



FOI MEMO

Projekt/Project
Teknikutveckling B

Sidnr/Page no
1 (9)

Handläggare/Our reference
Mats Forsman

Projektnummer/Project no	Kund/Customer
A404020	Försvarsdepartementet
FoT-område	
Inget FoT-område	
Datum/Date	Memo nummer/Number
2020-12-18	FOI Memo 7529

Slutrapport Teknikutveckling B 2018-2020

Titel/Title
Slutrapport Teknikutveckling B 2018-2020Memo nummer/Number
FOI Memo 7529

1 Inledning

1.1 Bakgrund

Historiskt har antikroppar och PCR dominerat metodarsenalen för identifiering av svårödlade sjukdomsframkallande mikroorganismer. Användning av antikroppar för identifiering av B-agens i miljöprover har haft begränsad framgång, dels beroende på begränsad känslighet och dels på den rikliga förekomsten i miljön av källor till falskt positiva reaktioner. PCR har både bättre känslighet och högre specificitet än antikroppar, och utgör idag grunden för de flesta direkta analyser av B-agens i miljön. Men PCR-metoder lider, trots sina många fördelar, av ett antal svagheter. Den viktigaste är det faktum att det är en målinriktad strategi. Bara det som exakt efterfrågas kan identifieras. Eftersom det biologiska hotet är associerat med ett potentiellt mycket brett spektrum av patogener, skulle ett stort antal PCR-analyser (i storleksordningen 40-50 analyser) behövas köras parallellt för att täcka in de farligaste/troligaste. Ofta måste analyserna, på grund av den vanligtvis begränsade mängden prov som kan erhållas efter extraktion och rening av ursprungsprovet, multiplexas (flera analyser sker simultant i samma provrör). Multiplexing innebär dock ytterligare tekniska utmaningar, då flera parallella reaktioner i samma provrör minskar effektiviteten och känsligheten och medför ökade krav på ständig validering och kvalitetskontroll och kommersiellt beroende av stängda system. Om multiplex inte används måste provet som skall analyseras delas upp i så många delar (subprover) som det antal B-agens som eftersöks. Detta medför att sannolikheten att kunna påvisa lågfrekventa patogener minskar, om antalet individuella organismer är så lågt att de inte förekommer i alla delprover.

PCR-baserade metoder, har också nackdelen att de är beroende av en känd *target*-sekvens och därför känsliga för mutationer eller manipulering av denna sekvens. Eftersom de endast detekterar en specifik sekvens ger de heller ingen ytterligare genetisk information om mikroorganismen ifråga eller provets innehåll i övrigt. Dessutom kan inte genetiskt modifierade B-agens identifieras. För att kunna härleda ursprung, genetisk modifiering, eller transmissionskedjor av B-agens krävs betydligt mer information än vad identifiering med PCR kan ge. De NGS-tekniker (*Next Generation Sequencing techniques*) som utvecklats de senaste åren är för närvarande de kraftfullaste och bredaste metoderna att samtidigt detektera och särskilja olika varianter av B-agens från varandra och användas för att härleda ursprung och identifiera transmissionskedjor. Dessutom ger helgenomsekvens information om egenskaper som virulens, antibiotikaresistens eller genotyper (olika varianter av samma smittämne) samt information om eventuell avsiktlig genetisk manipulering.

1.2 Syfte

Projektet syftar till att säkerställa och utveckla kunskap genom att följa teknikutvecklingen och anpassa sekvenseringsbaserade DNA-tekniker och analysmetoder för identifiering och källspårning av framförallt B-agens som kan betraktas som antagonistiska hot. Mer specifikt är syftet att förbättra förmågan generera specifika helgenomsekvenser från patogena organismer i komplexa miljö- och vävnadsprover. Sammantaget leder projektet till att laboratorieförmågan att identifiera, karakterisera, och spåra ursprung av patogena mikroorganismer förbättras till stöd för Försvarmakten, civilt försvar och svensk krisberedskap.

1.3 Övergripande frågeställningar och delprojekt

Övergripande projektmål och frågeställningar definierades inför projektets start i forskningsplan för Teknikutveckling B 2018-2020.

Titel/Title
Slutrapport Teknikutveckling B 2018-2020Memo nummer/Number
FOI Memo 7529

1. Utvärdera metoder och strategier för förutsättningslös DNA-sekvensering av prov med okänt innehåll i syfte att karakterisera ingående mikroorganismers ursprung och hälsofarlighet
2. Utveckla och pröva strategier och metoder för anrikning av patogena mikroorganismer för att kunna helgenomsekvensera sådana mikroorganismer från kliniska prover och komplexa miljöprover som dricksvatten, avloppsvatten och luftfilter

1.4 Verksamhet och kommunikation med uppdragsgivare

Nedan följer en beskrivning av den verksamhet som bedrivits, och resultat som uppnått, inom projektet och i projekt som medfinansierats under 2018 till 2020. Beskrivningen följer upplägget som under 2017 förankrades med en forskningsplan och som årsvis stämts av med Försvarsdepartementet i underlag Del A. Verksamhet och utkomst från projektet vid halvtid redovisades muntligen vid FOI 191022.

Kvalitetssäkring av arbetet i projektet sker genom deltagande i internationella konferenser och genom publikation av forskningsresultat i internationella och *peer review*-granskade tidskrifter och ansökningar till nationella och internationella forskningsfinansiärer.

Vidare läsning

- 2018 års verksamhet Årsrapporter FOI-2019-241.
- 2019 års verksamhet Årsrapporter FOI-2020-214.

1.5 Förutsättningslös DNA-sekvensering av prover med okänt innehåll

1.5.1 B2Forensics

Projektet *B2Forensics* (EDA/JIP-ICET2) har genomförts i samverkan med Bundeswehr Institute for Microbiology, Tyskland, Army Medical Center, Italien och DGA-NRBC/ University Paris-Saclay, Frankrike. Projektet syftade till att utvärdera användbarheten av DNA-sekvenseringsteknik för förutsättningslös identifiering av B-agens i miljöprover. DNA från olika vatten och luftfilter, med och utan tillsats av varierande halter av potentiella hot-agens, extraherades och sekvenserades. Validerade protokoll (SOPar) för DNA-preparation från dessa matriser utvecklades. Två olika alternativa sekvenseringsmetoder utvärderades, Illumina och Nanopore. Totalt avlästes flera miljarder baspar DNA-sekvens. För att kvalitetssäkra den efterföljande bioinformatiska analysen, etablerades optimerade modulära sekventiella mjukvaruprotokoll (s.k. pipelines, Svensson et al., 2019). Vidare sekvenserade referenspopulationer av *Bacillus*, *Yersinia*, *Brucella* och *Francisella* för att dels förbättra redan existerande databaser men också för att använda rådata från dessa sekvenseringar för att simulera närvaro i olika halter av de olika sekvenserade isolaten i den komplexa DNA-sekvensbakgrund som luft och vatten utgör. Med dessa verktyg var det möjligt att verifiera säkerheten i klassificeringen till rätt art och subart. Resultaten visade att även i ett mycket utmanande scenario med avseende på biologisk bakgrund - avloppsvatten - är DNA-sekvensering med ett sekvensinstrument av mellanklass (Illumina NextSeq) bara 10 till 100 gånger mindre känslig än PCR, men med en unik fördel: olika B-agens kan klassificeras hela vägen ned till subart, och en subarts unika egenskaper kan predikteras med avseende på antibiotikaresistens och virulens. Till exempel kan, i en förutsättningslös analys, de närbesläktade bakterierna *B. cereus* och *B. thuringiensis* särskiljas från *B. anthracis*. Den känslighet som uppnåddes i en 24 timmars luftinsamling var jämförbar eller bättre än PCR (Illumina NextSeq). Projektet visade att sekvenseringstekniker redan är tillräckligt mogna för att börja planera utvecklingen av prototyper för optimerat prov- och dataanalys, men många utmaningar kvarstår. Analyserna är i de flesta fall

Titel/Title
Slutrapport Teknikutveckling B 2018-2020Memo nummer/Number
FOI Memo 7529

fortfarande dyra och tidskrävande. Känsligheten för förutsättningslös DNA-sekvensering är linjär med mängden data som genererats (antal baser som avlästs) och för att uppnå känsligheter som motsvarar infektionsdos i prover med hög biologisk bakgrund för de mest infektiösa mikroorganismerna, krävs för närvarande dyra och tidskrävande analyser på toppklassinstrument. Vi har identifierat två viktiga aspekter som också måste förbättras. Det är kunskapen om de relevanta patogenerna, men minst lika viktigt är kunskapen om de närmaste släktingarna till de mikroorganismer som orsakar sjukdom. Inom det första området sker en ständig utveckling, men inom det andra krävs fler ansträngningar. Per definition är de närmaste släktingarna vanligtvis inte eller mycket måttligt patogena för människor och djur och är följaktligen inte intressanta att studera, men eftersom förutsättningslös DNA-sekvensering av miljöprover även identifierar alla nära släktingar, och hela klassificeringen bygger på genetisk distans (fylogeni), måste även de nära släktingarna kartläggas (dvs. den biologiska mångfalden), för att de sjukdomsframkallande varianterna ska kunna särskiljas korrekt.

Projektpublikationer - Vidare läsning

- European Defense Agency Research and Technology project JIP-ICET2 A-1341-RT-GP 2019. Bioforensics for Biodefence. Cutting edge technologies to evaluate the dangerousity of a biological sample and trace its origin. B2-forensics final report. <<https://ecp.eda.europa.eu/R/ICET2B2forensics/Pages/Home.aspx>>
- Svensson, D., Sjögren, R., Sundell, D., Sjödin A., Trygg J. 2019. doepipeline: a systematic approach to optimizing multi-level and multi-step data processing workflows. BMC Bioinformatics 20, 498. doi:10.1186/s12859-019-3091-z
- Grüning, B, Dale R, Sjödin A, Chapman BA, Rowe J, Tomkins-Tinch CH, Valieris R, Köster, JB. 2018. Bioconda: sustainable and comprehensive software distribution for the life sciences. Nature Methods, 15(7), pp.475–476

1.5.2 Förutsättningslös identifiering av hälsofarliga mikroorganismer i dricksvatten och dricksvattenberedning.

Projektet *Dricksvattenrisker* (2018-2019) har genomförts i samarbete med Livsmedelverket, Lund Universitet, Svenskt Vatten, SGU, Umeå Universitet och Chalmers och projektet *Nationell expert- och analysstöd för förutsättningslös identifiering av hälsofaror i vatten vid kris och höjd beredskap* (2019-2021) är ett samarbete med Livsmedelsverket, SVA, VAKA, Sydsvatten och Svenskt Vatten. Båda projekten är MSB 2:4 beredskapsprojekt som samfinansierats av *Teknikutveckling B*. Projektet *Dricksvattenrisker* har syftat till att utvärdera olika barriärer för beredningseffektivitet för rening av dricksvatten. FOI:s del i projektet har varit att analysera barriärverkan (sandfilter och UV-filter) och diversitet i svenska ytråvatten samt att utveckla lättanalyserade kvalitetsmarkörer för bedömning av beredningseffektivitet. Genom att använda en kombination av flödescytometri och förutsättningslös DNA-sekvensering har den bakteriella reduktionsgraden över de olika barriärerna bestämts samt hur den mikrobiella taxonomiska sammansättningen förändras före och efter rening. Genom denna analys har det varit möjligt att identifiera vad olika barriärer renar bort och vilka grupper av bakterier som passerar och att etablera en statistisk modell av reduktionsförmåga hos olika vattenverk. I samarbete med främst Lunds Universitet har liknande metodik använts för att kartlägga hur det mikrobiella samhället i råvatten påverkas efter passage genom UV-filter. Slutsatserna är att den mikrobiella sammansättningen påverkas avsevärt och en selektion för mikroorganismer som överlever UV-behandlingen sker. Dock avdödas de bakteriergrupper som innehåller de flesta sjukdomsframkallande arterna vid UV-behandling.

Inom projektet *Nationell expert- och analysstöd för förutsättningslös identifiering av hälsofaror i vatten vid kris och höjd beredskap* har vi bl.a. deltagit i två olika ringtester, där utvärdering av förutsättningslös DNA-sekvensering av dricksvattenprov med okänt innehåll utvärderats med befintliga teknikplattformar på FOI (Illumina och Nanopore). Syftet var att undersöka förmågan att identifiera och så långt som möjligt kvantifiera alla mikroorganismer i misstänkt förorenade

Titel/Title
Slutrapport Teknikutveckling B 2018-2020Memo nummer/Number
FOI Memo 7529

vattenprov men som det i övrigt saknades information om. Parallellt med förutsättningslös DNA-sekvensering användes flödescytometri för att bestämma det totala antalet celler i provet vilket gjorde det möjligt att sedan uppskatta antalet av respektive tillsatt påvisad organism. Sammantaget var detektionsgränsen i de aktuella proverna mellan 210 och 523 organismer per ml, då 523 endosporer/ml *Clostridium perfringens* men inte 210 cfu/ml *Salmonella enterica* kunde klassificeras korrekt. Vi visade även att detektionsgränsen kan ökas genom att sekvensera djupare, men då behövs ett kraftfullare instrument vilket medför ökad kostnad. Sekvensering av dricksvatten med ett toppklassinstrument (Illumina NovaSeq) ger ca 100x bättre känslighet i jämförelse med siffrorna ovan.

Resultaten utvecklar den potential som finns med förutsättningslös DNA-sekvensering att identifiera innehåll av mikroorganismer, inklusive patogener, i olika prov såväl kliniska som komplexa miljöprover (luftfilter, avloppsvatten, råvatten och dricksvatten). Denna kompetens är viktig för att spåra eventuella B-sabotage via dricksvatten eller luft, men också för att säkerställa kvaliteten på dricksvatten i allmänhet, som är en viktig samhällsresurs. Vidare visar också verksamheten behovet och nyttan samt utmaningar med referensmaterial, både stamkollektioner och genomreferensdata, för upprätthållande av *reach back*-funktion och utveckling och validering av detektionsmetoder, men också för att öka förmågan att skilja naturliga sjukdomsutbrott från avsiktlig spridning av smittämnen.

Projektpublikationer, vidare läsning

- Livsmedelverkets Samarbetsrapport. (2019). Bevattningsvatten-kunskapsunderlag. Rapport S 2019 nr. 02. <<http://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A1358413&dsid=-7538>>
- Livsmedelverket Samarbetsrapport. 2020. Handbok Dricksvattenrisker – Dricksvattenberedning. Rapport S 2020 nr. 1 tryck
- Hägglund, M. Bäckman S, Lindgren P, Borgmästars E, Jacobsson K, Dryselius R, Stenberg P, Sjödin A, Forsman M, Ahlinder J. 2018. Accounting for Bacterial Overlap Between Raw Water Communities and Contaminating Sources Improves the Accuracy of Signature-Based Microbial Source Tracking. *Frontiers in Microbiology*, 9, article id 2364
- Pullerits K, Ahlinder J, Holmer L, Salomonsson E, Öhrman C, Jacobsson K, Dryselius R, Forsman M, Paul CJ, Rådström P. 2020. Impact of UV irradiation at full scale on bacterial communities in drinking water. *npj Clean Water* 3:11.
- Eren AM., Kiefl E., Shaiber A., Veseli I., Miller SE., Schechter MS., Fink I., Pan JN., Yousef M., Fogarty EC., Trigodet F., Watson AR., Esen ÖC, Moore RM., Clayssen Q., Lee ML., Kivenson V., Graham ED., Merrill BD., Karkman A., Blankenberg D., Eppley JM., Sjödin A., Scott JJ., Vázquez-X., McKay LJ., McDaniel EA, Stevens SLR., Anderson R., Fuessel J., Fernandez-Guerra A., Maignien L., Delmont TO., Willis AD2020. Community-led, integrated, reproducible multi-omics with anvio. *Nature Microbiology*., doi:10.1038/s41564-020-00834-3

1.6 Anrikning av patogena mikroorganismer för att kunna kostnadseffektivt helgenomsekvensera sådana mikroorganismer från komplexa prover

En utmaning med direkt förutsättningslös DNA-sekvensering är att autentiska prov består av >99,9 % bakgrund. Följaktligen ger en direkt förutsättningslös sekvensering av ett sådant prov mer än 99,9 % DNA-sekvensläsningar från bakgrunden. Eftersom mängden DNA-sekvenser som är kostnadsmässigt och tidsmässig rimlig att generera är begränsad, så kommer 99 % av kostnad och analysstid att spenderas på bakgrunden samtidigt som känsligheten för detektion av eventuella patogener i provet minskar i motsvarande grad. Därför har vi under denna del utvärderat olika

Titel/Title
Slutrapport Teknikutveckling B 2018-2020Memo nummer/Number
FOI Memo 7529

strategier för att minska andelen av bakgrunds-DNA i olika typer av komplexa prov. För att kunna identifiera och karakterisera egenskaper hos främmande organismer som finns i låga mängder i sådana prover på ett enkelt DNA-sekvenseringsinstrument krävs någon form av selektiv sekvensering. Vi har utvärderat flera olika strategier för detta med varierande framgång.

En framgångsrik metod som vi utvecklat och optimerat är selektiv anrikning (SWGA – selektive whole genome amplification) av hela bakteriegenom i humana och djurprover. Metoden bygger på en kännedom om genetiska bakgrunden i provet, för att undvika att bakgrunden amplifieras. I det optimerade protokollet tar anrikningen tre timmar plus tid för DNA-sekvensering, som beroende på vilken metod som används, tar mellan 1-12 h, dvs det är fullt möjligt att genomföra analysen under en arbetsdag. Som modell har vi genererat komplett genominformation på *Francisella tularensis* (harpestbakterien) från skarpa kliniska human och djurprover från 2019 års harpestepidemi i Sverige. Detta möjliggör på ett enkelt och relativt snabbt sätt att epidemiologiska och bioforensiska undersökningar kan genomföras utan att proverna behöver odlas.

En begränsning med SWGA är som nämnts att den genetiska bakgrunden måste vara känd och karakteriserad, dvs metoden fungerar inte i prov med okänd heterogen bakgrund (vatten, luft, vektorer, ytprover) bestående av alla typer av organismer (>99,9 %). På grund av den heterogena bakgrunden har andra anrikningsmetoder utvärderats. I samarbete med USA (Northern Arizona University, NAU) har vi utvärderat en variant som bygger på hundratals syntetiserade DNA-oligonukleotider (120 nukleotider långa) som är designade att täcka huvuddelen av genomet på *Francisella* och inte hybridisera mot bakgrunds-DNA i provet. Detta bibliotek av oligonukleotider är uppbyggda på magnetkulor som gör det enkelt att fiska ut DNA som specifikt hybridiserat och som är fri från bakgrunds-DNA. Metoden verkar mycket lovande och vi har helgenomsekvenserat *Francisella* från fästingar, miljövattenprover och luftfilter (FOI luftfilterstation i Kiruna) med denna metod, men en nackdel är att det är en dyr och relativt tidkrävande (hybridisering över natt). För att enkelt screena miljöprover för innehåll av *Francisella*-bakterier, dvs identifiera prover som är intressanta att gå vidare med att anrika inför helgenomsekvensering har vi utvecklat en ny generell PCR för genuset *Francisella* som även täcker in miljöbakgrund (Cronhjort et al., 2019) samt en specifik PCR som bara plockar upp de sjukdomsframkallande varianterna av *Francisella* i miljöprover (Öhrman et al., 2021). Utvecklingen av den sistnämnda PCR:en har möjliggjorts genom ett mångårigt samarbete med USA som delvis finansierats via US-Swe bilateral agreement, där MSB finansierat den svenska delen. Detta projekt har syftat till att karakterisera de extremt närbesläktade *Francisella*-varianterna (som inte orsakar sjukdom, men som finns överallt i miljön) för att dessa inte kan plockas upp med PCR-analys.

Projektpublikationer, vidare läsning

- Cronhjort, S., Wilhelmsson, P., Karlsson, L., Thelaus, J., Sjödin, A., Forsberg, P., Lindgren, P-E. (2019) The Tick-Borne Diseases STING study: Real-time PCR analysis of three emerging tick-borne pathogens in ticks that have bitten humans in different regions of Sweden and the Aland Islands, Finland', *Infection Ecology and Epidemiology*. Taylor & Francis, 9(1). doi: 10.1080/20008686.2019.1683935.
- Uneklint, I., Öhrman, C., Karlsson, L., Byström, M., Hägglund, E., Forsman, M., & Sjödin, A. 2020. Complete Genome Sequence of *Francisella halioticida* Type Strain DSM 23729 (FSC1005), 9(August), e00541-20. <https://doi.org/doi.org/10.1128/MRA.00541-20>.
- Sundell D., Uneklint I., Öhrman C., Salomonsson E., Karlsson L., Bäckman S., Näslund J., Sjödin A., Forsman M., Appelt S., Drechsel O., Daniela J., Heuner K., Myrtenäs K. 2020. Complete genome sequence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strain A271_1 (FDC408), isolated from Eurasian beaver (*Castor fiber*). *Microbiology Resource Announcements*, 9(45). <https://doi.org/10.1128/mra.00738-20>
- Koene, M. Rijks, J., Maas., M. Ruuls, R., Engelsma, M., van Tulden, P., Kik, M., IJzer, J., Notermans, D., de Vries, M., Fanoy, E., Pijnacker, R., Spierenburg, M., Bavelaar, H., Berkhout, H., Sankatsing, S., Diepersloot, R., Myrtenäs K., Granberg, M., Forsman, M.,

Titel/Title
Slutrapport Teknikutveckling B 2018-2020Memo nummer/Number
FOI Memo 7529

- Roest, H-J., Gröne, A. (2019) Phylogeographic Distribution of Human and Hare *Francisella tularensis* Subsp. *holarctica* Strains in the Netherlands and Its Pathology in European Brown Hares (*Lepus Europaeus*), *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fcimb.2019.00011.
- Johansson A. and Forsman M. 2018. *Francisella*. In *Handbook of Foodborne Diseases* (Ed. Dongyou Liu) CRC Press, Boca Raton. pp 588-616.
 - Öhrman C., Uneklint I, Karlsson L. , Svensson D., Forsman M., Sjödin A. 2020. Complete Genome Sequences of *Allofrancisella inopinata* SYSU YG23 and *Allofrancisella frigidaquae* SYSU 10HL1970 isolated from water from cooling systems in China". *Microbiology Resource Announcements*, 9(48). <https://doi.org/10.1128/MRA.00554-20>
 - Öhrman C, Uneklint I, Karlsson L, Respcio-Kingry L, Forsman M, Petersen JM Sjödin A. 2020. Complete Genome of *Francisella* sp. LA11-2445 (FDC406), a novel *Francisella* species isolated from a human skin lesion. *Microbiology Resource Announcements*. Accepted for publication
 - Sundell D., Öhrman C., Svensson D., Karlsson D., Brindefalk B., Myrtenäs K., Ahlinder J., Antwerpen M., Walter MC., Forsman M., Stenberg P., Sjödin A. 2020. FlexTaxD: flexible modification of taxonomy databases for improved metagenomic classification. *Bioinformatics and BIOINF-2020-2523* submitted.
 - Ecke F, Johansson A, Forsman M, Khalil H, Magnusson M, Hörnfeltd B. 2020. Selective Predation by Owls on Infected Bank Voles (*Myodes glareolus*) as a Possible Sentinel of Tularemia Outbreaks. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 20:630–632.
 - Linde J, Homeier-Bachmann T, Dangel A, Riehm JM, Sundell D, Öhrman C, Forsman M, Tomaso H. 2020. Genotyping of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* from Hares in Germany. *Microorganisms* 8:1932.
 - Öhrman C., Sahl J., Sjödin A., Uneklint I., Ballard R , Karlsson L., McDonough R., Sundell D., Soria K., Brindefalk B., Vallesi A., Gustavo Ramirez-Paredes J., Colquhoun D. , Myrtenäs K., Birdsell D., Johansson A., Wagner D., Forsman M. 2020. Reorganized genomic taxonomy of *Francisellaceae* enables design of robust environmental PCR assays for detection of *Francisella tularensis*. *J. Microorganisms*. *Microorganisms* 2021, 9(1), 146; <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010146>
 - Dacklin I., Öhrman C, Myrtenäs K., Sundell D, Karlsson L., Näslund-Salomonsson E., Johansson A, Forsman M., Sjödin s. 2020. Selective whole genome amplification of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* DNA from clinical samples enabling culture-independent genome epidemiology. Manuscript in preparation

1.6.1 Luftprovtagning, detektion och anrikning av SARS-CoV2 från luftfilter

Under våren/sommaren 2020 utfördes luftprovtagning med en uppsättning instrument på intensivvårdsavdelningen samt infektionskliniken på Norrländska Universitetssjukhuset i Umeå med syfte att undersöka möjligheten att påvisa närvaron av SARS-CoV-2-virus i lokalerna. Dessa mätningar hade som syfte att dels undersöka FOI:s förmåga att tillämpa kunskaper och tillgänglig utrustning under en pågående pandemi, dels att stödja samhället med underlag för skyddsbedömning för personal under den pågående smittspridningen.

Provtagning utfördes med tre instrument: en partikelmätare som mäter storleken och mängden av partiklar i luften, en provtagare som samlar partiklar på ett filter under en längre tidsperiod och med möjligheten att fraktionera partikelstorlekar på olika filter över tid (8 filter), samt med en impaktor som har förmågan att dela upp de provtagna partiklarna i luften efter storlek.

De erhållna proverna analyserades med en uppsättning experimentella procedurer, med målet att dels analysera närvaro/mängd av viruspartiklar i luften, dels att avgöra om viabla virus-partiklar kunde detekteras. Inga virus detekterades på intensivvårdsavdelningen, troligen pga. att patienterna var intuberade och deras utandningsluft filtreras genom interna filter i ventilatorerna.

Titel/Title
Slutrapport Teknikutveckling B 2018-2020

Memo nummer/Number
FOI Memo 7529

Mätningar utfördes också på infektionskliniken i ett isolerat rum försett med luftsluss med en patient. Resultatet visade att de små partikelfraktionerna dominerade (0,06-4,07 mikrometer), och att toppar i partikelinnehåll i luften korrelerade med aktivitet i rummet, troligen öppning/stängning av luftslussen till det isolerade rummet. Patienten i rummet som provtogs hade redan varit bekräftat sjuk i fem dygn och hade passerat toppen för utsöndring av viruspartiklar (det tidsfönster där patienten är mest smittbenägen). PCR-analys gav positivt resultat för två filter från ASAP:en, men odling från filtren visade inga viabla viruspartiklar, troligen pga. den omilda behandlingen proverna utsätts för med de aktuella instrumenten inaktiverar virioner (infektiösa viruspartiklar).

Slutligen anrikades hela virusgenom från luftfiltren genom en metod som amplifierar hela virusgenomet (endast 30000 bp) genom 100-tals överlappande PCR reaktioner. Därefter sekvenserades alla PCR produkter och genomen sattes samman. Resultatet konfirmerade att den virus-variant som plockats upp på filtren var identisk med den som infekterat patienten. Sekvenseringsmetoden som användes har potentialen att vara mer känslig än en PCR-analys, och i detta fall gav samtliga filter från ASAP:en positivt resultat för virusnärvaro. Impaktorproverna gav positivt resultat i två av fem poolade storleksfraktioner, tydandes på att halten virus är högst i små partiklar (<5 mikrometer) och stora partiklar (droppsmitta), vilket väcker frågan om betydelsen av luftburen transmission av virus för luftburen smitta. De erhållna resultaten behöver valideras och utökas med ett mer omfattande provunderlag för säkra slutsatser.

Parallellt sekvenserades SARS-CoV2-genom från patienter i Västerbotten tagna mellan 10-20 mars 2020 och sekvenserna lades ut publikt den 13 april. (Då fanns endast ett genom, från indexfallet 20 januari ute från Sverige). Resultaten visade att det i Västerbotten redan i mitten av mars cirkulerade minst tre olika klader med europeiskt och amerikansk ursprung, och inga klader från Kina samt att intern samhällsmitta redan den 10 mars var omfattande i Västerbotten.

Projektpublikationer, vidare läsning

- Brindefalk B., Näslund J., Karlsson L., Lejon C., Forsman M. 2020. Luftprovtagning av SARS-Cov2 - Provtagning av luftprover på NUS vår-sommar 2020. FOI-D--1029—SE.
- FOI rapporterat podcast avsnitt nr 17, 2020

Titel/Title
Slutrapport Teknikutveckling B 2018-2020Memo nummer/Number
FOI Memo 7529

2 Samarbeten och nyttiggörande

Inom FOI har samverkan skett mellan kompetensgrupperna Biologiska ämnen, Fysiskt skydd och Spridningsmodellering för att stärka FOI:s förmåga för luftprovtagning och efterföljande analyser. I de delar av projektet som rör förutsättningslös sekvensering har samverkan nationellt skett med Livsmedelverket, Lund Universitet, Svenskt Vatten, SGU, Umeå Universitet, Chalmers, SVA, VAKA, Sydsvatten och Svenskt Vatten. Internationellt har samverkan inom anrikning och förutsättningslös sekvensering skett med grupper i de flesta Europeiska länderna och med ett flertal grupper i USA. Samverkan förbättrar möjligheten till framsteg inom området då verksamheten kan bedrivas i större omfattning och FOI drar nytta av den expertis som finns hos samarbetspartners. Under 2019 och 2020 har samverkan skett med FM FöMedC, SVA och Jordbruksverket i form av en gemensam ansökan till MSB för 2:4 krisberedskapsmedel *Ökad totalförsvarsförmåga för provtagning och analys av smittämnen i luft.*