

PROJEKTRAPPORT

Detektion av högpato­gena bakterier i vatten

Moa Lavander, Paula Ågren, Linda Karlsson, Elisabeth Hallin, Olga Stephansson,
Martina Lindberg och Caroline Schönning

ABSTRACT

The Forum for Biopreparedness Diagnostics (FBD) is a collaborative effort of four Swedish governmental authorities: National Food Agency (NFA), the National Veterinary Institute (SVA), the Swedish Defence Research Agency (FOI) and the Swedish Institute for Communicable Disease Control (SMI). The overall aim of the FBD is to increase the national analytical capacity of microbial high risk agents (i.e. agents that require biosafety level 3 laboratories) in various sample types and enable the authorities to share the sample load in a crisis. To achieve this, the FBD strives to harmonise methods, equipment and quality assurance to ensure that results emanating from the participating authorities are comparable.

This report summarises the activities and outcome of the FBD project denoted *Detection of high risk pathogens in water*. Dissemination of pathogenic microorganisms by water has caused, and causes, several severe outbreaks of disease worldwide. In the present project a method for water sampling and analysis using ultrafiltration was implemented to enable response in case of water contamination with bacterial biothreat agents, or suspicion thereof. Since the concentration of microbial contaminants in water tends to be low, analysis requires concentration of the microbes from a large volume of water. Depending on water turbidity, >100 L can be filtered through an ultrafilter which then, due to its small pore size, will entrap viruses, bacteria and protozoa. The whole chain of analysis, from sampling of a water body in the field, to transport of the filters to the BSL 3 facilities and elution, sample preparation and analysis by real time qPCR or cultivation methods have been trained and implemented at the authorities. Hence, the biopreparedness to handle dissemination of high risk pathogens in water has been strengthened within Sweden.

Titel:	Detektion av högpato­gena bakterier i vatten Publ.nr. MSB576 ISBN: 978-91-7383-356-1
Projektid:	Del 1: 27 januari till 30 november 2011 Del 2: 23 januari till 29 november 2012
Projektledare:	Moa Lavander, Livsmedelsverket
Projektgrupp:	Paula Ågren, Livsmedelsverket; Linda Karlsson, Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI), Elisabeth Hallin, Smittskydds­instituet (SMI), Olga Stephansson, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Martina Lindberg (SVA) och Caroline Schönning (SMI)
Kontaktperson i FBDs styrgrupp:	Annelie Lundin Zumpe och Hans Lindmark, båda Livsmedelsverket
Styrgrupp:	Annelie Lundin Zumpe, Hans Lindmark, Mats Johansson (Livsmedelsverket), Mats Forsman (FOI), Mona Byström (FOI), Viveca Bäverud (SVA), Rickard Knutsson (SVA), Caroline Schönning (SMI), Ida Andersson (SMI) och Andreas Bråve (SMI)
Finansiering:	Projektet har finansierats genom tilldelning av MSB anslag 2:4 Krisberedskap
Layout:	Tecknarn i Roslagen
Tryck:	Davidsons Tryckeri AB

INNEHÅLL

1. Begrepp och förkortningar	5
2. Bakgrund	6
3. Syfte och mål	7
3.1 Syfte	7
3.2 Uppfyllda Mål 2011	7
3.3 Uppfyllda Mål 2012	7
4. Implementering av ultrafiltreringsmetoden för provtagning och analys av vatten	8
4.1 Analyskedja för spikade prover på BSL 2-laboratorium	8
4.2 Analyskedja för prover tagna i fält	9
5. Material och metoder	10
5.1 Utrustning	10
5.2 Förbehandling av filtret	11
5.3 Provtagning av dricksvatten	11
5.4 Eluering	12
5.5 Sekundär koncentration	13
5.6 Detektion och analys	14
5.7 Avdödning och dekontaminering	14
6. Fältprovtagning: planering, genomförande och uppföljning	15
6.1 Förberedelser inför fältprovtagning	15
6.2 Plats för fältprovtagning	15
6.3 Riskbedömningar	15
6.4 Personlig skyddsutrustning	16
6.5 Utrustning och förberedelser	16
6.6 Provtagning i fält	16
6.7 Förvaring och transport av prov	17
6.8 Bearbetning och analys av prov på säkerhetslaboratorium	17
7. Resultat	18
8. Diskussion	18
8.1 BSL 3-anpassningar från provtagning till analys	18
8.2 Organismanpassning och isolering av stammar	19
8.3 Vatten – en varierande och ofta svår provtyp	19
8.4 Kvalitetssäkring	20
9. Slutsatser	21
10. Förslag på fortsatt verksamhet	22
10.1 Framtida mål	22
10.2 Metod för råvatten	22
10.3 Kvalitetssäkring och framtagande av ROP	22
10.4 Upprätthållande av uppbyggd förmåga	22
11. Bilagor	23
Bilaga 1. Protokoll för ultrafiltrering av spikat prov	23
Bilaga 2. Checklista inför fältprovtagning	27
Bilaga 3. Poster	28
12. Referenser	29



SAMMANFATTNING

Forum för beredskapsdiagnostik (FBD) är ett samarbete mellan fyra svenska myndigheter: Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Smittskyddsinstitutet (SMI) och Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI). Forumets huvudmål är kunskapsutbyte, metodutveckling och harmonisering av metoder och utrustning mellan myndigheterna för att öka beredskapen i Sverige vid en eventuell B-händelse, det vill säga en händelse där sjukdomsframkallande mikroorganismer utgör en fara genom ett naturligt utbrott, en olycka eller avsiktlig spridning. Projektet *Detektion av högpato­gena bakterier i vatten* syftar till att implementera en säker och snabb metod för provtagning och analys av högpato­gena bakterier i vatten på de myndigheter som ingår i FBD.

Sjukdomsframkallande mikroorganismer förekommer vanligtvis i mycket låga halter i vatten, varför detektion kräver koncentring av en större mängd vatten till en hanterbar provvolym. Detta kan ske med ultrafiltrering: dialysfilter används för att fånga upp mikroorganismer som är större än filtrets porstorlek (30 kDa) vilket omfattar alla typer av mikroorganismer. För dricksvatten kan en volym på >100 L koncentreras ner till ca 500 mL, vilket sedan koncentreras ytterligare genom centrifugering eller membranfiltrering. Koncentratet analyseras sedan för förekomst av sjukdomsframkallande mikroorganismer.

Metoden är lämplig vid arbete med högpato­gena mikroorganismer, vilka kräver att hantering sker på säkerhetslaboratorier. Eftersom vattnet som ska provtas kan pumpas genom ultrafiltret ute i fält behöver endast filtret tas in på säkerhetslaboratorium för provupparbetning och efterföljande analys. På så sätt behöver aldrig stora vattenvolymer tas in på säkerhetslaboratorium, vilket rent säkerhetsmässigt skulle vara svårt att hantera.

Under det inledande året, 2011, harmoniserades material och metodik mellan myndigheterna, personal lärdes upp och metoden implementerades vid respektive myndighet genom att genomföra ultrafiltreringar på vattenprover som inokulerats med modellorganismerna *Bacillus cereus* och *Francisella tularensis*. Under 2012 tillskansade sig projektgruppen ökad erfarenhet av analyskedjan genom en övning av vattenprovtagning i fält med transport av proverna till myndigheternas säkerhetslaboratorium för efterföljande övning av provbearbetning och analys. Den här rapporten sammanfattar projektets arbete med ultrafiltreringsmetoden som ett medel för att provta och sedan kunna analysera vattenprover, med diskussion kring svårigheter och möjligheter.

1. BEGREPP OCH FÖRKORTNINGAR

Aerosol	Små partiklar som är suspenderade i en gas. Används här om bakterier i luft, vilka kan ge upphov till luftburen smitta.
Agens	Verksam eller utlösande faktor, används inom medicin i betydelsen smittämne (infektiös agens), till exempel en sjukdomsframkallande mikroorganism.
BSL 2	Biosafety level 2, skyddsnivå 2.
BSL 3	Biosafety level 3, skyddsnivå 3. Används bland annat för att beteckna säkerhetslaboratorium, det vill säga ett laboratorium som är anpassat för arbete med högpatogena agens av riskklass 3. För ”riskklasser” se nedan.
CDC	Centers for disease control and prevention, amerikanska smittskyddsinstitutet.
CFU	Colony forming unit, kolonibildande enhet. Varje koloni på odlingsplattan motsvaras av en levande och tillväxande bakterie i materialet som spritts på plattan.
DEUF	Dead end ultrafiltrering, beskrivs i rapporten under rubrik 5. Material och metoder.
Eluera	Att frigöra ett ämne med hjälp av lösningsmedel. Används här i betydelsen att med en buffert skölja igenom ultrafiltret för att få ut de inbundna mikroorganismerna lösta i bufferten, det så kallade ”eluatet”.
EPA	Environmental protection agency, amerikanska miljöskyddsstyrelsen.
FOI	Totalförsvarets forskningsinstitut.
Färskvatten	Vatten som har tillräckligt låg salthalt för att drickas. All nederbörd är färskvatten, upp samlas i insjöar, älvar, diken m.m.
Högpatogen	Som är mycket smittsam och ofta orsakar livshotande sjukdom.
LVS	Live vaccine strain, den ickevirulenta vaccinstammen av <i>Francisella tularensis</i> .
Patogen	Sjukdomsframkallande.
Protozoer	Encelliga organismer som kan vara sjukdomsframkallande, t ex parasiten cryptosporidium som orsakat stora vattenburna utbrott världen över.
Riskklasser	Mikroorganismer delas in i olika riskklasser beroende på om de kan orsaka infektion hos människa, hur smittsamma de är, hur allvarlig sjukdom de ger och om det finns bot eller möjlighet att förebygga infektion.
Riskklass 2	Måttlig infektionsrisk. Kan orsaka infektioner som ibland kan vara allvarliga men vanligen kan botas, förebyggas eller självläka utan allvarliga men. Hanteras på BSL 2-laboratorium.
Riskklass 3	Hög infektionsrisk. Kan orsaka allvarliga infektioner med begränsade möjligheter att bota eller förebygga och som ofta har hög smittsamhet. Hanteras på säkerhetslaboratorium, BSL 3.
RUB	Resurslaboratorium för beredskapsdiagnostik, SVAs och Livsmedelsverkets gemensamma BSL 3-arbete.
Råvatten	Yt- eller grundvatten, råvaran till produktion av dricksvatten
SMI	Smittskyddsinstitutet.
Spika	Att tillsätta mikroorganismer till en provtyp, till exempel bakterier till vatten. Förekommer även som ”spikning” och ”spikningsförsök”.
SVA	Statens veterinärmedicinska anstalt.
Turbiditet	Grumligheten, beror på mängden partiklar i vattnet.
UF	Ultrafiltrering.

2. BAKGRUND

Inom FBD har metoder för detektion av riskklass 3-bakterier; *Bacillus anthracis*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* och *Yersinia pestis* harmoniserats. Provupparbetning är ett viktigt steg innan detektion kan ske. Tillsammans har de i FBD ingående myndigheterna ansvar för och erfarenhet av en mängd olika provtyper, såsom kliniska humanprover och djurprover, miljöprover och livsmedel. Den provtyp som behandlas inom ramarna för detta projekt är vatten. För ökad analyskapacitet och minskad sårbarhet i samhället är det önskvärt att alla myndigheterna i FBD har förmåga att kunna detektera relevanta riskklass 3-bakterier i vatten.

1.1 VATTEN SOM SPRIDNINGSVÄG FÖR HÖGPATOGENA BAKTERIER

Bacillus anthracis (mjältbrand, antrax) och *Francisella tularensis* (harpest, tularemi) är de två riskklass 3-bakterier som i dagsläget förekommer naturligt i Sverige och vatten är en möjlig spridningsväg för båda dessa bakterier.

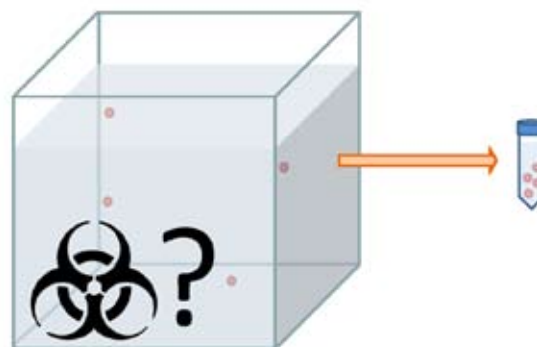
Både i Sverige och i andra länder har vattenrika miljöer identifierats som källor till humansmitta med *Francisella*. I Martha's Vineyard i USA har flera utbrott av lungsmitta med tularemi ägt rum, vilket är ett resultat av inandad bakterieaerosol. I detta område har man visat att *Francisella* överlever i de fuktiga miljöerna på ön, i synnerhet i bräckt vatten.¹⁻⁴ I Sverige är stick från infekterade myggor den vanligaste smittvägen till människa men smitta kan även ske oralt via mat eller dryck. Vattenburna utbrott av harpest har rapporterats i flera av de länder där *F. tularensis* finns endemiskt; bland annat Turkiet, Spanien och Norge⁵⁻⁷.

Medan *Francisella* orsakar årliga utbrott i Sverige har mjältbrandssmitta varit betydligt ovanligare. År 1981 drabbades en mjölkko i Uppland av mjältbrand, men sedan skulle det dröja 27 år innan smittan dök upp igen. Vattendrag i kontakt med gamla mjältbrandsgravar tros ha varit av betydelse för smittans spridning vid de två mjältbrandsutbrott som ägt rum på senare tid i Sverige 2008⁸ och 2011⁹. Eftersom klövdjur är ytterst infektiösa för mjältbrandsbakterien räcker ett fåtal sporer för att nötboskap via foder eller vatten ska drabbas av dödlig infektion. Det är därför värdefullt att kunna detektera väldigt låga koncentrationer av mjältbrandssporer.

1.2 ATT PROVTA VATTEN FÖR ANALYS VID SÄKERHETSLABORATORIUM

När ett vattenprov ska tas, är det framförallt provets volym som skiljer från andra provtyper. Blodprov tas i rör, jordprover läggs i burkar. Men av vatten finns det ett värde i att provta en stor volym – kanske hundratals liter. Vid spridning av bakteriella agens i vatten, som naturliga utbrott eller vid antagonistiska handlingar, gör utspädningsfaktorn att dessa agens förekommer i låga koncentrationer. Eftersom vattnet ofta är ett näringsfattigt medium sker dessutom ingen eller obetydlig tillväxt av bakterierna. Detektion kräver därför att mikroorganismerna i en större volym vatten koncentreras till en hanterbar provvolym (figur 1).

Figur 1. För att kunna analysera en större vattenvolym vid misstänkt förekomst av sjukdomsframkallande mikroorganismer måste provvolymen reduceras. Detta medför att endast en mindre provvolym behöver tas in på säkerhetslaboratorium, där stora volymer vätska är svåra och hantera. Den reducerade provvolymen leder till att koncentrationen av mikroorganismerna ökar i provet och därmed blir de enklare att detektera.



En fördelaktig och allt mer etablerad metod i dessa sammanhang är ultrafiltrering. Dialysfilter används för att fånga upp mikroorganismer som är större än filtrets porstorlek (~15-30 kDa) vilket omfattar protozoer, bakterier och de flesta virus. På detta sätt kan >100 L dricksvatten koncentreras ner till en volym om ca 500 mL, vilket sedan koncentreras ytterligare genom centrifugering eller membranfiltrering varpå mikroorganismer kan detekteras, vanligtvis genom odling och/eller nukleinsyraextraktion och realtids-PCR. Metoden används av både Centers for Disease Control and prevention (CDC) och Environmental Protection Agency (EPA) i USA¹⁰⁻¹⁵. Metoden är lämplig vid arbete med riskklass 3-bakterier eftersom problematiken med att ta in stora volymer vatten på säkerhetslaboratorium undviks. Eftersom filtreringen av vattenprovet kan utföras i fält, tas endast själva ultrafiltret in på BSL 3-laboratorium för eluering och efterföljande analys.

3. SYFTE OCH MÅL

3.1 SYFTE

Projektets syfte är att etablera en god förmåga hos de ingående myndigheterna att analysera högpatogeta bakterier från större volymer vatten. Det långsiktiga målet är att ultrafiltreringsprov som har tagits i fält, ska kunna analyseras för förekomst av riskklass 3-bakterier vid alla myndigheters säkerhetslaboratorier för att stärka den nationella förmågan att hantera vattenburna utbrott med högpatogeta agens.

3.2 UPPFYLLDA MÅL 2011

- Delmål 1:** En litteratursammanställning har gjorts över befintliga koncentreringsmetoder för identifiering av högpatogeta bakterier i större volym vatten.
- Delmål 2:** Dead end-ultrafiltrering som metod för att koncentrera och därpå analysera större vattenvolymer för förekomst av riskklass-3 agens och har implementerats på SMI, FOI, SVA och Livsmedelsverket.

3.3 UPPFYLLDA MÅL 2012

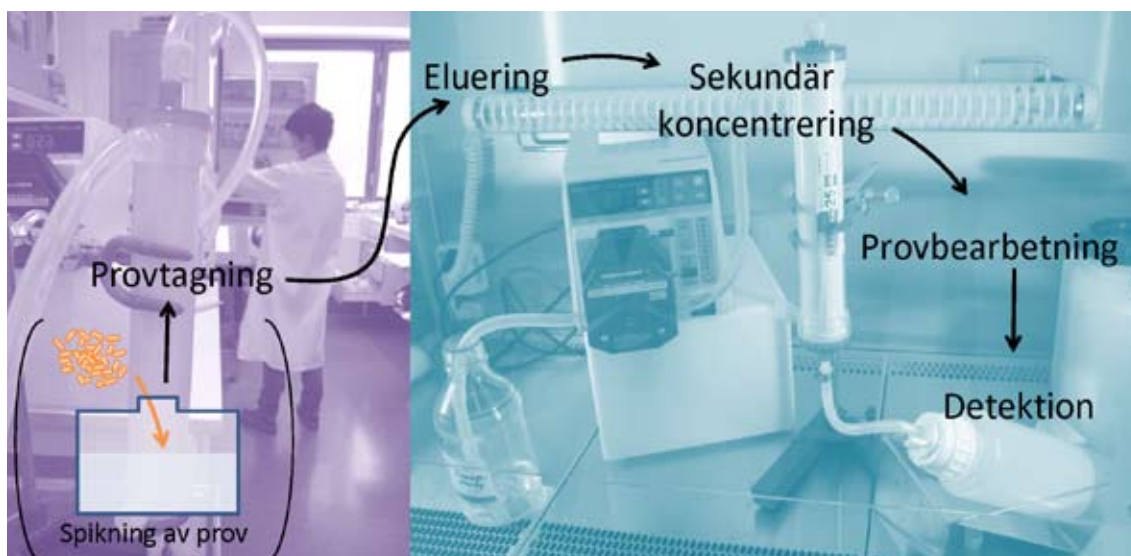
- Delmål 1:** Den litteratursammanställning som gjordes 2011 över befintliga koncentreringsmetoder för identifiering av högpatogeta bakterier i större volym vatten har uppdaterats.
- Delmål 2:** Fler personer är upplärda på metoden vid varje myndighet.
- Delmål 3:** Elueringssteget är övat och etablerat inne på säkerhetslaboratorierna.
- Delmål 4:** Riktlinjer för provtagning och transport av filter har upprättats.

4. IMPLEMENTERING AV ULTRAFILTRERINGSMETODEN FÖR PROVTAGNING OCH ANALYS AV VATTEN

För att implementera ultrafiltreringsmetoden för vattenprovtagning samt efterföljande analys vid laboratorierna vid FOI, SMI och SVA (Livsmedelsverket saknar laboratorium för analys av riskklass 3-agens och har genom avtal tillgång till laboratoriet på SVA) har material och metoder harmoniserats genom framtagande av gemensamma protokoll och utrustningslistor. Dessutom finns det nu personal som kan metoden vid varje myndighet. Det senare har åstadkommit genom att all laborativ personal i projektet har blivit upplärd på metoden och sedan implementerat den vid sin myndighet. För att minska sårbarheten har dessa personer i sin tur lärt upp andra, med målet att varje myndighet ska ha minst två personer utbildade på metoden. För att etablera metodik för hela analyskedjan för vattenprover vid misstanke om riskklass 3-smitta har övning först skett med spikade prover på BSL 2-laboratorium (se rubrik 4.1, nedan). För att säkerställa förmåga längs hela analyskedjan (rubrik 4.2), från provtagning och transport av provet till probbearbetning och analys har en fältprovtagning av ett färskvatten planerats och genomförts. Personalen har även övat probbearbetning och analys av prov taget i fält inne på myndigheternas säkerhetslaboratorier (se rubrik 6 *Fältprovtagning: planering, genomförande och uppföljning*).

4.1 ANALYSKEDJA FÖR SPIKADE PROVER PÅ BSL 2-LABORATORIUM

Under projektets inledande år, när metodiken sattes upp vid myndigheterna och personalen i projektet lärde sig ultrafiltreringsmetoden, utfördes allt arbete på BSL 2-laboratorium. Eftersom det är tidskrävande att arbeta på BSL 3-laboratorium, gjordes bedömningen att tiden i projektet inte skulle räcka till för att implementera metoden på BSL 3-nivå. Istället simulerades provtagning i fält genom att provet (20 L vatten spikat med bakterier) pumpades genom ultrafiltret på diskbänken på BSL 2-laboratoriet.



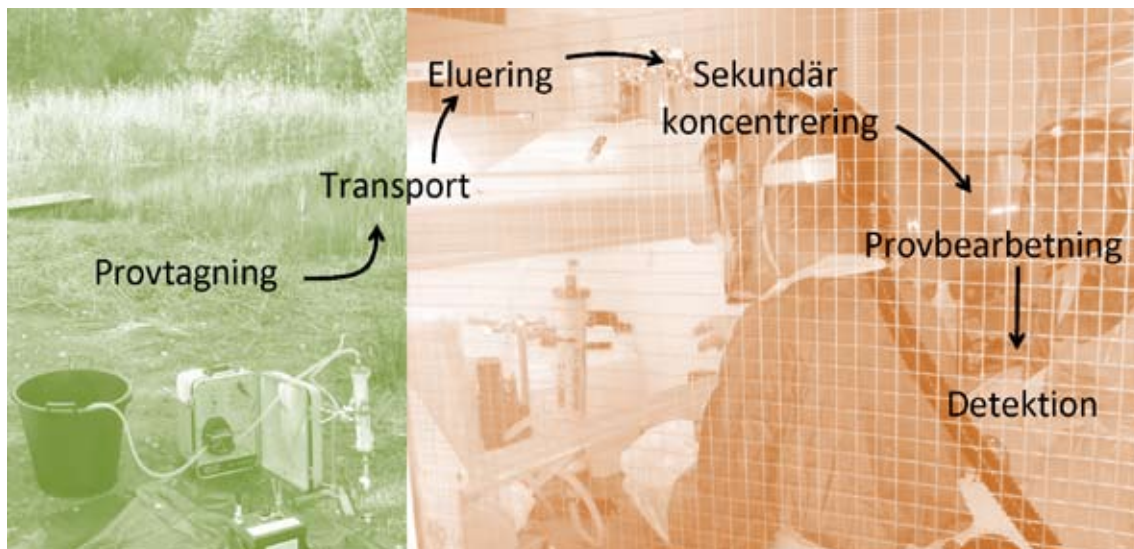
Figur 2. Under uppläring och harmonisering av metoden utförs arbetet på BSL 2-laboratorium med modellorganismer för de högpatogeta agens som kommer att analyseras framgent i FBD. Provtagning av spikat prov sker på bänk varpå ultrafiltret tas in i säkerhetsbänk för eluering och fortsatt bearbetning innan mikroorganismerna som provet spikats med kan detekteras.

Filtret plockades sedan ut från provtagningsutrustningen och togs in i säkerhetsbänk (figur 2). Den efterföljande provbearbetningen och analysen, som i skarpt läge kommer att ske i säkerhetsbänk inne på BSL 3-laboratoriet, utfördes i således säkerhetsbänk på BSL 2-laboratoriet.

20 L vattenprover spikades med *Bacillus cereus* och den ickevirulenta vaccinstammen (LVS) av *Francisella tularensis* och användes för att öva provtagning och analys. Metoden övades både gemensamt vid en workshop och separat vid myndigheterna. Även om detta gav god rutin och kännedom om metoden bör det påpekas att det aldrig är samma sak att arbeta på BSL 2- som på BSL 3-laboratorium. Det är viktigt att metoden övas även på säkerhetslaboratorium för att en analys i ett skarpt läge ska kunna ske på ett riktigt och säkert sätt.

4.2 ANALYSKEDJA FÖR PROVER TAGNA I FÄLT

När ultrafiltreringsmetoden sattes upp under 2011 var tanken att FBD-myndigheterna, liksom för andra provtyper, ansvarar för själva analysen av provet och inte för provtagningen. Diskussioner i projektgruppen och med styrgruppen landade dock i bedömningen att det vid misstanke om riskklass 3-smitta i vatten är troligt att det blir en av myndigheterna i FBD som utför provtagningen. Därför följdes vattenprojektet upp under 2012 med fokus på provtagning i fält och övning av metoden på säkerhetslaboratorium.

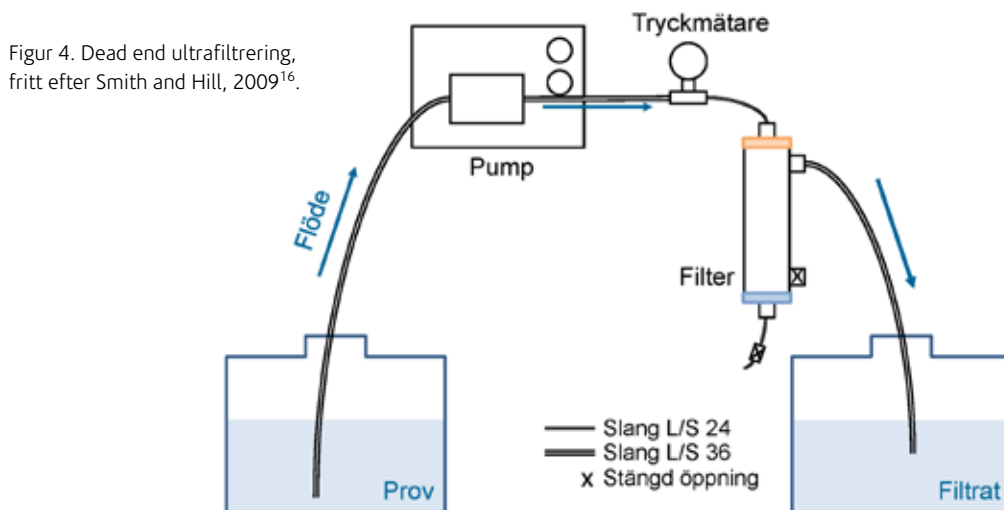


Figur 3. I ett skarpt läge, eller som här i en övning som ska efterlikna verkligheten så nära som möjligt, tas vattenprovet i fält. På så vis behöver endast filtret tas in på säkerhetslaboratoriet och där bearbetas för analys. När högpato­gena agens kan förekomma i provet utförs analysen i säkerhetslaboratoriet av personal med ändamålsenlig personlig skyddsutrustning och med provet inne i en säkerhetsbänk.

Vid en verklig händelse går flödet från provtagning i fält till probbearbetning och detektion av bakteriella agens inne på säkerhetslaboratoriet (figur 3). Kedjan liknar den som övats på BSL 2-laboratorium (figur 2), men förutom skillnader i lokaler tillkommer även transporten som ett delmoment. I det fältförsök som utfördes i projektet transporterades åtta prover från provtagningsplatsen till SVA med bil. Därifrån skickades två filter till SMI och två till FOI. Projektmedlemmarna utförde den efterföljande hanteringen av provet vid säkerhetslaboratorierna på de egna myndigheterna.

5. MATERIAL OCH METODER

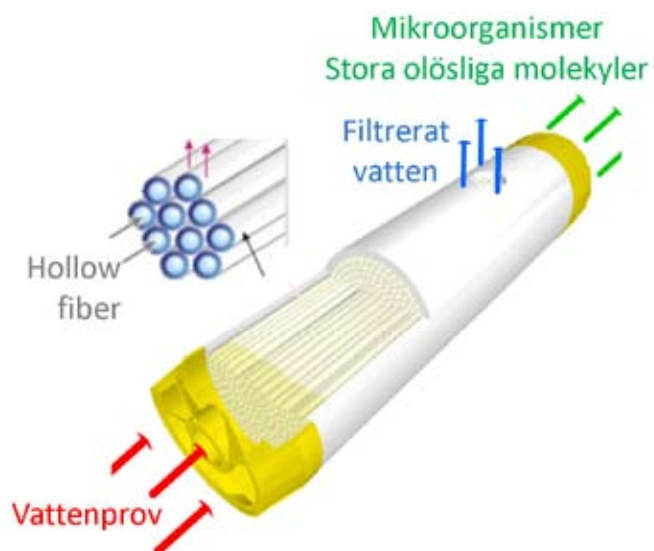
För att koncentrera ner ett relativt stort vattenprov till en hanterbar volym använder sig FBD av en ultrafiltreringsmetod som har utvecklats av Vincent Hills forskningsgrupp vid CDC^{11,13,15-18}. Metoden, som kallas *Dead end ultrafiltration* (DEUF)¹⁶, visas schematiskt i figur 4. Vissa modifikationer har tillförts baserat på opublicerade forskningsresultat inom RUB och FOI.



Provtagningen sker genom att vattnet pumpas av en peristaltisk pump till filtrets övre öppning. I den här uppsättningen sitter en tryckmätare ansluten mellan pumphuvudet och filtret. Dess uppgift är att varna för igensättning av filtret. Om trycket blir för högt (>15 psi) kan nämligen partiklar tryckas genom filtret och trasa sönder det. Filtrat vatten leds ut genom den övre sidoöppningen (figur 4 "Filtrat"), medan de mikroorganismer som funnits i provet fångas upp i filtret.

Ultrafiltret, Asahi Kasei REXEED 25S är ett dialysfilter som består av ihåliga polysulfonfibrer packade i en cylinder (figur 5)¹⁶. Filtrets totala yta är 2,5 m² och porstorleken är 30 kDa. Detta gör att en stor mängd vatten, flera hundra liter, kan filtreras och att många olika mikroorganismer fångas upp.

Figur 5. Schematisk illustration av ultrafiltrets uppbyggnad.



5.1 UTRUSTNING

Som en del av harmoniseringen av metoden har myndigheterna införskaffat likadan utrustning inklusive reagenser och förbrukningsmaterial, vilket beskrivs i kommande text samt i bilaga 1. En detaljerad lista finns i den interna projektrapport som skrevs 2011.

5.2 FÖRBEHANDLING AV FILTRET

För att förhindra att mikroorganismerna vidhäftar till filtret, och därmed blir svåra att eluera ut, förbehandlas filtret med kalvserum (figur 6) ^{17,19}.



Figur 6. Förbehandling där kalvserum cirkuleras genom filtret under 5 minuter, varpå filtret korkas igen och läggs på vippbord i rumstemperatur 2-20 h.

Förbehandlingen sker genom att 500 mL av 2,5 % kalvserum cirkuleras genom filtret i 5 min. Slutligen fylls filtret med serumlösning, korkas igen och får ligga på ett vippbord i rumstemperatur i 2-20 timmar. Innan provtagning sköljs kalvserumet ur filtret genom att pumpa igenom 1 L ultrarent vatten som får rinna ut i vasken tillsammans med serumet.

5.3 PROVTAGNING AV DRICKSVATTEN

När vattenprovet ska pumpas genom filtret används DEUF-uppsättning (figur 4). Tryckmätaren har utslutits ur uppsättningen (figur 7) för att minimera antalet kopplingar och då tidigare provtagningar visat att trycket under dricksvattenprovtagning understigit 15 psi med god marginal. Därmed minskar risken för läckage och problemen vid desinficeringen, vilket är särskilt värdefullt vid arbete med riskklass 3-agens. Det finns dock risk för högt tryck till exempel vid pumpning av vatten med hög turbiditet, där den stora mängden partiklar i vattnet kan göra att filtret sätts igen. Vid provtagning av annan provmatris än dricksvatten används därför tryckmätare för att kontrollera att risk för filtersprängning inte uppstår.



Figur 7. Dead end- ultrafiltrering av 20 L kranvatten spikat med *B. cereus* sporer och *F. tularensis*.

Vid implementering av ultrafiltreringsmetoden på BSL 2-laboratorium spikades ett vattenprov bestående av 20 L kranvatten med 1 spor/mL av *B. cereus* eller 1 bakterie/mL av *F. tularensis* LVS.

Provet pumpades genom filtret av en portabel pump (Masterflex® E/S™ portable sampler), som pumpar vattnet av en hastighet på ca 0,5 L/min. En provvolym á 20 L tar därmed ungefär 40 minuter att filtrera igenom ultrafiltret. Under övning och upplärning på BSL 2-laboratorium har provtagning skett genom att utrustningen och dunken med vattenprovet satts upp på diskbänk (figur 7) och eluering gjorts i säkerhetsbänk (figur 8).

Att tänka på

Arbetet med metoden innehåller många moment med påtaglig risk för spill och läckage. Det krävs därför övning med att sätta upp och ta ned utrustningen, pumpa vatten och uppmärksamma läckage. Den som laborerar ska arbeta eftertänksamt och fundera på hur filtret ska vinklas för att enklast komma åt att lossa och sätta dit slangar utan att riskera spill. Det är viktigt med rutiner för att ta hand om läckage och spill till exempel genom att ha absorptionsmaterial och saneringsmedel nära till hands.

5.4 ELUERING

Efter provtagning försluts filtret, monteras ned och tas till säkerhetsbänk. Provet elueras genom så kallad backflush-eluering¹⁶ (figur 8).

Ett viktigt moment, som ökar utbytet avsevärt, är att filtret vänds så att den ände där provet pumpades in nu är nedtill. 500 mL elueringslösning pumpas in genom den övre sidoöppningen och provet elueras ut till ett uppsamlingskärl.



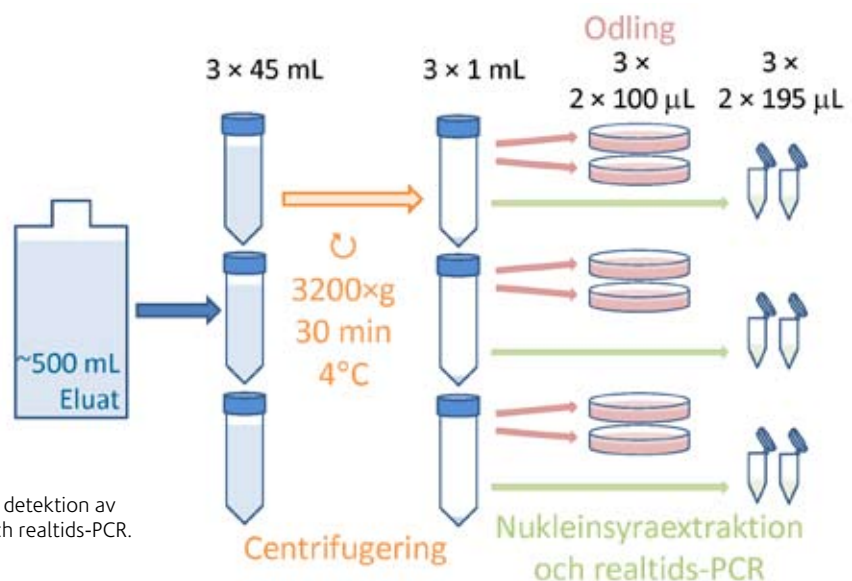
Figur 8. Backflush då elueringslösning (vänstra flaskan) pumpas genom filtret för att eluera ut mikroorganismerna till uppsamlingsflaskan (till höger). Metallställen har tillverkats av SVAs verkstad för att passa till dessa flaskor. När flaskorna läggs ned på det här sättet behöver inte filtret vara lika högt upp som om flaskorna står upp. På så sätt blir hela uppsättningen enklare att arbeta med inne i bänken. För att förhindra stänk och aerosolbildning används ett lock med slanggångor där utloppsslangen fästs in. Arbetet sker i säkerhetsbänk.

5.5 SEKUNDÄR KONCENTRERING

För att ytterligare koncentrera mikroorganismerna i eluatet pelleteras de genom centrifugering (figur 9). Angiven metod är den som gett bäst utbyte vid optimeringsarbete utfört av Resurslaboratorium för beredskapsdiagnostik (RUB).

Arbetet med eluatet sker i säkerhetsbänk. Från varje eluat hälls 3 x 45 mL i

50 mL-rör. Eluatet centrifugeras i 30 minuter, 3200 x g vid 4°C. Rören tas därpå tillbaka till säkerhetsbänken där supernatanten hälls av. Pelleten i varje flaska löses upp i 1 mL vätska; till exempel elueringslösning eller fysiologisk saltlösning.



Figur 9. Processning av eluatet för detektion av mikroorganismer genom odling och realtids-PCR.

5.6 DETEKTION OCH ANALYS

För detektion av *B. cereus* har odling använts. Det koncentrerade eluatet sprids på odlingsplattor, $2 \times 100 \mu\text{L}$ från varje rör, och inkuberas över natt i 37°C . Nästföljande dag bestäms koloniantalet varpå utbytet i eluatet kan beräknas, se nedan Beräkning av förväntat utbyte.

Beräkning av förväntat utbyte

$$(X/Y) \times Z \times V = 100 \%$$

X = Totala antalet bakterier i spikningsmaterialet

Y = Elueringsvolymen i mL

Z = Volymen till sekundär koncentring

V = Procent av resuspenderingsvätska spridd på platta som sekundära koncentrationen lösts i

EXEMPEL:

B. cereus spikning

- $135 \mu\text{L}$ av stocklösning $8,9 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$ till 3 mL elueringslösning
- $0,5 \text{ mL}$ av *B. cereus* i elueringslösning tillsätts till 20 liters-prov = koncentration av *B. cereus* blir 1 CFU/mL i provet

X = 2×10^4 (dvs 1 CFU/mL och provet är 20 liter)

Y = 550 mL

Z = 45 mL

V = $0,1$ (Pelleten löst i 1 mL och man sätter $100 \mu\text{L}$ till platta)

$$((2 \times 10^4)/550) \times 45 \times 0,1 = 163 \text{ CFU}$$

F. tularensis detekteras med realtids-PCR. Nukleinsyraextraktion från den lösta pelleten sker i EZ-1 roboten²⁰. Det extraherade materialet analyseras sedan med realtids-PCR för detektion av arter av *Francisella tularensis*, metodik som implementerats i tidigare projekt i FBD²¹⁻²².

5.7 AVDÖDNING OCH DEKONTAMINERING

Varje myndighet har egna rutiner för avdödning och dekontaminering som ska följas, enligt riskbedömning för respektive agens. *Francisella* avdödas vanligtvis med etanollösning och *Bacillus*-sporer med klorinbehandling, NuCidex eller liknande.

6. FÄLTPROVTAGNING: PLANERING, GENOMFÖRANDE OCH UPPFÖLJNING

För att kunna genomföra en vattenanalys med avseende på hela analyskedjan fokuserade arbetet i projektet under 2012 på övning av provtagning i fält inklusive transport av prov samt övning av provbearbetning och analys vid myndigheternas säkerhetslaboratorier.

6.1 FÖRBEREDELSE INFÖR FÄLTPROVTAGNING

Projektgruppen träffades vid FOI i Umeå för ett heldagsmöte den 20 april 2012 med syfte att planera den fältprovtagning som skulle genomföras i september samma år.

Frågor som diskuterades var:

- På vilken plats ska provtagningen genomföras?
- Behöver/bör vi underrätta lokala myndigheter om provtagningen?
- Vilka moment i metoden måste det skrivas riskbedömningar för?
- Vilken personlig skyddsutrustning ska användas?
- Vilken utrustning behöver vi ha med vid fältprovtagningen?
- Hur sker transport av ultrafiltren (som innehåller det koncentrerade provmaterialet) från provtagningsplats och till myndigheternas BSL 3-laboratorier?
- Hur ska provbearbetningen och analysen genomföras?

6.2 PLATS FÖR FÄLTPROVTAGNING

Vatten provtogs i ett rekreationsområde i Örebro, som tidigare ingått i FOIs vattenprovtagningar för detektion av *Francisella tularensis*. Örebro kommun kontaktades och informerades om att provtagningen skulle äga rum.

6.3 RISKBEDÖMNINGAR

För arbete med sjukdomsframkallande mikrobiologiska agens måste riskbedömningar göras i enlighet med Arbetsmiljöverkets föreskrifter²³. Riskbedömningarna ligger sedan till grund för att arbetet utförs på ett säkert sätt. I ultrafiltreringsmetoden ingår flera moment som är unika för denna metod, och som medför vissa risker i arbetet. Projektgruppen beslöt att göra två riskbedömningar för det laborativa arbetet: en för själva provtagningen och en för elueringssteget. Dessa moment har det gemensamt att de sjukdomsframkallande bakterierna (om det finns några sådana i vattnet som provtas) förekommer i koncentrerad mängd i ultrafiltret. I riskbedömningarna identifierades särskilt riskfyllda steg i metoden och strategier för att minimera riskerna för skada eller smitta utarbetas. Det tydligaste exemplet på ett riskfyllt moment är när provet har tagits och filtret ska monteras ned. Då förekommer eventuella sjukdomsframkallande bakterier i koncentrerad mängd och när slangarna lossas från filtret finns risk för stänk som kan ge aerosolspridning av bakterierna. För att undvika detta används ett absorberande papper indränkt med desinfektionsmedel (70 % etanol) som hålls mot filtrets öppning från det att slangarna lossas tills filtret korkas igen.

6.4 PERSONLIG SKYDDSUTRUSTNING

I planeringsstadiet bestämdes att arbetsoveraller, gummistövlar, handskar och munskydd som skyddar mot stänk skulle användas vid fältprovtagningen. Handskar och munskydd skulle endast bäras när filtret, innehållande koncentrerat prov, kopplas loss från det peristaltiska pumpsystemet. Inför själva provtagningen besöktes det rekreativområde där provet skulle tas och planen för personlig skyddsutrustning ändrades därefter.

Det var mycket vardagsmotionärer och flanörer som rörde sig i området och bedömningen gjordes att handskar och munskydd skulle väcka oro hos allmänheten. Marken vid provtagningsplatserna var en fast och fin gräsmatta och gummistövlar bars därför frivilligt. Det här exemplet visar att det går bra att göra en riskbedömning i planeringsskedet, men att förutsättningarna i fält gör att denna plan kan få modifieras under arbetets gång. Regnponchos packades ner för den händelse att det skulle regna, men i den strålände sol som rådde under provtagningen var keps en mer behövlig persedel (figur 10).

6.5 UTRUSTNING OCH FÖRBEREDELSE

Inför fältprovtagningen gjordes listor över vilket material som behövdes både för själva provtagningen, för dekontaminering, personlig skyddsutrustning, transport etc. En checklista upprättades för förberedelserna och finns bifogad som bilaga 2.

6.6 PROVTAGNING I FÄLT

Provtagningen (figur 10) gjordes i två vattendrag inom rekreativområdet, med fyra prover á 20 L från varje plats. Vattnet togs med vattenkanna och filtrerades först till en hink genom en silduk av sådan typ som används till saftning. Detta steg är tänkt att ta bort större skräp, men upplevdes som ineffektivt. Silduken var väldigt gles i väven och endast löv, grässtrån och liknande silades bort medan sand och små djur slank igenom. En något tätare silduk skulle därför vara av nytta.

Från hinken överfördes det silade vattnet till en balja och pumpades därifrån genom ultrafiltret. Det filtrerade vattnet leddes ut från filtret i en tämligen lång (>2 m) slang för att inte blöta ner vid platsen där utrustningen satts upp, och i filtret fångas alla partiklar upp som är >30 kDa, inklusive mikroorganismer. För att kunna driva den peristaltiska pumpen även om dess eget batteri (laddningsbart) tar slut kopplades den till ett bilbatteri som extern energikälla.

Att pumpa 20 L vatten genom filtret tog ca 40 minuter, varpå det plockades ned och korkades igen innan ett nytt filter kunde monteras upp för provtagning av nästa 20 L. Eftersom två av personerna i projektgruppen vid genomförandet av provtagningen var vaccinerade mot harpest bestämdes att de skulle hantera ultrafiltret när det innehöll koncentratet från vattenprovet. Om oönskat stänk eller aerosol skulle bildas när filtret kopplas loss från slangarna minimeras på så sätt risk för smitta av ovaccinerad personal.

Figur 10. Provtagning i fält av vattendrag i rekreationsområde i Örebro, där förekomst av *Francisella* tidigare påvisats. Provet tas med vattenkanna från vattendraget i bakgrunden. Först silas större skräp bort genom en silduk varpå vattnet hålls över till den svarta baljan. Härifrån pumpas vattnet genom ultrafiltret, där mikroorganismerna fångas upp. Det filtrerade vattnet leds tillbaka till vattendraget via slangen som skymtar bakom den gula pumpen. Bilbatteriet i nedre delen av bilden används för att driva pumpen. En presenning har lagts ut för att skydda batteriet mot fukt från marken.



6.7 FÖRVARING OCH TRANSPORT AV PROV

För ett prov med (eventuell) riskklass 3-smitta gäller specifika regler för transport och märkning²³⁻²⁴. De igenkorkade filtren lades i dubbla plastpåsar. I den yttre plastpåsen lades absorberande material, som ska räcka till att suga upp all vätska i provet om det skulle läcka. Den yttre påsen märktes med varningsdekal för smittförande ämnen samt namn och kontaktuppgifter till person på myndighet som ansvarar för provet om något skulle gå snett under själva transporten. Ultrafiltren transporterades med bil till SVA, där fyra av dem packerades om och skickades till FOI och SMI. De packades med kylklampor och paketen märktes upp med UN 3373, vilket är beteckningen för ”biologiskt ämne kategori B”²³⁻²⁴.

6.8 BEARBETNING OCH ANALYS AV PROV PÅ SÄKERHETSLABORATORIUM

När ultrafiltren tagits till BSL 3-laboratorium genomfördes eluering som beskrivits tidigare (rubrik 4.4). De resulterande eluaten behandlades som beskrivs i bild 9. De centrifugerades för ytterligare koncentring, pelleten löstes i 1 mL fysikalisk saltlösning och från detta togs delmängder till odling och nukleinsyraextraktion för detektion med realtids-PCR. Varken odling eller PCR gav vid detta tillfälle någon detektion av *E. tularensis*.

Figur 11. Eluering inne på säkerhetslaboratoriet vid SVA av prover tagna i fält. Bakom ultrafiltret, på dess vänstra sida, ses en flaska med eluat från ett tidigare filter.



7. RESULTAT

- Det finns övad personal på alla myndigheter i FBD som behärskar ultrafiltrering som metod för provtagning och analys av större volymer vatten vid misstanke om riskklass 3-smitta.
- Harmoniserad utrustning och metodik för provtagning finns på plats vid myndigheternas säkerhetslaboratorier.
- Hela analyskedjan har övats, dels på BSL 2-laboratorium med spikade dricksvattensprover och dels vid ett fältförsök med provtagning av färskvatten med transport till BSL 3-laboratorium för provbearbetning och analys.
- Riskbedömningar finns för relevanta delmoment i analyskedjan för vattenprover.
- Det finns protokoll för Dead end ultrafiltrering och en checklista för provtagning i fält (bilaga 1 och 2).
- Från det initiala arbetet med metoden under 2011 finns en intern projektrapport som i detalj beskriver metodiken och kan användas som ett verktyg vid uppsättande och övning av metoden.
- FBDs arbete med metoden har presenterats på en poster (bilaga 3) vid *Medical biodefense conference* i München i oktober 2011, samt vid *CBRN-dagarna* i Umeå i mars 2012.

8. DISKUSSION

8.1 BSL 3-ANPASSNINGAR FRÅN PROVTAGNING TILL ANALYS

För att möjliggöra säker analys av högpatogena agens i vatten bör provet tas i fält och det fyllda filtret sedan tas in i på säkerhetslaboratorium för eluering, vidare upparbetning och analys. Detta eftersom transport och arbete med stora vattenvolymer på säkerhetslaboratorium medför betydande svårigheter. Ultrafiltreringsmetoden är väl lämpad för koncentrerings av ett stort vattenprov till en hanterbar provvolym, och har därför implementerats i FBD. Provtagning i fält var från början tänkt att utföras av uppdragsgivaren för provanalysen men i och med genomförandet av detta projekt finns nu möjligheten att provtagningen kan utföras av personal från någon av myndigheterna som ingår i FBD. Vid alla fyra myndigheter finns personal som varit med att planera, utföra och följa upp fältprovtagning av färskvatten.

Efter provtagning transporteras provet/filtret enligt de regler och föreskrifter²³ som finns angående transport av riskklass 3-smitta till BSL 3-laboratorium för eluering. Elueringen sker sedan i säkerhetsbänk av klass I eller klass II beroende på vilken utrustning som finns tillgänglig vid myndigheternas säkerhetslaboratorier. Beroende på hur bänkarna utformats är de olika bekväma att arbeta i. I vissa bänkar är det mer komplicerat, laboranternas räckvidd in i bänken kan vara begränsad varvid det blir svårare att komma åt att fästa och lossa slangarna från ultrafiltrets övre del, som hamnar högt upp innanför säkerhetsbänkens glas. Det blir då särskilt viktigt att ha övat på att arbeta med filtret i säkerhetsbänk för att det ska kännas helt tryggt att ta in metoden på BSL 3-laboratorium. Det är också nödvändigt att ha tillräckligt med personal upplärd på metoden, för att minska sårbarheten och underlätta arbetet vid en utbrottssituation. Det är ett arbete som bör prioriteras vid myndigheterna.

8.2 ORGANISMANPASSNING OCH ISOLERING AV STAMMAR

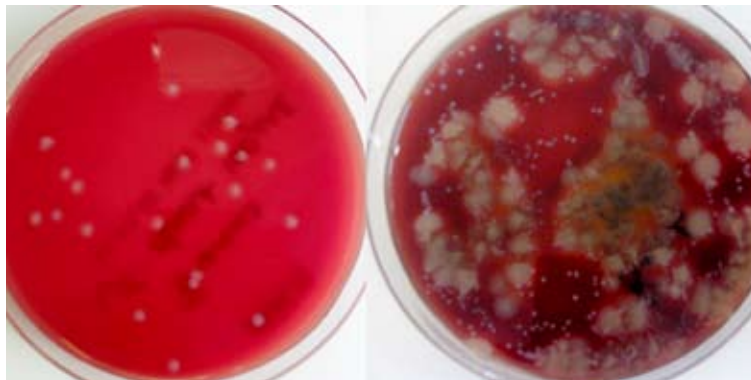
Eftersom de bakterier som kan vara aktuella för detektion med ultrafiltrering är av varierande karaktär kommer det i många fall att behövas anpassad metodik för detektion. Vid FOI har det observerats att *F. tularensis* är känslig för flera av komponenterna i elueringslösningen och att bakterierna dör tämligen snabbt under tiden som de exponeras för denna (L. Karlsson, opublicerade resultat). Det är därför värdefullt att efter eluering så fort som möjligt gå vidare till centrifugering för att kunna överföra *F. tularensis* till ett vänligare medium. *B. cereus* är däremot väldigt robust och överlever flera veckor i elueringslösningen (P. Ågren, O. Stephansson och M. Lavander, opublicerade resultat).

När *F. tularensis* detekteras med realtids-PCR krävs det inte att bakterien lever, men eftersom harpest finns endemiskt i Sverige är det av intresse att i framtiden kunna isolera levande och tillväxande stammar från vattendrag. Det här kräver inte bara en anpassad eluering, en annan viktig nyckel för att kunna göra detta är kännedom om och tillgång till selektiva odlingsmedier/odlingsmetoder, något som också undersöks av FBD i projekt för harmonisering av odling för riskklass 3-agens (Johanna Thelaus, FOI, projektledare 2011 och 2012).

8.3 VATTEN – EN VARIERANDE OCH OFTA SVÅR PROVTYP

Under arbetet med dricksvatten från tappkran har bakgrundsfloran varit väldigt låg vid odling, det vill säga andra typer av mikroorganismer har sällan växt tillsammans med *B. cereus* på odlingsplattorna. Eftersom *B. cereus* är hemolyserande på blodagar är det lätt att definiera icke hemolyserande kolonier som något annat.

Figur 12. På den vänstra plattan växer *Bacillus cereus* som spikats i dricksvatten från tappkran, bakgrundsfloran från dricksvattnet är obefintlig. På den högra odlingsplattan syns tillväxt av olika sorters bakterier från bakgrundsfloran i ett färskvattenprov. I det senare fallet blir det mycket svårare att identifiera de mikroorganismer som eftersöks i analysen. Odlingsmediet är hästblodagar från SVAs substratproduktion.



Analys av andra typer av vatten där bakgrunden är hög är dock betydligt svårare. I råvatten förekommer alltid en bakgrundsflora av mikroorganismer, där vissa snabbt kan tillväxa på en agarplatta och konkurrera ut de patogena arter som är av intresse. Även här är selektiva odlingsmetoder värdefulla. Råvatten kan vidare innehålla mycket PCR-inhibitorer vilket ställer till med problem för den molekylära diagnostiken. I projektet *Mikrobiologiska analyser vid kris* (Karin Jacobsson, Livsmedelsverket, projektledare 2011 och 2012) har man arbetat mycket med detektion av bakterier och virus i olika typer av råvatten och utarbetat olika strategier för att överkomma PCR-inhibition. Denna kunskap är av stort värde även för att utforma anpassade metoder för detektion av riskklass 3-agens i råvatten.

8.4 KVALITETSSÄKRING

Projektgruppen har diskuterat hur ultrafiltreringsmetoden ska kvalitetssäkras. Vattenproverna som tas, särskilt råvatten/färskvatten, kommer att vara av varierande karaktär med avseende på flera parametrar som har betydelse för hur framgångsrik provupparbetningen blir. Bakgrundsfloran i vatten kan variera kraftigt och ibland växa över de mikroorganismer som analysen är inriktad på att hitta. Sammensättningen av vatten varierar och ämnen som förekommer kan störa den molekylära



diagnostiken på olika sätt. Projektgruppen är överens om att kvalitetssäkring av metoden för alla typer av vatten inte är möjligt då det är för stor variation mellan olika vattentyper.

Figur 13. Eluat från två platser i rekreationsområdet där vatten provtogs under fältförsöket (rubrik 6 ovan), vilka visar hur olika karaktär två färskvattenprover kan ha. I bakgrunden till höger syns ett ultrafilter där en hel del större partiklar från vattnet fastnat i filtrets topp, under den brandgula platen.

Ett förslag är att metoden kvalitetssäkras för 1) dricksvatten från tappkran 2) för råvatten/färskvatten av olika turbiditet. Eftersom till exempel råvatten vid vattenverk varierar väldigt mycket beroende på den geografiska platsen, tiden på året, mängden nederbörd och andra faktorer så skulle en genomförd kvalitetssäkring endast gälla just det vatten som använts. Men det skulle med detta som grund gå att göra analyser även av andra vatten, med förbehållet att det i metoden framgår att kvalitetssäkringen är gjord på ett vatten som inte är identiskt med, men förhoppningsvis i stor utsträckning liknar, det aktuella. Inom FBD har en kvalitetsmanual tagits fram under 2012 (Caroline Kaipe, Livsmedelsverket, projektledare 2012) som kan användas som ett verktyg i kommande planering av kvalitetssäkring av ultrafiltreringsmetoden vid myndigheterna.

9. SLUTSATSER

Ultrafiltreringsmetoden passar väl för att provta vatten vid misstanke om riskklass 3-smitta. Det är en stor vinst att inte behöva ta in själva vattnet på säkerhetslaboratoriet, utan istället endast ultrafiltret som innehåller koncentratet från vattenprovet. Tack vare filtrets stora kapacitet kan detta koncentrat, beroende på vattnets turbiditet, motsvara en provvolym på 100-1000 L. Så stora volymer skulle vara i det närmaste omöjliga att hantera inne på säkerhetslaboratoriet, men kan vara nödvändiga att analysera när det gäller att återfinna organismer som finns i väldigt låg koncentration i vattnet. Metoden i sig innehåller en del svåra moment med viss risk för spill och läckage. För att myndigheterna ska kunna använda sig av metoden framgent krävs att det finns övad personal som kan genomföra de olika delmomenten, från provtagning till analys. Det har varit värdefullt att, inom FBDs ramar, tillsammans arbeta praktiskt med metoden. Projektets tydliga målsättningar har medfört att fokus varit på att implementera ultrafiltreringsmetoden vid de tre myndighetslaboratorierna. En viktig del har varit att utbilda deltagande personal och se till att laboratorierna utrustats med nödvändiga material och reagenser.

Särskilt lärorikt har det varit när personal från de fyra myndigheterna i FBD träffats och genomfört det praktiska arbetet tillsammans. För att öva metoden under det inledande året genomfördes vid en gemensam workshop två ultrafiltreringar från spikning till analys av eluatet. Detta var värdefullt för en gemensam diskussion om metodens avgränsningar och möjligheter, samt bidrog till harmonisering. Vidare har det vid varje myndighet genomförts 3-4 spikningsförsök med syfte att öva metoden. Detta har dock inte varit tillräckligt för att uppnå nödvändig rutin, utan arbete vid myndigheterna utöver det som sker inom FBD krävs för att etablera och upprätthålla förmågan.

Inför fältprovtagningen som genomfördes under 2012 lades stor tid på planering och förberedelser. Tack vare det grundliga förarbetet kunde provtagningen med följande provbearbetning genomföras utan problem. Detta bidrar till att öka beredskapen inför ett vattenrelaterat utbrott med riskklass 3-agens eftersom förfarande, nödvändiga förberedelser och utrustning har identifierats vilket gör att startsträckan när ett vattenprov ska tas blir kortare än om sådan planering måste göras helt från början när en fråga om analys kommer. En checklista för fältprovtagning finns i denna rapport (bilaga 2).

En stor vinst med projektet är att det verkligen fungerat som ett forum för diskussion och kunskapsutbyte kring vattenanalys där projektet kunnat dra nytta av sådant som även görs utanför FBDs ramar. Det gäller arbetet som pågått vid FOI med att anpassa elueringslösningen till *F. tularensis*, vilket förmodligen gör den lämplig även för andra Gram-negativa bakterier, och optimeringsarbete för centrifugering och eluering som utförts av Livsmedelsverket och SVA vid RUB. Med återkommande möten, både fysiskt och per telefon har arbete med metoden och tankar inför kommande verksamhet hållits vid liv.

För att upprätthålla och förbättra Sveriges beredskap för att hantera högrisksmitta i vatten krävs fortsatt övning och metodoptimering vid myndigheterna. Både djurs och människors hälsa är beroende av god vattenkvalitet och tillförlitlig metodik för att analysera vatten vid misstanke om smitta är ytterst värdefullt. Tack vare det arbete som gjorts inom FBD finns ett etablerat nätverk för att myndigheterna ska kunna samverka kring de här frågorna och tillsammans hantera ett allvarligt utbrott där vatten misstänks vara smittkälla.

10. FÖRSLAG PÅ FORTSATT VERKSAMHET

10.1 FRAMTIDA MÅL

I projektplanerna för verksamheten 2011 och 2012 fanns delmål, utöver de som anges under rubrik 3 *Syfte och mål*. Dessa skulle utföras i mån av tid och har inte hunnits med inom projektets ramar. För att ultrafiltreringsmetoden ska kunna vara en del i myndigheternas beredskap måste dessa mål beaktas.

Delmål 3 2011 i mån av tid: Metoden har kvalitetssäkrats enligt FBDs standard.

Delmål 5 2012 i mån av tid: Metoden har anpassats för analys av misstänkt smitta i råvatten.

Delmål 6 2012 i mån av tid: En ROP (recommended operating procedure) har tagits fram.

10.2 METOD FÖR RÅVATTEN

Projektgruppen har fått erfarenhet av arbete med råvatten genom fältprovtagningen, men specifika strategier för detektion av relevanta bakterier i råvatten har inte utarbetats. Råvatten är en svår provtyp, dvs dess egenskaper försvårar analys för detektion av specifika mikroorganismer. Ett sådant vatten är ofta rikt på partiklar och ämnen som hämmar den molekylära analysen. Dessutom finns vanligtvis en rik bakgrundsflora av konkurrerande mikroorganismer som försvårar detektion genom odling. Analysmetoderna behöver därför anpassas och optimeras för att fungera trots detta, ett viktigt men tidskrävande arbete som det inte har funnits utrymme för inom de begränsade ramarna för projektet.

10.3 KVALITETSSÄKRING OCH FRAMTAGANDE AV ROP

Ett annat delmål som kvarstår är kvalitetssäkring av metoden. Myndigheterna bör diskutera kring och besvara frågan: *Vilka kvalitetskrav behöver vi ställa på hela analyskedjan och vilken förmåga måste finnas etablerad för att kunna besvara frågan om misstänkt vattensmitta av högpatogena mikroorganismer?*

Med utgångspunkt i den kvalitetsmanual som tagits fram i FBD kan man sedan planera kvalitetssäkring av metoden.

I nuläget finns protokoll för metoden, samt en checklista för provtagning i fält (bilagorna 1 och 2).

Det är ett led i kvalitetssäkringen att arbeta om protokollet till en ROP (recommended operating procedure). En ROP är en mer utförlig metodbeskrivning som ska vara en garant för att metoden utförs på samma sätt oavsett vem det är som genomför arbetet med den.

10.4 UPPRÄTTHÅLLANDE AV UPPBYGGD FÖRMÅGA

Fortsatt övning av metoden krävs vid myndigheterna för att kunna genomföra provtagning och analys i skarpt läge, vid misstanke om vattenburen riskklass 3-smitta. Det här är något som delvis kommer att ske i samband med att metoden anpassas för analys av olika agens och varierande typer av vatten. I det arbetet ligger främsta fokus på att optimera själva analysen, varför det krävs kompletterande övning av provtagning och transport av provet. Genom upplärning och fortsatt övning av personalen vid myndigheterna i FBD kan operativ beredskap för hela analyskedjan för vatten upprätthållas.

11. BILAGOR

BILAGA 1.

PROTOKOLL FÖR ULTRAFILTERING AV SPIKAT PROV

DEAD END ULTRAFILTRERING AV KRANVATTEN SPIKAT MED *BACILLUS CEREUS* SPORER

Vid arbete med mikroorganismer ska alltid myndighetens rutiner för avdödning och dekontaminering följas.

Kommentar: detta protokoll är utformat för att passa arbete med spikade prover på laboratorium. Det kan dock användas även för att ta prover i fält; förbehandling och uppsättning för dead end ultrafiltrering är densamma med skillnaden att hänsyn måste tas till yttre faktorer såsom terräng och väderlek. Efter provtagning tas filtret från provtagningsplatsen till laboratorium för provupparbetning och analys, vilket sker i enlighet med stegen Eluering, Sekundär koncentrerings: centrifugering samt Detektion av mikroorganismer i eluatet: odling. Utöver odling sker även detektion med Realtids-PCR.

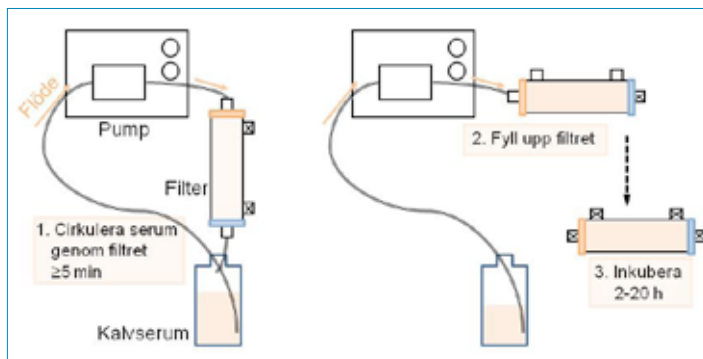
Material och reagenser

- Ultrafilter, Asahi Kasei REXEED 25S
- Slang, Masterflex, Slang Masterflex® L/S® 36 (9,5 mm) och L/S 24 (6,4 mm)
- Skarvstycken och slangklämmor till montering
- Stationär pump: Masterflex® L/S®
- Portabel pump: Masterflex® E/S™ portable sampler
- Stativ med klämmor, klor och A-fot att montera filtret i
- 10 mL plastpipett, en per filter
- Flaska, Nalgene, med lock med tre öppningar för uppsamling av eluatet
- Dunk med 20 L kranvatten för spikning
- MQ-vatten eller motsvarande, 1 L per filter
- Kalvserum, 25 mL per filter
- NaCl, fysikalisk lösning, 500 mL per filter och ca 10 mL till spikningskontrollen
- Blodagarplattor, 4 st till spikningskontrollen och 6 st per filter
- Stocklösning 10 % NaPP (2,5 g NaPP löst i 25 mL MQ-vatten)
- Stocklösning 10 % Tween-80, 1 % antifoam Y-30 (4,9 mL MQ-vatten, 100µL antifoam Y-30, 5 mL 20% Tween-80)
- *Bacillus cereus* sporer i stocklösning

Dag 0 eller morgonen Dag 1

Förbehandla filtret.

1. Montera filtret i enlighet med vänstra bilden, slang 24 L/S.
2. Blöt upp filtret genom att cirkulera 500 mL MQ-vatten genom det i 5 min.
3. Cirkulera 2,5 % kalvserum (25 mL kalvserum + 475 mL MQ-vatten) genom filtret i 5 min.



4. Stanna pumpen. Vinkla upp filtret så att det ligger horisontellt med sidoöppningarna uppåt, öppna dessa. Fyll upp filtret med serum genom att trycka på pumpens startknapp.
5. Korka igen.
6. Låt ligga på vippbord 2-20 h, rumstemperatur.

Dag 1

FÖRBEREDELSE AV SPIKAT VATTENPROV

Prov

20 L kranvatten spikat med *Bacillus cereus* sporer.

Blanda elueringslösning, 500 mL per filter

10% Tween 80, 1% antifoam	500 µL
10% NaPP	500 µL
NaCl (fys)	500 mL

OBS! Ta av en del av elueringslösningen för att lösa pelletar i efter körning, det behövs 6 mL per filter.

Torka odlingsplattor (blodagar)

- 4 plattor till spikningskontrollen
- 6 plattor per filter

Förbered spikningsmaterial av *B. cereus*

1. Gör ett spikningsmaterial genom att tillsätta stocklösning av *B. cereus* sporer till 3 mL elueringslösning för en slutkoncentration på ca 40000 CFU/mL. (135µL av stocklösning á 8,9 × 10⁵ sporer/mL till 3mL elueringslösning.)
2. Sprutfiltrera genom 5µm filter för att separera sporer som aggregerat: Detta blir spikningsmaterialet.
3. Gör tiospädningar av spikningsmaterialet i NaCl (fys) och sprid 100 µL av ospätt, 10⁻¹10⁻² och 10⁻³ på blodagarplattor (4 plattor totalt). Odlå i 37°C över natt för att kunna räkna kolonier och bestämma koncentrationen av sporer i ditt spikningsmaterial.

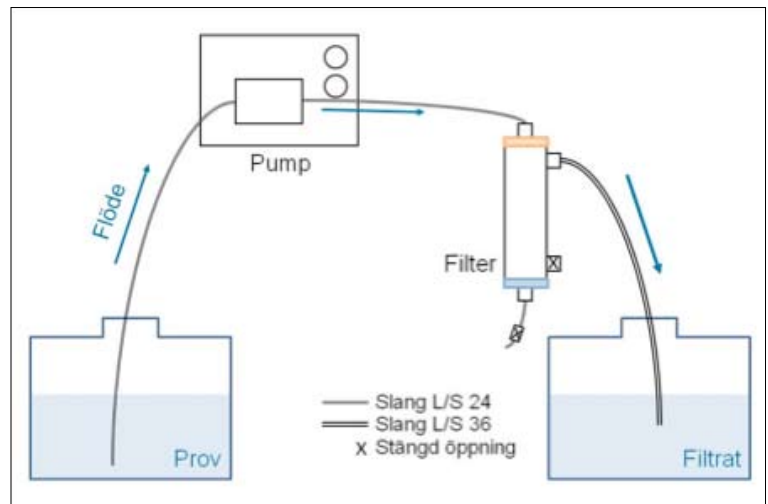
Spikning av vattenprovet

1. Tillsätt 500 µL av *B. cereus* spikningsmaterial till 20 L vatten, ska ge ca 1 spor/mL.
2. OBS! Skaka dunken ordentligt efter spikning för att blanda upp provet.

PRIMÄR KONCENTRERING: ULTRAFILTRERING

Uppsättning av Dead end ultrafiltrering

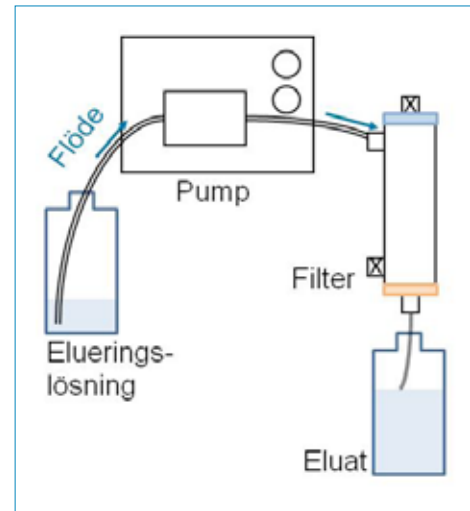
1. Låt filtret ligga på bänk medan slangar sätts fast. Se till att filtret är vänt så att vätska inte rinner ut.
2. En 70-90 cm L/S 24-slang fästs i ena änden till en 10 mL plastpipett med uttagen bomullstuss och avklippt spets. I andra änden fästs slangen till en DIN-adapter och säkras med slangklämna. DIN-adaptorn skruvas i den orange änden på filtret.
3. En 10-15 cm L/S 24-slang fästs i enda änden till en DIN-adapter, säkras med slangklämna över adaptorn och slangen kläms sedan ihop med en Delrin slangklämna. Detta för att hindra utflöde av vätska, DIN-adaptorn skruvas i den blå änden på filtret.
4. En L/S 36 slang av sådan längd att den når från filter till vask, 40-100 cm beroende på var filtret ska stå, fästs i sidoöppningen närmast orange ände.
5. Filtret fästs med orange ände upp i stativ. Slangen med pipetten ska leda vatten från dunken med provet. Den lilla slangen i blå änden är till för att hindra tryck från att byggas upp. Slangen i sidoöppningen leder filtratet ut i vasken. Den nedre sidoöppningen förblir igenkorkad.
6. När provet är på plats kan pumpen startas. Med portabel pump kan pumpning ske i maximal hastighet, vilket med rumstempererat kranvatten motsvarar ca 0,5 L/min.
7. Se till att inte luft pumpas in i systemet när provet börjar ta slut, då ökar trycket med risk för läckage.
8. När hela provet pumpats igenom monteras filtret ned och tas igenkorkat till säkerhetsbänken.



ELUERING

Elueringen sker i säkerhetsbänk med en stationär pump. Nalgene-flaska med lock med tre öppningar för slangar och luft används för uppsamling av eluatet.

1. Sätt en L/S 36 slang i sidoöppningen vid den blå änden, slangens andra ände placeras i en flaska med 500 mL elueringslösning. Samma slang kan användas som filtratet leddes ut igenom. Den blå änden ska vara uppåt i stativet.
2. Utflödet går genom en ca 20 cm L/S 24 slang filtrets nedre öppning (orange) till uppsamlingsflaska.
3. Hastighet på pumpen: 650 mL/min. Kom ihåg att ställa in slangtjockleken (36) på pumpen.



SEKUNDÄR KONCENTRERING: CENTRIFUGERING

1. Håll direkt från flaskan med eluatet till 3 st 50 mL rör; 45 mL vätska per rör.
2. Centrifugera rören på $3200 \times g$ i 30 min vid 4°C .
3. Märk utsidan av röret, för att kunna hålla av supernatanten utan att störa pelleten (som troligen inte syns).
4. Håll av supernatant.
5. Lös pellet med pipettering i 1 mL elueringslösning.

DETEKTION AV MIKROORGANISMER I ELUATET: ODLING

1. Sprid $2 \times 100 \mu\text{L}$ från varje rör på blodagarplattor.
2. Odlä övernatt i 37°C .

Dag 2

Räkna kolonier av *B. cereus* och beräkna utbytet i eluatet i förhållande till tillsatt mängd sporer. *B. cereus* orsakar hemolys på blodplattor och kan därför kännas igen på en uppklärningszon kring kolonierna. För att bekräfta att kolonierna på plattan är av den eftersökta sorten kan ytterligare molekylär diagnostik, såsom realtids-PCR, användas.

BILAGA 2.

CHECKLISTA INFÖR FÄLTPROVTAGNING

Val av plats

- Örebro eller Ljusdal, utbrottsplatser för *Francisella tularensis*.

Dokument

- Riskbedömning för fältförsöket, agens och eluering.
- Rutiner för utslussning av prov från säkerhetslaboratorium (till exempel för Plex-ID)
- Tillstånd för alla i projektgruppen att gå in på SVAs säkerhetslaboratorium

Inför resan

- Bil
- Övernattning

Material till filtreringen

- Protokoll för metoden
- 8 st serumbehandlade ultrafilter (förbereds dagen innan provtagningen)
- Slangar, klämmor, adaptrar etc till filtreringen
- 2 portabla pumpar (en från SMI, en från RUB)
- Skruvmejsel
- Sax
- Bilbatteri med kablar för elförsörjning till pumparna
- Hinkar, vattenkannor, sil, silduk

Material för dekontaminering och skydd

- Etanol, Ytdes 70 %
- Riskavfallspåsar
- Presenning
- Skyddshandskar
- Skyddskläder (arbetsoveraller)
- Gummistövlar
- Munskydd mot stänk
- Hushållspapper
- Handsprit
- Packtejp
- Behållare att förvara filtren i

Transport av provet

- Fraktas i bilen tillbaka till SVA
- Skickas till SMI och FOI – inventera lämpliga förpackningar på SVA i första hand och SMI i andra hand.
- Märkning av provet, UN3373.
- Kylförvaring
- Vermikulit, eller annat absorberande material
- Gängade proppar till ändarna av ultrafiltret (finns på SVA)

Extern kontakt

- Lokala myndigheter (Örebro eller Ljusdals kommun) för att informera om att vi gör den här provtagningen

12. REFERENSER

1. Berrada ZL, Telford SR, 3rd. Diversity of *Francisella* species in environmental samples from Martha's Vineyard, Massachusetts.
Microb Ecol 2010;59:277-283.
2. Broman T, Thelaus J, Andersson AC, et al. Molecular Detection of Persistent *Francisella tularensis* Subspecies *holarctica* in Natural Waters.
Int J Microbiol 2011;2011.
3. Svensson K, Back E, Eliasson H, et al. Landscape epidemiology of tularemia outbreaks in Sweden.
Emerg Infect Dis 2009;15:1937-1947.
4. Berrada ZL, Telford Iii SR. Survival of *Francisella tularensis* Type A in brackish-water.
Arch Microbiol 2011;193:223-226.
5. Anda P, Segura del Pozo J, Diaz Garcia JM, et al. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing.
Emerg Infect Dis 2001;7:575-582.
6. Celebi G, Baruonu F, Ayoglu F, et al. Tularemia, a reemerging disease in northwest Turkey: epidemiological investigation and evaluation of treatment responses.
Jpn J Infect Dis 2006;59:229-234.
7. Hoel T, Scheel O, Nordahl SH, et al. Water- and airborne *Francisella tularensis* biovar *palaeartica* isolated from human blood.
Infection 1991;19:348-350.
8. Lewerin SS, Elvander M, Westermark T, et al. Anthrax outbreak in a Swedish beef cattle herd--1st case in 27 years: Case report.
Acta Vet Scand 2010;52:7.
9. Översvämning & mjältbrand: En analys av översvämningar och mjältbrand i Kvismaredalen. In: Larsson M, ed. Örebro:
Länsstyrelsen i Örebro län, 2012.
10. Mull B, Hill VR. Recovery of diverse microbes in high turbidity surface water samples using dead-end ultrafiltration.
J Microbiol Methods 2012;91:429-433.
11. Mull B, Hill VR. Recovery and detection of *Escherichia coli* O157:H7 in surface water, using ultrafiltration and real-time PCR.
Appl Environ Microbiol 2009;75:3593-3597.
12. Francy DS, Bushon RN, Brady AM, et al. Comparison of traditional and molecular analytical methods for detecting biological agents in raw and drinking water following ultrafiltration.
J Appl Microbiol 2009;107:1479-1491.
13. Polaczyk AL, Narayanan J, Cromeans TL, et al. Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple microbe classes from 100-L tap water samples.
J Microbiol Methods 2008;73:92-99.

14. Lindquist HD, Harris S, Lucas S, et al. Using ultrafiltration to concentrate and detect *Bacillus anthracis*, *Bacillus atrophaeus* subspecies *globigii*, and *Cryptosporidium parvum* in 100-liter water samples.
J Microbiol Methods 2007;70:484-492.
15. Hill VR, Kahler AM, Jothikumar N, et al. Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples.
Appl Environ Microbiol 2007;73:4218-4225.
16. Smith CM, Hill VR. Dead-end hollow-fiber ultrafiltration for recovery of diverse microbes from water.
Appl Environ Microbiol 2009;75:5284-5289.
17. Hill VR, Polaczyk AL, Hahn D, et al. Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants.
Appl Environ Microbiol 2005;71:6878-6884.
18. Hill VR, Polaczyk AL, Kahler AM, et al. Comparison of hollow-fiber ultrafiltration to the USEPA VIRADEL technique and USEPA method 1623.
J Environ Qual 2009;38:822-825.
19. Morales-Morales HA, Vidal G, Olszewski J, et al. Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water.
Appl Environ Microbiol 2003;69:4098-4102.
20. Frosth S, Backman S, Farhadi L, et al. Utvärdering av extraktionsrobot 2009.
Forum för beredskapsdiagnostik rapportserie, 2009/3.
21. Ehrl S, Garbom S, Nilsson C, et al. Validering av multiplex Realtids PCR för harmonisering av molekylär detektion av riskgrupp 3 bakterier inom FBD.
Forum för beredskapsdiagnostik rapportserie, 2009/1.
22. Andersson A, Malm K, Granberg M, et al. Detektion av *Francisella tularensis*.
Forum för beredskapsdiagnostik rapportserie, 2011/8.
23. AFS 2005:1. Mikrobiologiska arbetsmiljörisker – smitta, toxinpåverkan, överkänslighet. ISBN 91-7930-443-5: Arbetsmiljöverkets författningssamling, 2005.
24. ADR-S Myndigheten för samhällsskydd och beredskaps föreskrifter om transport av farligt gods på väg och i terräng MSB, utgivare: Hedström, K, 2011.

