

## Rapport

DiarienummerProjektnummerNV Rapport 2024-010022 Flödesvirometri

# Flödesvirometri

Utvärdering av flödesvirometri för detektion av virus

Mikael Danielsson och Linda Holmer Norrvatten

2024-02-26



## Bakgrund

Ytvatten utsätts kontinuerligt för fekal kontaminering och Norrvattens laboratorium analyserar idag rutinmässigt koliforma bakterier med speciellt fokus på *Escherichia coli* för att upptäcka sådan kontaminering i Görväln. Norrvatten har däremot i dagsläget inga analyser för detektion av virus. Att kvantifiera virusreduktion är önskvärt i den nya UF-piloten inför NFVP. Det finns några olika tilltänkta analysmetoder för detta. Allra bäst är att analysera naturligt förekommande virus och inte behöva tillsätta stora mängder av det (spikning) för att se avskiljningsgraden. I denna rapport utvärderas möjligheten att analysera avskiljningsgrad av virus med flödesvirometri.

Flödescytometri på Norrvatten är en snabb DNA-baserad analysmetod som kan kvantifiera bakterieantal utan odling (Prest et al. 2013; Buysschaert et al. 2018; Vital et al. 2012; Hammes et al. 2008). Cellers nukleinsyror (främst DNA) infärgas med fluorescerande kemikalier och en laser används sedan för att bestråla flödet av celler (Wang et al. 2010; Muirheadi et al. 1985). Metoden kan användas för att analysera dricksvatten under behandling och i distributionsnätet (Schleich et al. 2019; Gillespie et al. 2014; Prest et al. 2013; Chan et al. 2018). Norrvatten har sedan tidigare två stationära flödescytometrar (BD Accuri C6+, New Jersey USA) samt en online-flödescytometer (BactoSense, Sigrist, Schweiz).

Med start 15:e mars 2023 hyrde Norrvatten en flödescytometer (Micro-PLUS flow cytometer) av Apogee Flow Systems Ltd. En "traditionell" flödescytometer kan detektera bakterieceller och större partiklar. Detta instrument tillverkat av Apogee Flow är specialiserat på att detektera små partiklar och har visats användbart för viruspartiklar (Ricci et al. 2021; Safford & Bischel 2019; Lippé 2018; Vlasak et al. 2016). Detektion av virus är dock en större utmaning än detektion av bakterier. Infärgningsmetodiken måste anpassas och det ställs högre krav på elektroniken för att detektera så små partiklar. En flödesvirometer skiljer sig från en flödescytometer på flera sätt (Lippé 2018):

- Kraftigare laser; Apogees virometer är utrustad med laser upp till 300 mW (jämfört med flödescytometrar som har standard blå laser (488 nm, 20 mW) och röd laser (12,5 mW). Apogees virometer kan ha upp till 4 lasrar monterade samtidigt och nuvarande val är: 375, 405, 488, 532, 552, 561, 635 nm.
- Reducerad wide angle forward light scatter (FSC); Apogees instrument har tre valbara FSC. Standard för flödescytometrar är att fånga ljus som emitteras i vinkel 0,5° 15° medan virometrar blockerar dessa och fångar i stället ljus med 15 70° vinkel. Detta i syfte att reducera noise ("falska positiva detekterade events").
- Tätare sheath fluid filter; Vätskan som matas in i provflödet filtreras genom 0,1 µm för att bättre avskilja partiklar (jämfört med BD Accuri C6+ 0,45 µm filtrering).

#### Allmänt om virus

Virus är små, intracellulära parasiter. De består av arvsanlag i form av olika varianter DNA eller RNA. Detta arvsanlag samt grundläggande proteiner omges av ett symmetriskt proteinhölje. Enveloped virus är dessutom omgett av ett lipid bilayer förstärkt av glykoproteiner (Figur 1). Virus, eller virioner som det kallas när viruspartiklar är kompletta och utanför celler, finns i olika varianter. De behöver alla värdceller för att kunna föröka sig (Gelderblom). Virus återfinns överallt i naturen och olika typer har ofta specifika värdceller. En del är växtvirus medan andra är ännu mer specialiserade mot individuella arter av bakterier eller animalceller. Virioners funktion är att infektera målorganismen som sedan kapas att producera fler virus med sin komplexa metabolism. Humanvirus är de virus som potentiellt kan orsaka sjukdom och smitta hos människor. Morfologiskt kan virus se väldigt olika ut, till exempel kan de vara nakna (non-enveloped) eller höljebärande (enveloped). Deras arvsanlag skiljer sig starkt emellan olika typer, de kan bära på DNA (enkelsträngat eller dubbelsträngat) eller RNA (enkelsträngat eller dubbelsträngat). Non-enveloped virus är oftast mer virulenta (sjukdomsframkallande) än enveloped virus (Virology Research Services, 2022). Virus kan ta sig in i celler på olika sätt, genom till exempel membranfusion eller att skapa en por i membranet och komma in genom denna.



Figur 1. Modifierad från Sakudo et al. 2011. Skiss över enveloped virus (svenska: höljebärande virus) och non-envleoped virus (svenska: nakna virus).

Skillnaden mellan DNA- och RNA virus är ganska komplex. Figur 2 visar olikheter mellan och inom virusgrupperna. DNA virus är vanligen dubbelsträngat (dsDNA) och replikerar sig i värdcell genom DNA-beroende DNA polymeras. RNA virus är oftast singelstranded (ssRNA) och grupperas som positiv-sense (ssRNA(+)) eller negativ-sense (ssRNA(-)). DNA kopiering sker inuti värdcellens cellkärna medan RNA kopiering sker utanför cellkärnan, dvs i värdcellens cytoplasma (Durmuş och Ülgen, 2017). Figur 2 illustrerar indelningen av DNA- och RNA virus.



*Figur 2. Modifierad från The Bioss Blog och Pearson Education Incorporated. DNA- och RNA virus klassificering och transkriberingssätt för proteinsyntes.* 

För att med flödescytometri och flödesvirometri kunna detektera små partiklar/celler i provet på ett bra sätt behöver provet ha någon typ av fluorescens. I de flesta fall används infärgning av vattenprovet. För Norrvattens bakterieanalyser används SYBR Green I (SG) och Propidium Iodide (PI) som båda två binder till främst dubbelsträngat DNA. Att färga in virus är svårare eftersom de är mindre, ofta inte har dubbelsträngat DNA som arvsanlag och har ytstrukturer som kan blockera molekyler för infärgning. Instrumentets olika lasrar och detektorer varieras för att kunna upptäcka olika våglängder och intensitet av emission från provet. Baserat på en sökning i litteraturen så finns det flera olika infärgningar som är kompatibla med virus och Norrvatten kan med fördel testa ett antal olika. Till skillnad från flödescytometri så kan det komma att krävas en ordentlig screening för de partiklar som finns i till exempel reagenser, bufferten och naturligt i vårt vatten. Det är viktigt att säkerställa att instrumentet kan särskilja virus från diverse partiklar som finns i vattnet. I denna rapport testas olika tekniker och kemikalier för infärgning av virala partiklar.

Fluorescerande små beads, likt de som används vid QC, söktes. Dessa beads bör ha en känd storlek som är jämförbar mot virus och en fluorescens som kan detekteras med instrumentet. Ingen försäljare hittades dock som tillverkade beads så små som vissa virus. Partikelstorlek 110 nm var den minsta som hittades, vilket inte är tillräckligt nära porstorleken i UF-membran (Tabell 1).

Particle Size (nm)	Fluorescence from violet or blue excitation	
110	Green	
180	None	
240	None	
300	None	
500	Green	
590	None	
880	None	
1300	None	

Tabell 1: Kalibreringsbeads för flödescytometri/-virometri.

STATUS: Running Sample					
Control	Service	Gain	PMT	Thresholds	Info
Lasers	Comp				
☐ 40 ☑ 63 ☑ 48	95nm 98nm 98nm		00 mW 00 mW 00 mW		

Figur 3: Laserinställningarna vi använde på Apogee's instrument.

#### Infärgningar

För infärgning av virala partiklar testades ett antal olika metoder. Nedan listas infärgningarna och några nyckelegenskaper.

INFÄRGNING nukleinsyra	Excitaiton (nm)	Emission(nm)	Violett laser 405 nm*	Blå laser 488 nm	FITC** (em 400-490 nm) (grön fluorescence)
SYBR Green I	497	520		х	х
SYTO 13	491, 488	514, 509		х	Х
SYTO RNASelect	490	530		х	x

\*Flurophorer till denna laser; Pacific Blue, Pacific Orange och Brilliant Violet. \*\*PMT inställning FVM.

SYBR Green I (SG). Färgar in främst dubbelsträngat DNA. Bindningsaffinitet till enkelsträngat DNA är 11 gånger lägre och ännu lägre för enkelsträngat RNA. Penetrerar cellmembran med hjälp av sin lilla storlek. Excitationsmax är blått ljus med 488 nm våglängd. Emissionsmax är grönt ljus 533 nm. Figur 4. SG har visats fungera för en del virus (Brussaard 2004).

Propidium Iodide (PI). Färgar in främst dubbelsträngat DNA. Stor molekyl som inte kan penetrera intakta ytstrukturer, används därför i kombination med SG för att detektera intakta

celler. Om "PI" anges i denna rapport är det alltså en mix av både SG och PI. Excitationsmax är blått ljus med 488 nm våglängd. Emissionsmax är rött ljus 670 nm.



Figur 4: Excitations- och emissionspektrum för SG och PI.

SYTO 13. Cellpermeabel infärgning som har visats färga in genomet hos virus med kapsel. Liknande egenskaper som SG. Excitationsmax är blått ljus med 488 nm våglängd. Emissionsmax är grönt ljus 509 nm (Figur 5).



Figur 5: Syto13 excitations- och emissionsspektrum i nanometer. Streckad kurva är excitation och helfärgad kurva är emission.

SYTO RNA-Select. Färgar specifikt in enkelsträngat RNA. Ger en mycket svag fluorescens vid inbindning till DNA. Excitationsmax är blått ljus med 490 nm våglängd. Emissionsmax är grönt ljus 530 nm (Figur 6).



Figur 6: Syto RNASelect excitations- och emissionsspektrum i nanometer. Streckad kurva är excitation och helfärgad kurva är emission.

MS2 bakteriofager för detta projekt beställdes från NMBU (Norges miljö- of biovitenskapelige universitet). En koncentrerad lösning av MS2 skickades till Norrvatten och anlände 24:e januari 2023. Dessa fager användes i flödesvirometri mars – maj. Ett spikningsförsök gjordes i dåvarande UF-pilot i samarbete med SLV (Nationellt Beredskapslaboratorium för mikrobiologiska vattenanalyser, NBV) med samma MS2-lösning i augusti 2023. NMBU estimerade MS2-koncentrationen till 2,9 \* 10<sup>10</sup>/ml men poängterade att titern kan falla något under transport. SLV:s ddPCR uppmätte snarlik 3,1 \* 10<sup>10</sup> kopior/ml 7 månader senare. Men SLV:s plaque-analyser indikerade en relativt låg andel infektiösa fager, ca 7,3 \* 10<sup>6</sup>/ml. Estimerad hållbarhetstid är därför några månader i kylskåp. MS2-fager är en relevant virustyp att experimentera med eftersom den har liknande storlek som norovirus och övriga egenskaper som ytstruktur och arvsanlag inte skiljer den alltför mycket åt.

#### Genomförda analyser

Nedan följer en punktlista över lärdomar som gjorts. Relevanta analyser i form av dot-plots som gjordes för att dra dessa slutsatser hänvisas till. De benämns som "A" (för "analys") med en efterföljande sifferordning.

X-axeln visar MALS (Medium Angle Light-Scatter).

Y-axeln visar intensitet av fluorescens med våglängd 488 nm (grönt ljus).

Varje punkt är en detekterad event, alltså en partikel eller cell eller liknande.

Röda området är den manuellt satta ROI (Region of Interest), motsvarigheten till flödescytometerns Gating. Röda event-counts i nedre vänstra hörnet är kopplat till ROI och eftersom ROI varierar genom dokumentet så är det logiskt att titta på relativa förändringar/förekomst av kluster.

Likt analyser med flödescytometri så kan man "gatea bort" partiklar som uppkommer från MQ-vatten (dubbelt avjonat). Dessa detekterade events kan alltså särskiljas från partiklar av faktiskt intresse i prover. Figur A1

Ett prov med MQ-vatten med tillsats av SG eller PI gav upphov till ett kluster av events utanför ROI. Detta indikerar att fluorescerande infärgning som inte binder till något kan orsaka mycket Background i virometern. Figurer A2.



Flödesvirometern kan, precis som flödescytometern, detektera naturligt förekommande bakteriekluster i dricksvatten efter infärgning med SG. Spikning med uppodlade rena bakteriestammar detekteras även det på ett tydlig sätt. Figurer A3.

Råvatten infärgat med SG ger upphov till högre TCC och fler events utanför ROI, vilket är att förvänta sig jämfört med dricksvatten. Figur A4.



Infärgning som riktar sig på nukleinsyror sker snabbt. DNA mättas snabbt av fluorescerande molekyler och är inte speciellt temperaturberoende. SG-infärgning gav liknande antal events i ROI oavsett om det inkuberats i 22°C eller 37°C. På samma sätt var antal events liknande oavsett om det inkuberats i 15 minuter, 1 timme eller 24 timmar. Antalet events utanför ROI sjönk radikalt med ökad inkubationstid. Figurer A6 och A7 samt Figur 7.





A6: Dricksvatten (pp208) infärgat med SG i rumstemperatur under 15 min, 60 min samt 24 timmar.

A7: Dricksvatten (pp208) infärgat med SG i 37°C under 15 min, 60 min samt 24 timmar.



Figur 7: PP208, 160 och 140 med SG-infärgning. Antal events som detekterats inom ROI men även utanför (totala antalet events) efter inkubation i 15 minuter, 60 minuter samt 24 timmar i 22°C respektive 37°C.

Tillsats av humussyror ger upphov till höga antal events, både infärgade och ofärgade prover. Figur A8.



Dricksvatten infärgat med RNASelect presenteras i Figur A9. Denna typ av infärgning ger events vid högt MALS, delvis inom ROI. Det är dock svårt att urskilja om det är ett separat kluster eller om det är förlängning av background. Figur A10 presenterar MQ med spikning av HPC-koloni. Det är tydligt att bakterieceller blir infärgade med RNASelect, vilket är logiskt. Klustret av events hamnar dock inte på samma ställe som SG/PI, vilket indikerar en annorlunda fluorescensintensitet och våglängd. Dessa resultat stämmer överens med tidigare forskningsresultat och litteratur. Figur A11 är vatten från SF12 som färgats in med RNASelect, upphettats till 80°C och filtrerats genom 0,45 µm. Detta visar att de events som detekteras vid högt MALS och låg fluorescens-intensitet har en mindre storlek än 0,45 µm samt inte bryts ned ytterligare vid upphettning eftersom de kvarstår. Klustret av events är dock lite svårläst, troligtvis pga att de är nära detektionsgränsen för instrumentet.



SF12 upphettades till ca 80°C, vilket gav ett kraftigt förändrat fingeravtryck efter infärgning. Detekterade events i dot-plot är mycket låga, nära kategorin Noise. Detta indikerar en lägre intensitet av fluorescens, sannolikt pga att cellerna fragmenterats. Figur A13. Om man filtrerade provet genom 0,45 µm försvann mycket av de eventsen. Totala antalet detekterade events ökade efter filtrering, vilket indikerar att infärgningen i sig ger upphov till events om det förblir obundet. Detta understryker vikten av att tillämpa rätt mängd infärgning till prover. Tillsats av MS2-lösning gav inte upphov till några events inom ROI men skiftade däremot background till ett annorlunda kluster (Figur A14).



SG och Syto13 färgar in vattenprover på ett mycket lika sätt. De indikerar båda två dubbelsträngat DNA men har också viss ospecifik infärgning. Figur A15.



MS2-fager kunde inte detekteras på ett tillförlitligt sätt, vilket var förväntat eftersom Apogee förvarnat att instrumentet har svårt att mäta partiklar mindre än 100 µm. MS2-fager är oerhört små (27 nm), även relativt till andra virus. En mängd olika infärgningar och fixeringar testades. MS2-lösning som inte filtrerats på Norrvattens laboratorium gav dock upphov till events i Noise-sektionen av dot-ploten. Figur A16-21. Det gick inte att avgöra om events uppstår pga virala partiklar eller om det var cellrester från odlingen i lösningen. Att kvantifiera virala partiklar som detekteras i Noise-sektionen är inte att rekommendera eftersom diverse partiklar/faktorer kan störa denna kvantifiering. Samma MS2-filtering som filtrerades innan analys uppvisade betydligt lägre Noise. SG och PI i kombination med MS2lösning gav, mot förmodan, upphov till events i ROI. Figur A17 och A19. Infärgning för dubbelsträngat DNA bör inte fungera för ett RNA-virus som MS2. Detta tyder ytterligare på cellrester i MS2-lösningen. Dricksvatten infärgat med PI gav upphov till ett förväntat kluster. Tillsats av MS2-lösning gav fler events utanför ROI, inte inom ROI (Figur A16).



Nobivac frystorkat hundvaccin testades eftersom det innehåller attenuerade viruspartiklar. För information om innehållet och specifikationer, se Tabell 2 nedan. Nobivac gav upphov till högt antal events utanför ROI, vilket skulle kunna ha indikerat fragment av celler eller mindre partiklar, potentiellt virala partiklar. Det går dock inte att avgöra exakt vad eller vilka proportioner baserat på FVM-analysen. Utan infärgning liknade ett prov med Nobivac ett avjonat vatten (mycket lågt antal events).

Virustyp	Förkortning	Arvsanlag	Storlek (nm)	Extern morfologi	Median Tissue Culture Infective Dose (TCID <sub>50</sub> )
Valpsjukevirus	CDV	ssRNA (+)	150 – 300	Enveloped	104
Hundadenovirus	CAV2	Linjärt dsDNA	70-90	Enveloped	104
Hundparvovirus	CPV	ssDNA	~25	Non- enveloped	107
Hundparainfluensavirus	CPiV	ssRNA (-)	150 – 250	Enveloped	10 <sup>5,5</sup>
MS2		ssRNA (+)	23-28	Non- enveloped	
PMMoV			300	Non- enveloped	

Tabell 2: Innehåll av Nobivac hundvaccin. Levande men attenuerade, avirulenta homologa stammar av virus. Det levereras frystorkat och löses upp i medföljande vätska. Virusstammarna har framställts genom cellodling. MS2-fager och Pepper Mild Mottile Virus (PMMoV) som användes i experimenten inkluderades i tabellen men finns inte i Nobivac.

Figur A visar att spädvattnet i Nobivac infärgat med SG, Syto13 och RNASelect inte ger några events i ROI. Det var alltså en kontroll att events i virometern påvisar partiklar och annat som finns i den frystorkade ampullen, potentiellt attenuerade virus. Efterföljande bilder A23-A27 visar Nobivac infärgat med allt vi hade tillgängligt. Baserat på Tabell X ovan är det 3 virustyper i Nobivac som har en större storlek än MS2 (CDV, CPiV och CAV2). Dessa har arvsanlag i form av RNA och DNA som potentiellt skulle kunna färgas in. Det detekterades vissa formationer av kluster av events med Nobivac. Koncentrationen virus kan ha varit för låg. Återigen kan dock detekterade events bero på cellrester från odlingen av virus, om det finns sådana. Figurer som visar kombinationer av infärgningar finns tillgängliga hos Norrvatten i mappen<sup>1</sup>, men inkluderades inte i denna rapport eftersom de inte bedömdes tillföra någon information.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> I mapp för FVM-körningar på Q:\Flödesvirometri\Bilder Flödesvirometri\230420



Mikrobiologerna på Norrvatten gjorde en filtrerad MQ-lösning med Tabasco och kryddor av typen paprika respektive chili. Detta eftersom de upptäckts innehålla höga halter PMMoV. Olika koncentrationer av tabasco och kryddor testades ihop med olika koncentrationer och typer av infärgningar. Sammantaget kan man förenklat konstatera att det inte gick att urskilja PMMoV eller något annat virus i dessa lösningar. Events i bakgrunden/noise var mycket höga och det var inte tillfredsställande reproducerbart från prov till prov. Tabasco-lösning färgades på något sätt in av DiO men det kunde inte bestämmas vad som hänt i denna reaktion. MQ Chili och Paprika såg identiska ut med DiD och DiO.





Lipophilic tracers (långa kedjor av dialkylcarbocyanine) färgar in membranstrukturer, framförallt lipid bilayer. Enveloped virus har visats infärgas med lipophilic tracers DiA, DiD, DiI, DiO, DiR. Två olika tracers testades med prover i flödesvirometern, DiD och DiO. Infärgning med dessa molekyler gav upphov till events som inte kunde identifiera vad som färgats in. Metoden verkade oerhört inkonsekvent och icke tillförlitlig. Om provet inte hade targets för infärgning (MQ) formade lipophilic tracers ett helt annat kluster. Inga prover indikerade att lipophilic tracers kan färga in viruspartiklar, åtminstone i den koncentration som vattenprover eller Nobivac innehöll. DiD gav en blank dotplot medan DiO gav ett kraftigt kluster (A36). Kombinationen av infärgningarna gav dock också en blank dotplot (A37). Detta framhäver ytterligare hur komplext infärgning med lipophilic tracers är. Nyckeln till lyckad infärgning med lipophilic tracers kan vara att tillsätta det i en aktiv kultur, under celldelning. Infärgningen integreras då bättre i membranstrukturer (Mousseau et al. 2019). Detta tillvägagångssätt är dock inte optimalt för dricksvattenprover, speciellt för virus.





#### Framtida idéer när teknologin förbättrats

Samarbetet med Göteborgs universitet gav oss kunskap om vilka fager vi har i vårt vatten. En metod som har potential är infärgning av dessa specifika fager för att på så sätt detektera reduktion genom processen. Antikroppar som binder till fager kan konjugeras med t.ex. Alexa488 eller nanopartiklar, vilket är en potentiellt riktad analys (Arakelyan et al. 2013). Metoden med antikroppar måste vara riktad eftersom det inte finns "generella" eller "universella" targets för antikroppar mot virus. De fager som Göteborg hittade, som är potentiella targets, är fager som angriper Enterobacter, Mycobacterium, Pseudomonas, Klebsiella, Salmonella samt Acinetobacter. Utmaningen i ett sådant experiment är att skapa en primär antikropp som binder till viruset. Sekundär antikropp med fluorescens är mycket enkelt att konjugera själv på ett laboratorium. I det utförande så köps ett konjugeringskit och endast de kemikalierna som ingår används, inga speciella instrument krävs. Amin-grupper används för denna konjugering.

Om detektion av relevanta virala partiklar visar sig vara för svårt med flödesvirometri finns det en intressant approach att testa: aggregering av viruspartiklar. Om enstaka partiklar är för svåra att detektera kanske ett aggregat av flera stycken fungerar. Man behöver i så fall tillsätta någon substans som binder till ytstrukturer på virus. Några exempel som var uppe för briefing men inte kunde införskaffas och hinna testas var: Concanavalin A, tetherin, immunoglobulin M och mannan-binding protein lectin. Dessutom bör det undersökas om ytstrukturer på virus har tiol-grupper, detta är ett användbart target inom immunologisk forskning. Virus bör även ha glykoproteiner på ytan, vilket concanavalin A bör binda till. Det finns också en sannolikhet att de diffusa kluster av virus som faktiskt detekterades inom ROI faktiskt bestod av aggregeringar (vilket är ett vanligt fenomen i naturen), inte enstaka virus som vi initialt tänkte (Pradhan et al. 2022). Detta fenomen kan kallas swarm effect eller klustereffekt.

Det verkar som att man behöver uppnå en stark fluorescens för att upptäcka partiklarna inom ROI. Det kan därför vara nödvändigt att använda flera olika typer av infärgningar som binder olika strukturer, t.ex. ytan och nukleinsyror i kombination.

Om flödesvirometri testas igen behöver man titta närmare på inkubationstemperatur / värmebehandling av proverna. Brussaard (2004) fann att virus färgas in bäst efter värmebehandling i 80 – 90 °C. Till viss del testades detta i proverna som upphettades, men kanske inte tillräckligt mycket (A13-A14).

## Glutaraldehyd

I ett försök att optimera protokollet, det vill säga bättre särskilja viruspartiklar från andra storleksmässigt lika stora partiklar såsom exosomer och mikrovesiklar, fixerades proverna med glutaraldehyd. Forskning har visat att glutaraldehyd kan öka fluorescensen och hjälpa till att separera målorganismen (Safford *et.al.* 2023).

I figur XA ses cytogram för körningar med fixering.

För samtliga analyser användes en och samma infärgning, SYTO 13. Baserat på instrumentets förmåga att detektera partiklar förväntas tre av fyra virus i vaccinet att synas, koncentration är CDV 10^4; CAV2 10^4; CPiV 10^5,5 /ml (CPV är för små för instrumentet att fånga upp). SYTO 13 koncentration 1X . Glutaraldehyd koncentration runt 0,5% och blandad i TE buffer. TE buffer filtraras först genom 0,45 $\mu$ m filter. Prover med glutaraldehyd inkuberas i 4°C i 15 minuter och därefter med SYTO 13 i 37°C i 15 minuter.

Den högre koncentrationen vaccin är CDV 3\*10^4; CAV2 3\*10^5,5; CPiV 3\*10^5,5.



SampleID
Vaccine Nobivac (SYTO 13)
Vaccine Nobivac and Glutaraldehyde (SYTO 13)
DI Water
Negative Control TE buffer (without added fluorochrome)
Negative Control with TE buffer (SYTO 13)
Negative Control with TE buffer and Glutaraldehyde (SYTO 1



Figur XA ses inga tydliga kluster som skulle indikera virus av olika storlekar, en något förstärkt fluorescens syns med prov som fixerats med glutaraldehyd. Dock blir fluorescens starkare för prover utan vaccin men med enbart glutaraldehyd och SYTO13 respektive. Så fluorescens bildas av enbart infärgning och glutaraldehyd, vilket blir problematiskt vid tolkning av körningen. Negativa kontrollerna med enbart DI vatten och TE buffer utan SYTO 13 får lågt utslag, vilket är förväntat.

Figur XB visar en körning med bara negativa kontroller då glutaraldyhyd utan prov ger stark fluorescens både med och utan SYTO 13 infärgning. Körningen visar på problematiken med flourescens på prover utan viruspartiklar eller prover med väldigt lågt innehåll, i realiteten skulle bli svårtolkat.

Figur XC körs prover med lite olika koncentration av vaccinet. Dock är skillnaden i koncentration inte stor. Men prov utan vaccin och prov med låg koncentration får liknande fluorescensutslag.

#### **Filtrerade prover**

Ett försök att enbart köra prover med 0,45 µm filtrering, utan fixering med glutaraldyd (Safford *et al.* 2023), gjordes. SYTO 13 [1X] infärgning användes för samtliga körningar även här.

Region of Interest (ROI) gate användes för körningarna, figur X. Utgående dricksvatten från verket (PP208) och ett prov med tillsatt vaccin. Visst ses en skillnad mellan proverna. Oklart vad som egentligen ses då det koncentrerade klustret i PP208 helt försvinner när vaccin tillsätts. Det koncentrerade klustret antas vara bakterier, små bakterier då provet har filtrerats, men kanske att viruskoncentrationen är högre än bakterierna och därför ses intensiteten av fluorescens förjuten.



I ett annat försök att använda naturliga prover med hög koncentration bakterier och förhoppningsvis virus (?) användes backspolsvatten (backwash) från en ultrafiltreringsanläggning (0,2 μm). I körningen ses prov med enbart vaccin och vaccin som adderats till utgående vatten (PP208) få väldigt liknande fluorescensavtryck. På liknande sätt ses koncentrerat kluster i backspolade provet bli mycket svagare i prov där vaccin har tillsats. Provkörningen är svårtolkad då förhoppningen skulle ha varit tydligare kluster att urskilja mellan de olika proverna.



## Framtida undersökningar

RNASelect skulle behöva analyseras mer i detalj eftersom det är något oklart vad som färgas in i vissa prover. Ett möjligt tillvägagångssätt är att tillsätta RNAse i provet före inkubation. Om det är RNA som färgats in och hamnar i ROI nära Noise så försvinner dessa events från den positionen. Om det däremot kvarstår är det mer sannolikt låg fluorescens av DNA eller annat. Det är inte osannolikt att RNA hamnar i låg intensitet av fluorescens eftersom det generellt är mindre target för infärgning jämfört med långa kedjor av DNA.

En potentiell metod för att sortera virus är ultracentrifugering. Det skulle kanske kunna skapa lager i vätska och på så sätt möjliggöra bortsortering av organiskt material eller celler mm. Men det kräver ett specifikt instrument och det finns nog inga garantier för att det underlättar framtagande av viruskoncentrat.

#### Slutsatser

- Tydliga grupper av virus i Norrvattens vatten kunde inte detekteras på ett tillförlitligt sätt med Apogee's flödesvirometer. I alla fall inte med de infärgningsmetoderna som testades. Renkulturer av stora virus kan troligtvis detekteras bättre men detta är inte applicerbart för Norrvatten.
- Om flödesvirometri testas i framtiden behöver man tillgång till flera olika viruskoncentrat i olika storlekar och med olika egenskaper. En nyckel i analysen är typ av infärgning så man behöver ta höjd för att virus har olika typer av arvsanlag, envelope och andra strukturer som är potentiella mål för infärgning.
- Lipophilic tracers (DiD och DiO) visade under dessa månader ingen större potential att användas som infärgning av virus.
- I dagsläget rekommenderas inte flödesvirometri som investering. Det testade instrumentet är inte tillräckligt känsligt för små virus, som kanske är mest relevant, i Norrvattens prover. I stället är molekylära metoder så som PCR-metoder / sekvensering mer värda ytterligare engagemang.

#### Referenser

Arakelyan, A., Fitzgerald, W., Margolis, L., & Grivel, J. C. (2013). Nanoparticle-based flow virometry for the analysis of individual virions. *Journal of Clinical Investigation*, *123*(9), 3716–3727. https://doi.org/10.1172/JCI67042

Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H.U., Egli, T., 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. Applied and Environmental Microbiology 73, 3283–3290. https://doi.org/10.1128/AEM.02750-06

Berney, M., Vital, M., Hülshoff, I., Weilenmann, H. U., Egli, T., & Hammes, F. (2008). Rapid, cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water. *Water Research*, *42*(14), 4010–4018. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.07.017

Besmer, M.D., Weissbrodt, D.G., Kratochvil, B.E., Sigrist, J.A., Weyland, M.S., Hammes, F., 2014. The feasibility of automated online flowcytometry for in-situ monitoring of microbial dynamics in aquatic ecosystems. Front. Microbiol. 5, 265.

Brussaard, C. P. D. (2004). Optimization of Procedures for Counting Viruses by Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(3), 1506–1513. https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1506-1513.2004

Buysschaert, B., Vermijs, L., Naka, A., Boon, N. & De Gusseme, B. (2018). Online flow cytometric monitoring of microbial water quality in a full-scale water treatment plant. *npj Clean Water*, 1:16. doi.org/10.1038/s41545-018-0017-7

Chan, S., Pullerits, K., Riechelmann, J., Persson, K. M., Rådström, P., & Paul, C. J. (2018). Monitoring biofilm function in new and matured full-scale slow sand filters using flow cytometric histogram image comparison (CHIC). *Water Research*, *138*, 27–36. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.032

Doms RW. Basic Concepts: A Step-by-Step Guide to Viral Infection. Viral Pathogenesis. 2016:29–40. doi: 10.1016/B978-0-12-800964-2.00003-3. Epub 2016 Feb 12. PMCID: PMC7150246.

Durmuş S, Ülgen KÖ. Comparative interactomics for virus-human protein-protein interactions: DNA viruses versus RNA viruses. FEBS Open Bio. 2017 Jan 4;7(1):96-107. doi: 10.1002/2211-5463.12167. PMID: 28097092; PMCID: PMC5221455.

E. Gatza, F. Hammes and E. Prest, Assessing Water Quality with the BD Accuri<sup>™</sup> C6 Flow Cytometer White Paper, BD Biosciences, 2013.

Gelderblom, Hans R. Medical Microbiology. 4th edition. Chapter 41.

Gillespie, S., Lipphaus, P., Green, J., Parsons, S., Weir, P., Juskowiak, K., Jefferson, B., Jarvis, P., & Nocker, A. (2014). Assessing microbiological water quality in drinking water distribution systems with disinfectant residual using flow cytometry. *Water Research*, *65*, 224–234. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.029

Hammes, F., Berney, M., Wang, Y., Vital, M., Köster, O., & Egli, T. (2008). Flowcytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research*, *42*(1–2), 269–277. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.009

Jae-Ku Oem, Seong-Hee Kim, Yeon-Hee Kim, Myoung-Heon Lee, Kyoung-Ki Lee. Molecular characteristics of canine parainfluenza viruses type 5 (CPIV-5) isolated in Korea. The Canadian Journal of Veterinary Research 2015;79:64–67

Lippé R. Flow Virometry: a Powerful Tool To Functionally Characterize Viruses. Journal of Virology. Volume 92, nummer 3. 2018.

Mousseau, F., Berret, J. F., & Oikonomou, E. K. (2019). Design and Applications of a Fluorescent Labeling Technique for Lipid and Surfactant Preformed Vesicles. *ACS Omega*, *4*(6), 10485–10493. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01094

Muirheadi, K.A., Horan, P.K., Poste, G., 1985. Flow Cytometry: Present and future. Bio/Technology 3, 337–356. https://doi.org/10.1038/nbt0485-337

Ogbu, K. I., Mira, F., Purpari, G., Nwosuh, C., Loria, G. R., Schirò, G., Chiaramonte, G., Tion, M. T., di Bella, S., Ventriglia, G., Decaro, N., Anene, B. M., & Guercio, A. (2020). Nearly full-length genome characterization of canine parvovirus strains circulating in Nigeria. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(2), 635–647. https://doi.org/10.1111/tbed.13379

Pardo, I. D. R., Johnson, G. C., & Kleiboeker, S. B. (2005). Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(10), 5009–5017. https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5009-5017.2005

Pearson Education Incorporated. Slideplayer, figure 9.2. 2015. https://slideplayer.com/slide/10498119/. 2023-08-18.

Pradhan, S., Varsani, A., Leff, C., Swanson, C. J., & Hariadi, R. F. (2022). Viral Aggregation: The Knowns and Unknowns. In *Viruses* (Vol. 14, Issue 2). MDPI. https://doi.org/10.3390/v14020438

Prest, E.I., Hammes, F., Kötzsch, S., van Loosdrecht, M.C.M., Vrouwenvelder, J.S., (2013). Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method. Water Research 47, 7131–7142. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.051

Proctor, C. R., Besmer, M. D., Langenegger, T., Beck, K., Walser, J. C., Ackermann, M., Bürgmann, H., & Hammes, F. (2018). Phylogenetic clustering of small low nucleic acid-content bacteria across diverse freshwater ecosystems. *ISME Journal*, *12*(5), 1344–1359. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0070-8

Ramseier, M. K., von Gunten, U., Freihofer, P., & Hammes, F. (2011). Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate(VI), and permanganate. *Water Research*, *45*(3), 1490–1500. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.016

Ricci, G., Minsker, K., Kapish, A., Osborn, J., Ha, S., Davide, J., Califano, J. P., Sehlin, D., Rustandi, R. R., Dick, L. W., Vlasak, J., Culp, T. D., Baudy, A., Bell, E., & Mukherjee, M. (2021). Flow virometry for process monitoring of live virus vaccines-lessons learned from ERVEBO. *Scientific Reports*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-021-86688-z

Safford, H. R., & Bischel, H. N. (2019). Flow cytometry applications in water treatment, distribution, and reuse: A review. In *Water Research* (Vol. 151, pp. 110–133). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.016

Saffford, H. R., Johnson M. M. & Bischel H. N.Flow virometry for water-quality assessment: protocol optimization for a model virus and automation of data analysis. NPJ Clean Water. 2023. 6:28.

Sakudo A, Onodera T och Tanaka Y. Inactivation of Viruses. Sterilization and Disinefction by Plasma. Sid 49-60. 2011. https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-enveloped-and-non-enveloped-viruses-Non-enveloped-viruses-are-composed-of\_fig1\_258425493. 2023-08-18.

SARAÇ, F., GÜLYAZ, V., HASÖKSÜZ, M., UZAR, S., GÜLAÇTI, İ., SATIR, E., TUNCER-GÖKTUNA, P., & ATIL, E. (2021). Genetic analysis of Canine adenovirus type 2

strains circulating in Turkey from past to present. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 32(2), 111–117. https://doi.org/10.35864/evmd.1002786

Schleich, C., Chan, S., Pullerits, K., Besmer, M. D., Paul, C. J., Rådström, P., & Keucken, A. (2019). Mapping dynamics of bacterial communities in a full-scale drinking water distribution system using flow cytometry. *Water (Switzerland)*, *11*(10), 1–14. https://doi.org/10.3390/w11102137

The Bioss Bog. Insight Into Viruses (3): The RNA Virus. <u>https://blog.biossusa.com/blogs/iggy-the-bioss-dragon/insight-into-viruses-3-the-rna-virus.</u> <u>2023-08-18</u>.

Virology research services. 2022. https://virologyresearchservices.com/2022/05/22/enveloped-vs-non-enveloped-viruses/. 2023-08-18.

Vital, M., Dignum, M., Magic-Knezev, A., Ross, P., Rietveld, L., & Hammes, F. (2012). Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: Alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. *Water Research*, *46*(15), 4665–4676. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.010

Vlasak, J., Hoang, V. M., Christanti, S., Peluso, R., Li, F., & Culp, T. D. (2016). Use of flow cytometry for characterization of human cytomegalovirus vaccine particles. *Vaccine*, *34*(20), 2321–2328. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.067

Wang, Y., Hammes, F., Boon, N., Chami, M., & Egli, T. (2009). Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria. *ISME Journal*, *3*(8), 889–902. https://doi.org/10.1038/ismej.2009.46

Wang, Y., Hammes, F., De Roy, K., Verstraete, W., & Boon, N. (2010). Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in Biotechnology*, *28*(8), 416–424. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.04.006

https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S7575

2023-09-12

https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S32703

2023-09-12

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp00282.pdf

2023-09-12