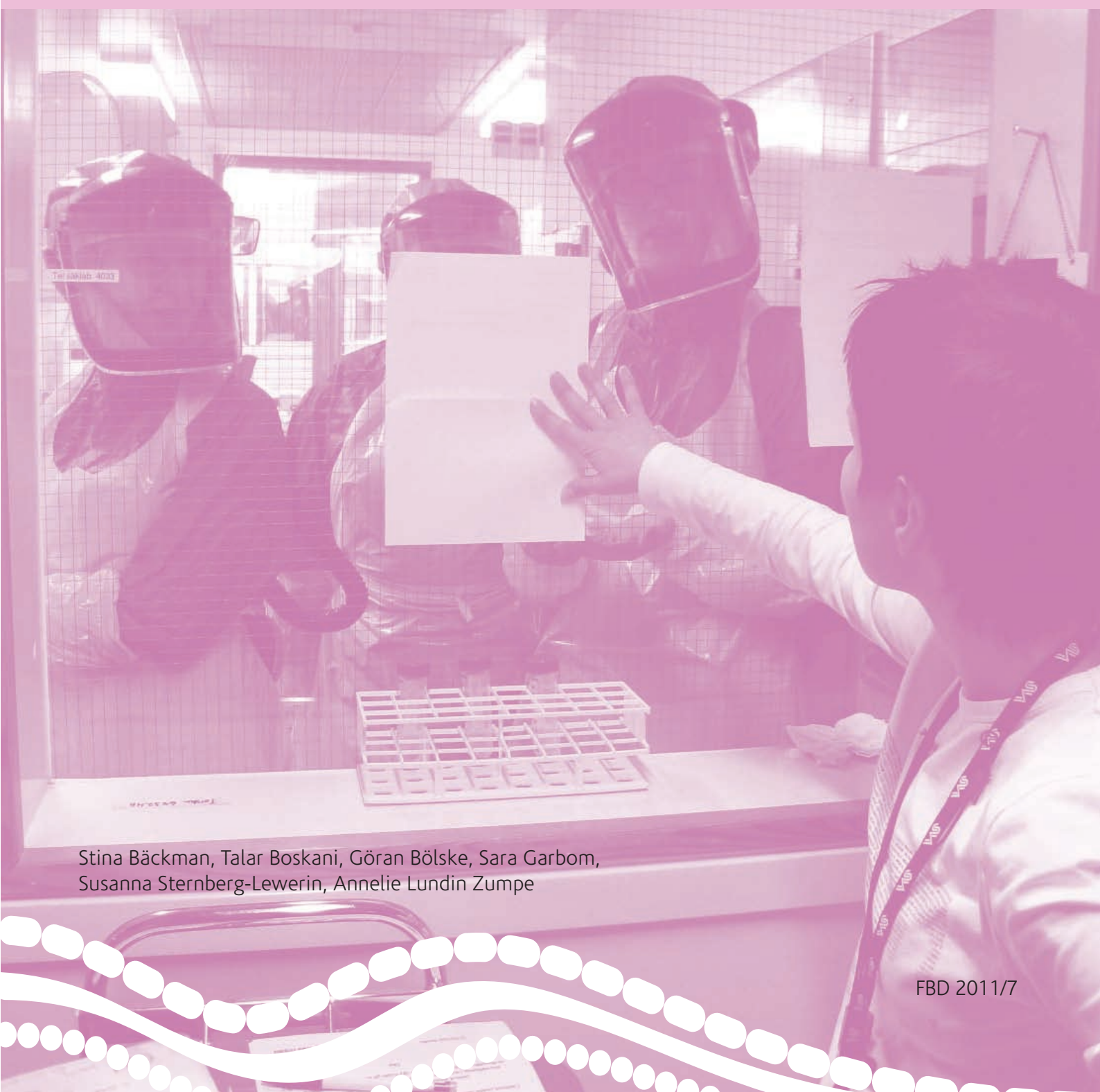


## PROJEKTRAPPORT

# Logistik och analysövning



Stina Bäckman, Talar Boskani, Göran Bölske, Sara Garbom,  
Susanna Sternberg-Lewerin, Annelie Lundin Zumpe

## ABSTRACT

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

In this project, a logistic and diagnostic exercise was planned, performed and evaluated. Part of the FBD quality system that is currently being established, for example referral and sample protocols, was also evaluated.

The standard transport routines for diagnostic samples were followed during the exercise and showed that transportation between the laboratories is efficient. All laboratories reported correct analyses results within the timeframe of the exercise. The protocols tested are functional but require modifications.

In conclusion, FBD is a functional network that can assist in cases where larger sample sets need to be directed between the institutes and for confirmation of analyses results and interpretation thereof. Realistic exercises are important to perform on regular basis in order to improve the routines of the diagnostic chain and to prepare the staff for difficult situations.

Titel:	<b>Logistik och analysövning</b> Publ.nr MSB332, ISBN 978-91-7383-176-5
Projektid:	16 februari 2010 till 9 juni 2011
Projektledare:	Stina Bäckman 2011, Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI), Sara Garbom 2010, Livsmedelsverket
Projektgrupp:	Talar Boskani, Smittskyddsinstitutet (SMI), Göran Bölske, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Susanna Sternberg-Lewerin, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Annelie Lundin Zumpe, Livsmedelsverket
Kontaktperson i FBDs styrgrupp:	Annelie Lundin Zumpe e-post: Annelie.LundinZumpe@slv.se
Styrgrupp:	Mats Forsman ordf. 2010 (FOI), Mona Byström (FOI), Hans Lindmark (Livsmedelsverket), Annelie Lundin Zumpe ordf. 2011 (Livsmedelsverket), Caroline Schönning (SMI), Andreas Bråve (SMI), Rickard Knutsson (SVA), Viveca Bäverud (SVA)
Finansiering:	Projektet har finansierats genom tilldelning av MSB anslag 2:4 Krisberedskap
Layout:	Tecknarn i Roslagen
Tryck:	Danagårds Grafiska

## INNEHÅLL

Sammamfattning	3
1. Bakgrund	4
2. Syfte och mål	5
2.1 Delmål	5
2.2 Avgränsningar	5
3. Material och metoder	6
3.1 Inventering och Förberedelser	6
3.2 Genomförande och deltagare	6
3.3 Dokumentation	8
3.4 Scenario	8
3.5 Datainsamling	9
3.6 Utvärdering och återkoppling	9
3.7 Säkerhet	10
4. Resultat	10
4.1 Provförberedelser	10
4.2 Analysstrategi och förfarande	11
4.3 Övningsresultat	11
4.4 Observationer och förbättringsförslag	13
4.5 förpackning och märkning	15
4.6 Transportdokument	15
5. Diskussion	15
6. Slutsatser	17
7. Förslag på fortsatt verksamhet	17
8. Bilagor	18
8.1 Bilaga 1	
8.2 Bilaga 2	
8.3 Bilaga 3	
8.4 Bilaga 4	
8.5 Bilaga 5	
8.6 Bilaga 6	
9. Referenser	18
10. Begrepp och förkortningar	19

## SAMMANFATTNING

Forum för beredskapsdiagnostik (FBD) är ett samarbete mellan fyra svenska myndigheter, Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Smittskyddsinstitutet (SMI) och Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI). Ett av FBD:s huvudmål är harmonisering av metoder och utrustning mellan de deltagande myndigheterna i syfte att öka beredskapen i Sverige inför en eventuell B-händelse, dvs. där sjukdomsalstrande mikroorganismer utgör en fara.

Syftet med den logistik och analysövning som genomförts och beskrivs i denna rapport var att pröva hur transport av prover mellan de myndigheter som ingår i FBD fungerar i praktiken. Även utvärdering av remiss- samt provsvarsprotokoll från FBD:s kvalitetssäkringsmanual för analys av prover var en målsättning med övningen. I övningen ingick därför provupparbetning, analys, rapportering av resultat och utvärdering av kvalitetssäkringsrutiner rörande rapportering, datahantering och kommunikationssäkerhet.

Det kunde under övningen snabbt konstateras att rutiner för effektiv transport av prover från SVA till SMI respektive FOI fungerar och är etablerade när de skickas som UN3373 (diagnostiskt prov). De genomförda laboratorieanalyserna rapporterades korrekt resultat av alla myndigheter. Vidare visade övningen att protokoll för provremiss och provsvar kan användas, men behöver utvecklas vidare för att rymma ett mer detaljerat provsvar. De viktigaste slutsatserna från övningen är att FBD kan vara ett användbart nätverk vid kris för fördelning av prover mellan myndigheterna och för laborativt stöd vid konfirmering av resultat. Det är även viktigt att genomföra verklighetslika övningar där 'okända provmatriser' analyseras under tidspress och att övningar som denna bör genomföras varje år inom FBD. Övningen gav även värdefull insikt hur rutiner på varje myndighets säkerhetslaboratorium kan förbättras.

## 1. BAKGRUND

Forum för beredskapsdiagnostiks (FBD:s) målsättning är att öka den nationella kapaciteten för analys av riskklass 3-agens vid utbrott eller andra större händelser genom samutnyttjande av såväl tekniska som personella resurser. En effektiv samverkan förutsätter en harmonisering av metodik och utrustning för analys och logistik och att analysdata kan skickas mellan myndigheter på ett säkert sätt innan analysvar skickas till beställaren.

FBD genomförde 2010 en kommunikationsorienterad utbrotsövning med riskklass 3-agens. Övningen syftade övergripande till att pröva FBDs roll och att kartlägga och utvärdera informations- och beslutsvägar samt analyskapacitet inom och mellan myndigheterna. De slutsatser och resultat från övningen 2010 föranledde initieringen av det övningsprojekt som genomfördes 2011 med fokus att belysa den fas i ett utbrott eller händelse där FBD aktiveras laborativt. Övningen utformades för att belysa både logistiska delar såsom rutiner och riskbedömningar vid transport och hantering av biologiskt material av riskklass 3 och rutiner runt provregistrering, analys, tolkning av data och analysvar.

Grunden för FBDs verksamhet är ett samverkansavtal som undertecknats av de fyra myndigheternas generaldirektörer. FBD är operativt i kris endast genom de ingående myndigheterna, inte i sig själv. FBDs roll är att vid behov samordna laborativ kapacitetsförstärkning mellan de ingående myndigheterna och styra prover så att de hamnar på rätt laboratorium. FBD kan även ha en roll vid analys av specialprover där det är oklart vem som har bästa förmågan analysera proverna. Det finns ovanliga provtyper, t.ex. omgivningsprov, där FBD kan ha en roll för fördelning av prover mellan myndigheterna. Samverkan inom FBD har lett till mycket goda och väl upparbetade personliga kontakter mellan personal vid de ingående myndigheterna och detta föranleder utbyte av både kunskap och metodik inom många olika områden. Dessa kontakter och kontinuerliga utbyten möjliggör effektiv rådgivning och informationsutbyte angående metodik och provflöde till och mellan myndigheterna.

## 2. SYFTE OCH MÅL

Övningens syfte var att pröva om det är möjligt att vid kris skicka prover mellan myndigheterna för analys. Behovet av att skicka prover kan uppstå i följande situationer:

1. **En myndighet behöver konfirmera analysresultat.**
2. **Antalet prover överstiger en myndighets kapacitet.**
3. **Ett specialprov behöver distribueras till den mest lämpade myndigheten.**

Vid den här övningen övades situation nummer 1.

Det lades ingen vikt på tidsaspekten när proven svarades ut. Under denna övning prövades även om FBD kan ha en operativ roll vid en händelse och hur det skulle kunna gå till. Vi ville även utreda respektive myndighets förmåga att analysera olika provtyper.

Övningen hade följande syften:

- **Utveckla och utvärdera befintliga rutiner för transport av prov med riskklass 3 agens mellan myndigheterna inom FBD.**
- **Utvärdera analysförmåga genom ringtest.**
- **Utvärdera varje myndighets förmåga för provanalys med ovanliga provmatriser.**
- **Svara på frågan: Hur fungerar FBD operativt vid ett specifikt scenario.**

### 2.1 DELMÅL

- **Undersöka olika möjligheter för transport av riskklass 3 agens.**
- **Ta fram gemensamma SOPar för riskbedömning och rutiner vid provtransport och hantering av riskklass 3 agens.**
- **Planera och utföra övning/ringtest.**
- **Sammanställa resultaten i en rapport.**

### 2.2 AVGRÄNSNINGAR

Då FBD har gjort en avgränsning mot andra aktörer gällande transport av prov från provtagningsställe till första myndighet så undersöktes endast transport mellan FBD-myndigheterna.

I övningen utvärderas inte kapacitet med avseende på provkvantitet utan endast flödet av ett fåtal prov från en myndighet till övriga.

## 3. MATERIAL OCH METODER

### 3.1 INVENTERING OCH FÖRBEREDELSE

#### 3.1.1 Seminarium om förpackningar och märkning vid transport av biologiskt material

13 april 2010 på Smittskyddsinstitutet

Dagen började med ett mycket informativt seminarium av Ewa Ljungdal-Ståhle kring transporter av smittförande ämnen (se presentation på wikin). Vi fick se en rad olika förpackningar för transporter, bl.a. en låda som kan vikas på olika sätt beroende på om det är riskklass A eller B som ska skickas. En annan bra förpackning var en platt låda som kan skickas som brev.

#### 3.1.2 Projektmöten angående transport och scenario

- 2 juni 2010 – Telefonmöte - scenariot
- 8 juni – Projektavstämning, Kista
- 9 september – Träff med projektgrupp, övningsscenario bestäms
- 1 december – Projektavstämning, Uppsala/Stockholm
- 31 januari 2011 – Telefonmöte
- 14 mars 2011 – Telefonmöte ang. övningen

### 3.2 GENOMFÖRANDE OCH DELTAGARE

#### 3.2.1 FBD-övning 2011

Övningen startade förmiddagen måndagen den 21:a mars och avslutades eftermiddagen, fredagen den 25:e.

#### 3.2.2 Aktörer

Följande aktörer deltog under övningen:

Totalförvarets forskningsinstitut (FOI)

Smittskyddsinstitutet (SMI)

Livsmedelsverket

Statens Veterinärmedicinska anstalt (SVA)

Försvarsmakten Skyddcentrum (SkyddC)

SVA och Livsmedelsverket utförde övningen tillsammans i det gemensamma laboratoriet genom samverkansprojektet Resurslaboratorium för Beredskapsdiagnostik (RUB). Därför refereras SVA och Livsmedelsverket som RUB i rapporten.

#### 3.2.3 Övningen

Projektgruppens medlemmar agerade lokala övningsledare på respektive myndighet under övningsveckan. Susanna Sternberg-Lewerin på SVA agerade länsveterinär när det behövdes för att stressa de övande att ge analysvar så fort som möjligt. SkyddC hade ingen observatör under veckan, men förde logg.





**Huvudövningsledare:** Stina Bäckman, FOI

**Lokala övningsledare som även fungerar som observatörer och utvärderare:**

- a. FOI – Stina Bäckman och Eva Larsson
- b. SMI – Talar Boskani
- c. RUB - Annelie Lundin Zumpe och Catarina Nilsson

**Aktivt övande:**

- d. FOI – Mona Byström, Edvin Karlsson och Anna Macellaro
- e. SMI - Tara Wahab
- f. Livsmedelsverket – Moa Lavander och Paula Ågren
- g. SVA – Sara Ehlers, Olga Stephansson och Yvonne Andreasson
- h. SkyddC – Eva Lundmark och Maria Muribi

SkyddC ingår inte i FBD, men deltog i övningen genom att analysera proverna med egna metoder, de svarade ut resultaten till övningsledaren och SVA.

## 3.3 DOKUMENTATION

### 3.3.1 Uppföljningsdag

Utvärdering 6 april 2011 i Uppsala. Projektgruppens medlemmar träffades och ett telefonmöte genomfördes med de övade där alla fick möjlighet att diskutera och ge synpunkter om övningen.

### 3.3.2 Rapport

Resultaten från övningen inklusive ringtestet och utvärderingen sammanfattas i denna rapport och projektet rapporterades även muntligt på gemensam projekträff för FBD den 9 juni 2011.

## 3.4 SCENARIO

### 3.4.1 Bakgrund

Scenariot utarbetades genom en gemensam process vid ett antal projektmöten. Olika scenarios och provmatriser diskuterades och följande scenario fastställdes:

*Ett familjeföretag i Uppländska Roslagen bedriver slakt av djur och produktion av ekologiska charkuteriprodukter såsom köttbullar och korv. Företaget har skickat egenkontrollprov från produktionsanläggningen till Sehr Gut Analyse (SGA) i Tyskland där bl.a. Bacillus cereus analyseras. Familjeföretaget kontaktas någon vecka senare av SGA eftersom man från ett köttbulleprov har isolerat kolonier med misstanke om Bacillus anthracis (bacilluskolonier utan hemolys på blodplatta). Tyvärr har plattan kommit på villovägar och köttbulleprovet har redan kastats. Färgning med gammalt metylenblått och mikroskopi av den misstänkta kolonin visar grampositiva stavar med rosafärgad kapsel.*

*Familjeföretaget kontakter genast Livsmedelsverket för råd om hur de ska agera och de sätts i kontakt med ordförande för Livsmedelsverkets epizootigrupp som i sin tur kontakter SJV och SVA. Så vitt det är känt har inga djur på de gårdar som slakteriet använder visat några symtom som skulle tyda på mjältbrand. Epizootigruppen kommer fram till att produktionsanläggningen måste stängas och en länsveterinär engageras för provtagning. Då det rör sig om ett flertal olika matriser kommer man i epizootigruppen fram till att FBD ska kopplas in och att de prover som tas ska analyseras på samtliga myndigheter inom FBD för att säkerställa ett så snabbt provsvar som möjligt (i övningen kommer dessutom SkyddC vara med). De provtyper som är aktuella är; nötblod, bindemedel, köttbullar samt omgivningsprov (svabbar) från produktionslinjen. Länsveterinären tar prov och fördelar så att ett prov av varje provtyp packats i fyra olika behållare som nu är på väg med budbil till SVA. Proven är förpackade och märkta enligt regelverket för provkategori UN3373 (diagnostiskt material). Viveca Båverud, chef för bakteriologiska avdelningen på SVA har kontaktat både Andreas Bråve, chef för enheten för högpatogeta mikroorganismer på SMI och Mats Forsman, forskningsledare på FOI som i sin tur delegerat uppgiften till personal som kan utföra diagnostiken på säkerhetslaboratorium.*

Vi kunde härmed fundera över spikning och hur mycket proverna skulle ympas med. Livsmedelsverket och SVA har byggt upp kunskap kring matriser och detektionsgränser som projektgruppen kunde ta del av och ha nytta av i ärendet. Ett ringtest skulle också ingå i övningen där projektgruppen kom fram till att använda DNA från samma agens som i scenariot. DNA preparerades på FOI från stammar med pXO1- och pXO2 plasmiderna var för sig med EZ1-robot och polades efter negativt steriltest. Detta gjordes för att ringtestet skulle utföras med prover som, i den utsträckning det är möjligt, liknar ett virulent *B. anthracis* prov (positivt för alla tre markörerna i den specifika FBD mjältbrand-PCR metoden).



### 3.4.2 Rapport

För att alla övande skulle planera och boka övningsveckan skickades information angående övningen ut under vecka 4 via e-post eller meddelades muntligen från övningsledare på respektive myndighet.

## 3.5 DATAINSAMLING

### 3.5.1 Ringtest

Projektgruppen bestämde att provsvaret för ringtestet skulle lämnas till huvudövningsledaren senast en vecka efter att proverna skickats ut.

### 3.5.2 Prov

Enligt scenariot skulle provsvar lämnas till den myndighet som koordinerade provutskicket när man ansåg sig färdig vid respektive myndighet.

### 3.5.3 Logg

Observatören/övningsledaren på varje myndighet förde en logg över vad som hände hos de övande under övningsveckan. De övande ansvarade för att dokumentera vad som gjordes (både laborativt och vilka kontakter som togs samt vad som då bestämdes/sades) inom övningen och denna logg skulle överlämnas till den lokala övningsledaren inför utvärderingsmötet. Logg fördes för att underlätta utvärdering och sammanställning.

#### *Avgränsningar*

- Inga externa kontakter skulle tas under övningen (utöver med övningens andra deltagare) och de kontakter som togs internt vid respektive myndighet skulle först stämmas av med övningsledaren innan kontakt togs.
- När kontakter togs var det essentiellt att direkt uppge att det var en övning.

## 3.6 UTVÄRDERING OCH ÅTERKOPPLING

Utvärdering och återkopplingsmöte hölls på torsdag eftermiddag för de som medverkade i övningen från RUB och SMI samt på fredag eftermiddag för de från FOI och SkyddC. Samtidigt lämnades en enkät.

### 3.6.1 Följande utvärderades:

- Scenario
- Protokoll
- Ringtest
- Transport

### 3.6.2 Protokoll

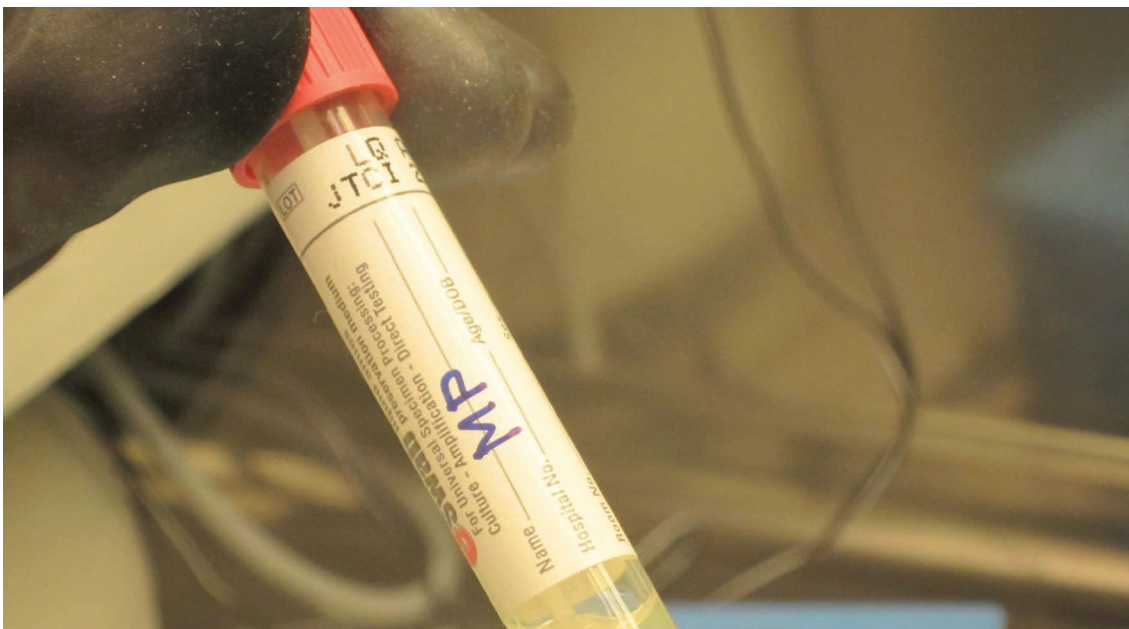
Vi använde oss av två protokoll, provremiss och provsvar, som togs fram i kvalitetssäkringsprojektet 2010. Innan protokollen tas i bruk är det viktigt att alla på myndigheterna har samsyn vad det gäller termer och begrepp samtidigt som protokollen är levande dokument som kontinuerligt behöver justeras. Övningen möjliggjorde att pröva protokollen.

### 3.6.3 Enkät för deltagare vid övningen

En enkät (bilaga 5) delades ut till deltagarna vid återkopplingsmötet, enkäten skulle besvaras inom en vecka när varje övningslag funderat och bearbetat det som hänt under övningsveckan. Syftet med enkäten var att få deltagarnas syn på övningen och mäta hur syfte och mål uppfyllts.

### 3.7 SÄKERHET

En riskbedömning för transporten av proverna gjordes i förväg (bilaga 6). I övrigt gällde de på myndigheten ordinarie säkerhetsbestämmelser för arbete med riskklass 3 agens.



## 4. RESULTAT

### 4.1 PROVFÖRBEREDELSE

Provtyperna, som förbereddes samma dag som scenariot presenterades, var nötblod (som var negativt för *B. anthracis*), köttbulle, miljöprov (svabb) och bindemedel (potatismjöl). Köttbulle och miljöprov spikades med sporer från apatogena *B. anthracis* stammen 4229 som saknar den ena virulensplasmiden och bindemedel (potatismjöl) spikades med *B. cereus* sporer stam F2085/98 (ref 1). *B. cereus* användes för att förvirra och eventuellt göra analysen mer komplicerad. Köttbullen injicerades med hjälp av pipett med ca 4000 *B. anthracis* sporer mitt i köttbullen och svabben med ca 400 *B. anthracis* sporer i en ml (s.k. E-svabb). När bindemedlet spikades med *B. cereus* klumpade det ihop sig, så trots att provet skakades om var det troligtvis inte homogent. Därför, beroende på hur delprov togs ut för extraktion, kunde provet bli positivt eller negativt för *B. cereus*. Det fanns en risk att sporer germinerat till vegetativa celler i matrisen innan analys påbörjades, men eftersom proven hölls väl kyllda var risken låg. Eftersom alla myndigheter utom SkyddC fick negativt PCR-resultat vid direktextraktion av proven tyder det på att ingen germinering skett innan analys påbörjades.

## 4.2 ANALYSSTRATEGI OCH FÖRFARANDE

Analysstrategin varierade mellan myndighetslaboratorierna. Inom RUB delades varje provtyp upp i tre delprov som sedan extraherades med Biorobot EZ1 och som i sin tur analyserades i triplikat för varje Realtids-PCR assay. I RUB:s metod används ca 2 gram matris per delprov vilket gjorde att allt provmaterial användes upp för t.ex. bindemedlet. En nackdel med detta är att om man senare skulle vilja komplettera med ytterligare analys finns inget material kvar, men samtidigt har man ett säkrare provsvar från materialet. Odling gjordes från varje delprov på oselektivt medium (blodagar). Säkerhetsbanken dekontaminerades efter att varje provtyp upparbetats med pH justerat 10 % klorin för att minska risken för kontamination mellan proverna.

FOI tog ut ett delprov från varje provtyp där DNA extraherades med två olika manuella metoder, QIAamp DNA Mini Kit samt QIAamp DNA stool Mini Kit, och varje prov analyserades i tripletter med Realtids-PCR. Bänk och pipett sanerades med EtOH mellan varje provtyp. Odling utfördes först på selektivt medium (PLET agar), men senare även på oselektivt (LA-platta).

SMI tog ut ett delprov från varje provtyp som kokades i PBS vid 99°C i 30 min för avdödning och extraherades därefter med NucliSENS® miniMAG® (Biomerieux) och dubletter analyserades i Realtids-PCR. Bänk och pipett sanerades med NuCidex mellan varje provtyp. SMI använde 10 µl sälherpesvirioner som står i myndighetens SOP jämfört med övriga laboratorier som använde FBD:s protokoll med 5 µl extraktionskontroll (sälherpesvirioner). Två andra delprov togs ut för odling på oselektivt medium (blodagar) och för germinering innan extraktion.

SkyddC hade problem med autoklaven samt luftslussen och behövde teknikerstöd så proverna fick stå i kylskåp över natt. Provupparbetningen och extraktionen startades under onsdagen. De tog ut ett delprov från proverna som extraherades med två metoder, QIAamp DNA stool Mini Kit samt Epicentre Masterpure, som därefter analyserades i dubletter med Realtids-PCR. De använde en annan Realtids-PCR-assay med SybrGreen kemi jämfört med FBD-myndigheterna.

Projektgruppen har kommit fram till att FBD kvalitetssäkringsprojektet bör standardisera antalet replikat av proverna som ska DNA-extraheras samt antal replikat vid Realtids-PCR.

I FBD-projektet 2009 som handlade om utvärdering av DNA-extraktionsrobot användes sälherpesvirioner som extraktionskontroll. Det ansågs då vara viktigt att virionerna tillsattes precis i anslutning till att DNA extraktionen med roboten startades för att systemet skulle vara så stabilt och jämförbart som möjligt. En sak som kom fram i den här övningen är att internkontrollen fungerar även när manuella DNA extraktionsmetoder utförs. Sälherpesvirionerna användes och fungerade här vid fyra olika manuella DNA extraktionsmetoder. SMI (63°C 20 min), FOI (65°C 15 min) och RUB (70°C 15 min) använde sig av olika germineringsprotokoll där man vid den här övningen kan se att alla fungerar. Temperatur och tid för germinering rekommenderar projektgruppen att standardisera därför bör en jämförelse göras för att utreda optimal temperatur och tid för germinering av olika provtyper.

## 4.3 ÖVNINGSRESULTAT

Scenariot presenterades på informationsmötet på respektive myndighetslaboratorium under måndagen övningsveckan. Proverna anlände enligt scenariot SVA under tisdag morgon för att senare transporteras till SMI och FOI. Scenariot och övningen uppfattades hos alla myndigheterna som väldimensionerade.

Transporten från SVA till SMI och FOI fungerade utan anmärkning. De ordinarie rutinerna på SVA för provutskick UN3733 tillämpades. Budbil till SMI gick iväg kl. 10:30 och ankom labbet kl. 13:10. Proverna från övningen blev liggande en stund på SMI innan de övande fick vetskap om att paketet

anlänt. Transport till FOI i Umeå med JetPak gick iväg kl. 9:30 och ankom labbet kl 13:00. Sen tog det ytterligare 40 min innan paketet anlände SkyddC. Det gick alltså ungefär lika snabbt att transportera till Umeå som till Stockholm.



I övrigt användes olika analysstrategi av proven av de olika myndighetslaboratorierna. Generellt kan sägas att extraktionskontrollen (sälherpesvirioner, PhHV-1) fungerade med alla metoder och att germinering krävdes för säkert PCR-resultat. Vidare finns observationer av effektiviteten mellan roboten å ena sidan och manuella preparations kit å andra sidan. QIAamp DNA stool Mini Kit och Epicentre Masterpure verkar vara de DNA extraktionskit som ger positiv signal vid direktextraktion, men de tar å andra sidan längre tid att hantera jämfört med EZ1 roboten. (Bilagor 1,2,3 och 4).

### 4.3.1 Resultat från ringtest

Tabell 1. Resultat av ringtest från de olika myndigheterna Ct-värden för analyserade prover. Standardavvikelse inom parentes

	Markör	RUB	SMI	FOI	Markör	Skydd-centrum
					SYBR	
DNA-A	5345	23,71 (0,15)	22	23,69 (0,22)	Ba1 (rpoB/Krom)	20
	pXO1	25,4 (0,03)	24	26,09 (0,16)	Ba2 (cap)	19
	pXO2	22,48 (0,07)	17	22,68 (0,21)	Ba3 (lef)	22
	Sälherpesvirioner	33,3 (0,11)	31	33,37 (0,15)	Ba4 (krom)	19
	rpoB		24	24,26 (0,02)	pXO1 ABI (probe)	26
					pXO2 ABI (probe)	26
DNA-B	5345	N/A	N/A	N/A	Ba1 (rpoB/Krom)	N/A
	pXO1	N/A	N/A	N/A	Ba2 (cap)	N/A
	pXO2	N/A	N/A	N/A	Ba3 (lef)	N/A
	Sälherpesvirioner	N/A	N/A	N/A	Ba4 (krom)	N/A
	rpoB		N/A	N/A	pXO1 ABI (probe)	N/A
					pXO2 ABI (probe)	N/A

Antal replikat vid PCR körningar är inte standardiserat som man kan se i tabell 1. Myndigheterna använde olika realtids-PCR instrument vilket kan vara en förklaring till de skillnader som ses i resultatet från ringtestet. Det fanns ingen anvisning om vilket tröskelvärde som skulle väljas och därför gjorde myndigheterna olika för att analysera data, manuellt eller automatiskt av instrumentet. Det går ändå att se att alla myndigheterna fått likvärdiga analysvar och Ct-värdena ligger mycket nära varandra.

### 4.4 OBSERVATIONER OCH FÖRBÄTTRINGSFÖRSLAG

Livsmedelsverket kontrollerade adress och kontaktperson innan proven skickades vilket var bra och en rutin som måste finnas.

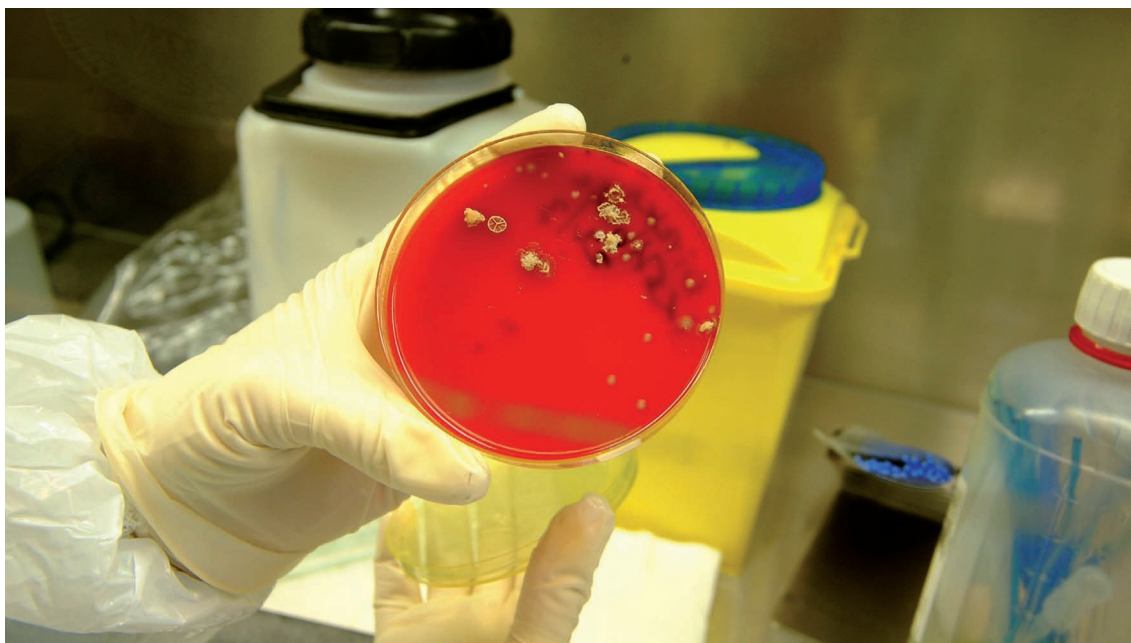
Rutiner inom den egna myndigheten prövades och stärktes. Kunskap för agens eller hanteringsfrågor kan i vissa fall vara personbundet och vid övningen kom det fram om det fungerade eller inte.

Alla arbetade lugnt och metodiskt inne på säkerhetslab och rutiner följdes. Allt arbete inne på säkerhetslaboratorium är krävande vilket måste beaktas, avbytare och vila är viktiga komponenter



för att uppnå säkerhet och god uthållighet. Inom RUB var en person inne lite för länge första dagen (nästan 4 timmar). Andra dagen ringde man in till säkerhetslabbet och hörde status och frågade när det var lunchdags. Detta är en bra rutin eftersom det kan vara svårt att själv känna trötthet och man kan tappa tiden.

Osäkerhet fanns angående vilken typ av svabb som skulle komma. RUB diskuterade igenom olika alternativ med FOI dagen innan och löste hur man skulle göra efter att provet packats upp. Även de andra matriserna diskuterades då analys skulle påbörjas, men det hade varit bra om alla myndigheterna varit med i diskussionen samtidigt.



Vid odling från bindemedlet konstaterades att Bacilluslika bakterien gav hemolys på plattan, detta innebär att det inte kunde vara *B. anthracis*. Provet kunde därför konstateras negativt med avseende på frågeställningen *B. anthracis* och man kunde gå vidare med de övriga proverna.

Telefonlistan för övningen var lite otydlig. Vi skulle ha preciserat bättre olika personers uppgifter i övningen. Samtidigt skulle vi ha lagt lokal övningsledare sist eftersom det fanns tendens att ringa första numret/namnet på listan.

SkyddC var med i övningen och tyckte det var nyttigt att se vilka metoder som används inom FBD och känna hur det är att jobba med levande material i containern.

Det är bra om man i förväg kan räkna på hur mycket av varje provtyp labbet behöver för att kunna analysera fler gånger om första analysen inte fungerar och även för uppföljning och lagring av prov (forensisk analys).

Hur ska proven svaras ut diskuterades, via mail, Wikin, fax, telefon eller post? Det är en säkerhetsfråga och gruppen kom fram till att det bästa är att först ringa och sedan skicka svaret med vanlig post.

Provsvarsblanketten fungerade till viss del men behöver justeras. Det var svårt att förstå 'labidentitet' på remissen som lämnades blankt. Detta är ett nummer som fås efter registrering i SVALA på SVA. Ska labidentitet finnas kvar eller ska det ersättas med något annat?

Att tänka på inför en ny övning:

- Bra med fler observatörer. Har man parallella händelser är det bra att kunna dela på sig. Om man blir sjuk eller behöver gå ut från BSL3 ett tag så är det bra att fler observatörer finns att tillgå.
- Bättre att ha en telefon och person som alltid är nåbar. RUB hade inte utsett någon som var sambandscentral/koordinator för kommunikation med de andra myndigheterna och därför var det ibland svårt för SMI och FOI att nå fram eftersom bara en person hade jobbmobil.

#### 4.5 FÖRPACKNING OCH MÄRKNING

Föreläsning av Ewa Ljungdahl-Stähle på SMI angående transport av farligt gods. Föreläsningen gav mycket information angående förpackningar och vilka storlekar som finns kommersiellt idag samt hur försändelser ska märkas.

#### 4.6 TRANSPORTDOKUMENT

Ambitionen i projektet var att ta fram ett gemensamt transportdokument för FBD. Efter seminariedagen på SMI och efter att ha fört en diskussion med några företag kom projektgruppen fram till att ett levande dokument behövs som ska uppdateras årligen. Projektgruppen beslutade att det bästa och enklaste sättet för transport av prov av den här typen är att följa den egna myndighetens normala rutiner som uppdateras kontinuerligt.

## 5. DISKUSSION

Övningen genomfördes 21-25 mars 2011 med i huvudsak gott utfall. I scenariot kom frågeställningen från ett litet familjeföretag som bedrev slakt och producerade charkuterivaror och funnit misstanke om mjältbrand i ett prov från köttbulle i egenkontrollen. Ytterligare provtagning skedde därefter av länsveterinär som skickade proven till SVA. Här började själva övningen med att SVA skickade prover vidare till SMI, FOI och Försvarmaktens SkyddC.

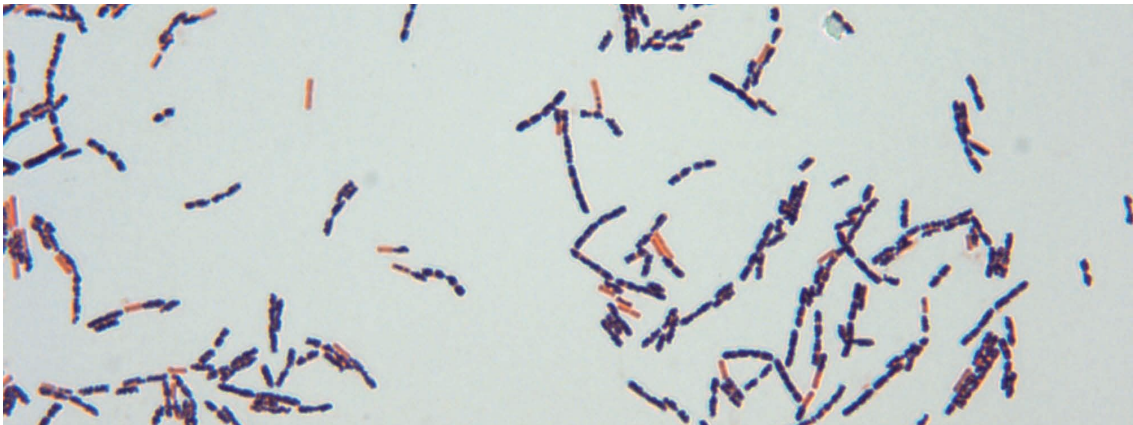
Beroende på prisklass går transporten olika fort när transportfirmor anlitas. Vid lägre prisnivå plockar budet ofta upp fler paket som ska levereras under färden. Vid högre prisnivå går leveransen från dörr till dörr. I den här övningen, skickades proven med den högre prisnivån och det tog 2,5 timme vilket kan vara bra att komma ihåg till ett annat tillfälle. En förutsättning för att paketet skulle komma fram samma dag till Umeå var att förpackningen skulle vara klar för avhämtning kl. 09.30. SVA:s godsmottagning har stor rutin av att skicka och ta emot försändelser vilket märktes i övningen. Det finns instruktion på SVA för transport av farligt gods och även centrallager av provburkar/frigolitlådor och kylklampar.

De övande i RUB tyckte att det hade varit bra om man fått diskutera provmängd som skulle tas med epizootologen på SVA eller ansvarig provtagare före provtagning eftersom det troligtvis skulle ha gått till så i verkligheten.

Provupparbetningen är ett viktigt steg i analysen för säkert analysvar. Många olika provtyper i samma ärende leder till att provupparbetningen tar längre tid och val av metod måste avvägas noggrant, viktigt att beakta är också risken för korskontamination. För varje provset bör en avvägning göras beroende på provantal och behov av bevissäkring (forensik). På RUB användes automatisk DNA extraktion med

EZ1 roboten som kan extrahera 6 prov per omgång (tar ca 20 min) vilket fungerade smidigt. Roboten står inne i en klass-2 bänk. FOI och SMI har idag inte EZ1 roboten inne på säkerhetslaboratoriet, utan använder manuell extraktion. Automatiserad extraktion med EZ1 underlättar analys av större provserier och därför rekommenderar projektgruppen att även SMI och FOI sätter in EZ1 robot på sina respektive säkerhetslaboratorium.

I övningen använde myndigheterna olika agarplattor, blodagarplattor och PLETplattor. *B. cereus* är normalt en art som inte växer på selektiva PLET agarplattor, men just den här stammen som användes i övningen är ett undantag. Odling behövs för att konfirmera PCR resultaten och även för fortsatt typning och forensiska frågeställningar och vi kan nu i och med det pågående odlingsprojektet inom FBD få lära oss mer om medier och agarplattor och implementera de bästa alternativen som finns i dag. Vidare slutsats är att det är viktigt att ha kontroll på kontrollerna. Även vad gäller odlingsmedium så behövs positiva kontroller i metoden för att man få vetskap om plattorna/mediet fungerar som de ska. Att beakta vid användandet av positiva odlingskontroller är dock risken för korskontamination/falsk positiva provsvar.



SMI gjorde under övningen en infärgning av bakterierna som odlats fram på agarplattan och tittade i mikroskop, vilket kompletterade PCR-analysen och något som övriga myndigheterna inte gjorde. Det berodde dels på avsaknad av mikroskop och/eller att den möjligheten glömts bort. Med FBD finns styrkan att kunna bekräfta prov på olika sätt hos de olika myndigheterna.

Ringtestet som skickades ut i samband med övningen hade kunnat omfatta fler prov för en bättre jämförelse och provsvarprotokollet var utformat så att kriterierna för dataanalys inte var bestämda vilket medförde att myndigheterna använde sig av olika sätt att bestämma tröskelvärden. En av fyra myndigheter hade angivit vilken metod som använts. Detta ser projektgruppen som ett viktigt kvalitetskriterium som har lyfts fram till kvalitetssäkringsprojektet. SkyddC hade gärna sett att ringtestet varit packat separat för att underlätta analysarbetet. Extraktionskontrollen som låg i ett eppendorfrör på botten av den gröna provburken missades av två myndigheter där lokala övningsledaren fick gå in och berätta var kontrollen skulle hittas.

Under 2008 undersökte en arbetsgrupp inom FBD fördelar respektive nackdelar med att skicka personal eller prover mellan myndigheterna vid en B-händelse. Gruppens slutsats var att det är enklare och mindre kostsamt att skicka prover jämfört med att skicka personal, men att det då är viktigt med harmoniserade metoder och att personalen är tränad så att analysresultaten är likvärdiga (se rapport på Wikin). Trots att vi inte gjort någon kostnadskalkyl eller testat att skicka personal som jämförelse kan vi säga att myndigheterna fick likartade resultat även då vi använde olika extraktionsmetoder och instrument.

SkyddC var det enda laboratorium som fick positivt PCR-svar efter direktextraktion, men resultaten kunde inte konfirmeras eftersom de inte har tillstånd att odla i det mobila labbet och Ct värdena låg så högt att det är tveksamt att de skulle ha svarats ut som positiva. Det kan ändå vara värt att prova ut den extraktionsmetod som användes på SkyddC och även den PCR-assay som användes för att se om det skulle förbättra övriga myndigheters resultat.

## 6. SLUTSATSER

Övningens omfattning och scenario var väl anpassat till syftet och resulterade i värdefulla insikter i hur laboratorierutiner och provrutiner kan förbättras. Det var ingen kapacitetsövning och därför blev uthålligheten aldrig prövad. En övning av den här storleken bör utföras inom FBD årligen för att kontinuerligt säkra och förbättra laboratorierutinerna.

Det hade varit en fördel om ett gemensamt uppstartsmöte per telefon hade genomförts för att diskutera vilken strategi och metod/metoder som skulle användas under övningen. En strategisk fråga är om resultatet blir starkare för att alla myndigheterna använder samma metod eller om myndigheterna använder olika metoder med likvärdigt resultat? Extraktionsroboten är snabb och underlättar hanteringen av prover speciellt när de hanteras inne på säkerhetslab. RUB har EZ1 extraktionsroboten inne på säkerhetslaboratoriet vilket både underlättar och ger en tidsvinst. Det skulle vara en effektivitetsvinst och minska manuell hantering och därmed ge ökad säkerhet om FOI och SMI också har roboten inne på säkerhetslaboratorierna. Det är en fördel att investera ytterligare en robot på myndigheterna för att ha möjlighet att utveckla metoder utanför säkerhetslaboratorierna.

FBD kommer i sig självt aldrig vara operativt utan myndigheterna använder sina ordinarie beredskapsplaner och beslutsvägar, men en generell slutsats från övningen är att FBD kan utnyttjas vid diskussion av metodfrågor, vilket dock inte utnyttjades fullt ut under övningen. FBD kan också verka som ett expertstöd vid tolkning av resultat. T.ex. den här övningen med positivt resultat för Bacillus på två målgener, kromosomal och en plasmid, men inte på den tredje, plasmid 2. Vad betyder det och hur ska man svara ut? Behövs ytterligare analyser? Sekvensering och vem är mest lämpad för detta? Själva analysen är bara en del i hela processen i ett utbrott och det är viktigt att förstå analysresultatet och dess begränsningar och också kunna förmedla resultatet till beställaren på bästa lämpliga sätt.

Riktlinjer för tolkning av PCR resultat behövs samt policy hur många replikat som ska analyseras. Något som överlämnats till projekt 9: Implementering av kvalitetssäkring inom FBD.

Transporter, förutsatt att rutiner finns etablerade och proven skickas på rätt sätt, så är transporttiden mellan myndigheterna ungefär densamma oavsett geografisk avstånd förutsatt att prov skickas vid utsatt tid.

Slutligen anser projektgruppen att det varit lärorikt att planera, observera och utvärdera övningen. Tydliga samverkansvinster erhålls mellan de deltagande myndigheterna i samband med den här typen av projektarbete.

## 7. FÖRSLAG PÅ FORTSATT VERKSAMHET

I kommande övning föreslås transport av Kategori A stammar eftersom dessa omfattas av ett annat regelverk och kan vara svårare att transportera, speciellt med flyg eftersom piloten har rätt att neka att ta med proven. Planering av den här övningen genomfördes under relativt lång tid och det är att föredra att koncentrera arbetet mer för att kunna hålla bättre fokus.

Frågor som tas vidare till projekt 9: Implementering av kvalitetssäkring inom FBD:

- Standardisering av antal replikat av provet som bör extraheras är önskvärt.
- Standardisering av PCR-protokoll: t.ex. antal replikat av proverna och metod för bestämning av tröskelvärde.
- Standardisering av provsvarprotokoll: ska pos/neg eller Ct värde redovisas för varje analys? En fördel om extraktionsmetod anges, ska labidentitet vara kvar eller ersättas med något annat? Vid odling, ska medium/platta, temp, bakgrundsflora anges som övrig kommentar eller ska det finnas specifika rader för det?
- Hur ska provresultatet svaras ut (säkerhetsfråga)? Mail / Wiki / Telefon / Post

## 8. BILAGOR

### 8.1 BILAGA 1

Provsvar SMI

### 8.2 BILAGA 2

Provsvar RUB

### 8.3 BILAGA 3

Provsvar Skyddcentrum

### 8.4 BILAGA 4

Provsvar FOI

### 8.5 BILAGA 5

Enkätfrågor

### 8.6 BILAGA 6

Riskbedömning vid transport



## 9. REFERENSER

1. *Fricke et al. Int J of Food Microbiol., 2011*
2. *Projektrapport Utvärdering av extraktionsrobot 2009 (FBD 2009/3)*
3. *Projektrapport Myndighetsövergripande samverkan vid utbrott av smittsamma sjukdomar (FBD 2010/4)*
4. *Kvalitetssäkring av provanalys inom FBD 2010*

## 10. BEGREPP OCH FÖRKORTNINGAR

RUB – Resurslaboratorium för Beredskapsdiagnostik, samverkansprojekt mellan SVA och Livsmedelsverket

SOP – Standard operating procedure

Realtids-PCR – Instrument mäter PCR produkt under pågående körning

