraktion med NucliSens miniMAG och TMB magnetic samt manuellt genomförda extraktioner med NucliSens miniMAG och TMB magnetic, för *B. cereus*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.



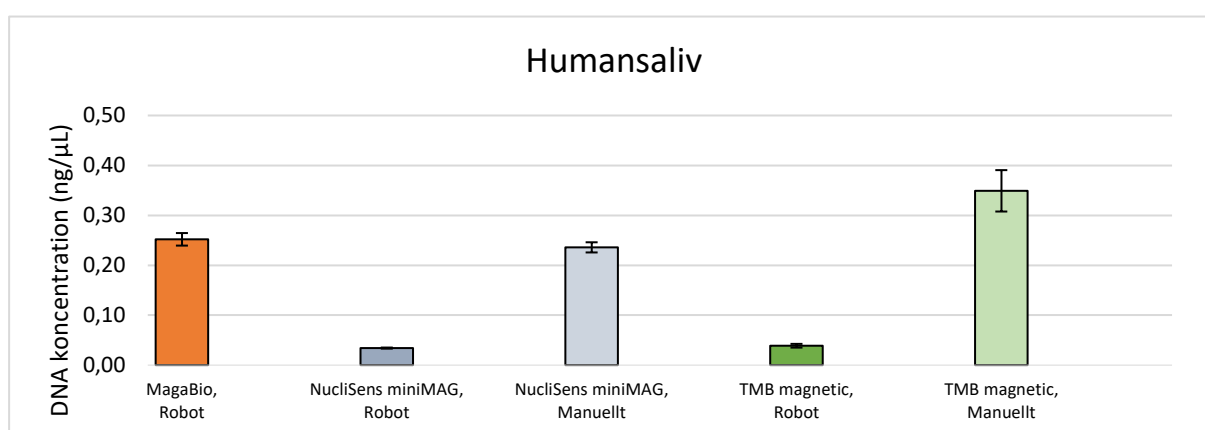
Figur 18. Medelkoncentration (CFU/mL) efter extraktion med MagaBio plus Virus DNA/RNA Purification Kit III, robotextraktion med NucliSens miniMAG och TMB magnetic samt manuellt genomförda extraktioner med NucliSens miniMAG och TMB magnetic, för *S. enterica*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.



Figur 19. Medelkoncentration (CFU/mL) efter extraktion med MagaBio plus Virus DNA/RNA Purification Kit III, robotextraktion med NucliSens miniMAG och TMB magnetic samt manuellt genomförda extraktioner med NucliSens miniMAG och TMB magnetic, för *S. cerevisiae*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.



Figur 20. Medelkoncentration (detektionsenheter) efter extraktion med MagaBio plus Virus DNA/RNA Purification Kit III, robotextraktion med NucliSens miniMAG och TMB magnetic samt manuellt genomförda extraktioner med NucliSens miniMAG och TMB magnetic, för Mengovirus. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.



Figur 21. Medelkoncentration (ng/μL) efter extraktion med MagaBio plus Virus DNA/RNA Purification Kit III, robotextraktion med NucliSens miniMAG och TMB magnetic samt manuellt genomförda extraktioner med NucliSens miniMAG och TMB magnetic, för humansaliv. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.

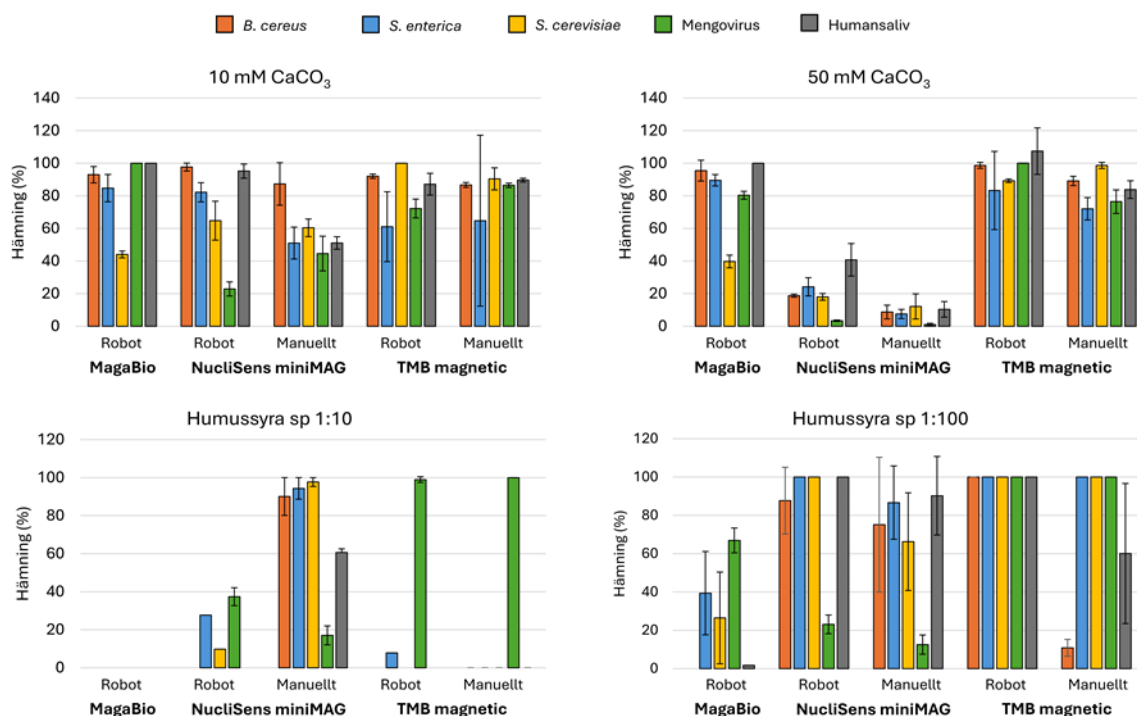
4.3.3 Hämmartålighet

Hämmartåligheten utvärderades för robotextraktioner med TMB magnetic, NucliSens miniMAG samt kitet MagaBio plus Virus DNA/RNA Purification Kit III (*BioFlux*), och jämfördes med manuellt genomförda extraktioner med TMB magnetic och NucliSens miniMAG. Som modell-hämmare användes CaCO_3 för att efterlikna de vita pulver som ibland ingår i s.k. anthrax-brev, samt humussyra som är ofta förekommande i jordprover. CaCO_3 utvärderades i två nivåer, en hög (50 mM) och en låg (10 mM). För humussyra användes 10 mg/mL. 630 μL av 5-agenscocktailen blandades med 70 μL av 500 mM respektive 100 mM CaCO_3 samt 100 mg/mL humussyra. Utvärderingen genomfördes i triplikat för varje hämmare och nivå, med en ingående volym på 200 μL och en elueringsvolym på 100 μL. I

utvärderingen inkluderades även en positiv kontroll, där 70 µL Ambion nukleasfritt vatten (Invitrogen) tillsattes i stället för hämmare. Samtliga protokoll finns på en gemensam myndighetsarea. Extrakten analyserades med qPCR (QuantStudio 5, *Thermo Fisher Scientific*). Extrakten med humussyra späddes 1:10 samt 1:100 innan analys med qPCR. Koncentrationsangivelserna för proven med hämmare dividerades med resultaten för de positiva kontrollerna för att erhålla relativ hämning, det vill säga att 100 % motsvarar att analyserna inte stördes av hämmarna.

Robotextraktionerna kunde hantera den lägre mängden CaCO₃ lika bra som de manuellt genomförda extraktionerna med respektive metod (Figur 22). För hög mängd CaCO₃ var TMB magnetic betydligt bättre på att hantera hämmaren jämfört med NucliSens miniMAG. Robotextraktioner och manuellt genomförda extraktioner visade likvärdiga resultat även där. MagaBio hanterade båda mängderna CaCO₃ bra, med undantag för *S. cerevisiae* som gav koncentrationsangivelser på ca. 40% jämfört med den positiva kontrollen för båda mängderna. MagaBio klarade inte av att extrahera och rena prover med humussyra på ett effektivt sätt. Prover med humussyra spädda 1:10 och körda med MagaBio var helt hämmade för samtliga agens. TMB magnetic uppvisade totalhämning för vissa agens. Robotextraktion med NucliSens miniMAG hade också svårigheter att hantera den höga mängden humussyra. Manuellt genomförd extraktion med NucliSens miniMAG klarade dock att extrahera och rena *B. cereus*, *S. enterica* och *S. cerevisiae*, men visade svårigheter med Mengovirus och humansaliv. TMB magnetic kunde hantera prover med humussyra spädda 1:100, både med robot och manuellt utfört, med undantag för *B. cereus* för den manuella extraktionen. MagaBio uppvisade hämmande effekter även för prov spädda 1:100.

De största skillnaderna i hämmartålighet noterades således mellan olika metoder, inte mellan manuell och automatiserad DNA/RNA-extraktion. MagaBio och TMB magnetic hanterade överlag det vita pulvret bättre än NucliSens miniMAG. För humussyra var resultaten omvända, i och med att NucliSens miniMAG uppvisade högst hämmartålighet och MagaBio var mest lättpåverkad.



Figur 22. Medelvärde för den relativa hämningen för prov med hämmare jämfört med positiva kontroller. Värdet 100 % innebär att provet med hämmare gav samma koncentrationvärde som de positiva kontrollerna, d.v.s. ingen hämmande effekt observerades. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, n=3.

4.4 UTVÄRDERING AV DNA/RNA-UTBYTE FÖR 22 OLIKA EXTRAKTIONSMETODER

Vid kris och störda förhållanden är det av stor vikt att ha tillgång till alternativa metoder som vid behov snabbt kan ersätta de metoder som normalt används. Detta kan göras endera genom att laboratoriet sätter upp nya metoder internt eller att DNA/RNA-extraktioner utförs hos ett annat laboratorium i FBD-nätverket. I båda fallen är det avgörande för snabb implementering att prestandan för de alternativa metoderna är känd innan störningen sker. Här har 22 DNA/RNA-extraktionsmetoder utvärderats och jämförts för fyra olika mikrobiella agens: *S. enterica*, *B. cereus*, *S. cerevisiae*, samt Mengovirus. Metoderna bygger på olika principer för extraktion och rening och inkluderar automatiserade kommersiella kit, manuella protokoll för rening och snabbprotokoll där extraktionen utförs i ett rör. De kan delas in i magnetkulebaserade metoder (automatiserade och manuella), spinnkolonn-metoder, organiska metoder samt snabbprotokoll. Metoderna listas i Tabell 6.

Tabell 6. Samtliga 22 extraktionsmetoder som utvärderades med avseende på DNA/RNA-utbyte och deras respektive slutvolym.

Metod	Leverantör	Kategori	Slutvolym
Maelstrom 9600	<i>TANBead</i>	Magnetkulator	100 µL
Maelstroem 4800	<i>TANBead</i>	Magnetkulator	100 µL
magLEAD DNA	<i>PSS</i>	Magnetkulator	100 µL
GenoXtract DNA	<i>Bruker</i>	Magnetkulator	100 µL
EZ1 DNA Tissue	<i>Qiagen</i>	Magnetkulator	100 µL
EZ1 Virus Mini	<i>Qiagen</i>	Magnetkulator	100 µL
MagaBio plus Virus DNA/RNA Purification Kit III	<i>BioFlux</i>	Magnetkulator	100 µL
NucleoMag Pathogen kit	<i>Macherey-Nagel</i>	Magnetkulator	100 µL
NucliSens miniMAG	<i>bioMérieux</i>	Magnetkulator	100 µL
TMB magnetic	<i>In-house</i>	Magnetkulator	100 µL
QIAamp (grampositiva bakterier)	<i>Qiagen</i>	Spinnkolonner	100 µL
QIAamp (humanceller)	<i>Qiagen</i>	Spinnkolonner	100 µL
FastDNA Spin kit for soil	<i>MP Biomedicals</i>	Spinnkolonner	100 µL
Phenol/chloroform	<i>In-house</i>	Organiskt	100 µL
TRIzol	<i>Invitrogen</i>	Organiskt	100 µL
NucleoZOL	<i>Macherey-Nagel</i>	Organiskt	100 µL
ChelexDirekt	<i>BioRad</i>	Snabbprotokoll	250 µL
Alkalint protokoll	<i>In-house</i>	Snabbprotokoll	250 µL
Guanidine thiocyanate extraction	<i>In-house</i>	Snabbprotokoll	202 µL
Proteinas K extraction	<i>In-house</i>	Snabbprotokoll	225 µL
QuickExtract DNA (projekt 26)	<i>Biosearch Technologies</i>	Snabbprotokoll	400 µL
QuickExtract DNA (manual)	<i>Biosearch Technologies</i>	Snabbprotokoll	400 µL

Inledningsvis gjordes en screening av samtliga metoder med en agenscocktail bestående av fyra mikrobiella agens: *S. enterica*, *B. cereus*, *S. cerevisiae*, samt Mengovirus (Tabell 5). Observera att cocktailen även innehöll humansaliv som inkluderades i försöken i Sektion 4.2.3, men inte ingår här. Cocktailen kallas dock även här för 5-agenscocktail. Mikroorganismerna valdes som modellorganismer för gramnegativa och grampositiva bakterier, eukaryota celler, och RNA-virus. 5-agenscocktailen utgör också ett mer komplext prov jämfört med om ett agens analyseras åt gången, vilket ställer hårdare krav på extraktionsmetoderna. Därför ansågs denna som en bra grund för att screena fram lovande metoder. Metoderna som presterade bäst för 5-agenscocktailen valdes ut för vidare tester med ett agens i taget.

Samma agensmängder som i 5-cocktailen användes och vatten tillsattes för att ersätta volymen av övriga agens. Utvärderingen med ett agens gjordes för *S. enterica*, *B. cereus*, *S. cerevisiae* samt Mengovirus. Metoderna som utvärderades för vilket agens finns listade i Tabell 7 nedan. Koncentrationerna anges i cfu/mL, beräknat från Cq-värden, på samma som i Sektion 4.2.3.

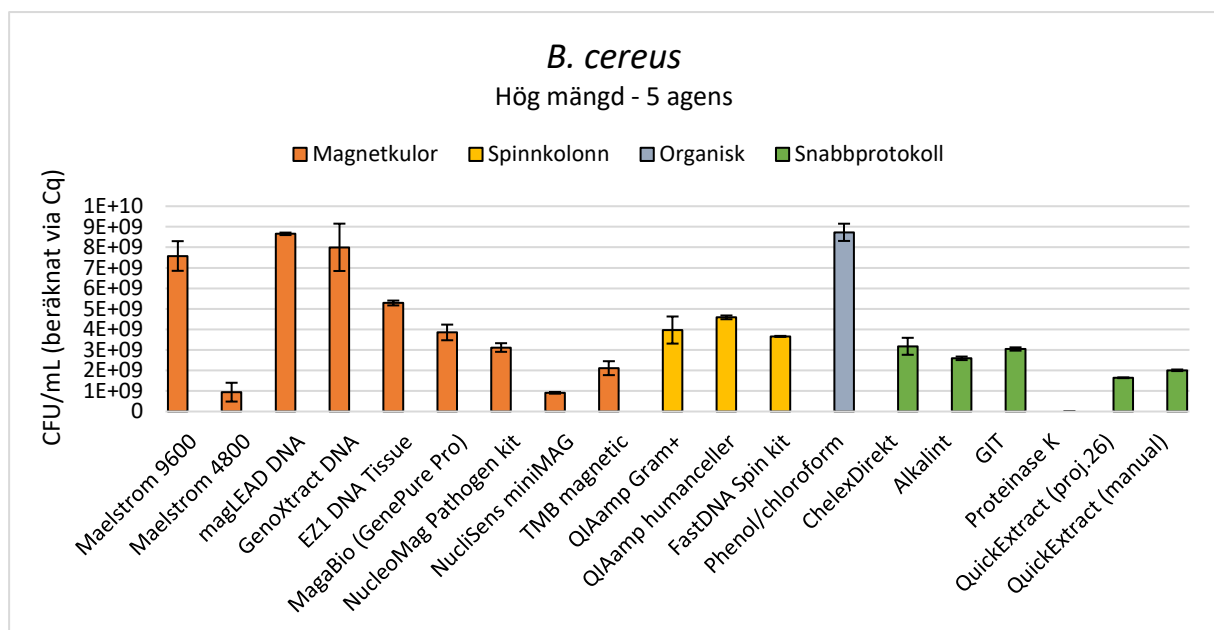
Tabell 7. Uppräkning av de DNA/RNA-extraktionsmetoder som utvärderades med ett agens i taget, samt för vilket agens detta gjordes. Metoderna valdes utifrån prestanda med 5-agenscocktailen.

Agens	Metoder
<i>B. cereus</i>	NucliSens miniMAG
	TMB magnetic
	QIAamp (grampositiva bakterier)
	Phenol/Chloroform
	Proteinas K extraktion
	QuickExtract (manual)
<i>S. enterica</i>	NucliSens miniMAG
	TMB magnetic
	QIAamp (grampositiva bakterier)
	Phenol/Chloroform
	Proteinas K extraktion
	QuickExtract (manual)
<i>S. cerevisiae</i>	FastDNA Spin kit for soil
	Phenol/Chloroform
	Yeast DNA Extraction Kit (Thermo Scientific)
Mengovirus	NucliSens miniMAG
	TMB magnetic
	QIAamp (humanceller)
	Phenol/Chloroform
	QuickExtract (manual)

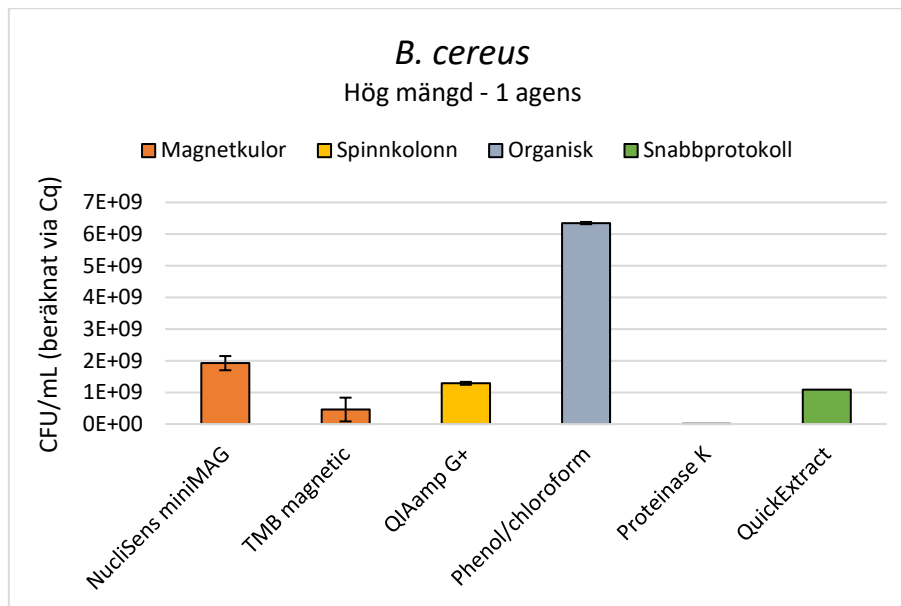
Samtliga metoder hade en ingångsvolym på 200 µL och de protokoll som tillät hade en elueringsvolym på 100 µL. Extraktionerna genomfördes i triplikat och extrakten analyserades med qPCR (QuantStudio 5, Thermo Fisher Scientific).

4.4.1 *B. cereus*

Phenol/chloroform-metoden gav högst DNA-utbyte för hög mängd *B. cereus* vid såväl extraktion av agenscocktail som vid endast ett agens (Figur 23-24). För agenscocktailen gav Maelstrom 9600, magLEAD DNA och GenoXtract DNA likvärdiga utbyten som phenol/chloroform. Värt att notera är att snabbprotokollen har en slutvolym på >200 µL, jämfört med 100 µL för de magnetkulebaserade metoderna, vilket leder till utspädning av DNA i eluaten. Vissa snabbprotokoll gav ändå likvärdiga koncentrationer som några av de magnetbaserade metoderna samt metoder med spinnkolonner för agenscocktailen. För extraktion av ett agens åt gången gav QuickExtract (slutvolym 400 µL) högre agenskonsentration än TMB magnetic (slutvolym 100 µL) och likvärdig koncentration som QIAamp för grampositiva bakterier (slutvolym 100 µL). För agenscocktailen gav TMB magnetic högre utbyte än NucliSens miniMAG, men för endast ett agens gav NucliSens miniMAG högre än TMB magnetic. Detta skulle kunna bero på att TMB magnetic är bättre att hantera den komplexa matrisen som agenscocktailen utgör medan NucliSens miniMAG fungerar bättre för renare prover.

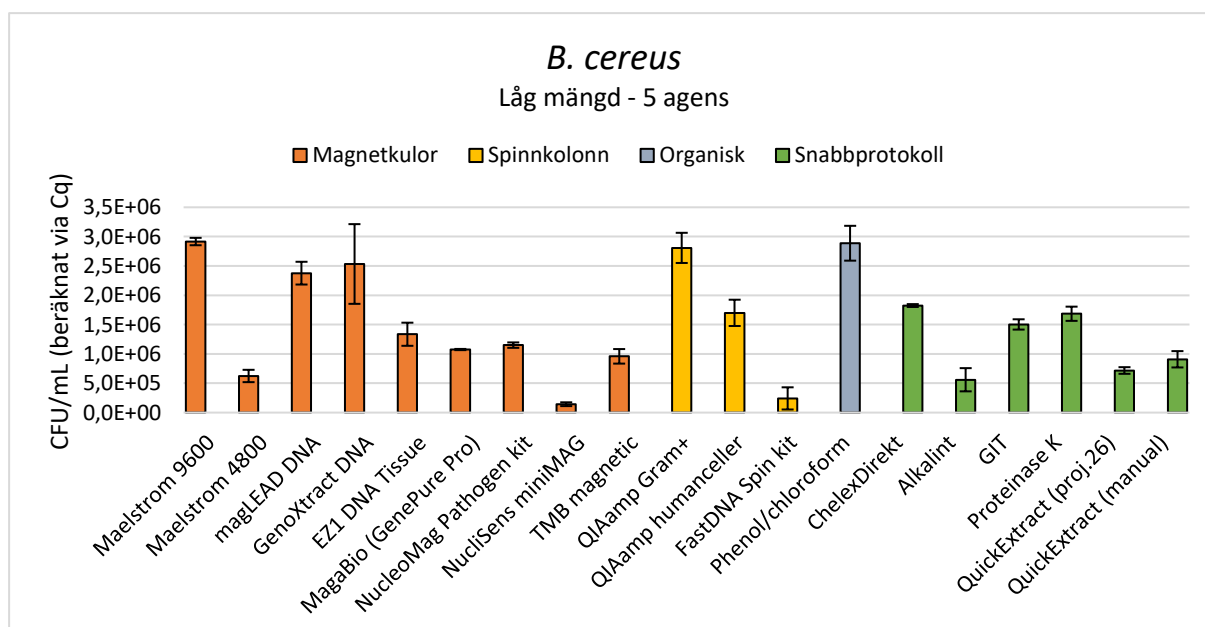


Figur 23. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av 5-agenscocktail med hög mängd *B. cereus*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, n=3.

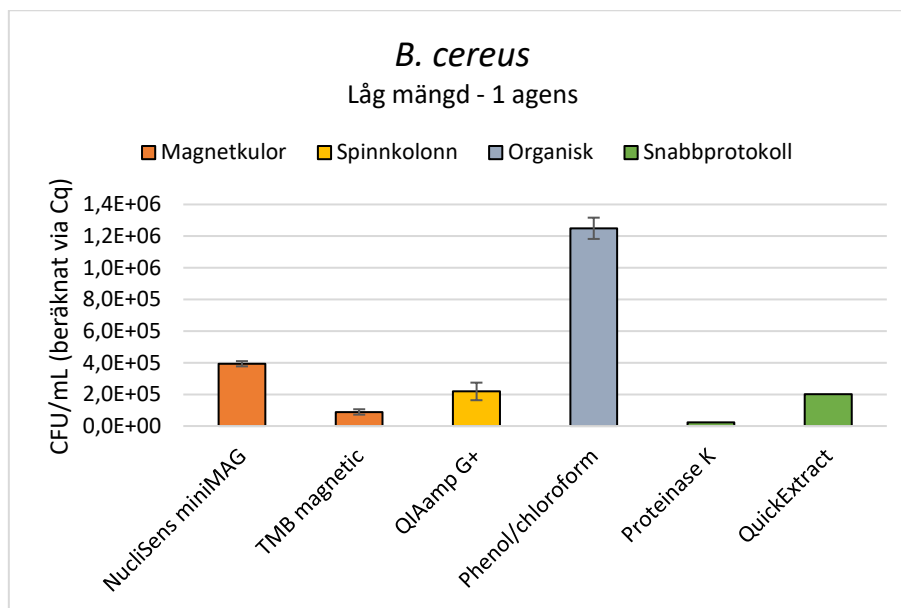


Figur 24. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av endast ett agens åt gången för hög mängd *B. cereus*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.

Samma mönster i resultat går att se för den låga mängden *B. cereus* som för den höga, både för agenscocktailen och vid endast ett agens, med undantag för QIAamp för grampositiva bakterier för agenscocktailen som där gav likvärdigt DNA-utbyte som phenol/chloroform-metoden (Figur 25-26).



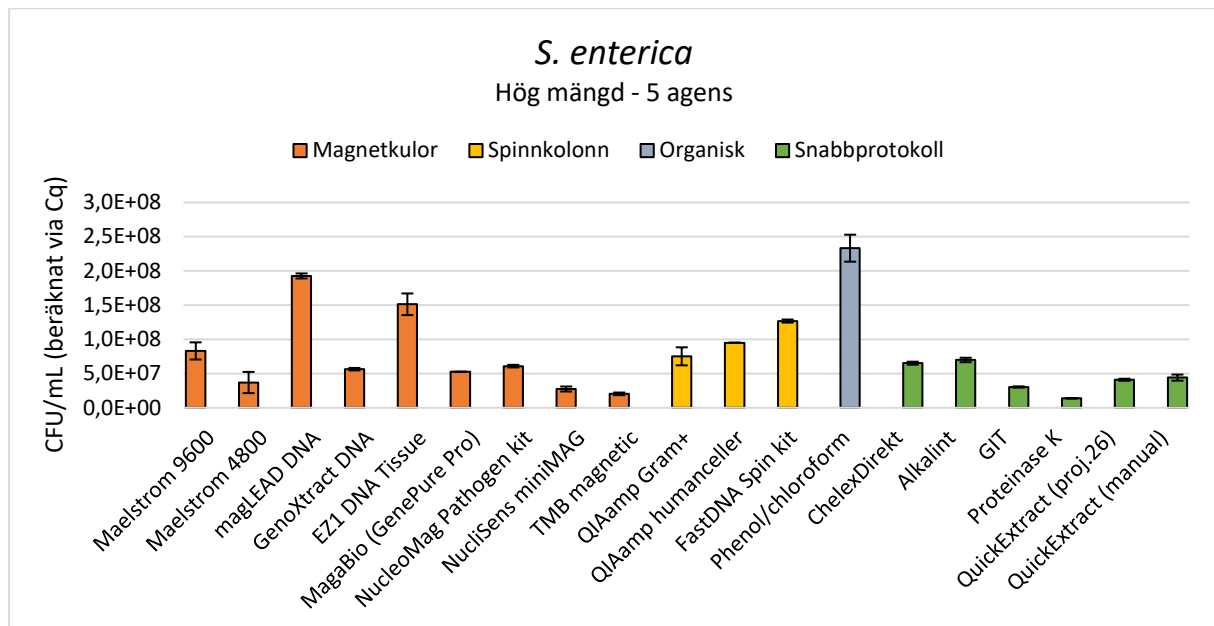
Figur 25. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av cocktail med låg mängd *B. cereus*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.



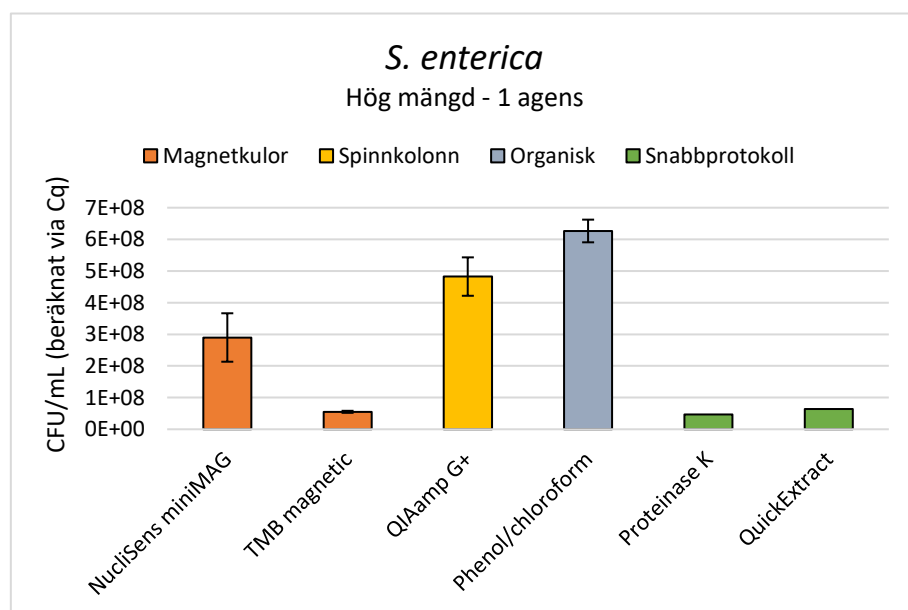
Figur 26. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av endast ett agens åt gången för låg mängd *B. cereus*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.

4.4.2 *S. enterica*

Phenol/chloroform-metoden gav högst DNA-utbyte för hög mängd *S. enterica*, för både agenscocktail och ett agens (Figur 27-28). För 5-agenscocktailen gav NucliSens miniMAG och TMB magnetic likvärdiga DNA-utbyten, men för ett agens gav NucliSens miniMAG högre utbyte än TMB magnetic. För ett agens gav också QIAamp för grampositiva bakterier betydligt bättre DNA-utbyte i förhållande till phenol/chloroform jämfört med för agenscocktailen. För agenscocktailen gav flera snabbprotokoll högre eller likvärdiga DNA-utbyten som de sämsta magnetmetoderna, trots att de förra hade en högre slutvolym ($>200 \mu\text{L}$) och presenterade värden är koncentrationer. För extraktion av ett agens gav Proteinase K extraktion och QuickExtract likvärdigt utbyte som TMB magnetic.



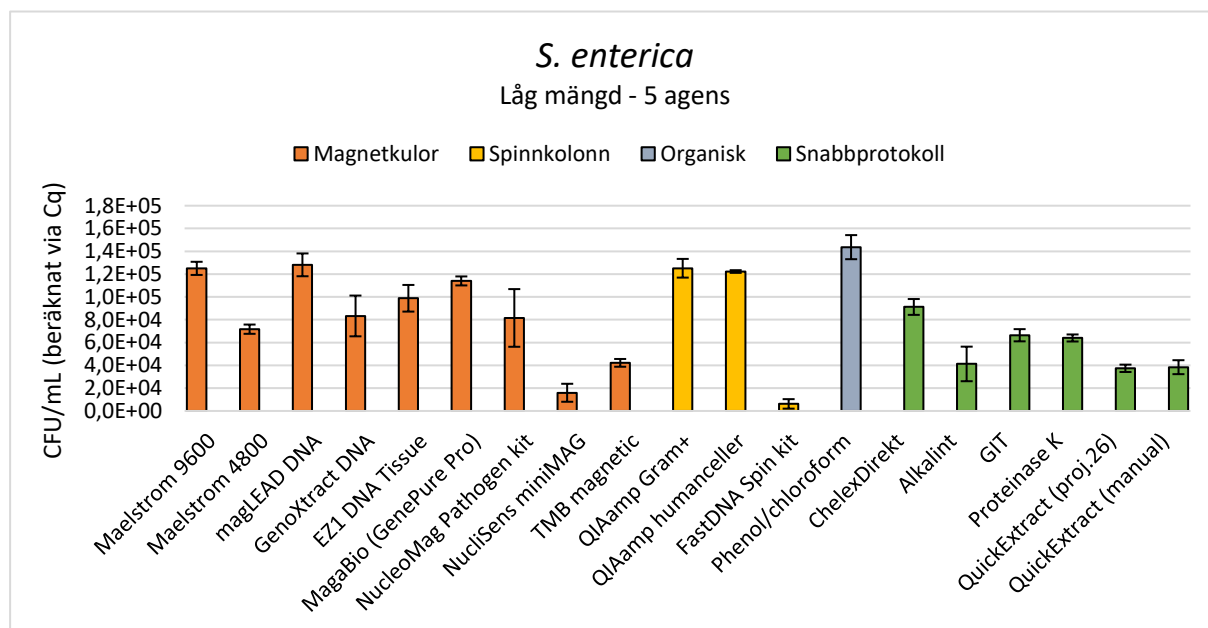
Figur 27. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av cocktail med hög mängd *S. enterica*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.



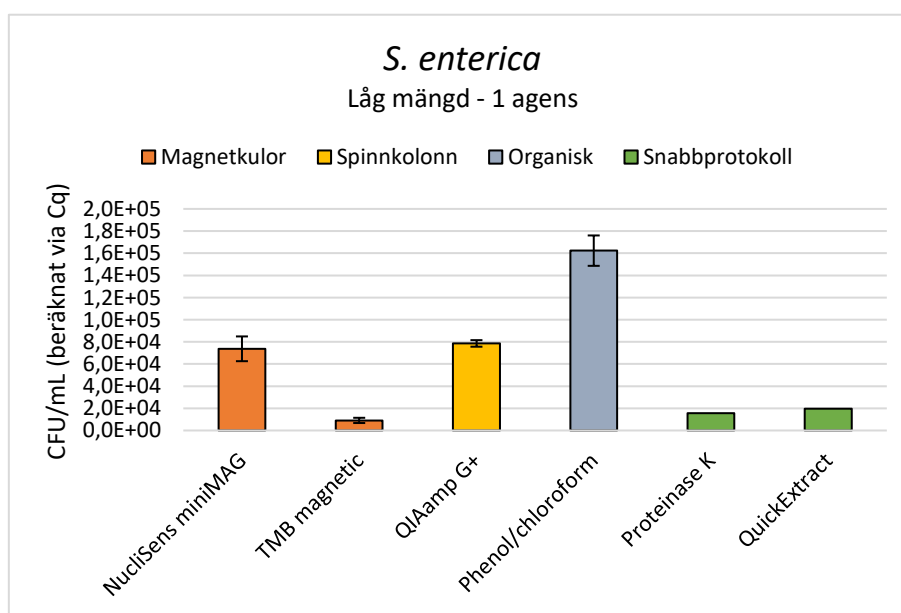
Figur 28. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av endast ett agens åt gången för hög mängd *S. enterica*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.

För den låga mängden *S. enterica* presterade metoderna jämnare i förhållande till varandra jämfört med för den höga mängden för agenscocktailen (Figur 29). FastDNA Spin kit presterade dock sämre i förhållande till de andra metoderna för den låga mängden. Extraktion med Proteinase K och GIT låg i botten av snabbprotokollen för den höga mängden, men ligger för den låga mängden i toppen efter ChelexDirekt. Detta kan bero på att de lägre mängderna, och ett agens istället för cocktail, innebär

mindre komplexa prover att hantera för metoderna. Vid extraktion av *S. enterica* utgör ju övriga agens potentiellt störande moment. Vid ett agens syns samma mönster för den låga mängden *S. enterica* som för den höga, med undantag för QIAamp för grampositiva bakterier som är mer likvärdig med NucliSens miniMAG för den låga mängden (Figur 30).



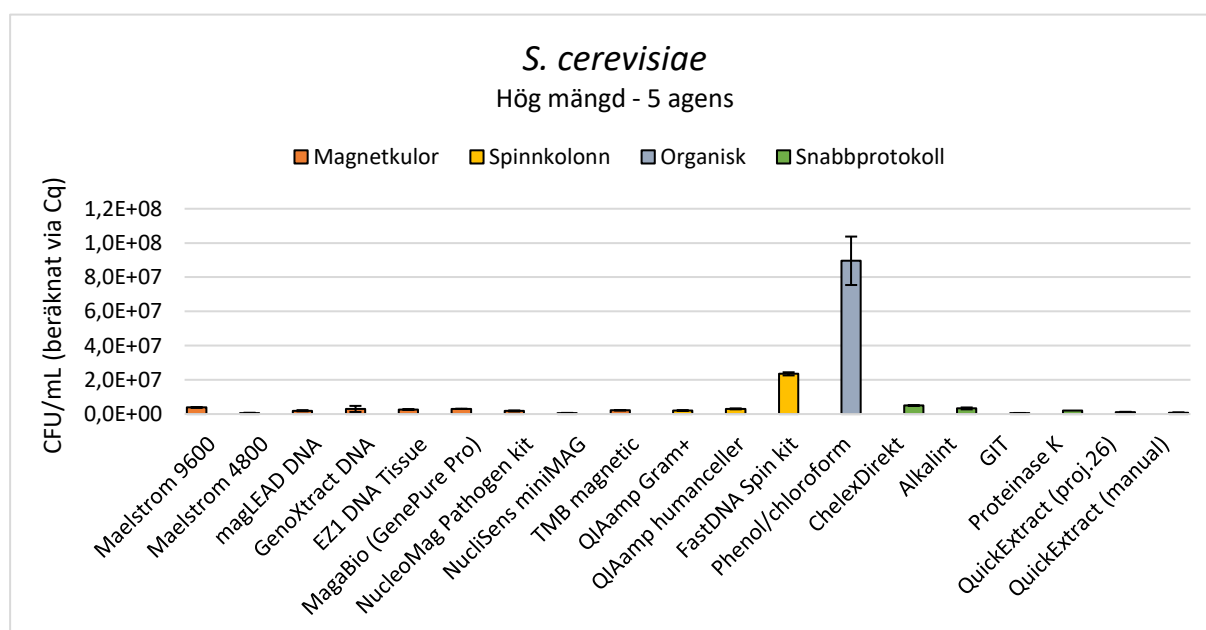
Figur 29. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av cocktail med låg mängd *S. enterica*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.



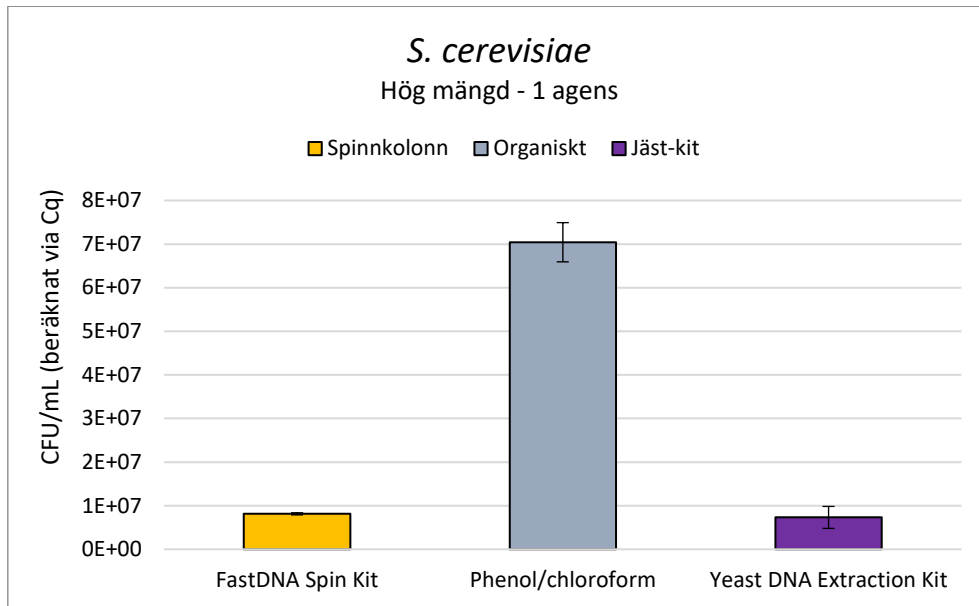
Figur 30. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av endast ett agens åt gången för låg mängd *S. enterica*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.

4.4.3 *S. cerevisiae*

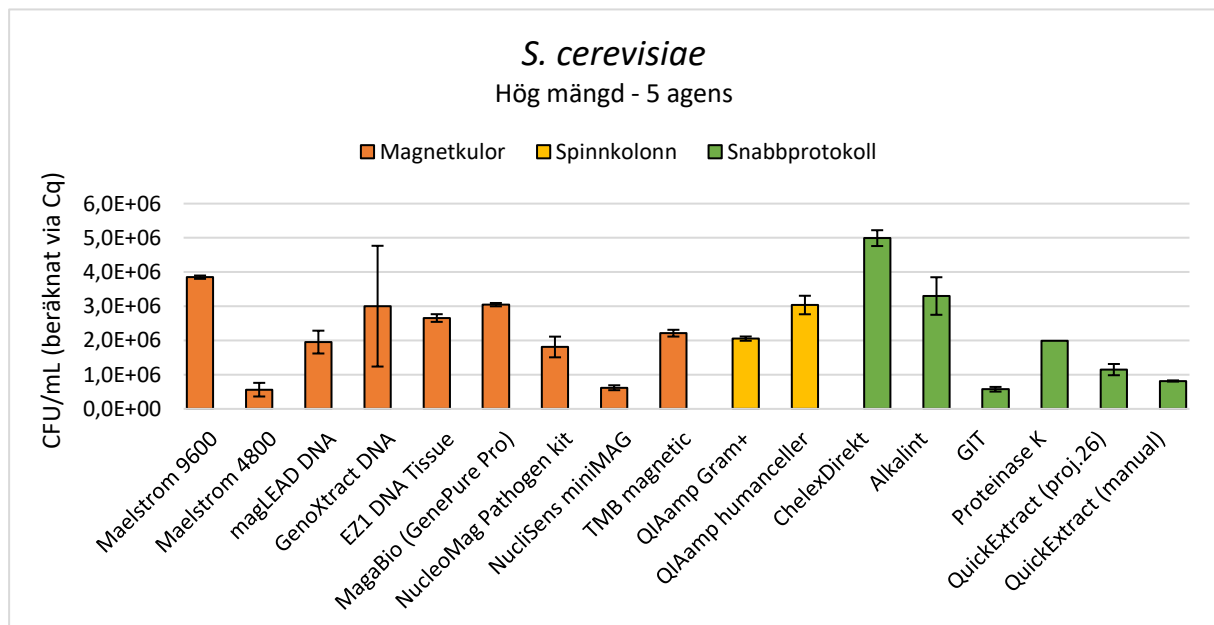
Phenol/chloroform-metoden gav högst utbyte för hög mängd *S. cerevisiae* för både agenscocktail och ett agens (Figur 31 och 32). För agenscocktailen gav FastDNA Spin kit näst högst utbyte, dock betydligt lägre än phenol/chloroform. För ett agens inkluderades även det specialiserade kitet Yeast DNA Extraction Kit (*Thermo Scientific*) som gav likvärdigt utbyte som FastDNA Spin kit och alltså lägre än phenol/chloroform. Exkluderar vi metoderna phenol/chloroform och FastDNA Spin kit gav ChelexDirekt högst utbyte av övriga metoder (Figur 33). Det alkalina snabbprotokollet gav likvärdigt utbyte som de bästa magnetmetoderna, trots en högre slutvolym för snabbprotokollen (250 µL). Maelstrom 4800, NucliSens miniMAG, GIT extraktion och QuickExtract gav lägst DNA-utbyte.



Figur 31. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av cocktail med hög mängd *S. cerevisiae*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.



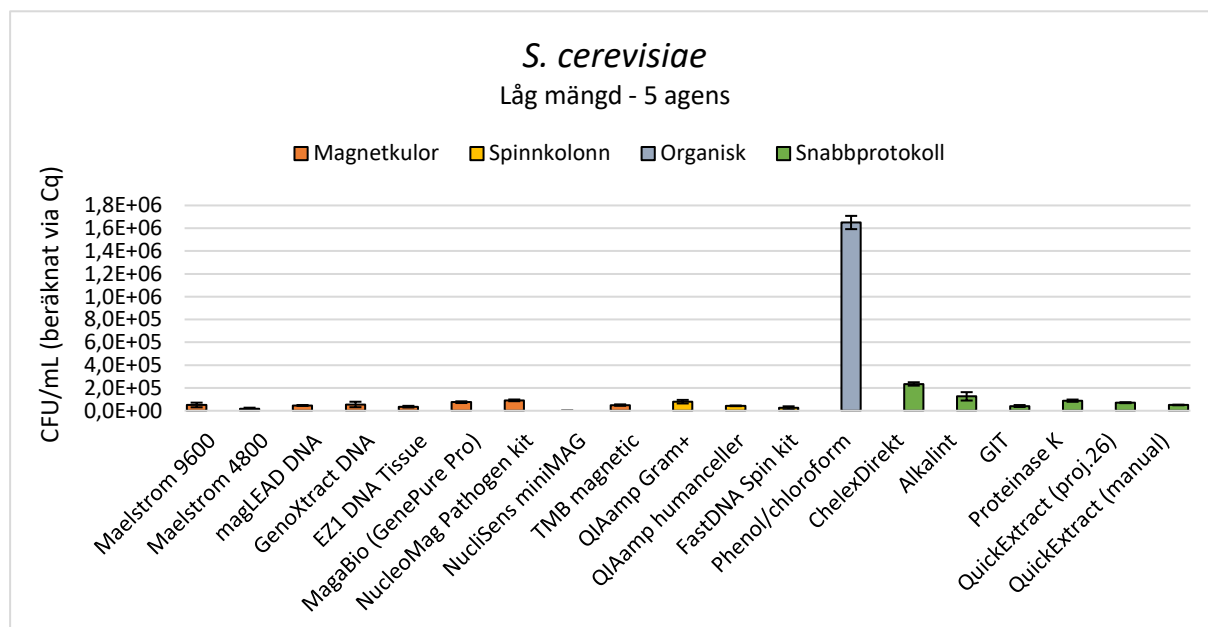
Figur 32. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av endast ett agens åt gången för hög mängd *S. cerevisiae*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, n=3.



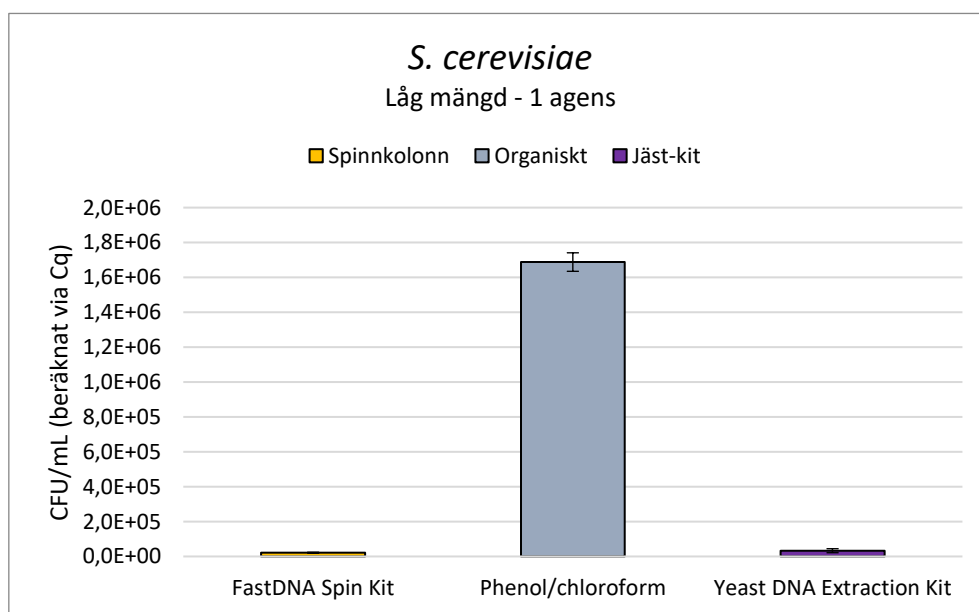
Figur 33. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av cocktail med hög mängd *S. cerevisiae*, där phenol/chloroform samt FastDNA Spin kit för soil exkluderas. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, n=3.

Phenol/chloroform-metoden gav överlägset högst DNA-utbyte även för den låga mängden, både för agenscocktail samt för ett agens (Figur 34 och 35). FastDNA Spin kit gav sämre utbyte i relation till de andra metoderna för den låga mängden jämfört med den höga mängden (Figur 36). För den låga

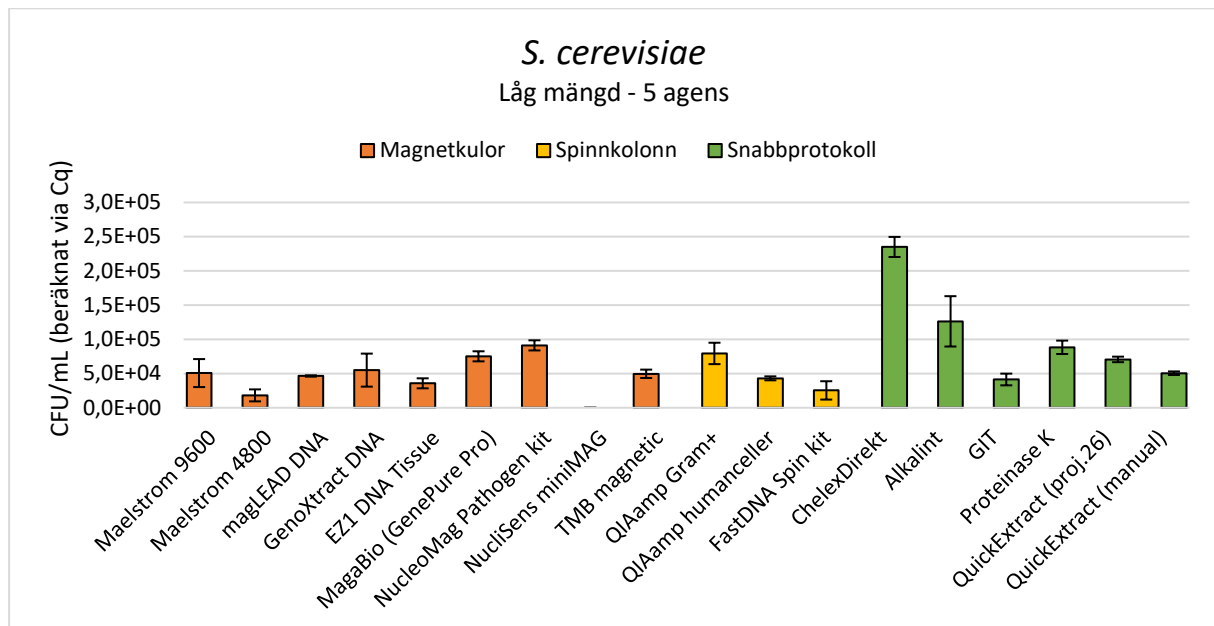
mängden stack ChelexDirekt ut med ett högre utbyte i förhållande till övriga metoder. NucliSens miniMAG gav inget detekterbart DNA för den låga mängden.



Figur 34. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av cocktail med låg mängd *S. cerevisiae*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.



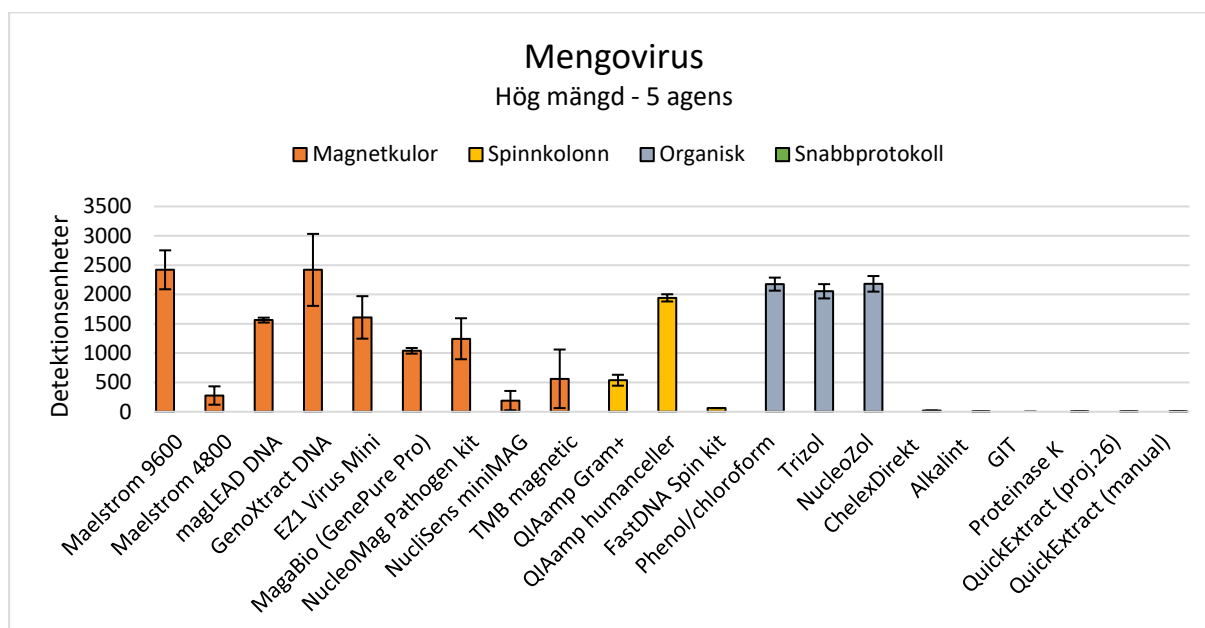
Figur 35. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av endast ett agens åt gången för låg mängd *S. cerevisiae*. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.



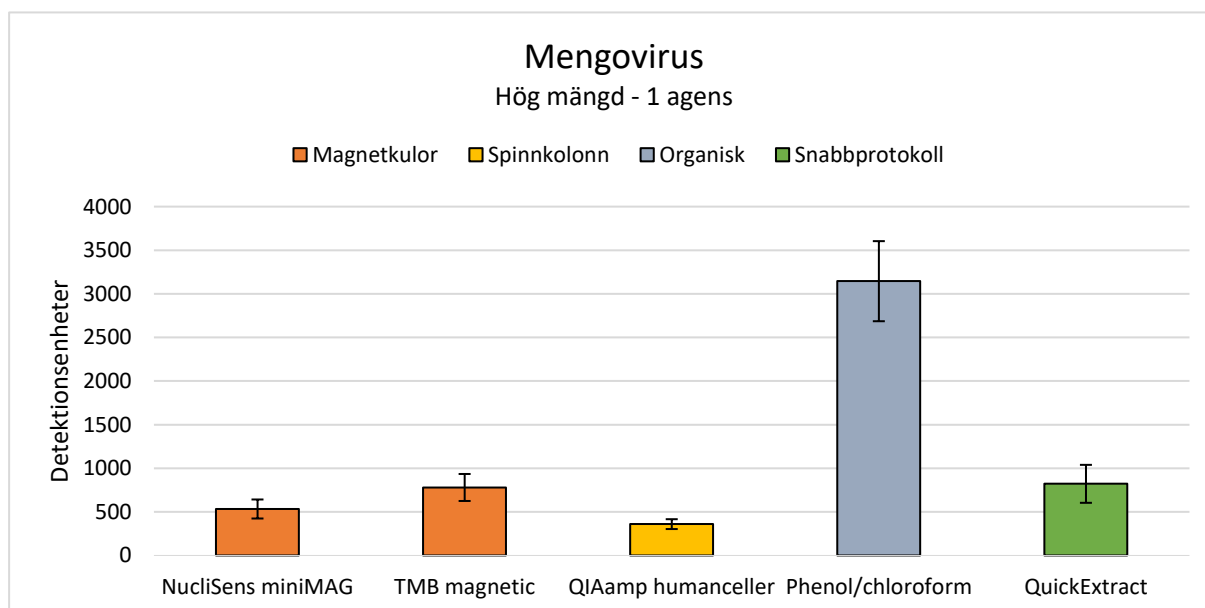
Figur 36. Medelkoncentration (CFU/mL) för extraktion av cocktail med låg mängd *S. cerevisiae*, där phenol/chloroform exkluderas. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.

4.4.4 Mengovirus

För Mengovirus gav samtliga organiska metoder, QIAamp för humanceller, GenoXtract DNA samt Maelstrom 9600 högst RNA-utbyte för hög mängd av agenscocktailen (Figur 37). Snabbprotokollen gav lägst utbyte tillsammans med FastDNA Spin kit, NucliSens miniMAG samt Maelstrom 4800. För ett agens gav phenol/chloroform högst RNA-utbyte (Figur 38). QuickExtract gav bättre utbyte i förhållande till de andra metoderna jämfört med för 5-agenscocktailen. För ett agens gav även TMB magnetic högre utbyte än NucliSens miniMAG. Mengovirus var det enda agens där TMB magnetic presterade bättre än NucliSens miniMAG vid ett agens-försöken.

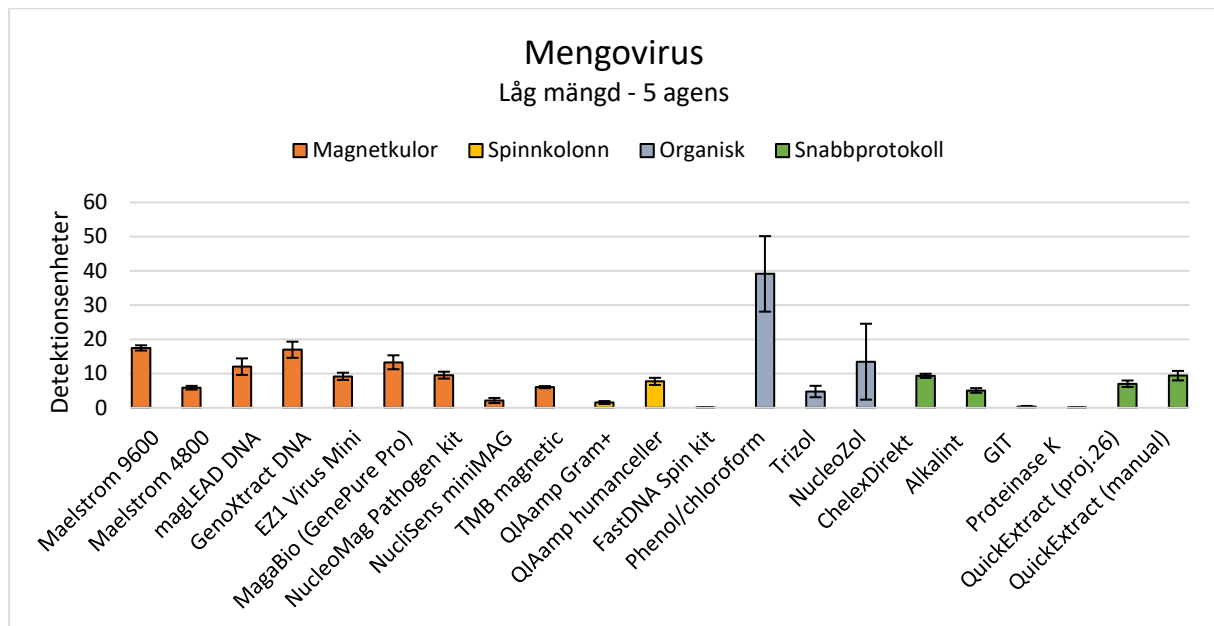


Figur 37. Medelkoncentration (detektionsenheter) efter extraktion av agenscocktail med hög mängd Mengovirus. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, n=3.

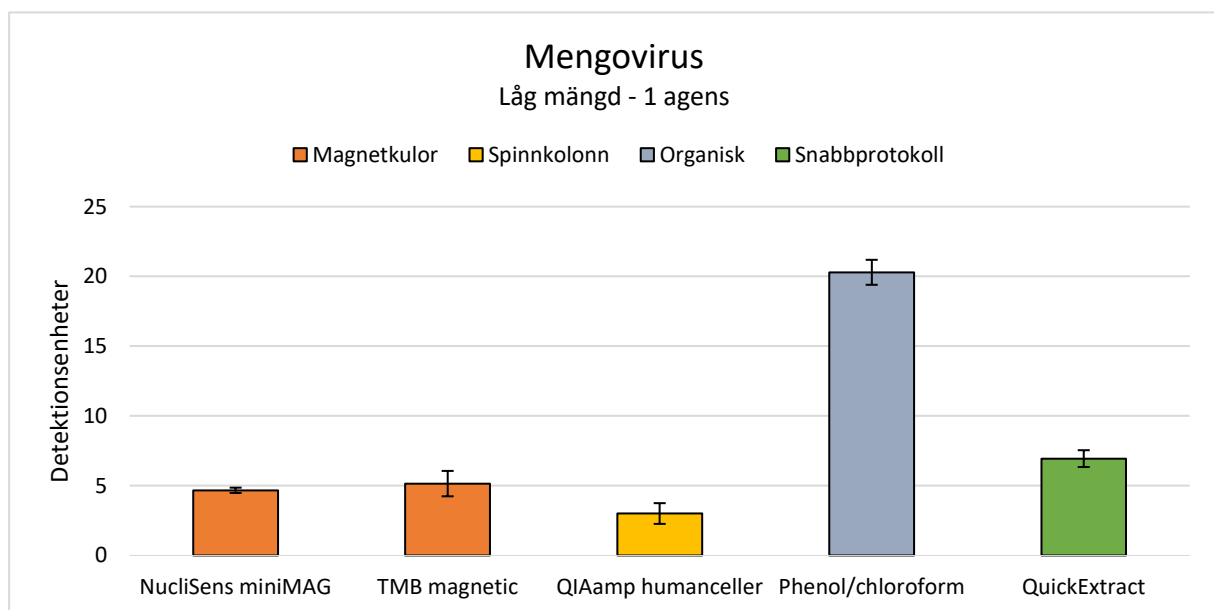


Figur 38. Medelkoncentration (detektionsenheter) efter extraktion av endast ett agens åt gången för hög mängd Mengovirus. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, n=3.

För låg mängd Mengovirus gav phenol/chloroform bäst utbyte medan övriga metoder som presterade bra för hög mängd gav sämre resultat (Figur 39). Snabbprotokollen gav bättre utbyte i förhållande till övriga metoder jämfört med för den höga mängden. För ett agens gav phenol/chloroform också bäst utbyte (Figur 40). QuickExtract, TMB magnetic och NucliSens miniMAG gav likvärdiga RNA-utbyten.



Figur 39. Medelkoncentration (detektionsenheter) efter extraktion av cocktail med hög mängd Mengovirus. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.



Figur 40. Medelkoncentration (detektionsenheter) efter extraktion av endast ett agens åt gången för hög mängd Mengovirus. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, $n=3$.

4.5 OPTIMERING OCH UTVÄRDERING AV SNABBPROTOKOLL FÖR DNA-EXTRAKTION

Den enklaste typen av DNA-extraktionsprotokoll utgörs av ett rör, en lyseringsbuffert, vortexning och inkuberingar. Dessa så kallade snabbprotokoll möjliggör korta analystider, lite manuellt arbete och minimal DNA-förlust. Målet i denna studie var att optimera och jämföra snabbprotokoll baserade på olika principer, med avseende på utbyte och DNA-stabilitet.

4.5.1 Chelex-baserad DNA-extraktion

I Chelexbaserad DNA-extraktion ingår en avslutande inkubering vid 100°C i värmeskåp i 20 till 40 minuter. Denna höga temperatur kan ha negativ påverkan på de insatsrör som kan användas i snabbprotokoll eftersom de flesta tillverkare inte rekommenderar att de utsätts för över 70°C. Därför undersöktes olika temperaturer och inkubationstider varpå utbyte och stabilitet jämfördes. Humansaliv som låtits torka in på glas och topsats med bomullstops användes som DNA-källa. Inga skillnader i DNA-utbyte iaktogs mellan de olika inkuberingstiderna vid 100°C (5 till 20 minuter), och inte heller mellan de olika temperaturerna (70 till 100°C) (Tabell 8). DNA-degradering leder till mindre mängder mätbart DNA. Inga extrakt uppvisade några tecken på tydlig nedbrytning av DNA efter 21 dagar i kylskåp.

Tabell 8. DNA-koncentration för modifierade Chelex Direkt-protokoll. Medelvärde och standardavvikelse presenteras för olika tidpunkter efter genomförd extraktion. $n=3$.

Chelex-extraktion (°C/min)	DNA-konc. medel (ng/μL) 0 dgr	DNA-konc. medel (ng/μL) 7 dgr i kylskåp	DNA-konc. medel (ng/μL) 21 dgr i kylskåp	DNA-konc. medel (ng/μL) 21 dgr i kylskåp + frysning/tining
100°C/20min	0,18 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,003	0,19 ± 0,04
100°C/15min	0,19 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,02
100°C/10min	0,17 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,02
100°C/5min	0,17 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,18 ± 0,02
90°C/20min	0,21 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,03
80°C/20min	0,14 ± 0,02	0,18 ± 0,05	0,14 ± 0,04	0,14 ± 0,03
70°C/20min	0,17 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,15 ± 0,04	0,16 ± 0,04

4.5.2 Alkalin DNA-extraktion

Alkalin DNA-extraktion bryter ner även mer svårlyserade celler såsom humana spermier. Lyseringen sker med hjälp av tillsats av natriumhydroxid (NaOH). pH neutraliseras sedan med Tris-HCl. Det är ett mycket enkelt protokoll som inte är beroende av specifika leverantörer. Här utvärderades olika förhållanden mellan NaOH och Tris-HCl samt olika koncentrationer av de båda, med syfte att identifiera det optimala protokollet med avseende på utbyte och pH-neutralisering. Humansaliv som låtits torka in på glas och topsats med bomullstops användes som DNA-källa. Ursprungsprotokollet med tillsats av lika mycket NaOH och Tris-HCl presterade sämst, med betydligt lägre DNA-utbyte än övriga varianter (Tabell 9). Högst utbyte genererades av protokollet med tillsats av 150 µL 0,1 M NaOH för lysering och 50 µL 0,5 M Tris-HCl. Ration 3:1 har också fördelen att en större volym buffert kan användas under själva lyseringen. Detta protokoll rekommenderas därför för fortsatta tester.

Tabell 9. DNA-koncentrationer för olika förhållanden och koncentrationer av NaOH och Tris-HCl i alkalin lysering. Medelvärde och standardavvikelse visas. $n=3$.

Ratio NaOH:Tris-HCl	Molaritet NaOH/Tris-HCl (M)	pH	Medel DNA-konc (ng/µL)
1:1	0,2/0,2	12,2	0,07 ± 0,03
1:1	0,2/0,5	8,2	0,19 ± 0,04
3:1	0,1/0,5	8,7	0,27 ± 0,04
3:1	0,2/1	8,8	0,17 ± 0,05
3:1	0,1/1	8,2	0,21 ± 0,02

4.5.3 Jämförelse mellan fyra snabbprotokoll

Fyra olika snabbprotokoll jämfördes med avseende på DNA-utbyte. Utöver Chelex-extraktion och alkalin lysering inkluderades den kommersiella metoden QuickExtract och ett in house-protokoll baserat på M-PER, ett reagens framtaget för proteinextraktion från mammalieceller. Humansaliv som låtits torka in på glas och topsats med bomullstops användes som DNA-källa. Chelex-extraktionen gav högst DNA-utbyte, följd av QuickExtract och alkalin lysering (Tabell 10). M-PER-metoden gav lågt utbyte och anses inte ändamålsenlig för DNA-extraktion. I vissa tester uppvisade alkalin lysering PCR-hämning, särskilt i kombination med flockad nylontops. Detta bör undersökas vidare innan eventuell validering och implementering av alkalin lysering. Det jämna utfallet mellan de tre bästa metoderna innebär att de skulle kunna fungera som komplementmetoder till varandra, exempelvis om det uppstår brist på något reagens.

Tabell 10. Jämförelse mellan fyra snabbprotokoll. Medelkoncentrationer och standardavvikelse anges. $n=3$.

Protokoll	DNA-konc. medel (ng/ μ L)
Chelex-extraktion	$0,24 \pm 0,08$
QuickExtract	$0,18 \pm 0,08$
Alkalin lysering	$0,14 \pm 0,03$
M-PER	$0,080 \pm 0,007$

4.6 KVALITETSBESTÄMNING AV DNA EFTER EXTRAKTION

Valet av DNA-extraktionsmetod kan påverka om det resulterande DNA:t är enkel- eller dubbelsträngat samt hur stora DNA-fragment som utvinns. Vid bibliotekspreparation inför sekvensering är det ofta viktigt att känna till DNA:ts kvalitet och integritet eftersom vissa metoder kräver exempelvis dubbelsträngat DNA för att fungera optimalt. I denna studie undersöktes hur DNA-kvaliteten med avseende på "strandedness" och fragmentering påverkades av olika relevanta DNA-extraktionsmetoder. Utöver DNA-kvalitet undersöktes metodernas DNA-utbyte för prov innehållande redan extraherat DNA. Försöket gjordes med högmolekylärt genomisk humant DNA (*Roche*). 10 μ L av 0,2 mg/mL DNA blandades med 190 μ L Ambion nukleasfritt vatten (*Invitrogen*) som sedan "extraherades" med nedan listade extraktionsmetoder (Tabell 11). Samtliga extraktionsprotokoll finns på en gemensam myndighetsarea. Samtliga metoder hade en ingångsvolym på 200 μ L och de protokoll som tillät hade en elueringsvolym på 100 μ L. De specifika volymerna specificeras i protokollen. Ett referensprov som inte genomgick något extraktionsprotokoll inkluderas också. Extraktionerna genomfördes i triplikat.

Tabell 11. Samtliga metoder som inkluderades i utvärdering av kvalitet av DNA efter extraktion.

Metod	Leverantör	Kategori
Maelstrom 9600	<i>TANBead</i>	Magnetkolor
Maelstroem 4800	<i>TANBead</i>	Magnetkolor
magLEAD DNA	<i>PSS</i>	Magnetkolor
GenoXtract DNA	<i>Bruker</i>	Magnetkolor
EZ1 DNA Tissue	<i>Qiagen</i>	Magnetkolor
MagaBio plus Virus DNA/RNA Purification Kit III	<i>BioFlux</i>	Magnetkolor
NucleoMag Pathogen kit	<i>Macherey-Nagel</i>	Magnetkolor
NucliSens miniMAG (manuellt)	<i>bioMérieux</i>	Magnetkolor
NucliSens miniMAG (GenePure Pro)	<i>bioMérieux</i>	
TMB magnetic (manuellt)	<i>In-house</i>	Magnetkolor

TMB magnetic (GenePure Pro)	<i>In-house</i>	
QIAamp (grampositiva bakterier)	<i>Qiagen</i>	Spinnkolonner
QIAamp (humanceller)	<i>Qiagen</i>	Spinnkolonner
FastDNA Spin kit for soil	<i>MP Biomedicals</i>	Spinnkolonner
Phenol/chloroform	<i>In-house</i>	Organiskt
ChelexDirekt	<i>BioRad</i>	Snabbprotokoll
Alkalint protokoll	<i>In-house</i>	Snabbprotokoll
Guanidine thiocyanate extraction	<i>In-house</i>	Snabbprotokoll
Proteinas K extraction	<i>In-house</i>	Snabbprotokoll
QuickExtract DNA (projekt 26)	<i>Biosearch Technologies</i>	Snabbprotokoll
QuickExtract DNA (manual)	<i>Biosearch Technologies</i>	Snabbprotokoll

Med en Qubit 3.0 Fluorometer mättes därefter mängden dsDNA samt ssDNA i samtliga extrakt inklusive referensprovet. DNA-mängderna användes sedan för att beräkna andelen dsDNA vs. ssDNA i proven. Protokoll för mätning av dsDNA och ssDNA samt beräkning av andelen finns beskrivet av Jansson *et al*, (2024). Extrakten analyserades också med HS Genomic DNA 50 kb kit (*Agilent Technologies*) på Fragment Analyzer (*Agilent Technologies*) enligt tillverkarens instruktioner. Efter analys erhålls ett medelvärde för fragmentstorlek, hur stor andel av DNA:t som ligger mellan vissa specifika fragmentlängder samt hur stor andel av fragmenten som ligger över ett satt tröskelvärde (GQN-värde, Genomic Quality Number). GQN är ett nummer mellan 0–10 som visar hos stor andel DNA som har fragmentstorlekar större än det satta tröskelvärdet. Är GQN-värdet 10 betyder det alltså att 100 % av DNA:t är längre än det satta tröskelvärdet. Tröskelvärdet sattes i denna studie till 10 kb. Extrakten kvantifierades med qPCR-kitet PowerQuant System (*Promega Corporation*) på en QuantStudio 5 (*Thermo Fisher Scientific*) enligt tillverkarens instruktioner.

För rent human-DNA gav Maelstrom 9600, magLEAD DNA, phenol/chloroform och samtliga snabbprotokoll högst DNA-utbyte (≥ 97 %, Tabell 12 och Figur 41). Därefter kom EZ1 DNA Tissue, NucleoMag Pathogen kit, QIAamp för humanceller samt FastDNA Spin kit (utbyte 75–81%). QIAamp för grampositiva bakterier, TMB magnetic (manuell), MagaBio och NucliSens miniMAG (manuell) gav DNA-utbyte mellan 24–37 %. Resterande metoder, Maelstrom 4800, GenoXtract DNA, NucliSens miniMAG (robot) och TMB magnetic (robot) gav låga utbyten (< 17 %). Samtliga snabbprotokoll gav < 16 % dsDNA, med undantag för Guanidine thiocyanate extraction och Proteinas K extraktion som båda gav > 95 % dsDNA (Tabell 12). Två av tre metoder med spinnkolonner gav också > 95 % dsDNA, där den tredje metoden var QIAamp för grampositiva bakterier som gav 24 % dsDNA. Den organiska metoden phenol/chloroform gav > 95 dsDNA. Maelstrom 9600, Maelstrom 4800, magLEAD DNA, GenoXtract DNA, EZ1 DNA och NucleoMag Pathogen kit gav samtliga > 67 % dsDNA. NucliSens,

både manuellt genomförd extraktion och med robot gav ca. 39 % dsDNA. Manuellt genomförd extraktion med TMB magnetic gav ca 14 % dsDNA. Robotextraktion med TMB magnetic gav för låga mängder DNA för att kunna ta fram ett mått på andelen dsDNA.

Maelstrom 9600, EZ1 DNA Tissue, MagaBio och TMB magnetic (manuell) gav DNA-fragment med storlekar mellan 40-50 kb (Tabell 12). För NucliSens (robot), TMB magnetic (robot), QIAamp för grampositiva bakterier samt Alkalint protokoll syntes inga DNA-toppar i elektroferogrammet för Fragment Analyzer. Detta beror på de låga DNA-mängderna. Övriga metoder med spinnkolonner gav fragment med storlekar 15-24 kb. Proteinase K extraktion och Guanidine thiocyanate extraction gav fragment med storlek 32 respektive 39 kb, medan resterande snabbprotokoll gav fragment med storlekar mellan 1,3-3,1 kb. Det ska dock noteras att fragmentstorleken för prover bestående av mycket ssDNA underskattas med denna mätmetod och resultatet ska därför tolkas med försiktighet. Tröskelvärde för GQN sattes till 10 kb. Samtliga snabbprotokoll hade GQN <2,5 med undantag för extraktion med Proteinase K och Guanidine thiocyanate som hade GQN på 6,2 respektive 6,7 (Tabell 12). De flesta magnetkulebaserade metoder uppvisade GQN mellan 2,8-5,0 med undantag för TMB magnetic (robot) (2,0), NucleoMag Pathogen kit (6,4), EZ1 DNA Tissue (6,9) samt Maelstrom 9600 (7,0).

Totalt sett gav följande metoder bäst resultat, med avseende på utbyte, hög andel dsDNA och låg nivå av fragmentering (ordnade med metoden som presterade bäst överst):

1. Maelstrom 9600
2. Guanidine Thiocyanat-extraktion
3. Proteinase K-extraktion
4. EZ1 DNA Tissue
5. Phenol/Chloroform
6. NucleoMag Pathogen kit
7. QIAamp (humanceller)
8. FastDNA Spin kit for soil

Tabell 12. Medelvärde ($\pm$ standardavvikelse) för DNA-utbyte (%), andel dsDNA, fragmentstorlek (kb) för de fragment som låg i det mest vanliga storleksområdet samt GQN (tröskelvärde på 10 kb) för extrakt från samtliga metoder. Beräkningarna av DNA-utbytet har tagit hänsyn till de olika slutvolymerna. Referensen utgörs av högmolekylärt human-DNA från Roche som inte genomgått något extraktionsprotokoll. $n=3$.

Metod	DNA-utbyte (%)	dsDNA (%)	Fragment-storlek (kb)	GQN (10 kb)
Maelstrom 9600	121 $\pm$ 7,5	>95 $\pm$ 0	40 $\pm$ 2,8	7,0 $\pm$ 0,6
Maelstrom 4800	9,8 $\pm$ 6,1	84 $\pm$ 12	27 $\pm$ 0	5,0 $\pm$ 0,3
magLEAD DNA	139 $\pm$ 25,0	68 $\pm$ 39	1,7 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,3

GenoXtract DNA	17 ± 1,8	94 ± 1,9	23 ± 16	4,5 ± 1,7
EZ1 DNA Tissue	80 ± 4,4	>95 ± 0	43 ± 6,2	6,9 ± 0,1
MagaBio	28 ± 6,1	23 ± 0,9	48 ± 12	3,2 ± 0,5
NucleoMag Pathogen kit	75 ± 7,5	90 ± 5,5	32 ± 2,3	6,4 ± 0
NucliSens miniMAG (manuellt)	25 ± 9,5	39 ± 16	15 ± 14	3,2 ± 0,8
NucliSens miniMAG (GenePure Pro)	5,9 ± 0,1	39 ± 0,7	N/D	3,7 ± 0,3
TMB magnetic (manuellt)	35 ± 0,6	14 ± 0,5	50 ± 0	4,0 ± 0,8
TMB magnetic (GenePure Pro)	0,9 ± 0,1	N/D	N/D	2,0 ± 1,4
QIAamp (grampositiva bakterier)	36 ± 2,6	24 ± 2,9	N/D	2,5 ± 0,2
QIAamp (humanceller)	80 ± 6,5	>95 ± 0	23 ± 2,0	5,5 ± 0,3
FastDNA Spin kit for soil	79 ± 2,5	>95 ± 0	16 ± 1,8	5,0 ± 0,4
Phenol/chloroform	105 ± 4,2	>95 ± 0	24 ± 1,7	6,7 ± 0,1
ChelexDirekt	129 ± 1,8	4,1 ± 1,9	1,3 ± 0,4	2,0 ± 0,05
Alkalint protokoll	104 ± 14	12 ± 1,1	N/D	2,5 ± 0,4
Guanidine thiocyanate extraction	121 ± 5,2	>95 ± 0	39 ± 4,6	6,7 ± 0,1
Proteinas K extraction	98 ± 6,5	>95 ± 0	32 ± 2,1	6,2 ± 0,1
QuickExtract DNA (projekt 26)	105 ± 10,3	13 ± 0,9	3,1 ± 0	2,8 ± 0,5
QuickExtract DNA (manual)	111 ± 7,4	15 ± 1,8	2,7 ± 0,4	2,1 ± 0,4
Referens	100 ± 0,1	>95 ± 0	34 ± 0,7	7,1 ± 0,05

4.7 SAMMANFATTANDE SLUTSATSER: DNA/RNA-EXTRAKTION

Det utvecklade magnetkulebaserade DNA/RNA-extraktionsprotokollet, kallat TMB magnetic, gav högre utbyte och likvärdig eller bättre detektionsgräns jämfört med det kommersiella kitet NucliSens miniMAG för RNA-extraktion från virus. TMB magnetic kan användas för virusextraktion inom standarderna ISO 1516-1 och ISO 1516-2, exempelvis som ett alternativ till NucliSens miniMAG. Protokollet fungerar med såväl olika typer av magnetkuler som kuler som passerat utgångsdatum, vilket minskar beroendet av specifika leverantörer och kontinuerliga leveranser. TMB magnetic fungerar dock sämre för DNA-extraktion, där den inte hör till de bästa av de undersökta metoderna. Roboten GenePure

Pro gav goda DNA-utbyten med det tillhörande kitet MagaBio. Däremot fungerade det sämre att automatisera TMB magnetic och NucliSens miniMAG, vilket var huvudsyftet med studien. I nuläget anses roboten därmed endast tillämplig tillsammans med leverantörens eget extraktionskit.

Vid jämförelse av 22 DNA/RNA-extraktionsmetoder baserade på olika principer (manuella och automatiserade) för extraktion av fyra olika mikrobiella agens, gav phenol/chloroform-extraktion överlag högst utbyten. För *B. cereus* och *S. enterica* gav vissa av de magnetkule- och spinnkolonn-baserade metoderna likvärdigt eller bara något lägre utbyten jämfört med phenol/chloroform. För jästsvampen *S. cerevisiae* var skillnaderna mellan phenol/chloroform och övriga metoder mycket stora. Phenol/chloroform kan därmed användas som alternativ vid samhällsstörning när kommersiella kit inte är tillgängliga. Tillgängligheten på phenol/chloroform kan förväntas vara god även vid samhällsstörning, och det går också att egentillverka. Arbetsmiljöproblem och skaderisker kopplade till arbete med phenol/chloroform gör dock metoden mindre attraktiv.

Vid behov av högmolekylärt och dubbelsträngat DNA, till exempel för bibliotekspreparation inför sekvensering, rekommenderas främst någon av följande metoder: 1) Maelstrom 9600, 2) Guanidine Thiocyanat-extraktion, 3) Proteinase K-extraktion, 4) EZ1 DNA Tissue, 5) Phenol/Chloroform.

5 RENING OCH KONCENTRERING AV DNA

Rening och koncentration av DNA-extrakt kan ingå i rutinprotokollen för provberedning alternativt utföras i efterhand för att förbättra utfallet i analysen. Flera olika principer och metoder kan användas för koncentration och rening. I händelse av kris och störda förhållanden är det viktigt att laboratorierna har tillgång till alternativa metoder med känd och tillräcklig prestanda, exempelvis vid leveransproblem från specifika företag. Här utvärderades och jämfördes 12 metoder med avseende på förmågan att koncentrera DNA-extrakt och sju metoder med avseende på prestandan gällande rening av extrakt innehållande hämmare.

5.1 UTVÄRDERING AV NYA OCH ALTERNATIVA METODER FÖR RENING OCH KONCENTRERING AV DNA

12 metoder baserade på olika principer för koncentration och rening av DNA ingick i utvärderingen som fokuserades på utbyte, förmåga att avlägsna PCR-hämmare samt användarvänlighet. Bland de nya och alternativa protokollen ingick kommersiella metoder som bygger på flush-back filter, spinnkolonner och mangnetkulator, samt in house-metoder som nyttjar utfällning och frystorkning av DNA. För fällningsmetoderna ingick även utvärdering och optimering av olika DNA-bärare. Metodernas möjlighet att koncentrera prover undersöktes med rena prover innehållande DNA, medan deras möjlighet att rena undersöktes med prover innehållande DNA samt kända hämmare.

5.1.1 Koncentrering av DNA med tolv olika metoder

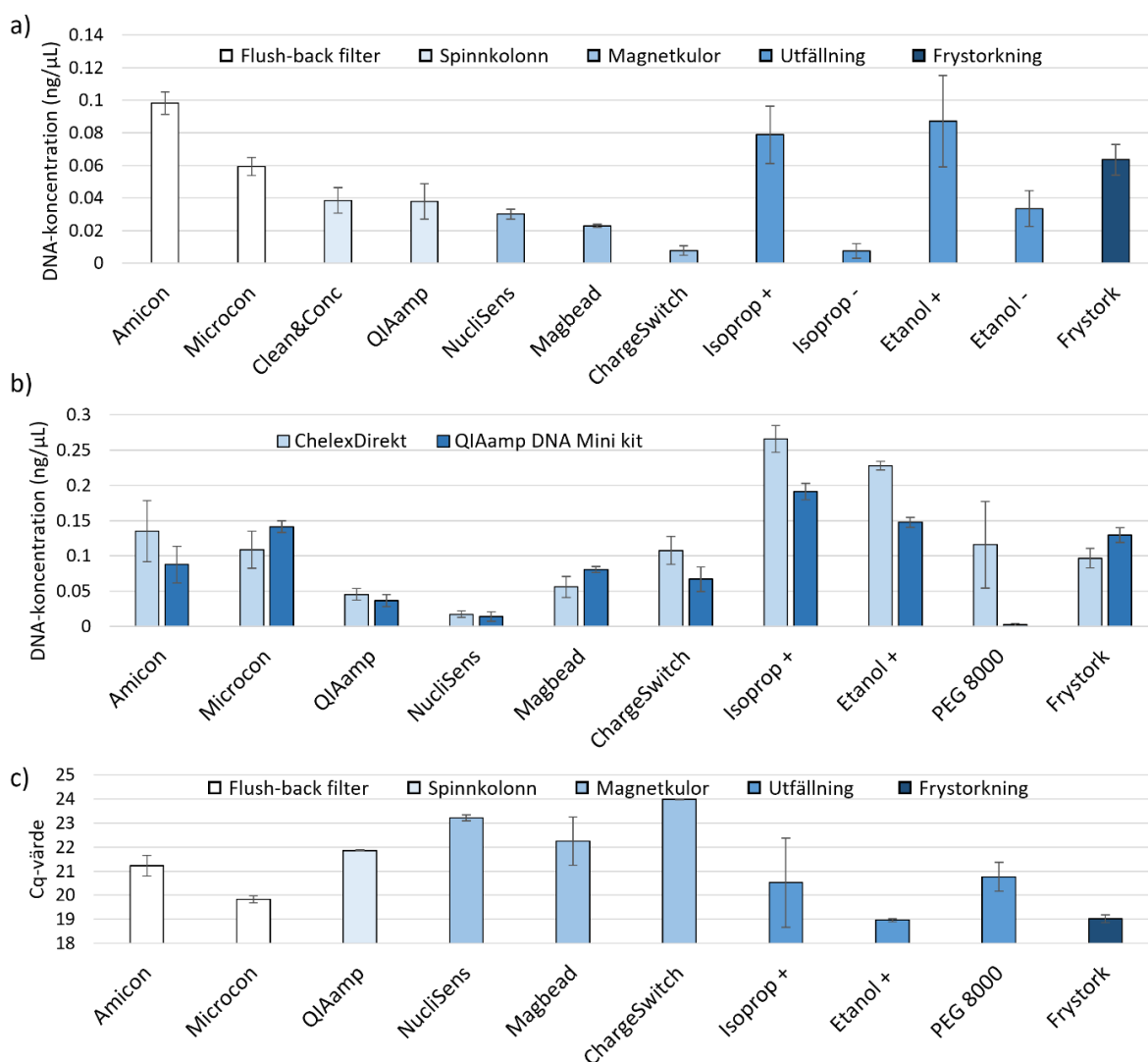
För undersökning av utbyte vid koncentration användes prov innehållande humant referens-DNA (2800M Control DNA, *Promega Corporation*) samt prov innehållande extraherat DNA från humansaliv samt *S. enterica*. För prover med referens-DNA spädde 2800M Control DNA i Ambion nukleasfritt vatten (*Invitrogen*) till 0,02 ng/μL. Proverna innehållande extraherat DNA från humansaliv tillverkades genom att 50 μL saliv extraherades med ChelexDirekt (*BioRad*) samt QIAamp DNA Mini kit (*Qiagen*). För ChelexDirekt tillsattes 1 mL ChelexDirekt-buffert samt 10 μL Proteinase K (10 mg/mL) till proverna som därefter inkuberades i 1 h, 1500 rpm, 56 °C. Sedan inkuberades proverna i värmeskåp i 20 min, 100 °C varpå de fick svalna i rumstemperatur i ca. 15 min. Slutligen centrifugerades proverna vid 11000 rcf, 1 min. QIAamp DNA Mini kit utfördes enligt protokoll. Extrakten kvantifierades sedan med qPCR (QuantStudio 5, *Thermo Fisher Scientific*), och spädde därefter till en slutlig koncentration av 0,02 ng/μL. *S. enterica* odlades upp i 5 mL LB odlingsmedium i 37 °C i 16 h. Bakterierna alikvoterades därefter till 1,5 mL mikrofugrör med 1 mL bakteriesuspension per rör. Rören centrifugerades i 5 min,

5000 rcf varpå supernatanten avlägsnades och pelleten tvättades med 1 mL Ambion nukleasfritt vatten. DNA-extraktion utfördes på replikat av 200 µL uppslammad pellet med NucliSens miniMAG (*bioMérieux*) och replikaten poolades. Samtliga metoder för koncentration utfördes i triplikat, med en startvolym på 500 µL DNA-blandning för varje replikat. Slutvolymen var 50 µL, och för de metoder där slutvolymen var <50 µL tillsattes TE-buffert (*Medicago*) upp till 50 µL. Nedan listas samtliga metoder som testades för koncentration och för vilka prov (Tabell 13).

Tabell 13. Samtliga metoder som utvärderades med avseende på förmåga att koncentrera DNA, samt proverna som ingick i experimenten.

Metod	2800M Control DNA (500 µL; 0,02 ng/µL)	Extraherat humansaliv (500 µL; 0,02 ng/µL)	Extraherat DNA från <i>S. enterica</i>
Amicon® Ultra 30K – 2 mL Centrifugal Filters (<i>Merck</i>)	X	X	X
Microcon® DNA Fast Flow (<i>Merck</i>)	X	X	X
QIAamp® DNA Mini Kit (<i>Qiagen</i>)	X	X	X
Genomic DNA Clean & Concentrator® - 10 (<i>Zymo Research</i>)	X	-	-
NucliSens® miniMAG™ (<i>bioMérieux</i>)	X	X	X
Quick-DNA/RNA™ MagBead (<i>Zymo Research</i>)	X	X	X
ChargeSwitch™ Forensic DNA Purification Kit (<i>Invitrogen</i>)	X	X	X
Precipitering med isopropanol med/utan glykogen som DNA-bärare	X	Endast med glykogen	Endast med glykogen
Precipitering med etanol med/utan glykogen som DNA-bärare	X	Endast med glykogen	Endast med glykogen
Precipitering med PEG8000 i 0,6 M NaCl	-	X	X
Frystorkning	-	X	X

Samtliga prov analyserades slutligen med qPCR (QuantStudio 5, *Thermo Fisher Scientific*). För koncentration av prov med 2800M Control DNA gav Amicon-rör och utfällning med etanol samt isopropanol (båda med glykogen) högst DNA-utbyte ($p < 0,05$) (Figur 41a). ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit och utfällning med isopropanol utan glykogen gav lägst DNA-utbyte. För koncentration av DNA extraherat från humansaliv med ChelexDirekt respektive QIAamp DNA Mini kit gav utfällningsmetoderna överlag högst utbyten (Figur 41b). Jämfört med Amicon-rör gav utfällning med isopropanol högre DNA-utbyte ($p = 0,0003$) och metoder med magnetkylor gav lägre DNA-koncentrationer ($p < 0,005$). Det är värt att notera att DNA-extrakt som koncentrerats med QIAamp DNA Mini kit och NucliSens miniMag har en elueringsvolym på 200 μL och ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit en elueringsvolym på 150 μL jämfört med 50 μL för övriga metoder. Vid 50 μL elueringsvolym hade DNA-koncentrationerna troligen varit tre-fyra gånger högre för ChargeSwitch Forensic Purification Kit, QIAamp DNA Mini kit och NucliSens miniMAG. För DNA extraherat från *S. enterica* gav frystorkning och utfällning med etanol och glykogen högst DNA-utbyte (Figur 41c). Metoder med magnetkylor gav lägst DNA-koncentrationer. Observera att resultaten för *S. enterica*-DNA anges som Cq-värden. Högre Cq-värden motsvarar lägre DNA-koncentrationer.



Figur 41. Medelkoncentrationer eller Cq-värden när koncentrerings utförts med olika metoder. a) Koncentrerings av 2800M DNA (ng/μL). b) Koncentrerings av human-DNA (ng/μL) som extraherats med ChelexDirekt eller QIAamp DNA Mini kit. c) Koncentrerings av Salmonella-DNA (Cq-värde). Isoprop och etanol + och - står för utfällning med och utan glykogen. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, n=3.

5.1.2 Utvärdering av DNA-bärare för användning i utfällning av DNA

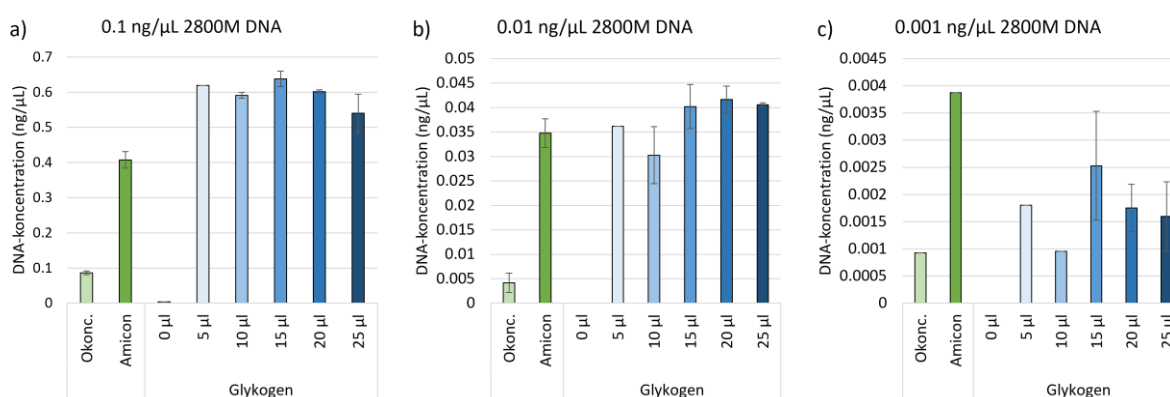
Utfällning av DNA med isopropanol eller etanol visade lovande resultat och det var tydligt att tillsats av en DNA-bärare (glykogen) var nödvändigt effektiv utfällning. Därför studerades effekten av olika typer och mängder av DNA-bärare vid utfällning med isopropanol. Olika mängder glykogen, 5, 10, 15, 20 samt 25 μL av 20 mg/mL, testades för utfällning med isopropanol där 2800M Control DNA späddes i Ambion nukleasfritt vatten (*Invitrogen*) till en slutlig koncentration av 0,001, 0,01 och 0,1 ng/μL. Provvolymer var 500 μL (n=2 per metod och DNA-koncentration). I testet med olika DNA-bärare tillverkades prover genom att extrahera 10 μL humant sperma (spädd 1:300 respektive 1:1800 i Ambion nukleasfritt vatten) enligt ett internt NFC-protokoll för differentiell lysering med Chelex. Efter

lyseringen användes spermiedelen för att testa olika DNA-bärare i protokollet för utfällning med isopropanol jämfört med koncentrerings/rening med Amiconrör (n=3 per metod och spermiespädning).

Följande DNA-bärare undersöktes:

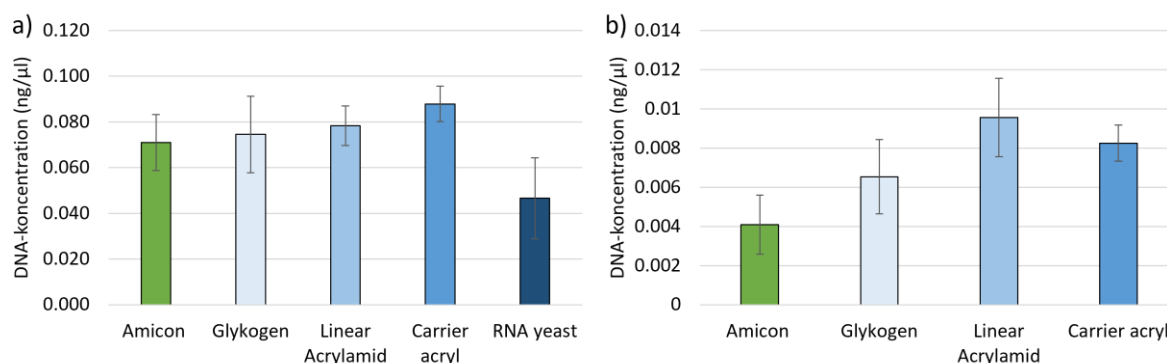
1. Glykogen (*Thermo Fisher Scientific*)
2. Linear Acrylamid (*Thermo Fisher Scientific*)
3. Carrier acryl (*TopBio*)
4. RNA från jäst (*Sigma Aldrich*)

Samtliga prov analyserades slutligen med qPCR (QuantStudio 5, *Thermo Fisher Scientific*). Tillsats av glykogen i egenskap av DNA-bärare var nödvändigt för att möjliggöra utfällning av DNA med isopropanol (Figur 42). Tillsats av 5 μL glykogen gav likvärdiga DNA-koncentrationer som vid tillsats av 25 μL för samtliga testade DNA-koncentrationer. För den lägsta DNA-mängden fanns det en tendens till att utfällningen började prestera sämre jämfört med för de högre koncentrationerna.



Figur 42. Medelkoncentrationer (ng/μL) när olika mängder glykogen sattes tillsammans med isopropanol till spädningar av DNA, jämfört med okoncentrerat prov och koncentrerings/rening med Amicon filterrör. Koncentreringen har utförts på prover med a) 0,1 ng/μL, b) 0,01 ng/μL, och c) 0,001 ng/μL 2800M DNA. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, n=2.

När andra typer av DNA-bärare sattes till DNA-extrakt blev DNA-utbytena likvärdiga för alla testade DNA-bärare ($p > 0,05$, Figur 43).



Figur 43. Medelkoncentrationer (ng/μL) när olika DNA-bärare sattes tillsammans med isopropanol jämfört med Amiconfiltrering. Testet utfördes på spermiedelen av prover med a) 10 μL sperma spädd 1:300, och b) 10 μL sperma spädd 1:1800, som extraherats med differentiell lysering med Chelex. Felstaplarna representerar standardavvikelsen, n=3.

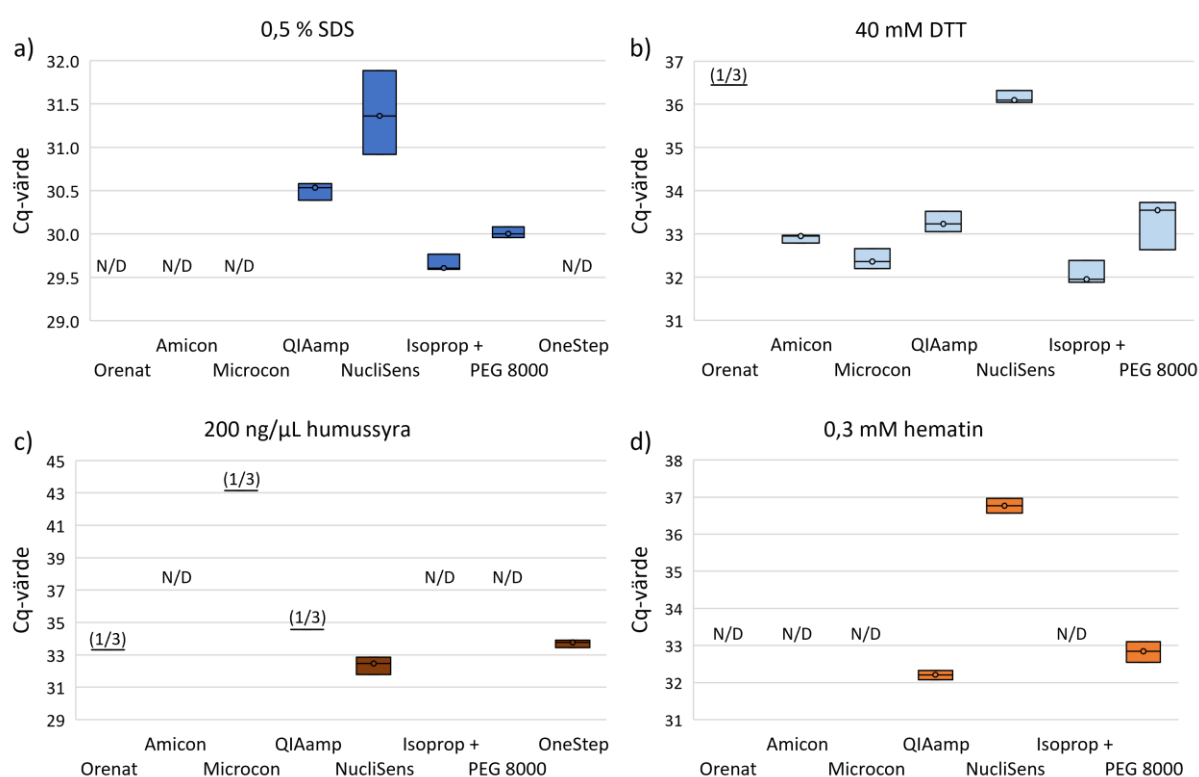
5.1.3 Rening av extrakt innehållande hämmare med sju olika metoder

För utvärdering av sju metoder med avseende på rening tillverkades prover med 0,02 ng/μL 2800M Control DNA i Ambion nukleasfritt vatten, varpå hämmare tillsattes enligt följande: 0,5 % SDS, 40 mM DTT, 200 ng/μL humussyra och 0,3 mM hematin. Dessa koncentrationer bedömdes ge en lämplig nivå av PCR-hämning i utförda förtester. Blandningarna alikvoterades till 1,5 mL mikrofugrör med 500 μL per rör (n=3 per metod och hämmare). Slutvolymen var 50 μL, och för de metoder där slutvolymen var <50 μL tillsattes TE-buffert (*Medicago*) upp till 50 μL. Nedan finns en lista på samtliga metoder som testades för rening. Protokoll för samtliga metoder finnes på en gemensam myndighetsarea.

1. Amicon® Ultra 30K – 2 mL Centrifugal Filters (*Merck*)
2. Microcon® (*Merck*)
3. QIAamp® DNA Mini Kit (*Qiagen*)
4. NucliSens® miniMAG™ (*bioMérieux*)
5. Precipitering med isopropanol + glykogen
6. Precipitering med PEG8000 i 0,6 M NaCl
7. OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit (*Zymo Research*)

Samtliga prov, tillsammans med ett orenat referensprov, analyserades slutligen med qPCR (QuantStudio 5, *Thermo Fisher Scientific*). De olika metoderna renade extrakten olika effektivt beroende på vilken typ av hämnare som var närvarande i provet. För SDS och DTT visade sig utfällning med isopropanol med glykogen vara mest effektiv (Figur 44a-b). Amicon- och Microcon-rör renade 40 mM DTT lika effektivt som utfällning med isopropanol, men presterade sämre för prover med SDS (N/D; ej detekterat). Utfällning med PEG 8000, QIAamp DNA Mini kit och NucliSens miniMAG fungerade väl

för SDS, men inte lika effektivt som utfällning med isopropanol. OneStep PCR Inhibitor Removal kit fungerade inte för prov med SDS (N/D; ej detekterat). För prover med humussyra visade sig NucliSens miniMAG vara mest effektiv, följt av OneStep PCR Inhibitor Removal kit. Filtrerings- och utfällningsmetoderna koncentrerade troligtvis humuspartiklarna (molekyler är ofta >100 kDa) tillsammans med DNA:t eftersom de renade proverna uppvisade starkare hämmareffekter än ursprungsprovet (Figur 44c). QIAamp DNA Mini kit renade prover med hematin mest effektivt, följt av utfällning med PEG 8000 (Figur 43d). NucliSens miniMAG renade bort hematin betydligt sämre än QIAamp DNA Mini kit samt utfällning med PEG 8000, men bättre än Amicon, Microcon samt utfällning med isopropanol (N/D; ej detekterat).



Figur 44. Erhållna Cq-värden då rening av 2800M DNA-prover med PCR-hämmare utförts med olika metoder. a) Rening av prov innehållande 0,5% SDS. b) Rening av prov innehållande 40 mM DTT. c) Rening av prov innehållande 200 ng/μL humussyra. Isoprop + står för utfällning med glykogen. Orenat innebär att provet med 0.02 ng/μL 2800M DNA och tillsatt hämmare analyserats utan rening. N/D; ej detekterat. (1/3) innebär att endast ett replikat detekterades, n=3.

5.1.4 Användarvänlighet

Samtliga metoder utvärderades också med avseende på användarvänlighet, baserat på total tidsåtgång, tid för manuellt arbete, antal pipetteringar och överföringar samt om något moment bedömdes som svårt att utföra (Tabell 14). Rening och koncentreringsmetoderna upplevdes som smidigt,

enkelt och innebar lite manuellt arbete. Spinnkolonn-metoderna (Genomic DNA Clean & Concentrator och QIAamp DNA Mini kit) och protokollen med magnetkolor (NucliSens miniMAG, Quick-DNA/RNA MagBead och ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit) upplevdes som bökiga, med många steg och mycket manuellt arbete. Utfällningsmetoderna upplevdes som jämförbara med filter-metoderna men i steget där pelleten ska lufttorka kunde det vara svårt att avgöra när den torkat tillräckligt. Frystorkningsprotokollet var mycket enkelt men har en totaltid på över 24 timmar. Dessutom står rören öppna bredvid varandra under den tiden vilket kan öka risken för kontamination. OneStep PCR Inhibitor Removal kit var allra enklast och snabbast men fungerade bara för rening av vissa hämmare och inte för koncentration.

Tabell 14. Metoderna som testats för rening respektive koncentration. Total tid för koncentration/rening, manuell arbetstid, antal pipetteringar och antal överföringar anges för ett prov. För Amicon Ultra filterrör ingår det ett extra steg vid rening, vilket ökar tidsåtgången. Observera att total tid och manuell tid inte nödvändigtvis multipliceras med antalet prover när man hanterar flera prover än ett åt gången.

Metod	Total tid	Manuell arbetstid	Pipetteringar/ Överföringar	Kommentar
Amicon Ultra 30K – 2 mL	25 min/ 45 min	10 min/ 12 min	3/2	Smidigt, enkelt
Microcon DNA Fast Flow	20 min	5 min	1/1	Smidigt, enkelt
Genomic DNA Clean & Concentrator	25 min	25 min	9/2	Många steg, maxvolym begränsande
QIAamp DNA Mini kit	25 min	25 min	9/1	Många steg
NucliSens miniMAG	40 min	20 min	15/2	Många pipetteringar
Quick-DNA/RNA MagBead	55 min	20 min	13/2	Många pipetteringar
ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit	20 min	20 min	11/2	Smidigast av magnetkulemetoderna
Utfällning med isopropanol och DNA-bärare	65 min	15 min	7/0	Enkel fram till lufttorkning av pellet, men detta steg upplevdes som svårt
Utfällning med etanol och glykogen	Över natt	15 min	7/0	Enkel fram till lufttorkning av pellet, upplevdes som svårt
Utfällning med PEG 8000	Över natt	10 min	7/0	Smidig, enkelt

Frystorkning	>24h	5 min	0/0	Mycket smidigt men lång totaltid
OneStep PCR Inhibitor Removal kit	6 min	3 min	1/1	Mycket smidigt och snabbt

5.2 SAMMANFATTANDE SLUTSATSER: RENING OCH KONCENTRERING AV DNA

Bland 12 st utvärderade protokoll för DNA-koncentrering gav utfällning med isopropanol eller etanol överlag högst utbyten. Filtrerröret Amicon och frystorkning presterade nästan lika bra som dessa. Vissa magnetkulebaserade metoder hade en större slutvolym än övriga metoder och fick därmed lägre DNA-koncentrationer. Utfällningsmetoderna behövde en DNA-bärare såsom glykogen för att fungera. Eftersom utfällningsmetoderna inte kräver kommersiella kit eller instrument kan de tillämpas i händelse av samhällsstörningar.

För de sju metoderna som utvärderades med avseende på rening av hämmare varierade prestandan med typen av hämmare. För exempelvis Amicon-filtrerrören verkade humussyra ackumuleras vid koncentreringen, vilket antas bero på att filtret inte släpper igenom molekyler av humussyrans storlek. Löslighet i vatten är en annan faktor som påverkar möjligheten att rena bort hämmare med olika metoder. Utfällning med isopropanol eller PEG8000 gav bäst resultat för SDS, medan NucliSens miniMAG och OneStep PCR Inhibitor Removal kit fungerade bäst för hematin.

6 PCR-REAGENSER

PCR är grunden i nutida DNA/RNA-analys för detektion av patogena mikrober. För PCR och realtids-PCR krävs flertalet avancerade reagens, såsom fluorescerande molekyler och värmetåliga DNA-polymeras av hög kvalitet. Vid analys av RNA krävs också enzym för omvänd transkription, så kallade RT-enzym. PCR-reagenser tillverkas till största delen av företag i andra länder. Detta innebär att leveransstörningar helt kan slå ut laboratoriernas möjlighet att utföra DNA/RNA-analys. Här har vi studerathållbarheten för reagensmixar som används för DNA- och RNA-analys för att undersöka om dessa kan användas med god prestanda även efter att tillverkarens angivna utgångsdatum passerat. Dessutom utvecklat protokoll för egen tillverkning och utvärdering av PCR-ens mest kritiska reagens, DNA-polymeraset.

6.1 SAMMANSTÄLLNING AV DNA-POLYMERASER OCH RT-ENZYM

Laboratoriernas samlade erfarenhet av olika DNA-polymeraser och RT-enzym har sammanställts i två listor som distribuerats mellan myndigheterna. Listorna omfattar 23 enskilda DNA-polymeraser och mastermixar för PCR/qPCR samt 10 mastermixar för one-step RT-qPCR. Varje enzym är beskrivet med avseende på deras ursprung, egenskaper och användningsområde. Syftet med listan är att sprida kunskap och erfarenhet om hur analysen av specifika prover kan optimeras genom att välja rätt DNA-polymeras eller mastermix.

6.2 UTREDA HÅLLBARHET PÅ PCR-REAGENSER

I syfte att utreda stabiliteten av mastermixar med polymeras under olika temperaturbetingelser (rumstemperatur, kyl och frys) utfördes två långtidsstudier parallellt på två olika laboratorier med två olika mastermixar: en mastermix för RNA-virus (TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix, *Thermo Fisher Scientific*) och en mastermix för DNA-virus (PerfeCTa MultiPlex qPCR ToughMix, *Quantabio*).

6.2.1 Studieupplägg

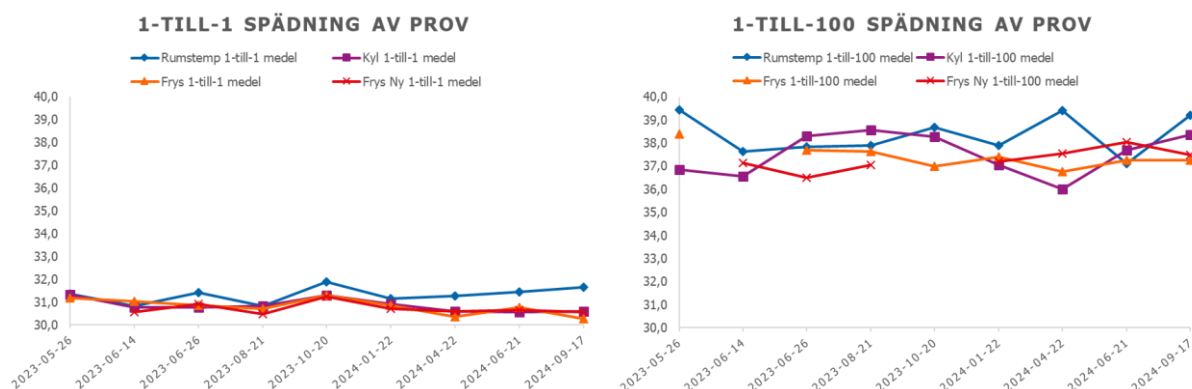
Under maj 2023 förberedes två mastermixar för RNA-virus med olika utgångsdatum, en med utgångsdatum 2022-05-31 och en med utgångsdatum 2024-06-31. Det vill säga, den ena mastermixen hade gått ut cirka ett år tidigare innan försökets början och den andra mastermixen hade ett utgångsdatum som sträckte sig ett år fram i tiden. De båda mastermixarna alikvoterades och placerades i

rumstemperatur (RT), kyl (4°C) och frys (-20°C) den 2023-05-16. Under perioden 2023-05-26 till och med 2024-09-17 genomfördes nio tester där alikvoterna i olika temperaturbetingelser utvärderades i duplikat mot en SARS-CoV-2 PCR med positiv kontroll i olika spädningar (1:1, 1:10 och 1:100).

Parallellt på ett annat labb placerades under samma tidsperiod tre identiska batcher av mastermix för DNA-virus med utgångsdatum 2023-11-30 under samma temperaturbetingelser som ovan. DNA extraherat från ett kliniskt prov som naturligt var saminfekterat med två virus användes som kontroll i duplex TaqMan realtids-PCR. DNA späddes 1:10 och 1:1000, alikvoterades och förvarades vid -80°C fram till vidare användning. Spädningen 1:1000 var särskilt förberedd för att skapa utmanande PCR-förhållanden och utvärdera mastermixens prestanda under dessa förhållanden. Primer och prober alikvoterades också och förvarades vid -20°C fram till användning. Mastermix placerades vid respektive temperatur den 2023-05-05. Från 2023-05-19 (efter 2 veckors förvaring) till 2024-09-09 (16 månaders förvaring) genomfördes tio PCR-tester med den spädda DNA-mallen och vatten som NTC, alla i triplikat. Totalt utfördes nio reaktioner för varje temperaturförhållande.

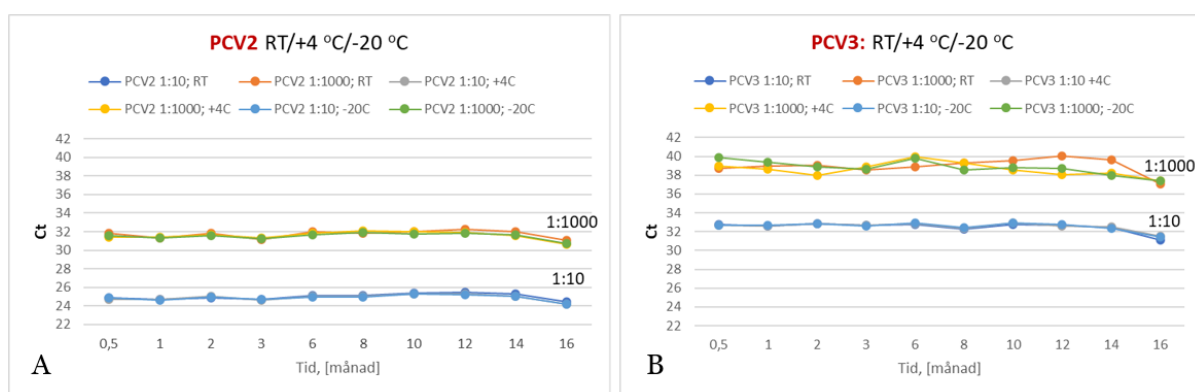
6.2.2 Resultat

Försöken visar att mastermixarna är stabila oavsett lagringstemperatur och utgångsdatum, där positiv kontroll utan spädning ger liknande Ct-värden för de olika temperaturbetingelserna. Möjligen kan en mindre ökning i Ct-värde noteras för RNA-virus-mastermixen i RT. Dock ska det noteras att denna mastermix hade gått ut ett år på datum innan försöket påbörjades samt att den skillnaden är generellt är mindre än ett Ct-värde. Endast vid spädning 1:100 av den positiva kontrollen noteras det i lite högre omfattning för rumstemperatur-mastermixarna att en av de två brunnarna oftare var negativa jämfört med de andra temperaturerna och mastermixar (Figur 45). Överlag indikerar resultaten att den testade RNA-virusmastermixen är robust vid olika temperaturer och stabilt relativt utgångsdatum.



Figur 45. Prestanda för polymeras över ca. 16 månaders förvaringsperiod (datum på X-axeln) under olika temperaturförhållanden och spädningar (1:1 och 1:100).

Resultaten visade att DNA-polymeraset förblev stabilt oavsett förvaringstemperatur, även nio månader efter utgångsdatum (Figur 46). Ct-värdena var konsekventa för alla temperaturförhållanden för båda virusen (Figur 46A, B), med undantag för PCV3 vid en spädning på 1:1000 (Figur 45B). Dessa variationer i Ct-värden kunde dock tillskrivas PCV3 PCR-reaktionens prestanda under utmanande förhållanden. Detektering av PCV3 vid 1:1000 spädning misslyckades i en eller två replikat i samtliga tio tester, oavsett polymerasets förvaringstemperatur. PCV2 PCR-reaktionen visade 100% detektion i alla triplikat, oberoende av polymerasets förvaringstemperatur. Smärre fluktuationer i Ct-värden observerades under den 16 månader långa testperioden, men dessa avvikelser berodde enbart på den mänskliga faktorn. Intressant nog erhöles de bästa resultaten i det sista PCR-testet efter 16 månader, vilket indikerar att polymeraset kan förbli stabilt under långtidsförvaring, även vid rumstemperatur och långt efter utgångsdatumet.



Figur 46. Polymeras prestanda över 16 månaders förvaringsperiod under olika temperaturförhållanden. Polymeras utgångsdatum motsvarar den 8:e månaden av X-axeln.

6.3 TILLVERKNING OCH UTVÄRDERING AV DNA-POLYMERASER

Tillgång till DNA-polymeras av god kvalitet är avgörande för laboratorieförmågan gällande DNA- och RNA-analys. Långvariga leveransstörningar som påverkar tillgången till dessa kan därmed hindra laboratoriernas arbete. Att ta fram metoder för att kunna tillverka eget DNA-polymeras skulle därför minska leverantörsberoendet och öka beredskapen. Tillverkningsmetoderna behöver vara så enkla som möjligt och inte kräva avancerade instrument eller reagens. DNA-polymeraset från *Thermus aquaticus* (*Taq*) är det mest använda PCR-enzymet världen över. Det har god effektivitet och går att tillämpa tillsammans med hydrolys-prober i qPCR tack vare sin 5'-3' exonukleasaktivitet. För sekvensering och andra analyser kan det dock krävas polymeraser med lägre risk för fel jämfört med *Taq*. Ett vanligt

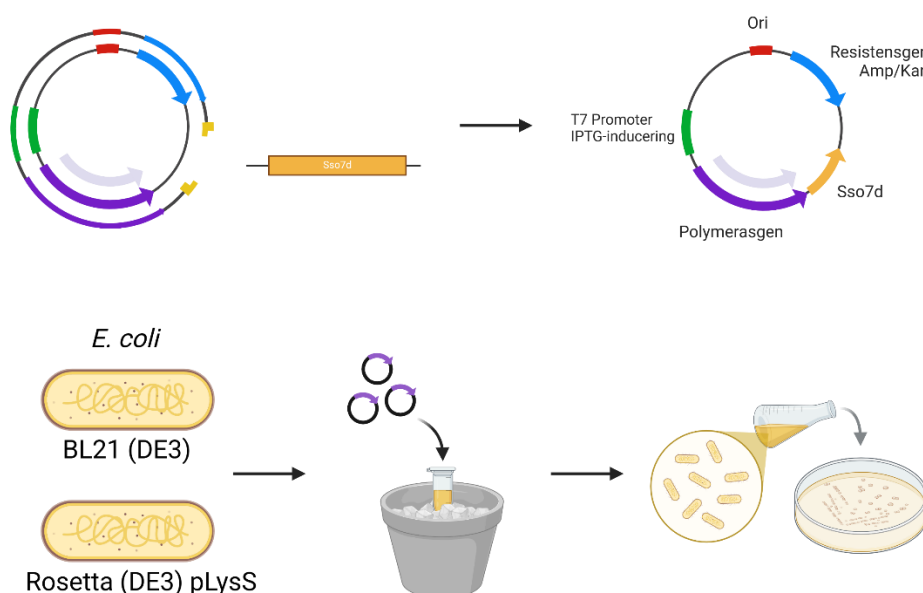
sådant så kallat ”proof reading”-enzym är polymeraset från *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), som har förmågan att ta bort felaktiga kvävebaser med sin 3’-5’ exonukleasaktivitet. Utöver vildtyper av DNA-polymeras finns det ingenjörsmässigt framtagna varianter med specifika egenskaper. Ett sätt att öka effektiviteten är att sätta fast en dsDNA-bindande domän på polymeraset, där den mest använda kallas *Sso7d* och kommer från *Sulfolobus solfataricus*. Polymeraset från *Nanoarchaeum equitans* (*Neq*) har exempelvis tidigare modifierats för att öka dess processivitet och minska risken för fel genom införandet av två bas-mutationer (kallat *Neq2X*) och *Sso7d*-domänen (kallat *Neq2X7*). *Neq*-polymeras har, liksom *Pfu*, 3’-5’ exonukleasaktivitet.

Målet med detta arbetspaket var att ta fram metodik för att tillverka och utvärdera följande sex DNA-polymeraser i det egna laboratoriet utan behov av avancerad instrumentering: *Taq* med och utan DNA-bindande domän, *Pfu* med och utan DNA-bindande domän, samt *Neq2X* med och utan DNA-bindande domän. Olika stammar av *E. coli* användes för syntesen. Såväl cell-extrakt som framrenade enzymer utvärderades med hjälp av PCR och qPCR. Plasmider innehållande gener för *Taq*, *Pfu*, *Neq2X* samt *Neq2X7* beställdes från Addgene. *Neq2X7* innehåller genen för *Sso7d*. För *Taq* och *Pfu* klonades *Sso7d*-genen in i en ny plasmid för att skapa varianter av dessa båda polymeraser med den dsDNA-bindande domänen (Figur 47). De två *E. coli*-stammarna BL21 (DE) och Rosetta (DE) pLysS användes i detta arbete. I båda stammarna är några proteas borttagna för att främja tillverkningen av protein. Beteckningen DE innebär att stammarna innehåller en profag (lambda DE3) som bär på en gen för T7 RNA-polymeras, vilken möjliggör kontroll av proteinsyntesen via inducering med IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalacopyranoside). pLysS är en plasmid som innehåller genen för T7-lysosym. Uttryck av lysosymet minskar eventuellt proteinuttryck under kontroll av T7-promotorn innan induktionen startats med IPTG. Samma två stammar utvärderades också för tillverkning av DNA-polymeras. Rosetta fungerade avsevärt bättre med avseende på både mängd och enzymaktivitet, och användes fortsatt i utvecklingen av protokoll för polymerassyntes. Uttryck av *Pfu* har tidigare visat sig vara något toxiskt för *E. coli*, vilket kan vara en bidragande faktor till att Rosetta presterade bättre än BL21.. Hela det framtagna protokollet syns i Figur 48.

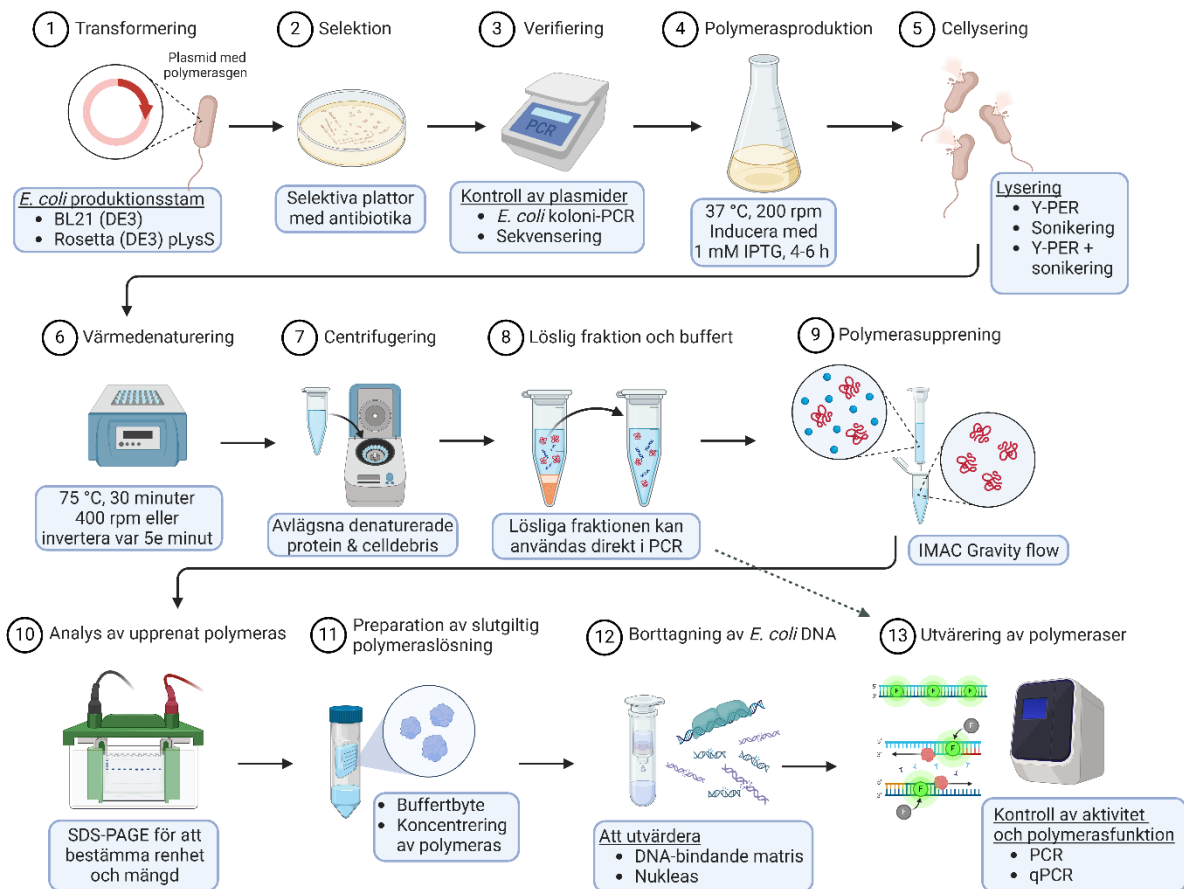
Tillverkningsprocessen inklusive rening och utvärdering av polymeras kan genomföras på fem arbetsdagar. Första dagen utförs transformering av plasmiderna in i *E. coli* (steg 1 i Figur 48). Dag två verifieras kolonierna på selektiva plattor med koloni-PCR och positiva kloner används för att starta förkulturer (steg 2-3). Dag tre odlas, induceras och skördas cellerna (steg 4). Dag fyra utförs cell-lysning följt av värmedenaturering för att bryta ner oönskade proteiner i lysatet (steg 5-6). Sedan centrifugeras lysatet för att avlägsna denaturerade proteiner och cell-debris (steg 7). Den lösliga fraktionen av cell-lysatet kan användas direkt i PCR (steg 8). Nästa steg är ”gravity flow”-rening med IMAC-kolonn (immobilized metal ion affinity chromatography) (steg 9). ”Gravity flow” innebär att upprening utförs på labb-bänken med hjälp av gravitation och utan behov av specifika instrument. IMAC-reningen tar

bort kvarvarande proteiner och majoriteten av *E. coli*-DNA. Polymeraset analyseras med SDS-PAGE för att bestämma renheten i fraktionerna och få en uppskattning av mängden enzym (steg 10). Femte dagen utförs buffertbyte och eventuell koncentrerings av polymeras samt utvärdering av polymerasaktivitet med hjälp av PCR eller qPCR (steg 11-13). Steg 12, borttagning av *E. coli*-DNA för att minimera mängden bakgrunds-DNA, har ännu inte inkluderats i protokollet. För att snabba upp tillverkningsprocessen kan man på förhand frysa in *E. coli*-celler som har plasmider för polymerasen i 25% glycerol (-80°C). Med dessa som utgångspunkt kan framrenat och funktionellt DNA polymeras framställas på två och en halv dag via stegen 4-11 (Figur 48).

Ett nyckelsteg i protokollet är celllysningen, där reagenset Y-PER och sonikering utvärderades. Sonikering visade sig krävas för att bli av med utfällning av stora mängder *E. coli*-DNA, som annars störde nästföljande steg. DNA-polymeraserna som används i PCR är stabila i höga temperaturer. Därför kunde värmedenaturering användas som ett reningssteg. Detta gav kraftigt minskade mängder av oönskade proteiner. Olika metoder för framrening av polymeras utvärderades. Orenat cell-lysats användes också för PCR-analys för att utvärdera om det skulle vara möjligt att i en krissituation kunna framställa funktionellt DNA-polymeras utan rening, vilket skulle spara tid. Efter att ha optimerat protokollet för tillverkning av DNA-polymeraser (Figur 47) var det möjligt att producera stora mängder aktivt *Taq*- och *Pfu*-polymeras med och utan *Sso7d*-domänen. Tillräckligt mycket *Taq*-polymeras för att räcka till ca 90 000 PCR-reaktioner kunde exempelvis tillverkas från 100 mL *E. coli*-kultur. *Neq*-varianterna var mer utmanande och endast begränsade mängder av dessa har hittills kunnat tillverkas. Även *Neq*-enzymen har dock uppvisat tillräcklig polymerasaktivitet för att kunna fungera i PCR.

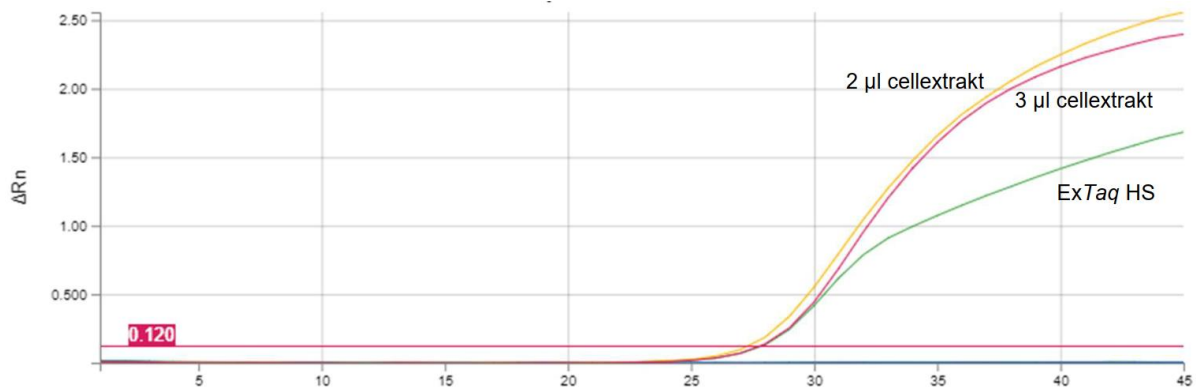


Figur 47. Kloning av nya varianter av *Taq*- och *Pfu*-polymeras, med *Sso7d* dsDNA-bindande domän.



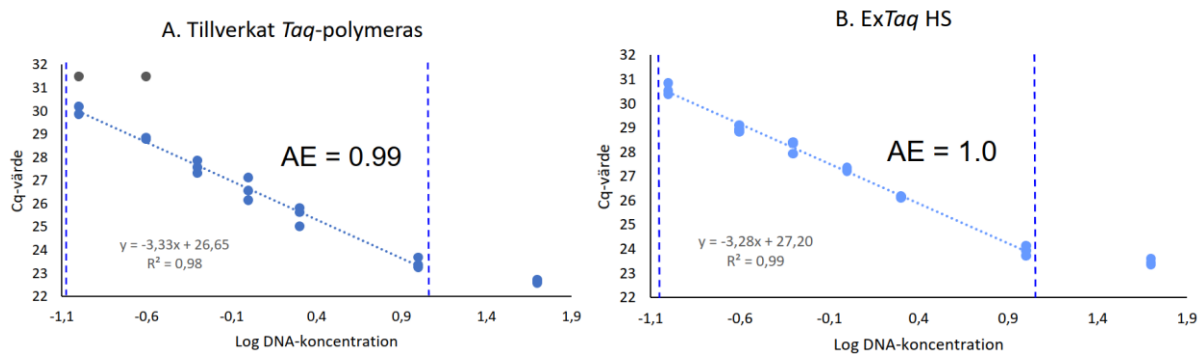
Figur 48. Protokoll för tillverkning av DNA-polymeras. Hela protokollet kan utföras på fem arbetsdagar. Från 100 mL cell-kultur går det tillverka Taq-polymeras som räcker till 90 000 PCR-reaktioner. Om celler innehållande plasmiderna finns nedfrysta går det att syntetisera och rena polymeras på två och en halv dag.

Cell-lysats från tillverkning av Taq-polymeras uppvisade god prestanda för såväl konventionell PCR som qPCR. Det krävdes dock relativt stora mängder cell-lysats för att uppnå tillräcklig aktivitet. När exempelvis två eller tre μL cell-lysats nyttjades i qPCR erhöles resultat jämförbara med det kommersiella polymeraset ExTaq HS (Figur 49). Värt att notera är att cell-lysats innehåller stora mängder DNA från värdet *E. coli*, och därmed inte är applicerbart för analys av denna eller närbesläktade bakterier.



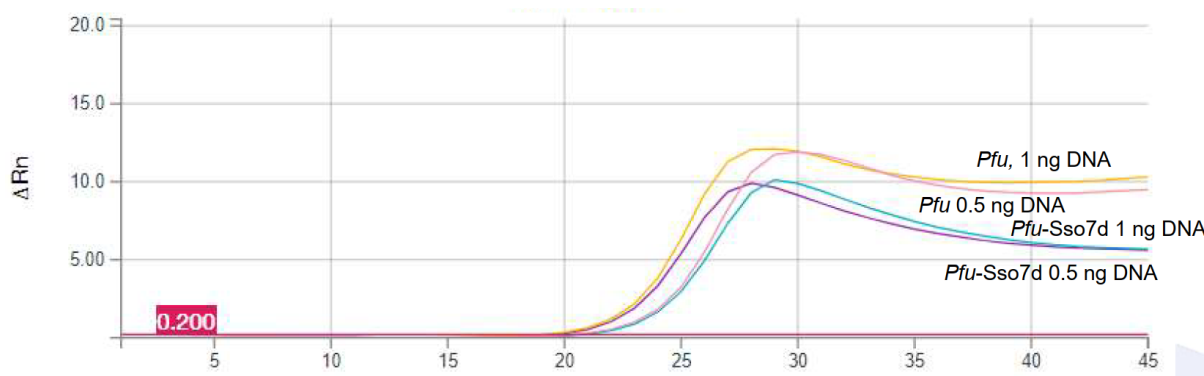
Figur 49. Jämförelse mellan cellextrakt med funktionellt Taq-polymeras och ExTaq HS för qPCR-analys med hydrolysprober. Cq-värden visas på x-axeln och relativ fluorescens på y-axeln.

Framrenat Taq-polymeras undersöktes vidare med avseende på analys av låga mängder DNA och kompatibilitet med hydrolysprober. En human-specifik qPCR-metod användes och 0,1 till 50 ng DNA analyserades med såväl tillverkat Taq-polymeras som ExTaq HS. Taq-polymeraset gav överlag god amplifieringseffektivitet i paritet med ExTaq HS (AE=0,99 vs AE=1,00, Figur 50). För de lägsta DNA-mängderna (0,1 och 0,25 ng) misslyckades analyserna för tillverkat Taq för ett replikat vardera. Detta motsvarar ca 30 till 75 DNA-kopior, vilket innebär att detektionsgränsen ändå är relativt god för Taq.



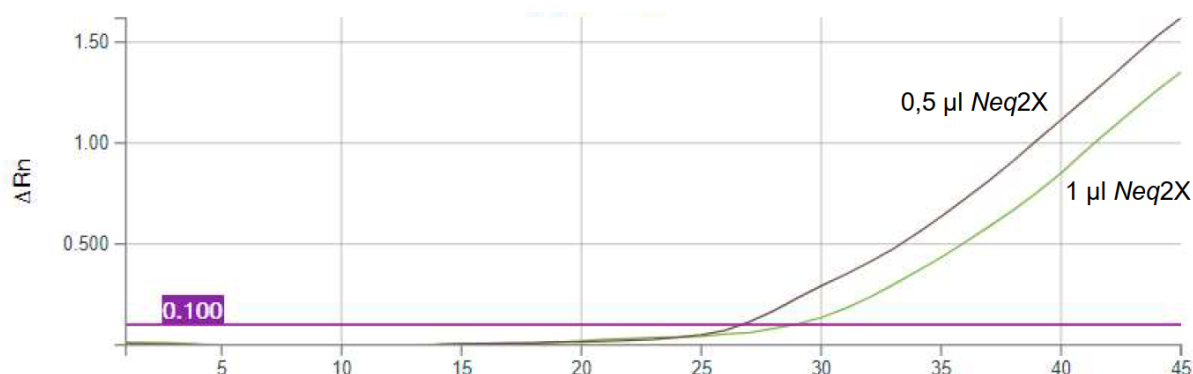
Figur 50. Jämförelse mellan A) tillverkat och framrenat Taq-polymeras och B) kommersiellt ExTaq HS-polymeras vid qPCR-analys. Human-DNA i följande mängder analyserades: 50, 10, 2, 1, 0,5, 0,25 och 0,1 ng. n=3.

Pfu-polymeras har ofta något lägre amplifieringseffektivitet jämfört med Taq-polymeras och kan kräva mer optimering för att fungera i olika PCR-assayer. Framrenat *Pfu*-polymeras uppvisade god prestanda med resultat jämförbara med kommersiellt *Pfu*-polymeras. Såväl den normala *Pfu*-varianten som *Pfu* med Sso7d-domänen fungerade väl i qPCR med EvaGreen-färg (Figur 51).



Figur 51. Jämförelse mellan *Pfu*-polymeras med och utan den DNA-bindande domänen *Sso7d* för qPCR-analys med EvaGreen-färg. Cq-värden visas på x-axeln och relativ fluorescens på y-axeln. Gul kurva: *Pfu* med 1 ng DNA; Rosa: *Pfu* med 0,5 ng DNA; Lila: *Pfu-Sso7d* med 1 ng DNA; Blå: *Pfu-Sso7d* med 0,5 ng DNA.

Neq-varianterna var svårast att tillverka och endast mindre mängder kunde framställas. Aktivt *Neq*-polymeras kunde påvisas, men amplifieringseffektiviteten var relativt låg utan den förväntade exponentiella tillväxten (Figur 52). En polymeraspreparation som fungerade väl i en PCR-assay kunde dessutom ge negativa resultat i en annan. Ytterligare arbete med att optimera tillverkningen av *Neq*-polymeras krävs för att komma tillrätta med dessa problem.



Figur 52. qPCR-analys (EvaGreen) med *Neq2X*-polymeras.

Även de framrenade polymerasen innehöll detekterbart *E. coli*-DNA. Fortsatt arbete med optimering av tillverkningen av *Taq*- och *Pfu*-polymerasen bör därför inriktas på att i största möjliga mån ta bort detta. Detta är en utmaning eftersom nukleaser, som effektivt tar bort DNA, kan skapa stora problem i PCR om de inte tas bort i sin tur. Även kommersiella polymeraser har visat sig innehålla små mängder *E. coli*-DNA, så helt DNA-fria enzymreparationer kanske inte går att uppnå.

6.4 SAMMANFATTANDE SLUTSATSER: PCR-REAGENSER

Resultaten i studien visar att PCR-reagenser kan lagrhållas betydligt längre än vad tillverkarna rekommenderar. Även om reagenserna inte lagrhålls vid rekommenderade temperaturer (frys) överskrider hållbarheten avsevärt vad som anges av tillverkarna. Exempelvis förblev ett av de testade DNA-polymerasen stabilt oavsett förvaringstemperatur (frys, kyl eller rumstemperatur), även nio månader efter utgångsdatum. Kvalitén på resultaten var densamma som när nya DNA-polymeraser och mastermixar användes. Vid levereransstörningar anses det därför vara möjligt att, efter enklare tester, använda utgångna och gamla PCR-reagens för rutinanalys, vilket ökar möjligheten att upprätthålla laboratorieförmågan.

Det är fullt realistiskt att snabbt kunna producera DNA-polymeraser nödvändiga för molekylär diagnostik i ettavspärrningsläge, med hjälp av i projektet framtagna metodik. Detta kan ske till en förhållandevis låg kostnad och utan behov av avancerade instrument, men kräver förberedande arbete och utpekat ansvar att bygga beredskap för att snabbt kunna ställa om till produktion och utvärdering av polymerasernas prestanda. DNA-polymeraser av flera varianter och med olika kan tillverkas med den utvecklade metodiken.

7 PCR-BASERADE ANALYSMETODER

Kunskap om vilka agens som orsakat en smitta är avgörande för att snabbt kunna vidta rätt åtgärder för att stoppa ytterligare spridning. Vid sjukdomsutbrott och vid kontroller för att säkerställa att exempelvis mat och vatten inte orsakar smitta är det därför viktigt att snabbt kunna detektera och artbestämma eventuella patogena agens. Implementering av nya och alternativa analysmetoder breddar laboratoriernas möjlighet att analysera relevanta agens, vilket bland annat ger fler valmöjligheter och redundans i händelse av kris och störningar. Detta kan innefatta såväl metoder som bygger på etablerad teknik som nya innovationer, och därmed kan ge ytterligare förbättrade möjligheter att detektera specifika agens. I projektet validerades en kommersiell realtids-PCR-metod, IQ-Check Vibrio PCR Detection Kit, för analys av bakterier av släktet *Vibrio*. Dessutom utvecklades och utvärderades en hyperplex-PCR (hpPCR)-panel för parallell detektion av 16 olika agens och toxingener.

7.1 VALIDERING AV PCR FÖR VIBRIO SPP

Vibrio spp., huvudsakligen *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* och *V. vulnificus*, kan orsaka allvarliga matförgiftningar via konsumtion av kontaminerade livsmedel i form av skaldjur eller vatten. För närvarande är risken låg i Sverige för några större utbrott av vibriosis men återkommande varma somrar innebär en högre risk för utbrott då *Vibrio* spp. gynnas av ett varmare klimat. För att stärka beredskapen för diagnostik av dessa bakterier gjordes en validering av ett kommersiellt multiplex-test, IQ-Check Vibrio PCR Detection Kit, som baseras på genamplifiering och detektion genom realtids-PCR. Detta test möjliggör kvalitativ detektering av *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* och *V. vulnificus* i prover som tidigare anrikats med odling. IQ-Check Vibrio Kit använder ett optimerat system av primers och prober för att säkerställa hög specificitet. Analysen är utformad som en multiplexreaktion som inkluderar en intern hämningskontroll som amplifieras parallellt med mål-DNA för ett tillförlitligt resultat (negativ resultatvalidering). Verifieringen utformades utifrån ISO 16140-3:2021, *Microbiology of the food chain – Method validation – Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory*, och godkändes för användning vid ett myndighetslaboratorium. Resultaten visade att metoden är ändamålsenlig för detektion av *Vibrio* i livsmedel.

7.2 HYPERPLEX-PCR FÖR ANALYS MED BRED FRÅGESTÄLLNING

Realtids-PCR är en effektiv metod för att detektera och kvantifiera mikrober, men kräver att man på förhand misstänker ett specifikt agens som analys kan inriktas mot. Sekvensering av exempelvis 16S rRNA-genen hos bakterier ger möjlighet att identifiera arter utan att i förväg behöva rikta in sig på en specifik organism. Metoden är dock tidskrävande och begränsad till just bakterier och missar därför eukaryota patogener och virus. Hyperplex PCR (hpPCR) är en svensk uppfinning som tillhandahålls av företaget Aplex Bio. Tekniken möjliggör parallell detektion av upp till 100 olika DNA- eller RNA-fragment genom nyttjandet av patenterade fluorescerande nanopixlar (för detaljerad beskrivning av hpPCR, se www.aplex.bio). Sekvens-specifika padlock-prober gör att endast korrekta PCR-produkter ska detekteras. Via rolling circle amplification kan enskilda PCR-produkter synliggöras, vilket ger potential att nå mycket goda detektionsgränser. HpPCR används här för att utveckla och utvärdera en proof-of-concept-panel för analys med en bred frågeställning av prover som antas innehålla smittsamma agens. I panelen ingår högpatogeta bakterier, samt bakterier, eukaryota parasiter och virus som orsakar mag- och tarmsjukdomar. För att bredda analysen undersöks möjligheten att inkludera såväl primrar för genus som för specifika arter av detta genus. Totalt ingår 16 olika agens och toxingener i assayen, vilka detekteras med 16 olika nanopixel-prober. Efter att ha visat proof-of-concept är det möjligt att utöka panelen med fler agens, varpå denna panel kan användas som ett första steg vid analys av prover som tros innehålla smittbärande bakterier, parasiter eller virus. Sedan kan ytterligare konfirmerande analyser såsom qPCR eller 16S-sekvensering utföras.

7.2.1 Utveckling av panel för parallell detektion av patogena bakterier, eukaryoter och virus

Samtliga FBD-myndigheter deltog i urvalet av agens att inkludera i hpPCR-assayen. Tillsammans beslutades att fokusera på högpatogeta bakterier samt patogener som orsakar sjukdomar i mag- och tarmsystemet.

Följande agens inkluderades:

1. *Bacillus* spp.
2. *Bacillus anthracis*
3. *Yersinia* sp.
4. *Yersinia pestis*
5. *Francisella tularensis*
6. *Coxiella burnetti*
7. *Brucella abortus*
8. *Salmonella* spp.
9. *Vibrio cholerae*

10. Shigatoxinproducerande *Escherichia coli* (STEC) stx 1
11. STEC stx 2
12. *Cryptosporidium parvum*
13. Norovirus G1
14. Norovirus G2
15. Hepatit A

För *Bacillus* och *Yersinia* inkluderades primrar och prober för både genus-nivån och de högpatogena arterna *Bacillus anthracis* och *Yersinia pestis*. Det är senare möjligt att addera genus- respektive arts specifika assayer även för andra agens för att ytterligare öka förmågan att fånga upp intressanta patogener i prover. Primersekvenser samt de agensspecifika delarna av padlock-proberna finns i Tabell 15 och 16.

Tabell 15. Primersekvenser och primerkoncentrationer för respektive agens i hpPCR-panelen.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Final concentration
Bacillus spp_F2	CAAACCTCCTTATCAGTGGTTTC	150 nM
Bacillus spp_R2	CCCGTAAAGTCCTCAATCGGAGA	200 nM
B. anthracis_F1	TTCCCAATAAATGTCTGTATC	150 nM
B. anthracis_R1	CATGGTACTACTCAAACAAG	200 nM
Yersinia sp_F1	TTGACACAACCTTAGGCAATATGG	7.5 nM
Yersinia sp_R1	ACTGGTCAATGGTGCGCTATAA	10 nM
Y. pestis_F2	CTGTAGGATCGGTAATTTCGAGCA	75 nM
Y. pestis_R2	GCTCACGATTGAAGAAATTTGTTGATC	100 nM
F. tularensis sp_F2	CTTGGGCAACTGTAACAGTTAAGC	150 nM
F. tularensis sp_R2	GCGATTACTTCTTTGTCTATAAACTAC	200 nM
C. burnetti_F1	CACGAGACGGGTTAAG	30 nM
C. burnetti_R1	CACACGCTTCCATCAC	40 nM
Brucella spp._F1	TGGTCTATCTGTAAATTTTTATTAAG	150 nM
Brucella spp._R1	CTGTGGTTTTTCCTCAATC	200 nM
B. abortus_F1	GGTGTATATCAACCAGCAG	75 nM
B. abortus_R1	CCGTTCCAGTAATTAAGAG	100 nM
Salmonella spp._F1	TCGTCATTCCATTACCTACC	15 nM
Salmonella spp._R1	AAACGTTGAAAACTGAGGA	20 nM
V. cholerae_F1	TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG	45 nM
V. cholerae_R1	AGTCACTTAACCATACAACCCG	60 nM

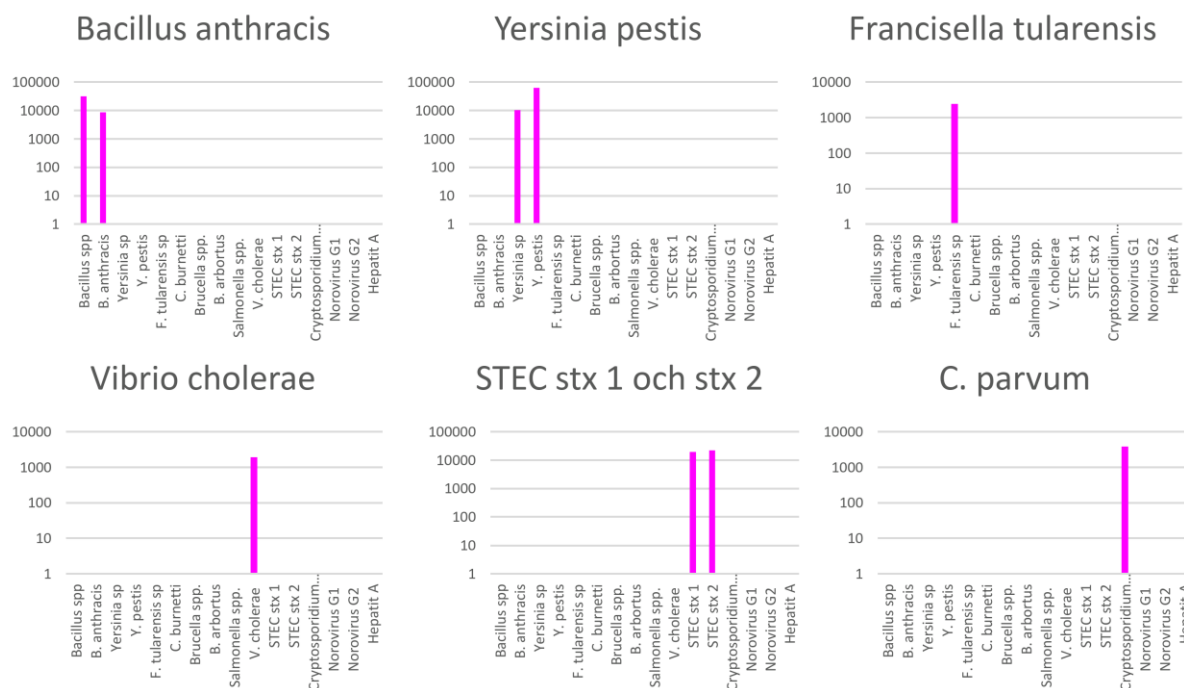
STEC stx_F1	TTTGTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG	15 nM
STEC stx_R1	CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC	20 nM
Cryptosporidium spp_F1	GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGG	15 nM
Cryptosporidium spp_R1	CTGCTTTAAGCACTCTAATTTTCTCAAAG	20 nM
Norovirus G1_F1	CGCTGGATGCGNTTCCAT	30 nM
Norovirus G1_R1	CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	40 nM
Norovirus G2_F1	ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA	15 nM
Norovirus G2_R1	TCGACGCCATCTTCATTCACA	20 nM
Hepatit A_F1	TCACCGCCGTTTGCCTAG	30 nM
Hepatit A_R1	GGAGAGCCCTGGAAGAAAG	40 nM

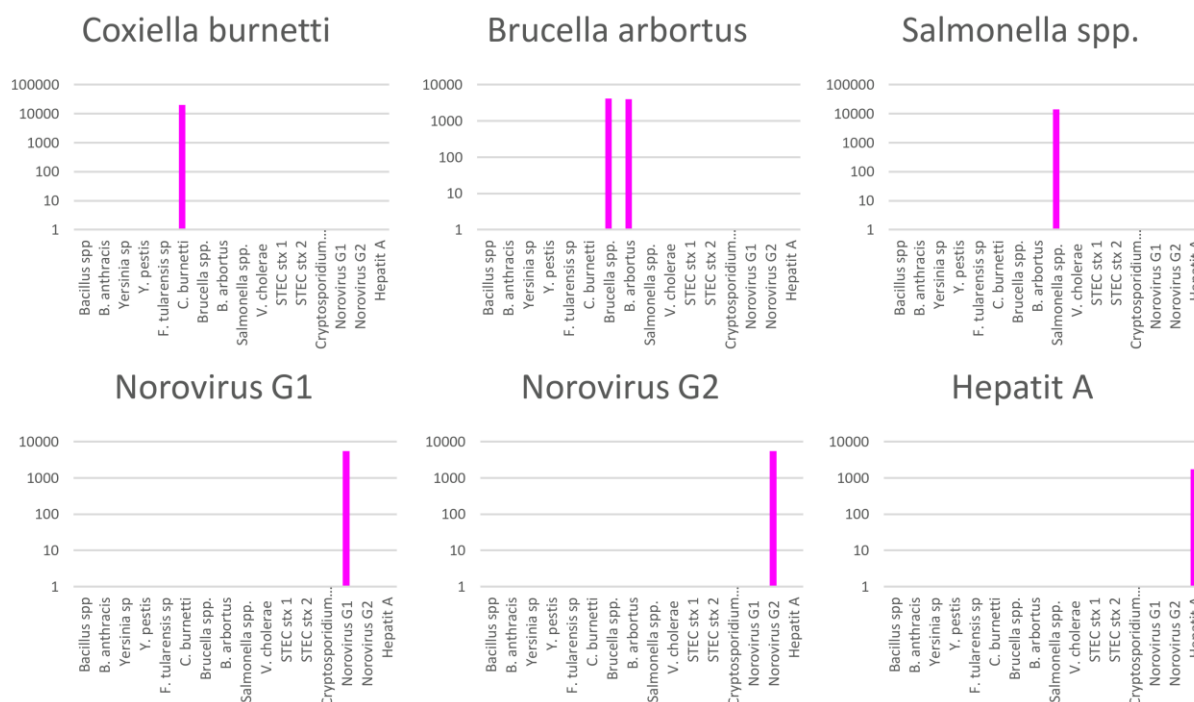
Tabell 16. Sekvenser för områden där padlock-proberna binder till respektive målsekvens.

Padlock probe name	Padlock probe target sequence (5'-3')
PLP_Bacillus spp	TGGTTTCTTGATGAGGGTTTGCGAGAAATGTTCAG
PLP_B. anthracis	AAGATTCAGAGACTCGTACATACATAGAAGGACGAT
PLP_Yersinia sp	ATAAGTGCCGTCATTTGTGATCCGTGATAACGCCCAT
PLP_Y. pestis	GATCACTGCCACGCACTGGTATTGGCAATGCTCGAA
PLP_F. tularensis sp	CAGTTAAGCAAGGTAATAACTTCTGTAGCGGTAAGT
PLP_C. burnetti	TTAAGACTGGCTACGGTGGATACATACTGAGCACGC
PLP_Brucella spp.	TTAAATGTAGGTTTCACATGATGGATGGCACAATTA
PLP_B. Abortus	GAGTGGCGCCAGTAGTATTGACGACATAGATATCGT
PLP_Salmonella spp.	TATTCAGTGCGATCAGGAAATCAACCAGATAGGTAG
PLP_V. Cholerae	AACCATTTTTTAAACATTTCTCAGYGAAAAS
PLP_STEC stx 1	TCATTACATAAGAACGCCCACTGAGATCATCCAGTG
PLP_STEC stx 2	ACACAGGAGCAGTTTCAGACAGTGCCTGACGAAATT
PLP_Cryptosporidium spp	ATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGA
PLP_Norovirus G1	CGGGCAGGAGATYGCGRTCTCCTGTCCACAATCCGA
PLP_Norovirus G2	CCAGATTGCGATCGCCCTCCCACGTGCTCAGATCTG
PLP_Hepatit A	TTAAGAACCCTGAACCTGCAGGAATTAATATTTACA

Den utvecklade hpPCR-panelen innehåller således 15 primerpar (båda STEC-varianterna plockas upp av ett och samma primerpar) och 16 padlock-prober. Primerkoncentrationer justerades empiriskt för att säkerställa höga antal detekterade RCA-produkter eller ”counts” (>1000) för positiva prover. Till den initiala RT-PCR:en sattes 1 µL extrakt till en total reaktionsvolym av 10 µL. För att maximera

detektionen utfördes 40 PCR-cykler. Samtliga tolv agens analyserades var för sig med 16-plex-panelen (STEC-stammen innehöll båda toxin-varianterna stx 1 och stx 2). Samtliga prover gav förväntade resultat, det vill säga tydlig detektion av korrekta agens och inga korsreaktioner för andra assayer (Figur 53). För DNA från *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* och *Brucella abortus* erhöles positiva resultat för såväl de genus-inriktade assayerna som de art-specifika. Det lägsta antalet ”counts” iaktogs för Hepatit A, men detta resultat var också tydligt positivt (>1000 counts).





Figur 53. Resultat för analys av 12 patogena agens med 16-plex hpPCR-panelen. Medelantalet detekterade RCA-produkter (counts) presenteras för respektive prov och assay. $n=2$.

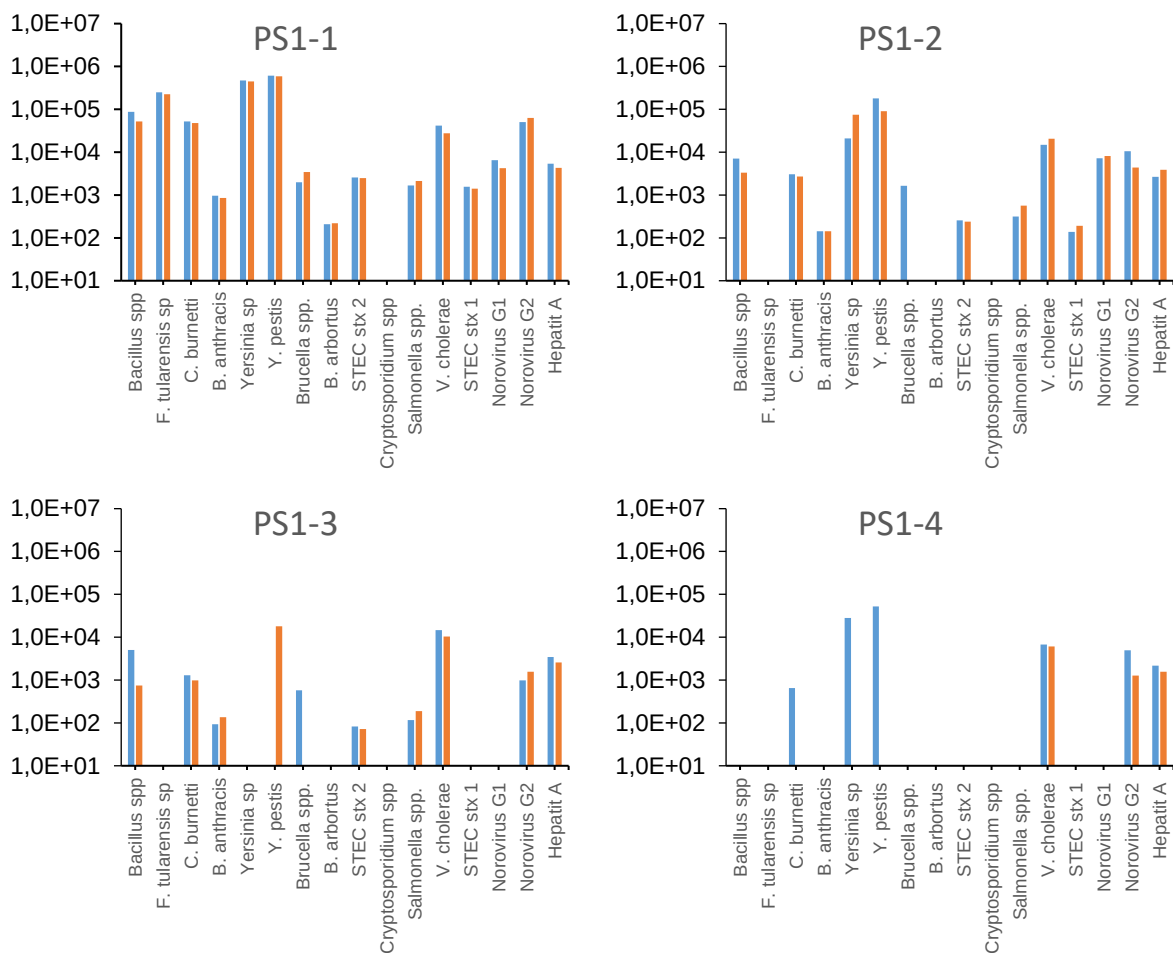
7.2.2 Utvärdering av hyperplex-PCR-panel för patogen-detektion

Utvärderingen av hpPCR-panelen fokuserades på exklusivitet/inklusiveitet, detektionsgräns och hämmareffekter. I samtliga försök sattes 5 μL prov till den initiala RT-PCR-reaktionen (totalvolym 10 μL). I denna studie presenteras samtliga utfall med detekterade counts som positiva, men ett tröskelvärde kommer att behövas om metoden implementeras i rutinanalys. hpPCR-analyserna utfördes av företaget Apex Bio utgående från prover beredda av nätverket.

Exklusivitet och inklusiveitet undersöktes även under utvecklingen av 16-plex-panelen i och med att samtliga tolv testade agens där gav förväntade resultat utan korsreaktioner. Ytterligare tester genomfördes där höga mängder *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* respektive Mengovirus analyserades. *Bacillus cereus* och *Yersinia enterocolitica* förväntades ge positiva resultat för respektive genusassay, medan *E. coli* och Mengovirus väntades ge negativa utfall. Dessutom analyserades en hög mängd DNA från ytterligare en stam av *Francisella tularensis* (*tularensis*, Typ A), som förväntades ge positivt resultat för *Francisella*-assayen. *Francisella tularensis* (*holarctica*, Typ B) inkluderades i övriga experiment med denna art. Detektionsgräns undersöktes i två experiment. I det första kombinerades tolv agens i en spädningsserie där den högsta koncentrationen skulle motsvara ca 10 000 DNA-kopior och 1000 RNA-kopior i hpPCR-analysen och den lägsta omkring 1 kopia/0,1 kopia. Antalet kopior beräknades från tidigare uppskattningar av koncentrationer med Qubit och får därför anses vara ungefärliga. Antalen valdes baserat på initiala qPCR-försök. Dessutom undersöktes

detektionen av låga mängder STEC (ca 10 kopior), *Bacillus anthracis* (ca 100 kopior), samt Norovirus G2 (ca 10 kopior) i närvaro av höga mängder (ca 100 000 kopior) *Salmonella* och *Vibrio cholerae*, samt analyser innehållande endast de låga mängderna STEC, *Bacillus anthracis* samt Norovirus G2. Hämmareffekter studerades med humussyra som modellhämmare. Två nivåer av hämmare testades tillsammans med DNA och RNA från STEC, *Bacillus anthracis*, samt Norovirus G2. Resultaten jämfördes mot kontroller med vatten i stället för hämmare.

Vissa hpPCR-analyser uppvisade positiv detektion för agens som inte fanns med i de berörda proverna. Orsaken till detta är i skrivande stund inte klarlagd. Innan metoden kan implementeras behöver denna problematik hanteras. I testet av exklusivitet och inklusivitet gav samtliga agens förutom *Yersinia enterocolitica*, som var negativ för *Yersinia*-genus-assayen för hpPCR-panelen, förväntade resultat. Kontrollförsök visade att även motsvarande qPCR-assay gav negativt resultat för *Yersinia enterocolitica*. Därmed bedöms problemet inte vara kopplat till hpPCR-tekniken. *Bacillus cereus* gav positivt utfall för *Bacillus*-genus-assayen i hpPCR, medan *E. coli* och Mengovirus gav negativa resultat. *Francisella tularensis* (Typ A) detekterades i *Francisella*-assayen. I undersökningen av detektionsgräns gav samtliga förväntade assayer (14 st) positiva utfall för den högsta agens-koncentrationen. Alla dessa assayer förutom *Brucella abortus* och *Bacillus anthracis* uppvisade över 1000 counts, vilket tyder på god analytisk kvalitet. Även Norovirus G1 detekterades, trots att det inte fanns med i provet. Med fallande DNA/RNA-mängder detekterades färre och färre agens (Figur 54). Stora skillnader i detektionsgräns uppvisades mellan olika agens, vilket delvis beror på osäkerhet i den initiala Qubit-kvantifieringen. Även skillnader i prestanda mellan assayerna bedöms påverka detektionsgränsen. För *Vibrio cholerae* detekterade hpPCR-panelen samtliga DNA-mängder med höga antal counts. De båda STEC-assayerna gav överlag få counts och misslyckades att detektera flertalet DNA-mängder trots att toxingenerna förekommer i flera kopior och att det totala antalet målmolekykler därmed bör vara fler än för övriga agens.



Figur 54. Undersökning av detektionsgräns för hpPCR-panelen. Analyserna innehöll samtliga agens förutom *Cryptosporidium* i minskande nivåer. PS1-1 innehöll inte Norovirus G1. PS1-1: ca 10000 kopior av bakterierna, ca 1000 kopior av virus; PS1-2: ca 1000 kopior av bakterierna, ca 100 kopior av virus; PS1-3: ca 300 kopior av bakterierna, ca 30 kopior av virus; PS1-4: ca 100 kopior av bakterierna, ca 10 kopior av virus.

När STEC (ca 10 kopior), *Bacillus anthracis* (ca 100 kopior), samt Norovirus G2 (ca 10 kopior) analyserades var för sig eller i närvaro av höga mängder (ca 100 000 kopior) *Salmonella* och *Vibrio cholerae*, gav hpPCR endast positiva resultat för Norovirus G2. qPCR detekterade Norovirus G2 och STEC (stx 1 och 2) i samtliga prover, samt *Bacillus* genus och *Bacillus anthracis* i prover som endast innehöll ca 100 kopior *Bacillus anthracis*. *Bacillus* genus-assayen i hpPCR-panelen var i princip opåverkad av den högsta mängden humussyra, 1500 ng. Även *Bacillus anthracis*-assayen gav detektion i närvaro av 1500 ng humussyra, men med låga antal counts. STEC-assayerna fungerade inte för 500 ng humussyra, vilket går i linje med deras låga prestanda överlag. Norovirus G2 kunde också detekteras av hpPCR för 1500 ng humussyra.

7.3 SAMMANFATTANDE SLUTSATSER: PCR-BASERADE ANALYSMETODER

Den kommersiell realtids-PCR-metod IQ-Check Vibrio PCR Detection Kit är ändamålsenlig för detektion av bakterier av släktet *Vibrio* i livsmedel.

hpPCR-panelen uppvisade lovande resultat med förbättringsmöjligheter såsom att lägga till ytterligare agens. Möjligheten att parallellt kunna detektera RNA och DNA ses som en styrka för metoden. Fortsatt optimering av hpPCRs initiala RT-PCR-steg behövs för att nå optimal detektion och repeterbara resultat. Detta arbete pågår i skrivande stund hos företaget som står bakom hpPCR-tekniken, Apex Bio. Dessutom behövs studier för att bestämma vilka antal counts som behövs för att ett resultat ska anses vara tillförlitligt. Resultaten visar också att hpPCR-panelen har god eller mycket god tålighet för modellhämaren humussyra. Potential att kunna detektera många agens i samma assay är mycket tilltalande och användbart, speciellt för screening av prover, där frågeställningen är oklar eller kunskapen om provets innehåll är liten. Användning av sådan metodik har potential att snabbare komma fram till provets komposition och motsvarande adekvat behandling, vilket kan spara liv. En ytterligare fördel kan vara att detta är en svensk teknik som i en avspärrningsituation kan finnas att tillgå. hpPCR-panelen är totalt sett lovande men kräver ytterligare optimering och utvärdering innan den kan valideras och implementeras vid laboratorierna.

8 UTBILDNING OCH TRÄNING

En av de viktigaste delarna för framgång i beredskap är övning och träning. Alternativa metoder eller reagens ingår kanske inte laboratoriernas standardanalyser och riskerar därmed att glömmas bort i samband med övning och träning. För att stärka vår beredskap och minska sårbarheten för samhällsstörningar behöver vi även öva och träna för det oväntade. I projektet har det hållits en workshop för att stärka kompetensen inom odling och typning samt två utbildningar i PCR med fokus på krisberedskap.

8.1 ODLING OCH TYPNING

I samband med störda förhållanden som kan påverka till exempel el- eller materialförsörjning till laboratorier och som innebär att ordinarie mer avancerad 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 också 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. Det är viktigt för laboratoriepersonal att ha kunskap och erfarenhet av hur respektive bakterie växer på olika agarplattor samt dess morfologi. Det räcker dock inte med mikroskopering och kolonimorfologi för att typa bakterier.

I samband med kunskapsinhämtningen och workshopen under föregående projektomgång 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 verktyg 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 en workshop som genomfördes 2019 framkom behovet av utbildningsinsatser angående grunder i

klassisk bakteriologi. Dessutom krävs kunskap för att kunna avgöra vilka bakterier som är relevanta beroende på till exempel matris och anamnes.

8.1.1 Studieupplägg

FBD projekt 31 har genom tidigare workshop (FBD 2022/24) fastställt behovet av utbildningsinsatser inom klassisk mikrobiologi för identifiering och typning av högpatogeta mikroorganismer för att säkra kritisk mikrobiologisk diagnostikförmåga under störda förhållanden. Utbildningsinsatser i detta delprojekt har fokuserats på odling av BSL3-agens samt gramfärgningsteknik. BSL3-agens odlades upp på selektiva och mindre selektiva substrat för att studera dess morfologi (se bilaga 1). Som en del i arbetet sammanställdes också en tabell över kända egenskaper hos olika BSL3-agens såsom mikromorfologi, gramfärgning och information om avdödning (se bilaga 2). För att simulera riktiga prover spikades olika matriser för att studera matriseffekter. Resultaten fotograferades och materialet diskuterades teoretiskt i en workshop med representanter från SVA, Livsmedelsverket och FOI. Samma dag hölls en även en utbildning i gramfärgning där deltagarna fick en teoretisk genomgång av metoden och sedan möjlighet att öva praktiskt (se bilaga 3).

8.2 PCR-ANALYS I KRISBEREDSKAP

Utbildningen *PCR-analys i krisberedskap* utvecklades vid Lunds universitet (LU) för att ge personal vid myndigheterna djupgående teoretisk och praktisk kunskap inom PCR-baserad DNA/RNA-analys med specifikt fokus på kvalitetssäkring och felsökning under störda förhållanden (se bilaga 4). Föreläsningar blandades med laborativa experiment, diskussioner samt en praktisk övning som gick ut på att identifiera okända agens med begränsade laborativa resurser (Figur 55). Utbildningen omfattade 40 timmar och gavs som intensivkurs vid *Avdelningen för teknisk mikrobiologi* vid två tillfällen: v. 35, 2023 och v. 16, 2024. Kursansvariga var personer från LU och Nationellt Forensiskt Centrum (NFC), Polismyndigheten. Vid varje tillfälle deltog åtta anställda från myndigheterna som ingår i FBD-nätverket. Totalt deltog tre personer från FM, tre från NFC, tre från SVA, tre från FOI, två från Livsmedelsverket och två från Fohm. Bland deltagarna fanns personer med metodansvar, projektledare och laborativ personal. Vissa hade mångårig erfarenhet av arbete med PCR medan andra var nybörjare. Utöver de sexton personer som deltog på plats så följdes kursens föreläsningar av ytterligare sex personer från FOI och SVA. Följande föreläsningar ingick i utbildningen: 1) Introduktion till PCR, 2) Realtids-PCR (qPCR), 3) Reverse Transcription qPCR – Relativ kvantifiering, 4) Validering, kontaminationsrisk och kvalitetskontroll, 5) PCR-hämning och pre-PCR processing, och 6) Forensisk DNA-analys.

Fyra laborationer och en praktisk övning ingick i utbildningen, där deltagarna labbad två och två och sedan redovisade sina resultat i diskussioner i helgrupp. Först studerades detektionsgränsen i PCR genom att analysera spädningsserier av DNA med såväl konventionell PCR med agarosgel-detektion som realtids-PCR (qPCR). Detta gav en grund för att diskutera likheter och skillnader mellan olika PCR-baserade tekniker. I den andra labben (PCR-optimering) undersöktes effekten av att öka respektive minska mängden av fyra kritiska ingredienser i PCR: magnesiumjoner, nukleotider, primrar och DNA-polymeras. I den tredje labben analyserades prover innehållande PCR-hämmare (humussyra från jord/sediment) med olika DNA-polymeraser, facilitorer och detektionssystem (DNA-bindande färg eller hydrolys prob) för att undersöka hur hämmartåligheten kan optimeras. I den fjärde labben analyserades RNA med hjälp av reverse transcription qPCR och skillnader och likheter mellan DNA- och RNA-analys diskuterades. I laborationerna fick deltagarna blanda mastermixar från grunden, bereda och utföra agarosgelelektrofores, förbereda PCR/qPCR samt utvärdera resultat från DNA/RNA-analys.



Figur 55. I utbildningen ingick både praktiska och teoretiska moment kopplade till PCR-analys i krisberedskap.

I den avslutande övningen fick deltagarna använda det de lärt sig under veckan genom att planera, designa och genomföra experiment för att identifiera vilka agens som ingick i tre prover med okänt innehåll (framrenat DNA). Scenariot handlade om att identifiera smittagens i en vattentäkt. Vissa prover innehöll hämmare och tillgången till analysreagens var kraftigt begränsad. Deltagarna fick välja mellan olika DNA-polymeraser och hade möjlighet att tillsätta vissa facilitorer. Dessutom kunde de använda antingen agarosgelelektrofores eller realtids-PCR. Svar krävdes inom en arbetsdag. Vissa grupper rapporterade endast frånvaro/närvaro av ett specifikt agens, medan andra även angav DNA-koncentration. Övningen gav upphov till många intressanta diskussioner om upplägg och genomförande av laborationer med alternativa metoder under störda förhållanden. Deltagarna var överlag nöjda med utbildningen (Tabell 17). Såväl personer med lång tidigare erfarenhet av PCR som nybörjare uppgav att de lärde sig mycket under kursen. De flesta angav övningen *Det okända provet* som det mest givande momentet, samt möjligheten att lära känna och diskutera med personer från andra myndigheter.

Tabell 17. Resultat från kursutvärdering för de två tillfällen som utbildningen PCR-analys i krisberedskap arrangerades. De åtta deltagarna vid respektive kurstillfälle gav betyg 1 till 5 kopplat till fem olika frågor.

Fråga	2023	2024
Övergripande betyg till utbildningen	5,0	4,9
Lärde du dig mycket?	4,6	4,7
Var kursledarna kunniga inom ämnet?	5,0	4,9
Planering och genomförande	4,3	4,6
Kursmaterial	4,9	4,8

9 SLUTSATSER

9.1 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.

9.2 PROJEKTRESULTAT I FÖRHÅLLANDE TILL PROJEKTETS URSPRUNGLIGA MÅL

Samtliga sex delmål anses vara uppfyllda. Utöver de initiala målen inkluderades även en utvärdering av analysmetoden hyperplex PCR (hpPCR) som tillhandahålls av företaget Aplex Bio med avseende på relevanta agens.

9.3 SAMVERKANSVINSTER

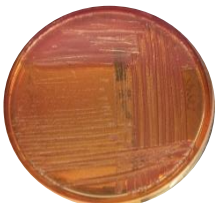
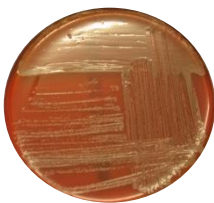
Möjligheten att få diskutera frågeställningar rörande analyser och reagenser ur ett beredskapsperspektiv i ett större sammanhang där fler aktörer ingår har ökat värdet i projektet. Både workshops, inventeringar och övning har bidragit till att fler medarbetare på respektive myndighet har varit delaktiga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

10 BILAGOR

10.1 BILAGA 1 – MORFOLOGI PÅ PLATTOR HOS UTVALDA BSL3-AGENS

Agens	Selektivt medium	Icke-selektivt medium
Bacillus anthracis	PLET-agar: Används vid misstanke om hög bakgrundsflora i proverna. Gråvita och ofta platta kolonier med en yta likt frostat glas.  Chromagar Anthracis med PLET-tillsatser: Används vid misstanke om hög bakgrundsflora och konkurrerande stammar av närbesläktade Bacillus. På Chrom-PLET vita eller ljus blå efter 24 h medan andra Bacillus är mörkt blå efter 24 h. Efter 48 h har även färgen på B. anthracis blivit mörkare blå (bild saknas).	Blodagar: Bildar stora (3-5 mm) regelbundna gråvita kolonier, ger ej hemolys. 

Agens	Selektivt medium	Icke-selektivt medium
Brucella spp	Farrellagar: Vita kolonier 	TSA (tryptic soy agar) med 5% nötblod (Farellagar utan tillsats av antibiotika): Vita kolonier   Blodagar: Honungsfärgade till vita kolonier, ger ej hemolys

Agens	Selektivt medium	Icke-selektivt medium
Burkholderia mallei	 Ashdown's agar: Små runda vita kolonier som ofta har en glansig yta.	 Blodagar: Grå halvgenomskinliga kolonier, ger ej hemolys.
Burkholderia pseudomallei	 Ashdown's agar: Vita kolonier	 Blodagar: Vita kolonier
Francisella tularensis	 T4-agar: Bleka, gråaktiga och ofta blanka kolonier.	 T5 agar: Bleka, gråaktiga och ofta blanka kolonier.

Agens	Selektivt medium	Icke-selektivt medium
Yersinia pestis	CIN-agar: Cerisefärgade kolonier. Upphöjda kolonier som liknar ett  stekt ägg i morfologin	Blodagar: Bildar små gråaktiga kolonier, som inte ger hemolys på  blodagar (ca 1 mm i diameter)

10.2 BILAGA 2 – EGENSKAPER HOS UTVALDA BSL3-AGENS

Agens	Mikromorfologi	Gramfärgning	Egenskaper	Avdödning
Bacillus anthracis	Stora orörliga stavar i kedjor. Kan bilda sporer, som är ovala och centralt placerade i bakteriecellen.	G+ *Kapselfärgning med gammal metylenblåttlösning (halvfylld flaska minst 1 år). Kapsel röd, bakteriekropp blå. (Tham, Några vanliga biokemiska tester inom bakteriologin)	Katalaspositiv Oxidasnegativ Voges-Proskauer positiv Lecithinaspositiv Mannitolnegativ Ger ej hemolys på blodagar	Hypoklorit eller Klorin (min 2.5%) i vatten justerad till pH≤7 med koncentrerad ättiksyra. Effekten kvarstår även vid 0.5% Na hypoklorit. Lösningen tillbereds direkt innan användning eftersom aktiviteten avtar med tiden. pH-värdet är viktigt då natriumhypoklorit med för högt pH värde har begränsad sporavdödande effekt. Verkningstid 20 min. Alkohol dödar ej sporer
Brucella spp	Orörlig liten kockoid stav.	G-	Katalaspositiv Oxidaspositiv Tryptofanas (indol-)negativ Voges-Proskauer negativ H ₂ S negativ Ureaspositiv Ger ej hemolys på blodagar	70 % EtOH. 1% natriumhypoklorit

Agens	Mikromorfologi	Gramfärgning	Egenskaper	Avdödning
			De flesta Brucella spp. bildar ej syra genom fermentation av kolhydrater.	
Burkholderia mallei	Små, kockoida och orörliga stavar. Har ej flageller.	G-	Katalaspositiv Oxidas varierar Fermenterar ej kolhydrater	70 % EtOH. 1% natriumhypoklorit
Burkholderia pseudomallei	Små, rörliga stavar, som har flera polära flageller.	G-	Katalaspositiv Oxidaspositiv Fermenterar ej kolhydrater	70 % EtOH. 1% natriumhypoklorit
Francisella tularensis	Kockoid eller korta orörliga stavar.	G-	Katalaspositiv Oxidasnegativ Tryptofanas (indol-)negativ Ureasnegativ Fermenterar glukos.	70 % EtOH

Agens	Mikromorfologi	Gramfärgning	Egenskaper	Avdödning
Yersinia pestis	Icke rörliga stavar.	G-	Katalaspositiv Oxidaspositiv Tryptofanas (indol-) negativ Ureasnegativ Citratnegativ Eskulinasnegativ Metylroött positiv	70 % EtOH. 1% natriumhypoklorit
Coxiella	Små orörliga och pleomorfa stavar	G-	Mycket resistent mot kemikalier och hög temperatur. Bakterien kan bilda en endosporliknande kropp.	70 % EtOH. Hypoklorit eller Klorin (min 2.5%) i vatten justerad till pH≤7 med koncentrerad ättiksyra.

10.3 BILAGA 3 – GRAMFÄRGNINGSBILDNING

Syfte: Att praktiskt testa gramfärgningens olika delar, från att förbereda preparat till att läsa av i mikroskop.

Workshop började med en teoretisk genomgång av säkerhetsaspekter samt teorin bakom gramfärgning. Efter detta genomfördes den praktiska delen.

Inför workshop hade ett antal olika stammar odlats upp för att ge exempel på några olika gramvarianter:

- *E. coli* (gramnegativ stav)
- *Staphylococcus pseudintermedius* (grampositiv kock)
- *Streptococcus zooepidemicus* och *pyogenes* (grampositiv kock)
- *Bacillus cereus* (grampositiv stav)
- *Haemophilus influenzae* (gramnegativ kockobacill)

Deltagarna fick sedan träna på att förbereda preparatet. Först fick man lära sig att lägga preparat enligt standardförfarande. Dessutom testades också hur utfallet av färgningen skulle bli beroende på hur tjockt preparatet blev samt påverkan av fixeringstid över öppen låga. Betydelsen av att slamma isolatet i NaCl kontra ultrarent vatten jämfördes också.

Vid de olika färgningsstegen uppmuntrades deltagarna också att testa att variera tiden för varje steg, samt intensitet i avfärgning.

Deltagarna fick sedan mikroskopera sina färgade preparat och se hur de olika behandlingarna påverkats. Slutsatsen blev att metoden är relativt robust och det som påverkade resultatet mest var ett överdrivet brännande av preppet för fixering.

I nästa moment fanns redan förberedda preparat med okänt innehåll som deltagarna fick färga och sedan mikroskopera. Målet var att identifiera vilken eller vilka typer av bakterier man såg på preparatet samt om man kunde urskilja någon övrig morfologisk skillnad.

Testet bestod av tre olika preparat:

- A. *Bacillus cereus* (Stor grampositiv stav) + *Pseudomonas aeruginosa* (gramnegativ stav)
- B. *Haemophilus influenzae* (gramnegativ kockobacill) + *Staphylococcus pseudintermedius* (grampositiv kock)
- C. *Nocardia asteroides* (grampositiv stav) + *Streptococcus zooepidemicus* (grampositiv kock)

Mikroskoperingen ledde till en givande diskussion då några av bakterierna varit med i de tidigare momenten medan några var nya. Dessutom var det blandningar som gjorts för att kunna leda till förvirring om huruvida färgningen gått rätt till, t ex om avfärgningen varit för kraftig.

10.4 BILAGA 4 – RECEPT FÄRGLÖSNINGAR TILL SAMT UTFÖRANDE AV GRAMFÄRGNING

Kristallviolett:

Lösning A: Kristallviolett 10 mg

95% EtOH 100 ml

Blanda tills innehållet löst sig

Lösning B: Ammoniumoxalat, 1% i destillerat vatten

Blanda 20 ml av lösning A och 80 ml av lösning B

Lugols:

- 3,3 g jod och 6,7 g kaliumjodid blandas i en mortel, tills de blandats väl.
- Fukta massan med små portioner destillerat vatten och överför till en flaska.
- Fyll på med destillerat vatten till totalt 1000 ml.
- Skaka innehållet till dess allt har löst sig och förvara mörkt.

Safranin 0,25%:

- Väg in 2,5 g safranin och lös i 100 ml 95% EtOH
- Låt stå på omrörning tills det löst sig
- Tillsätt 900 ml destillerat vatten

Aceton-alkohol i droppflaska:

- 95% EtOH 4 delar
- Aceton 1 del

Instruktion färgning

1. Sätt en droppe vatten eller 0,9 NaCl lösning på ett objektglas
2. Slamma lite bakteriematerial i droppen.
3. När glaset torkat fixerar man genom att föra objektglaset med bakteriesidan uppåt genom gaslåga 4-5 gånger.
4. Droppa rikligt med kristallviolettlösning och vänta 1 minut.
5. Skölj med lugols lösning och låt lösningen ligga på 1 minut
6. Avfärga försiktigt med acetonsprit till dess att ingen färg löses ut.
7. Skölj försiktigt med kranvatten.
8. Kontrastfärga flödigt med safraninlösning i ca 30 sekunder
9. Skölj försiktigt med kranvatten, torka med filterpapper.
10. Mikroskopera

10.5 BILAGA 4 – INBJUDAN TILL PCR-UTBILDNING 2023



PCR-analys i krisberedskap

Utbildning i samarbete med projekt 31 inom Forum för beredskapsdiagnostik

Anmäl deltagande till johannes.hedman@tmb.lth.se senast 9 juni.

Deltagare: Laborativ personal vid myndigheterna. Inga förkunskapskrav. Åtta platser, en plats avsatt för varje partner. Meddela också om det finns intresse för mer än en deltagare.

Plats: Avdelningen för teknisk mikrobiologi (TMB), Lunds universitet

Datum: 28 augusti - 1 september 2023

Tekniker: Konventionell PCR med agarosgel-elektrofores samt realtids-PCR

Föreläsningar:

- Introduktion till PCR
- Realtids-PCR (qPCR)
- Reverse Transcription qPCR
- Validering, kontaminationsrisk och kvalitetskontroll
- Pre-PCR processing
- Forensisk DNA-analys

Laborationer:

- Detektionsgräns – konventionell PCR vs realtids-PCR
- PCR-optimering
- Pre-PCR processing
- Reverse Transcription qPCR
- “Okända provet”.

Samtliga mastermixar tillreds från grunden.

Diskussioner och ws där vi gräver djupare i de principer som styr PCR och möjligheten att få användbara resultat från svåra prover.

På förfrågan kan föreläsningarna också ges digitalt. Kursen ges på svenska med kursmaterial på engelska.

Välkomna till Lund! / Johannes, Linda och Lisa



PCR-analys i krisberedskap 2

Utbildning i samarbete med projekt 31 inom Forum för beredskapsdiagnostik

Anmäl deltagande till johannes.hedman@tmb.lth.se senast 1 mars.

Deltagare: Metodansvariga samt laborativ personal vid myndigheterna. Åtta platser, en plats avsatt för varje partner. SVA har i år företräde till en av de två extraplatserna. Meddela så snart som möjligt om ni önskar mer än en plats.

Plats: Avdelningen för teknisk mikrobiologi (TMB), Lunds universitet

Datum: 15-19 april 2024

Tekniker: Konventionell PCR med agarosgel-elektrofores samt realtids-PCR

Föreläsningar:

- Introduktion till PCR
- Realtids-PCR (qPCR)
- Reverse Transcription qPCR
- Validering, kontaminationsrisk och kvalitetskontroll
- Pre-PCR processing
- Forensisk DNA-analys

Laborationer:

- Detektionsgräns – konventionell PCR vs realtids-PCR
- PCR-optimering
- Pre-PCR processing
- Reverse Transcription qPCR
- “Okända provet”.

Samtliga mastermixar tillreds från grunden.

Diskussioner och ws där vi gräver djupare i de principer som styr PCR och möjligheten att få användbara resultat från svåra prover.

På förfrågan kan föreläsningarna också ges digitalt. Kursen ges på svenska med kursmaterial på engelska.

Välkomna till Lund! / Johannes och Lisa

11 REFERENSER

- 1.) He, H., R. Li, Y. Chen, P. Pan, W. Tong, X. Dong, Y. Chen and D. Yu (2017). *Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections*. *Sci Rep* 7: 45199. DOI: [10.1038/srep45199](https://doi.org/10.1038/srep45199)
- 2.) Jansson, L., Fagerholm, S.A., Börkén, E., Gynnå, A.H., Sidstedt, M., Forsberg, C., Ansell, R., Hedman, J. and , A. Tillmar (2024). *Assessment of DNA quality for whole genome library preparation*. *Analytical Biochemistry*, 695, p.115636. DOI: [10.1016/j.ab.2024.115636](https://doi.org/10.1016/j.ab.2024.115636)



Folkhälsomyndigheten



STATENS
VETERINÄRMEDICINSKA
ANSTALT



FOI



Livsmedelsverket



FÖRSVARSMAKTEN



Polisen