



Analysemetoder til måling af flere uønskede stoffer og mikroorganismer i samme prøve

Nye mikrobiologiske metoder

Steffen Lynge Jørgensen

6. januar 2020
Proj.nr. 2007053
Version 1
Init. STJO/MT/BGS

Baggrund

I SAF-projektet "Nye mikrobiologiske metoder" skal der udarbejdes en perspektivering over muligheder for at analysere flere forskellige uønskede stoffer og mikroorganismer i samme prøve, hvor prøven fx kunne være blod eller kød. Det overordnede mål er at få så meget viden som muligt om en given prøve med så få analyser som muligt og på så let tilgængeligt et prøvemateriale som muligt.

Formål

Formålet med nærværende rapport er primært at indsamle viden og vurdere muligheder for identifikation af flere mikroorganismer i én og samme analyse.

Sammendrag

Der blev i denne undersøgelse primært taget udgangspunkt i fire typer metoder; immunoassays, "elektroniske næser", PCR-baserede metoder samt moderne sekventeringsmetoder.

Traditionelle immunoassay-baserede ELISA-metoder samt real-time PCR-metoder er begge robuste metoder, der har været brugt i årtier. Begge metoder kan multiplexes (kombineret til detektion af flere organismer på én gang). Begge metoder kræver dog ofte et tidskrævende opformeringstrin for at sikre, at der er nok antigen eller DNA til detektion, samt for at reducere risikoen for detektion af antigen eller DNA fra døde celler (falsk positiv).

Elektroniske næser baseret på kemiske analysemetoder som kromatografi og spektrometri er velkendte og robuste metoder til detektion af kemiske stoffer og mikroorganismer. Der er så småt begyndt at blive udviklet metoder til detektion af organiske stoffer og metabolitter, der repræsenterer specifikke organismer. Heriblandt detektion af organismespecifikke toxiner og proteiner. Herudover er metoden også velegnet til detektion af antibiotikarester samt antibiotikaresistensproteiner (gener).

Blandt de mest interessante teknologier til hurtig detektion af flere organismer på én gang er RNA-PCR. Teknologisk udvikling har ført til simple metoder (fx RPA), der i høj grad minder om metoder, der er velkendte i industrien. RNA-PCR kan også bruges til påvisning af andet end specifikke organismer, fx ekspresion af gener associeret med fordærv, virulensegenskaber eller antibiotikaresistens. Der foreligger et stykke arbejde med udvikling af primers og protokoller samt test og validering. Men samlet set vurderes det, at der ligger et stort potentiale i RNA-PCR for fødevarerindustrien til detektion af organismer og stoffer i fødevarer (fx toksiner eller fermenteringsmetabolitter).

DNA sekventeringsteknologier fra Oxford Nanopore og nye computeranalyse-software er med til at gøre sekventering meget mere tilgængeligt. Amplikon-sekventering som 16S eller 18S kan identificere mange bakterier eller gær/svampe på én gang. Der er dog endnu ingen kommercielle løsninger, der er helt klar til brug. Tilsvarende har Oxford Nanopore-teknologien gjort dybdegående metagenomsekventering mere tilgængelig. Metagenomsekventering er sekventering af alt DNA i en prøve og kan identificere både bakterier, gær, parasitter og genpulje på én og samme gang. Men analysen er stadig tung og forholdsvis dyr.

Immunoassay-metoder

Immunoassays er baseret på binding af specifikke antistoffer til specifikke target-antigener. Target antigenerne er ofte større molekyler, heriblandt peptider, proteiner og polysaccharider, som kan være sygdomsrelaterede molekyler såsom toksiner, antibiotikarester, samt overfladeproteiner og polysaccharider fra specifikke organismer.

Antistoffers evne til at diskriminere mellem subtyper er bl.a. meget effektiv indenfor flere velkendte patogener fx *Salmonella* og *E. coli*.

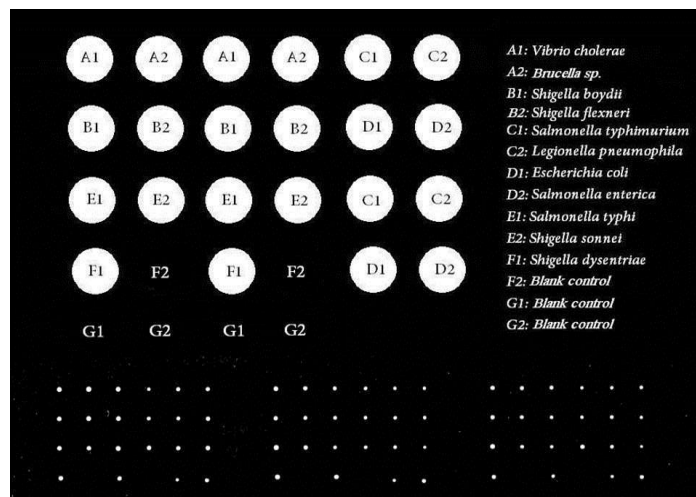
ELISA

ELISA-metoder er de mest udbredte metoder baseret på binding af antistoffer på antigen-targets, fx overfladeproteiner på bakterier eller proteiner eller på de toksiner, organismene producerer. Den dannede antigen-antistof-struktur kan efterfølgende fungere som et målbart produkt. Metoden har været brugt i årtier, og der findes mange kommercielle produkter og kits til detektion af mange forskellige organismer og metabolitter. Der er inden for de sidste par år blevet udviklet ELISA-metoder, der kan multiplexes. Der findes flere kommercielle multiplex ELISA-kits til diagnosticering (kræft og stofskifte) fra bl.a. RayBiotech Life (<https://www.raybiotech.com/quantibody-multiplex-elisa-array/>) og ELISA-Genie (<https://www.elisagenie.com/multiplex-elisa>). Der er desværre endnu ikke kits målrettet fødevarer, men med afsæt i viden fra det diagnostiske område, forventes det, at det også vil være muligt at anvende multiplex ELISA til analyse af organismer/stoffer i fødevarer.

Microarray

Microarray-metoder er screeningsmetoder, der bygger på en chip, der indeholder et meget stort antal brønde med prober (tusindvis), der kan detektere og binde mange forskellige targets på én gang: DNA/RNA, proteiner, peptider, polysaccharider m.m. Microarray bruges ofte til måling af specifikke metabolitter (fx antibiotikaresistens-enzym, toxiner m.m.) ved måling af genekspression (transskription af mRNA). Dette trin kræver dog yderlig reverse transskription af RNA til DNA. Microarraysassays er blevet brugt til detektion af flere metabolitter såvel som organismer på én gang (Ranjbar et al., 2017).

Der eksisterer forskellige udbydere, der tilbyder løsninger til detektion af specifikke gener, bl.a. antibiotikaresistensgener og specifik detektion af bakterier. Heriblandt Veredus Laboratories (<http://vereduslabs.com/>), der producerer kits og instrument til detektion af fødearebakterier.



Simpel microarray-analyse med oversigt over brønde med prøber for forskellige organismer samt resultater (bunden) over brønde med positivt signal/detektion af organismen (Ranjbar et al., 2017)

Udfordringer og potentiale

Der findes ingen kommercielle multiplex kits til detektion af bakterier eller stoffer, som er relevante ift. fødevarer kvalitet eller sikkerhed. Der findes dog andre kits med antistoffer til relevante organismer og stoffer i blod (fx trikiner, toksiner, antibiotikarester), som muligvis ville kunne benyttes med multiplex ELISA-kits.

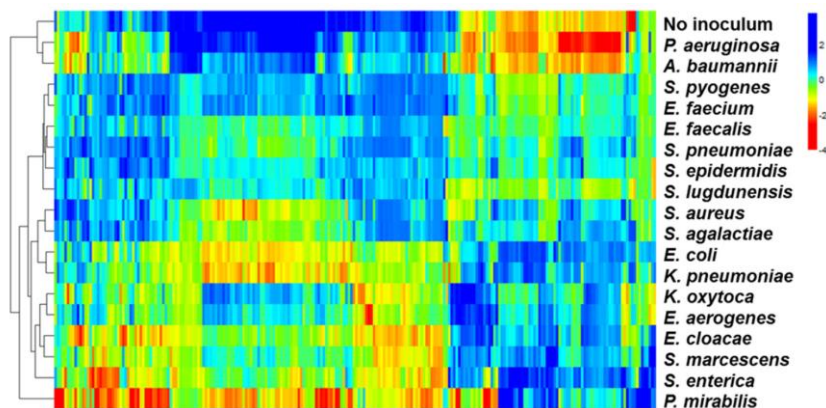
Men stort set alle immunoassays lider under den begrænsning, at der er risiko for krydsreaktioner, som både kan føre til falsk negative og falsk positive resultater. Herudover er det ofte nødvendigt med et langsommeligt opformeringstrin af prøverne. Dette gøres, både for at der er nok antigen, til at det kan måles, og for at reducere risikoen for, at der måles på døde celler. Afhængig af organismetype kan dette trin tage op til et døgn. Endvidere kan organismerne have meget forskellige væksthastigheder, og hurtigtvoksende celler vil hurtigt kunne vokse op i en densitet, der undertrykker væksten af andre organismer, der dermed ikke kan detekteres.

"Elektroniske næser"

"Elektroniske næser" kan detektere stoffer i en gas, og "næsen" er ofte baseret på gaskromatografi. Stofferne, der detekteres, kan fx være molekyler, der repræsenterer organismer eller kemiske stoffer.

Volatile Organic Compounds (VOC) (dansk: flygtige organiske forbindelser) er organiske forbindelser, der let fordampes ved stuetemperatur og normaltryk (de fleste lugte er VOC'er). Enkelte eller kombinationer af VOC'er, der repræsenterer specifikke organismer eller stoffer, kan fungere som biomarkører og detekteres med fx gaskromatografi-massespektrometri (GC-MS). Herved kan en fødevarer-, miljø- eller blodprøve undersøges for indhold af en række biomarkører, der repræsenterer organismer og metabolitter, der er associeret med fx fødevarerfordæring (Casaliniuvo et al., 2006; Johanningsmeier and McFeeters, 2011). Andre organiske forbindelser, der ikke normalt fordampes let (non-volatile organic compounds – NVOC), kan ved høj temperatur og tryk exciteres til en tilstand, der også kan detekteres.

Colorimetric sensor array (CSA) er en udviklet metode, der er baseret på farvning af VOC'er med reaktive kemiske farvestoffer, der sidder på en chipoverflade og kan binde specifikke VOC'er. Herefter danner chippen en farvekode, der giver et unikt "fingeraftryk" for specifikke VOC'er. Metoden er blevet brugt til at danne fingeraftryk for bl.a. patogene bakterier (Lim et al., 2014; Zuo et al., 2019).



Unikke kemiske "fingertryk" af patogene bakterier med colorimetric sensor array (CSA), der er en "elektronisk næse" (Lim et al., 2014)

Der findes kommercielle elektroniske næser på markedet, der kan detektere bakterier, heriblandt Cyranose 320 fra virksomheden Sensigent. Men umildbart er Cyranose 320 stadig kun blevet brugt til identifikation af bakteriekultur med forudgående opformering, og dermed ikke i komplekse miksede prøvematrixer. Men University of Tampere i Finland er i gang med at udvikle deres "eNose", der er baseret på Ion-mobility spectrometry (IMS)-teknologi. IMS er baseret på separation og identifikation af ioniserede stoffer i gasfase og er mere sensitiv og specifik end traditionel gaskromatografi-massespektrometrimetoder. Den finske eNose baseres på kommercielt tilgængelig IMS-analyseudstyr til kvalitative analyser med meget høj sensitivitet, der tilpasset til at "snuse" til bakteriekolonier, celleopløsninger eller blod, og har indtil videre vist gode resultater med MRSA, *Clostridium* og *E. coli* (Saviauk et al., 2018). Målet er at udvikle eNose således, at det fungerer som et point-of-care-device, der snuser til et sår eller udåndingsluft på selve patienten til hurtig klinisk diagnostik.

Andre metoder

Tilsvarende findes der også kemiske analyser, der detekterer molekylestrukturer, heriblandt matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) og liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), der bygger på separation af molekylerne med hhv. laser og kemisk opløsning, efterfulgt af massespektrometri. Ligesom med GC-MS-baserede metoder, er LC-MS og MALDI blevet brugt til identifikation og detektion af enkelte molekyler eller stoffer i forholdsvis rene former og simple opløsninger. Men der er, ligesom med GC-MS, sket en udvikling, så der kan måles på mere komplicerede prøvetyper og efter flere stoffer og molekyler på én gang.

Randox har udviklet LC-MS-baseret udstyr, der kan detektere og kvantificere for flere typer antibiotikarester i samme prøve (mælk, madvarer og væv) på én gang. (<https://www.randoxfood.com/instrumentation/evidence-series/evidence-investigator/#1524133382922-899fbb60-e142>). Der er stadig ingen kommercielle multiplex MALDI-metoder eller maskiner, der kan detektere flere analytter på én gang i komplekse prøver, men der præsenteres løbende videnskabelige studier, hvori kombinationer af multiplex-PCR og MALDI-TOF til detektion af flere stoffer eller vira på samme tid beskrives (Ivanov et al., 2020; Liu et al., 2019).

Udfordringer og potentiale

Det vurderes, at der er potentiale i at bruge kemisk analyse som fx gaskromatografi-massespektrometriteknologi til detektion af VOC'er og NVOC'er som biomarkører af kemiske forbindelser. Metoden er veletableret, har høj specificitet og bruges allerede i andre formater til detektion af bl.a. antibiotikarester og toksiner i fødevarer. Men det er forholdsvis nyt at benytte metoden til detektion af mange specifikke organismer og stoffer direkte på meget komplekst sammensatte biologiske prøver, som sår og fødevarer, i stedet for renkulturer af organismene eller "simple" opløsninger (fx blod eller mælk). Komplexiteten af prøven kan medføre, at sensitiviteten kan blive forringet. Der er simpelthen for mange forskellige molekyler, der detekteres, hvormed der produceres for meget data, hvilket komplicerer processen, hvor de relevante molekyler udpeges og måles. Dette medfører, at der skal tilføjes yderlig håndtering og forberedelse af prøvematerialet, inden prøven kan analyseres. Omvendt ligger der utroligt meget ubenyttet data, som muligvis vil kunne bidrage yderligere til vurdering af produktets kvalitet og sikkerhed (hvilket kan blive en klar fordel), da der jo kun måles på enkelte udvalgte stoffer. Herudover skal der mere udvikling til, før sensitiviteten er høj nok til hurtiganalyser for fødevarepatogener. Der er ikke lavet validering på lignende devices før, hvilket kan medføre yderlig udviklingstid.

DNA-baserede PCR-metoder

PCR-metoderne bygger på amplifikation og måling af specifikke DNA-sekvenser eller RNA-produkter, der koder og repræsenterer organismer eller proteiner.

Multiplex PCR

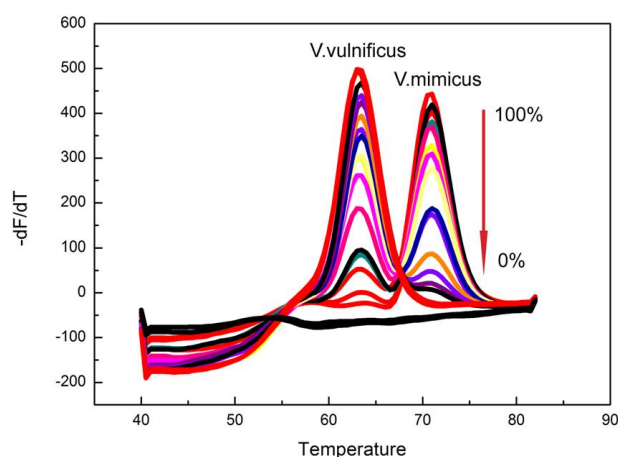
Traditionelle real-time PCR-metoder er blevet brugt i årtier til detektion af uønskede organismer. Real-time PCR er robust og kan multiplexes, således at flere organismer eller gener, der koder for uønskede stoffer (toksiner m.m.), kan detekteres på én gang. Der findes en lang række kommercielle kits på markedet til mange forskellige organismer og gener.

Der er løbende videreudvikling af PCR-metoderne og -teknologien som fx øgning af effektiviteten, et eksempel er droplet-digital PCR (ddPCR). I ddPCR opdeles hver prøve i mange millioner vand-/olie-emulsionsdråber, hvori PCR-amplifikationen foregår. Fordelen ved denne metode fremfor konventionel PCR er, at metoden er mindre påvirkelig overfor inhibitorer fra fødevarematricer, hvilket derved giver højere sensitivitet og reproducerbarhed, samt at der gives et kvantitativt resultat (hvis dette ønskes) uden behov for en standardkurve. Flere studier har vist detektionsgrænser for patogener i fødevarer på <1 CFU/ μ l, hvilket dog stadig svarer til mange CFU pr. prøve. Prøvehåndtering og opsætning af assays er sammenligneligt med traditionel PCR, der kræves blot andre reagenser samt et specielt ddPCR-instrument. Bio-Rad har netop lanceret et nyt ddPCR kit til detektion af Shiga toksinproducerende *E. coli* (STEC) i fødevarer. Med kittet detekteres flere virulensgener simultant, og derved kan risikoen for falske/positive resultater reduceres.

PCR-Probe-smeltekurveanalyse (Multiplex ligation reaction based on probe melting curve analysis (MLMA))

Metoden er baseret på real-time PCR til diskriminering af forskellige organismer på baggrund af forskelle i smeltetemperatur af PCR-produktet. Smeltetemperaturen er den temperatur, hvor det dobbeltstrengede PCR-produkt adskiller sig til to enkeltstrengede DNA-molekyler.

Der laves real-time PCR på et forholdsvist universelt gen, som flere organismer har. Herved produceres PCR-produkter for flere organismer på én gang, men med små forskelle i deres DNA-kode. Dette resulterer i, at PCR-produkterne fra de forskellige organismer har forskellige smeltetemperaturer. Ved efterfølgende at lave smeltekurveanalyse vil de forskellige organismer kunne differentieres på deres distinkte smeltepunkt. Ved at multiplexe metoden med prober og fluorescerende markører til flere forskellige gener vil flere organismer kunne differentieres, og der vil opnås en øget differentieringsopløsning på de organismer, der har ensartet smeltekurve. Metoden er bl.a. blevet designet til identifikation af forskellige sygdomsfremkaldende bakterier, heriblandt *Vibrio* og *Aeromonas*, og metoden er demonstreret til at kunne differentiere ned på serotypeniveau for *Salmonella* (Jiang et al., 2017; Zuo et al., 2019).



Eksempel på PCR-probe-smeltekurveanalyse til detektion af forskellige organismer vha. forskellige smeltetemperaturer af PCR-produkt for forskellige organismer (Jiang et al., 2017).

Udfordringer og potentiale

Selvom real-time PCR er meget sensitiv, kræver metoden, at der er en vis mængde DNA-target til stede for at amplifikation kan finde sted og producere nok PCR-produkt, til at det kan detekteres. Herudover findes der tit PCR-inhiberende stoffer i fødevarerprøver, der kan reducere PCR-reaktionens effektivitet. Derfor tilføjes ofte et tidskrævende opformeringstrin. Dette gøres for at være sikker på, at der er tilstrækkelig DNA-target, til at det kan detekteres, samt for at reducere sandsynligheden for, at der måles på døde celler. Afhængig af organismetype kan dette trin tage op til et døgn. Endvidere kan organismerne have meget forskellige væksthastigheder, og hurtigtvoksende celler vil hurtigt kunne vokse op i en densitet, så langsomt voksende celler aldrig når op i en koncentration (densitet), der kan måles. Fx kan *Salmonella* vokse op i målbare koncentrationer i løbet af timer, mens *Listeria* kræver minimum et døgn. Der er flere muligheder med DNA-PCR, men det vurderes umiddelbart, at videreudvikling af DNA-PCR-metoder blot forlænger denne metodes levetid en smule, da metodens maksimale potentiale er ved at være nået og er ved at blive overhalet af andre metoder.

RNA-baserede PCR-metoder

RNA-PCR kan bruges til detektion af organismer og ekspresion af specifikke gener. Traditionel DNA-PCR bygger på amplifikation af DNA-target, som ofte kun findes i en eller få kopier. Derimod findes der ofte tusindvis af RNA-kopier, når cellen er aktiv. Så selvom der kun er få celler til stede i en prøve, vil der stadig være tusindvis af RNA-target, som kan amplificere op i et niveau, der er målbart med RNA-PCR.

Ved at tilføje et kort opformeringstrin vil selv meget langsomt voksende celler blive aktiverede og begynde at transskribere RNA, inden de begynder at dele sig. Således vil der altså blive produceret målbart RNA meget hurtigt, samtidig med at opformeringstiden reduceres. Opformeringstrinet gør også, at der kun måles på RNA fra levende aktiverede celler, altså en minimering af falsk positive svar. Samlet vil hele analysen altså kunne laves på få timer, pga. det stærkt forkortede opformeringstrin.

PCR på RNA kræver dog et ekstra håndteringstrin i forhold til PCR på DNA, idet RNA'et normalt skal reverstransskribes til DNA, før der kan køres PCR på det. Men moderne PCR-metoder som RPA (Recombinase Polymerase Amplification) samt NEAR-PCR (Nicking enzyme amplification reaction) gør, at der kan laves PCR direkte på RNA, hvilket øger metodens robusthed og sensitivitet, men især også brugervenlighed og hastighed.

NEAR-PCR er kendt for at være en smule mere uspecifik end RPA, derfor er kun RPA beskrevet yderligere i denne rapport.

Recombinase Polymerase Amplification – RPA

RPA er en "next-generation" isotherm PCR-metode, der både kan bruges på RNA og DNA. Rent praktisk kan RPA-reaktion laves i en kop varmt vand og aflæses på en lateral flowstrip (en slags graviditetstest). Metoden kan multiplexes ligesom traditionel PCR, således at flere organismer/gener vil kunne blive detekteret på én gang.

Der findes på nuværende tidspunkt ikke tilgængelige kommercielle multiplexede RPA-metoder, og firmaet TwistDX er på nuværende tidspunkt eneudbyder af RPA-reagenser og -måleudstyr <https://www.twistdx.co.uk/en/rpa>. TwistDX tilbyder ikke primers og kits til specifikke organismer. RPA-reagenser er udviklet til, at brugeren selv designer primers, men reagenserne er egnede til multiplexanalyser. Der er udgivet videnskabelige publikationer med teknologien til detektion af andet end specifikke bakterier, heriblandt virus, food authenticity samt gener, der koder for antibiotikaresistens (Daher et al., 2016; Zarei, 2018). Metoden vil ligeledes kunne bruges til detektion af gener fra bakterier associeret med fødevarerfordærv, virulens eller karakteristika specifikke for unikke bakteriesubtyper.

Udfordringer og potentiale

RNA nedbrydes hurtigere end DNA på grund af tilstedeværelse af RNaser i og udenfor cellerne. Dette kan være en ulempe, da det kræver ekstra påpasselighed i forhold til prøvehåndtering (men omvendt kan det udnyttes til at diskriminere mellem levende og døde celler, hvilket er en klar fordel).

Samlet set vurderes det, at der ligger et stort potentiale i RNA-PCR-metoder, som fx RPA til detektion af organismer og gen-ekspression for dannelse af kemiske stoffer som fx toksiner. Den øgede sensitivitet og reducerede analysetid gør metoden attraktiv. Der foreligger et stykke arbejde med udvikling af primers og protokoller samt test og validering, før metoden vil kunne bruges i industriel sammenhæng. Men der eksisterer allerede flere velkendte og validerede primers og gentargets, der er blevet brugt til traditionelle PCR-metoder. Disse primers og gentargets vil med stor sandsynlighed kunne genanvendes, hvilket vil lette udviklingsprocessen betydeligt, da RNA-PCR minder om teknologier, der allerede bruges inden for fødevarer- og kvalitetsanalyser, og med tilsvarende kravspecifikationer. Udvikling og validering vil være mere ligetil, sammenlignet med fx udviklingen af elektroniske næser.

Sekventering

Ved brug af amplikon-sekventering, fx på 16S rRNA-genet, kan flere bakterier identificeres i samme prøve på én gang. Metoden bygger på PCR-amplifikation af en DNA-sekvens med høj diskriminationsevne, efterfulgt af sekventering og differentiering af DNA-sekvenserne baseret på forskellene i sekventeringsdata.

Oxford Nanopore udvikler platforme, der har gjort denne teknologi meget tilgængelig og billig. Men firmaet Ontera (tidligere 2PoreGuys) har taget Oxford Nanopores teknologi et skridt videre og udvikler point-of-care-platforme til sekventering af en eller flere DNA target-sekvenser.

Der måles tilstedeværelse af bakterier, bakterierne kvantificeres, og der laves genetisk sammenligning af target-sekvensen. Ontera har ikke lanceret nogen kommercielle instrumenter, men har været med i studier, der demonstrerede metodens meget høje sensitivitet og hastighed til detektion af *Mycobacterium tuberculosis*, influenza A virus og *Salmonella enterica* serovar Typhimurium med ca. 1,5 timers analysetid (Cantera et al.). Teknologien vil med stor sandsynlighed kunne overføres til fødevarebårne patogener.

Udfordringer

Der findes ikke én standard for ekstraktion af DNA, hvorfor ekstraktionen udføres på forskellige måder. Med andre ord, det er ikke klart, hvordan den "gode ekstraktion" udføres. Herudover er sekventeringsmetoder stadig ikke gode til at skelne mellem DNA fra levende og døde/inaktiverede celler, hvilket kan resultere i falsk positive resultater.

Metagenomsekventering

Metagenomsekventering er sekventering af alt DNA eller RNA i prøvematrixen (fx kød), bakterier, parasitter, vira, gen-ekspression-produkter (mRNA), gær og svampe. Der sekventeres meget "dybt", altså hvor der produceres endog meget store mængder DNA sekvensdata. Denne store mængde data kan både beskrive organismesammensætningen (mikrobiom), genpulje (virulens, stress, fordævelses- og antibiotikaresistensegenskaber) og gen-ekspression af disse egenskaber på én gang. Moderne sekventeringsudstyr fra Oxford Nanopore har gjort metagenomsekventering meget tilgængelig, og den kan gøres signifikant billigere end for blot 5 år siden.

Udfordringer

Den praktiske analyse er stadig ret omfattende, da prøverne sekventeres i flere dage og stadig koster >1.000 kr. pr. prøve. Den efterfølgende dataanalyse er også omfattende og kræver meget kraftige computere og specialuddannet personale (bioinformatikere). Men de fortsat faldende sekventeringspriser og forbedrede dataanalyser vil gøre metagenomsekventering mere tilgængelig og relevant for fødevareindustrien. Den store mængde data indeholder ikke blot information, der vil kunne besvare, om givne stoffer og organismer er til stede, men også information om tilstedeværelsen af mange andre organismer, gener og gen-ekspression, der kan fortælle noget om produktets kvalitet.

Konklusion og perspektivering

Det er en udfordring at udvikle analyser, der kan detektere flere organismer/stoffer på én gang. Tilgangen er umiddelbart videreudvikling af eksisterende metoder, hvor "gamle" velkendte udfordringer følger med. Det vurderes, at RNA-PCR fx RPA har

det største umiddelbare potentiale til detektion af uønskede organismer og genekspression af (uønskede) stoffer i fødevarer. Den øgede sensitivitet og reducerede analysetid gør metoden attraktiv. RNA-PCR minder om teknologier, der allerede bruges inden for fødevareressikkerheds- og kvalitetsanalyser, og med tilsvarende kravspecifikationer. Dette gør, at både udvikling og manglende validering er mere ligetil, sammenlignet med fx udviklingen af elektroniske næser.

Andre metoder, som metagenomsekventering og elektroniske næser, har begge et potentiale og vil med tiden kunne udvikles og blive interessante for fødevarerindustrien. Begge metoder indeholder enorme mængder information om både uønskede og ønskede organismer og stoffer, der er til stede i prøven. Al vil sandsynligvis blive måden at håndtere og analysere de enorme mængder data fra elektroniske næser og især metagenomsekventering.

Referencer

- Cantera, Jason L., et al. "Assessment of Eight Nucleic Acid Amplification Technologies for Potential Use to Detect Infectious Agents in Low-Resource Settings." *PLoS ONE*, vol. 14, no. 4, 2019, pp. 1–14, doi:10.1371/journal.pone.0215756.
- Casalinuovo, Ida A., et al. "Application of Electronic Noses for Disease Diagnosis and Food Spoilage Detection." *Sensors*, vol. 6, no. 11, 2006, pp. 1428–39, doi:10.3390/s6111428.
- Daher, Rana K., et al. "Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications." *Clinical Chemistry*, vol. 62, no. 7, 2016, pp. 947–58, doi:10.1373/clinchem.2015.245829.
- Ivanov, Daniil G., et al. "Relative Quantitation of Beta-Amyloid Peptide Isomers with Simultaneous Isomerization of Multiple Aspartic Acid Residues by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 31, no. 1, American Chemical Society, Jan. 2020, pp. 164–68, doi:10.1021/jasms.9b00025.
- Jiang, Yixiang, et al. "Simultaneous Identification of Ten Bacterial Pathogens Using the Multiplex Ligation Reaction Based on the Probe Melting Curve Analysis." *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, Springer US, 2017, pp. 1–9, doi:10.1038/s41598-017-06348-z.
- Johanningsmeier, Suzanne D., and Roger F. McFeeters. "Detection of Volatile Spoilage Metabolites in Fermented Cucumbers Using Nontargeted, Comprehensive 2-Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry (GC×GC-TOFMS)." *Journal of Food Science*, vol. 76, no. 1, 2011, pp. C168–77, doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01918.x.
- Lim, Sung H., et al. "Colorimetric Sensor Array Allows Fast Detection and Simultaneous Identification of Sepsis-Causing Bacteria in Spiked Blood Culture." *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 52, no. 2, 2014, pp. 592–98, doi:10.1128/JCM.02377-13.
- Liu, Ning, et al. "Establishment of a Simultaneous Detection Method for Ten Duck Viruses Using MALDI-TOF Mass Spectrometry." *Journal of Virological Methods*, vol. 273, no. August, Elsevier, 2019, p. 113723, doi:10.1016/j.jviromet.2019.113723.

Ranjbar, Reza, et al. "DNA Microarray for Rapid Detection and Identification of Food and Water Borne Bacteria: From Dry to Wet Lab." *The Open Microbiology Journal*, vol. 11, no. 1, 2017, pp. 330–38, doi:10.2174/1874285801711010330.

Saviauk, T., et al. "Electronic Nose in the Detection of Wound Infection Bacteria from Bacterial Cultures: A Proof-of-Principle Study." *European Surgical Research*, vol. 59, no. 1–2, 2018, pp. 1–11, doi:10.1159/000485461.

Zarei, Mohammad. "Infectious Pathogens Meet Point-of-Care Diagnostics." *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 106, no. February, Elsevier B.V., 2018, pp. 193–203, doi:10.1016/j.bios.2018.02.007.

Zuo, Le, et al. "Multiplex Ligation Reaction Based on Probe Melting Curve Analysis: A Pragmatic Approach for the Identification of 30 Common Salmonella Serovars." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 18, no. 1, BioMed Central, 2019, pp. 1–10, doi:10.1186/s12941-019-0338-5.