

Detektion af E. coli bakterier med modulært system

MUDP-rapport

Juni 2020

Udgiver: Miljø- og Fødevareministeriet

Redaktion:

Jeppe Fock, BluSense Diagnostics APS

Sara Starcke, Amphi-Bac Aps

ISBN: 978-87-7038-192-5

Miljøstyrelsen offentliggør rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, som er finansieret af Miljøstyrelsen. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Må citeres med kildeangivelse

Indhold

Forord	7
1. Introduktion	8
1.1 Projektets aktiviteter	8
2. Markedsundersøgelse	9
2.1 E. coli detektions metoder	9
2.2 Dansk E. coli. marked estimat	11
2.3 Konkurrent analyse	11
3. Udvikling af vand op-koncentrations enhed	13
3.1 Indledning	13
3.2 HiVoSa	13
3.3 Opbygning af HiVoSa	14
3.3.1 Genfindingsprocent og forsøgsopstilling	14
3.3.2 Opbygning af systemet	15
3.3.2.1 Pumper	15
3.3.2.2 Rørføring	15
3.3.3 Filtre	15
3.3.4 Opkoncentreringstid	15
3.4 Det færdige produkt	15
4. E. coli detektion	17
4.1 Udvikling af RPA-detektion af E. coli.	17
4.1.1 Teknologier for DNA amplifikation	17
4.1.2 Recombinase Polymerase Amplification (RPA)	18
4.1.3 Strategier for detektion	19
4.1.3.1 Strategi I: Biotin-mærkede A og B primere (uden probe tilsat)	19
4.1.3.2 Strategi II: Biotinylated Biotin-mærket probe og primer B	20
4.1.3.3 Strategi III: Biotin-mærket probe	21
4.2 RPA-detekteringskassette	22
4.2.1 Første version RPA- detekteringskassette	22
4.2.2 Anden version RPA- detekteringskassette	24
5. Temperaturkontrol i BluBox	27
6. Integration	29
6.1 E. coli detektion fra vandprøve til resultat	29
6.2 DNA-ekstraktion	30
6.2.1 Kommercielt tilgængelige løsninger.	30
6.2.1.1 Integration af modulerne	30
7. Validering	31
7.1.1 Laboratorie test	31
7.1.2 Fuld skala, Kalundborg Forsyning	31

8. Konklusion	32
Referencer	33

Forord

Denne rapport er udarbejdet på baggrund af projektet "Detection of E. coli bacteria with modular system", der er gennemført med tilskud fra Miljø- og Fødevareministeriet i 2016.

Projektet bestod af:

Hovedansøger:

Blusense Diagnostics ApS

Medansøgere:

Amphi-Bac ApS

Kalundborg Vandforsyning

1. Introduktion

E. coli er den vigtigste indikator for forurening med patogene bakterier i drikkevand. WHO anbefaler at E. coli ikke skal kunne detekteres i en 100 ml drikkevand prøve [1]. Denne anbefaling er efterkommet i EU's drikkevandsdirektiv[2] og i den danske drikkevandsbekendtgørelse[3]. Vandværkerne skal teste mindst 1 månedlig prøve for hvert distribueret 4000 m³/døgn i deres kontrol af drikkevandkvaliteten[3]. For et gennemsnit forbrug på 63 m³ pr person om året (inklusive erhvervets forbrug)[5] svarer det til 1 test per måned ca. pr 23.000 forbruger. Alle de godkendte detektionsmetoder bruger opformering af levende E. coli, som typisk tager 18-48 timer, for at opnå den ønskede sensitivitet[4]. Er E. coli forurening detekteret skal vandværkerne, indtil kilden for forureningen er lokaliseret og vandet er fundet fri for E. coli, enten levere rent drikkevand med alternativ vandforsyning, med nødforsyning (vandtanke) eller forbrugerne skal koge vandet inden brug[6]. En hurtig opsporing og detektering af E. coli vil kunne frigive drikkevandet hurtigere til gavn for samfundet.

1.1 Projektets aktiviteter

Formålet med dette projekt er at udvikle en komplet løsning til hurtig detektion af E. coli DNA fra et stort volumen af vand. Løsningen består af to modulære dele.

- 1) Op-koncentration af DNA i vand udviklet af Amphi-Bac Aps
- 2) Detektion af E. coli DNA ved brug af isoterm DNA opformering og optomagnetisk ud-læsning i en BluBox udviklet af BluSense Diagnostics ApS.

Derudover undersøges i projektet muligheder for integration af de modulære dele, og en markedsundersøgelse udføres. Denne tekniske rapport sammenfatter resultaterne fra projektet.



FIGUR 1. Billede af en BluBox fra BluSense Diagnostics.

2. Markedsundersøgelse

2.1 E. coli detektions metoder

I TABEL 1 ses de godkendte metoder til detektion af E. coli i drikkevand i USA. Metoderne tager alle mere end 18 timer at udføre, og kræver laboratoriefaciliteter. Kun Colilert® Quany Tray testen er godkendt til den rutinemæssige, lovbundne kontrol i Danmark, mens Colilert® og ReadyCult er anerkendt til screening[6]. Til hurtig kilde opsporing er desuden et antal ikke E. Coli specifikke metoder anbefalet[6].

TABEL 1. Metoder til E. coli detektering godkendt af US Environmental Protection Agency (EPA)

Metode kategori	Metode
Multiple-tube Fermentation (MTF)	<ul style="list-style-type: none">Standard metode 9221 F – EC – MUG medium
Membran filtre partition	<ul style="list-style-type: none">Standard metode 9222 G – EC broth with MUGStandard metode 9222 G – NA-MUG
Membran filtre	<ul style="list-style-type: none">MI mediumM-ColiBlue24® TestChromocult
Enzym substrat	<ul style="list-style-type: none">Colilert® - VT LABSColisure®E* Colite® TestReadyCult® TestModified Colitag® Test

Molekylære metoder detekterer enten DNA, RNA eller antistoffer fra E. coli. De molekylære metoder tager typisk et par timer at udfører og kræver et specialiseret laboratorie. Volumen af en prøve for molekylære metoder er normalt i størrelsesordenen mikroliter. For at opnå tilstrækkelig sensitivitet kræves enten en præ-kultivering af E. coli, eller en opkoncentrering af vandprøven.

Udover de godkendte metoder beskrevet ovenfor, er der udviklet et antal andre metoder til at detektere E. coli. TABEL 2 sammenfatter egenskaberne ved de forskellige metoder. **Enzyme-linked immunosorbent assay** (ELISA) måler antistof, der binder specifikt til et antigen på en overflade, og signalet læses ved hjælp af et enzym på et sekundært antistof, der konverterer et ikke-fluorescerende substrat til et fluorescerende produkt. Selvom specificiteten på ELISA er høj, så er sensitiviteten lav. **Polymerase chain reaction** (PCR) opformerer/ amplificerer et specifikt område på en DNA streng og detekterer den samlede mængde amplificeret DNA med en fluorofor. Sektion 4 beskriver et antal andre DNA amplifikationsmetoder, som kan anvendes i stedet for PCR. Derudover findes hybridisering teknikker, som kan detektere nukleotider (DNA- og RNA-sekvenser) direkte *in-situ* med hybridisering teknikker, dog med meget lav sensitivitet. Der findes flere metoder til at detektere DNA i høj koncentration, fx efter en DNA-amplifikation. **Elektrisk impedans** DNA-detektion måler den elektriske impedans af en elektrode og ændringerne, når DNA binder til elektroden. **Surface Plasmon resonance** (SPR) måler en ændring i brydningsindekset, nær en overflade, når DNA eller et andet molekyle, fx antistof, binder. **Optomagnetisk** detektion, som er brugt i dette projekt, måler ændring i rotationsdynamik, når magnetiske partikler agglutinerer.

Egenskaber samt analysestid for forskellige E. coli detektionsmetoder er ræsenteret i TABEL 2.

TABEL 2. Egenskaber ved E. coli detekterings metoder

Metoder	Tid	Specificitet Sensitivitet	kvantitativ / kvalitativ	Falsk positive risiko	Metabolisk status
Multiple tube fermentation	48-72 h	Medium Medium	kvantitativ	Ja	Ja
Membran filtration	24-48 h	Medium Medium	kvantitativ	Ja	Ja
Enzym substrat metoder	18-24 h ¹	Høj Lav	kvalitativ	Ja	Ja
Enzym-linket immuNejsorbent test (ELISA)	6-24 h ¹	Høj ² Lav	Semi- kvan- titativ	Nej	Nej ³
Polymerase chain reaction metoder (PCR)	≤ 2 h	Høj Lav	kvantitativ	Nej	Nej
<i>In situ</i> hybridisering teknikker med fluorescens-markerede nukleotider	≤ 2 h	Høj Meget Lav	kvantitativ	Nej	Nej
Elektrisk impedans	kort	Høj Lav	Semi- kvan- titativ	Ja	Nej
Surface Plasmon resonance (SPR)	kort	Høj Lav	Semi- kvan- titativ	Ja	Nej
Optomagnetisk detektion	kort	Høj Lav	Semi- kvan- titativ	Ja	Nej

1) Afhængig af E. coli koncentration, 2) Afhængig af antistoffet, 3) under udvikling

2.2 Dansk E. coli. marked estimat

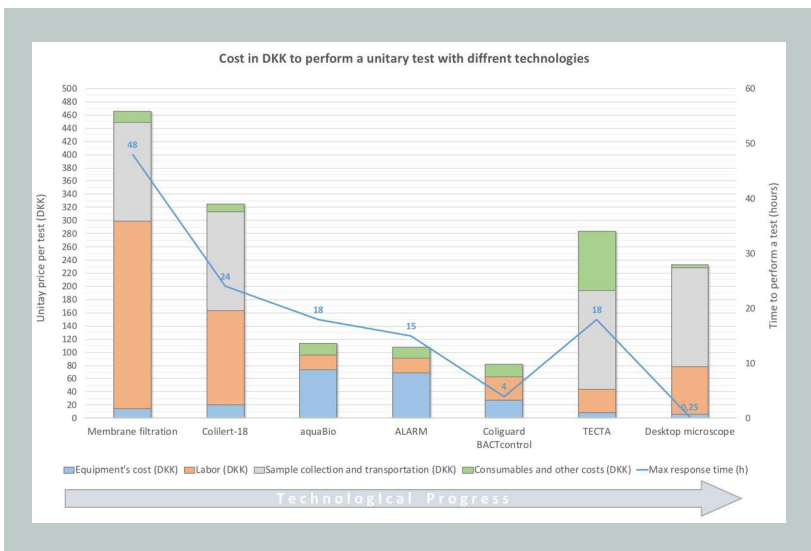
Markedet for metoder til detektion af E. coli er estimeret af Technavio til at overstige 222\$ millioner i 2020. I 2015 var markedet i EMEA (Europa, Mellemøsten og Afrika) estimeret til i alt 48,6\$ millioner [7].

Den europæiske markedsandel af EMEA estimeres ud fra vandforbruget i husholdninger publiceret af World's Water [8]. I Europa bliver 47,9 milliarder m³ vand leveret til befolkningen årligt, hvor der, til sammenligning, bliver leveret henholdsvis 23 og 21,3 milliarder m³ vand til befolkningen i Mellemøsten og Afrika. Europa står altså for 51,5 % af det totale vandforbrug i EMEA, svarende til et E. coli detektionsmarked på 28,3\$ millioner. Ifølge WHO's *Guidelines for drinking-water quality* [1] har mange lande i Afrika og Mellemøsten svært ved at leve op til minimumsbefalingerne for test af E. coli i drikkevand. Derfor er det rimeligt at øge andelen af det Europæiske marked med 30% til 36,8\$ millioner. Det danske marked er beregnet ud fra den danske befolkningsandel (0,75%) ud af samlede i europæisk befolkning hvilket giver 1.9 millioner kr. årligt.

Vi estimerer også et *bottom up* estimat af det danske E. coli detektionsmarked ud fra det samlede antal tests samt enhedsprisen. 13.906 akkrediteret vandprøver blev udtaget i 2018 for de drikkevandsselskaber der har indleveret data til DANVA Statistik & Benchmarking (levere til ca 56% af den danske befolkning)[5]. Det svare til at der i Danmark årligt foretages minimum 25000 E. coli tests. Enhedspris for E. coli tests (Colilert-18) inklusiv forsendelses- og lønomkostninger estimeres til 3.7\$ hvilket resulterer i et *bottom-up* perspektiv på 635000 kr årligt på et marked for E. coli detektion. Dette er en 1/3 af estimatet fra *top-down* analysen ovenfor. Vi estimerer derfor at E. coli detektionsmarkedet i Danmark er mellem 635.000 kr og 1.9 millioner kr årligt.

2.3 Konkurrent analyse

FIGUR 2 viser udgifterne for forskellige kommercielle E. coli tests opdelt i udgifter til instrumenter, arbejdskraft, prøvetagning, transport og materialer. De to nuværende mest udbredte tests, Colilert-18 og membran filtration, har store udgifter til arbejdskraft, prøvetagning og transport. Nyere tests har alle lavere udgifter til arbejdskraft. For de on-line automatiske løsninger (aqua-Bio, ALARM og COLIGUARD/BACTcontrol) er der ingen udgifter til prøvetagning og transport, hvilket gør enhedsprisen for disse teknologier samlet set billigst i denne sammenligning, selvom instrumentprisen er højere. For et *off-line* scenarie er målet for dette project en samlet testpris på 225 kr, hvilket placerer løsningen lige under TECTA og "Desktop microscope" i pris, men med en kortere prøvetid.



FIGUR 2. Konkurrent analyse

3. Udvikling af vand op-koncentrations enhed

3.1 Indledning

Som nævnt i afsnit 2.1, er prøvevolumen til molekylærbiologiske analysemetoder meget lavt (typisk 1 – 10 µl). Når dette kombineres med at koncentrationen af E. coli i en drikkevandsforurening i Danmark ofte også er meget lav (typisk 1-3 E. coli/100 ml), er det nødvendigt enten at opdyrke prøven med et specifikt medie således at de enkelte bakterier formerer sig og koncentrationen dermed øges, eller at filtrere et meget stort vandvolumen således at et tilpas stort antal bakterier koncentrerer på et filter eller i et meget mindre volumen.

Opdyrkning af prøven adskiller sig ikke markant fra fremgangsmetoderne beskrevet i TABEL 2, hvorfor alle fordele ved hurtig detektering af en fækal forurening forsvinder, når prøven indledningsvist skal opdyrkes i 18-24 timer.

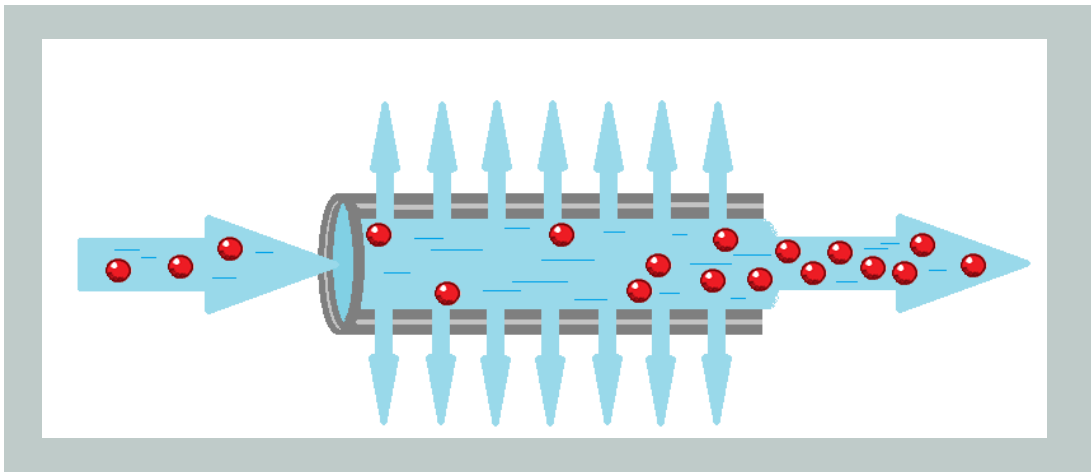
Derfor er der til dette projekt fokuseret på opkoncentrering af et stort volumen. For at metoden har værdi i forhold til forureningsopsparing i Danmark, skal metoden være så følsom, at den kan detektere 1-3 E. coli/100 ml i ledningsnettet. Denne følsomhed stiller krav til mængden af drikkevand, der skal opkoncentreres. Det vurderes at være nødvendigt at opkoncentrere 1.000-5.000 liter drikkevand for at være sikker på et pålideligt resultat. Yderligere er det nødvendigt at opkoncentreringen foregår hurtigt, da en langsom filtrering også vil fjerne fordelene ved en hurtig detektion af en forurening.

3.2 HiVoSa

For at imødekomme kravene til opkoncentrering af meget store drikkevandsprøver på meget kort tid, har Amphi-Bac bygget et apparat, der benytter teknologien fra Cross Flow Filtrering til at opfylde kravene.

HiVoSa (High Volumen Sampling) udtager automatisk en drikkevandsprøve, der cirkuleres i systemet med højt flow hen over et filter. Filteret er opbygget af hundredvis af hule fibre med en lille porestørrelse. Vandprøven flyder på indersiden af fibre således, at det rene vand filtreres fra (permeatet) og alle bakterier holdes i suspension i systemet (Retentatet).

Figur 3 nedenfor viser en skitse af princippet ved opkoncentreringen. Vand med lav koncentration af E. coli ledes på indersiden af de hule fibre, der har en så lille porestørrelse at bakterierne tilbageholdes inde i fibre mens det rene vand filtreres fra. I takt med at et større og større vandvolumen med lav koncentration af E. coli filtreres, vil koncentrationen af E. coli tilbageholdt i suspensionen i systemet stige. Slutteligt er alle bakterier fra eksempelvis 5000 liter vand tilbageholdt i systemet, men nu kun suspenderet i 100 ml.



Figur 3. Skitse, der illustrerer hvordan koncentrationen af de tilbageholdte bakterier i suspensionen stiger i takt med at det rene vand filtreres ud af systemet.

3.3 Opbygning af HiVoSa

At opkoncentrere store mængder vand på kort tid, stiller krav til udstyrets fysiske opbygning, filtre og pumper, så det sikres, at bakterierne i vandprøven forbliver intakte til trods for den hårde behandling de udsættes for under opkoncentreringen. Derfor er der udført en række tests under mange forskellige forhold af rørføring, filtre samt pumper. Konklusionerne herfra er anført nedenfor.

3.3.1 Genfindingsprocent og forsøgsopstilling

I det følgende er systemets ydeevne vurderet bl.a. i forhold til genfindingsprocenten. Genfindingsprocenten er i denne sammenhæng defineret som den procentdel af dyrkbare bakterier, der kan detekteres ved dyrkning efter opkoncentrering af en prøve i forhold til det antal bakterier, der teoretisk burde være i opkoncentratet, når det opkoncentrerede volumen tages i betragtning. Til test af systemet er der opsat en forsøgsopstilling, hvor en stor omrørt beholder er fyldt med hanevand til det ønskede volumen. Beholderen er efterfølgende spiket med en renkultur af *E. coli* eller spildevand i en lav koncentration. Startkoncentrationen af *E. coli* er bestemt med opdyrkning i specifikt medie (Colilert, IDEXX).

Til detektion af *E. coli* med molekylærbiologiske metoder er det ikke afgørende at bakterierne i opkoncentratet er dyrkbare/levende, da metoden detekterer DNA fra bakterierne uafhængigt af bakterierne tilstand. Det vurderes dog, at genfindingsprocenten er en god vurderingsparametre i forhold til at vurdere enkeltdele i HiVoSa, da det er afgørende at cellerne i suspensionen ikke smadres fuldstændigt. Hvis dette sker, er der risiko for at cellernes DNA går tabt i opløsningen og ikke blive detekteret.

3.3.2 Opbygning af systemet

For at undgå tilstopning af filteret, er det vigtigt, at vandprøven cirkuleres med højt flow hen over filteret. Samtidig er det vigtigt at pumpen ikke er for hård ved bakteriecellerne, når de cirkuleres i systemet samt at rørføringen i systemet har mindst muligt antal sving, ventiler og indsnævring.

3.3.2.1 Pumper

Der er testet en række forskellige pumper, der fungerer forskelligt. Pumperne er vurderet på permeat flow, retentat flow, genfindingsprocent samt opkoncentreringstid. Hver pumpetype er testet ved forskellige opkoncentreringsvolumner.

Pumpen, der viste sig bedst egnet var en membran pumpe med fire pumpehoveder, der sikrer, at vandet pumpes lavpulsierende rundt i systemet.

3.3.2.2 Rørføring

For at opnå et så flydende og uforstyrret flow i systemet som muligt, er en række forskellige slange og rørføringer med forskellig diameter testet.

Den sammensætning, der gav den højeste genfindingsprocent, var en slangeføring med lille diameter sammenkoblet med ingen vinkler på over 70°.

3.3.3 Filtre

Filteret er hjertet i systemet, og det er afgørende at filteret er velfungerende. Indledningsvist ønskes et genanvendeligt filter, der kunne regenereres og renses, når det var nødvendigt. Til dette formål testes en række forskellige keramiske filtre med forskellig porestørrelse. Resultaterne af disse test viste, at de keramiske filtre ikke kunne anvendes til formålet, da porestørrelsen ikke er absolut, hvorved en stor del af bakterierne i retentatet ikke blev tilbageholdt.

I stedet blev engangsfiltre opbygget af hule fibre valgt.

3.3.4 Opkoncentreringstid

Filtrene med de hule fibre er begrænset af, at det transmembrane tryk ikke må blive for højt, idet filteret dermed har risiko for at blive ødelagt. Dette sætter yderligere krav til systemets opbygning, idet der ønskes en meget hurtigt opkoncentrering. For at imødekomme dette, er HiVoSa opbygget med mulighed for en modulær opbygning af flere filtre i parallel. Dermed kan den mængde vand, der ønskes opkoncentreret, på den tid opkoncentreringen ønskes udført på, styres af antallet af filtre i HiVoSa.

3.4 Det færdige produkt

De mange test har resulteret i et mobilt produkt, der kan tilsluttes direkte til ledningsnettet. HiVoSa kan udtage en straksprøve eller en tidsintegreret prøve, hvor mindre vandmængder opsamles over en valgfri periode. Prøvevolumen kan vælges frit, så det kan tilpasses til den individuelle situation. Opkoncentreringstiden kan ligeledes varieres. HiVoSa kan aktiveres via signaler fra de fleste anerkendte protokoller samt via sms, app eller manuelt via en knap på apparatet.

På FIGUR 4 ses et billede af HiVoSa brugt til opkoncentrering i ledningsnettet hos Kalundborg Forsyning (se afsnit 7.1.2)



FIGUR 4. Prototype af HiVoSa, der er anvendt til opkoncentrering af vandprøver hos kalundborg Forsyning.

4. E. coli detektion

4.1 Udvikling af RPA-detektion af E. coli.

BluSense Diagnostics har udviklet en metode til at påvise DNA fra E. coli ved at kombinere DNA-amplifikationsteknikken *recombinase polymerase amplification* (RPA) med opto-magnetisk udlæsning. Ved projektets start demonstrerede vi høj sensitivitet for detektionen af mikrobiologisk (DNA) ved hjælp af *loop mediated amplification* (LAMP) [9]. LAMP har dog en høj risiko for falsk-positive resultater på grund af den eksponentielle amplifikation af DNA og det høje antal af DNA specifikke *primere*, som øger produktionen af uønskede bi-produkter. Det lykkedes os at udvikle en metoden og adskille falske positive fra sande positive resultater, men på bekostning af sensitiviteten. En anden udfordring ved LAMP, er at metoden skal udføres ved høj temperatur (60-70 °C), hvilket ofte kan forårsage utætheder i mikro-fluide enheder. På baggrund af de ovenstående problemer besluttede vi tidligt i projektet at skifte til RPA i stedet for LAMP.

4.1.1 Teknologier for DNA amplifikation

TABEL 3 sammenligner fire DNA amplifikationsmetoder: RPA, LAMP, *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) og *rolling cycle amplification* (RCA).

RPA er den af de fire metoder, som udføres ved laveste temperatur, tager kortest tid og som har den absolut laveste detektionsgrænse for mål-DNA'et (DNA sekvensen, der ønskes detekteret). Tilgængæld sker amplificering af DNA sekvensen ved eksponentiel fordobling, hvilket øger risikoen for amplifikation af uønskede bi-produkter og dermed antallet af falsk positive resultater. Ved RCA påhæftes en yderst specifik probe til DNA sekvensen, førend en lineær amplifikation finder sted, hvilket giver en højere specificitet. Dette sker dog på bekostning af en højere starttemperatur på 65°C, længere inkubationstid og en højere detektiongrænse.

På baggrund af vores erfaringer med LAMP og nøje sammenligning af forskellige DNA amplifikationsmetoder besluttede vi tidligt i projektet, at RPA var den optimale metode til amplifikation og detektion i en mikrofluid enhed på en BluBox.

TABEL 3. Teknologier for DNA amplifikation

Metode	Inkubations-temperatur (°C)	Reaktionstid (min)	Detektionsgrænse (antal DNA kopier)	Isothermal	Amplifikationstype
RPA	37-42	20-40	1	Yes	Eksponentiel
LAMP	60-70	60	5	Yes	Eksponentiel
RCA	30-40, 65	60-240	10	Yes	Linier
qPCR	60, 95	40-120	1-10	no	Eksponential med flere thermocykler

Raja, B., Goux, H. J., Marapadaga, A., Rajagopalan, S., Kourentzi, K., & Willson, R. C. (2017). Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of common bacterial urinary tract infection pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 123(2), 544–555. <https://doi.org/10.1111/jam.13493>

4.1.2 Recombinase Polymerase Amplification (RPA)

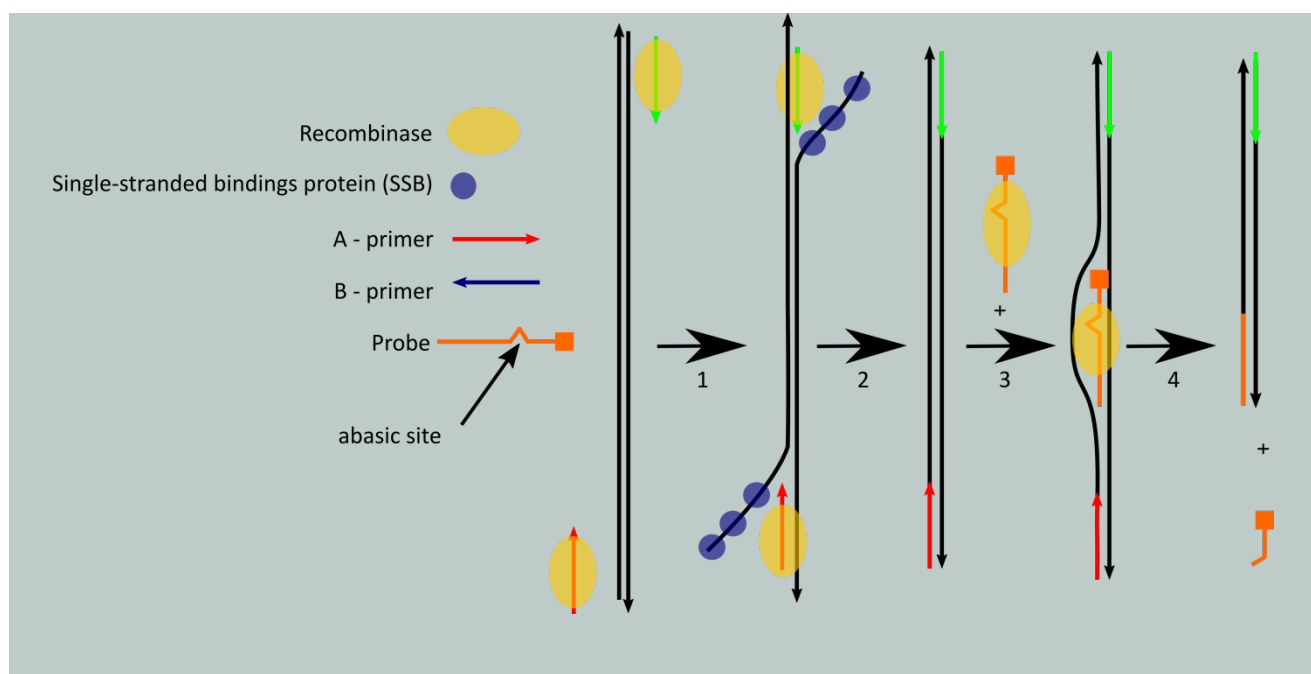
RPA blev introduceret i 2006 af Piepenburg et al. [10] og metoden er for nylig gennemgået i en oversigtartikel [11]. FIGUR 5 viser en skematisk fremstilling af RPA-metoden, som består af følgende trin:

- 1) Et DNA rekombinationsenzym kaldet Rekombinase binder til korte enkeltstrengede DNA-sekvenser (primere) specifikke for mål-DNA'et og ved en samtidig tilstedeværelse af en 'crowding agent'/makromolekyle og ATP fremmes adskillelsen af de to komplementære DNA-strengte. Små DNA-bindende proteiner stabiliserer det nu åbne DNA-molekyle.
- 2) En DNA-polymerase med DNA-forskydnings aktivitet kopierer den ønskede DNA-sekvens og punkt 1 og 2 gentages således at en egentlig amplifikation af mål-DNA'et finder sted.
- 3) For at øge specificiteten og gøre det muligt for et såkaldt 'sandwich assay', vil en DNA-probe med et α -basisk punkt/sted (det vil sige et sted som ikke er et naturligt DNA-molekyle) binde til det amplificerede DNA ved hjælp af Rekombinase. DNA-proben har en blokering i 3'-enden, hvilket forhindrer yderligere forlængelse af det amplificerede DNA.
- 4) Når DNA-proben har bundet til det amplificerede mål-DNA vil Endonuklease IV (nfo) enzymet klippe ved det α -basiske punkt og dermed fraspalte 3'-blokeringen, således at 3'-enden er tilgængelig for polymerasen til yderligere forlængelse

Ved en traditionel 'sandwich assay' metode vil 5'-enderne på både Probe og primer B være påhæftede forskellige mærker (f.eks. biotin eller FAM), hvilket er nødvendigt i detektion af mål-DNA'et ved en lateral flow-test.

BluSense Diagnostics' teknologien er baseret på optisk detektion af magnetiske nanopartiklers evne til at rotere i et magnetfelt, hvilket afhænger af deres hydrodynamiske størrelse. Det amplificerede mål-DNA kan binde til de magnetiske partikler, således at de aggregerer. Den ændrede størrelse af partiklerne og dermed deres rotation måles ved hjælp af lys.

Vi undersøgte tre forskellige strategier til at amplificere og binde mål-DNA'et til de magnetiske partikler ved hjælp af RPA-metoden og derved inducere aggregering.



FIGUR 5. Grafisk fremstilling af RPA-reaktionen.

4.1.3 Strategier for detektion

Vi bruger kommercielt fremstillede magnetiske nanopartikler (Micromod BNF starch, 100nm), der med streptavidin molekyler på overfladen kan danne stærke bindinger til biotin-mærkede molekyler. I RPA-assay'et bindes biotin-mærkede primere og prober specifikke for mål-DNA'et til de magnetiske partikler. De funktionaliserede magnetiske partikler kan hermed specifikt binde til det amplificerede mål-DNA og inducere aggregering af partiklerne.

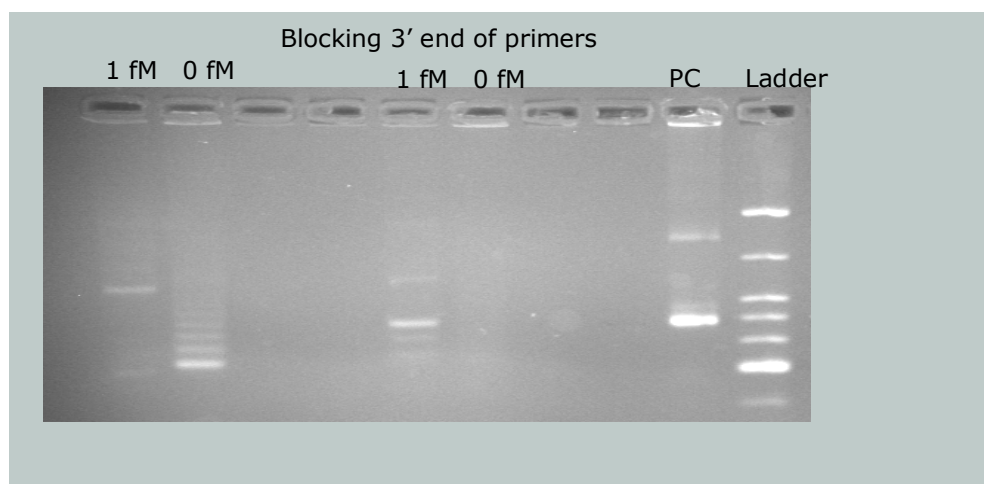
Selve RPA-reaktionen forløber kun ved høje koncentrationer af polyethylene glycol (PEG). PEG gør RPA-reaktionsbufferen meget viskøs, hvilket hæmmer de magnetiske partiklers evne til at rotere i en sådan grad, at rotationen ikke kan detekteres på Bluboksen. Det løste vi ved at fortynde prøven efter endt RPA-reaktion inden selve målingen og som konsekvens kun giver mulighed for en 'end-point' måling.

Vi udviklede RPA-metoden på mål-DNA fra andre mikroorganismer (*E. Faecalis* og *P. Aeruginosa*) end *E. coli* for at undgå kontaminering af fremtidige prøver med amplificeret *E. coli* DNA. På grund af mangel på tid, valgte vi at benytte os af DNA primere og prober som allerede er dokumenteret virksomme (Raja et al., 2017).

Vi undersøgte tre forskellige strategier til at binde amplificeret mål-DNA til partiklerne og fremme aggregering og dermed detektion i BluBox.(I) biotin-mærkede A and B primere (uden brug af probe), (II) primer B og biotin-mærket probe, og (III) biotin-mærket probe. Derudover, undersøgte vi muligheden for at bruge mindre magnetiske partikler (50 nm) til at måle RPA-reaktionen in 'real-time'. De forskellige strategier er beskrevet nedenfor.

4.1.3.1 Strategi I: Biotin-mærkede A og B primere (uden probe tilsat)

Vi brugte to populationer af magnetiske partikler, som var funktionaliseret med henholdsvis primer A og primer B, begge biotin-mærkede. Vi tilføjede ikke probe eller Nfo enzymet. Strategien blev undersøgt med mål-DNA fra *E. Faecalis*. Den negative kontrolprøve viste høj aggregering (data ikke vist), hvilket skyldes forlængelse og amplificering af primer homodimere. Dette ses visuelt som en 'stige' af korte DNA-sekvenser, når prøven undersøges med agarose gel-elektroforese (FIGUR 6, 0 fM (bane 2 fra venstre)). Dette problem løste vi ved at blokere primerne ved 3'enden (FIGUR 6, 0 fM (bane 6 fra venstre)). Imidlertid viste blokeringen at have en uheldig effekt på selve RPA-assayet, idet den positive kontrol viste DNA af flere forskellige længder (FIGUR 6, 1 fM, bane 5) og strategien blev forkastet.



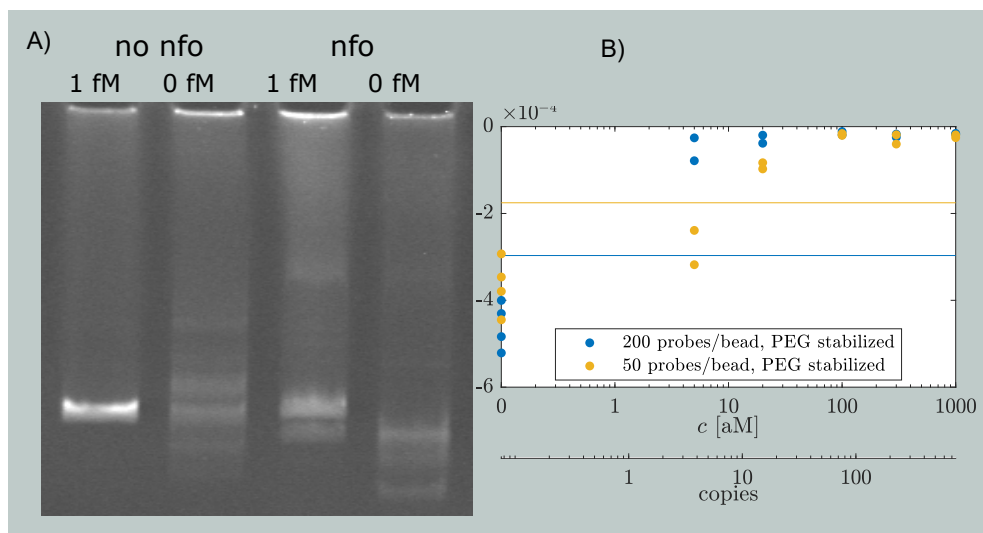
FIGUR 6. Gel-elektroforese af RPA-prøver fra amplificering af *E. Faecalis* DNA på en 4% agarose. PC er en positiv kontrolprøve. "Ladder" er en markørprøve med DNA af forskellig længde.

4.1.3.2 Strategi II: Biotinylated Biotin-mærket probe og primer B

Magnetiske partikler blev ved denne strategi først funktionaliseret med proben og dernæst tilsat RPA-assaybufferen med primer A og biotin-mærket primer B.

RPA-assayet var designet således, at en positiv prøve ville resultere i magnetiske partikler dekoreret med amplifieret dobbeltstrengt DNA med et biotin-molekyle påhæftet i den frie ende. Ved hjælp af magnetisk separation kunne supernatanten med overskydende biotin-mærket primer B fjernes, RPA-produkterne vaskes, og magnetiske partikler med streptavidin på overfladen tilsættes. Streptavidin-mærkede partikler og partiklerne dekoreret med amplifieret biotin-mærket mål-DNA fra RPA-reaktionen ville derpå binde til hinanden og danne aggregater. Strategien blev undersøgt med mål-DNA fra *P. Aeruginosa* and *E. Coli*. Se skematisk fremstilling i FIGUR 5. Prøverne fra RPA-assay med og uden probe og Nfo for *P. Aeruginosa* blev undersøgt ved agarose gelelektroforese inden tilsætningen af streptavidin-mærkede partikler, FIGUR 7A. Når Nfo ikke tilsættes RPA-reaktionen, ses blot et produkt for den positive prøve, idet proben ikke klippes over. Som forventet, når både probe og Nfo tilsættes RPA-reaktionen, ses et ekstra og mindre produkt, da proben binder til amplifieret mål-DNA og derefter klippes af Nfo. Begge negative kontrolprøver viser en mindre grad af produkter af forskellig størrelse. Inden den optomagnetiske måling blev prøverne fra RPA-reaktionen, igen uden streptavidin-mærkede partiklerne tilsat, fortyndet 10 gange.

Den positive prøve for *P. Aeruginosa* viste aggregering allerede efter endt RPA-reaktion og inden de streptavidin-mærkede partikler blev tilsat. På grund af aggregering af partikler i den positive prøve er det optomagnetiske signal ikke detekterbart, mens den negative prøve giver et optomagnetisk signal fra hver af de frie (og dermed roterbare) partikler. Det lykkedes os at optimere funktionaliseringen af de magnetiske partikler, således at vi kunne detektere ned til 5 aM syntetisk fremstillet mål-DNA, hvilket svarer til få kopier (FIGUR 7B). Det gjorde vi blandt andet ved at behandle de magnetiske partikler med biotin-mærket PEG, efter funktionaliseringen med proben, således at frie streptavidin molekyler på overfladen blokeredes. Resultaterne antyder, at den biotin-mærkede primer B kan bryde den ellers stærke binding mellem streptavi-



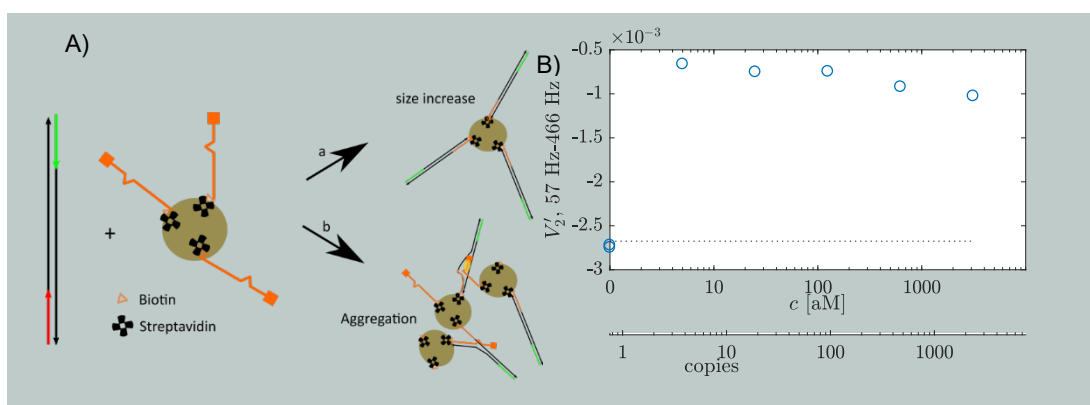
FIGUR 7. A) Gel-elektroforese af RPA-prøver for amplifering af *P. Aeruginosa* DNA med og uden Nfo og probe. B) Dosis-respons kurve for detektion af *P. Aeruginosa* DNA efter 20 minutters reaktionstid og med partikler funktionaliseret med op til 50 (gul) og 200 prober per partikel (blå). X-aksen er logaritmisk inddelt på nær for den negative kontrolprøve (0 aM). De horisontale linier angiver detektionsgrænsen for signalet beregnet som gennemsnitsværdien af de negative kontrolprøver + 3 gange standardafvigelsen

din og biotin på den funktionaliserede partikel, hvilket resulterer i partikler funktionaliseret med

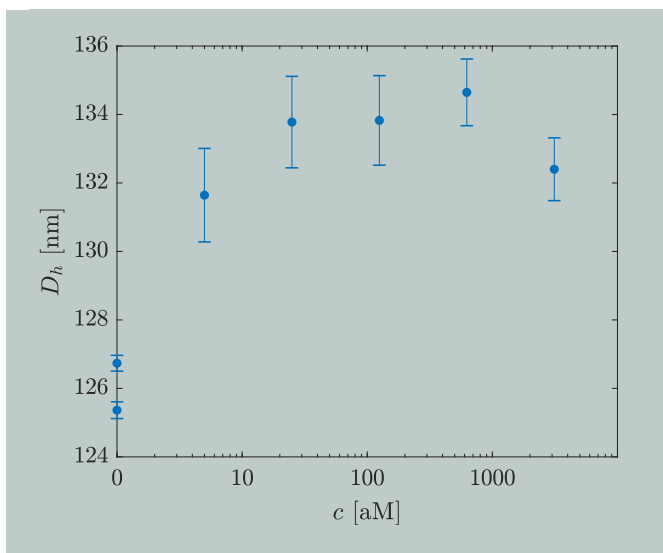
både probe og primer B. Dette understøttes yderligere af det faktum, at ved tilsætning af streptavidin-mærkede partikler til RPA-reaktionen efter magnetisk separation og vask af RPA-produkterne, ses ikke yderligere aggregering. Det vil sige, at der ikke er frie biotin-molekyler tilgængelige på de magnetiske partikler, som kan binde til de streptavidin-mærkede partikler. Ligandudvekslingen resulterede i primer B-funktionaliserede partikler. Hvis sekvensen af primer B imidlertid ikke er designet perfekt, kan det resultere i amplificering af primer homodimerer og give falsk positive resultater, som i tilfældet med primerne for E. Facalis under strategi I og for E. coli under denne strategi.

4.1.3.3 Strategi III: Biotin-mærket probe

Magnetiske partikler blev igen først funktionaliseret med proben og dernæst tilsat RPA-assay-buffere med primere, men for at undgå detektion af homodimere var primer B denne gang ikke mærket med biotin. Vi forventede at kunne se en lille stigning i den hydrodynamiske diameter af de magnetiske partikler efter RPA-reaktionen på grund af dannelsen af dobbeltstrengt DNA på partiklerne (se fig. FIGUR 8A-reaktion a). Vi testede strategien ved hjælp af primere og probe til påvisning af E. coli. Resultaterne viste ikke blot en større hydrodynamisk størrelse (FIGUR 9), men også mangel på frie magnetiske partikler på grund af aggregering. FIGUR 8B viser en dosis-responskurve af det optomagnetiske signal, der viser, at signalet falder på grund af mangel på partikler. Aggregeringen af partikler, selv uden biotin-mærket primer B, kan forklares ved aktiviteten af Rekombinase. Når amplifikationen finder sted, vil proberne på de magnetiske partikler, som forventet, blive klippet af Nfo og forlænget af Recombinase, hvilket giver dobbeltstrengt mål-DNA som vist i **a** i FIGUR 8A. Prober som endnu ikke er bundet til mål-DNA vil være i stand til at binde til dobbeltstrengt mål-DNA på partiklerne med hjælp fra Recombinase, og det vil lede til agglomeration af partiklerne (reaktion **b** i FIGUR 8A). Vi forestiller os, at geometrien af det amplificerede DNA på partiklerne forhindrer nogle prober i at binde perfekt til mål-DNA'et og blive klippet af Nfo. Nfo vil kun identificere og klippe prober, som er perfekt bundet til DNA. Denne strategi er meget enkel, da den kun bruger en type funktionaliserede magnetiske partikler og et begrænset antal trin i modsætning til de to andre strategier. Metoden vil imidlertid ikke være i stand til at kvantificere mængden af E. coli, men blot give et kvalitativt 'ja' eller 'nej' svar på om E. coli er til stede i prøven.



FIGUR 8. A) Grafisk fremstilling af de magnetiske partikler under RPA-reaktionen B) Dosis-respons kurve af E. coli mål-DNA. RPA-reaktionen forløb 20 minutter og prøverne er fortyndet 10x. Kurven er konstrueret under anvendelse af middelværdien af den reelle del af optomagnetisk signal mellem 57 Hz og 466 Hz. Den stiplede linje angiver detektionsgrænsen for signalet beregnet som gennemsnitsværdien af de negative kontrolprøver + 3x standardafvigelsen.



FIGUR 9. Den hydrodynamiske diameter af de magnetiske partikler (D_h) efter endt RPA-reaktion vs. koncentrationen (c) af syntetisk fremstillet E. Coli mål-DNA. Diameteren aflæses som maksimum på kurven af den reelle del af det optomagnetiske signal.

4.2 RPA-detekteringskassette

Vi valgte at integrere strategi III på en detekteringskassette, der kan anvendes i en BluBox. Assayet består af følgende skridt:

1. Tilsætning af prøve
2. Blanding af RPA-reagenser (tørret på kassetten) med prøven
3. Inkubation ved 37 – 42 °C i ca. 20 min mens der lejlighedsvis blandes
4. 5-10 gange fortynding med en buffer (tilsæt kassetten fra start)
5. Måling af det optomagnetiske signal.

Vi udviklede først en RPA-detekteringskassette, der kunne udføre en enkelt RPA-reaktion og måling. Vi udførte nogle indledende forsøg med designet, der så ud til at fungere godt. Men på grund af en meget lang leveringstid på nye RPA-regenser (>3 måneder) kunne forsøgsrækken ikke afsluttes. I ventetiden blev der udviklet anden version af RPA-detekteringskassetten, der kunne udføre og måle op til 6 parallelle RPA-reaktioner. Dette krævede optimering af måle skriptet (rotation frekvenser, temperatur mm.) på BluBoxene før det virkede tilfredsstillende. Det blev hurtigt klart, at vi kom til at mangle RPA-reagenser, som blev bestilt i god tid (2-3 måneder før det skulle bruges), men på grund af ekstra lang leveringstid på RPA-regenserne fra Twist DX (>9 måneder) blev projektafslutningen udskudt igen. Begge RPA-kassettedesign passer til alle BluBox, der findes på markedet.

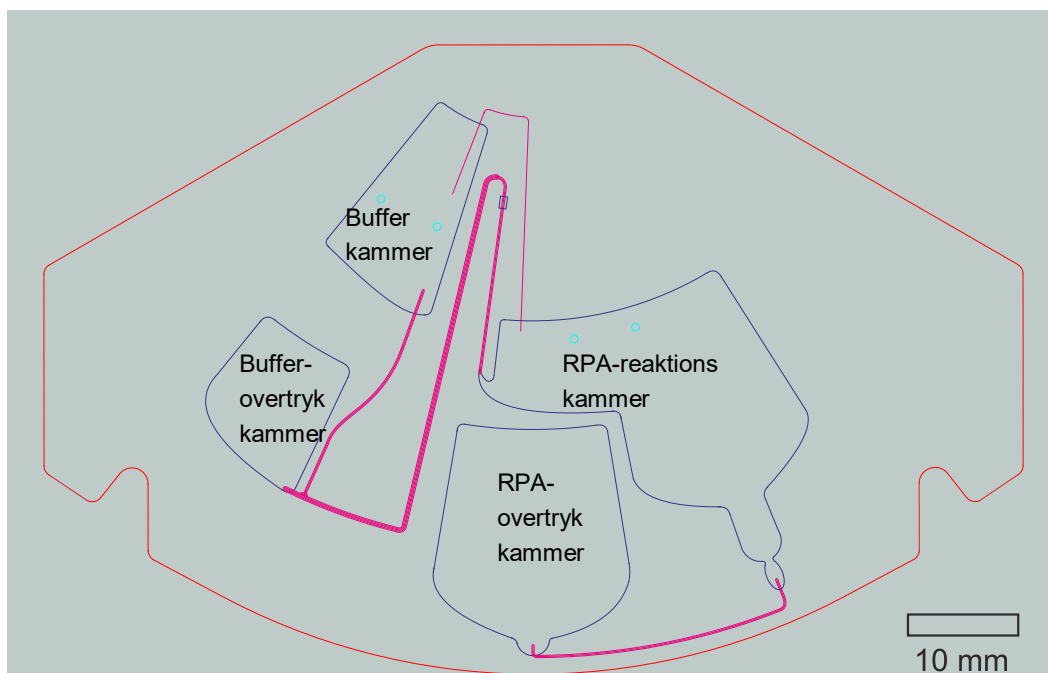
4.2.1 Første version RPA- detekteringskassette

Første version af RPA-detekteringskassetten blev udviklet i samarbejde med en erhvervs-master studerende, der blev vejledt af Jeppe Fock fra BluSense diagnostics og af Mikkel Fougthansen fra DTU Health.

FIGUR 10 viser det endelige design. Bufferen tilføres til bufferkammeret og prøven til RPA-reaktionskammeret. Adgangshullerne bliver forsejlet af PCR-tape, og kassetten indsættes i en BluBox. Når kassetten roteres, presses væsken (buffer og prøve) ned i overtrykskamrene, og når rotationen formindskes, presser trykket væskerne tilbage. Det vil blande væskerne og hjælpe med at opløse tørrede reagenser.

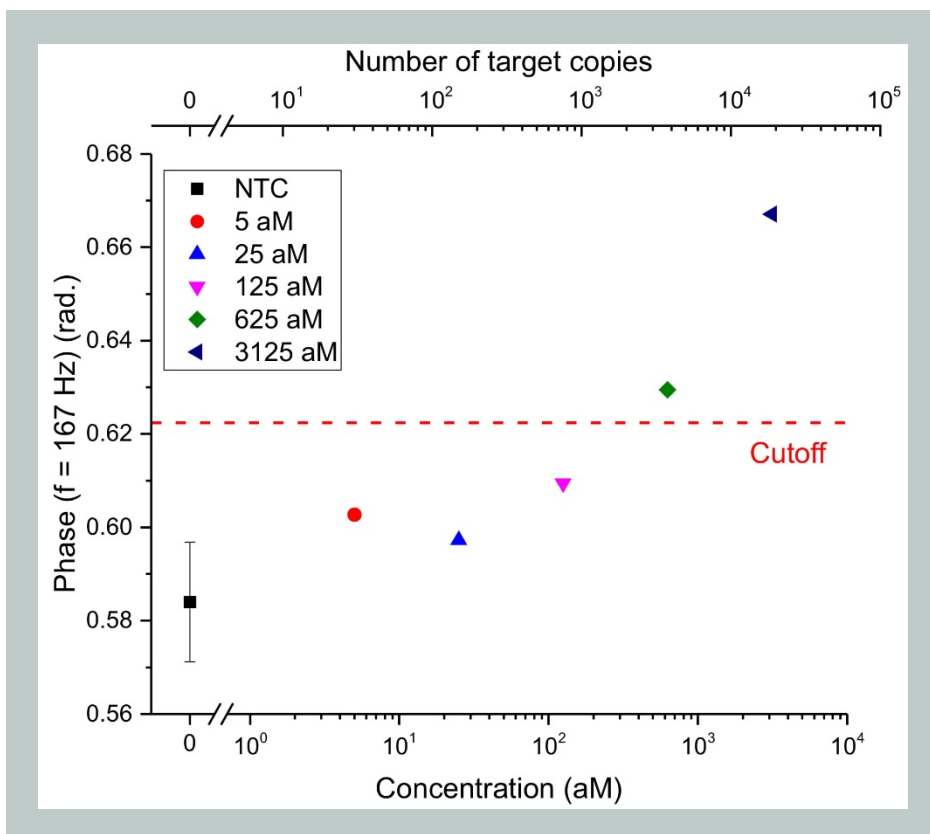
Når ændringen i rotationshastigheden udføres langsomt, vil de hydrostatiske og centrifugale kræfter være i ligevægt, og bufferen vil presses tilbage i buffer-kammeret. Men hvis rotationshastigheden ændres pludseligt fra høj til lav, vil bufferen først og fremmest presses igennem

kanalen med mindst modstand, som forbinder til RPA-reaktionskammeret. Hermed kan buffer-overførelsen kontrolleres ved at udføre langsomme hastighedsændringer indtil overførelsen ønskes.



FIGUR 10. Første version af RPA-detekteringskassetten.

Ved hjælp af dette design var vi i stand til at detektere 625 aM E. Coli DNA (FIGUR 11). Den lavere sensitivitet i kassetten i forhold til i rør er højst sandsynligt på grund af upræcis temperatur i BluBoxen, og ikke optimal blanding af reagenser.



FIGUR 11. Dose respons kurve udført på første version af RPA-kassetten. 625 aM E. Coli. DNA kan detekteres.

4.2.2 Anden version RPA- detekteringskassette

I den anden version af RPA- detekteringskassetten implementerede vi 6 parallelle RPA-reaktioner og udlæsninger. Nogle af de udviklede Micro fluide funktioner er vi i gang at patentere, og vi kan derfor ikke vise designet her. Integrationen af RPA-reaktionerne har været hæmmet af leveringsproblemer for RPA-reagenser. Første del af designet blev udviklet uden adgang til reagenser og først senere valideret med RPA-reaktionerne.

FIGUR 12 viser at med det opdaterede design, har vi en detektionsgrænse på under 25 aM for syntetisk E. Coli DNA. På figuren ses også resultaterne af 3 prøver, der er genereret ved ekstraktion af DNA fra en storvolumen prøve spiket med E. coli og efterfølgende opkoncentreret på HiVoSa.

S1 er en negativ kontrol, hvor 10 liter hanevand er opkoncentreret. S2 er en realistisk drikkevandsforurening (1 E. coli/100 ml), hvor et stort volumen er opkoncentreret og slutvolumet indeholdte 2.257 dyrkbare E. coli. S3 repræsenterer er en høj forurening (23 E. coli/100 ml), hvor det opkoncentrerede slutvolumen indeholdt 23.767 dyrkbare E. coli. Fremgangsmetoden er beskrevet i valideringsafsnittet (**se afsnit 7.1.1**).



FIGUR 12. RPA-reaktioner udført i BluBox. S2 og S3 er vand prøver spiket med E. Coli opkoncentreret og DNA'et ekstraheret (se afsnit 7.1.1). S1 er en opkoncentreret negativ kontrol.

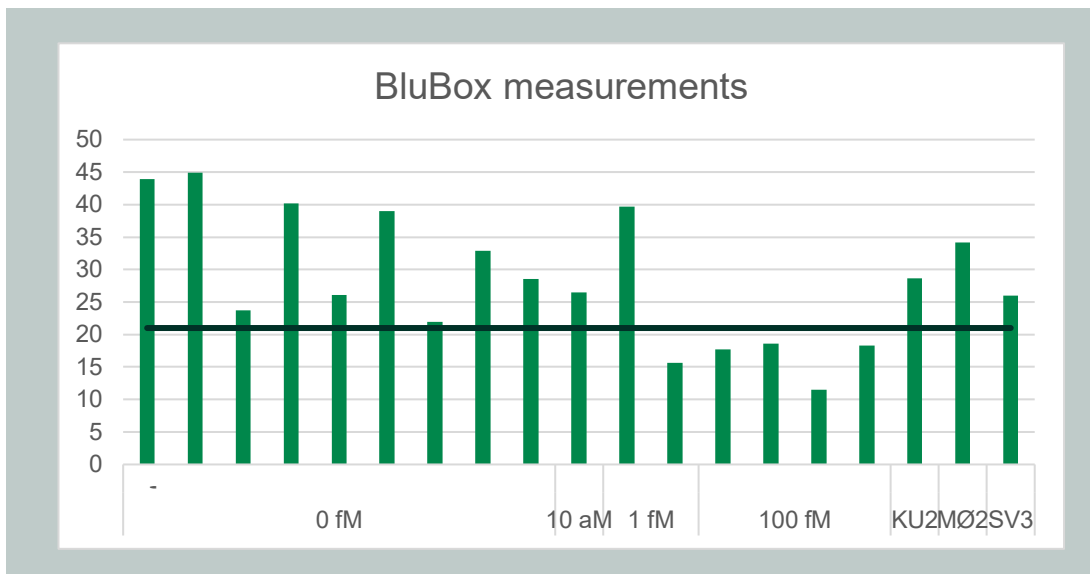
Den sidste batch af RPA-reagenser, som vi modtog i marts 2020, havde lavere reaktiveret end de foregående. Med den batch var vi ikke i stand til at måle E. Coli i S2 prøven ovenfor.

Assayet er testet på 3 prøver udtaget i ledningsnettet hos Kalundborg Forsyning. Til hver prøve er der udtaget 10 liter vand, der er opkoncentreret og DNA herfra ekstraheret. For hver prøve er der udtaget en dobbeltbestemmelse, der ligeledes er opkoncentreret med HiVoSa, men efterfølgende opdyrket med specifikt medie. Der blev ikke målt dyrkbare E. coli i nogle af de 3 prøver (<0,01 E. coli/100 ml). Måling af prøver fra Kalundborg vandforsyning var på grænsen til at blive detekteret som positive med et reference optomagnetisk system (resultaterne ses på FIGUR 13), og en prøve på 1 fM (femtamolær, 10^{-15} mol/L) var tæt på cutoff.



FIGUR 13. RPA-reaktioner udført i reference opto-magnetisk system. RPA-reaktioner af prøver fra Kalundborg vandforsyning (MØ2, SV3 og KU2, se afsnit **Fuld skala, Kalundborg Forsyning** 7.1.2) og af negative kontrol (0 aM) samt positive kontroller (1 fM og 100 fM). Linjen er middelværdien af den negative kontrol minus tre gange standardafvigelsen (3 replikationer).

I tilsvarende målinger i en BluBox var alle prøverne fra Kalundborg vandforsyning negative, men med høj variabilitet af de negative kontroller (FIGUR 14). To prøver med 1 fM syntetisk E. Coli DNA blev målt på BluBox, men kun en gav et positivt resultat.

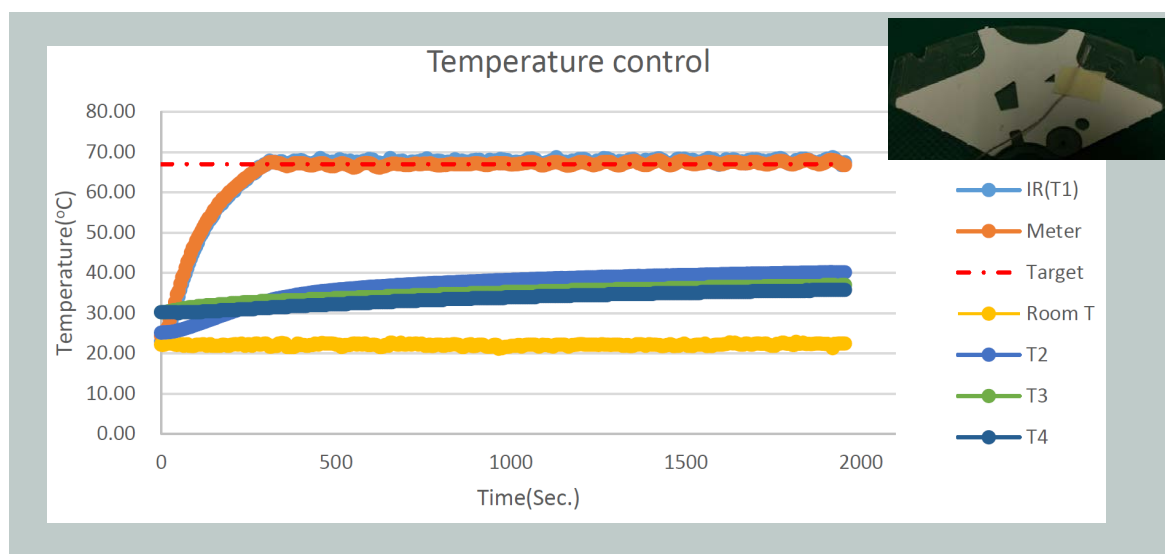


FIGUR 14. RPA-reaktioner udført i en BluBox. RPA-reaktioner af prøver fra Kalundborg vandforsyning (se afsnit 7.1.2) og af negative kontrol (0 aM attomolær) samt positive kontroller (10aM, 1 fM og 100 fM; femtomolær). Cutoff (sort linje) er manuelt defineret for at sikre at alle negative kontroller giver et negativt resultat.

Resultaterne viser, at vi kan detektere E. coli DNA specifikt og med høj sensitivitet i BluBoxe. Vi kan måle 6 prøver parallelt i en enkelt BluBox med en samlet prøvetid på 30 min (5 min pr. prøve). Assayet er dog afhængig af høj kvalitet af de leverede RPA-reagenser.

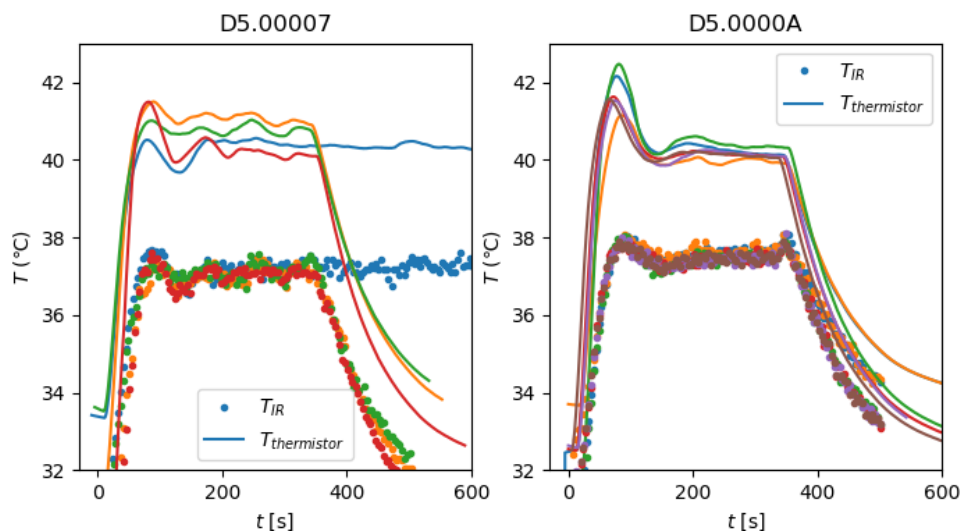
5. Temperaturkontrol i BluBox

For at opnå høj sensitivitet i et RPA-baseret test, kræves det at temperaturen er optimal for den enzymatiske amplifikation af DNA. RPA er en isoterm amplifikationsmetode og kræver ikke hurtig opvarmning og nedkøling som i PCR, men en konstant temperatur omkring 40 °C. Til dette formål har BluSense Diagnostics udviklet et temperaturmodul til BluBox version D5 og frem. Modulet består af en varmeplade og et infrarød (IR) termometer, der måler temperaturen nær positionen hvor det optomagnetiske signal måles. Foruden IR-termometeret er der placeret tre andre termometre i BluBoxen, som kan bruges til at måle temperaturen inden i maskinen. FIGUR 15 viser temperaturmålinger udført, når temperaturen er sat til 70 °C. Det ses, at IR-termometeret giver god overensstemmelse med temperaturen målt inden i kassetten.



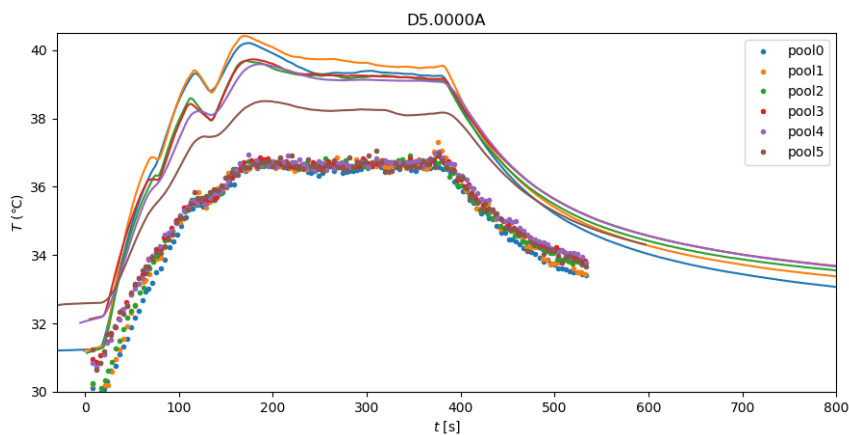
FIGUR 15. Temperaturkontrol sat til 70 °C. IR(T1) og T2, T3 og T4 er målt af BluBoxen. Temperaturen målt inde i kassetten (Meter) nær målepositionen, og rumtemperaturen (Room T) er målt med eksternt apparatur. Billedet viser kassetten brugt til temperaturmålingen.

RPA-reaktionen foregår dog ikke i målekammeret i det endelige design, men længere inde imod centrum af kassetten. For at evaluere temperaturstyringen i RPA-kammeret gentages forsøget nu med en termistor placeret i RPA-kammeret og med temperaturkontrollen sat til 37 °C hvorved RPA kan foregå. I FIGUR 16 kan vi se, at BluBoxen stabilisere sig på ca. 40 °C efter kortvarigt at overskride op til ca. 42 °C. Forskellen på den indstillede temperatur og den målte temperatur skyldes en temperaturgradient på varmepladen i BluBoxen, og da temperaturen bliver kontrolleret i kanten af pladen, hvor målekammeret er placeret, er temperaturen højere i centrum af kassetten. FIGUR 16 viser god overensstemmelse mellem to forskellige BluBoxe, og repeatabiliteten mellem gentagende målinger er høj.



FIGUR 16. Temperaturkontrol sat til 37 °C. T_{IR} er målt af BluBoxen og Thermistor er målt med eksternt apparatur. Ved tiden $t = 0$ aktiveres temperaturkontrollen til 37 °C og efter 390 s slukkes temperaturkontrollen. De forskellige farver er gentagende målinger. Målingerne blev ud ført i 2 forskellige BluBoxe (D5.00007 og D5.0000A).

I kassetten er der 6 parallelle RPA-reaktionskamre med tilhørende målekamre. FIGUR 17 viser temperaturvariationen på tværs af de seks RPA-kamre målt med en termistor i individuelle forsøg. Det kan ses, at et af de yderste kamre (pool5) har en signifikant lavere temperatur sammenlignet med resten af kamrene. Det vil betyde at sensitiviteten i "pool5" vil være lavere end i resten af kassetten, fordi temperaturen ikke vil være optimal for RPA-reaktionen.



FIGUR 17. Temperaturkontrol @ 36 °C. p er målt af bluboxen og "Thermistor" er målt med eksternt apparatur. Ved tiden $t = 0$ aktiveres temperaturkontrollen til 37 °C og efter 390 s slukkes temperaturkontrollen. De forskellige farver er målinger i forskellige RPA-reaktions kamre på kassetten (Pool0 til Pool5).

6. Integration

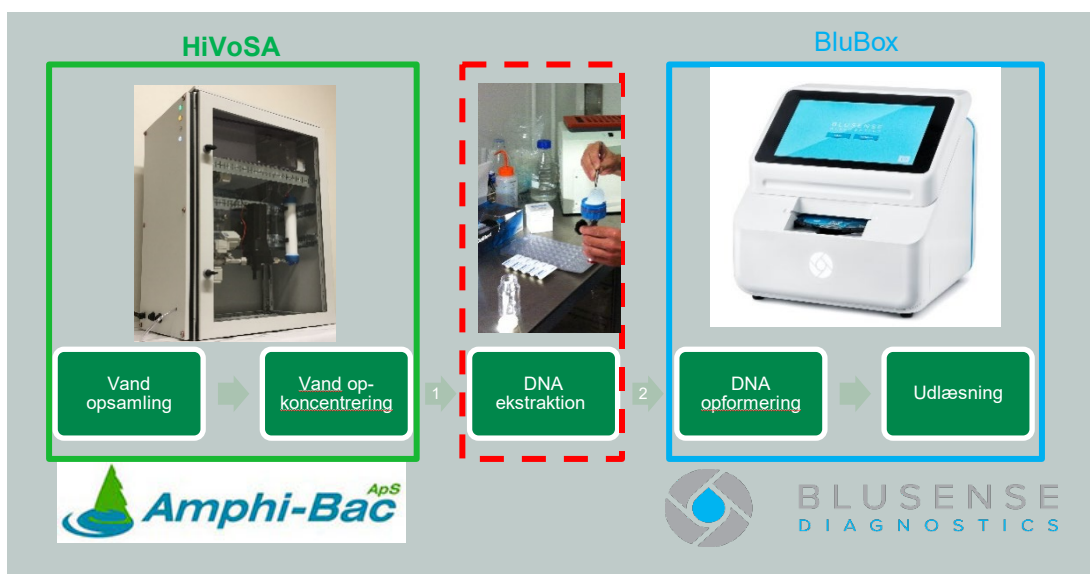
6.1 E. coli detektion fra vandprøve til resultat

Først bliver en vandprøve opsamlet og dernæst bliver den opkoncentreret. Amphi-Bac har i dette projekt udviklet et produkt (HiVoSa) til automatisk prøvetagning og opkoncentrering af storvolumenprøver. HiVoSa opkoncentrerer alle bakterierne fra den store vandprøve i en suspension på 100 ml, der kan håndteres i laboratoriet.

Efter op-koncentrationen bliver de 100 ml overført til DNA ekstraktionsprocessen. DNA ekstraktionsprocessen har ikke været en del af dette projekt. DNA-ekstraktionen blev udført ved først at filtrere de 100 ml i et nylon filter via Dead-End filtrering, hvorefter DNA-oprensning er blevet udført med et kommercielt tilgængeligt kit (DNeasy PowerWater, Qiagen) i et laboratorium. Efter DNA-ekstraktionen er volumen af prøven reduceret til 100 µl, og udgøres nu af DNA fra alle de bakterier, der fandtes i storvolumenprøven.

For hver test bliver 10 µl af det ekstraherede DNA (prøve af 100 µl) overført til en RPA-kassette med en pipette. Seks tests kan udføres parallelt på en RPA-kassette. RPA-kassetten indføres i en BluBox og testen startes på skærmen. Først bliver prøverne blandet med RPA-reagenser og isotherm DNA-amplifikation bliver udført i BluBoxen. Dernæst bliver RPA-reaktionen fortyndet og den optomagnetiske udlæsning viser, om der er blevet detekteret E. coli DNA i prøven.

På FIGUR 18 er processen fra prøveudtagning til analysesvar illustreret med opdeling i 5 moduler.



FIGUR 18. E. coli. detektion processen opdelt i fem moduler. DNA ekstraktionsmodul imellem den opkoncentrerede prøve og DNA opformeringen i BluBox er ikke automatiseret i dette projekt.

I dette projekt har Amphi-Bac automatiseret vandprøvetagning og vand-opkoncentrering samt integrationen imellem dem i et samlet modul. Og BluSense Diagnostics har automatiseres DNA-amplifikation og udlæsning i et andet modul (en BluBox med tilhørende RPA-kassette). Vi har i dette projekt ikke automatiseret DNA ekstraktionsprocessen. Der findes flere kommercielt til-

gængelige løsninger, der kan automatisere DNA-ekstraktionen. I det nedenstående er det beskrevet, hvordan sådanne løsninger kan integreres med vores systemer. Derudover er der i litteraturen flere eksempler på DNA-ekstraktion på en mikro-fluid platform.

6.2 DNA-ekstraktion

6.2.1 Kommercielt tilgængelige løsninger.

TABEL 4 viser et udvalg af kommercielt tilgængelige produkter for automatiseret DNA-ekstraktion. Alle løsninger baserer sig på velkendte laboratorie teknikker, og i mange tilfælde ved brug af magnetiske mikro partikler til oprensning. Automatiseringen udføres med en pipetterobot eller ved at flytte de magnetiske partikler mellem forskellige opløsninger med en magnet. Maskinerne bruger typisk 40-80 minutter til DNA-oprensningen.

TABEL 4. Kommercielt tilgængelige DNA-ekstraktion løsninger.

Instrument	Producent	#samples	Max volumen
Chemagic™ 360 Nucleic Acid Extractor	PerkinElmer	12	10 ml
AnaPrep 12/24 Automated Nucleic Acid Preparation Instrument	BioChain	12/24	1 ml
Maxwell RSC/ FSC (48) Instrument	Promega	16 / 48	0,4 ml
MagNA Pure 96 Instrument	Roche	48	1 ml
KingFisher Presto/Flex/Duo Prime	ThermoFisher	24/24/6	5 ml
QIAcube Connect	Qiagen	12	1 ml

De fleste løsninger kræver manuel indsætning af prøver. "KingFisher Presto" og "Chemagic™ 360 Nucleic Acid Extractor" kan dog integreres med en væske/pipette-robot.

6.2.1.1 Integration af modulerne

Aftapningen af den opkoncentrerede prøve fra HiVoSa styres via udstyrets indbyggede PLC, hvilket kan automatiseres og integreres med en af DNA-ekstraktions maskinerne (TABEL 4). Efter ekstraktion, kan en pipetterobot overføre det oprenset DNA til en RPA-kassette. For at indsætte RPA-kassetten i en BluBoxenen kræver det et manuelt skridt i processen. Alternativt kan en "pick-and-place" robot bruges til formålet. Et sådanne samlet system vil være udgiftstungt på grund af udgifterne til automatisk DNA-ekstraktion, pipetterobotten samt en "pick-and-place" robot.

7. Validering

Det samlede system med opkoncentrering og udlæsning af resultater i BluBox er valideret under kontrollerede forhold i laboratoriet samt i fuld skala hos Kalundborg Forsyning i en almindelig drifts situation.

7.1.1 Laboratorie test

Funktionen af det samlede system er testet i laboratoriet. En stor spikebeholder blev fyldt med hanevand og spiket med en ren kultur af *E. coli*. Forsøget blev gentaget to gange med forskellige koncentrationer af *E. coli* samt en blindprøve. Til det ene forsøg blev beholderen spiket med en lav koncentration af *E. coli*, der svarede til en realistisk drikkevandsforurening i dansk drikkevand (1 *E. coli*/100 ml). Til det andet forsøg blev beholderen spiket med en høj koncentration af *E. coli* (ca. 20 *E. coli*/100 ml). Vandet fra spikebeholderen blev først opkoncentreret med HiVoSa til et slutvolumen på 200 ml. En delprøve af opkoncentratet blev dyrket for at bestemme koncentrationen af *E. coli* i koncentratet, hvorefter den resterende del af prøven blev filtreret og DNA herfra oprenset med DNeasy Power Water kittet. Det opkoncentrede DNA blev opdelt i to prøver, hvor den ene prøve blev analyseret med Q-PCR som kontrol (et assay designet til Total *E. coli*), mens den anden delprøve blev analyseret med RPA-assayet i BluBox.

Resultaterne af valideringen i laboratoriet viste, at det er muligt at opkoncentrere *E. coli* i lav koncentration fra en drikkevandsprøve og få et signal med RPA-assayet udlæst i BluBox, der adskiller sig signifikant fra blindprøven.

7.1.2 Fuld skala, Kalundborg Forsyning

Metoden er valideret hos Kalundborg Forsyning. Der er gennemført 3 prøvetagningsserier i ledningsnettet hos Kalundborg Forsyning, hvor der i hver prøvetagningsserie er udtaget mellem 6 og 14 storvolumen prøver (10 liter) ved udvalgte centrale knudepunkter (i alt blev der udtaget 30 10-litersprøver over de 3 prøvetagningsserier). De udtagne prøver er opkoncentreret med HiVoSa, hvorefter koncentratet er analyseret med et specifikt medie til coliforme og *E. coli* (Colilert, IDEXX). Foruden de kvantificerede prøver, er der flere steder udtaget duplikater af prøverne, hvor DNA er blevet ekstraheret fra prøven. Prøverne til DNA-ekstraktion er ekstraheret med DNeasy Power Water kittet som er beskrevet i afsnit 6.1.

Der blev ikke detekteret *E. coli* i nogle af de i alt 30 storvolumen prøver (<0,01 *E. coli*/100 ml). Det ekstraherede DNA er blevet testet i en BluBox. Ingen af prøverne gav et positivt resultat i BluBox, hvilket stemmer overens med resultaterne af de opdyrkede prøver, hvor der heller ikke kunne detekteres *E. coli*.

8. Konklusion

Det er muligt at opkoncentrere antallet af E. coli i en lav drikkevandsforurening til en koncentration, der kan detekteres med RPA-assayet.

Det er muligt at opkoncentrere meget store vandprøver så hurtigt at metoden til detektion af E. coli i drikkevand kan udføres indenfor få timer fra prøveudtag til resultat.

Detektion af E. coli DNA ved hjælp af RPA og optomagnetisk udlæsning var muligt med en detektions grænse ned til få attomolær (aM, 10^{-18} mol/L), men RPA-assayet er afhængig af leverance og kvaliteten af RPA-reagenser. Der er kun én enkelt udbyder af RPA-reagenser, der har vist sig at have usikre leveringstider.

Integration af opkoncentreringen fra Amphi-Bac og den optomagnetiske udlæsning fra BluSense Diagnostics er teknisk muligt med kommercielle tilgængelige produkter.

Den samlede løsning blev valideret med prøveudtagning på Kalundborg Forsyning. Der blev ikke detekteret E. coli (<0,01 E. coli/100 ml) i nogle af de udtagne prøver.

Referencer

- [1] *Guidelines for Drinking-Water Quality*, 4th edition, 2017. In World Health Organisation (WHO).
- [2] RÅDETS DIREKTIV 98/83/EF af 3. november 1998 om kvaliteten af drikkevand
- [3] Drikkevandsbekendtgørelsen, BEK nr 524 af 01/05/2019
- [4] *Coliform bacteria and E. coli in drinking water. Comparison of EU reference method with alternative methods*. Danish Environmental Protection Agency 2007
- [5] VAND I TAL 2019, DANVA
- [6] Håndtering af overskridelser af de mikrobiologiske drikkevandsparametre, VEJ nr 9095 af 18/03/2013
- [7] Global Residential Drinking Water Treatment Equipment Market 2016-2020, <https://www.technavio.com/report/global-water-and-waste-management-residential-drinking-market>
- [8] THE WORLD'S WATER, Total Renewable Freshwater Supply, by Country www.worldwater.org/datav7/data_table_2_freshwater_withdrawal_by_country_and_sector.pdf
- [9] Minero, G. A. S.; Nogueira, C.; Rizzi, G.; Tian, B.; Fock, J.; Donolato, M.; Strömberg, M.; Hansen, M. F. Sequence-Specific Validation of LAMP Amplicons in Real-Time Optomagnetic Detection of Dengue Serotype 2 Synthetic DNA. *Analyst* 2017, 142, 3441–3450.
- [10] Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L., & Armes, N. A. (2006). DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biology*, 4(7), e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
- [11] Lobato, I. M., & O'Sullivan, C. K. (2018). Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 98, 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
- [12] Islam, M. S., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. R. (2017). A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/mi8030083>
- [13] Robert W. Baber, Marco Donolato, Mikkel F. Hansen, and Jeppe Fock. "Integration of isothermal molecular amplification with centrifugal microfluidic platform and nanoparticle based optomagnetic readout for detection of E. coli" *MicroTas 2019, Basel*

Detektion af E. coli bakterier med modulært system

Formålet med dette projekt er at udvikle en løsning til hurtig detektion af E. coli fra et stort vandvolumen. Løsningen består af to modulære dele til følgende processer:

- Opkoncentration af DNA i vand
- Detektion af E. coli DNA ved brug af isoterm DNA opformering og optomagnetisk udlæsning

Projektet viste, at det er muligt at opkoncentrere antallet af E. coli i en lav drikkevandsforurening til en koncentration, der kan detekteres med RPA-assayet.

Detektion af E. coli DNA ved hjælp af RPA og optomagnetisk udlæsning var muligt med en detektionsgrænse ned til få attomolær (aM, 10⁻¹⁸ mol/L), men RPA-assayet er afhængig af leverance og kvaliteten af RPA-reagenser.

Den samlede løsning blev valideret med prøveudtagning på vandforsyning. Der blev ikke detekteret E. coli (<0,01 E. coli/100 ml) i nogle af de udtagne prøver.



Miljø- og Fødevarerministeriet
Tolderlundsvej 5
5000 Odense C

www.mfvm.dk