FORUM FÖR
BEREDSKAPSDIAGNOSTIK

FBD

PROJEKTRAPPORT

Utvärdering av extraktionsrobot 2009

Sara Frosth, Statens veterinärmedicinska anstalt • Stina Bäckman, Totalförsvarets Forskningsinstitut
Linn Farhadi, Smittskyddsinstitutet • Annelie Lundin Zumpe, Livsmedelsverket • Olga Stephansson,
Statens veterinärmedicinska anstalt • Joakim Ågren, Statens veterinärmedicinska anstalt

FBD 2009/3

ABSTRACT

The main goal with FBD is to improve multidisciplinary cooperation in order to harmonize methods, education, training and exercises for diagnostic preparedness applications regarding dangerous pathogens.

Evaluation of DNA Extraction Robot on Human, Environmental, Food and Feed Samples Applicable in a BSL-3 Laboratory

Background: Forum for Biopreparedness Diagnostics (FBD) is a collaborative effort between four Swedish governmental institutes, National Food Administration, National Veterinary Institute, Swedish Institute for Infectious Disease Control and the Swedish Defence Research Agency. One of the main goals of this collaboration is harmonisation of methods and equipment between the participating authorities to increase the level of biopreparedness in Sweden.

Manual DNA extraction in a BSL-3 laboratory is tedious and an enclosed automated system would therefore increase both sample capacity and safety. For this purpose we have evaluated the EZ1 DNA extraction robot on a number of various matrices and performed tests to evaluate if the robot can be used in a biosafety cabinet within our different BSL-3 laboratories.

Methods: The matrices were spiked with vegetative *Bacillus cereus* cells and an internal DNA extraction control PhHV-1. Five environmental, 13 food, 8 feed or animal and 5 human sample types were analysed. An in-house duplex real-time PCR was used for detection. Results: All samples were successfully extracted and both B. cereus and PhHV-1 DNA was detected. However, some samples contained PCR inhibitors and a modified protocol was therefore needed. The robot was placed in a biosafety cabinet in three different BSL-3 laboratories and passed the KI-discus test in all.

Conclusion: The DNA extraction robot EZ1 can be used for extraction of various number of sample types in the biosafety cabinets within our BSL-3 laboratories.

Titel:	**Utvärdering av extraktionsrobot 2009** Publ.nr MSB281, ISBN 978-91-7383-149-9
Projekttid:	1 april till 31 december 2009
Projektledare:	Sara Frosth, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA)
Projektgrupp:	Stina Bäckman, Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI), Annelie Lundin Zumpe, Livsmedelsverket, Linn Farhadi, Smittskyddsinstitutet (SMI),
Kontaktperson i FBDs styrgrupp:	Rickard Knutsson, rickard.knutsson@sva.se
FBDs styrgrupp 2009:	Pär Larsson (FOI), Mats Forsman (FOI), Mona Byström (FOI), Cecilia Dahlberg (Livsmedelsverket), Marianne Boysen (Livsmedelsverket), Annelie Lundin Zumpe (Livsmedelsverket), Benjamin Edvinsson (SMI), Ida Andersson (SMI), Ralfh Wollin (SMI), Viveca Båverud (SVA), Rickard Knutsson, ordf (SVA), Olga Stephansson (SVA), Joakim Ågren (SVA)
Finansiering:	Projektet har finansierats genom tilldelning av MSB:s anslag 2:4 Krisberedskap
Layout:	Tecknarn i Roslagen
Tryck:	Danagårds Grafiska

INNEHÅLL

1. Sammanfattning	3
2. Bakgrund	4
3. Syfte	5
4. Utförande	6
5. Resultat	8
6. Diskussion	20
7. Slutsats	21
8. Referenser	21
Bilag 1	22
Bilag 2	26
Bilag 3	27

1. SAMMANFATTNING

Forum för BeredskapsDiagnostik (FBD) är ett samarbete mellan fyra svenska myndigheter, Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Smittskyddsinstitutet (SMI) och Totalförsvaret forskningsinstitut (FOI). Ett av forumets huvudmål är harmonisering av metoder och utrustning mellan de deltagande myndigheterna för att öka beredskapen i Sverige inför en eventuell B-händelse.

Det finns ett stort behov inom Forum för Beredskapsdiagnostik (FBD) att automatisera det arbetsamma och tidskrävande DNA extraktionssteget inne på BSL-3 (biosafety level 3) laboratorium och att harmonisera laboratorieutrustning mellan de fyra ingående myndigheterna.

En automatiserad DNA extraktionsrobot, BioRobot EZ1, skickades runt mellan myndigheterna för utvärdering där robotens extraktionseffektivitet undersöktes för ett antal olika provmatriser och dessutom så undersöktes möjligheten att arbeta med roboten i säkerhetsbänk på BSL-3 laboratorium med bibehållet personskydd.

Totalt analyserades 31olika matriser av vitt skilda slag såsom vatten, jord, mygg, korv, hallon, mjöl, faeces, urin, blod, raps och ensilage. För att testa om BioRobot EZ1 kan användas i en säkerhetsbänk med bibehållet personskydd på ett BSL-3 laboratorium genomfördes KI-discus-test i enlighet med Svensk Standard SS-EN 12469 och arbetsmiljöverkets riktlinjer för mikrobiologiska säkerhetsbänkar.

Sammanfattningsvis kan sägas att BioRobot EZ1 fungerar bra för att analysera en mängd olika provmatriser och att det går att arbeta med den på ett säkert sätt inne på ett BSL-3 laboratorium.

2. BAKGRUND

För att kunna hantera ett stort antal prov vid ett utbrott eller extraordinär händelse av riskklass 3 agens finns ett behov av harmonisering av laborationsutrustning inom Forum för Beredskapsdiagnostik (FBD) där myndigheterna: Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI), Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) och Smittskyddsinstitutet (SMI) ingår.

Under mjältbrandsutbrottet 2008 spenderades mycket tid på BSL-3 (biosafety level 3) laboratorium för att isolera DNA från olika typer av prover. Provbearbetningsteget är arbetsamt och det mest tidskrävande steget och mot denna bakgrund finns det ett stort behov av att automatisera steget vilket skulle ge både en tidsvinst och göra metoden mer säker med färre manuella provhanteringssteg.

I december 2008 investerade FBD i en BioRobot EZ1 från Qiagen för extraktion av nukleinsyra. Detta som ett led i att påbörja kunskapsuppbyggnad inom materialanskaffning och användning av gemensam apparatur. Extraktionskit har införskaffats och under 2009 skickades utrustningen runt till de olika myndigheterna för utvärdering. En specialbyggd transportlåda användes för att underlätta transport av roboten.

BioRobot EZ1 är en automatiserad DNA extraktionsrobot som kan ta 1-6 prover per extraktionsomgång där varje extraktionsomgång tar ca 15-20 minuter. Roboten är relativt liten med måtten: 32 × 54 × 50 cm (B × H × D) och vikten 25,8 kg vilket innebär att den rent teoretiskt skulle kunna användas i en säkerhetsbänk under förutsättning att det känsliga luftflödet i bänken inte störs. Det finns även en nyare version av BioRobot EZ1 som heter EZ1 Advanced och den är i stort sett identisk med sin föregångare vad gäller måtten och prestandan men har fått några nya finesser som inbyggt UV-ljus för dekontamination, streckkodsläsare och LIMS (Laboratory Information Management System) kompatibilitet. En stor fördel med EZ1 Advanced, om man vill kunna använda den i en säkerhetsbänk, är att luckan som man öppnar när man sätter in sina prover skjuts in i själva roboten och inte ovanför som på BioRobot EZ1 där man riskerar att luckan slår i taket/filtret på säkerhetsbänken.

Olika provmatriser påverkar utbyte och kvalitet av extraherat DNA. Det är därför nödvändigt att utvärdera robotens extraktionseffektivitet för olika provmatriser. Detta görs lämpligen genom att respektive myndighet väljer ut relevanta prover för utvärdering; FOI (miljöprover), Livsmedelsverket (livsmedel och dricksvatten), SVA (veterinärmedicinska prover och foderprover), och SMI (humana prover och pulverbrev).

3. SYFTE

Syftet med projektet är att automatisera DNA extraktionssteget inne på ett BSL-3 laboratorium på ett säkert sätt och målet är att utvärdera extraktionseffektiviteten för BioRobot EZ1, som är en automatiserad DNA extraktionsrobot, på olika provmatriser samt att undersöka möjligheten att arbeta med roboten i säkerhetsbänk på BSL-3 laboratorium med bibehållet personskydd.

4. UTFÖRANDE

4.1 UTVÄRDERING AV EXTRAKTIONSEFFEKTIVITETEN FÖR BIOROBOT EZ1

Extraktionseffektiviteten studerades med hjälp av utbyte, renhet samt PCR-detektion på minst 5 matriser per myndighet. Mjölkpulver användes som kontrollmatris och en *B. cereus* stam användes för att spika matriserna. Spikningsmängden bestämdes med hjälp av CFU (colony forming units) räkning och det extraherade DNA:t mättes på NanoDrop ND-1000 spektrofotometer för koncentrations- och renhets bestämning (260/280 nm). Som extraktionskontroll användes sälherpesvirioner typ1, PhHV-1[1] och för PCR-detektion användes en *rpoB*-assay som är designad så att den ska detektera alla arter av *Bacillus* och är därför inte specifik för enbart *B. cereus* som vi använde för att spika proverna med.

4.1.1 Spikningsprotokoll för B. cereus

Dag 1, ca kl 10-11 fylldes botten på ett 50 ml Falconrör med ca 2 ml BHI-buljong (brain heart infusion) och sedan ympades röret med en liten koloni av *B. cereus*. Röret vortexades och inkuberades sedan vid 37°C. Ca kl 16 späddes kulturen från Falconröret i Eppendorfrör 1:10, 1:100, 1:1 000 (10 µl + 90 µl) i ljummen BHI. Femtio mikroliter togs ifrån 1:1 000 spädningen och spikade 5 ml varm BHI i en cellodlingsflaska som sedan inkuberades vid 37°C över natt i en låda för att förhindra avdunstning.

Dag 2, kl 8 späddes kulturen som inkuberats över natt 1:10 i varm BHI i ett Eppendorfrör (10 µl+ 90 µl). Femtio mikroliter togs ifrån spädningen och användes för att spika 5 ml varm BHI i en cellodlingsflaska som inkuberades vid 37°C i 2,5 timmar. Kl 10:30 innehöll kulturen ca 1-3×10^7 CFU/ml som användes för att spika matriserna. En matris spikades i taget med slutkoncentrationen 10^2 CFU/µl och om fler matriser skulle köras samma dag förvarades spikningskulturen i kyl och användes för att spika enligt ovan.

En spädningsserie gjordes även av kulturen i fysiologisk koksaltlösning och lämpliga spädningar spreds på två blodagarplattor som inkuberades vid 37°C över natt och räknades CFU dagen efter.

4.1.2 Förbearbetningsprotokoll

För fasta matriser vägdes 2 g matris upp i ett 50 ml Falconrör som spikades med *B. cereus* med undantag för jord och mygg där 50 mg jord respektive 25 st mygg per prov användes. Spikningsmängden beräknades så att slutkoncentrationen blev 10^4 cfu/ml. Den spikade matrisen fick stå ca en timme så att bakterierna kunde binda in till matrisen. Till varje spikad matris tillsattes sedan 10 st glaskulor (5 mm i diameter) och 18 ml fysiologisk koksaltlösning och efter att rören skakats hårt manuellt i 2 min i säkerhetsbänk så fick de sedimentera i 10 min. Supernatanten användes sedan för extraktion. Flytande matriser utan större partiklar extraherades direkt.

4.1.3 DNA extraktionsprotokoll

Samtliga extraktioner utfördes på BioRobot EZ1 från Qiagen enligt tillverkarens instruktioner och EZ1 DNA Tissue kit användes enligt ”bacterial protocol”. Sex prover kunde extraheras på BioRobot EZ1 åt gången och varje extraktionsomgång tog 15-20 min. Den spikade testmatrisen extraherades i triplikat, den spikade kontrollmatrisen (mjölkpulver från Nestlé) i duplikat och ospikad testmatris extraherades i ett exemplar (enbart spikad med sälherpesvirioner) som negativ kontroll. Sälherpesvirionerna, som användes som extraktionskontroll, tillsattes alltid till samtliga prover precis innan extraktionen

och genomgick alltså inga eventuella förbearbetningar tillsammans med provet. Fem mikroliter sälherpesvirioner med koncentrationen 10^5 virioner/µl togs till 195 µl matris vilket motsvarade en slutkoncentration av $2{,}5\times10^3$ virioner/µl. Provvolym in i roboten var alltid 200 µl och som elueringsvolym användes alltid 50 µl.

4.1.4 PCR-protokoll

Quanta Biosciences PerfeCta Multiplex qPCR SuperMix användes i samtliga realtids-PCR reaktioner och slutkoncentrationen av primrar och prober enligt nedan var 0,5µM respektive 0,1µM. Fem mikroliter eluat användes som prov i realtids-PCR analysen och samtliga prover kördes i duplikat. Totalvolymen för varje realtids-PCR reaktion var 25 µl.

- *rpoB* forward 5'-ACCTCTTCTTATCAGTGG-3'
- *rpoB* reverse 5'-CCCGTAAAGTCTTCAATC-3'
- *rpoB* prob 5'-CATTTCTCGCAAACCCTCATCAAG-3' (FAM-BHQ1)
- PhHV-1 forward 5'-GGGCGAATCACAGATTGAATC-3'
- PhHV-1 reverse 5'-GCGGTTCCAAACGTACCAA-3'
- PhHV-1 prob 5'-TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-3' (VIC-MGB)

Följande PCR-program användes för samtliga realtids-PCR analyser: 95°C i 2 min, (95°C i 15 s och 60°C i 1 min) × 45 cykler. På Livsmedelsverket, SMI och SVA utfördes analyserna på ABI7500 Fast från Applied Biosystems och FOI använde Mastercycler realplex2 från Eppendorf.

4.2 UTVÄRDERING AV BIOROBOT EZ1 I SÄKERHETSBÄNK PÅ BSL-3 LAB

För att testa om BioRobot EZ1 kan användas i en säkerhetsbänk med bibehållet personskydd på ett BSL-3 laboratorium genomfördes KI-discus-test av NNE Pharmaplan. KI-discus-testen utfördes i enlighet med Svensk Standard SS-EN 12469 och arbetsmiljöverkets riktlinjer för mikrobiologiska säkerhetsbänkar. Tre säkerhetsbänkar av typ klass II med BioRobot EZ1 placerad inuti sig lokaliserade på BSL-3 lab på SVA (Bakt BSL-3 lab), SVA (Vir BSL-3 lab där Livsmedelsverket har tillträde) samt FOI testades. På Bakts BSL-3 lab på SVA genomfördes även rökvisualisering samt partikelmätning både i och utanför säkerhetsbänken som kompletterande test och även de utfördes av NNE Pharmaplan.

5. RESULTAT

5.1 UTVÄRDERING AV EXTRAKTIONSEFFEKTIVITETEN FÖR BIOROBOT EZ1

5.1.1 Utbyte och renhet

Vid FOI genomfördes två körningar (1-2) och spikningskulturerna innehöll $2{,}1\times10^8$ CFU/ml och 2×10^8 CFU/ml respektive enligt CFU räkningen. Samtliga DNA extraktioner mättes med avseende på koncentration och renhet vilket kan ses i tabell 1. Varje testmatris kördes i triplikat och det är medelvärden av dessa som visas i tabellen. För kontrollmatrisen är det ett medelvärde av 10 extraktioner som visas och för de ospikade testmatriserna så är det endast ett värde per matris.

Tabell 1. Resultat DNA konc. och renhet för matriser körda vid FOI

Körning	Matris	Konc. ng/µl	260/280 nm
1	Ytvatten	1,2	1,5
	Ytvatten ospikat	1,3	1,7
	Bottenvatten	4,4	1,2
	Bottenvatten ospikat	2,7	1,1
2	Mygg	247,6	1,8
	Mygg ospikat	201,9	1,8
	Jord (ute)	14,6	1,5
	Jord (ute) ospikat	11,5	1,6
	Jord (påse)	11,9	1,4
	Jord (påse) ospikat	12,3	1,4
	Mjölkpulver (kontroll)	4,6	1,1

Vid Livsmedelsverket genomfördes två körningar (1-2) och spikningskulturerna innehöll $5{,}3\times10^7$ CFU/ml och 4×10^7 CFU/ml respektive. Samtliga DNA extraktioner mättes med avseende på koncentration och renhet vilket kan ses i tabell 2. Varje testmatris kördes i triplikat och det är medelvärden av dessa som visas i tabellen. För kontrollmatrisen är det ett medelvärde av 12 extraktioner som visas för körning 1 och 14 st för körning 2. För de ospikade testmatriserna så är det endast ett värde per matris

Tabell 2. Resultat DNA konc. och renhet för matriser körda vid Livsmedelsverket

Körning	Matris	Konc. ng/µl	260/280 nm
1	Falukorv	4,83	1,7
	Falukorv (ospikat)	4,50	1,9
	Hallon	2,73	1,3
	Hallon (ospikat)	6,20	1,5
	Vetemjöl	12,93	1,5
	Vetemjöl (ospikat)	9,90	1,5
	Mellanmjölk	8,37	1,3
	Mellanmjölk (ospikat)	1,30	0,7
	Oboy	5,97	1,3
	Oboy (ospikat)	5,00	1,2
	Vita bönor	2,03	0,9
	Vita bönor (ospikat)	1,00	1,6
	Mjölkpulver totalt	11,01	1,3
2	Basilika	1,43	1,5
	Basilika (ospikat)	2,43	2,4
	Sötärtor	1,90	1,3
	Sötärtor (ospikat)	2,50	1,6
	Skinka	6,20	1,6
	Skinka (ospikat)	5,10	1,5
	Mussla	69,30	1,9
	Mussla (ospikat)	72,30	1,9
	Apelsinjuice	1,37	1,1
	Apelsinjuice (ospikat)	2,20	1,2
	Majs	1,47	1,1
	Majs (ospikat)	1,20	0,9
	Tonfisk	1,67	1,2
	Tonfisk (ospikat)	1,50	1,6
	Mjölkpulver totalt	3,65	1,1
	Mjölkpulver (ospikat)	3,65	0,9

Vid SMI genomfördes en körning men tyvärr finns inga data för spikningskulturens koncentration eller DNA extraktionernas koncentration eller renhet.

Vid SVA genomfördes fyra separata körningar (1-4) och spikningskulturerna innehöll följande koncentrationer enligt CFU räkning:

- Körning 1. $4{,}4\times10^7$ CFU/ml
- Körning 2. $5{,}6\times10^7$ CFU/ml
- Körning 3. $3{,}5\times10^7$ CFU/ml
- Körning 4. $6{,}3\times10^7$ CFU/ml

Samtliga DNA extraktioner mättes med avseende på koncentration och renhet vilket kan ses i tabell 3. Varje testmatris kördes i triplikat och det är medelvärden av dessa som visas i tabellen. Mjölkpulver kördes i duplikat i spikat och ospikat vid varje körning (1-4) och spikat mjölkpulver kördes i duplikat i varje extraktionsomgång. För kontrollmatrisen är det ett medelvärde av 10 extraktioner som visas för körning 1, 2 st för körning 2, 8 st för körning 3 och 6 st för körning 4. För de ospikade testmatriserna så är det endast ett värde per matris.

Tabell 3. Resultat DNA konc. och renhet för matriser körda vid SVA

Körning	Matris	Konc. ng/µl	260/280 nm
1	Nötblod	27,0	1,9
	Nötblod (ospikat)	28,1	1,9
	Mjölkpulver	7,2	1,8
	Mjölkpulver (ospikat)	6,8	1,6
	Ensilage	5,2	2,1
	Ensilage (ospikat)	5,2	2,6
	Hö	4,9	2,4
	Hö (ospikat)	4,3	2,7
	Damm	24,9	1,9
	Damm (ospikat)	22,7	1,9
	Palmexpeller	4,1	2,4
	Palmexpeller (ospikat)	4,2	1,4
	Mjölkpulver (kontroll)	7,1	1,7
2	Mjölkpulver	7,9	1,5
	Mjölkpulver (ospikat)	4,2	1,9
	Damm	21,0	2,0
	Damm (ospikat)	22,6	2,0
	Mjölkpulver (kontroll)	5,2	1,8
3	Mjölkpulver	2,4	2,1
	Mjölkpulver (ospikat)	2,5	1,9
	Skrapprov	7,6	2,2
	Skrapprov (ospikat)	7,1	2,1
	Raps	1,9	1,4
	Raps (ospikat)	2,1	3,8
	Palmkärna	3,3	1,9
	Palmkärna (ospikat)	2,5	1,5
	Vetemjöl	5,6	2,5
	Vetemjöl (ospikat)	6,0	3,0
	Mjölkpulver (kontroll)	3,0	1,9
4	Mjölkpulver	4,0	1,9
	Mjölkpulver (ospikat)	4,0	1,4
	Skrapprov	8,9	1,9
	Skrapprov (ospikat)	8,6	2,6
	Raps	2,5	1,7
	Raps (ospikat)	2,6	1,2
	Vetemjöl	5,7	1,8
	Vetemjöl (ospikat)	7,1	1,9
	Mjölkpulver (kontroll)	4,4	1,6

5.1.2 PCR-detektion

På FOI analyserades följande matriser: ytvatten, bottenvatten, mygg, jord utifrån och jord köpt på påse. Jorden fungerade inte att analysera med enbart det förbearbetningsprotokoll enligt punkten 4.1.2 samt efterföljande extraktion på BioRobot EZ1 men efter rening av eluaten med ett microspin kit (S-400 hr columns) från GE Healthcare så kunde även jorden analyseras, se tabell 4. Resultaten för kontrollmatrisen kan ses i tabell 5. Samtliga ospikade matriser var *rpoB* negativa och roboten som extraktionerna utfördes på var BioRobot EZ1 som köpts in av FBD.

Tabell 4. Resultat från körda matriser FOI

Körning	Matris	Ct triplikat *rpoB*	Ct triplikat virioner	Ct virioner ospikad matris
1	Ytvatten	23,73	33,39	32,79
	Bottenvatten	21,04	32,81	31,68
	Mjölkpulver totalt	22,07	33,98	Ej kört
2	Mygg	28,79	31,97	31,66
	Jord (ute)	ND	ND	ND
	Jord (påse)	ND	ND	ND
	Jord (ute) microspin	29,67	32,66	33,14
	Jord (påse) microspin	30,42	33,39	32,69
	Mjölkpulver totalt	20,44	33,64	Ej kört

Tabell 5. Resultat kontrollmatris FOI

Körning	Matris Mjölkpulver	Ct duplikat *rpoB*	Ct duplikat virioner
1	Extraktion 1	22,17	33,89
	Extraktion 2	21,96	34,06
2	Extraktion 3	20,41	33,73
	Extraktion 4	20,34	33,74
	Extraktion 5	20,31	33,69
	Extraktion 6	20,57	33,54
	Extraktion 7	20,59	33,51

På Livsmedelsverket analyserades följande matriser: falukorv, hallon, vetemjöl, mellanmjölk, oboy, vita bönor, basilika, sötärtor, skinka, mussla, apelsinjuice, majs och tonfisk, se tabell 6. Resultaten för kontrollmatrisen kan ses i tabell 7. Vid körning två användes mjölkpulver från Semper istället för mjölkpulver från Nestlé som användes i körning 1 och i körningarna vid FOI, SMI och SVA. Samtliga ospikade matriser var *rpoB* negativa och roboten som extraktionerna utfördes på var EZ1 Advanced som finns att tillgå inom Resurslaboratorium för Beredskapsdiagnostik (RUB).

Tabell 6. Resultat från körda matriser Livsmedelsverket

Körning	Matris	Ct triplikat *rpoB*	Ct triplikat virioner	Ct virioner ospikad matris
1	Falukorv	27,70	32,81	32,41
	Hallon	31,41	35,18	35,63
	Vetemjöl	28,14	ND*	ND*
	Mellanmjölk	28,94	32,76	32,50
	Oboy	23,84	32,13	32,40
	Vita bönor	28,84	32,61	32,00
	Mjölkpulver totalt	24,06	32,04	Ej kört
2	Basilika	29,14	32,35	32,12
	Sötärtor	27,23	32,19	31,58
	Skinka	27,80	31,47	31,71
	Mussla	26,39	31,79	32,12
	Apelsinjuice	29,97	32,50	ND*
	Majs	26,31	31,93	31,65
	Tonfisk	27,66	32,39	32,37
	Mjölkpulver totalt	23,54	31,63	31,92

** Sälherpesvirioner ej tillsatt*

Tabell 7. Resultat kontrollmatris Livsmedelsverket

Körning	Matris Mjölkpulver	Ct duplikat *rpoB*	Ct duplikat virioner
1	Extraktion 1	24,12	32,44
	Extraktion 2	24,17	31,79
	Extraktion 3	24,25	31,77
	Extraktion 4	23,95	ND
	Extraktion 5	24,02	32,08
	Extraktion 6	24,01	32,13
	Extraktion 7	20,59	33,51
2	Extraktion 7	23,92	31,89
	Extraktion 8	23,65	31,58
	Extraktion 9	23,53	31,85
	Extraktion 10	23,64	32,01
	Extraktion 11	23,40	31,58
	Extraktion 12	23,50	31,26
	Extraktion 13	23,29	31,50

På SMI analyserades följande matriser: faeces löst i PBS, muskelvävnad, helblod, blod från blododlingsflaska, urin och faeces löst i NaCl, se tabell 8. Samtliga ospikade matriser var *rpoB* negativa och roboten som extraktionerna utfördes på var BioRobot EZ1 som köpts in av FBD.

Tabell 8. Resultat från körda matriser SMI

Körning	Matris	Ct triplikat *rpoB*	Ct triplikat virioner	Ct virioner ospikad matris
1	Faeces löst i PBS	22,29	31,11	31,16
	Muskelvävnad	24,13	31,15	31,42
	Helblod	24,06	32,58	32,50
	Blod från blododlingsflaska	25,38	31,51	31,10
	Urin	26,52	31,81	31,58
	Faeces löst i NaCl	23,38	31,91	32,00
	Mjölkpulver totalt	20,95	31,35	Ej kört

Tabell 9. Resultat kontrollmatris SMI

Körning	Matris Mjölkpulver	Ct duplikat *rpoB*	Ct duplikat virioner
1	Extraktion 1	21,17	31,33
	Extraktion 2	20,55	30,93
	Extraktion 3	20,91	31,41
	Extraktion 4	20,79	31,29
	Extraktion 5	20,87	31,30
	Extraktion 6	21,43	31,85

På SVA analyserades följande matriser: nötblod, ensilage, hö, damm från foderfabrik, palmexpeller, skrapprov från foderfabrik, raps, palmkärna och vetemjöl, se resultaten i tabell 10. Resultaten för kontrollmatrisen kan ses i tabell 11. Flera ospikade matriser var *rpoB* positiva se tabell 10. I körning 1 var ett replikat av två positivt för en av två extraktioner av ospikat mjölkpulver och för ospikat damm var båda replikaten för den enda extraktionen positiva. När dessa två matriser kördes om från början i körning 2 erhölls samma resultat som tidigare. I körning 3 när nya matriser kördes tillsammans med mjölkpulver igen så erhölls samma resultat för det ospikade mjölkpulvret att en av fyra PCR-reaktioner var positiva (2 extraktioner) och för ospikat skrapprov och ospikat vetemjöl var ett replikat vardera positivt. För ospikad raps var båda replikaten positiva. När de positiva ospikade matriserna från körning 3 kördes om från början igen i körning 4 erhölls samma resultat för skrapprov att ett replikat var positivt medan båda replikaten för vetemjöl var positiva och tre av fyra PCR-reaktioner för mjölkpulver var positiva och de

båda replikaten för raps var negativa i denna körning. I körning 1 och 2 användes samma batch mjölkpulver som FOI, Livsmedelsverket och SMI också använde medan i körning 3 och 4 användes nyinköpt mjölkpulver pga. det första tog slut dock från samma tillverkare (Nestlé).

PCR:erna för samtliga ospikade matriser som haft något replikat positivt tidigare kördes om i en stor körning efteråt med resultat överensstämmande med tidigare resultat. Roboten som extraktionerna utfördes på var BioRobot EZ1 fast inte samma exemplar som FOI och som SMI utförde sina extraktioner på och som köpts in av FBD utan ett exemplar som finns att tillgå inom RUB som köpts in under 2004. För att försöka utreda om dessa prover som var positiva trots att de var ospikade berodde på kontamination i roboten, rengjordes den ordentligt med klorin och UV-behandlades, och efter det så kördes 6 ospikade prover av mjölkpulver och på dessa 6 prover kördes PCR:en i triplikat. För 5 av 6 prover var något eller alla replikat positiva med ett medelvärde av Ct på 36,9 (totalt 11 replikat av 18 körda) förmodligen precis på detektionsgränsen.

Tabell 10. Resultat från körda matriser SVA

Körning	Matris	Ct triplikat *rpoB*	Ct rpoB ospikad matris	Ct triplikat virioner	Ct virioner oslipad matris
1	Nötblod	23,95	ND	31,70	30,17
	Mjölkpulver	21,73	38,01	30,39	30,06
	Ensilage	26,72	ND	32,82	32,40
	Hö	22,99	ND	30,65	30,37
	Damm	24,37	32,37	30,85	30,57
	Palmexpeller	21,88	ND	30,58	30,34
2	Mjölkpulver	20,71	35,98	31,93	32,09
	Damm	26,71	31,36	32,17	32,09
3	Mjölkpulver	23,53	36,22	32,38	31,94
	Skrapprov	23,09	39,00	32,56	32,30
	Raps	24,03	36,86	32,47	34,08
	Palmkärna	23,01	ND	31,53	31,68
	Vetemjöl	24,23	37,57	31,51	31,35
4	Mjölkpulver	22,76	37,55	30,69	29,82
	Skrapprov	21,72	38,67	30,90	29,86
	Raps	22,78	ND	30,50	29,95
	Vetemjöl	23,29	34,81	29,65	29,19

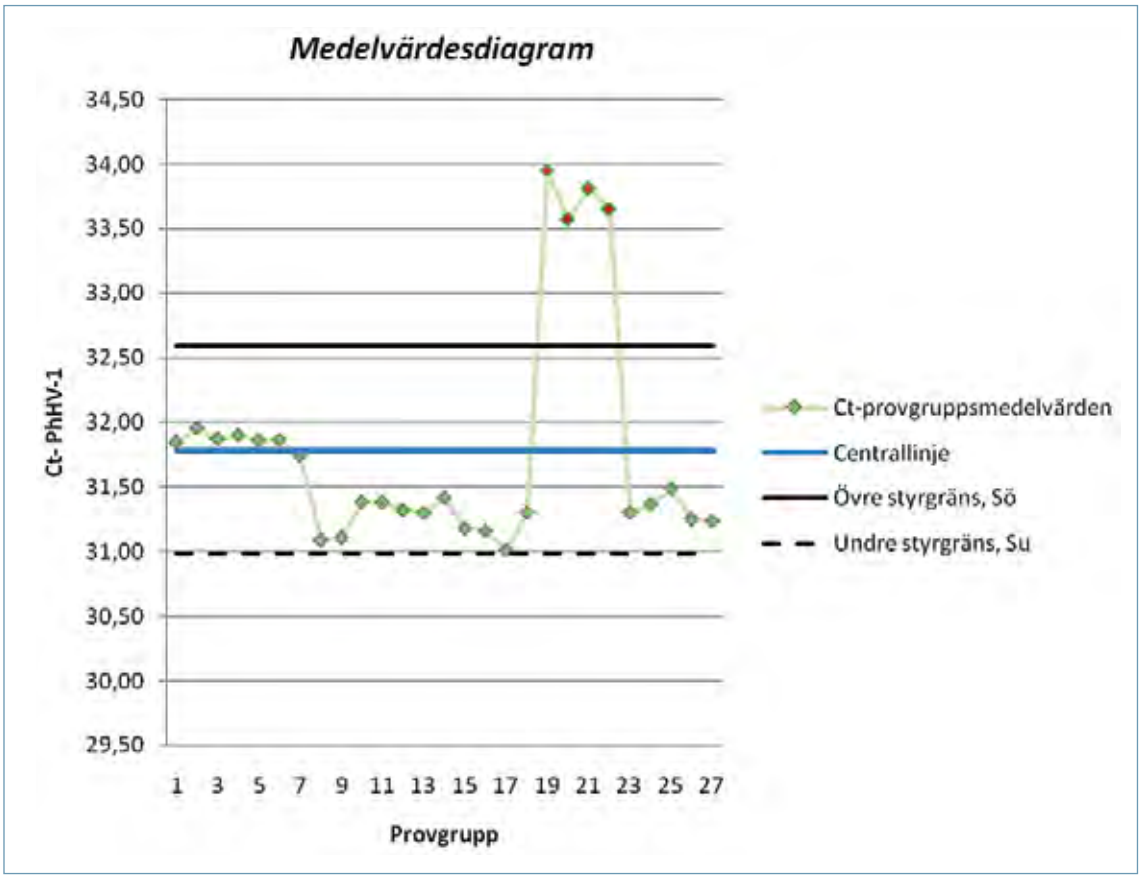
Tabell 11. Resultat kontrollmatris SVA

Körning	Matris Mjölkpulver	Ct duplikat *rpoB*	Ct duplikat virioner
1	Extraktion 1	21,79	30,17
	Extraktion 2	21,72	30,26
	Extraktion 3	21,74	30,68
	Extraktion 4	21,67	30,55
	Extraktion 5	21,72	30,32
	Extraktion 6	21,74	30,36
2	Extraktion 7	20,78	31,75
	Extraktion 8	20,65	32,12
3	Extraktion 9	23,33	32,52
	Extraktion 10	23,68	32,54
	Extraktion 11	23,39	32,05
	Extraktion 12	23,56	32,36
	Extraktion 13	23,67	32,42
4	Extraktion 14	22,50	30,96
	Extraktion 15	22,86	30,58
	Extraktion 16	22,83	30,58
	Extraktion 17	22,83	30,62

5.1.2.1 Jämförelse av resultaten för extraktionskontrollen PhHV-1 mellan de olika myndigheterna

I medelvärdesdiagrammet i figur 1 observeras de sammanfattande resultaten, från samtliga myndigheter, för extraktionskontrollen PhHV-1 extraherat från mjölkpulverkontrollen spikad med PhHV-1 virioner och *B. cereus*. Styrgränserna (toleransgränserna) för medelvärdesdiagrammet valdes enligt 3-sigma-gränser, vilket innebär att avståndet mellan vardera styrgräns ($S_Ö$, S_U) och centrallinjen (C_L) är tre gånger standardavvikelsen. Provgrupp 1-7 visar resultat erhållna på Livsmedelsverket, provgrupp 8-18 är resultat från SVA, provgrupp 19-24 är resultat från FOI och provgrupp 23-27 visar de erhållna resultaten på SMI. Enligt diagrammet ligger samtliga resultat utom FOI:s inom styrgränserna. Orsaken till detta kan vara att samtliga myndigheter utförde sina realtids-PCR analyser på ABI7500 Fast från Applied Biosystems förutom FOI som utförde sina realtids-PCR analyser på Mastercycler realplex2 från Eppendorf .

Fig. 1. Sammanfattande resultat på extraktionskontrollen PhHV-1 för samtliga myndigheter



5.2 UTVÄRDERING AV BIOROBOT EZ1 I SÄKERHETSBÄNK PÅ BSL-3 LAB

Samtliga tre säkerhetsbänkar av typ klass II med BioRobot EZ1 placerad inuti sig lokaliserade på BSL-3 lab på SVA (Bakt BSL-3 lab), SVA (Vir BSL-3 lab där Livsmedelsverket har tillträde) samt FOI som KI-discus-testades uppfyllde kraven enligt SS-EN 12469, se figurer 2-4 för hur robotarna står i bänkarna samt bilagor 1-3 för resultatrapporter från NNE Pharmaplan. Rökvisualiseringstestet som genomfördes på Bakts BSL-3 lab på SVA visade på inga synbara in/utläckage mellan säkerhetsbänken och övriga rummet och för partikelmätningstestet kunde man dra paralleller med resultatet för KI-discus-testet även om ingen standard fanns att tillgå för detta test (se bilaga 1). Roboten som användes vid KI-discus-testet på SVA (Bakt BSL-3 lab) samt på FOI var BioRobot EZ1 medan KI-discus-testet på SVA (Vir BSL-3 lab) samt rökvisualiseringstestet och partikelmätningstestet på Bakts BSL-3 lab på SVA genomfördes med EZ1 Advanced. KI-discus-test utfördes ej på SMI då man inte hade möjlighet att dekontaminera hela BSL-3 laboratoriet.

Fig. 2. KI-discus-test på SVA (Bakt BSL-3 lab) med roboten placerad till höger i en Holten klass II bänk

Fig. 3. KI-discus-test på SVA (Vir BSL-3 lab) med roboten placerad till vänster i en Holten klass II bänk

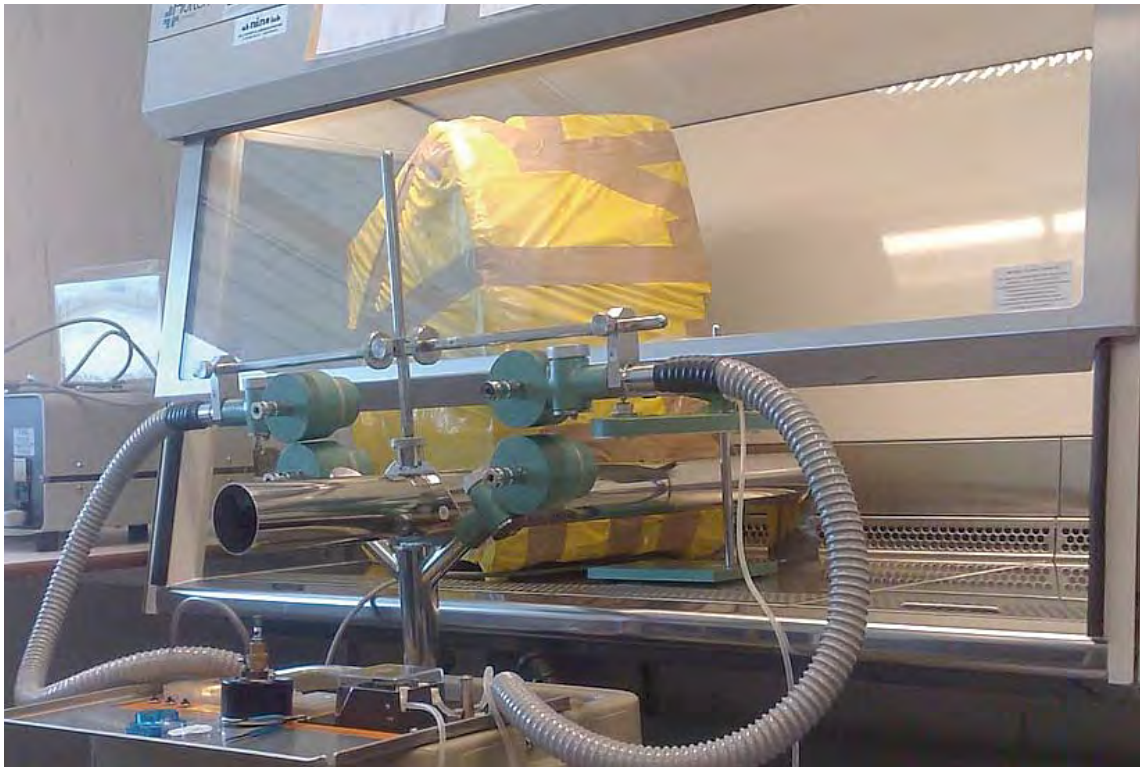
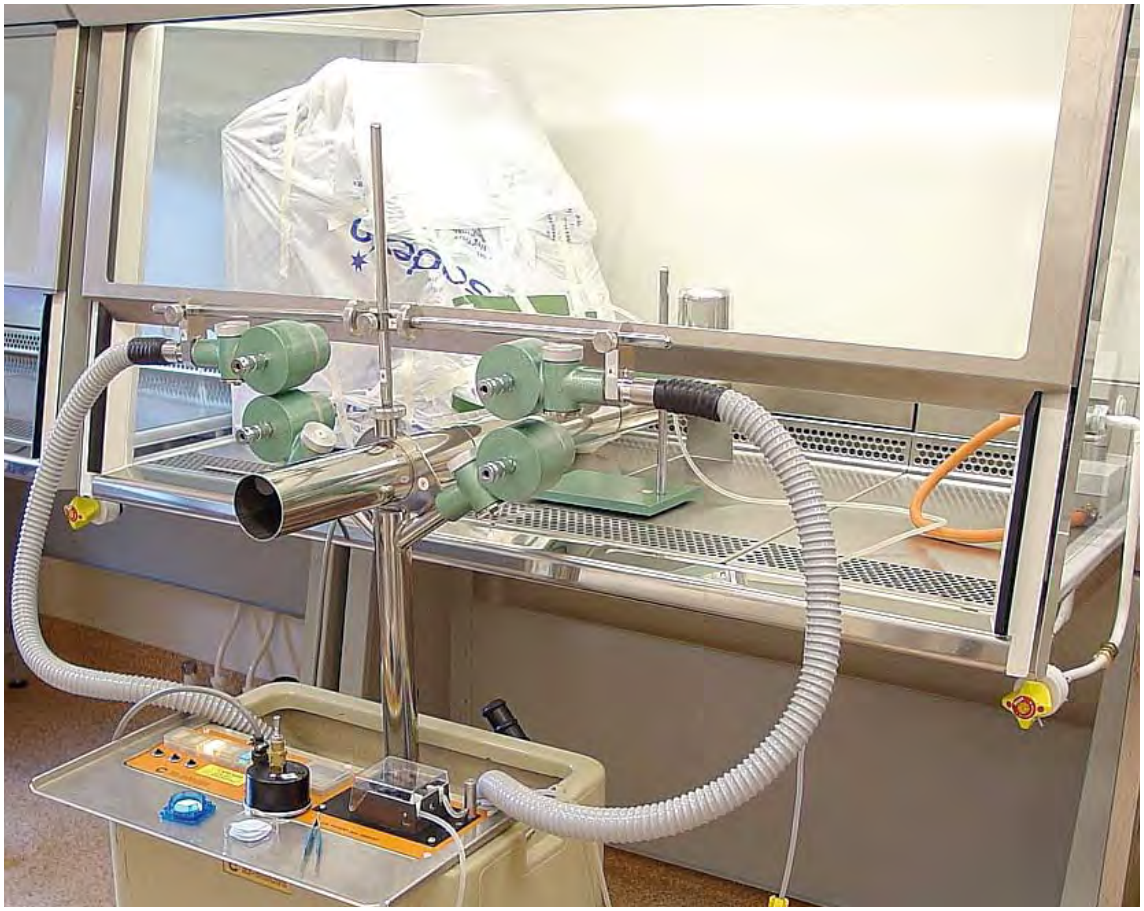


Fig. 4. KI-discus-test på FOI med roboten placerad till vänster i en Holten klass II bänk



6. DISKUSSION

För att utvärdera extraktionseffektiviteten för Biorobot EZ1 användes modellorganismen *B. cereus* eftersom den är väldigt lik *B. anthracis*, men inte är lika farlig utan är en riskklass 2 organism. Det finns flera fördelar med att använda modellorganismer och i detta fall så innebar det att försöken kunde utföras i ett vanligt BSL-2 laboratorium. För att resultaten skall vara så överförbara som möjligt för analys av *B. anthracis* så valdes en *B. cereus* stam som genetiskt är väldigt lik B. anthracis och vars sporer också har liknande egenskaper.

Ett negativt provresultat i en DNA-baserad detektionsmetod med komplexa matriser kan av olika anledningar vara falskt negativt. Det kan bero på att mängden patogener i provet är så låg att den ligger under detektionsgränsen, men det kan också bero på att enzymer eller andra faktorer i matrisen bryter ned DNA:t i provet eller att DNA:t inte är tillräckligt rent och innehåller komponenter från matrisen som inhiberar PCR:en. Genom att tillsätta en känd mängd DNA av en positiv kontroll tillsammans med provet kan DNA extraktionsprocessen kontrolleras och inhibition och/eller degradering av DNA påvisas. Den positiva extraktionskontroll som användes här består av sälherpesvirioner typ1, PhHV-1. Detektion av den positiva kontrollen med PCR ger en uppfattning om extraktionens effektivitet och kvalitet.

När det gäller extraktionseffektiviteten för BioRobot EZ1 så är det svårt att dra några större slutsatser vad gäller utbyte då det visade sig att matriserna innehåller så mycket DNA i sig själva vilket gör det svårt att korrelera till spikningsmängden av *B. cereus* som dessutom inte var så hög i förhållande. Att koncentrationen av spikningskulturerna skiljer sig mellan de olika myndigheterna trots att samma protokoll användes kan bero på skillnader i substratet eller skillnader mellan olika inkubatorer t ex.

När det gäller renheten på det extraherade DNA:t så varierade det mellan matriserna, en del låg runt 1,8 (vid 260/280 nm) vilket anses vara optimalt för rent DNA medan en del andra låg betydligt högre respektive lägre. En högre kvot kan indikera att man har mycket RNA medan en lägre kan tyda på att man har fått med proteiner eller andra kontaminanter i sitt prov. Även små mängder magnetiska kulor som används för själva uppbindningen av DNA:t kan följa med i provet och påverka absorbansmätningen. Vissa av de erhållna mätvärdena får dock betraktas som lite osäkra då de ligger på eller till och med strax under vad som är detektionsgränsen för mätinstrumentet (2 ng/µl).

Trots att matriserna innehöll mycket annat DNA så lyckades vi få detektion med *rpoB*-assayen för samtliga 31 testade matriser även om vissa t ex jord behövde ett extra reningssteg efter extraktion för att få detektion och även om vissa matriser fick betydligt högre Ct-värden än andra förmodligen på grund av inhibition. För att förbättra detektionen för dessa matriser skulle man kanske kunna optimera förbearbetningssteget ytterligare, nu användes ett generellt protokoll, men mer anpassade protokoll skulle kunna tas fram för olika grupper av matriser där man har detektionsproblem.

I vissa matriser syns en tydlig inhibition av PCR:en (alt. DNA degradering) där Ct-värdet för extraktionskontrollen är mycket högre jämfört med Ct-värdet för kontrollmatrisen. Ett exempel är hallon där Ct-värdet för PhHV-1 ligger på 35,2 för hallon och i medeltal 32 för mjölkpulver.

Orsaken till att flera ospikade matriser blev positiva vid körningarna på SVA är inte helt utredd. En möjlig förklaring skulle kunna vara kontamination mellan prover under robotkörningarna, men det är inte så troligt eftersom vi inte erfarit detta tidigare inom RUB. En ordentlig rengöring av roboten följt av en extraktionsomgång med bara ospikat mjölkpulver på samtliga sex positioner gav även det posititivt resultat i 5 av 6 prover vilket tyder på att matrisen innehåller *Bacillus* DNA från början. Den *rpoB*-assay

som använts är designad så att den ska detektera alla arter av *Bacillus* och är därför inte specifik för enbart *B. cereus* som vi använde som modellorganism.

När det gäller möjligheten att arbeta med roboten på ett säkert sätt inne på ett BSL-3 laboratorium så var det mycket positivt att de KI-discus-tester som genomfördes med roboten i säkerhetsbänk på tre olika BSL-3 lab blev godkända och att även de kompletterande tester som gjordes inte gav något annat resultat. På Bakteriologens BSL-3 laboratorium på SVA har redan en EZ1 Advanced som köpts in av RUB tagits i bruk och den står numera permanent i den testade säkerhetsbänken. Roboten har även redan satts på prov under en kapacitetsövning arrangerad inom RUB där totalt 136 prover extraherades på roboten under två dagar med mycket gott resultat.

7. SLUTSATS

Sammanfattningsvis kan sägas att BioRobot EZ1 fungerar bra för att analysera olika provmatriser även om resultatet kan förbättras för vissa genom förslagsvis modifikationer av förbearbetningsprotokollet och att det går att arbeta med den på ett säkert sätt inne på ett BSL-3 laboratorium. Om ytterligare två exemplar av extraktionsroboten köps in genom FBD, och då förslagsvis EZ1 Advanced som är mer anpassad för att stå i en säkerhetsbänk än BioRobot EZ1, så skulle samtliga fyra myndigheter ha tillgång till en egen robot på BSL-3 laboratorium och då skulle vi vara bättre rustade vid ett eventuellt utbrott. BioRobot EZ1 som redan köpts in av FBD skulle kunna modifieras med ett litet stop så att luckan inte kan slå i filtret i säkerhetsbänken och fungera som en backup till de övriga robotarna eller användas för ytterligare utvärdering utanför BSL-3 laboratorium på de olika myndigheterna. Att skicka roboten mellan myndigheterna (FOI och SMI) visade sig fungera väl i praktiken, det tog ca 1-3 dagar med Posten Pacsoft och kostade ca 700 kr per tillfälle.

Provkapaciteten per extraktionsomgång för BioRobot EZ1 är relativ låg (6 st), men kompenseras av det enkla förfarandet och den snabba extraktionstiden (15-20 min) vilket innebär att man kan starta många extraktionsomgångar efter varandra under en arbetsdag. Eftersom det idag inte finns någon enkel och billig lösning för att arbeta säkert med större extraktionsrobotar inne på ett BSL-3 laboratorium är BioRobot EZ1 ett mycket bra alternativ.

Under december 2009 köptes ett exemplar av EZ1 Advanced in av FBD och förhoppningarna är att ytterligare ett exemplar kan köpas in under 2010.

8. REFERENSER

1. van Doornum, G.J., et al., *Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture.* J Clin Microbiol, 2003. 41(2): p. 576-80.

BILAGA 1

Teknisk rapport KI-discus-test och rökvisualisering av säkerhetsbänk vid SVA (Bakt)

TEKNISK RAPPORT

nne pharmaplan **Teknisk rapport**

Linköping
Organisationsenhet
Testgrupp Sverige
Handläggare
Lars Jansson
Telefon
Mobil: 076-128 98 92
E-post
ljas@nnepharmaplan.com

Kund	Beställningsdata	Granskad/godkänd av	Rapportfördelning	
Statens Veterinärmedicinska Anstalt Ulls väg 2B 751 89 Uppsala	Mail beställning 2009-03-03 Sara Frosth	Lars Jansson	Beställaren	1ex

KI-discus-test och rökvisualisering av säkerhetsbänk vid Enhet för bakteriologi, SVA, Uppsala.

Datum

2009-04-16.

Allmänt

Kontrollen har omfattat 1st. KI-discus-test av säkerhetsbänk klass 2.

Kontrollen har utförts i enlighet med Svensk Standard SS-EN 12469 och Arbetsmiljöverkets riktlinjer för mikrobiologiska säkerhetsbänkar.

Rökvisualisering och partikelmätning utförd både i och utanför säkerhetsbänken.

Sammanfattning

Säkerhetsbänk Holten 2000 1.2 S/N 96432000F uppfyller kraven enligt Svensk Standard SS-EN 12469 och Arbetsmiljöverkets riktlinjer för mikrobiologiska säkerhetsbänkar gällande personskydd.

Resultatet av KI-discus-test redovisas på bilaga 1.

Kontroll av spärrverkan och in/utläckage

Med mätsond kopplad till patrikelräknare placerad 5 cm från frontskivans nedre kant på säkerhetsbänkens utsida tillfördes kemisk rök mot roboten i bänken samt mot bänkens frontöppning.
Inga med rökvisualisering synbara in/utläckage mellan arbetskammare och rummet förekom.

Samma test utfördes sedan med en kall "PAO"-dimma (Emery 3004) riktat provocerande mot roboten.
Dimmans partiklardiameter ligger mellan 0,3 - 10µm.
Samtidigt uppmättes antalet partiklar på bänkens utsida.

Testen utfördes sedan med en person under arbetssimulering.

Resultatet av rökvisualisering och partikelmätning redovisas på bilaga 2.

Mätutrustning

Utrustning	Fabrikat / Modell	Serienummer	Kalibreringsdatum
Skyddsfaktortestare	KI-discus MK-2	700-4489	2008-10-31
Partikelräknare	Lighthouse 5100	031103001	2009-01-28
Rökgenerator	Invent Flow Marker 1	B7004290	-
Aerosolgenerator	TDA-6C	18723	-

NNE Pharmaplan AB
Testgrupp Sverige

Lars Jansson

nne pharmaplan®

"KI-Discus" test results

Bilaga: 1

ESTABLISHMENT: Statens Veterinär Anstalt **LOCATION:** Rum F:213 **DATE:** 2009-04-16

IDENTIFICATION: Holten 2000 1.2 S/N 96432000F **CLASS:** 2 **TIME:** 16.45

Test according to SS-EN 12469 **Test operator:** Lars Jansson

Test #		Number of Droplets counted (A)	Graticule Multiplication Factor (if appropriate) (B)	Total number of droplets recovered (AxB)=n	Protection factor $\frac{62*10^{\wedge 5}}{n}$	Result (Approved/ Not approved)	Comments
1	X1	6			1 033 333	A	Background test .
	X	2			3 100 000	A	X=4
	Y1	8			775 000	A	Y=0
	Y	2			3 100 000	A	
2	X1	1			6 200 000	A	
	X	1			6 200 000	A	
	Y1	1			6 200 000	A	
	Y	2			3 100 000	A	
3	X1	1			6 200 000	A	
	X	1			6 200 000	A	
	Y1	1			6 200 000	A	
	Y	1			6 200 000	A	
4	X1	1			6 200 000	A	
	X	6			1 033 333	A	
	Y1	5			1 240 000	A	
	Y	1			6 200 000	A	
5	X1	1			6 200 000	A	
	X	1			6 200 000	A	
	Y1	2			3 100 000	A	
	Y	1			6 200 000	A	

TEKNISK RAPPORT

Mätplats	Rums-klass	Aktivitet vid mätpunkten under provtagningstiden	Antal partiklar per ft³ ≥ 0,5µm	≥ 5,0µm
Frontluckans nedre kant	-	Bakgrundnivå i laboratoriet vid testens början	6 382	6,0
Frontluckans nedre kant	-	En person med händerna stilla på arbetsytan	7 883	7,9
Frontluckans nedre kant	-	En person med armen mot frontluckan	9 153	4,0
Frontluckans nedre kant	-	En person med en hand mot robotens arbetslucka	7 317	2,0
Frontluckans nedre kant	-	En person med en hand mot robotens startknapp	6 971	5,0
Frontluckans nedre kant	-	En person med en hand mot robotens startknapp. Med mätsonden placerad längst till höger i bänken	9 627	8,0

BILAGA 2

Testrapport KI-discus-test av säkerhetsbänk vid SVA (VIR)

TESTRAPPORT

Plats: SVA

Avdelning: VIP

Testobjekt: Säkerhetsbänk klass II med EZ1 (Robot)

Tillverkare, Typ: Holten S2010 1,2

S/N: 30402836 (VIR REN 2836)

Test av personskyddsfaktor

Utrustning: KI-discus mark 2 S/N: K01/02-0147 kal. datum: 2008-10-31

Testnr		Antalet avläsbara punkter	Skyddsfaktor 62x10^5/n	Resultat (Godkänt/Inte godkänt)
1	X	27	229 000	G
	X1	3	2 060 000	G
	Y	19	326 000	G
	Y1	9	688 000	G
2	X	41	151 000	G
	X1	11	563 000	G
	Y	8	775 000	G
	Y1	3	2 060 000	G
3	X	51	121 000	G
	X1	9	688 000	G
	Y	22	281 000	G
	Y1	2	3 100 000	G
4	X	34	182 000	G
	X1	3	2 060 000	G
	Y	2	3 100 000	G
	Y1	1	6 200 000	G
5	X	48	129 000	G
	X1	31	200 000	G
	Y	11	563 000	G
	Y1	7	885 000	G

Ja/Nej

Uppfyller kraven enligt EN-12469 Ja

Datum: 2009-08-28/Pass

Utfört av: Per-Erik Karlsson

BILAGA 3

Testrapport KI-discus-test av säkerhetsbänk vid FOI

TESTRAPPORT

Plats: FOI, Umeå

Avdelning: CBRN Säkerhet och skydd

Testobjekt: Säkerhetsbänk klass II

Tillverkare, Typ: Holten S-2010 1,2

S/N: 97442000E

Krav: >100 000 = <62 punkter

Test av personskyddsfaktor

Utrustning: KI-discus mark 2 S/N: K01/02-0147

Testnr		Antalet avläsbara punkter	Skyddsfaktor 62x10^5/n	Resultat (Godkänt/Inte godkänt)
1	X	5	1 240 000	G
	X1	3	2 060 000	G
	Y	3	2 060 000	G
	Y1	5	1 240 000	G
2	X	4	1 550 000	G
	X1	5	1 240 000	G
	Y	6	1 030 000	G
	Y1	4	1 550 000	G
3	X	7	885 000	G
	X1	5	1 240 000	G
	Y	4	1 550 000	G
	Y1	2	3 100 000	G
4	X	10	620 000	G
	X1	1	6 200 000	G
	Y	1	6 200 000	G
	Y1	1	6 200 000	G
5	X	4	1 550 000	G
	X1	2	3 100 000	G
	Y	2	3 100 000	G
	Y1	1	6 200 000	G

Ja/Nej

Uppfyller kraven enligt EN-12469 Ja

Datum: 2009-06-02

Utfört av: Per-Erik Karlsson

STATENS VETERINÄRMEDICINSKA ANSTALT

SMITTSKYDDSINSTITUTET

LIVSMEDELSVERKET
NATIONAL FOOD ADMINISTRATION

FOI