

FFI RAPPORT

PÅVISNING AV BIOLOGISKE STRIDSMIDLER VED BRUK AV REAL-TIME PCR

FYKSE, Else Marie, OLSEN, Jaran Strand, SKOGAN, Gunnar

FFI/RAPPORT- 2004/04247

FFIV/895/139

Godkjent
Kjeller 7. desember 2004

Bjørn Arne Johnsen
Forskningsjef

**PÅVISNING AV BIOLOGISKE STRIDSMIDLER
VED BRUK AV REAL-TIME PCR**

FYKSE, Else Marie, OLSEN, Jaran Strand, SKOGAN,
Gunnar

FFI/RAPPORT- 2004/04247

FORSVARETS FORSKNINGSINSTITUTT
Norwegian Defence Research Establishment
Postboks 25, 2027 Kjeller, Norge

P O BOX 25
 NO-2027 KJELLER, NORWAY
REPORT DOCUMENTATION PAGE

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
 (when data entered)

1) PUBL/REPORT NUMBER FFI/RAPPORT- 2004/04247	2) SECURITY CLASSIFICATION UNCLASSIFIED	3) NUMBER OF PAGES 35
1a) PROJECT REFERENCE FFIV/895/139	2a) DECLASSIFICATION/DOWNGRADING SCHEDULE -	
4) TITLE PÅVISNING AV BIOLOGISKE STRIDSMIDLER VED BRUK AV REAL-TIME PCR IDENTIFICATION OF BIOLOGICAL AGENTS USING REAL-TIME PCR		
5) NAMES OF AUTHOR(S) IN FULL (surname first) FYKSE, Else Marie, OLSEN, Jaran Strand, SKOGAN, Gunnar		
6) DISTRIBUTION STATEMENT Approved for public release. Distribution unlimited. (Offentlig tilgjengelig)		
7) INDEXING TERMS IN ENGLISH: IN NORWEGIAN:		
a) <u>Biological warfare agents</u>	a) <u>Biologiske stridsmidler</u>	
b) <u>Molecular biology</u>	b) <u>Molekylærbiologi</u>	
c) <u>Detection and identification</u>	c) <u>Påvisning</u>	
d) <u>Real-time PCR</u>	d) <u>Real-time PCR</u>	
e) <u>DNA</u>	e) <u>DNA</u>	
THESAURUS REFERENCE:		
8) ABSTRACT Genetic methods are nowadays considered indispensable for identification of microorganisms. Such methods are used in the field of food safety, clinical diagnostics of humans and animals and for identification of biological warfare agents. In PCR, specific DNA-sequences are amplified and these PCR products are detected by gel electrophoresis. In real-time PCR amplified DNA is detected during the PCR by using the fluorescent dye SYBR Green I or fluorescent labelled DNA probes. Real-time PCR has considerable advantages over classical PCR. It is fast (20-40 minutes), possibility of quantification and no additional detection method such as gel electrophoresis is needed, which means decreased risk of contamination between different samples. In this report we describe real-time PCR methods for identification of several biological warfare agents such as <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Francisella tularensis</i> and <i>Brucella melitensis</i> . A method for analysis of Vaccinia virus is also included. These samples are provided by Dr Bruce Harper, Dugway Proving Ground, Life Science Division, USA. In addition we shortly describe a method for lysis of Gram-positive bacteria exemplified by <i>Bacillus cereus</i> .		
9) DATE 7. desember 2004	AUTHORIZED BY This page only Bjørn Arne Johnsen	POSITION Director of Research

ISBN 82-464-0913-1

UNCLASSIFIED

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
 (when data entered)

INNHOOLD

	Side	
1	INNLEDNING	7
1.1	Biologiske stridsmidler	7
1.2	Påvisning av biologiske stridsmidler	7
1.3	Bruk av molekylære metoder for påvisning av biologiske stridsmidler	8
1.4	Prinsipper for real-time PCR	8
1.5	Bruk av real-time PCR for påvisning av biologiske stridsmidler	11
2	MATERIALER OG METODER	12
2.1	MATERIALER	12
2.2	METODER	15
2.2.1	PCR-amplifikasjon	15
3	RESULTATER	17
3.1	Optimalisering av PCR	17
3.2	Påvisning av bakterier med real-time PCR	19
3.2.1	Påvisning av bakterier generelt	19
3.2.2	Påvisning av <i>Bacillus anthracis</i>	21
3.2.3	Påvisning av <i>Coxiella burnetii</i>	23
3.2.4	Påvisning av <i>Brucella melitensis</i>	24
3.2.5	Påvisning av <i>Francisella tularensis</i>	25
3.2.6	Påvisning av <i>Vibrio cholerae</i>	26
3.2.7	Påvisning av <i>Yersinia pestis</i>	28
3.2.8	Påvisning av Vaccinia virus	29
3.3	Lysering av bakterieceller og kvantitativ real-time PCR	30
4	DISKUSJON	32
5	REFERANSER	33

Påvisning av biologiske stridsmidler ved bruk av real-time PCR

1 INNLEDNING

I denne rapporten beskrives metoder for påvisning av biologiske stridsmidler ved bruk av real-time PCR (polymerase-kjedereaksjon, sanntids PCR). Med påvisning menes ikke bare deteksjon, men også spesifikk identifikasjon av en spesifikk art. Real-time PCR er en molekylærbiologisk metode som kan brukes til påvisning av spesifikke DNA-sekvenser for å identifisere en art. Til mer detaljerte stammebestemmelser må andre PCR-baserte metoder brukes samt DNA-sekvensering. Arbeidet som er beskrevet i rapporten er gjort under FFI-prosjekt: 814-Utvikling av metoder for identifikasjon av biologiske stridsmidler.

1.1 Biologiske stridsmidler

Biologiske stridsmidler er levende bakterier, virus, sopp, eller toksiner produsert av slike mikroorganismer. Som følge av siste tids hendelser er det i dag økt fokus på biologiske stridsmidler og bioterror. Trusselen fra slike våpen er kompleks og uoversiktlig. Bruk av biologiske stridsmidler kan ramme både militær og sivil virksomhet med mulighet for langvarig påvirkning av operativ evne og store tap som følge av sykdom og død. Biologiske stridsmidler kan også rettes mot sivilbefolkningen eller mot et lands økonomi og samfunnsfunksjoner, gjerne med anslag mot landbruksproduksjonen. Mikroorganismer som tradisjonelt har vært brukt til fremstilling av biologiske stridsmidler gir opphav til sykdommer som finnes naturlig flere steder i verden, men slike sykdommer er sjeldne i våre områder. I enkelte tilfeller kan det være vanskelig å avgjøre om et utbrudd av slike sykdommer er naturlig eller et resultat av en terrorhandling. Et angrep med biologiske stridsmidler eller et bioterroranslag vil ofte ikke bli oppdaget før symptomer på sykdom bryter ut. Da er det viktig med hurtig avklaring av hvilken mikroorganisme som er involvert slik at rask diagnose kan stilles og riktig behandling startes for å begrense skadevirkningene. Målet er å begrense antall personer som blir syke.

1.2 Påvisning av biologiske stridsmidler

Ulike metoder kan brukes for identifikasjon av biologiske stridsmidler. Klassiske metoder som dyrking av mikroorganismer og mikroskopi er utprøvde og fungerer i mange tilfeller bra. Fordelen med dyrking er at levende organismer kan påvises og eventuell antibiotikaresistens hos organismen kan avsløres. En ulempe er imidlertid at metoden er tidkrevende for mange mikroorganismer. Det kan ta fra timer og opp til flere dager. Enkelte bakterier er heller ikke dyrkbare. I jord er det kun 0,1 til 0,5 % av bakteriene som er dyrkbare, mens < 1 % er dyrkbare fra vann. Flere bakterier, f.eks. *Vibrio cholerae*, kan gå over i en ikke-dyrkbar tilstand ved ugunstige miljøforhold. Immunologiske metoder kan også benyttes for identifikasjon av

biologiske stridsmidler, men det krever tilgang på spesifikke antistoffer som gjenkjenner ulike biologiske stridsmidler. Påvisning av sporer med immunologiske metoder er vanskelig da det er vanskelig å lage spesifikke antistoffer mot sporer.

Den raske utviklingene som har skjedd innen bioteknologi og genteknologi de siste årene har muliggjort svært spesifikk identifikasjon av biologiske stridsmidler. Vi har etablert og utviklet real-time PCR-metoder for påvisning av DNA fra utvalgte mikroorganismer. Dette er *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Brucella melitensis* og Vaccinia virus. Prøvene er kobolt-bestrålte mikroorganismer som vi har mottatt fra Dr. Bruce Harper, US Army Dugway Proving Ground, USA i forbindelse med NATO-PfP SIBCA øvelser for påvisning av biologiske stridsmidler. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* og *Vibrio cholerae* er dyrket ved FFI.

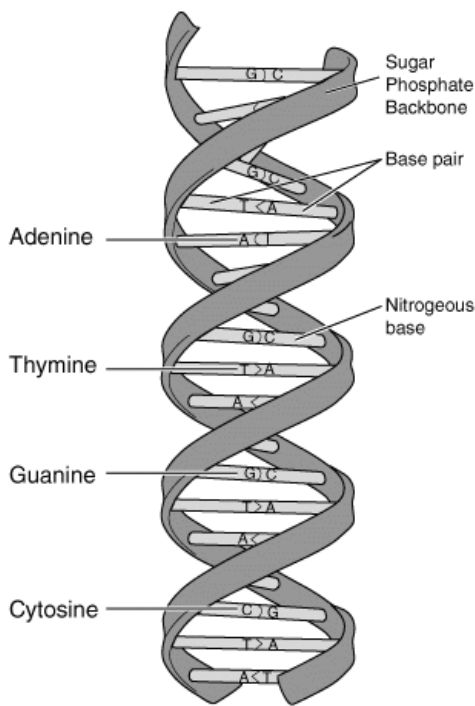
1.3 Bruk av molekylære metoder for påvisning av biologiske stridsmidler

Molekylærbiologiske metoder fokuserer på innholdet av deoksyribonukleinsyre (DNA) eller ribonukleinsyre (RNA) i et biologisk agens. Slike metoder er derfor i prinsippet kun egnet for organismer som inneholder DNA eller RNA, f eks bakterier, sopp og virus, men de er ikke egnet for toksiner. Grove preparater av enkelte biotoksiner, f eks botulinium toksin, kan inneholde rester av genetisk materiale som er tilstrekkelig for å gjennomføre genetiske analyser. Den totale sekvensen av DNA i en organisme (eller RNA for noen virus) kalles ofte genom-sekvensen (eller genomet). Denne sekvensen koder for alle de potensielle egenskapene til en organisme og kalles for organismens genotype. En organisme kan identifiseres på bakgrunn av hele DNA-sekvensen eller spesifikke deler av den. Molekylære metoder er godt egnet for identifikasjon av biologiske stridsmidler, de er raske og konkluderende. Dette er vist ved flere NATO-PfP SIBCA ”round robin” øvelser. Forskjellige karakteristikk ved en organisme kan brukes til spesifikk identifikasjon, men virulens egenskaper er mer viktig enn andre karakteristikk da dette bestemmer organismens patologiske effekt. Molekylære metoder har gitt innsikt i forskjeller og likheter mellom patogene og ikke-patogene nært beslektede organismer. Det er vist at *B. anthracis*, *B. cereus* og *B. thuringiensis* som har svært forskjellige fenotypiske egenskaper og patologisk effekt, i prinsippet kan klassifiseres som en art på bakgrunn av genetiske bevis (Helgason, *et al*, 2000). Etter hvert som DNA-sekvensen av flere patogene mikroorganismer og deres ikke-patogene slektninger blir kjent, øker mulighetene for utvikling av spesifikke påvisningsmetoder. I juni 2003 var 88 mikroorganismer fullsekvensert (hele genomet) og ytterligere 100 andre var underveis. Dette arbeidet skjer så raskt at ca 200 nye gener blir sekvensert hver dag og slik informasjon er tilgjengelig via store databanker.

1.4 Prinsipper for real-time PCR

De fleste levende organismer inneholder DNA som genetisk materiale med unntak av enkelte virus som har RNA. DNA inneholder 4 ulike aromatiske baser (adenin, guanin, cytosin, tymidin). En base koplet sammen med deoksyribose gir 4 ulike deoksynukleosider. Når et

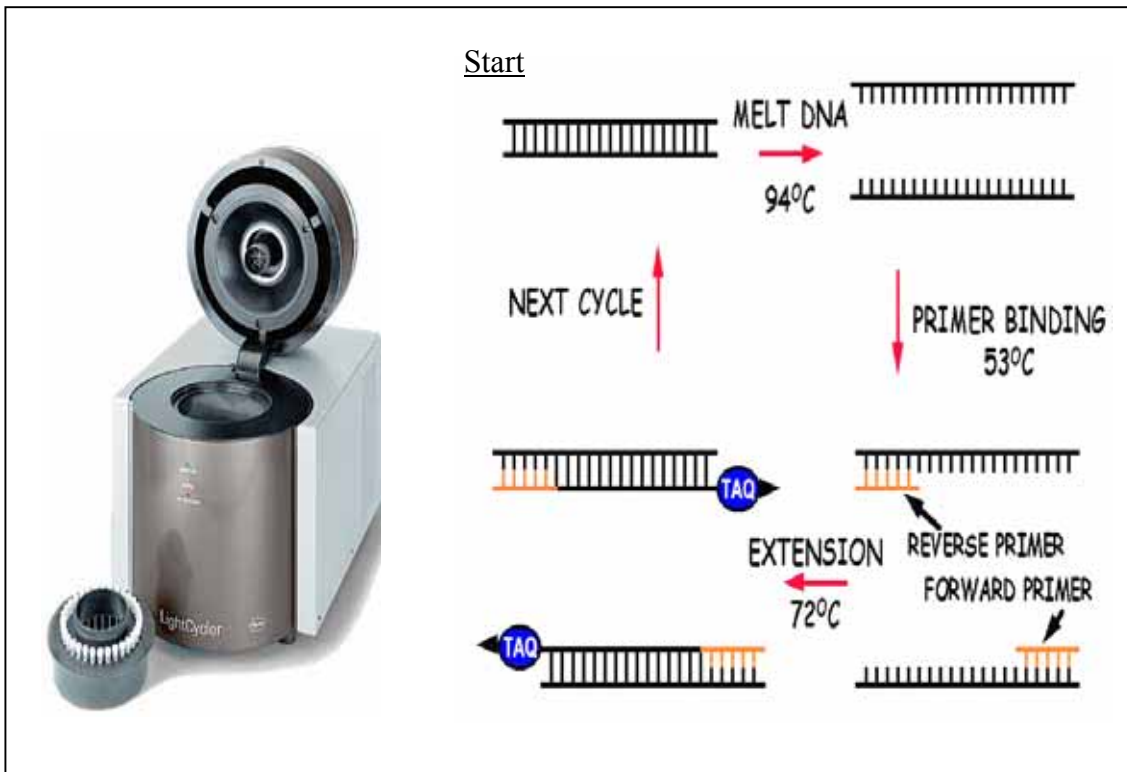
deoksynukleosid koples sammen med en fosfatgruppe fås et deoksyribonukleotid. DNA-molekylet består av to komplementære kjeder av deoksyribonukleotider som danner en dobbelheliks. Sekvensen av de ulike basene i polynukleotidkjedene bestemmer den genetiske informasjonen og et gen er en del av DNA-molekylet som koder for et protein. Påvisning av slike DNA-sekvenser kan brukes som markører for påvisning av en organisme.



Figur 1.1 Modell av en DNA-doppelheliks.

Til analyse av DNA kan man benytte PCR eller "In vitro amplifikasjon av DNA". PCR er en teknikk som ble tatt i bruk fra 1985, og den blir stadig videreutviklet og brukt på flere og flere områder. Med denne metoden kan en raskt skaffe seg store mengder DNA som lettere kan detekteres, fra en opprinnelig minimal mengde. Som DNA-kilde (templat) er det i teorien nok med ett DNA-molekyl som inneholder den sekvensen man ønsker masseprodusert, men i praksis må det benyttes flere kopier. Man må kjenne DNA-sekvensen til ca 20 baser på hver side av det DNA-fragmentet man skal mangfoldiggjøre (amplifisere). På grunnlag av dette lages det to syntetiske oligonukleotider som er komplementære til disse områdene. Disse oligonukleotidene fungerer som primere for DNA-syntesen (startsekvenser). Det brukes enkelttrådede primere som er komplementære til motsatte DNA-tråder. Denaturering av DNA vil si at de to kjedene av deoksyribonukleotider skiller lag. Dette skjer bl a ved oppvarming og kalles også smelting. Smeltepunktet til templatet er per definisjon når 50 % av DNA-trådene har skilt lag og blitt enkelttrådet. Renaturering vil si at to enkelttråder tilbakedanner dobbeltrådet DNA. Dette kalles også for "annealing" (sammensmelting). Reaksjonsblandingen må inneholde templat-DNA, to komplementære primere, de 4 deoksyribonukleotidene og enzymet DNA-polymerase for syntese av DNA. DNA-kilden (templat) varmes opp til ca 95°C som gir enkelttrådet DNA. Deretter avkjøles blandingen til ca 55-60°C, og primerne bindes til hver sin DNA-tråd i komplementære områder. Ved oppvarming til 72°C syntetiseres DNA der primerne er bundet og det lages en ny

komplementær tråd på hver av de to opprinnelige. Når denne tråden er ferdig startes en ny runde med oppvarming, avkjøling og syntese. Denne syklusen kan gjentas 30-40 ganger og det skjer en dobling av antall DNA-molekyler for hver runde. Hvis en starter med ett molekyl som templat har man teoretisk etter 10 runder 256 molekyler, etter 20 runder 262 144 og etter 30 runder 268 millioner kopier av samme DNA-molekyl. Ved endepunktet av PCR-reaksjonen vil PCR- produktet ha en veldefinert størrelse, den som er bestemt av avstanden mellom primerne.



Figur 1.2 Skjematisk fremstilling av den første syklusen i en PCR-reaksjon. Bildet viser også en LightCyclerTM PCR-maskin.

En ulempe med PCR-teknikken frem til nå har vært at metoden har vært relativt tidkrevende. I tradisjonell PCR tar hver syklus ca 4-5 minutter, slik at hele syntesen tar 2-3 timer. I tillegg kommer tiden det tar å analysere PCR-produktene. Til analyse av PCR-produktene brukes ofte gelektroforese-tekniker. De siste årene er det lansert flere PCR-maskiner der både syntese og analyse av produktene kan gjennomføres i løpet av 20-40 minutter, såkalt real-time PCR. Slike instrumenter består av to ulike hovedkomponenter, en syntesedel og en fluorimeterdel til analyse og deteksjon av produktene. Kvantifisering av PCR-produktene er også mulig. Eksempler på slike maskiner er LightCyclerTM fra Roche (Sveits) og Smart Cycler^R fra Cepheid (USA). Ved FFI brukes begge disse maskinene. Denne rapporten er basert på resultater fra en LightCyclerTM, men de samme analysene kan utføres på Smart Cycler^R. Syntesedelen i slike maskiner er optimalisert for å utføre hurtige PCR-analyser. I LightCyclerTM forgår reaksjonene i kapillærrør med høy overflate til volumratio, og luft benyttes til temperaturregulering. Temperaturen i PCR-instrumentet forandres med 20°C per sekund, og det

fører til at hver syklus kan gjennomføres på under 30 sekunder. Ved real-time PCR kan produkt dannelsen direkte detekteres etter hver syklus og kvantitering av PCR-produktene er mulig. LightCycler™ finnes også i en utgave som er beregnet for feltbruk, R.A.P.I.D.^R System (Ruggedized Advanced Pathogen Identification Device), Idaho Technology (USA). Smart Cycler^R instrumentet er mer robust enn laboratorieutgaven av LightCycler™ og er mer egnet for feltbruk. Utviklingen av ”feltinstrumentene” er støttet økonomisk av det Amerikanske Forsvaret.

1.5 Bruk av real-time PCR for påvisning av biologiske stridsmidler

Både sekvensuavhengig og sekvensspesifikk deteksjon av PCR-produktene er mulig. Sekvensuavhengig fluorescensdeteksjon utføres ved bruk av SYBR-Green I som bindes til dobbelttrådet DNA som syntetiseres i hver syklus. Hvert PCR-produkt har et spesifikt smeltepunkt som kan brukes til identifikasjon av produktet. Smeltepunktet er avhengig av produktets basesevens og sekvensens lengde (størrelse). Smeltepunktet bestemmes ved å øke temperaturen langsomt fra ca 55°C til 95°C mens en kontinuerlig måler nedgangen i fluorescens.

For kontroll og identifikasjon av PCR-produktene kan man også bruke såkalte hybridiseringsprober som er merket med fluorescerende molekylmarkører (fluorescein, LC Red 640 eller 705). Hver hybridiseringsprobe er 23-35 baser lang. Bruk av slike prober gir en svært spesifikk deteksjon av PCR-produktene. Den ene hybridiseringsproben er koplet til fluorescein i 3' ende, mens den andre proben er koplet til LC Red 605 eller 705. De to hybridiseringsprobene, som er komplementære til PCR-produktet, hybridiserer til PCR-produktene i avkjølingssteget (annealing) i hver syklus. Fluorescein eksiteres og denne energien overføres til den andre proben gjennom FRET (Fluorescens Resonance Energy Transfer). Mengden fluorescensen fra LC 605 eller 705 er proporsjonal med mengden PCR-produkt som er dannet.

Det er flere fordeler ved real-time PCR fremfor tradisjonell PCR:

1. Tidsbesparende (gelelektroforese er vanligvis ikke nødvendig)
2. Lett å bruke
3. Muligheter for kvantitativ analyse
4. Mer kontroll, det er for eksempel mulig å avslutte PCR-analysen under kjøring så snart en har fått dannet produkt
5. Mindre risiko for kontaminering av andre prøver. Etter real-time PCR er det ikke nødvendig å åpne prøverørene for videre analyse.

Real-time PCR-metoder er utviklet for spesifikk identifikasjon av DNA fra en rekke mikroorganismer. Optimalisering av reaksjonsbetingelsene er viktig for å oppnå høy spesifisitet og sensitivitet i PCR-analysene. I denne rapporten beskrives optimalisering av flere primersett for påvisning av DNA fra 7 utvalgte organismer ved hjelp av real-time PCR. Noen av primersettene er hentet fra litteraturen mens andre er egenkonstruerte. Alle hybridiseringsprobene som er brukt er egenkonstruerte. En vellykket PCR-analyse er avhengig av effektiv

lysning av cellene (frigjøring av DNA fra cellene). Ufullstendig lysning kan gi lavere deteksjonsgrenser eller i verste fall falske negative resultater. Vi har utviklet en metode for lysning av celler med ultralyd. Denne metoden blir kort beskrevet i rapporten. En ulempe med PCR-metodikk er at forurensninger som er tilstede i prøvene kan hemme PCR-reaksjonen (hemmer DNA-polymerase enzymet) og gi falske negative resultater. Jordprøver inneholder for eksempel mye humus som hemmer PCR-reaksjonen og omfattende ekstraksjon og rensing av DNA er nødvendig. Metoder for ekstraksjon og rensing av DNA blir ikke beskrevet her.

2 MATERIALER OG METODER

2.1 MATERIALER

Vi har arbeidet med følgende organismer: *B. anthracis*, *Y. pestis*, *V. cholerae*, *C. burnetii*, *F. tularensis*, *B. melitensis* og Vaccinia virus. Disse prøvene kommer fra Dr Bruce Harper, Dugway Proving Ground, Life Science Division, USA og de er inaktivert ved bestråling (tabell 2.2). I tillegg har vi arbeidet med *B. cereus* (ulike stammer, bl a ATCC 14579), *B. subtilis* og *B. thuringiensis* (ulike stammer) som alle er nært beslektet til *B. anthracis*. Disse organismene dyrker vi i eget laboratorium, samt *V. cholerae* (Inaba, O1).

Oversikt over hybridiseringsprober og primere som er brukt i dette arbeidet vises i tabell 2.3 og 2.4. De er syntetisert av henholdsvis Tib Molbiol (Tyskland) og Eurogentec (MedProbe, Norge). Tabell 2.5 viser størrelsen av PCR-produktene.

Kjemikalier	Produsent
Primersett	Eurogentec
Hybridiseringsprober	Tib Molbiol
Light Cycler TM – DNA Master SYBR-Green I	Roche Molecular Biochemicals
Light Cycler TM – DNA Master Hybridization probes	Roche Molecular Biochemicals

Tabell 2.1 Kjemikalier som er benyttet i real-time PCR.

Organisme	Stamme	Konsentrasjon
<i>Yersinia pestis</i>	Lapaz strain	3,7 x 10 ⁷ cfu/ml
<i>Coxiella burnetii</i>	9 Mile, phase I	2,1 x 10 ⁷ ID ₅₀ /ml
<i>Bacillus anthracis</i>	Vollum strain	8,7 x 10 ⁶ cfu/ml
Vaccinia virus	Lister	6,7 x 10 ⁶ pfu/ml
<i>Vibrio cholerae</i>	Inaba O1	1,1 x 10 ⁷ cfu/ml
<i>Brucella melitensis</i>	Melitensis biovar 1	2,9 x 10 ⁷ cfu/ml
<i>Coxiella burnetii</i> (røyk)	9 Mile, phase I	3,6 x 10 ⁶ ID ₅₀ /ml
<i>Bacillus anthracis</i> (røyk)	Vollum 1B	8,7 x 10 ⁶ cfu/ml
<i>Brucella melitensis</i>	Melitensis biovar 3	2,4 x 10 ⁷ cfu/ml
<i>Francisella tularensis</i>	Schu S4	5,2 x 10 ⁶ cfu/ml
<i>Vibrio cholerae</i> (kontaminert)	Inaba O1	5,7 x 10 ⁶ cfu /ml
<i>Francisella tularensis</i>	Schu S4	7,8 x 10 ⁶ cfu /ml
<i>Yersinia pestis</i> (jord)	India	1,1 x 10 ⁷ cfu /gr jord
<i>Bacillus anthracis</i> (jord)	Vollum 1B	1,4 x 10 ⁷ cfu /gr jord
<i>Coxiella burnetii</i> (jord)	9 Mile, phase I	2,3 x 10 ⁷ ID ₅₀ /gr jord
<i>Brucella melitensis</i>		Ukjent, Q-tips
<i>Bacillus anthracis</i>		Ukjent, Q-tips
<i>Vibrio cholerae</i>		Ukjent, Q-tips
<i>Yersinia pestis</i>		Ukjent, Q-tips
<i>Francisella tularensis</i>		Ukjent, Q-tips

Tabell 2.2 Oversikt over bakterier og virus fra Dr Bruce Harper.

Organisme	Betegnelse	DNA-sekvens
<i>Bacillus anthracis</i> *	Balef-FL	5'-cct att tca taa taa acg ttc agt gcc-3'
<i>Bacillus anthracis</i> *	Balef-705	5'-ttt cag tat ttt cta cat aat ctt ccg aag-3'
<i>Bacillus anthracis</i> *	Ba813-FL	5'-ata gaa cct ggc att aaa aga ctc att ga-3'
<i>Bacillus anthracis</i> *	Ba813-640	5'-aac tcg tta atg ctt caa att ctg tgt tt-3'
<i>Coxiella burnetii</i> *	CB-FL	5'-cca tgt ctt ttt tga get tga gca aca t-3'
<i>Coxiella burnetii</i> *	CB-640	5'-aat cct act ttt tct gcg gtt tga agg-3'
<i>Coxiella burnetii</i> *	Bchem-FL	5'-cta ata aac tcg gtt gat tgt ctg caa-3'
<i>Coxiella burnetii</i> *	Bchem-640	5'-agc ttt att ggc aag ttg tac agc tc-3'
Bakterier Gram+/- **	Gram16S-iFL	5'-tat tac cgc ggc tgc tg-3'
Bakterier Gram+ **	Gram+705	5'-cct aac cag aaa gcc acg gct aac tac gtg-3'
Bakterier Gram- **	Gram-640	5'-ccg cag aat aag cac cgg cta act ccg t-3'

*Egne prober laget for denne studien . **Klaschik *et al.*, 2002

Tabell 2.3 DNA-sekvens og betegnelse på hybridiserings prober.

Primer	Organisme	Målgen	Sekvens	Ref.
UP16S-1	Bakterier generelt	16S rRNA, universal region	5'- gag ttt gat cct ggc tca g-3'	1
UP16S-2	Bakterier generelt	16S rRNA, universal region	5'- aga aag gag gtg atc cag cc -3'	1
16S rRNA-1	Bakterier generelt	16S rRNA, universal region	5'- gaa cgc tgg cgg cag gcc taa -3'	1
16Si-f	Bakterier generelt	16S rRNA, universal region	5'- tcc tac ggg agg cag cag -3'	2
16S rRNA-2	Bakterier generelt	16S rRNA, universal region	5'- ggt aag gtt ctt cgc gtt gca t -3'	1
16Si-r	Bakterier generelt	16S rRNA, universal region	5'- ctg ctg cct ccc gta gga -3'	2
Gram-16S-F	Bakterier generelt	16S rRNA, universal region	5'- tac ggg agg cag cag -3'	3
Gram-16S-2	Bakterier generelt	16S rRNA, universal region	5'- tat tac cgc ggc tgc t -3'	3
VCcet-1	<i>Vibrio cholerae</i>	Enterotoxin	5'-ggc aga ttc tag acc tcc t-3'	4,5
VCcet-2	<i>Vibrio cholerae</i>	Enterotoxin	5'- tcg atg atc ttg gag cat tc -3'	4,5
VCctx-1	<i>Vibrio cholerae</i>	Vibrio cholerae toxin	5'- ctc aga cgg gat ttg tta ggc acg -3'	6
VCctx-2	<i>Vibrio cholerae</i>	Vibrio cholerae toxin	5'- tct atc tct gta gcc ggt att acg -3'	6
VCtxA-3	<i>Vibrio cholerae</i>	Vibrio cholerae toxin	5'- gtt agg cac gat gat gga ta -3'	b
VctxA-5	<i>Vibrio cholerae</i>	Vibrio cholerae toxin	5'- tct ctg tag ccc cta tta cga -3'	b
TUL-1	<i>Francisella tularensis</i>	17kDa lipoprotein	5'- tat caa tcg cag gtt tag c-3'	7,8
TUL-2	<i>Francisella tularensis</i>	17kDa lipoprotein	5'- tcg ttc ttc tca gca tac tta g-3'	7,8
FT17k-1	<i>Francisella tularensis</i>	17kDa lipoprotein	5'-gca agc tgc tgc tgt atc ta-3'	b
FT17k-2	<i>Francisella tularensis</i>	17kDa lipoprotein	5'-tgg cac tta gaa cct tct gg-3'	b
Ba813-1	<i>Bacillus anthracis</i>	Kromosomal DNA	5'- tta att cac ttg caa ctg atg gg -3'	9
Ba813-2	<i>Bacillus anthracis</i>	Kromosomal DNA	5'- aac gat agc tcc tac att tgg ag -3'	9
Balef-f*	<i>Bacillus anthracis</i>	Lethal factor på pXOI-plasmidet	5'- gca gat tcc tat tga gcc aaa-3'	b
Balef-r	<i>Bacillus anthracis</i>	Lethal factor factor på pXOI-plasmidet	5'- gaa tca cga ata tca att tgt agc-3'	b
YPpla-1	<i>Yersinia pestis</i>	Plasminogen activator	5'- tgc ttt atg acg cag aaa cag g -3'	10
YPpla-2	<i>Yersinia pestis</i>	Plasminogen activator	5'- ctg tag ctg tcc aac tga aac g -3'	10
Ychro-f	<i>Yersinia pestis</i>	Kromosomal DNA	5'- tgt agc cgc taa gca cta cca tcc -3'	11
Ychro-f	<i>Yersinia pestis</i>	Kromosomal DNA	5'- ggc aac agc tca aca cct ttg g-3'	11
BaB4	<i>Brucella melitensis</i>	31 kDa antigen	5'- tgg ctc ggt tgc caa tat caa-3'	12, 13
BaB5	<i>Brucella melitensis</i>	31 kDa antigen	5'- cgc gct tgc ctt tca ggt ctg-3'	12, 13
CB-1*	<i>Coxiella burnetii</i>	27-kDa OMP	5'- agt gtc gac ggc caa tta tc -3'	b
CB-2	<i>Coxiella burnetii</i>	27-kDa OMP	5'- tgc ctg cta gct gta acg att -3'	14
VACHa-1	Vaccinia virus	Hemagglutinin	5'- atg caa ctc tat cat gta a -3'	15
VACHa-2	Vaccinia virus	Hemagglutinin	5'- cat aat cta ctt tat cag tg -3'	15

Referanser:

b: primersett laget for denne studien;

1: Sjøstedt *et al.*, 1990; 2: FOA, 2000; 3: Klaschik *et al.*, 2002; 4: Fields *et al.*, 1992; 5: Wang *et al.*, 1997; 6: Brasher *et al.*, 1998; 7: Long *et al.*, 1993; 8: Shaw *et al.*, 1998; 9: Patra *et al.*, 1996; 10: Higgins *et al.*, 1998; 11: Radnedge *et al.*, 2001; 12: Baily *et al.*, 1992; 13: Queipo-Ortuño *et al.*, 1997; 14: Kato *et al.*, 1998; 15: Ropp *et al.*, 1995.

Tabell 2.4 Oversikt over primere som er brukt i denne studien. Målgen og DNA-sekvens av primerne er vist.

Organisme	Primer	Lengde (antall basepar)
Bakterier generelt	UP16S-1/2	1550
Bakterier generelt	16S rRNA-1/2	950
Bakterier generelt	16S rRNA-1/16Si-r	330
Bakterier generelt	16Si-f/16S rRNA-2	620
Bakterier generelt	Gram16S-F/2	187
<i>Vibrio cholerae</i>	Vcct-1/2	563
<i>Vibrio cholerae</i>	VCctx-1/2	302
<i>Vibrio cholerae</i>	VctxA-3/5	286
<i>Francisella tularensis</i>	FT17k-1/2	153
<i>Francisella tularensis</i>	TUL-1/2	300
<i>Bacillus anthracis</i>	BA813-1/2	152
<i>Bacillus anthracis</i>	BAlef-f*/r	156
<i>Bacillus cereus</i>	Bchem-1/2	185
<i>Bacillus subtilis</i>	Bsnorf-1/2	200
<i>Yersinia pestis</i>	YPpla-1/2	344
<i>Yersinia pestis</i>	Ychro-f/r	273
<i>Brucella melitensis</i>	BaB4/5	223
<i>Coxiella burnetii</i>	CB-1*/2	157
Vaccinia virus	VACha-1/2	273

Tabell 2.5 Oversikt over hvilke primersett som er brukt og størrelsen (antall basepar) av PCR- produktene.

2.2 METODER

2.2.1 PCR-amplifikasjon

PCR-analysene ble utført i et totalvolum på 20 µl, og innholdet i en reaksjonsblanding der SYBR-Green I og hybridiseringsprober som er brukt er vist i henholdsvis tabell 2.6 og 2.7 . Det er brukt 3 ulike temperaturprogram, et for PCR-produkter som er mindre enn 200 basepar, et for

PCR-produkter mellom 200 og 350 basepar og et for PCR-produkter større enn 350 basepar (tabell 2.8).

	Sluttkonsentrasjon
<u>Real-time PCR:</u>	
Light Cycler™ (LC)– DNA Master SYBR-Green I buffer ^a	1 X
MgCl ₂ konsentrasjon	Optimalisert for hvert primer par
Primerkonsentrasjon	Optimalisert for hvert primer par

^a 10 X Light Cycler™ – DNA Master SYBR Green I buffer inneholder Taq DNA polymerase, buffer, dATP, dUTP, dGTP, dCTP, SYBR Green I og 10 mM MgCl₂.

Tabell 2.6 Standard reaksjonsblanding som er brukt ved real-time PCR.

Organisme	Probe FL (μM)	Probe LC- 640/705 (μM)	Primer (μM)	MgCl ₂ (mM)	LC- Hybprobe buffer	Annealing temp. (°C)
<i>Bacillus anthracis</i> BA813-FL/640	0,2	0,2	1	3,5	1 x	58
<i>Bacillus anthracis</i> Balef-FL/705	0,2	0,2	1	3,5	1 x	58
<i>Coxiella burnetii</i> CB-FL/640	0,2	0,2	1	3,5	1 X	58
Bakterier generelt Gram16S-F/iFL (primere) Gram+705/-640	0,25	0,2	0,5	4	1x	52

Hybridiseringsprober mot *B. cereus* og *Y. pestis* var mindre sensitive enn tilsvarende PCR med SYBR-Green I og de er derfor ikke tatt med.

Tabell 2.7 Oversikt over innkuberingsløsninger for PCR-analyser med hybridiseringsprober.

	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Produkter kortere enn 200 basepar			
Initial denaturering	95°C	3 min	1
Denaturering	95°C	0 sek	30-35
Annealing	Optimalisert	2 sek	30-35
Syntese	72°C	10 sek	30-35
Produkter mellom 200 og 350 basepar			
Initial denaturation	95°C	3 min	1
Denaturation	95°C	0 sek	30-35
Annealing	Optimalisert	5 sek	30-35
Syntese	72°C	15 sek	30-35
Produkter større enn 350 basepar			
Initial denaturation	95°C	3 min	1
Denaturation	95°C	0 sek	30-35
Annealing	Optimalisert	10 sek	30-35
Syntese	72°C	30 sek	30-35

Tabell 2.8 Standard temperatur-programmer benyttet ved real-time PCR-analyser.

3 RESULTATER

3.1 Optimalisering av PCR

Noen av primersettene som er benyttet er hentet fra litteraturen mens andre er egenkonstruert (se tabell 2.3). Alle hybridiseringsprobene er egenkonstruerte. For å kjøre real-time PCR er det nødvendig å optimalisere PCR-betingelser som primerkonsentrasjon, MgCl₂-konsentrasjon, ”annealing”-temperatur (sammensmelting) og syntese av DNA selv om primerne har vært brukt ved konvensjonell PCR tidligere. Tabell 3.1 viser en oversikt over primersettene vi har optimalisert. Konsentrasjon av MgCl₂ og primer er oppgitt samt laveste deteksjonsgrense som er oppnådd.

Design av primere er den mest kritiske parameter for en vellykket PCR-reaksjon. Dårlige

primere kan gi PCR-reaksjoner som ikke virker, ikke-spesifikk amplifisering av annet DNA som er tilstede i prøven eller PCR-reaksjoner med lav sensitivitet og effektivitet. Optimal lengde av primerne er 18-24 basepar. Lengden har betydning både for spesifisitet og smeltepunktet for primeren. En tommelfinger regel er at man ofte bruker en "annealing"-temperatur i PCR-reaksjonen som er 5°C lavere enn smeltepunktet for primeren. En "annealing"-temperatur på 58°C er benyttet i flere av analysene. "Annealing"-temperatur er avhengig av lengden på primeren og innholdet av basene guanin og cytosin (GC-innhold).

Som tidligere nevnt under metoder bindes SYBR-Green I til dobbeltrådet DNA som syntetiseres i hver syklus, enten DNAet som dannes er spesifikke eller uspesifikke PCR-produkt. Hvert spesifikt PCR-produkt har et gitt smeltepunkt som benyttes til identifisering. Uspesifikke primer-dimere dannes ofte, gjerne på slutten av amplifiseringen. Disse dimerene er dobbeltrådede PCR-produkter dannet av reaksjonen mellom de to primerne. Design av primere er svært viktig for å unngå dimerdannelse i PCR-reaksjonen. Problemet kan ytterligere reduseres ved grundig optimalisering av PCR-betingelsene, f eks bruke minimal konsentrasjon av primere.

Konsentrasjonen av MgCl₂ er også viktig for spesifisitet og sensitivitet av PCR-reaksjonen. MgCl₂-konsentrasjonen må optimaliseres for hvert primerpar. Både for mye og for lite MgCl₂ vil kunne føre til uspesifikk produkt dannelse eller redusert utbytte og PCR-effektivitet. MgCl₂ regulerer aktiviteten av enzymet som syntetiserer DNA samt primernes interaksjon med templatet.

Det er benyttet tre ulike temperaturprogram (se tabell 2.8). For de korteste PCR-produktene (< 200 basepar) tar hver PCR-syklus (smelting, "annealing" og syntese av DNA) bare 12 sekunder, for de lengre PCR-produktene (> 200 basepar) må det brukes lengre tid til "annealing" og syntese av DNA. Vi har valgt primere som gir forholdsvis korte PCR-produkt (se tabell 2.5). Minimalisering av syklustiden kan redusere total analysetid og dannelsen av ikke-spesifikke PCR-produkter. En målsetning var å etablere metoder som kan brukes til screening av en prøve for flere biologiske stridsmidler samtidig. Størrelsen av alle PCR-produktene er kontrollert ved hjelp av gelelektroforese og DNA-sekvensen av produktet er bekreftet med sekvensering. Spesifisiteten av alle primersett og prober er testet mot alle mikroorganismer som er omtalt i kapittel 2.1. Det ble ikke observert noen kryssreaktivitet. Primersettet Bchem-1/2 (Wang, 1997) som gjenkjenner hemolysingenet i *B. cereus* gjenkjente også *B. anthracis* i denne studien.

Organisme	Primere	Produktstørrelse (basepar)	Optimal MgCl ₂ kons. (mM)	Optimal primer kons. (uM)	Annealing temp. (°C)	Deteksjonsgrense (cfu)
<i>B. anthracis</i>	Ba813-1/2	152	3.5	1.0	58	<10
	BAlef-f*/r	156	3,5	1,0	58	<10
<i>B. subtilis</i>	BSnof-1/2	200	3	1	60	10
<i>B. cereus</i>	Bchem-1/2	185	4.5	0.5/1.0	58	20
<i>B. melitensis</i>	BaB4/5	223	3	1	58	< 10
<i>C. burnetii</i>	CB-1*\2	157	3.5	1.0	58	20
<i>F. tularensis</i>	Tul-1/2	300	3	1	60	10
<i>F. tularensis</i>	FT17k-1/2	153	3.5	1	60	< 10
<i>V. cholerae</i>	VCctx-1/2	302	3	1	58	200
	Vccet-1/2	563	3	1	62	< 10
	VctxA-3/5	284	3	1	58	10
<i>Y. pestis</i>	YPpla-1/2	344	3	1	62	
	Ychro-f/r	273	3	1	66	
16S-rDNAgen	Gram-16S-F/2	187	4	0.5/1.0	52	10
Vaccinia	VACHa-1/2	273	3.5	1.5	58	< 10 pfu

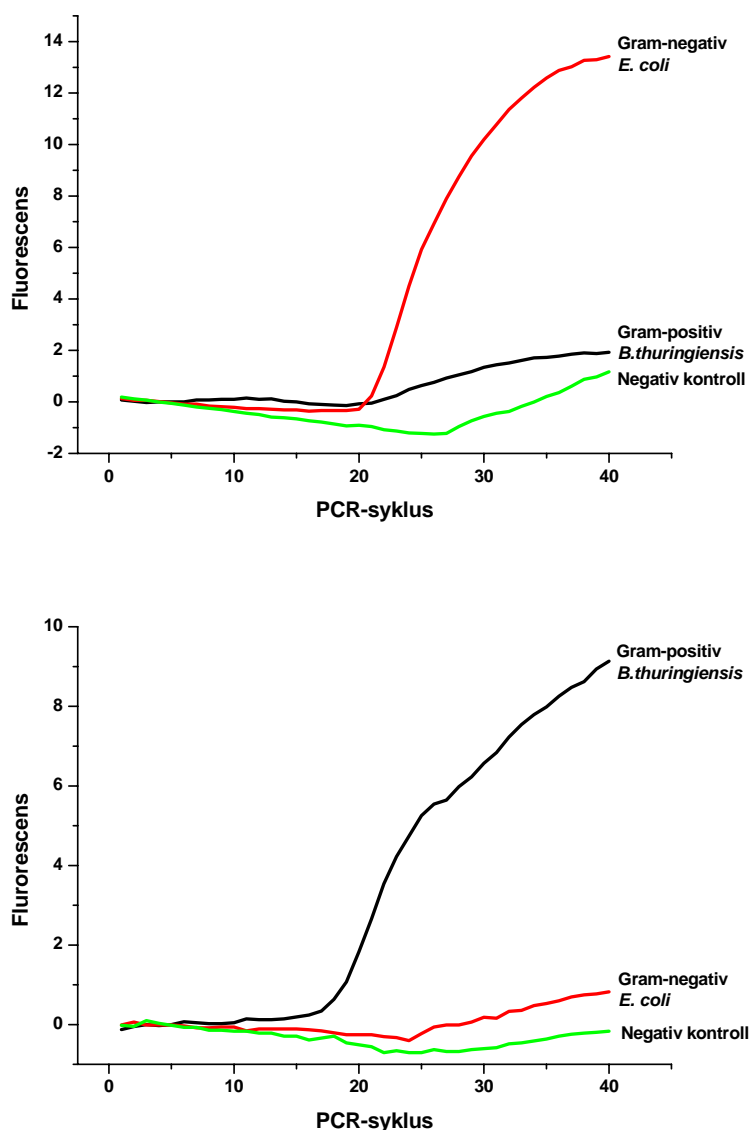
Tabell 3.1 Oversikt over optimaliserte betingelser for primersettene som er benyttet. Optimal konsentrasjon av MgCl₂, primerkonsentrasjon, "annealing" temperatur og deteksjonsgrense er angitt.

3.2 Påvisning av bakterier med real-time PCR

3.2.1 Påvisning av bakterier generelt

Deteksjon av 16S-rDNA-genet, som finnes i alle bakterier, kan brukes som markørgen til påvisning av bakterier generelt. Dette genet koder for et ribosomalt protein hvor visse områder

av genet er likt hos ulike bakterier (høyt konservert gen). For PCR har vi benyttet 3 ulike primersett. Disse er 16Si-f/ 16SrRNA-2 som amplifiserer et fragment på 620 basepar, 16Si-r/ 16SrRNA-1 som amplifiserer et fragment på 330 basepar (Sjøstedt *et al.*, 1990; FOA, 2000) og Gram16S-F/Gram16S-2 som amplifiserer et fragment på 187 basepar (Klaschik *et al.*, 2002). Sistnevnte primesett gav de beste resultatene og var de mest sensitive. Vi har også benyttet hybridiseringsprober til disse primerne som kan skille mellom Gram-positive og Gram-negative bakterier. Gram16Si-FL erstatter Gram16S-2 ved bruk av prober. Til påvisning av Gram-negative og Gram-positive bakterier brukes Gram16S-F/Gram16Si-FL og henholdsvis Gram-640 og Gram-705 probene. Oversikt over prober og primere og sekvens av disse er i tabell 2.3 og 2.4. I figur 3.1 er det brukt hybridiseringsprober til å skille mellom Gram-negative (*E. coli*) og Gram-positive (*B. thuringiensis*) bakterier. Real-time PCR og generelle primere kan også gi en indikasjon på relativ mengde av bakterie-DNA i en prøve .



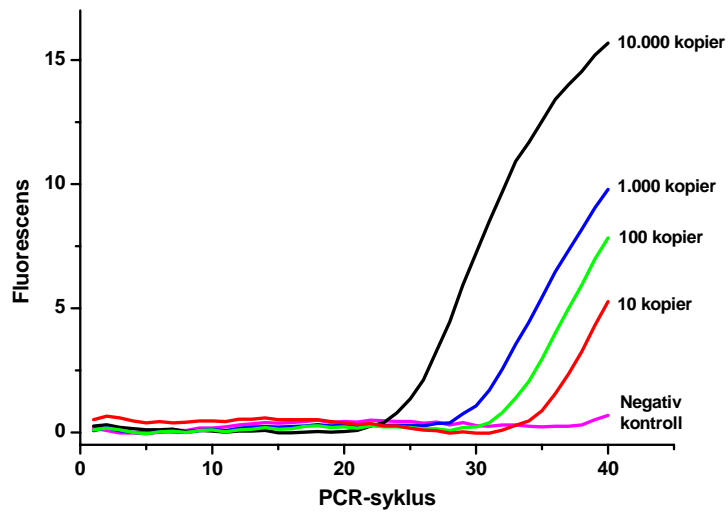
Figur 3.1 Spesifikke hybridiserings prober kan skille mellom Gram-negative og Gram-positive bakterier.

3.2.2 Påvisning av *Bacillus anthracis*

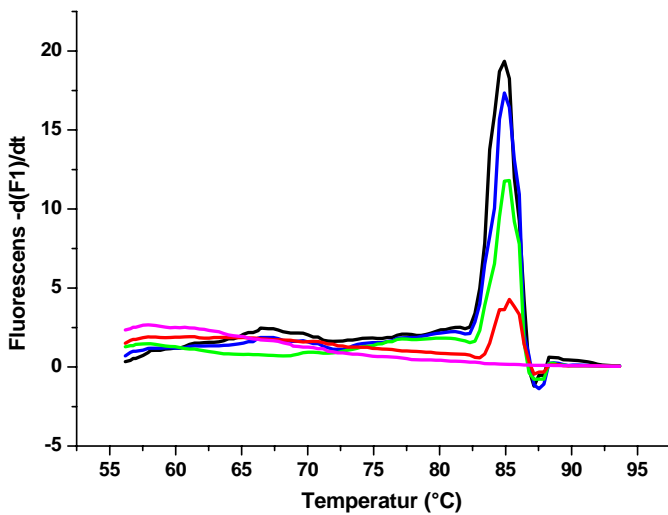
Bakteriene *B. cereus*, *B. thuringiensis* og *B. anthracis* utgjør *B. cereus* gruppen innenfor slekten *Bacillus*. De er Gram-positive, sporedannende jordbakterier. Organismene klassifiseres som tre ulike arter, men det er både genetisk og morfologiske indisier på at de burde anses som varianter av samme art med *B. cereus* som den stabile arten. De typiske egenskapene som karakteriserer både *B. thuringiensis* og *B. anthracis* er knyttet til egenskaper som kodes på store plasmid. Gener på disse plasmidene koder for toksiner. Hos *B. anthracis* finnes to store plasmider som koder for syntese av kapsel (PXO2) og toksiner (PXO1) og begge er nødvendig for full virulens (evne til å fremkalle sykdom). *B. thuringiensis* er verdens viktigste biopesticid og blir benyttet til bekjempelse av skadeinsekter i store deler av verden. De ulike variantene virker med selektive endotoksiner mot grupper av insekter. Fullstendig DNA-sekvens av 10 forskjellige stammer av *B. anthracis* er kjent per i dag.

Vi har benyttet primere som detekterer en sekvens på kromosomet som er spesifikk for *B. anthracis* (Ba813-1/2, 152 basepar) (Patra *et al.*, 1996). Videre har vi benyttet primere som detekterer et av toksingenene, lethal-faktor som finnes på PXO1 plasmidet (BAlef-f*/r, 156 basepar) (denne studien). Vi har også laget hybridiseringsprober for Ba813 og BAlef primersettene (denne studien). Begge probene var sensitive og effektive og mindre enn 10 kopier av genet kunne detekteres. Syntese av kapsel er også nødvendig for patogenisitet. Det er derfor ønskelig å ha primere som påviser dette genet. Vi har testet primere mot kapsel-genet, men de virket dårlig. Sekvensen som Ba813 primerne amplifiserer er senere funnet i et lite antall *B. cereus* og *B. thuringiensis* stammer (Ramisse *et al.*, 1999). Vi har identifisert et område innenfor gyrase-genet i *B. anthracis* genomet som ser ut til å være spesifikt i forhold til *B. cereus* og *B. thuringiensis* stammer som er undersøkt (J M Blatny, persolig kommunikasjon). Slike primere vil bli testet.

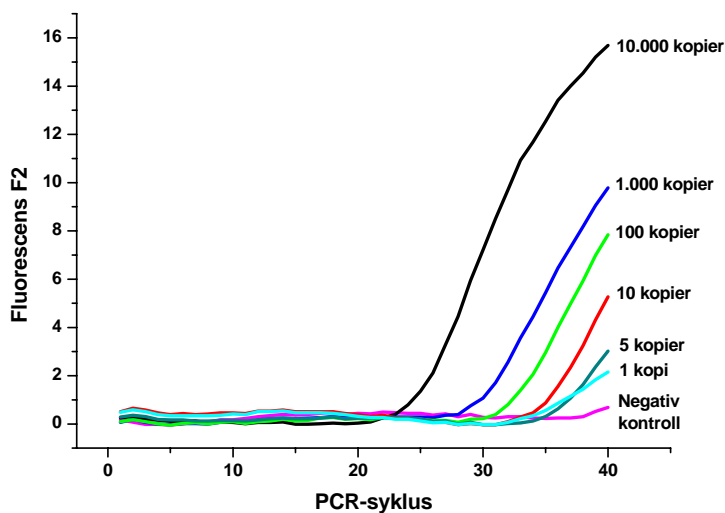
Påvisning av *B. anthracis* ved bruk av Ba813-1/2 primerne og SYBR-Green I er vist i figur 3.2. Figur 3.3 viser smeltepunktanalyse av PCR-produktene. Hvert PCR-produkt har et spesifikt smeltepunkt som kan brukes til spesifikk identifikasjon av PCR-produktet. I figur 3.4 er spesifikke hybridiseringsprober for Ba813-1/2-fragmentet brukt for spesifikk deteksjon av PCR-produktene. Resultatene viser at mindre enn 10 kopier av DNA fra *B. anthracis* kan påvises.



Figur 3.2 PCR-påvisning av *B. anthracis* (Vollum). Tidspunktet (PCR-syklus) for begynnende økning i fluorescensintensiteten over basalnivå gjenspeiler antall kopier av DNA i prøven som varierer fra 10 til 10.000. SYBR-Green I er brukt for å påvise DNA.



Figur 3.3 Smeltepunktsanalyse av PCR-produktene fra figur 3.2. Spesifikt produkt identifiseres ved smeltepunktanalyse.

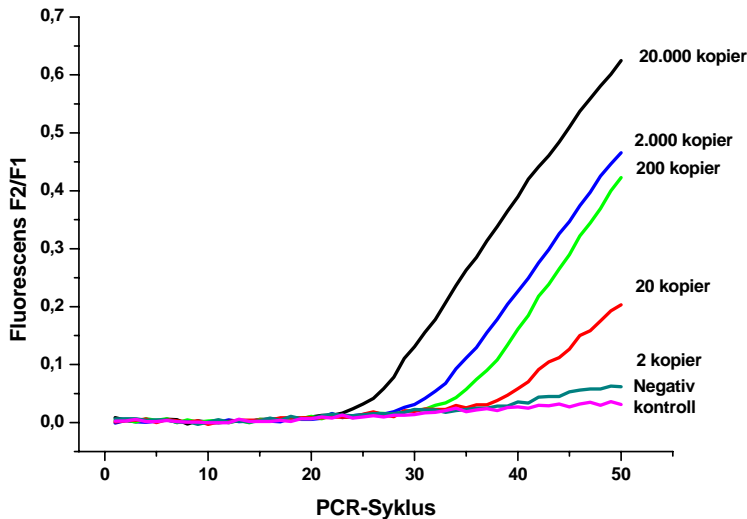


Figur 3.4 Påvisning av *B. anthracis* (Vollum) med spesifikke hybridiseringsprober. Ba813 primerne er brukt.

3.2.3 Påvisning av *Coxiella burnetii*

C. burnetii er en liten Gram-negativ bakterie som lever intracellulært. Den klassifiseres i familien rickettsier. Organismen er meget tolerang ovenfor tørke, og ulike desinfeksjonsmidler. Bakterien kan danne et sporelignende overlevelsesstadium, og kan derfor overleve månedvis i støvpartikler. Den infeksjose dosen er svært lav, helt ned i en bakterie i enkelte tilfeller. Koblet til høy overlevelseskapasitet i miljøet er derfor *C. burnetii* ansett for å være et potensielt biologisk stridsmiddel. Naturlig reservoar for bakterien er storfe, sau og geit, men også hunder, katter, og fugler kan være bærere av smitte. Bakterien skiller ut i melk, urin og avføring fra infiserte dyr. Under fødsler avgis store mengder av organismen gjennom fostervann og gjennom morkaken. Bakterien ble første gang beskrevet av Derrick i 1937. Han undersøkte utbrudd av febersykdommer hos australske slaktere der sykdomsårsak var ukjent. Sykdommen fikk derfor sitt navn Q-feber av engelsk "query", i utgangspunktet midlertidig inntil sykdomsårsaken ble kjent. Navnet har imidlertid blitt stående.

Vi har benyttet ett primersett for påvisning av DNA fra *C. burnetii*. CB-1* har vi laget selv, mens CB-2 er tatt fra studien til Kato *et al.*, (1998). I den studien ble *C. burnetii* påvist i blodprøver fra 52 pasienter med Q-feber lignende symptomer. Vi har også laget en hybridiseringsprobe for spesifikk deteksjon. Resultatet viser at mindre enn 20 kopier av DNA kan påvises (figur 3.5).

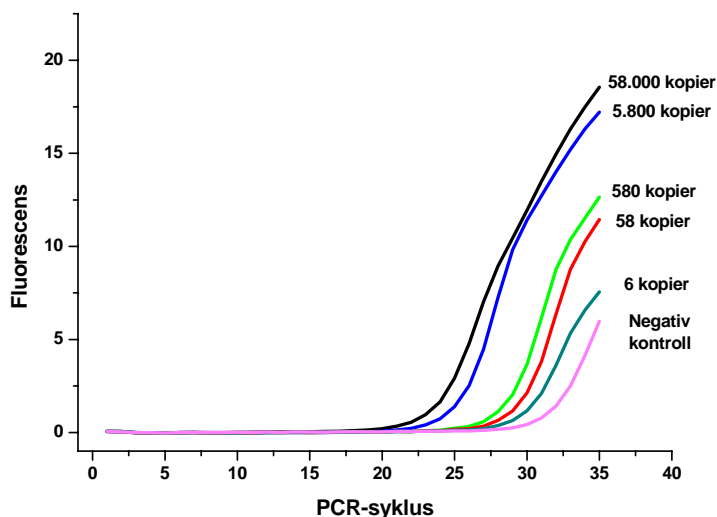


Figur 3.5 PCR-påvisning av *C. burnetii* (9 Mile, phase I). Tidspunktet (PCR-syklus) for begynnende økning i fluorescensintensiteten over basalnivå gjenspeiler antall kopier av DNA i prøven som varierer fra 2 til 20.000. Spesifikke hybridiseringsprober er brukt for å identifisere organismen.

3.2.4 Påvisning av *Brucella melitensis*

B. melitensis er en stav-formet, Gram-negativ, ikke-sporedannende bakterie. Bakterien forårsaker sykdommen brucellose, og forekommer primært hos dyr. Sykdommen kan bli overført til mennesker gjennom mat og drikke som er kontaminert med bakterien, inhalasjon av bakterien eller gjennom huden ved direkte kontakt med infiserte dyr og deres ekskrementer. Smitte fra person til person er sjelden. Symptomene på brucellose likner forkjølelssymptomer og de kan være langvarige. Brucellose forekommer over hele verden, men oftest i u-land .

Vi har benyttet et primersett (BaB-4/5) som gjenkjenner både *B. melitensis* og *B. abortus* (Baily *et al.*, 1992; Queipo-Ortuno *et al.*, 1997). Primersettet detekterer deler (223 basepar) av den kodende sekvensen av et 31 kDa *B. abortus* antigen. Det er ikke påvist forskjeller i sensitivitet eller størrelse av PCR-produktet ved påvisning av disse to organismene (Baily *et al.*, 1992). Smeltepunktanalyse av PCR-produktet (figur 3.6) viser at mindre enn 20 kopier av DNAet gav et spesifikt PCR-produkt. Dimere ble dannet etter syklus 31, men disse hadde et annet smeltepunkt. Dimerdannelse vises ved at den negative kontrollen øker. Problemet med dimerdannelsen løses ved å bruke hybridiseringsprober som spesifikt gjenkjenner sekvensen. Det kliniske bildet av brucellose viser store variasjoner. Det har vært undersøkt om en blodprøvebasert PCR kan være et hjelpemiddel ved diagnostisering (Queipo-Ortuno *et al.*, 1997) og alle 50 tilfellene av brucellose som ble undersøkt med PCR-analyse ble bekreftet.



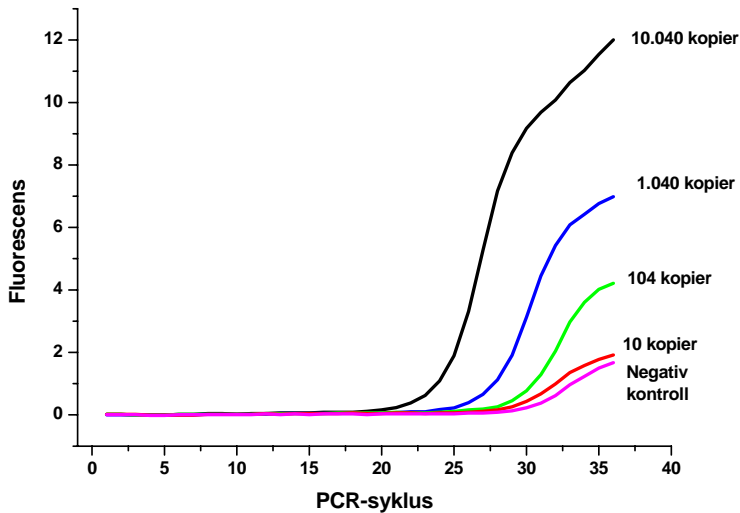
Figur 3.6 Påvisning av *B. melitensis* (biovar1) ved PCR. Tidspunktet (PCR-syklus) for begynnende økning i fluorescensintensiteten over basalnivå gjenspeiler antall kopier av DNA i prøven som varierer fra 6 til 58.000. SYBR-Green I er brukt for å påvise DNA. Smeltepunktanalyse viser at 6 kopier gir et spesifikt produkt. Den negative kontrollen har økt pga dimerdannelse.

3.2.5 Påvisning av *Francisella tularensis*

F. tularensis er en hardfør Gram-negativ, ikke-sporedannende kokkoid stavbakterie. Den er fakultativt intracellulær og kan formere seg i makrofager. Bakterien kan overleve flere uker ved lav temperatur i vann, fuktig jord, høy og døde dyr. Bakterien forårsaker sykdommen tularemi som også kalles harepest. Flest tilfeller forekommer om høsten eller vinteren de årene det er mye smågnagere. Naturlig reservoar for *F. tularensis* er smågnagere som lemen, mus, hare, kanin og bever. Bakterien smitter ved kontakt med syke eller døde dyr, ved inhalering av støv infisert med dyreekskrementer eller via vann infisert av døde dyr. Mygg og flott kan også overføre smitte fra dyr til mennesker. Sykdommen smitter ikke fra person til person og forekommer sjelden i Norge. Det har vært rapportert 0-11 tilfeller hvert år i perioden 1995-2000. Fire biovar-typer (underarter) er identifisert: *biovar tularensis* (type A), som forekommer i Nord-Amerika, *biovar palaeartica* (type B), som forekommer i Europa, Asia og Nord-Amerika, *biovar novicidia* (type C) (område ikke angitt) og *biovar mediasiatica* (funnet i Sentral-Asia). Tularemi type A har høyere dødelighet enn type B. Infeksiøs dose av *F. tularensis* er 10-100 bakterier.

Vi har benyttet to ulike primersett for påvisning av *F. tularensis*, Tul-1/2 (300 bp) (Long *et al.*, 1993; Shaw *et al.*, 1998) og FT17k-1/2 (153 basepar) (denne studien). Begge primerne er rettet mot et 17kDa lipoprotein som gjenkjennes av T-celler fra personer som tidligere har gjennomgått sykdommen eller er blitt vaksinert. Begge primersettene er sensitive med en deteksjonsgrense ned mot 10 kopier av DNA. I smeltepunktanalyse gav Tul-1/2 primerne en dobbelttopp, men analyse av produktet på gel viser kun et spesifikt produkt. FT17k-1/2 primerne

gav kun en smeltetopp, men det viste seg at smeltepunktet til primerdimere og det spesifikke produktet var sammenfallende slik at toppene ikke kunne skiller. Gelanalyse bekrefter at det dannes spesifikt produkt. Hybridiseringsprober må brukes for spesifikk deteksjon ved hjelp av real-time PCR. I figur 3.7 er FT17k1/2-primerne benyttet.



Figur 3.7 Påvisning av *F. tularensis* (Schu S4) med PCR. Tidspunktet (PCR-syklus) for begynnende økning i fluorescensintensiteten over basalnivå gjenspeiler antall kopier av DNA i prøven som varierer fra 10 til 10.040. SYBR-Green I er brukt for å påvise DNA. Smeltepunktanalyse viser at 10 kopier gir et spesifikt produkt.

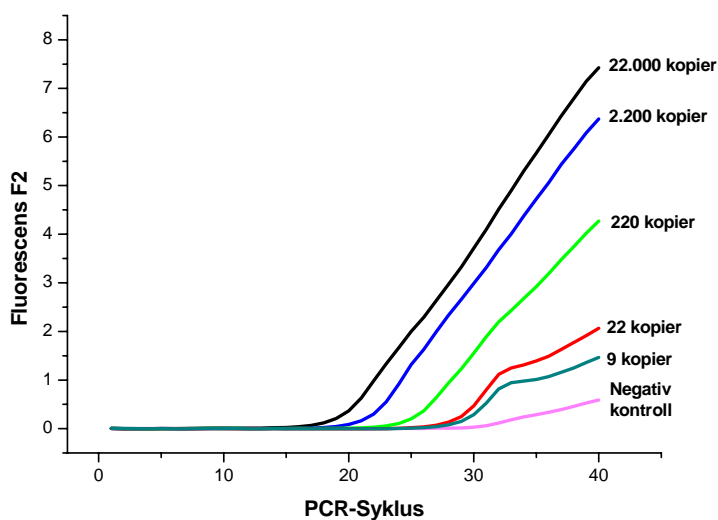
3.2.6 Påvisning av *Vibrio cholerae*

Kolera forårsakes av den Gram-negative, stavformede, ikke-sporedannende bakterien *V. cholerae*. Kolera kan bli overført til mennesker gjennom infisert mat og drikkevann. Kolera er fremdeles en alvorlig sykdom flere steder i verden, spesielt i utviklingsland. Bakterien har tidligere forårsaket mange epidemier og millioner av mennesker har dødd. Bakterien er påvist i sjøvann og andre vannkilder flere steder i verden, både i områder der kolera er endemisk og i områder der sykdommen ikke forekommer. Det har vært problemer med å påvise *V. cholerae* i miljøprøver da bakterien kan gå inn i en hviletilstand der den ikke lar seg dyrke, men er fortsatt viabel (levedyktige) (Roszak og Colwell, 1987). PCR er derfor en godt egnet metode for påvisning av DNA fra bakterien i miljøprøver.

V. cholerae deles ofte inn i serogruppene *V. cholerae* Non-O1, Non-O139 stammer og *V. cholerae*-O1 og -O139. Innenfor hver gruppe er det isolert og karakterisert en rekke stammer. *V. cholerae* Non-O1 og Non-O139 mangler sentrale kolera-toksin gener. Slike stammer isoleres vanligvis fra pasienter med mild diaré eller fra miljøkilder. Det er holdepunkter for at stammer som mangler koleratoksin-gener kan ta opp gener for toksin-produksjon ved transduksjon. *V.*

cholerae O1 og O139 stammer er patogene og inneholder gener for toksinproduksjon. Slike stammer isoleres vanligvis fra pasienter med symptomer på kolera (kraftig diaré). Den toksiske serogruppen O139 har oppstått etter rekombinasjon med en eller flere toksiske O1 stammer. CtxAB-genet koder for A og B subenheten av koleratoksin og Singh *et al.*, (2001) fant at 16 av 17 undersøkte O1 og O139 stammer inneholdt genet. I 1991 var det et utbrudd av kolera i Latin-Amerika. I løpet av 8 måneder ble 450,000 mennesker smittet og 4000 av disse døde. Av totalt 150 isolerte O1 stammer fant man ved PCR at 140 inneholdt koleratoksin gener (Fields *et al.*, 1992). Dette var isolater både fra pasienter, mat og vann.

I PCR har vi benyttet primere som detekterer ctx-A genet. Vi har benyttet tre ulike primersett: VCctx-1/2 (302 basepar) gav en deteksjonsgrense på ca 200 kopier av DNA (Brasher *et al.*, 1998), VCtxA-3/5 (286 basepar) primerne som gav en deteksjonsgrense på 10 kopier (denne studien) og VCcet-1/2 (563 basepar) en deteksjonsgrense på kun 10 kopier (Fields *et al.*, 1992; Wang, 1997). Sistnevnte primersett er sensitive, men produktet er forholdsvis stort (563 bp) og smeltepunktsanalyse viste to smeltepunktstopper for stammen vi testet (Inaba O1). VctxA-3/5 primerne så ut til å være de mest spesifikke og sensitive. Vi har også testet en spesifikk hybridiseringsprobe (denne studien) for spesifikk deteksjon av genet, men dette har foreløpig ikke gitt optimale resultater. Figur 3.8 viser en fortynningskurve for påvisning av *V. cholerae* der VctxA-3/5 primerne og SYBR-Green I er brukt. Smeltepunktsanalyse viser at mindre enn 10 kopier av DNA gir et spesifikt PCR-produkt. Vi skal også teste to andre spesifikke primersett og validere disse og VctxA-3/5 primerne mot en stammesamling vi er i gang med å bygge opp.

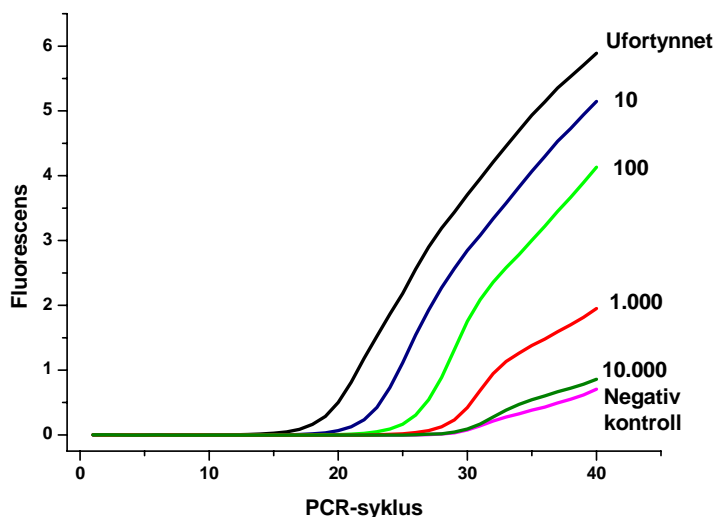


Figur 3.8 Påvisning av *V. cholerae* (Inaba, O1) med PCR. Tidspunktet (PCR-syklus) for begynnende økning i fluorescensintensiteten over basalnivå gjenspeiler antall kopier av DNA i prøven som varierer fra 9 til 22.000. SYBR-Green I er brukt for å påvise DNA. Smeltepunktsanalyse viser at 9 kopier gir et spesifikt produkt.

3.2.7 Påvisning av *Yersinia pestis*

Y. pestis er en stavformet, Gram-negativ, ikke-sporedannende bakterie som tilhører familien *Enterobacteriaceae*. Bakterien kan overleve flere uker i vann og fuktig jord. Nær frysepunktet kan bakterien overleve i flere måneder til år. Den drepes ved oppvarming til 55°C i 15 min. Bakterien overlever også en tid i tørt spytt, loppeekskremitter og begravde lik, men drepes etter få timers eksponering til sollys. I luft (aerosol) kan den overleve inntil en time. *Y. pestis* forårsaker sykdommen pest. Pest finnes naturlig hos gnagere på alle kontinenter bortsett fra Australia. Pest overføres vanligvis til mennesker ved bitt av pestinfiserte lopper. Tre store verdensomspennende epidemier (pandemier) av pest er kjent. Den første på 500-tallet i Europa, Nord-Amerika og Asia, den andre (Svartedauen) varte fra 1347-1351 i Europa og den siste spredte seg til alle kontinent fra Kina i 1855. Millioner av mennesker døde i disse epidemiene. Byllepest er den vanligste formen for pest og overføres fra gnagere med lopper. Sekundær lungepest kan forekomme hvis bakterien spres til lungene via blodet. Hvis pest bakterier spres i luften som en aerosol vil lungepest forekomme. Lungepest kan overføres fra person til person og symptomene er i begynnelsen lett å forveksle med andre luftveisinfeksjoner. Det er mange utbrudd av pest hos mennesker i dag og de fleste tilfellene opptrer i Afrika.

Flere metoder er beskrevet for å påvise *Y. pestis* ved PCR. Vi har benyttet primere rettet mot plasminogen-aktivator genet (YPpla-1/2) (Higgins *et al.*, 1998) som spesifikt påviser *Y. pestis*. Primerne er testet mot 11 *Y. pestis* stammer og alle kan påvises. Primerne gav ikke PCR-produkt når de ble testet mot flere nært beslektede arter som *Yersinia enterocolitica* og *Yersinia pseudotuberculosis* (Higgins *et al.*, 1998). Andre biologiske stridsmidler gir ikke PCR-produkt ved bruk av YPpla primerne. Vi har også benyttet primere som gjenkjenner en kromosomal sekvens (Ychro-1/2) (Radnedge *et al.*, 2001). Dette primersettet er også testet mot en rekke nært beslektede bakterier og ikke beslektede bakterier og ser ut til å være spesifikt for *Y. pestis* (Radnedge *et al.*, 2001). YPpla og Ychro primersettene gav begge en deteksjonsgrense på mindre enn 20 kopier av DNA. Figur 3.9 viser analyse av en SIBCA prøve med ukjent antall bakterier tilstede i prøven. Bakterien er ekstrahert over i buffer fra en svaber prøve og antall kopier av DNA tilstede er derfor ukjent. Ekstrahert materiale er direkte analysert ved PCR og YPpla primerne er benyttet.

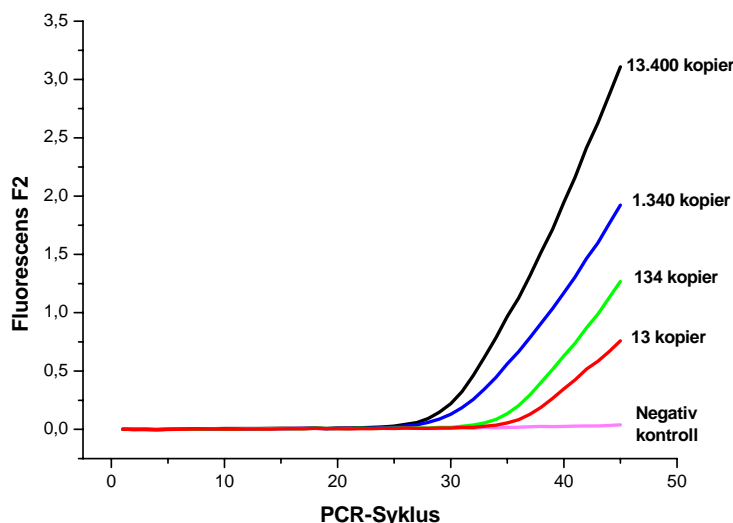


Figur 3.9 Påvisning av *Y.pestis* ved PCR-analyse. Tidspunktet (PCR-syklus) for begynnende økning i fluorescensintensiteten over basalnivå gjenspeiler antall kopier av DNA i prøven og SYBR-Green I er brukt for å påvise DNA. Bakterien er ekstrahert fra en svaber prøve og totalt antall bakterier er ukjent. Figuren viser en fortynningskurve som går fra ufortynnet til 10.000 ganger fortynning.

3.2.8 Påvisning av Vaccinia virus

Vaccinia-virus (kukopper) tilhører klassen *orthopox*-virus. De er morfologisk store og utgjør en gruppe av nært relaterte vertebratvirus som inkluderer det nå utryddete koppeviruset (*Variola major*). Vaccinia-virus benyttes i vaksiner mot kopper.

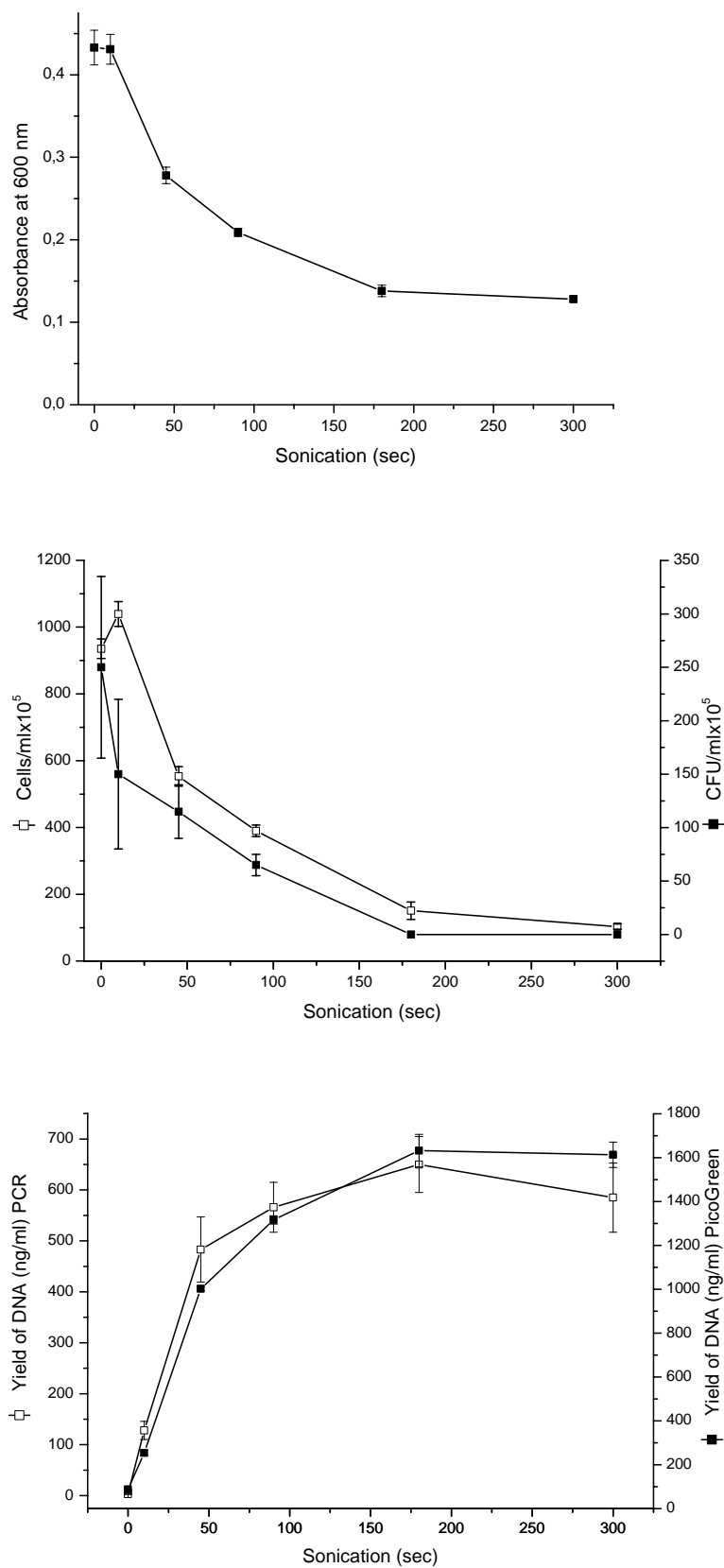
For påvisning av vaccinia har vi benyttet primere som gjenkjenner hemagglutinin-genet (HA) i *orthopox* (Ropp *et al.*, 1995). Figur 3.10 viser at mindre enn 20 kopier av Vaccinia kan påvises. Smeltepunktanalyse viser at produktet er spesifikt.



Figur 3.10 Påvisning av vaccinia virus (*listet*) ved PCR-analyse. Tidspunktet (PCR-syklus) for begynnende økning i fluorescensintensiteten over basalnivå gjenspeiler antall kopier av DNA i prøven som varierer fra 13 til 13.400. SYBRGreen I er brukt for å påvise DNA. Figuren viser at mindre enn 20 kopier kan påvises.

3.3 Lysering av bakterieceller og kvantitativ real-time PCR

Vellykket deteksjon og karakterisering av DNA fra mikroorganismer er avhengig av effektive metoder for lysering av cellene og ekstraksjon av DNA. Dårlig lysering av cellene er en faktor som kan begrense sensitiviteten i PCR og kan i verste fall føre til falske negative resultater. Gram-positive bakterier er vanskelig å lysere pga en rigid cellevegg som inneholder peptidoglykan. Gram-negative bakterier har en tynnere peptidoglykan cellevegg og er derfor enklere å lysere. Vi har utviklet en ultralydmetode for lysering av Gram-positive celler. Vi benyttet celler i stasjonær vekstfase (24 timers kultur) da slike celler er vanskeligere å lysere enn celler i eksponentiell vekstfase (3-4 timer). Som modellorganisme har vi benyttet *B. cereus* (Fykse *et al.*, 2003). Vi har vist at spesifikke DNA-sekvenser fra renkulturer av bakterier kan påvises direkte ved hjelp av PCR etter lysering uten å bruke omfattende metoder for ekstraksjon av DNA. Det samme gjelder delvis for luftprøver (dette undersøkes nærmere i FFI-prosjekt 895), men vannprøver med mye humus og jordprøver krever omfattende prosedyrer for ekstraksjon og isolering av DNA. Rester av forurensninger kan føre til lavere sensitivitet og i noen tilfeller til falske negative prøver. Ved å tilsette en intern-kontroll, som amplifiseres samtidig før prøveopparbeidelse, kan dette unngås. Metoder for ekstraksjon av DNA vil ikke bli videre beskrevet i denne rapporten.



Figur 3.11 Lysering av en *B. cereus* kultur (1×10^8 celler/ml) med ultralyd (resultater fra Fykse et al., 2003).

Figur 3.11 viser effekten av ultralyd på en kultur av *B. cereus* i stasjonær vekstfase. Cellene er sonikert fra 10 sekunder opp til 5 minutter. Antallet levende og strukturelt intakte celler etter sonikering er bestemt ved dyrking og telling av celler ved fase-kontrast mikroskopi, optisk tetthet ved 600 nm og utbytte av DNA er målt ved real-time PCR og måling av fluorescens etter farging med pico-grønn. Det er brukt en DNA-standard ekstrahert og rensset fra *B. cereus* til kvantitering av DNA som frigjøres ved sonikering. Som en ser av figur 3.11 avtar antallet levende og strukturelt intakte celler som en konsekvens av behandlingen og mengden DNA øker. Etter ca 3 minutter er antall celler redusert til et minimumsnivå. Sporer er mer resistente mot lysering enn Gram-positive cellene i stasjonær vekstfase. Sporer kan også lyses ved bruk av ultralyd eller andre metoder som bead-beating (knusing av sporeveggen med silikapartikler).

4 DISKUSJON

Denne rapporten beskriver metoder for rask påvisning av ulike biologiske stridsmidler med real-time PCR. Tabell 3.1 viser en oversikt over alle metodene som er beskrevet i rapporten. De optimaliserte betingelsene og deteksjonsgrenser er angitt. For utvelgelse av spesifikke primere er det nødvendig å kjenne DNA-sekvensen til de ulike mikroorganismer helt eller delvis. Slik informasjon er tilgjengelig i store databaser og mengden informasjon øker stadig. Det er derfor nødvendig å beherske dataverktøy (såkalt bioinformatikk) for utvelgelse av spesifikke primere. Etter utvelgelse av et primersett må de spesifikke eksperimentelle PCR-betingelsene optimaliseres, som beskrevet i denne rapporten. Etter optimalisering må primersettet valideres ved testing av ulike stammer for å utelukke falske negative resultater som kan oppstå hvis en eller flere stammer ikke gjenkjennes. Det optimaliserte primersettet må også testes mot andre beslektede mikroorganismer for å utelukke falske positive resultater. Vi har foreløpig et begrenset antall stammer av de ulike mikroorganismene vi har laget primere mot og slik testing er derfor ikke gjennomført. Vi har testet egne primersett mot de mikroorganismene vi har tilgjengelig i laboratoriet, og ingen kryssreaktivitet ble påvist. Alle real-time PCR-produktene er også undersøkt ved gelelektroforese for å bekrefte at størrelsen (antall basepar) er riktig i forhold til forventet størrelse. Det er også gjort DNA-sekvensering av PCR-produktene.

FFI deltar i et samarbeid innenfor WEAG (Western European Armament Group) der målsetningen er å karakterisere ulike bakteriestammer med molekylære PCR-baserte metoder. Alle land som deltar i samarbeidet skal få tilgang til de ulike stammene. Sverige er koordinator for studien og de ulike landene har ansvar for karakterisering av følgende organismer: Sverige, *F. tularensis*; Nederland, *Brucella* spp.; Frankrike, *Y. pestis*; Italia, *B. anthracis*; Norge, *B. cereus* gruppen (ikke *B. anthracis*); Tyskland, *C. burnetti* og *Burkholderia* spp. Innenfor *B. cereus* gruppen har FFI i dag 280 stammer. Disse er tilsendt etter forespørsel fra Norges Veterinærhøgskolen, Bioteknologisenteret ved Universitetet i Oslo, *Bacillus* Genetic Stock Center (USA) og Institute of Microbiology, Bundeswehr. Arbeidet som gjøres innenfor WEAG gir økt kunnskap som er nyttig ved utvelgelse og validering av primere for spesifikk påvisning av DNA fra en organisme da arbeidet gir tilgang til DNA fra en rekke stammer. Molekylære

PCR-baserte metoder er nyttige for bestemmelsen av hvilke stammetyper som har forårsaket en infeksjon eller et større sykdomsutbrudd samt bidra til økt kunnskap om den geografiske opprinnelsen til et eventuelt utbrudd.

Vi har flere ganger deltatt i såkalte "round robin" analyser i regi av NATO-PfP-SIBCA for påvisning av biologiske stridsmidler. Hvert land får tilsendt 5 til 6 bestrålte prøver og ut fra en liste på 10 biologiske stridsmidler skal det undersøkes om det finnes og hvilke organismer som er i prøvene. Deltagerlandene kunne bruke de analysemetoder som de ønsket og øvelsen måtte utføres og rapporteres innen 10 dager. Vi benyttet real-time PCR og DNA-sekvensering og prosedyren har vært at det først ble undersøkt om prøvene inneholdt bakterier ved bruk av generelle primere og deretter ble alle prøvene screenet med primersettene som er beskrevet i denne rapporten. DNA-sekvensering ble brukt for å bekrefte resultatene. Vi har deltatt i slike tester hvert år siden 1999 og har i de fleste tilfeller klart å påvise hvilke organismer som er tilstede i prøvene (Olsen *et al.*, 1999; 2000). I noen tilfeller har det vært forurensninger som jord, sand og biologisk plantemateriale tilstede i prøvene. Det krever omfattende metoder for ekstraksjon og rensing av DNA. Vi har også mottatt svaberprøver. Hensikten med slike tester er at hvert enkelt land skal kunne evaluere sine metoder og sammenligne resultatene med andre land.

Rask deteksjon kan være en nøkkelfaktor for å redusere konsekvensene av eventuell bioterror eller andre scenarier der infeksjose organismer er involvert. I slike scenarier kan det forekomme mikroorganismer som ikke så lett lar seg dyrke eller celler som er i et hvilestadium. Målsetningen med dette arbeidet er å utvikle og validere metoder for deteksjon av biologiske stridsmidler ved bruk av real-time PCR. Etablering av raske metoder for effektiv lysering av cellene og ekstraksjon av DNA er viktig. Vi ønsker å etablere en intern-kontroll som amplifiseres samtidig med den spesifikke organismen da dette reduserer sjansene for falske negative resultater hvis prøvene inneholder rester av forurensninger. Vi er i gang med å utarbeide prosedyrer og rutiner for å håndtere såkalte pulverbrev eller andre prøver der biologisk terror mistenkes. I det arbeidet inngår rutiner for mottak, åpning av prøven, eventuell inaktivering av deler av materialet og videre analyse, bl a dyrking i ulike medier, real-time PCR og DNA-sekvensering. I fremtiden vil vi også være i stand til å foreta en stammebestemmelse og sammenligne med egne stammer som vi skal motta. Siden mengden tilgjengelige DNA-sekvenser fra forskjellige mikroorganismer øker raskt kan spesifisiteten av primere og prøber endres slik at de beskrevne real-time PCR-metodene må evalueres og oppdateres kontinuerlig.

5 REFERANSER

Baily G G, Krahn J B, Drasar B S, Stoker N G (1992): Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* **95**, 271-275.

Brasher C W, DePaola A, Jones D D, Bej A K (1998): Detection of microbial pathogens in

shellfish with multiplex PCR, *Current Microbiol* **37**, 101-107.

Fields P I, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O (1992): Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from Latin-American cholerae epidemic, *J Clin Microbiol* **30**, 101-107.

FOA (2000): 2 nd. SIBCA Laboratory Exercise (Sweden).

Fykse E M, Olsen S J, Skogan G (2003): Application of sonication to release DNA from *Bacillus cereus* for quantitative detection by real-time PCR, *J Microbiol Methods* **55**, 1-10.

Helgason E, Økstad O A, Caugant D A, Johansen H A, Mock F M, hegna I, Kolstø A-B (2000): *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence, *Appl Environ Microbiol* **66**, 2627-2630.

Higgins J A, Ezzell J, Hinnebusch B J, Shipley M, Henchal E A, Ibrahim S (1998): 5' Nuclease PCR assay to detect *Yersinia pestis*, *J Clin Microbiol* **36**, 2284-2288.

Kato K, Arashim Y, Asai S, Furuya Y, Yoshida Y, Murakami M, Takahashi Y, Hayashi K, Katayama T, Kumasaka K, Arakawa Y, Kawano K (1998): Detection of *Coxiella burnetii* specific DNA in blood samples from Japanese patients with chronic nonspecific symptoms by nested polymerase chain reaction, *FEMS Immunology and Medical Microbiol* **21**, 139-144.

Klaschik S, Lehmann L E, Raadts A, Book M, Hoeft A, Stuber F (2002): Real-time PCR for detection and differentiation of Gram-positive and Gram-negative bacteria, *J Clin Microbiol* **40**, 4304-4307.

Long G W, Oprandy J J, Narayanan R B, Fortier A H, Porter K R, Nacy C A (1993): Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol* **31**, 152-154.

Olsen J S, Fykse E M, Skogan G (1999): Genetic identification of potential biological warfare agents by the polymerase chain reaction (PCR), FF/RAPPORT-99/04992.

Olsen J S, Skogan G, Økstad O A, Fykse E M, (2000): Deltagelse i NATO/PfP-interlaboratorieøvelse for deteksjon/identifikasjon av biologiske stridsmidler, FFI/RAPPORT-2000/03995.

Patra G, Sylvestre P, Ramisse V, Therasse J, Guesdon J-L (1996): Isolation of a specific chromosomal DNA sequence of *Bacillus anthracis* and its possible use in diagnosis, *FEMS Microbiol Lett* **15**, 221-231.

Queipo-Ortuño M I, Morata P, Ocón P, Manchado P, Colmenero DeD (1997): Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay, *J Clin Microbiol* **35**, 2927-2930.

Radnedge L, Gamez-Chin S, McReady P M, Worsham P L, Andersen G L (2001): Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis*, *Appl Environ Microbiol* **67**, 3759-3762.

Ramisse V, Patra G, Vaissaire J, Mock M (1999): The Ba813 chromosomal DNA sequence effectively traces the whole *Bacillus anthracis* community, *J Appl Bacteriol* **87**, 224-228.

Ropp A L, Jin Q, Knight J C, Massung R F, Esposito J J (1995): PCR strategy for identification and differentiation of smallpox and other orthopoxviruses, *J Clin Microbiol* **33**, 2069-2076.

Rozzak D B, Colwell RR (1987): Survival strategies of bacteria in the natural environment, *Microbiol Rev* **51**, 365-379.

Singh D V, Matte M H, Jiang S, Sabeena F, Shukla B N, Sanyal S C, Huq A, Colwell R R (2001): Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: Clonal relationships between clinical and environmental isolates, *Appl Environ Microbiol* **67**, 910-921.

Sjøstedt A, Sandstrøm G, Tärnvik A, Jaurin B (1990): Nucleotide sequence and T cell epitopes of a membrane protein of *Francisella tularensis*, *J Immunol* **145**, 311-317.

Shaw J J, McCleskey F K, Beninga K K, Candler W, Redkar R J, DeVecchio V G, Goode M T (1998): Rapid Detection of Tularemia with Real-time PCR, *Infect Med* **15**, 326-330.

Wang R F (1997): A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods, *J Appl Microbiol* **83**, 727-736.