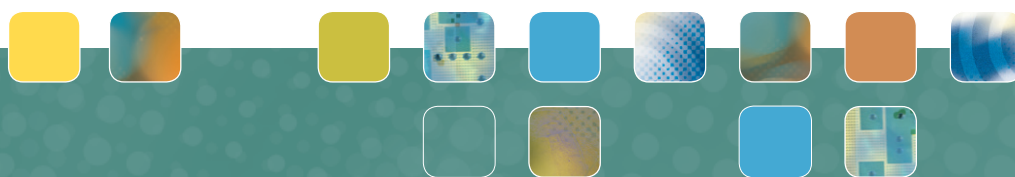




FFI-rapport 2013/01195

Evaluering av RAZOR™-instrument for identifisering av biologiske trusselstoffer



Ingjerd Thrane, Mari Espelund, Tone Aarskaug
og Janet Martha Blatny

Evaluering av RAZOR™-instrument for identifisering av biologiske trusselstoffer

Ingjerd Thrane, Mari Espelund, Tone Aarskaug og Janet Martha Blatny

Forsvarets forskningsinstitutt (FFI)

7. august 2013

FFI-rapport 2013/01195

1195

P: ISBN 978-82-464-2262-6

E: ISBN 978-82-464-2263-3

Emneord

biologiske trusselstoffer

påvise

identifikasjon

real-time PCR

felt

brukervennlighet

Godkjent av

Janet Martha Blatny

Prosjektleder

Jan Ivar Botnan

Avdelingssjef

Sammendrag

Ved en biologisk hendelse er det viktig å undersøke tilstedeværelse av biologiske trusselstoffer så raskt som mulig og identifisere dem, samt å avklare om de biologiske trusselstoffene utgjør en reell trussel. PCR-teknikken er en spesifikk og rask molekylærbiologisk metode for å påvise genomet til mikroorganismer, og den er mye brukt for å identifisere biologiske trusselstoffer. For bruk av PCR-metoden i felt er det utviklet kommersielt tilgjengelige PCR-instrumenter som er robuste og brukervennlige. Slike feltinstrumenter kan bidra til å foreløpig identifisere ett eller flere biologiske trusselstoffer og dermed å avklare situasjonen og være av betydning for den videre håndteringen av hendelsen.

FFI har testet og evaluert to PCR-systemer for bruk i felt fra leverandøren BioFire Diagnostics, Inc. (Salt Lake City, UT, USA); RAZOR™ og RAZOR™ EX BioDetection System. Arbeidet har vært knyttet til FFI-prosjektene ”Evaluering av biologisk trussel II” og ”Biologisk deteksjon og identifikasjon”.

RAZOR™-instrumentet benytter brukerens egne PCR-reagenser som tilsettes tomme reagenskassetter tilhørende instrumentet. FFI testet RAZOR™-systemets sensitivitet ved analyse av DNA fra bakteriene *Bacillus anthracis* (miltbrann), *Brucella maris* (brucellose), *Francisella tularensis* (harepest), *Salmonella enterica* (salmonellose), *Yersinia pestis* (pest), *Burkholderia mallei* (snive) og *Shigella flexneri* (diaré), samt fra *Bacillus atrophaeus*-sporer (simulant for *B. anthracis* sporer). Sensitiviteten ble målt til 10-10000 genomkopier/mL for de ulike mikroorganismene. Den oppnådde sensitiviteten viste seg å være tilsvarende eller 10 ganger bedre/svakere enn de oppgitte verdiene fra produsenten.

RAZOR™ EX-systemet ble testet med det tilhørende ”The 10® Target Screen Kit” som inneholder en reagenskassett med frysetørkede reagenser og primere for testing av DNA fra ti ulike biologiske trusselstoffer i en og samme analysetest: *Bacillus anthracis* (miltbrann), *Brucella melitensis* (brucellose), *Clostridium botulinum* type A (botulisme), *Coxiella burnetii* (Q feber), *Escherichia coli* O157 (diaré), *Francisella tularensis* (harepest), *Ricinus communis* (ricinforgiftning), *Salmonella enterica* (salmonellose), *Variola virus* (kopper) og *Yersinia pestis* (pest).

FFI testet RAZOR™ EX-systemet for DNA fra *B. anthracis*, *C. botulinum* type A, *E. coli* O157, *F. tularensis*, *ricin*, *S. enterica* og *Y. pestis*. Resultatene viste at RAZOR™ EX-systemet kunne påvise DNA fra blandinger av de testede biologiske trusselstoffene. Det ble testet og påvist opp til seks trusselstoffer samtidig.

RAZOR™ EX-systemet ble også testet for sin evne til å påvise *B. atrophaeus* (simulant for *B. anthracis*), *S. enterica*, *E. coli* O157, *C. botulinum* type A og *B. anthracis* enten i form av bakterieceller, sporer eller DNA i komplekse prøver som inneholdt bakterieartene enten hver for seg eller i en blanding. De utvalgte komplekse prøvematerialene var melk, hvetemel og jord. Resultatene viste at alle de testede biologiske trusselstoffene, med unntak av *C. botulinum* type A-sporer, kunne identifiseres i de komplekse prøvene uten en krevende forbehandling av prøvematerialet. Selv om sporeformen av *C. botulinum* ikke ble identifisert i testen, er det sannsynlig at celler i aktiv vekst ville blitt påvist.

RAZOR™ EX-systemet er et lett, bærbart og meget brukervennlig instrument for analyse av også komplekse prøver for innhold av biologiske trusselstoffer. Instrumentet kan benyttes i felt av ikke-spesialister og utrenede brukere, samt på et laboratorium, da god sensitivitet oppnås. Det tar kun 30 minutter å teste tilstedeværelse av de ti trusselstoffene med bruk av ”The 10® Target Screen Kit”. Dette tidsestimatet inkluderer forarbeid med preparering av prøvene til analysen. Bruk av interne kontroller i kit’et kvalitetssikrer resultatet fra RAZOR™ EX-analysesystemet.

RAZOR™ EX vurderes som meget velegnet for ikke-spesialister fra både sivile og militære aktører. Instrumentet kan benyttes når det er ønskelig med en rask analyse for å oppnå en foreløpig identifisering av biologiske trusselstoffer enten i felt eller på et mobilt laboratorium.

English summary

Upon a biological incident, it is crucial to identify or to rule out the presence of biological threat agents. PCR is a specific and rapid molecular technique commonly used for identification of DNA from biological threat agents. Robust and user-friendly PCR instruments for use in the field have been developed and such systems are commercially available. Such field instruments can aid in giving a preliminary identification of the presence of biological threat agents in a sample thereby assisting in initiating proper countermeasures and further handling of the incidence.

FFI has tested and evaluated two PCR systems for use in the field; RAZOR™ and RAZOR™ EX BioDetection System. These systems are from BioFire Diagnostics, Inc. (Salt Lake City, UT, USA).

RAZOR™ utilizes the users' own PCR reagents added to the system's empty test pouches. FFI tested the instrument's sensitivity in analysis of bacterial DNA from *Bacillus anthracis* (anthrax), *Brucella maris* (brucellosis), *Francisella tularensis* (tularemia/rabbit fever), *Salmonella enterica* (salmonellosis), *Yersinia pestis* (plague), *Burkholderia mallei* (glanders) and *Shigella flexneri* (diarrhea), and also from *Bacillus atrophaeus* spores (stimulant for *B. anthracis* spores). The sensitivity was measured to be in the range of 10 to 10000 genome copies per ml for the different microorganisms. The achieved sensitivity is as good as or 10 times more/less sensitive than the values presented or referred to by the producer.

RAZOR™ EX was tested using the test panel "The 10® Target Screen Kit" developed for the system. The kit contains a reagent pouch with freeze dried PCR reagents including primers for testing of ten different biological threat agents in one test: *Bacillus anthracis* (anthrax), *Brucella melitensis* (brucellosis), *Clostridium botulinum* type A (botulism), *Coxiella burnetii* (Q fever), *Escherichia coli* O157 (hemorrhagic diarrhea), *Francisella tularensis* (tularemia/rabbit fever), *Ricinus communis* (ricin poisoning), *Salmonella* (salmonellosis), *Variola virus* (smallpox) and *Yersinia pestis* (plague).

FFI tested the RAZOR™ EX system for DNA from *B. anthracis*, *C. botulinum* type A, *E. coli* O157, *F. tularensis*, *ricin*, *S. enterica*, og *Y. pestis*. The results showed that the RAZOR™ EX system could identify DNA from the different biological threat agents in a mixed sample. FFI tested and detected up to six biological threat agents in a single test.

The RAZOR™ EX instrument was also tested for its ability to identify *B. atrophaeus* (simulant for *B. anthracis*), *S. enterica*, *E. coli* O157, *C. botulinum* type A and *B. anthracis*, either as bacterial cells, spores or DNA in complex samples that contained the bacterial species either in pure cultures or in mixed samples. The selected complex samples were milk, wheat flour and soil. The results showed that all biological threat agents, except for *C. botulinum* type A spores, could be identified in the complex samples without a time-consuming sample preparation of the test material. Even though the spore form of *C. botulinum* was not detected, there is reason to believe that cells in active growth would have been detected.

The RAZOR™ EX instrument is a robust, low weight, mobile and very user friendly instrument for identification of biological threat samples, also in complex samples. The instrument can be used in the field by non-specialists and the results obtained are easy to interpret. It takes only 30 minutes to test for the presence of all ten biological threat agents when using "The 10® Target Screen Kit". This time estimate also includes a preparatory step for the samples to be ready for analysis. Internal controls secure the quality of the results from the RAZOR™ EX analysis system.

Our studies indicate that RAZOR™ EX is a very well suited instrument for use in the field and/or for mobile laboratories for both military and civilian users, and whenever there is a need for rapid analysis to obtain a preliminary identification of biological threat agents.

Innhold

1	Innledning	7
1.1	Bakgrunn for studien	7
1.2	Formålet med studien	8
1.3	RAZOR™ instrumentbeskrivelse	9
1.4	Protokoll	12
2	Materialer og metoder	15
2.1	Instrumenter og real-time PCR analysebetingelser	15
2.1.1	Sensitivitetsforsøk utført på RAZOR™	15
2.1.2	RAZOR™ EX og "The 10 Target Screen Kit"	15
2.2	Prøvemateriale: DNA, celler og sporer	16
2.3	Reagenser	16
2.4	Primere og prober til sensitivitetsforsøk på RAZOR™	17
2.5	Beregning av enheten genomkopier/mL	18
2.6	Forsøksoppsett sensitivitet	19
3	Resultater	19
3.1	Sensitivitetsforsøk på RAZOR™	19
3.1.1	Eksempel på sensitivitetsforsøk med <i>Y. pestis</i>	19
3.1.2	Sensitivitetsforsøk med RAZOR™ for syv biologiske trusselstoffer	21
3.2	Forsøk med "The 10 Target Screen Kit" på RAZOR™ EX instrumentet	23
3.2.1	Kan "The 10 Target Screen Kit" påvise DNA fra forskjellige bakterier i samme prøve?	23
3.2.2	Kan "The 10 Target Screen Kit" påvise bakterier i komplekse prøver (melk, hvetemel) som kan inneholde inhiberende faktorer for PCR analysen?	24
3.2.3	Kan bakterier og sporer påvises i en prøve uten behov for prøvepreparering?	26
3.3	Oppsummering av forsøkene på RAZOR™ og RAZOR™ EX instrumentene	30
3.4	Brukervennlighet av RAZOR™ EX og "The 10 Target Screen Kit"	31
3.4.1	RAZOR™ EX instrumentet	31
3.4.2	Praktisk bruk av RAZOR™ EX	32
3.4.3	Tidsbruk	32
3.4.4	RAZOR™ EXs presentasjon av resultater	32
3.4.5	Holdbarhet og oppbevaring av "The 10 Target Screen kit" til RAZOR™ EX	33
3.5	Brukervennlighet av RAZOR™ med tomme reagenskassetter og egne reagenser.	33
3.5.1	RAZOR™ instrumentet	33

3.5.2	Praktisk bruk av RAZOR™	34
3.5.3	Tidsbruk	34
3.5.4	RAZOR™s presentasjon av resultater	34
3.5.5	Holdbarhet av RAZOR™s reagenskassetter og oppbevaring	34
3.6	Pris på RAZOR™ og RAZOR™ EX instrument og produkter	35
4.1	Sensitivitet for RAZOR™ instrumentet	36
4.2	Sensitivitet for RAZOR™ EX instrumentet og "The 10 Target screen kit"	36
4.3	Inhibering i komplekse prøver testet på RAZOR™ EX og "The 10 Target Screen Kit"	38
4.4	Sammenligning av RAZOR EXs "The 10 Target Screen Kit" og RAZOR™s tomme reagenskassetter	39
4.5	Alternative PCR instrumenter for bruk i felt	40
4.6	Fremtidige teknologier for rask PCR analyse i felt	41
4.7	Konklusjon	41
	Referanser	43
	Appendix A	44
A.1	Detaljerte resultater sensitivetsforsøk	44
A.1.1	<i>B. anthracis</i> sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™	44
A.1.2	<i>Brucella spp.</i> sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™	46
A.1.3	<i>B. mallei</i> sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™	47
A.1.4	<i>F. tularensis</i> sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™	49
A.1.5	<i>S. enterica</i> sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™	52
A.1.6	<i>Y. pestis</i> sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™	53
A.1.7	<i>S. flexneri</i> sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™	55
A.1.8	BG sporer: Sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™	56
A.2	Utdrag fra DTRA rapport CBRT 2011 - Chemical Biological Radiological Technology Survey (referanse 11)	58
A.2.1	RAZOR™ EX	58
A.2.2	BioSeeq PLUS.	61
A.2.3	T-COR 4	63

1 Innledning

1.1 Bakgrunn for studien

Ved en mulig biologisk hendelse er det viktig å få et raskt svar på om prøven inneholder et biologisk trusselstoff og om trusselen er reell. Raskt og pålitelig svar er viktig for å kunne igangsette beskyttelses og/eller medisinske tiltak. I hht NATO inndeles identifikasjon av biologiske trusselstoffer i tre kategorier; foreløpig identifikasjon ("provisional"), bekreftet identifikasjon ("confirmed") og utvetydig identifikasjon ("unambiguous") (1).

Egnet utstyr for bruk i felt for å identifisere biologiske trusselstoffer bør ha flest mulig av følgende egenskaper:

- Være enkel i utførelsen slik at utstyret kan benyttes av personell med minimum av laboratorieerfaring
- Være robust
- Gi raske og tilstrekkelige svar for å igangsette evt mottiltak
- Inneha en akseptabel sensitivitet og spesifisitet

FFI har tidligere vurdert immunologiske hurtigtester fra Dräger Safety, Tyskland, til foreløpig identifikasjon i felt (2). Resultatene viste at hurtigtesten var enkel og rask å gjennomføre. Toksinene ricin, SEB og botulinumtoksin ble påvist. Det er i mange tilfeller ønskelig å ha en metode som kan brukes til påvisning av flere trusselstoffer med en god sensitivitet.

En molekylærbiologisk metode som er mye brukt er Polymerase Chain Reaction (PCR) hvor spesifikke deler av arvestoffet (genomet) til mikroorganismen (bakterier og virus) kopieres opp for videre identifisering. Metoden er sensitiv, spesifikk og rask, men krever tradisjonelt en forbehandling av prøvematerialet og kan være sensitiv for forurensning. FFI har etablert PCR metoder på laboratoriet for å identifisere biologiske trusselstoffer, men disse metodene benytter utstyr som ikke nødvendigvis er egnet for mobile laboratoriefasiliteter og krever ofte opplært personell for bruk.

Biofire Diagnostics Inc. (tidligere Idaho Technology Inc.) har vært en pioner innenfor utvikling av PCR instrumenter for bruk i felt. Deres første instrument R.A.P.I.D. kom på markedet i 1999 og etter hvert har de utviklet RAZOR™ instrumentene som er evaluert i denne studien.

Smiths Diagnostics (Watford, UK) kom i 2009 på markedet med instrumentet Bio-Seeq PLUS (vedlegg 6.2.2). Tetracore Inc. (Rockville, MD, USA) har kommet ut med instrumentet T-COR 4™ Real-time PCR Thermocycler (vedlegg 6.2.3). Tetracore Inc. vil lansere et større instrument, T-COR 8™ Real-time PCR Thermocycler, med kapasitet til å analysere åtte prøver av gangen.

Real-time PCR instrumentene RAZOR™ og RAZOR™ EX er konstruert med tanke på bruk i felt.

RAZOR™ leveres med tomme reagenskassetter hvor brukeren supplerer med PCR reagenser og eget PCR oppsett. Dette systemet kan derfor sammenlignes med PCR systemer som FFI og andre

forskningslaboratorier benytter (3, 4). RAZOR™ EX bruker frysetørkede reagenser i spesialtilpassede reagenskassetter og som gjør at instrumentet blir meget enkel å bruke. Kit'et inneholder alt man trenger for å analysere direkte på pulver- eller væskeprøver. Leverandøren oppgir sensitiviteten til å være mellom 100 CFU/mL for ulike biologiske trusselstoffer.

1.2 Formålet med studien

Formålet med denne studien er å vurdere om RAZOR™ og RAZOR™ EX instrumentene egner seg til bruk i felt for å oppnå en rask og foreløpig identifikasjon av biologiske trusselstoffer i en prøve, samt om de er egnet til bruk i et «reach back laboratorium».

Instrumentet kan være aktuelle for ulike aktører involvert i beredskap, inkludert Forsvaret, politi og annet førstelinjepersonell/brukere.

Studien inkluderte følgende:

- Sammenligning av analyseresultatene fra RAZOR™ og FFIs *in house* real-time PCR instrumenter med hensyn på sensitivitet ved bruk av DNA fra *B. anthracis*, *B. maris*, *F. tularensis*, *S. enterica*, *Y. pestis*, *B. mallei*, *S. flexneri* og fra *B. atrophaeus* (BG) sporer.
- Evaluering av RAZOR™ EX med det kommersielle kit'et "The 10 Target Screen Kit" til å påvise *B. anthracis*, *C. botulinum* type A, *E. coli* O157, *F. tularensis*, *ricin*, *S. enterica*, og *Y. pestis* på DNA nivå, samt *E.coli* O157 og *S. enterica* i form av levende celler.
- Evaluering av RAZOR™ EX med "The 10 Target Screen Kit" for å påvise trusselstoffer i komplekse prøver: i) DNA fra *B. anthracis*, *E. coli* O157 og *S. enterica* i hvetemel og melk, ii) celler fra *E. coli* O157 og *S. enterica* i melk og iii) *B. anthracis* sporer fra jordprøver.
- Vurdering av produsentens protokoll og eventuelt optimalisering av denne for fremtidige brukere av systemet.
- Vurdering av brukervennlighet.
- Vurdering av kostnader for bruk av instrumentene.

Instrument	Forsøk
RAZOR™	Vurdere sensitivitet for påvisning av: <ul style="list-style-type: none"> • DNA fra <i>B. anthracis</i>, <i>B. maris</i>, <i>F. tularensis</i>, <i>S. enterica</i>, <i>Y. pestis</i>, <i>B. mallei</i> og <i>S. flexneri</i> • <i>B. atrophaeus</i> sporer
RAZOR™ EX	Vurdere egnethet for påvisning av: <ul style="list-style-type: none"> • DNA fra <i>B. anthracis</i>, <i>C. botulinum</i> type A, <i>E. coli</i> O157, <i>F. tularensis</i>, <i>ricin</i>, <i>S. enterica</i>, og <i>Y. pestis</i> • Baktericeller fra <i>E. coli</i> O157 og <i>S. enterica</i> • Biologiske trusselstoffer i melk, hvetemel og jord

Figur 1.1 Oversikt over test og evalueringsstudiet av RAZOR™ og RAZOR™ EX instrumentene.

1.3 RAZOR™ instrumentbeskrivelse

Produsenten beskriver instrumentene på følgende måte: RAZOR™ / RAZOR™ EX er real-time PCR instrumenter designet til bruk under feltforhold. Instrumentet er robust og enkelt i bruk. Det kan enkelt fraktes og brukes under ekstreme forhold. Instrumentet gir raske svar, analysen tar bare ca 30 min. Instrumentene er tilpasset bruk uten ekstern strømtilførsel og uten ekstern datatilkobling ute i felt og skal da gi en enkel resultatpresentasjon som er lett å tolke for utrenet personell og brukere. Resultater skal kunne vurderes ytterligere ved at man får mer detaljerte resultater ved ekstern datatilkobling.

RAZOR™ EX instrumentet er en videreutvikling av RAZOR™ og hvor hovedforskjellen er en litt mer avansert innebygget software med forbedret resultatpresentasjon uten ekstern datatilkobling. Figur 1.2 viser bilder av begge instrumentene.



Figur 1.2 RAZOR™ til venstre og RAZOR™ EX til høyre.

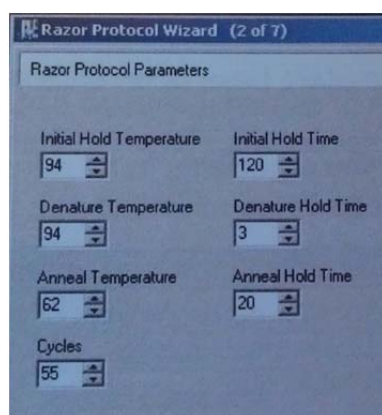
Instrumentene er produsert av BioFire Diagnostics Inc. Salt Lake City, Utah, USA.

Tabell 1.1 viser de tekniske spesifikasjonene for begge instrumenter.

Tabell 1.1 Tekniske spesifikasjoner for RAZOR og RAZOR EX.

Spesifikasjoner	RAZOR™	RAZOR™ EX
Størrelse	b ¹ : 23 cm, d: 11cm, h: 17 cm	b: 26 cm, d: 11 cm, h: 19 cm
Vekt	4,1 kg	4,9 kg
Operating temperatur	0°-40°C	0°-40°C
Batterikapasitet	4 kjøring v/25 °C	8 kjøring v/25 °C
Datalagringskapasitet	50 kjøring	75 kjøring

Instrumentene kan bruke batteri og vanlig ekstern strømtilkobling, men lave temperaturer mot 0°C kan gi lavere batterikapasitet. På RAZOR™ EX legges alle detaljerte analyseparametere til PCR reaksjonen inn ved skanning av en strekkode på esken. Når en reagenskassett kjøres skannes strekkoden på selve kassetten og dette sikrer at riktige analyseparametere blir brukt. På RAZOR må dette programmeres manuelt, enten direkte på instrumentet eller via en ekstern PC som vist i Figur 1.3.



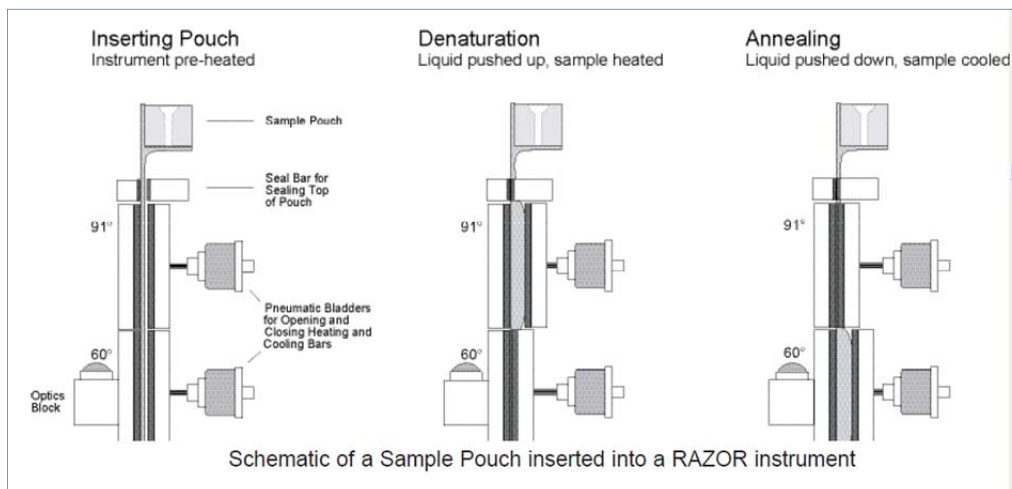
Figur 1.3 Programmering av PCR reaksjonens temperatur- og tidsparametere.

I PCR reaksjonen er det den sykliske temperaturreguleringen som gjør at den spesifikke sekvensen av genomet blir kopiert. Måten denne temperaturreguleringen utføres på i RAZOR™ / RAZOR™ EX er spesiell for disse instrumentene (Figur 1.4).

Reaksjonsblandingen tilsettes en tynn plastlomme som plasseres i instrumentets varmeblokk. Plastlommen er delt opp i to soner med forskjellig temperatur. Reaksjonsblandingen flyttes mellom de to temperatursonene ved at trykkluft åpner og lukker de to temperatursonene. Inkuberingsstidene kan være korte fordi varmeoverføringen går raskt mot den store flaten i

¹ b: bredde, d: dybde, h: høyde

plastlommene. Dette til tross for at reaksjonsvolumene er ca. 10 ganger større enn det som benyttes i laboratorieinstrumenter.

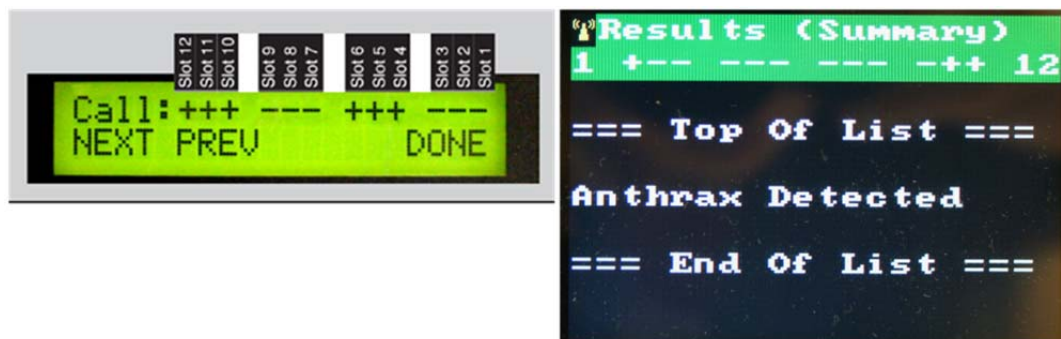


Figur 1.4 Illustrasjon av temperaturreguleringen i RAZOR™ / RAZOR™ EX (produsentens illustrasjon).

Fluorescensproben som velges brukt i PCR må tilpasses filtersettet som er tilgjengelig for identifikasjon i PCR instrumentt. Forsøkene med tomme reagenskassetter er utført på RAZOR™ med filter tilpasset TaqMan-probe med eksitasjonsbølglengde 470 ± 20 nm og emisjonsbølglengde 530 ± 10 nm.

Forsøkene med "The 10 Target screen kit" er utført på RAZOR™ EX med filter tilpasset en fluorescensprobe (FRET) som har eksitasjonsbølglengde 470 ± 20 nm og emisjonsbølglengde på 690 ± 80 nm.

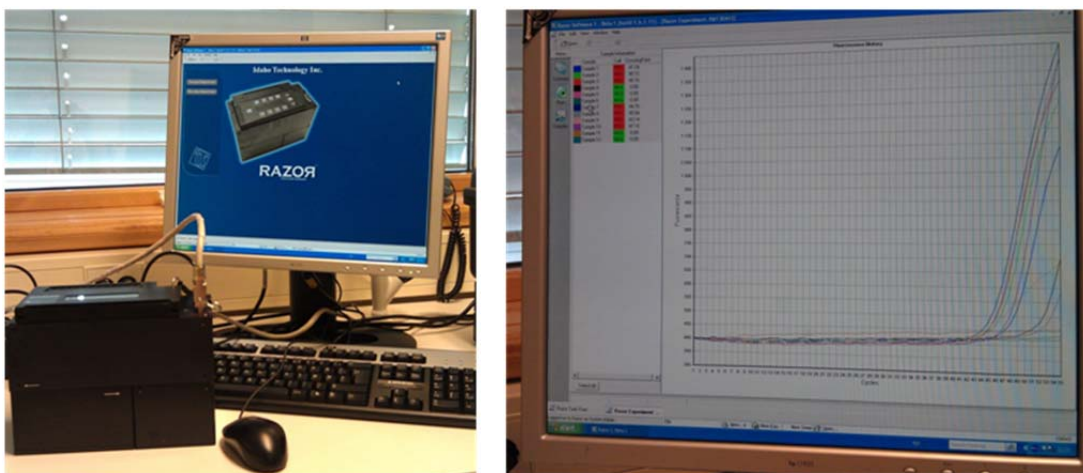
Ved kjøring uten tilkobling til ekstern datamaskin angis resultater som +/- på instrumentets display. Produsenten kaller dette "Call". RAZOR™ EX vil i tillegg angi i tekstform hvilke biologiske trusselstoffer som er påvist (Figur 1.5).



Figur 1.5 Resultatvisning på display; "Call". RAZOR™ til venstre og RAZOR™ EX til høyre.

På RAZOR™ vises det på skjermen under kjøring hvor langt kjøringen har kommet ved å angi syklus $x/55$ og ved nedtelling av tiden. Resultatene kan etter kjøring overføres til ekstern datamaskin som vist i

Figur 1.6 for mer avansert databehandling med akkumuleringskurver for PCR-produkt (fluorescensintensitet som funksjon av antall sykluser) og Crossing-Point verdier (CP). Produsenten definerer CP-verdier som det syklusnummeret der fluorescens intensiteten for en prøve overstiger grensen for bakgrunnsfluorescensen. En lav CP-verdi indikerer større mengde av aktuelt DNA enn en høy CP-verdi. Hvis RAZOR™ kjøres med ekstern datatilkobling kan akkumuleringskurver for PCR-produktet følges direkte på skjermen.



Figur 1.6 RAZOR™ koblet til PC og skjermbilde av resultatvisning på PC med akkumuleringskurver for PCR-produkt, "Call" (POS, NEG) og CP-verdier.

RAZOR™ EX har en litt mer avansert innebygget software og viser også real-time akkumuleringskurver for PCR-produkt på instrumentskjermen. Etter endt kjøring vises resultatene (

Figur 1.6) som inkluderer akkumuleringskurver, "Call" og CP-verdier. Rådata importeres til en database etter at kjøringen er ferdig og kan der valideres ytterligere med mer detaljerte kurver og CP-verdier. I tillegg kan det skrives ut en rapport fra analysen.

1.4 Protokoll

Her følger produsentens retningslinjer for prøve- og reagensbehandling for kit "The 10 Target Screen Kit" analysert på RAZOR™ EX.

Konseptet er basert på ferdige kit som inneholder det som er nødvendig for utførelsen: Svaber og plastpipette for innsamling av prøvemateriale, flasker til preparering av prøvematerialet, sprøyter til overføring av prøve og reagenskassett for analysering av prøve. I tillegg til "The 10® Target Screen Kit", finnes det andre kit til bruk på RAZOR™ EX instrumentet. I Tabell 1.2 gis en oversikt over tilgjengelige kit.

Tabell 1.2 Oversikt over tilgjengelige kommersielle kit for identifisering av hvilke biologiske trusselstoffer.

“The 10 Target Screen Kit “	“ RAZOR™ BA 3 Target Kit”	“RAZOR™ Food Screen 3 Target Kit”	“RAZOR™ Water Screen 3 Target Kit”
<i>B. anthracis</i> ² <i>Brucella</i> ³ <i>C. botulinum A</i> ⁴ <i>C. burnetii</i> ⁵ <i>E. coli</i> O157 ⁶ <i>F. tularensis</i> ⁷ <i>Ricin</i> ⁸ <i>Salmonella</i> ⁹ <i>V. major</i> ¹⁰ <i>Y. pestis</i> ¹¹	<i>B. anthracis</i> ² Target 1, 2 og 3	<i>Campylobacter</i> ¹² <i>Listeria monocytogenes</i> ¹¹ <i>Salmonella spp.</i> ⁸	<i>Cryptosporidium</i> ¹³ <i>Salmonella</i> ⁸ <i>E.coli</i> O157 ⁵



Figur 1.7 RAZOR™ EX instrumentet benytter ”The 10 Target Screen Kit” og inneholder en reagenskassett, utstyr til prøvetaking, en buffer til prøvepreparering og en buffer til positiv kontroll.

² *B. anthracis* bakterien forårsaker miltbrann.

³ *Brucella* bakterien forårsaker brucellose.

⁴ *C. botulinum A* bakterien produserer botulinumtoksin A som forårsaker botulisme.

⁵ *C. burnetii* bakterien forårsaker Q feber.

⁶ *E. coli* O157 bakterien forårsaker matforgiftning.

⁷ *F. tularensis* bakterien forårsaker harepest.

⁸ Ricin er et giftig toxin fra planten *Ricinus communis*.

⁹ *Salmonella spp.* forårsaker salmonellose.

¹⁰ *Varolia major* er et virus som forårsaker kopper.

¹¹ *Y. pestis* bakterien forårsaker pest.

¹² *Campylobacter spp.* og *L. monocytogenes* forårsaker matbårne infeksjoner.

¹³ *Cryptosporidium* er en parasitt som gir diaré sykdom.

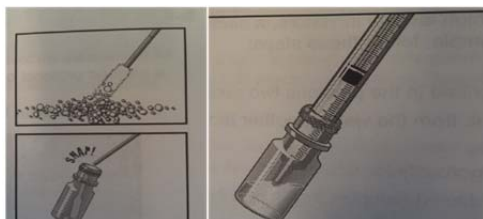
Preparering av reagenser og prøve trenger ingen sentrifugering eller nøyaktig pipettering, noe som gjør metoden spesielt godt egnet til feltbruk. I de ferdige kit'ene er alle reagenser frysetørret i en reagenskasset, som består av en "loading stasjon" og en tynn klar og fleksibel plastlomme som er delt i 12 deler. Den tynne klare plasten gir stor overflate som igjen medfører raske temperaturendringer og effektiv fluorescensdeteksjon. Plastlommene er koblet til "loading stasjonen" der reagensene er lagret som tørrstoff. Tørrstoffet løses opp når prøve tilsettes. Hver lomme kan inneholde ulike sammensetninger av reagenser. "The 10 Target screen kit" inneholder reagenser for ti ulike biologiske trusselstoffer (Tabell 1.2), en inhiberingskontroll og en positiv kontroll.

Produsenten gir følgende retningslinjer for prøvepreparering:

- Væskeprøve: 0,5 mL av væsken suges opp med den medfølgende plastpipetten og overføres til "unknown sample"- flasken. Flasken ristes i 30 sekunder. Innholdet i "unknown sample"-flasken er ikke oppgitt.
- Pulverprøve: Pulveret samles i en haug og medfølgende svaber dyppes ned i pulveret. Svaberen settes så i "unknown sample"-flasken og nederste delen av svaberen brekkes av. Flasken ristes i 30 sekunder(Figur 1.8).

Produsenten har en demonstrasjonsvideo på sin hjemmeside som viser prøveprepareringsprosessen:

<http://www.biofire dx.com/Video/RAZOREXHazmatDemo.html>



Figur 1.8 Produsentens illustrasjon av preparering av pulverprøver ved bruk av en svaber deretter en sprøyte.

Prøven overføres til reagenskassetten ved at prøvematerialet trekkes opp i sprøyten med en spesiell spiss. Figur 1.9 viser hvordan sprøytespissen føres ned i en "sample inlet port". Vakuum i reagenskassetten gjør at 100 µl væske suges inn i "loading-stasjonen".



Figur 1.9 En sprøyte brukes til å overføre prøven til reagenskassetten "loading-stasjon".

I "loading-stasjonen" løses reagenstørstoffet opp og prøve/reagensblanding presses så ut i hver enkelt plastlomme ved at man trykker ned ett stempel for hver lomme. Deretter settes kassetten på plass i instrumentet og analysen kan starte. I "The 10 Target Screen Kit'et" trekkes 2 mL prøve opp i sprøyten og ved overføring fordeles prøven med 100 µl i hver av de 12 lommene.

Tilsetting av prøve til RAZOR instrumentet:

- Ved bruk av tomme reagenskassetter (uten frysetørret reagens) benyttes egne reagenser. Det må lages en reagens/prøveblanding først og som trekkes opp i sprøyten og deretter tilsettes reagenskassetten. Det er 12 "sample inlet ports" og hver lomme må tilsettes separat med hver sin sprøyte. Minimum 200 µl trekkes opp i sprøyten.

I denne studien ble det forsøkt med 150 µl totalvolum som viste seg å fungere bra på laboratoriet. Under felt betingelser bør man bruke produsentens anbefaling på 200 µl.

2 Materialer og metoder

2.1 Instrumenter og real-time PCR analysebetingelser

2.1.1 Sensitivitetsforsøk utført på RAZOR™

Alle sensitivitetsforsøk er utført på RAZOR™ med tomme reagenskassetter og egne reagenser.

Det er brukt "default" PCR-program for RAZOR™ for alle primere benyttet i analysen. Første denaturering er i 2 min ved 94°C, deretter 55 sykluser med denaturering i 10 sekunder ved 94°C og annealing 30 sekunder ved 60°C.

2.1.2 RAZOR™ EX og "The 10 Target Screen Kit"

Alle forsøk med "The 10 Target Screen Kit" er utført på RAZOR™ EX.

PCR betingelser for "The 10 Target Screen Kit" legges automatisk inn i instrumentet ved skanning av strekkoden og er som følger: Initial denaturering: 2 min 93°C, 55 sykluser med denaturering 3 sekunder ved 91°C og annealing 15 sekunder ved 60°C.

2.2 Prøvemateriale: DNA, celler og sporer

Bakterie-DNA er enten mottatt fra ekstern samarbeidspartner eller dyrket og isolert fra egne stammer (Tabell 2.1). Ricin-DNA er isolert fra blad på plante ved bruk av en standard metode for DNA-isolering.

Tabell 2.1 Oversikt over bakteriestammer og isolert DNA brukt i denne studien.

Biologisk trusselstoff	Typestamme	Dato DNA-isolering utført	NanoDrop ng/µl	DNA-renhet A_{260nm}/A_{280nm}	PicoGreen 4) ng/µl
<i>B. anthracis</i>	A80	¹⁾ 2011–FFI	4,97	1,70	0,15
<i>B. maris bvl</i>	019-00718	2006	18,94	2,26	2,99
<i>C. botulinum</i> type A	CIP104310T	221112-FFI	11,46	2,11	2,68
<i>S. enterica</i>	CCUG 42060T	310712-FFI ²⁾	159	2,11	21,2
<i>E. coli</i> O157	CCUG 44857	310712-FFI ²⁾	55	1,94	19,0
<i>F. tularensis</i>	FCS 595	Preparert 2006	17,07	2,18	11,13
Ricin	fra plante	01082012 FFI ³⁾	91,07	1,95	31,3
<i>S. flexneri</i>	FML 1980	Kokeprep NVH 2012	1250	1,73	358
<i>B. mallei</i>	580	Preparert 2006	8,90	2,16	1,01
<i>Y. pestis</i>	CEB 02-455	Preparert 2005	18,19	1,85	6,3

1) Mottatt fra Veterinærinstituttet (VI) fra norsk utbrudd storfe 2002.

2) Isolert med Qiagen DNeasy blood and tissue kit.

3) Ca 1 g finhakket blad deretter mortet med 5 mL enzymatisk lysisbuffer. 180 uL av dette ble brukt til DNA-isolering med metoden "DNeasy blood and tissue kit". Ricin 1: Første elueringsvolum 200ul fra begge isoleringer slått sammen. Ricin 2: Elueringsvolum 100 uL fra begge isoleringsrør slått sammen.

4) PicoGreen måler dobbeltrådet DNA, mens Nanodrop-metoden også måler RNA, enkelttrådet DNA, degradert DNA og frie nukleotider. PicoGreen-metoden vil derfor gi lavere og mer nøyaktige verdier for dobbeltrådet DNA enn NanoDrop-metoden.

Bakterier og sporer benyttet i studien: Oppdyrkede celler fra *S. enterica* CCUG 42060T og *E. coli* O157:H7 CCUG44857. Sporer fra *B. atrophaeus* BG (Dugway) og *C. botulinum* type A (CIP104310T) (FFI).

2.3 Reagenser

Reagenser til RAZOR™: LightCycler 40 Probes Master ref 04887 301 001 Roche Diagnostics, Mannheim Germany. Fast start Taq DNA polymerase, reaction buffer, dNTP mix og 6,4 mM MgCl₂.

Reagenser til RAZOR™ EX: Alle reagenser er frysetørket og er inkludert i den tilhørende reagenskassetten.

2.4 Primere og prober til sensitivetsforsøk på RAZOR™

Primere og prober brukt i dette studiet er vist i Tabell 2.2.

Tabell 2.2 Oversikt over primere og prober brukt i sensitivetsforsøk på RAZOR™.

Mikroorganisme	Target gen	Primer/probe sekvens	Final kons nM	Ref.
<i>B. anthracis</i>	cap	F : 5'-TTG GGA ACG TGT GGA TGA TTT-3' R: 5'-TCA GGG CGG CAA TTC ATA AT -3' P: 5'-FAM-TAG TAA TCTAGC TCC AAT TGT - MGBNFQ-3'	300 900 200	3 a
	pag	F: 5'-CGG ATA GCG GCG GTT AAT C-3' R:5'-CCA ATG CTA TTT TAA GGG CTT CTT TT -3' P: 5'- FAM-TAG AAA CGA CTA AAC CGG ATA T-MGBNFQ-3'	300 900 200	3, a
<i>Y. pestis</i>	pla	F : 5'- GAA AGG AGT GCG GGT AAT AGG TT-3' R: 5'-CCT GCA AGT CCA ATA TAT GGC ATA -3' P: 5'-FAM- TTA CCA GCG CTT TTC - MGBNFQ-3'	300 900 200	3, a
<i>Brucella</i> spp.	IS711	F: 5'-GGC CTA CCG CTG CGA AT-3' R: 5'-TTG CGG ACA GTC ACC ATA ATG -3' P: 5'-FAM-AAG CCA ACA CCC GGC - MGBNFQ-3'	300 900 200	4, a
<i>F. tularensis</i>	23kDa	F : 5'-TGA GAT GAT AAC AAG ACA ACA GGT AAC A-3' R: 5'-GGA TGA GAT CCT ATA CAT GCA GTA GGA -3' P: 5'-FAM-CCA TTC ATG TGA GGA CTG MGBNFQ-3'	900 900 200	3, a
<i>Burkholderia</i>	bimA _{ma}	F : 5'-CAG TTG ATT CTC CCA CC-3' R: 5'-TGT CTT GTT CAG CAT GAG A -3' P: 5'-FAM-CAT ACG GAT GTA TAG AAC CAA T - MGBNFQ-3'	300 900 200	5, b
<i>S. flexneri</i>	ipaH	F: 1635F: 5'-CAG AAG AGC AGA AGT ATG AG-3' R: 1804R: 5'-CAG TAC CTC GTC AGT CAC -3'	300 900 200	6, c

		P: 5'-FAM-ACA GGT GAT GCG TGA GAC TG - MGBNFQ-3'		
<i>S. enterica</i>		F: c25- F : 5'-GCC AGA AGC GTG CTT TTC C-3' R: c25-R: 5'-GGG CAA CGA GTG GGT ATT TTT -3' P: 5'-FAM-CAC GCC AGG AGC AG - MGBNFQ-3'	400 400 200	7, d
<i>B. atrophaeus</i> BG sporer	tarA	F: BGtarA-F:5'-CATTACATTACAATTCCCTTCACCTT-3', R: BGtarA-R: 5'-CCCTTCTGCTGCGTCTTTT-3', P: 5'-FAM-CGATGAATTAATATGAGGAGCGTGCAA-MGBNFQ-3'	300 900 200	

a) Alle probekonsentrasjonene er redusert til 200 nM (250 nM i referanse) pga store reaksjonsvolumer på RAZOR. *Brucella*: Benyttet 900nM av primer R i stedet for 300 nM.

b) Primerkonsentrasjon oppgitt i tabellen avviker fra primerkonsentrasjonen brukt i referanse 5.

d) Benyttet primerkonsentrasjoner oppgitt i referanse (4), men PCR-betingelser er "standard RAZOR".

2.5 Beregning av enheten genomkopier/mL

DNA-konsentrasjon er målt med både NanoDrop og PicoGreen-metode. Siden Nanodrop-metoden ikke er spesifikk for dobbelttrådet DNA, er det valgt å bruke PicoGreen-resultatene i beregninger (Tabell 2.1).

For å beregne enheten genomkopier/mL er genomstørrelsen brukt. Sensitiviteten er angitt både i genomkopier/mL og mengde DNA i prøven som kan detekteres for å kunne relatere resultatene til antall bakterier/celler.

Til beregning av genomkopier/mL er følgende formel er brukt:

$$\text{Antall genomkopier/ng} = \frac{NA(6,0221415 \times 10^{23}) \text{kopier/g}}{\text{Genom størrelse} \times \frac{650 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{\text{bp}} \times 10^9}$$

$$\text{Antall genomkopier/mL} = \text{DNA-konsentrasjon i ng/}\mu\text{l} \times \text{antall genomkopier/ng} \times 1000$$

2.6 Forsøksoppsett sensitivitet

Sensitivitetsforsøkene er utført på samme måte for alle de biologiske trusselstoffene testet.

Forsøket er delt opp i 2 deler.

Del 1 (innledende test): Test av en fortynningsrekke med 1 parallell av hver konsentrasjon fra 1×10^8 – 1×10^1 genomkopier/ml og 2×10^8 – 2×10^2 sporer/mL for BG sporer.

Del 2: Test av fortynningsrekke med tre paralleller av 3 konsentrasjoner. De to laveste konsentrasjonene som ga positiv "Call" og den høyeste konsentrasjonen som ga negativ "Call" i del 1 av forsøket; f.eks 1×10^4 , 1×10^3 og 1×10^2 genomkopier/mL.

Sensitiviteten angis som den laveste konsentrasjon som gir positivt resultat for tre av tre paralleller.

3 Resultater

3.1 Sensitivitetsforsøk på RAZOR™

Formålet med sensitivitetsforsøkene er å undersøke om RAZOR™ som real-time PCR instrument er sammenlignbar med konvensjonelle real-time PCR instrumenter brukt på «reach back laboratorier». Oppnådd sensitivitet sammenlignes med publisert verdier for sensitivitet for samme primere og prøber (3-7).

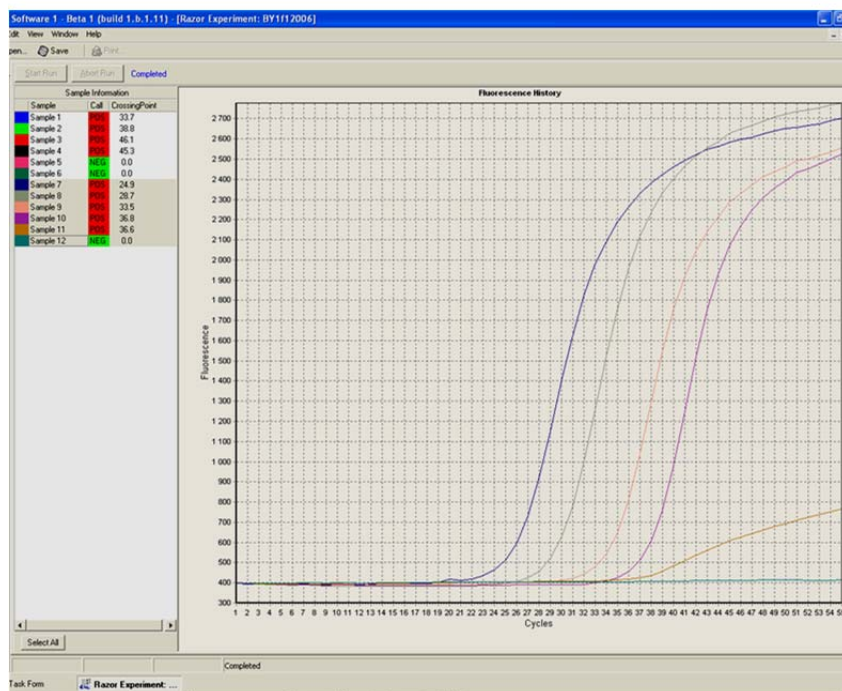
Sensitivitetsforsøkene er utført med biologiske trusselstoffer og primere beskrevet i henholdsvis Tabell 2.1 og Tabell 2.2. Prøvene er analysert ved bruk av de tomme reagenskassetene som tilhører RAZOR™ instrumentet. DNA fra bakteriene *B. anthracis*, *B. maris bv1*, *F. tularensis*, *S. enterica*, *Y. pestis*, *B. mallei*, *S. flexneri*, samt *B. atrophaeus* sporer ble benyttet til testing av sensitivitet.

3.1.1 Eksempel på sensitivitetsforsøk med *Y. pestis*

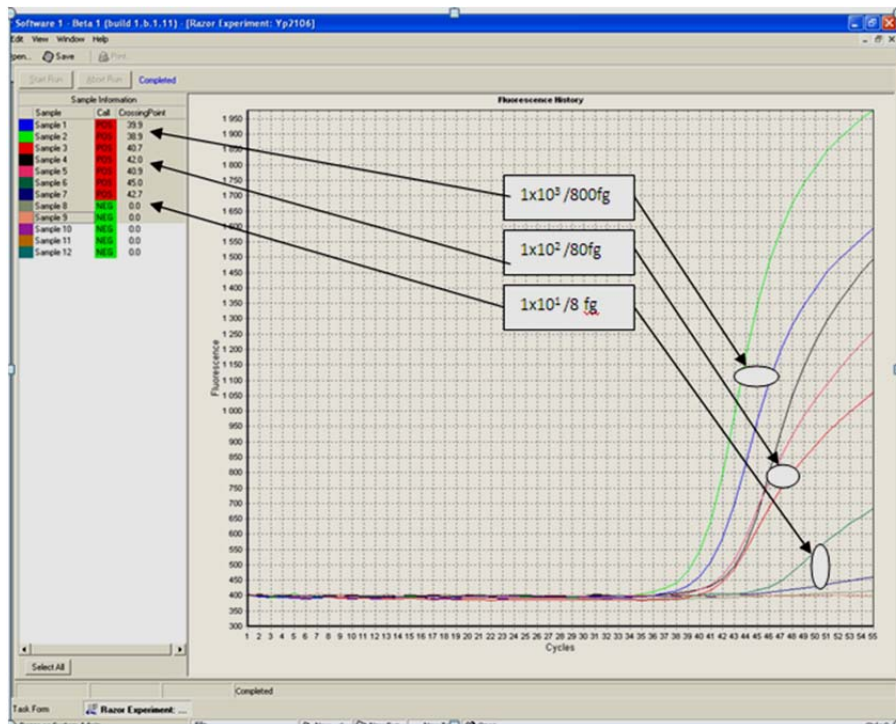
Forsøket vist i Figur 3.1 er en innledende test (Del 1, kapittel 2.6) som viser at fortynningsrekken fra 1×10^6 genomkopier/mL ned til 1×10^2 genomkopier/mL alle gir positive resultater i PCR. For å bestemme sensitiviteten nøyaktig, ble prøvene 1×10^3 genomkopier/mL til 1×10^1 genomkopier/mL analysert i tre paralleller hver (Del 2, kapittel 2.6). Resultatene er vist i Figur 3.2.

Figur 3.1 viser positive resultater i form av stigende fluorescensintensitetskurver i PCR og positiv «Call» indikert med rød farge i resultatpresentasjonen for prøven *Y. pestis*. Negative resultater sees ved utflatende kurver og negativ »Call» indikert med grønn farge. Tilsvarende forsøk for *B. anthracis*, *B. maris bv1*, *B. mallei*, *F. tularensis*, *S. enterica*, *S. flexneri*, samt *B. autropheus* sporer er dokumentert i vedlegg 6.1.1-6.1.8. Sensitiviteten er definert som den laveste fortyningen som fortsatt gir positivt resultat i tre av tre paralleller.

Resultatene viser at *Y. pestis* ble påvist i tre av tre paralleller for 1×10^2 genomkopier/ml. Sensitiviteten er derfor bestemt til 1×10^2 genomkopier/mL.



Figur 3.1 Sensitivitet *Y. pestis*. Del 1: Brønn 7, 1×10^6 genomkopier/mL (blå); brønn 8, 1×10^5 genomkopier/mL (grå); brønn 9, 1×10^4 genomkopier/mL (rosa); brønn 10, 1×10^3 genomkopier/mL (lilla); brønn 11, 1×10^2 genomkopier/mL (brun); brønn 12, negativ kontroll (turkis). Figuren viser akkumuleringskurver (økningen i fluorescens over tid målt i antall PCR sykluser, "Call" og CP-verdier.



Figur 3.2 Sensitivitet *Y. pestis*. Del 2: Brønn 1-2, 1×10^3 genomkopier/mL (blå og grønn), brønn 3-5, 1×10^2 genomkopier/mL (rød, svart og rosa); brønn 6-8, 1×10^1 genomkopier/mL (mørk grønn, blå og grå); brønn 9, negativ kontrol (rosa). Figuren viser økningen i fluorescens over tid målt i antall PCR sykluser, "Call" -resultater og CP-verdier.

3.1.2 Sensitivitetsforsøk med RAZOR™ for syv biologiske trusselstoffer

Tilsvarende fremgangsmåte som for testing av sensitiviteten til RAZOR™ for påvisning av *Y.pestis* (kapittel 3.1.1) ble benyttet for å vurdere sensitiviteten til RAZOR™ for påvisning av seks andre biologiske trusselstoffer. Resultatene i Tabell 3.1 er en oppsummering av disse resultatene og viser den laveste DNA konsentrasjonen hvor positive resultater for tre av tre paralleller som ble testet med RAZOR™ instrumentet.

Tabell 3.1 Oppsummering av resultater fra sensitivitetsforsøk med RAZOR™ for påvisning av biologiske trusselstoffer. Den oppnådde sensitiviteten med RAZOR™ er sammenlignet med publiserte verdier.

Mikroorganisme, biologiske trusselstoff	Target gen	Sensitivitet: genomkopier/mL	Sensitivitet: mengde DNA/reaksjon (a)	Sensitivitet oppgitt i referanse	Referanse
<i>B. anthracis</i>	Cap	1×10^3	860 fg	100fg	2
	Pag	1×10^3	860 fg	10 fg	2
<i>Y. pestis</i>	Pla	1×10^2	80 fg	10 fg	2
<i>B. maris</i>	IS711	<10 (b)	<5,3 fg	10 fg	2
<i>F. tularensis</i>	23kDa	1×10^3	334 fg	10 fg	2
<i>B. mallei</i>	bimA _{ma}	1×10^4	4 pg	1pg	3
<i>S. flexneri</i>	ipaH	1×10^6	1074 pg	4×10^4 CFU/mL	4
<i>S. enterica</i>	c25	1×10^2	85 fg	41,2 fg	5
<i>B. atrophaeus</i> (BG)	tarA	2×10^3 sporer/mL			(c)

- a) Referansene oppgir at DNA konsentrasjonene er målt med NanoDrop. I denne studien er resultatene fra PicoGreen-metoden benyttet i beregningene siden denne metoden gir mer nøyaktige resultater (se fotnote 4 i Tabell 2.1).
- b) Referansen angir sensitiviteten som mengde DNA/reaksjon. Antall kopier av PCR-target IS711 varierer mellom 7 og 30 kopier for ulike arter av *Brucella*. *B. maris* som er brukt i denne studien har et stort antall kopier av target IS711 og kan være årsaken til at det blir positivt resultat ned til 10 genomkopier/mL. Negativ kontroll viser fravær av kontaminering. Referansen angir ikke hvilken *Brucella* som er brukt i sensitivitetsforsøk.
- c) Ingen data tilgjengelig for sammenligning.

Produsenten for RAZOR™ oppgir en sensitivitet på 100-1000 CFU/mL, men henviser også til data presentert på vitenskapelige poster der resultater med langt svakere sensitivitet, kun 30000 CFU/mL for to av artene (6).

Oppnådd sensitivitet i FFIs forsøk var mellom 100 og 1000 genomkopier eller sporer per mL for de fleste trusselstoffene. For *S. flexneri* ble sensitiviteten noe svakere (1×10^6 genomkopier/mL), noe som kan henge sammen med lavere DNA-kvalitet målt for dette DNA. *B. maris* ble påvist med en sensitivitet på under 10 genomkopier/mL. Det gode resultatet skyldes trolig at FFIs PCR-oppsett benytter et høykopi-target som templat i PCR.

3.2 Forsøk med ”The 10 Target Screen Kit” på RAZOR™ EX instrumentet

RAZOR™ EX instrumentet ble testet og evaluert for bruk av ferdige frysetørrede reagenser (reagenskassetter) og til bruk i felt. Følgende spørsmål ble adressert:

- Kan ”The 10 Target Screen Kit” påvise DNA fra forskjellige bakterier i en og samme prøve?
- Kan ”The 10 Target Screen Kit” påvise bakterier i komplekse prøver (melk, hvetemel, jord) som kan inneholde inhiberende faktorer for PCR analysen?
- Kan bakterier og sporer påvises i en prøve uten behov for prøvepreparering?
- Hva er brukervennligheten av RAZOR™ EX i felt?

Resultatene oppnådd er i henhold til hva instrumentet har levert i form av ”Calls” (positiv/negativ ”Call”, kapittel 1.3).

3.2.1 Kan ”The 10 Target Screen Kit” påvise DNA fra forskjellige bakterier i samme prøve?

For å besvare om ”The 10 Target Screen Kit” kan påvise DNA fra forskjellige bakterier i samme prøve ved bruk av RAZOR™ EX, ble det laget en blandet prøve, ”Blandet prøve 1”(B1), som bestod av 10^4 genomkopier/mL fra følgende seks trusselstoffer; *B. anthracis*, *C. botulinum* type A, *E. coli* O157, *F. tularensis*, *Y. pestis* og DNA fra planten *R. communis*. 10^4 genomkopier/mL er ca 10x høyere enn den sensitiviteten som ble oppnådd under kapittel 3.1.

Resultater oppnådd:

- Det ble funnet positive ”Call” ” på alle de seks trusselstoffene tilsatt den blandede prøven.
- Det ble ikke funnet falske positive ”Calls”.
- Tre av de seks prøvene som alle ga positiv ”Call” med 10^4 genomkopier/mL, ga også positiv ”Call” for en fortynnet prøve med 100 genomkopier/mL. Disse resultatene ble oppnådd med *B. anthracis*, *Y. pestis* og ricin.

Den samme analysen ble utført med en ”Blandet prøve 2”(B2) som bestod av 10^4 genomkopier/mL fra tre trusselstoffer; *B. anthracis*, *E. coli* O157 og *S. enterica*. I dette forsøket fikk alle tre bakterieartene positiv ”Call”.

Resultatene viste at RAZOR™ EX og ”The 10 Target Screen Kit” kan påvise DNA fra alle de seks forskjellige trusselstoffer testet i en og samme prøve.

3.2.2 Kan "The 10 Target Screen Kit" påvise bakterier i komplekse prøver (melk, hvetemel) som kan inneholde inhiberende faktorer for PCR analysen?

For å vurdere om RAZOR™ EX kunne benyttes til å analysere biologiske trusselstoffer i komplekse prøver, ble hvetemel og melk valgt som prøvetyper. Hvetemel og melk inneholder komponenter som er kjent for å inhibere PCR-reaksjonen. Dette kan da føre til falske negative resultater hvis man analyserer prøven direkte ved hjelp av PCR. En metode for å isolere av DNA før PCR analysen utføres kan bidra til å fjerne slike inhiberende faktorer. Siden "The 10 Target Screen Kit" benytter en veldig enkel metode for prøvepreparering, samt at innholdet i kit bufferen" er ukjent, er det nødvendig å teste ut om produsentens prøvepreparering er i stand til å påvise biologiske trusselstoffer i prøver som inneholder inhiberende faktorer.

3.2.2.1 Melk som en kompleks prøve

RAZOR™ EX og "The 10 Target Screen Kit" ble benyttet for å påvise DNA fra utvalgte bakterier i melk.

Dette ble testet med "Blandet prøve 3"(B3) som inneholdt 10^4 genomkopier/mL fra følgende tre bakterier; *B. anthracis*, *E. coli* O157 og *S. enterica*. Resultatene er vist i *Tabell 3.2*.

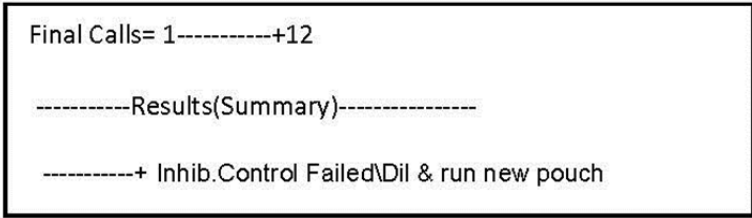
En prøve ble tilsatt lettmelk fra Tine i en konsentrasjon som tilsvarer 0,5 mL væskeprøve til bufferflasken fra kit'et (som er produsentens retningslinje for prøvetaking av væskeprøver, kapittel 1.4). En annen prøve ble tilsatt dobbelt så mye lettmelk.

Tabell 3.2 Sammenligning av "Call"/CP-verdier for melk tilsatt B. anthracis, E. coli O157 og S. enterica. CP-verdien er lavere jo mer DNA det påvises i prøven. iCP-verdier for inhiberingskontroll (IC) og positiv kontroll (PC) er inkludert.

Blandet prøve	<i>B. anthracis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	IC	PC
B3 uten melk	Pos/38,43	Pos/34,97	Pos/37,32	Pos/37,14	Pos/37,07
B3 med melk	Pos/41,66	Pos/38,58	Pos/39,49	Pos/40,33	Pos/37,66
B3 med dobbelt så mye melk	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos/37,33
B3 med dobbelt så mye melk og fortynnet 1:10	Pos/42,16	Pos/36,46	Pos/38,78	Pos/36,79	Pos/37,17

RAZOR™ EX påviste DNA fra de tre bakterieartene tilsatt melk. CP-verdiene økte noe sammenlignet med en prøve uten melk, også for inhiberingskontrollen (IC). Resultatene viste ingen falske positive resultater.

Ved å tilsette dobbelt så mye melk ble alle analysene med RAZOR™ EX negative, inkludert IC. I slike tilfeller anbefaler produsenten fortynning av prøven. Instrumentets resultatpresentasjon vil da vise meldingen «Dil&run new pouch» (Figur 3.3).



```
Final Calls= 1-----+12
-----Results(Summary)-----
-----+ Inhib.Control Failed\Dil & run new pouch
```

Figur 3.3 Instrumentets resultatpresentasjon på skjermen når ”FinalCalls” for IC kontrollen blir negativ (-). Det er registrert inhibering og brukeren får instruksjon om fortynning og reanalyse.

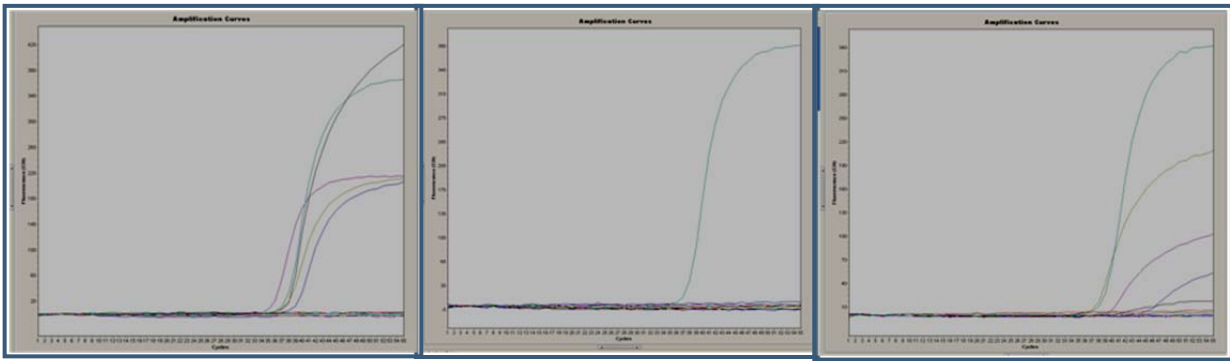
Etter at melkeprøven ble fortynnet og reanalysert ble det oppnådd positiv ”Call” (Tabell 3.2). Dette betyr at både inhiberingskontrollen og produsentens anbefaling om fortynning av prøven virker.

Konklusjonen er at RAZOR™ EX og ”The 10 Target Screen Kit” kan påvise DNA fra de biologiske trusselstoffene tilsatt melk i denne studien.

3.2.2.2 Hvetemel som inhibitor

Brev med hvitt pulver tilsatt sporer av *B. anthracis* sporer kan være en måte å spre biologiske trusselstoffer på.

I denne studien ble hvetemel benyttet som en pulverprøve. Melet ble tilsatt ”Blandet prøve 4”(B4), som inneholdt 10^4 genomkopier/mL fra følgende tre bakterier: *B. anthracis*, *E. coli* og *S. enterica* (samme prøveblanding som i kapittel 3.2.2.1 Melk som inhibitor). Denne blandede prøven ble tilsatt hvetemel ved å bruke en svaber som fulgte med kit’et (Figur 1.8). Svaberen ble dyppet i melet for deretter å knekke av enden av svaberen i bufferens ”unknown sample”-flasken som inneholdt B4 prøven etterfulgt av risting i 30 sekunder.



Figur 3.4 Analyse av "Blandet prøve 4" (B4) med DNA fra *B. anthracis*, *E. coli* og *S. enterica*, i en hvetemelprøve. a. B4 uten hvetemel; b. B4 med hvetemel og c. B4 med hvetemel, fortynnet 1:10. Akkumuleringskurver viser dannelse av PCR-produkt (fluorescens over antall sykluser) for *B. anthracis* (blå); *E. coli* (fiolett); *S. enterica* (svart) internkontroll (oker) og positiv kontroll (grønn).

Resultatene (

Figur 3.4) viser at tilsetning av hvetemel medfører en sterk inhibering av PCR reaksjonen, alle tre inhiberingskontrollkjøringer (IC) får negativ "Call". RAZOR™ EX oppga "IC control failed" og anbefalte fortynning.

Prøven ble fortynnet ved å overføre 0,5 mL av prøvematerialet til en ny bufferflaske ("unknown sample") etterfulgt av risting i 30 sekunder. Dette ga en 1:10 fortynning av prøven. Denne fortynnede prøven fikk positiv "Call" for alle tre bakterieartene, men CP-verdiene indikerte at det fremdeles var noe inhibering til stede.

Resultatene viser at konsentrasjonen av hvetemel i prøven er av betydning for RAZOR™ EX analysen. Dette tilsier at metoden for prøvetakingen kan være avgjørende for å oppnå en god analyse. Det ble derfor testet ut flere måter å samle opp pulver på, da det er stor forskjell på hvor mye pulver som fester seg på svaberen. Demonstrasjonsvideoen av prøvebehandlingen (kapittel 1.3) viser at svaberen dyppes lett ned i pulveret. Ved å rulle svaberen rundt i pulveret, fester det seg 2-3 ganger så mye hvetemel på svaberen i forhold til bare å dyppe den ned i pulveret.

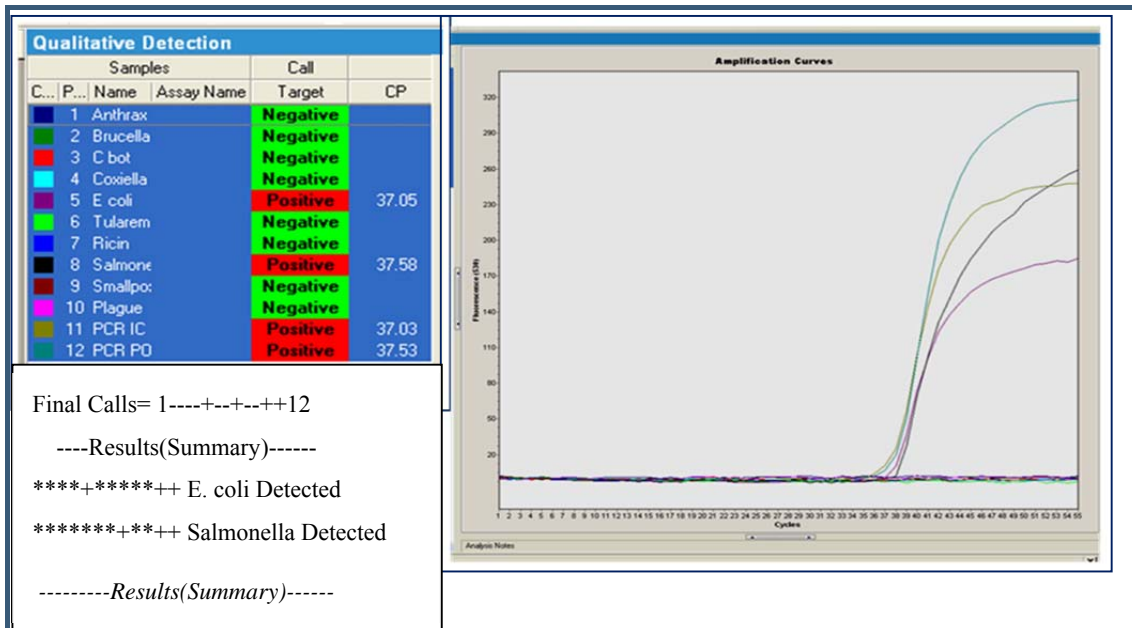
3.2.3 Kan bakterier og sporer påvises i en prøve uten behov for prøvepreparering?

Hensikten med dette forsøket var å teste om RAZOR™ EX instrumentet og "The 10 Target Screen Kit" kunne påvise bakterier og sporer i en prøve hvis man kun benytter den enkle prøveprepareringen produsenten anbefaler.

3.2.3.1 Påvisning av bakterieceller uten prøvepreparering

I dette forsøket ble det først undersøkt om en blanding av *E. coli* og *S. enterica* i samme prøve kunne påvises. Denne blandede prøven, "Blandet prøve 5" (B5), bestod kun av oppdyrkede bakterieceller av *E. coli* og *S. enterica* (Tabell 2.1). Kulturen ble tilsatt direkte i kit'ets buffer

flaske etterfulgt av risting i 30 sekunder før tilsetning av prøven til reagenskassetten. Sluttkonsentrasjon av celler i prøven var 5×10^4 CFU/mL. Resultatene er vist i Figur 3.5.

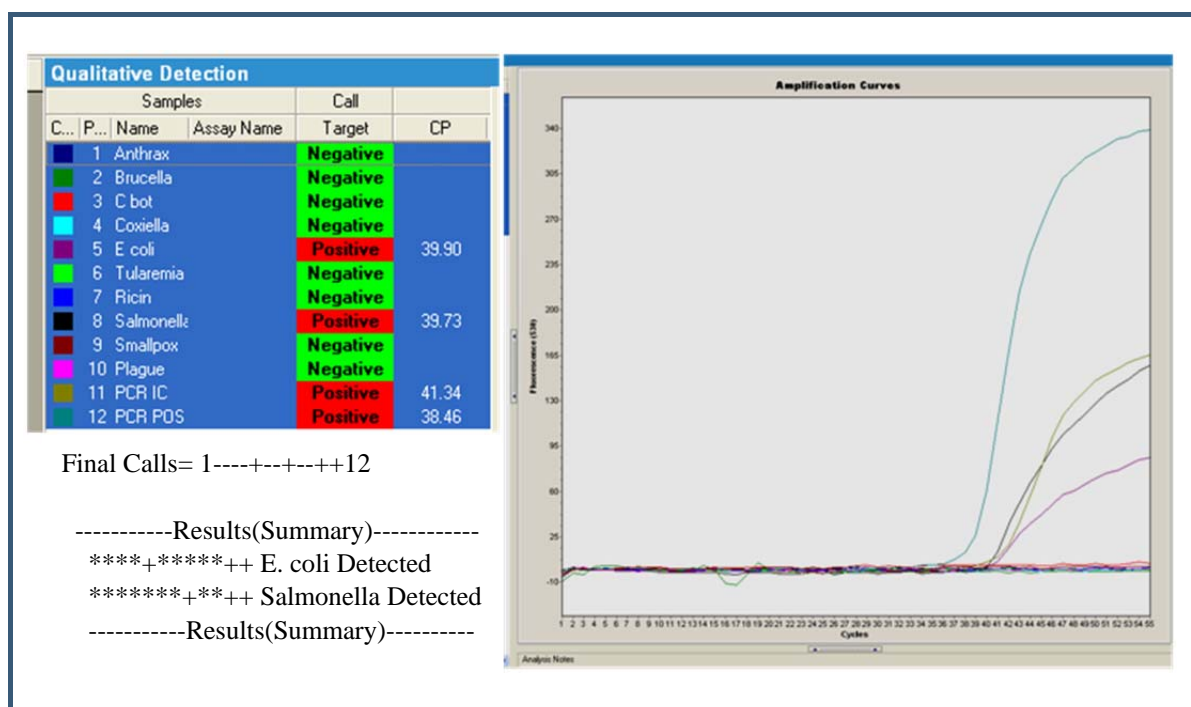


Figur 3.5 Blandet prøve B5 med bakterier av *E. coli* og *S. enterica* analysert på RAZOR™ EX. Akkumuleringskurver viser dannelse av PCR-produkt (fluorescens over antall sykluser) for *E. coli* (fiolett); *S. enterica* (svart); internkontroll (brun) og positiv kontroll (grønn).

Konklusjonen fra dette forsøket er at RAZOR™ EX påviser to forskjellige bakteriearter med konsentrasjon 5×10^4 CFU/mL i samme prøveblanding.

3.2.3.2 Påvisning av bakterieceller i en kompleks prøve uten prøvepreparering

I dette forsøket ble det undersøkt om både *E. coli* O157 og *S. enterica* kunne påvises direkte i en blandet prøve med et noe mer komplekst prøvemateriale. ”Blandet prøve 6” (B6) bestod av 0,5 mL lettmelk fra Tine tilsatt *E. coli* og *S. enterica* med en cellekonsentrasjon på 5×10^5 CFU/mL. 0,5 mL melk ble overført til 4,5 mL ”unknown sample”-buffer og ristet i 30 sekunder, sluttkonsentrasjonen ble da igjen 5×10^4 CFU/mL. Resultatene fra forsøket er vist i Figur 3.6 og er begge forsøk er oppsummert i Tabell 3.3.



Figur 3.6 Analyse av melk tilsatt blandet prøve B6 med *E. coli* og *S. enterica* celler (5×10^5 CFU/mL) analysert med RAZORTM EX. Akkumuleringskurver viser dannelse av PCR-produkt (fluorescens over antall sykluser) for både *E. coli* (fiolett) og *S. enterica* (svart). Internkontroll (brun) og positiv kontroll (grønn) viser også positive akumuleringskurver. Oppgitt "Call", CP-verdier og "Results summary" er vist i tabell 3.3.

Resultatene i Figur 3.6 og Tabell 3.3 viser at RAZORTM EX påviser bakterier i lettmeik uten mer forbehandling av prøven enn produsentens enkle prøvebehandling.

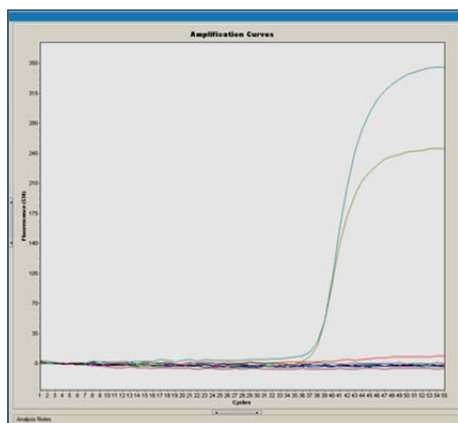
Tabell 3.3 Sammenligning av CP-verdier ved påvisning av bakterierceller i lettmeik fra Tine. CP-verdier for inhiberingskontroll (IC) og positiv kontroll (PC) er vist.

			IC	PC
Blandet prøve	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>		
B6: 5×10^4 CFU/mL	37,05	37,58	37,03	37,53
B6: 5×10^4 CFU/mL i lettmeik	39,90	39,73	41,34	38,46

3.2.3.3 Clostridium botulinum type A sporer

0,5 mL av 1×10^5 sporer/mL sterilt vann av *C. botulinum* type A ble tilsatt til bufferflasken merket "unknown sample" og ristet i 30 sekunder før overføring til reagenskassetten. Konsentrasjonen av sporer i prøven var på 1×10^4 sporer/mL.

Ved analysen av denne prøven med RAZOR™ EX ble positiv "Call" og CP-verdi 34,63 funnet. Pga den oppnådde (flate) akkumuleringskurven for dannelse av PCR-produktet (rød kurve i Figur 3.7) i forhold til inhiberingskontrollen IC og den positive kontrollen PC tyder resultatene på at *C. botulinum* A sporer ikke var mulig å påvise uten prøvepreparering. Ikke overraskende ble heller ikke *C. botulinum* A sporer påvist i hvetemel. Det antas at *C. botulinum* type A sporer har for lite DNA utenpå sporene til at de blir påvist med den enkle prøveprepareringen som produsenten anbefaler.

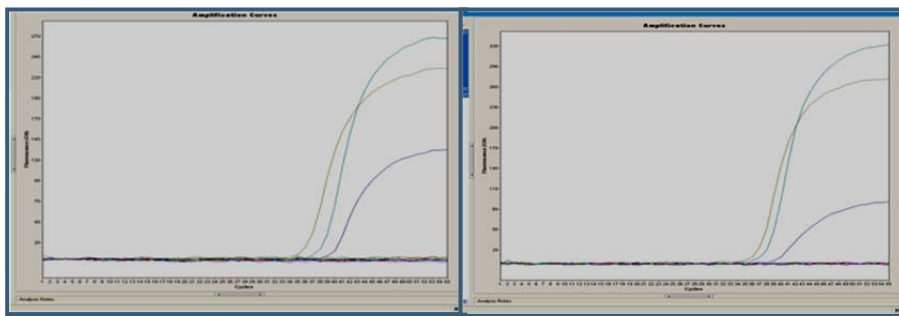


Figur 3.7 Akkumuleringskurver (fluorescens over antall sykluser) for *C. botulinum* type A sporer. Den røde kurven (*C. botulinum* type A) er så vidt synlig over de negative kontrollene. De to andre kurvene er inhiberingskontrollen (brun) og positiv kontroll (grønn) som viser at selve testen har fungert.

3.2.3.4 Påvisning av *Bacillus anthracis* sporer i jord

Formålet med dette forsøket var å undersøke om RAZOR™ EX og "The 10 Target Screen Kit" kunne identifisere *B. anthracis* sporer i jord. I denne studien inneholdt jordprøven en konsentrasjon av *B. anthracis* på ca 1×10^5 CFU/g jord.

Prøvemengden på ett gram jord ble tilsatt 10 mL sterilt vann. Blandingen ble ristet i ca 2 minutter og satt på benk i 3 minutter slik at mesteparten av de store partiklene sedimenterte. 0,5 mL av supernatanten ble overført til "unknown sample"-bufferflasken og ristet i 30 sekunder. Mengde tilsatt i prøvekassetten ble tilsvarende konsentrasjon på ca 1×10^3 celler/mL. Forsøket ble utført i to paralleler og resultatene er vist i Figur 3.8 og i Tabell 3.4.



a.

b.

Figur 3.8 Akkumuleringskurver (fluorescens over antall sykluser) for B. anthracis (fiolett) påvist i jordprøve. Forsøk a og b er analyser av jordprøven i to paralleller. Oppgitt konsentrasjon var ca 1×10^5 sporer per gram jord (tilsvarer 1×10^3 sporer/mL i reaksjonsblandingen). Inhiberingskontroll IC og positiv kontroll (PC) er vist i henholdsvis brun og grønn farge.

Tabell 3.4 CP-verdier for B. anthracis påvist i jordprøve (to paralleller). IC og PC er hhv intern og positiv kontroll.

	Prøve 10	IC	PC
CP-verdi	39,04-38,93	35,72-36,28	37,95-37,69

Konklusjonen fra dette forsøket er at RAZOR™ EX og "The 10 Target Screen Kit" kan påvise *B. anthracis* direkte i en jordprøve uten annen forbehandling av prøven.

3.3 Oppsummering av forsøkene på RAZOR™ og RAZOR™ EX instrumentene

En oppsummering av de to forgående kapitlene er vist i Figur 3.9 . Figuren viser en samlet oversikt over hvilke biologiske trusselstoffer som er blitt påvist med henholdsvis RAZOR™ og RAZOR™ EX instrumentene. Hensikten med å teste RAZOR™ instrumentet var å undersøke sensitiviteten for analysene utført på dette instrumentet sammenlignet med andre systemer. RAZOR™ EX ble testet for å undersøke brukervennlighet og for påvisning av trusselstoffer i «ekte» prøver i felt.

Instrument	RAZOR								RAZOR EX									
PCR	Egne PCR-oppsett								"The 10 Target Screen Kit"									
Trusselstoffer	<i>B. anthracis</i>	<i>B. maris bv1</i>	<i>F. tularensis</i>	<i>S. enterica</i>	<i>Y. pestis</i>	<i>B. mallei</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>B. atropheus (BG)</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>C. botulinum A</i>	<i>C. burnetii</i>	<i>E. coli O157</i>	<i>F. tularensis</i>	<i>R. communis</i>	<i>S. enterica</i>	<i>V. major</i>	<i>Y. pestis</i>
Isolert DNA																		
Renkultur								S			N		B		N/A	B		
Melk									D				D			D		
Hvetemel									D				D			D		
Jord									S									

Figur 3.9 Oppsummering av påviste biologiske trusselstoffer testet på de to instrumentene RAZOR™ og RAZOR™ EX. Tegnforklaring: D, DNA; B, Bakterier; S, Sporer; N, Negativ; N/A, Not Applicable.

Resultatene viser at FFI fikk positive resultater for påvisning av alle de biologiske trusselstoffene som ble testet bortsett fra en test av *C. botulinum* type A sporer (kapittel 3.2.3.3)

3.4 Brukervennlighet av RAZOR™ EX og "The 10 Target Screen Kit"

Brukervennligheten er vurdert ut fra testingen og evalueringen utført i denne studien, dvs FFIs erfaring ved bruk av instrumentet. FFI har presentert og demonstrert instrumentet for både militære og sivile representanter.

3.4.1 RAZOR™ EX instrumentet

RAZOR™ EX er et lite, lett og robust real-time PCR instrument (kapittel 1.3). Det er designet for å kunne brukes under feltforhold. Instrumentet kan f.eks brukes når det står på gulvet i en bil eller på bakken utendørs. I følge produsenten kan instrumentet brukes ved temperatur mellom 0-40°C. Instrumentet kan ikke brukes ute under vinterforhold og temperatur under 0°C. FFI har kun testet instrumentet ved romtemperatur. Instrumentet kan også brukes i et stasjonært og/eller et mobilt laboratorium.

Produsenten oppgir en batterikapasitet på 4 kjøring ved 25°C og lagringskapasitet på 75 kjøring før data må overføres til ekstern datamaskin (Tabell 1.1). Batterikapasiteten er verifisert under FFIs uttesting, i motsetning til lagringskapasiteten da FFI ikke har kjørt mer enn 25

kjøringer i testperioden. Instrumentpanelet har store knapper som gjør det enkelt å betjene instrumentet med hansker.

Instrumentet rapporterer svar som positiv eller negativ "Call". Dette er velegnet for brukere som ikke er kjent med PCR-teknologien og/ellertestmetoden. Det er allikevel mulig å se akkumuleringskurvene på skjermen for brukere som er mer trent i slik analysevirksomhet.

Det er enkelt å hente frem resultater fra tidligere kjøring for å kunne sammenligne oppnådde resultater.

Brukermanualen er lett og forstå og har gode illustrasjoner. Det finnes også en fin kortversjon av brukermanualen.

3.4.2 Praktisk bruk av RAZOR™ EX

Den praktiske gjennomføringen er meget enkel og kan lett utføres av utrent personell/brukere etter en kort innføring. Protokollen er lett å forstå og preparering av reagenskassetten går raskt og krever ingen presisjons pipettering eller bruk av annet laboratorieutstyr enn det som følger med i selve kit'et. FFI fant ingen forbedringspunkter i protokollen slik den er satt opp av produsent. Når man setter i gang instrumentet, gis instruksjoner om hva man skal gjøre underveis. Enkel prøvehåndtering er viktig i forhold til kontaminering av prøver og for brukerens sikkerhet.

Ved å skanne en strekkode på kit-esken blir et program med alle analyseparametere lagt inn i instrumentet. Hver gang en reagenskasset kjøres, skannes en strekkode på selve reagenskassetten som velger riktig program. Dette sikrer bruk av riktig program.

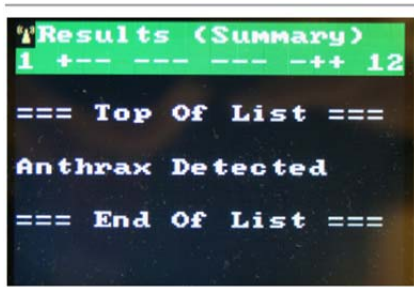
3.4.3 Tidsbruk

Under FFIs testing og evaluering av RAZOR™ EX ble tidsbruket for preparering av prøve og tilsetning av prøve til reagenskasset estimert til ca. 5 min. Kjøringen ble estimert til ca. 20 minutter. Fra prøvetaking til oppnådde resultater med instrumentet estimeres et tidsforbruk på ca. 25 min.

3.4.4 RAZOR™ EXs presentasjon av resultater

FFIs erfaring er at RAZOR™ EXs resultatpresentasjon er enkel å forstå.

På "Result summary" angis + (pos)/- (neg) "Call" øverst. Under vises det en liste som angir hvilke trusselstoffer som er påvist (Figur 3.10).



Figur 3.10 Eksempel på resultatpresentasjonen "Results summary" på skjermen på RAZOR™ EX.

Hvis alle prøvene er negative, vil det stå "No Biothreat Detected" på skjermen.

Hvis inhiberingskontrollen feiler, kommer dette opp på skjermen med beskjed om å fortynne prøven og reanalysere. Dette er positivt siden utrenede brukere slipper å vurdere dette selv.

Totalt er resultatpresentasjonen spesielt god for utrenet personell, da det kreves minimalt med egne vurderinger.

En liten ulempe er at instrumentets skjerm er litt liten, men det er fullt mulig å få en oversikt.

Resultatene kan overføres til ekstern datamaskin for ytterligere vurdering slik at det kan skrives ut rapporter fra analyseresultatene.

3.4.5 Holdbarhet og oppbevaring av "The 10 Target Screen kit" til RAZOR™ EX

Holdbarheten på "The 10 Target Screen Kit" kan være en utfordring. Produsenten lover en holdbarhet på 7 måneder. Det er ikke bare reagensene som gir denne relativt korte holdbarheten, men også vakuemet i reagenskassetten. Frysetørkede reagenser har lang holdbarhet, men vakuemet i reagenskassetten vil forsvinne etterhvert og dermed vil volumet av prøven som suges inn i reagenskassetten endres. Frysetørkede reagenser gjør at kit'et skal kunne oppbevares i romtemperatur noe som er meget brukervennlig og egnet for instrumentets bruk i felt.

3.5 Brukervennlighet av RAZOR™ med tomme reagenskassetter og egne reagenser.

3.5.1 RAZOR™ instrumentet

RAZOR™ er forgjengeren til RAZOR™ EX (kapittel 1.3). RAZOR™ instrumentet har ett annet filtersett enn RAZOR™ EX. Resultatpresentasjonen er noe forbedret i RAZOR™ EX, men ellers er instrumentene ganske like.

3.5.2 Praktisk bruk av RAZOR™

Bruk av tomme reagenskassetter og egne reagenser medfører av man kan tilpasse hvilke trusselstoffer det skal testes for etter behov. Bruk av egne reagenser forutsetter at brukeren har mer kunnskap om analysen.

Den praktiske gjennomføringen ved bruk av tomme reagenskassetter og egne reagenser er mer arbeidskrevende enn ved bruk av ”The 10 Target Screen kit” tilpasset RAZOR™ EX instrumentet. Følgende gjør den praktiske bruken av RAZOR™ mer arbeidskrevende enn RAZOR™ EX:

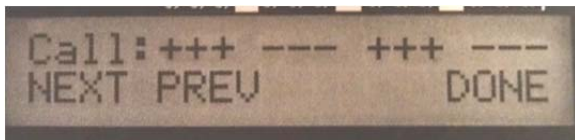
- Prøvepreparering av prøven, ”unknown sample”- bufferflaske følger ikke med
- Behov for flere presisjonspipetteringer
- Behov for konsentrasjonsberegninger ved tillaging av reagens/prøveblanding
- Behov for mange ulike reagenser for analysen
- Behov for gjentatte pipetteringer av potensielt farlig prøvemateriale som kan gi dårligere sikkerhet for bruker og større fare for kontaminering av prøven
- Behov for overføring av prøve til hver enkelt lomme med egne sprøyter og spisser
- Behov for oppbevaring av reagenser i fryser eller kjøleskap

3.5.3 Tidsbruk

FFIs erfaring er at selve kjøringen av RAZOR™ instrumentet tar omtrent samme tid som for RAZOR™ EX og ”The 10 Target Screen Kit”. Derimot er tidsforbruket minst det dobbelte når det gjelder forberedelser og preparering av de tomme kassettenes.

3.5.4 RAZOR™s presentasjon av resultater

RAZOR™ har en mindre avansert resultatpresentasjon enn RAZOR™ EX, spesielt når instrumentet kjøres uten tilkobling til PC. Etter at kjøringen er ferdig vil skjermbildet på RAZOR™ bare vise + (pos)/ - (neg) ”Call”resultater (*Figur 3.11*). Bruker må selv holde styr på hvilke reagens/prøveblandinger som er i de forskjellige lommene. Det kreves mer kunnskap for å tolke resultatet slik at det blir en økt sannsynlighet for feiltolkninger. Hvis instrumentet kjøres med PC tilkobling vil vurderingene kunne bli noe forenklet



Figur 3.11 Resultatpresentasjon fra RAZOR™.

3.5.5 Holdbarhet av RAZOR™s reagenskassetter og oppbevaring

De tomme reagenskassettenes oppbevares ved romtemperatur. Holdbarheten på de tomme reagenskassettenes er begrenset av at vakuemet vil forsvinne etterhvert og da vil volumet som suges inn ved tilsetting av prøve/reagensblandingen til kassetten bli feil. Holdbarheten på reagenskassettenes FFI benyttet i evalueringen av systemet var opptil 18 måneder.

Reagenser har generelt lang holdbarhet ved -20°C. En ferdig tillaget reagensblanding vil ha begrenset holdbarhet ved 4°C. FFI testet reagensblandingen kun etter en dags oppbevaring ved 4 °C. Kassetten kan ikke oppbevares ved romtemperatur.

3.6 Pris på RAZOR™ og RAZOR™ EX instrument og produkter

Tabell 3.5 viser en oppsummering av pris på RAZOR™ og RAZOR™ EX instrumentene med tilhørende produkter pr 2012.

Tabell 3.5 Priser på RAZOR™ produktene i 2012.

Produkt	Pris US\$ (2012)	Pris NOK (2012)
Instrument	43 000	245 000 ekskl moms ¹
”The 10 Target Screen Kit”	160	Ca. 915 ekskl moms ²
Tomme reagenskassetter	25	Ca. 145 ekskl moms ²

¹Listepris oppgitt.

²Pris ved innkjøp av kit og tomme reagenskassetter til uttesting ved FFI.

For ”The 10 Target Screen Kit” tilkommer ingen ekstra kostnader. For tomme reagenskassetter tilkommer pris på PCR reagenser, spesifikke primere, probe, sprøyter og spisser for overføring av prøve til reagenskassetten. Siden reaksjonsvolumene i reagenskassetten er på 200 µl (100 µl reagens/prøve og 100 µl dødvolument ved tilsetning av prøve), blir pris for reagenser ca. 10x dyrere enn for PCR analyser utført på mer vanlige stasjonære plattformer på laboratorier. Spissene som er nødvendig for overføring av tomme reagenskassetter er spesialspisser fra BD, Franklin Lakes, NJ USA. De selges ikke i Europa (gjeldende for 2012) og bestilles fra Biofire Diagnostics, Inc.

Estimerte kostnader for forbruksvarer som kommer i tillegg pr reagenskassetten ved bruk av tomme reagenskassetter for RAZOR™ EX (2012):

PCR reagenser	ca 480 NOK ekskl moms
Probe	ca 240 NOK ekskl moms
Forbruksmateriell (sprøyter, spisser etc)	ca 75 NOK ekskl moms
Totalt	ca 940 NOK ekskl moms

Ved sammenligning av kostnadene for innkjøp og bruk av ”The 10 Target Screen Kit” og tomme reagenskassetter (Tabell 3.5) for bruk til egne reagenser så blir det dyrere å benytte de tomme reagenskassetten.

RAZOR™ instrumentene, ”The 10 Target Screen Kit” og de tomme reagenskassetten er kontrollert for eksport under International Traffic in Arms Regulation (ITAR) administrert av U.S. Department of State, Directorate of Defense Trade Control (DDTC). Det er derfor behov for lisens fra DDTC for innkjøp av instrument eller kit. En lisens varer i 2 år og man kan søke om

lisens for et estimert forbruk for 2 år. Leverandøren krever ikke at man kjøper alle kit det er fått lisens for i løpet av en lisensperiode.

4 Diskusjon

4.1 Sensitivitet for RAZOR™ instrumentet

Sensitivitet til RAZOR™ instrumentet ble evaluert ved å utføre forsøk med FFIs egne primersett, prober og PCR reagenser i de tomme reagenskassetene for RAZOR™ og resultatene ble sammenlignet med egne og publiserte resultater oppnådd på Applied Biosystems 7300/7500 med samme oppsett (3). Forsøkene ble utført med DNA fra åtte ulike biologiske trusselstoffer med kjent konsentrasjon (Tabell 3.1).

For de fleste biologiske trusselstoffene ble resultatene mellom 100 og 1000 genomkopier eller CFU per mL oppnådd. Produsenten henviser til egne data og til data presentert på vitenskapelig poster (8). Her er tallene oppgitt til 100-1000 CFU/mL for de fleste bakterieartene, mens for *B. melitensis* og *S. enterica* er det oppgitt en sensitivitet på kun 30000 CFU/mL. (8). Når FFIs resultater sammenlignes med tallene oppgitt av produsenten er det mye sammenfall, men i FFI's datasett er det *S. flexneri* som har den svakeste sensitiviteten (100.000 genomkopier per mL). Årsaken kan være kvaliteten på DNA prøvematerialet. FFIs erfaring er at det er vanskelig å oppnå så gode resultater som 100-1000 kopier/celler for alle de testede biologiske trusselstoffene.

FFI vurderer allikevel sensitiviteten til RAZOR™ for påvisning av de utvalgte biologiske trusselstoffene som god.

4.2 Sensitivitet for RAZOR™ EX instrumentet og "The 10 Target screen kit"

I forsøkene med RAZOR™ EX og "The 10 Target Screen Kit" ble det valgt å benytte konsentrasjoner ca 10x høyere enn sensitiviteten oppnådd med RAZOR™ instrumentet og egne reagenser. Bakgrunnen for dette var et begrenset antall tilgjengelige kit, samt at det var ønskelig å være i et konsentrasjonsområde av de biologiske trusselstoffene som kunne påvises. For utvalgte prøvetyper ble det i tillegg testet fortyninger av den opprinnelige prøven. Tabell 3.6 viser laveste konsentrasjon påvist sammenlignet med publiserte resultater (8).

Tabell 4.1 Laveste konsentrasjon påvist med RAZOR™ EX og "The 10 Target Screen Kit" sammenlignet med produsentens referanse (8). Resultater er angitt som CFU per mL ved direkte påvisning av vegetative celler(v) eller sporer(s) uten forbehandling av prøven.

Biologiske trusselstoffer	DNA genomkopier/mL (FFI ¹)	CFU/mL	Vegetative /sporer CFU/mL (referanse 8)
<i>B. anthracis</i>	10 ²	1x10 ³ (2)	1x10 ³ (s)
<i>Brucella spp.</i>			3x10 ⁴ (v)
<i>E. coli</i>	10 ³	5x10 ⁴ (v)	3x10 ³ (v)
<i>F. tularensis</i>			1x10 ² (v)
<i>Ricin</i>	10 ²		1 µg/mL
<i>S. enterica</i>	10 ³	5x10 ⁴ (v)	3x10 ⁴ (v)
<i>Y. pestis</i>	10 ²		1x10 ² (v)
<i>C. botulinum</i> A	10 ⁴	10 ⁴ (s) ikke påvist	3x10 ³ (v)
<i>Coxiella</i>			Ingen data tilgjengelig
Kopper			238 genomkopier

¹Laveste konsentrasjon oppnådd med positiv "Call" i RAZOR EX.

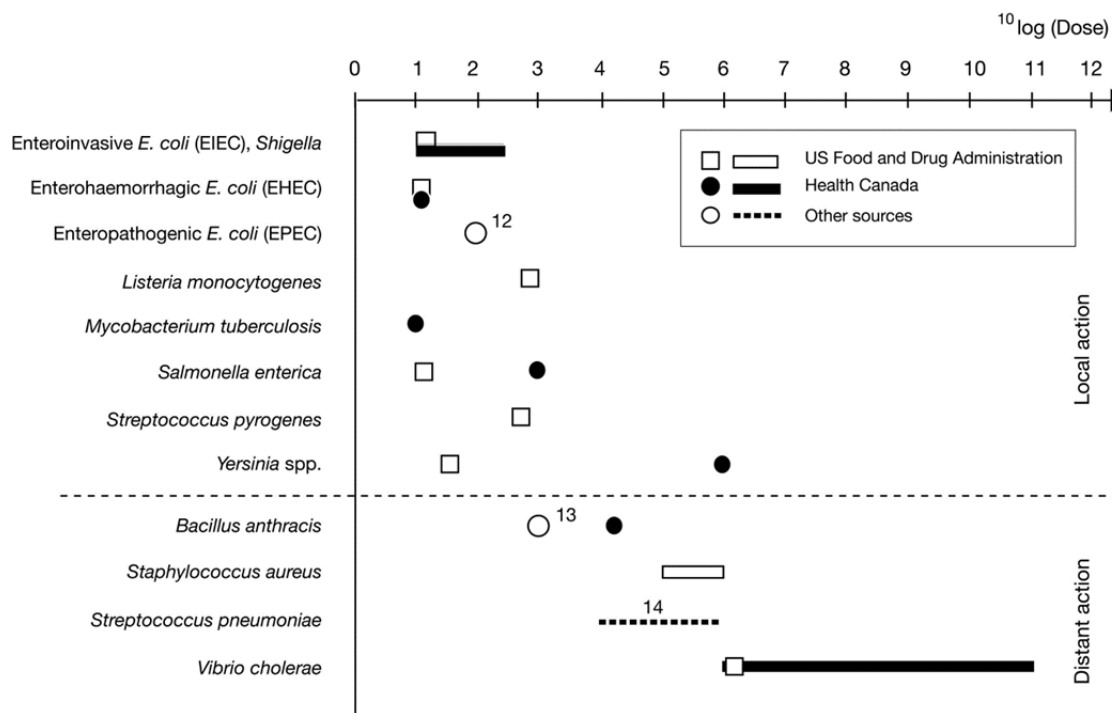
² 1x10³ sporer/mL *B. anthracis* påvist i jordprøve.

Resultater for sensitivitet på vegetative celler avhenger av hvilken type celleduspensjon som ble brukt. En kultur dyrket opp overnatt vil inneholde både døde og levende celler, samt fritt DNA og vil derfor gi en urealistisk god sensitivitet sammenlignet med en eksponensielt voksende bakteriekultur.

C. botulinum type A sporer ble ikke påvist under uttesting ved FFI. Til sammenligning er det publisert at vegetative celler av denne bakterien kan påvises ved en konsentrasjon av 3x10³ celler per mL (8), men det er ikke tilgjengelig data for påvisning av sporer fra denne bakteriararten. Årsaken til at sporene ikke ble påvist er trolig at de ikke ble lysert, hverken ved den enkle prøveprepareringen, eller gjennom selve PCR-analysen hvor prøven gjentatte ganger denatureres som en del av analysen.

Sporer fra *B. atrophaeus* (BG) er vist å ha DNA på overflaten og er derfor enklere å påvise i PCR uten å isolere DNA fra prøven før analysen utføres. For å påvise sporer av *C. botulinum* type A er det trolig nødvendig med en prøveopparbeidelse som innebærer mekanisk lysis av sporene ("bead-beating").

Det er av interesse å vurdere sensitiviteten oppnådd med den infektive dosen av det biologiske trusselstoffet. *Figur 4.* viser en oversikt over infektiv dose for noen patogene mikroorganismer. Det kan være utfordrende å påvise meget lave infektive doser uten å benytte et anrikningstrinn før PCR-analysen. For sporer av *B. anthracis* derimot, med en infektiv dose i størrelsesorden 10^4 sporer, vil man med RAZOR™ EX ligge innenfor LOD (limit of detection).



Figur 4.1 Infektiv dose for utvalgte patogene mikroorganismer. Øvre panel: Patogene bakterier hvor smitten er avhengig av direkte kontakt ("Local action"). Nedre panel: Patogene bakterier hvor smitte avhenger av utskilte molekyler ("Distant action"). Figuren er hentet fra Schmid-Hempel og Frank, 2007 (9).

4.3 Inhibering i komplekse prøver testet på RAZOR™ EX og "The 10 Target Screen Kit"

For å teste ut om utvalgte biologiske trusselstoffer kunne påvises i prøvemateriale som kunne inneholde inhiberende faktorer for PCR analysen ble melk, hvetemel og jord valgt som prøvemateriale. Det er kjent at melk, hvetemel og jord kan inneholde mange faktorer som kan inhibere en PCRreaksjon og derved gi falske negative PCR-resultater.

Resultatene fra analysene ga positive resultater når man fulgte anbefalingene til produsenten i forhold til mengden av kompleks prøve som ble tilsatt i analysen (Tabell 4.2).

Tabell 4.2 Laveste konsentrasjon av utvalgte biologiske trusselstoffer påvist i tre forskjellige prøvetyper (melk, hvetemel, jord) kjent for å inneholde mange inhiberende faktorer.

Prøve- materiale	DNA	Vegetative celler/ sporer	
		Påvist	Ikke påvist
Melk	<i>B. anthracis</i> , <i>E. coli</i> og <i>S. enterica</i> 1x10 ³ mL genomkopier/mL	<i>E. coli</i> og <i>S. enterica</i> 5x10 ⁴ CFU/mL	
Hvetemel	<i>B. anthracis</i> , <i>E. coli</i> og <i>S. enterica</i> 1x10 ³ mL genomkopier/mL		<i>C. botulinum</i> type A 1x10 ⁴ CFU/mL
Jord		<i>B. anthracis</i> ca 1x10 ³ sporer/mL ca 1x10 ⁵ sporer/g jord	

4.4 Sammenligning av RAZOR EXs "The 10 Target Screen Kit" og RAZOR™s tomme reagenskassetter

"The 10 Target Screen Kit" består av en reagenskasset til analyse av ti ulike biologiske trusselstoffer og er beregnet for å teste en prøve på alle de ti trusselstoffene samtidig. Kit'et inneholder nødvendige reagenser og forbruksmaterieell for å utføre analysen. Det finnes også andre kit med færre "targets" slik at det kan kjøres flere prøver samtidig (Tabell 1.2). Disse kit'ene er ikke vurdert i denne studien.

Praktisk bruk av "The 10 Target Screen Kit" og tomme reagenskassetter med egne reagenser er sammenlignet nedenfor. Vurderingen er basert på FFIs erfaring sett i lys av et brukerperspektiv for å utføre analyse i felt.

- "The 10 Target Screen Kit" krever ingen presisjonspipettering. Egne reagenser krever mye presisjonspipettering og noe ekstra utstyr, både pipetter og mange flere specialsprøyter til tilsetning av reagens/prøveblanding.
- Prøvepreparering er mye enklere for "The 10 Target Screen Kit". Ved bruk av tomme reagenskassetter vil trolig analysetiden dobles eller mer.
- Sikkerhet for bruker ansees som dårligere ved bruk av tomme reagenskassetter. Risikoen for forbyttning eller forurensning ansees som betydelig større.
- Egne reagenser vil i motsetning til "The 10 Target Screen Kit" sette større krav til fasilitetene hvor analysen skal utføres. Hvis man først er avhengig av egne reagenser og laboratoriefasiliteter til prøvepreparering vil man spare ressurser på å benytte et PCR instrument med f.eks 96 brønners plater som forenkler prøveprepareringen.

- ”The 10 Target Screen Kit” oppbevares i romtemperatur, mens reagenser til tomme reagenskassetter må oppbevares ved -20 °C over tid. De tomme reagenskassettene har meget kort holdbarhetstid ved 4°C.
- De store reaksjonsvolumene (200 µl) i ”The 10 Target Screen Kit” og med tomme reagenskassetter gir høy fortynningsgrad av prøvematerialet og dermed redusert risiko for inhibering av PCR reaksjonen.
- ”The 10 Target Screen Kit” vurderes å gi mindre og sikrere avfall.
- Resultatvurdering er vesentlig enklere med bruk RAZOR™ EX og ”The 10 Target Screen Kit” for en utrenet bruker sammenlignet med RAZOR™.

”The 10 Target Screen Kit” har flere fordeler når det gjelder praktisk bruk.

Dette analysesystemet mister mesteparten av feltfordelene hvis man skal bruke tomme reagenskassetter og egne reagenser. I tillegg viser kostnadsoversikten i Tabell 3.5 at det ikke er lavere kostnader ved bruk av tomme reagenskassetter. Den eneste situasjonen som kunne forsvare bruk av tomme reagenskassetter er hvis det er ønskelig å teste et stort antall prøver for bare ett biologisk trusselstoff.

Den enkle prøveprepareringen er det som gir størst utslag når det gjelder brukervennlighet for utrenet personell.

4.5 Alternative PCR instrumenter for bruk i felt

Det finnes også to andre leverandører som tilbyr robuste PCR instrumenter for bruk i felt; Smiths Diagnostics, Watford, UK, med instrumentet Bio-Seeq PLUS, og Tetracore Inc., Rockville, MD, USA, med T-COR 4™. Begge instrumentene er egnet for analyse av et biologisk trusselstoff med en intern kontroll per test.

Rapporten ”DTRA 2011 - Chemical Biological Radiological Technology Survey” (11) gir en samlet vurdering av RAZOR™ EX og de to alternative instrumentene (kapittel 6.2). Hovedkonklusjonen er at RAZOR™ EX og T-COR 4 ansees som de mest modne instrumentene i bruk mens Bio-Seeq PLUS får en karakter dårligere. Noen viktige parametere for de tre instrumentene er samlet i Tabell 3.3.

Tabell 4.3 Sammenligning av utvalgte mobile PCRinstrumenter for bruk i felt. Parameterne er hentet fra Emanuel og Caples, 2011(11).

Parameter	RAZOR EX	Bio-Seeq PLUS	T-COR 4
Antall prøver per kjøring	En prøve testes for 10 trusselstoffer	6 prøver testes for et trusselstoff hver	4 prøver testes for et trusselstoff hver ¹
Batteritid	2-4 timer	2-4 timer	4-8 timer
Pris instrument ²	245 000	225 000	140 000
Pris per test	915	190	80

¹ Et nytt instrument *T-COR 8*, som lanseres i løpet av 2013, analyserer 8 prøver samtidig.

²Pris i NOK ekskl moms (2012)

4.6 Fremtidige teknologier for rask PCR analyse i felt

Amplifisering av DNA ved bruk av PCR metoden er blitt en dominerende metode for identifikasjon av biologiske trusselstoffer fordi PCR teknikken er både spesifikk og rask. Isoterm amplifisering er et alternativ til PCR metoden som trolig vil være velegnet i felt da amplifiseringsreaksjonen skjer ved en og samme temperatur (i motsetning til tradisjonell PCR).

Imidlertid har isoterme metoder tidligere ikke oppnådd samme spesifisitet som PCR. I dag eksisterer metoder for isoterm amplifisering med en reaksjonstid på 10-20 minutter og som stiller mindre krav til renhet på prøven enn PCR (10). Denne teknologien kan komplementere, evt erstatte, PCR i felt på sikt. Dette da denne teknologien krever et enkelt instrument som kun holder en temperatur og fordi reaksjonen er mindre påvirket av urene prøve enn PCR. Det finnes slikt utstyr for bruk på laboratoriet, eksemplifisert med EnviroLogix Inc., Portland, ME, USA, men som er ennå ikke utviklet for bruk i felt.

4.7 Konklusjon

RAZOR™ og RAZOR™ EX instrumentene er robuste og velfungerende PCR instrumenter for PCR kjøring i felt. De spesielle plastlommene i reagenskassetene gjør at man kan kjøre korte temperaturprogrammer selv om reaksjonsvolumene er store. Dette gir raske resultater med god sensitivitet og liten grad av PCR inhibering.

RAZOR™ EX er veldig enkel i bruk og systemet kan kjøres av brukere med liten laboratorieerfaring. Prisen per test estimeres til kr 915 ekskl moms (2012) for ”The 10 Target Screen Kit”. Dette inkluderer en test for ti biologiske trusselstoffer samtidig. For analyser i felt, hvor man ønsker å teste mange trusselstoffer samtidig, så ser det ut til at det per i dag finnes ingen alternativer til RAZOR™ EX og ”The 10 Target Screen Kit”.

Bruk av tomme reagenskassetter sammen med RAZOR™ instrumentet gir ingen reduksjon i kostnadene med mindre det er ønskelig å teste bare for et trusselstoff av gangen. Imidlertid mister man feltfordelene ved å velge et RAZOR™ system med tomme reagenskassetter.

Hvis man ønsker å teste for et trusselstoff av gangen er instrumentene fra Tetracore interessante alternativer; T-COR 4TM og T-COR 8TM. FFI har ikke på nåværende tidspunkt testet disse instrumentene.

Referanser

1. SIBCRA AEP-66: NATO handbook for sampling and identification of biological, chemical and radiological Agents; STANAG 4701.
2. Aarskaug, T., Fykse, E.M., Olsen J.S., Blatny, J.M. Evaluering av Dräger Bio-Agent test for foreløpig identifisering av biologiske trusselstoffer. FFI rapport (2011) 00349.
3. Skottman T, Piiparinen H, Hyytiäinen H, Myllys V, Skurnik M, Nikkari S.. Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2007) 26(3), 207-211.
4. Matero P, Hemmilä H, Tomaso H, Piiparinen H, Rantakokko-Jalava K, Nuotio L, Nikkari S.. Rapid field detection assays for *Bacillus anthracis*, *Brucella spp.*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. Clin Microbiol Infect (2011) 17, 34-43.
5. Ulrich MP, Norwood DA, Christensen DR, Ulrich RL. Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. J Med Microbiol (2006) 55, 551-559.
6. Wiemer D, Loderstaedt U, von Wulffen H, Priesnitz S, Fischer M, Tannich E, Hagen RM. Real-time multiplex PCR for simultaneous detection og *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia* species in fecal samples. Int J Med Microbiol (2011) 301, 577-584.
7. Jing Chen, Zhang LD, Paoli GC, Shi CL, Tu SI, Shi XM. A real-time PCR method for detection of *Salmonella enterica* from food using target sequence identified by comparative genomic analysis. Int J Food Microbiol (2010) 137, 168-174.
8. Bird A, Kadavy D, Vinas A, Allen L, Westfall N, Carrion R, Hoosien K, Rendon M, Christensen C, Gardner J, Trauscht R, Vaughn M, Crisp R, Stordal D, Nunneley J. Field Based Real-Time PCR Detection of Biothreat Pathogens Without Sample Extraction or Purification. Poster ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting. Feb. 2011.
9. Schmid-Hempel P, Frank SA (2007) Pathogenesis, Virulence, and Infective Dose. PLoS Pathog 3(10): e147.
10. Kim J, Easley CJ. Isothermal DNA amplification in bioanalysis: strategies and applications. Bioanalysis (2011) 3, 227-239.
11. DTRA 2011 - Chemical Biological Radiological Technology Survey” utarbeidet av Peter Emanuel, Ph.D. (U.S. Army ECBC) og Matthew Caples, Ph.D. (Booz Allen Hamilton

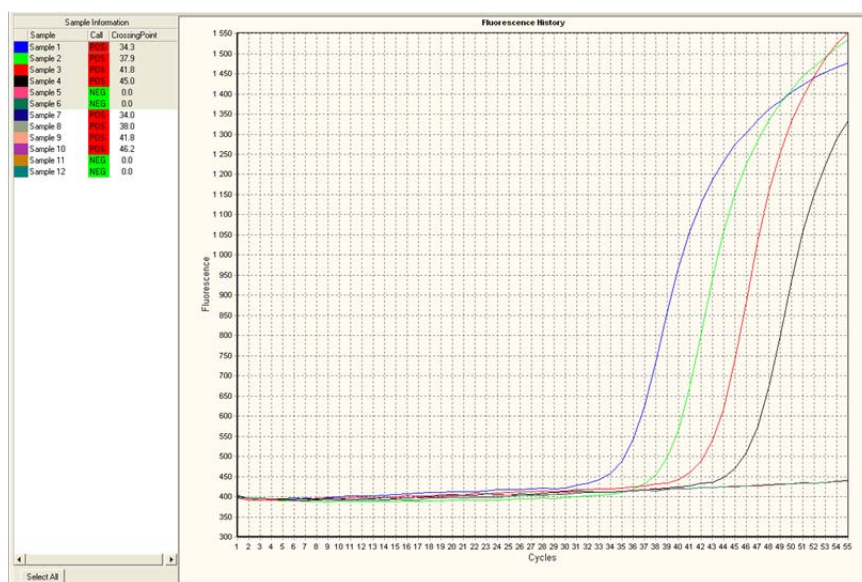
Appendix A

A.1 Detaljerte resultater sensitivitetsforsøk

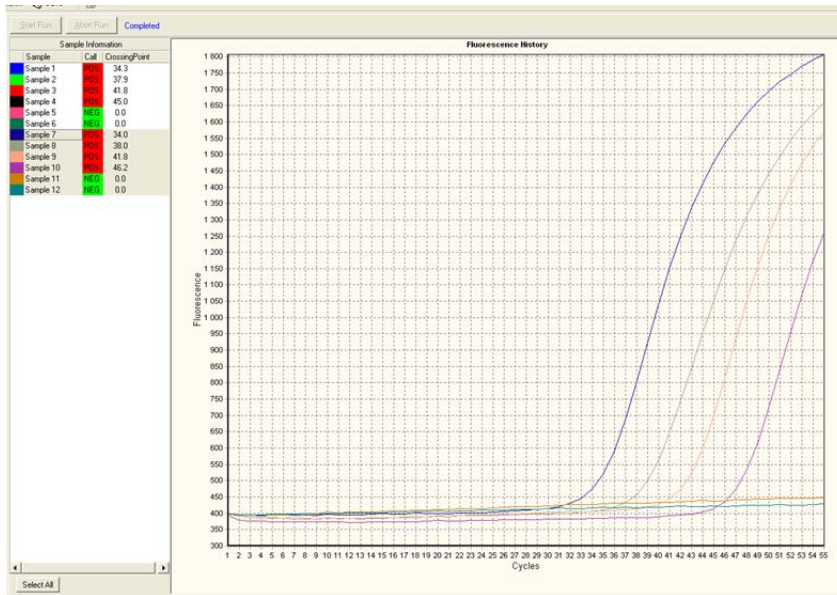
Detaljerte resultater fra sensitivitetsforøkene viser utførte forsøk og resultater i form av akkumuleringskurver og instrumentets “Call” og CP-verdier. Resultater ble behandlet som beskrevet i kapittel 2.6. Alle resultater for sensitivitetsforsøkene er oppsummert i kapittel 3.1.

A.1.1 *B. anthracis* sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™

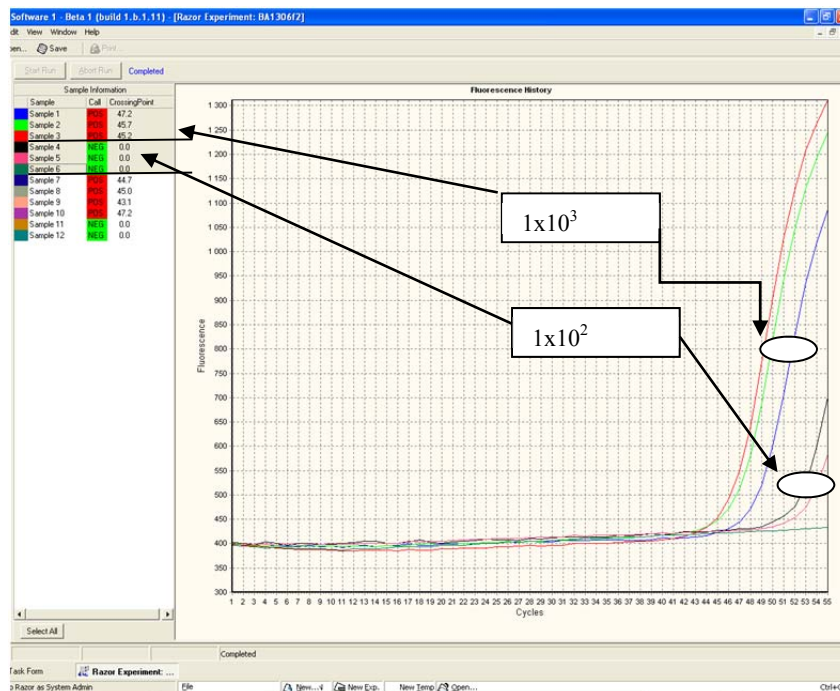
Prøvemateriale: DNA isolert fra fersk oppdyrket renkultur med konsentrasjon 0,15 ng/μl målt med Picogreen-metoden. I sensitivitetsforsøk, del 1, er fortynningsrekke av prøven fra 1×10^6 genomkopier/mL til 1×10^2 genomkopier/mL benyttet, med en parallell av hver. I del 2 er 1×10^3 genomkopier/mL og 1×10^2 genomkopier/mL benyttet, og analysert med tre paralleller av hver.



Figur A.1 Del 1, akkumuleringskurver for primer BApag. Brønn 1, 1×10^6 genomkopier/mL (blå); brønn 2, 1×10^5 genomkopier/mL (grønn); brønn 3, 1×10^4 genomkopier/mL (rød); brønn 4, 1×10^3 genomkopier/mL (svart).

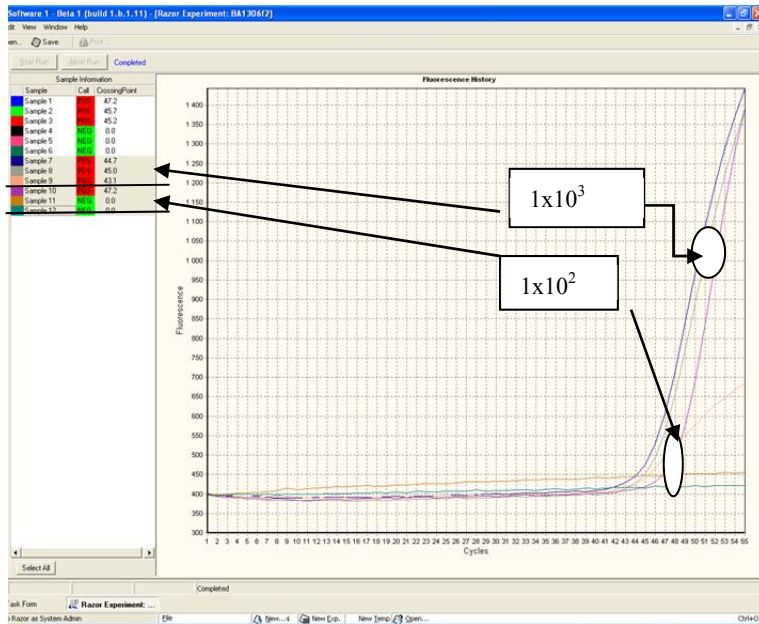


Figur A.2 Del 1, akkumuleringskurver for primer BAcap. Brønn 7, 1×10^6 genomkopier/mL (blå); Brønn 8, 1×10^5 genomkopier/mL (grå); Brønn 9, 1×10^4 genomkopier/mL (rosa); Brønn 10, 1×10^3 genomkopier/mL (lilla).



Figur A.3 Del 2, akkumuleringskurver for primer BApag. Brønn 1-3, 1×10^3 genomkopier/mL (rød, grønn og blå); Brønn 4-6, 1×10^2 genomkopier/mL (grå, rosa og grønn).

Resultatene viste tre av tre positive tester med 1×10^3 genomkopier/ml (CP: 47,2- 45,7- 45,2) og tre av tre negative med 1×10^2 genomkopier/ml. Med primerne BApag ble laveste konsentrasjon detektert 1×10^3 genomkopier/ml.

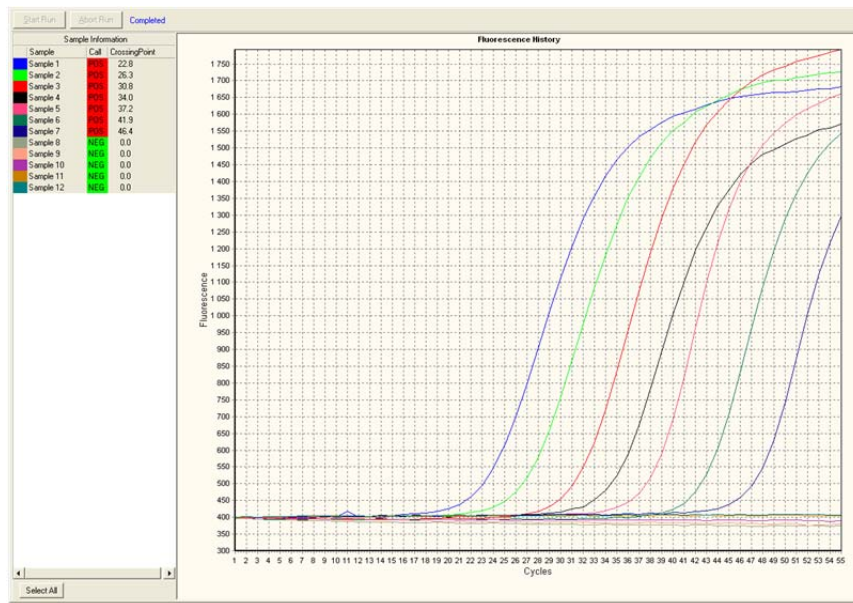


Figur A.4 Del 2, akkumuleringskurver for primer BAcap. Brønn 7-9, 1×10^3 genomkopier/ml (blå, grå og rosa); Brønn 10-12, 1×10^2 genomkopier/mL (lilla, brun og grønn).

Resultatene viste at med primerne BAcap var tre av tre paralleller positive med 1×10^3 genomkopier/ml (CP: 44,7- 45,0- 43,1), mens bare en av tre paralleller var positive med 1×10^2 genomkopier/ml (CP: 47,2). Med primerne BAcap ble laveste konsentrasjon påvist til 1×10^3 genomkopier/ml.

A.1.2 *Brucella spp.* sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™

Prøvemateriale: DNA isolert fra fersk oppdyrket renkultur konsentrasjon 2,99 ng/μl målt med Picogreen-metoden. I sensitivitetsforsøk, del 1 er fortynningsrekke av prøven fra 1×10^7 genomkopier/mL til 1×10^1 genomkopier/mL er benyttet, med en parallell av hver Del 2 forsøket ble ikke utført fordi det ble positivt resultat på alle konsentrasjonene.

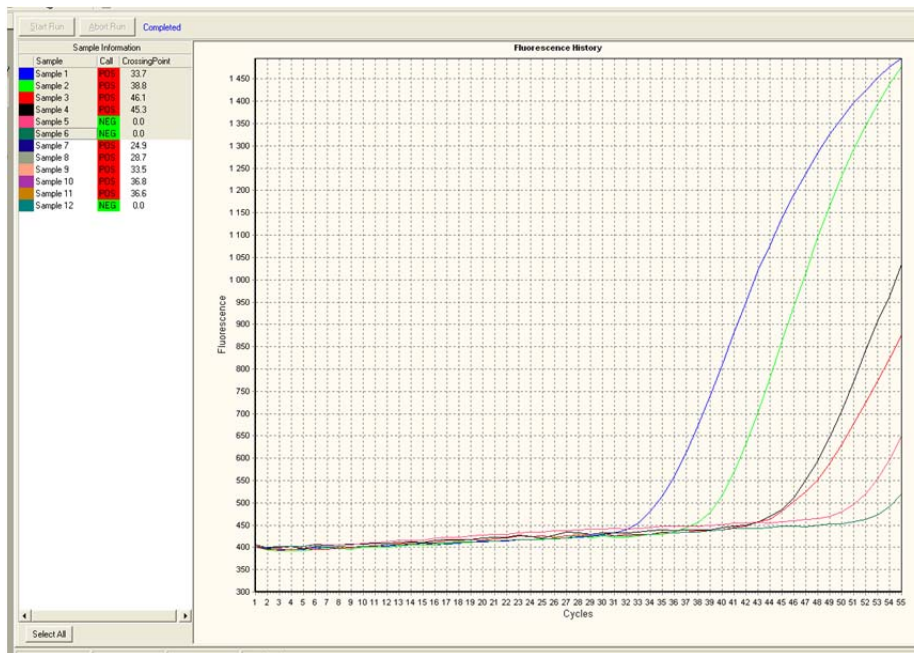


Figur A.5 Del 1, akkumuleringskurver. Brønn 1, 1×10^7 genomkopier/mL (blå); brønn 2, 1×10^6 genomkopier/mL (grønn); brønn 3, 1×10^5 genomkopier/mL (rød); brønn 4, 1×10^4 genomkopier/mL (svart); brønn 5, 1×10^3 genomkopier/mL (rosa); brønn 6, 1×10^2 genomkopier/mL (mørk grønn); brønn 7, 1×10^1 genomkopier/mL (blå).

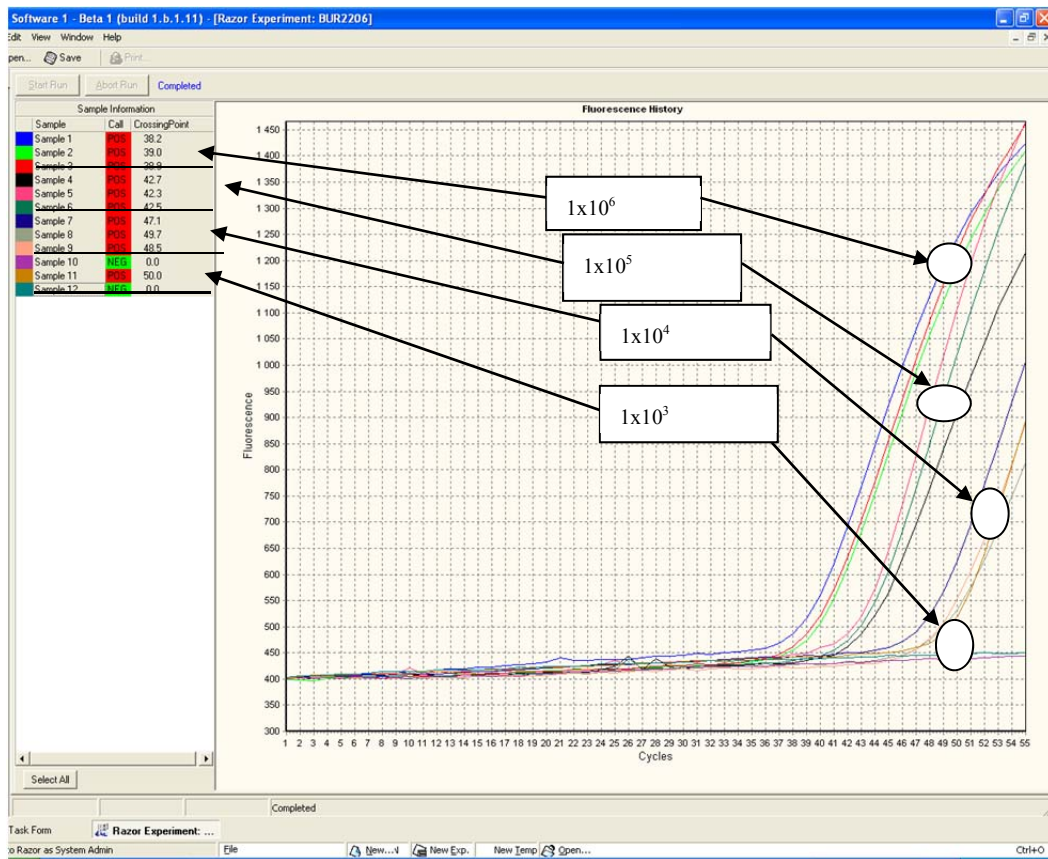
Antall kopier av markøren IS711 varierer fra 7 til >30 . *Brucella maris* har stort antall kopier av IS711. Dette kan være årsaken til at fortyningene blir positive helt ned til 10 kopier/ml. Ulike kopiantall gjør at sensitiviteten varierer innen de forskjellige *Brucella artene*. Referansen angir ikke hvilken *Brucella* art som er brukt i sensitivitetsforsøkene.

A.1.3 *B. mallei* sensitivitet med tommereagenskassetter på RAZOR™

Prøvemateriale: DNA isolert 21.09.2006 med konsentrasjon 1,01 ng/μl målt med Picogreen-metoden. Del 1, fortynningsrekke av prøven med konsentrasjoner fra $2,7 \times 10^7$ genomkopier/ml til $2,7 \times 10^{-2}$ genomkopier/ml en parallell av hver. Del 2, fire konsentrasjoner 1×10^6 genomkopier, 1×10^5 genomkopier, 1×10^4 genomkopier og 1×10^3 genomkopier/ml, tre paralleller av hver.



Figur A.6 Del 1, akkumuleringskurver. Brønn 1, $2,7 \times 10^7$ genomkopier/ml (blå); Brønn 2, $2,7 \times 10^6$ genomkopier/ml (grønn); Brønn 3, $2,7 \times 10^5$ genomkopier/ml (rød); Brønn 4, $2,7 \times 10^4$ genomkopier/ml (svart); Brønn 5, $2,7 \times 10^3$ genomkopier/ml (rosa); Brønn 6, $2,7 \times 10^2$ genomkopier/ml (mørk grønn).

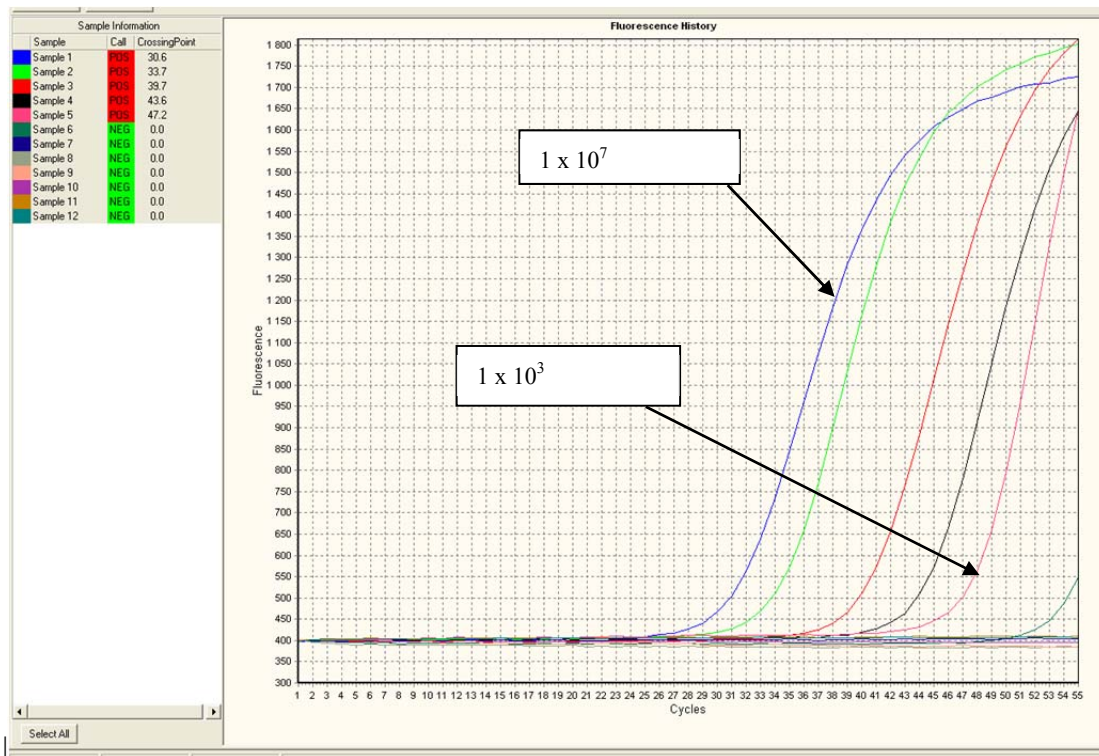


Figur A.7 Del 2, akkumuleringskurver. Brønn 1-3, 1×10^6 genomkopier/mL (blå, grønn og rød); brønn 4-6, 1×10^5 genomkopier/mL (svart, rosa, mørk grønn); brønn 7-9, 1×10^4 genomkopier/mL (blå, grå og rosa); brønn 10-12, 1×10^3 genomkopier/mL (lilla, brun og grønn).

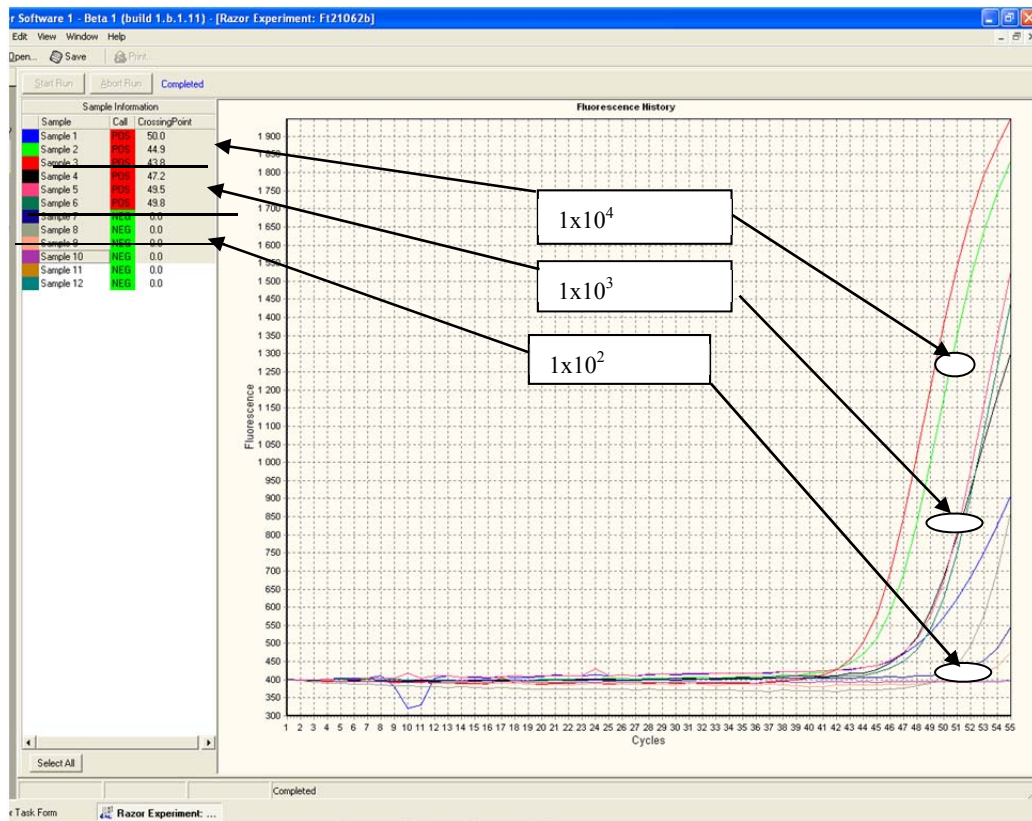
Tre av tre paralleller var positive for konsentrasjonene 1×10^6 genomkopier/mL (CP: 38,2 - 39,0 – 38,9), 1×10^5 genomkopier/ml (CP: 42,7 – 42,3 – 42,5) og 1×10^4 genomkopier/mL (CP: 47,1 – 49,7 – 48,5). Bare en av tre paralleller var positive for 1×10^3 genomkopier/mL (CP: 0 - 0 – 50,0). Den laveste konsentrasjonen hvor alle paralleller var positive ble dermed 1×10^4 genomkopier/mL.

A.1.4 *F. tularensis* sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™

Prøvemateriale var DNA isolert fra oppdyrket renkultur i konsentrasjon 11,13ng/ μ l målt med Picogreen-metoden. Del 1, fortynningsrekke med konsentrasjoner fra 1×10^7 genomkopier/ml til 1×10^2 genomkopier/ml, en parallell av hver. Del 2, tre konsentrasjoner 1×10^4 genomkopier, 1×10^3 genomkopier og 1×10^2 genomkopier, tre paralleller av hver.



Figur A.8 Del 1 akkumuleringskurver. Brønn 1, 1×10^7 genomkopier/mL (blå); brønn 2, 1×10^6 genomkopier/mL (grønn); brønn 3, 1×10^5 genomkopier/mL (rød); brønn 4, 1×10^4 genomkopier/mL (svart); brønn 5, 1×10^3 genomkopier/mL (rosa); brønn 6, 1×10^2 genomkopier/mL (mørk grønn).

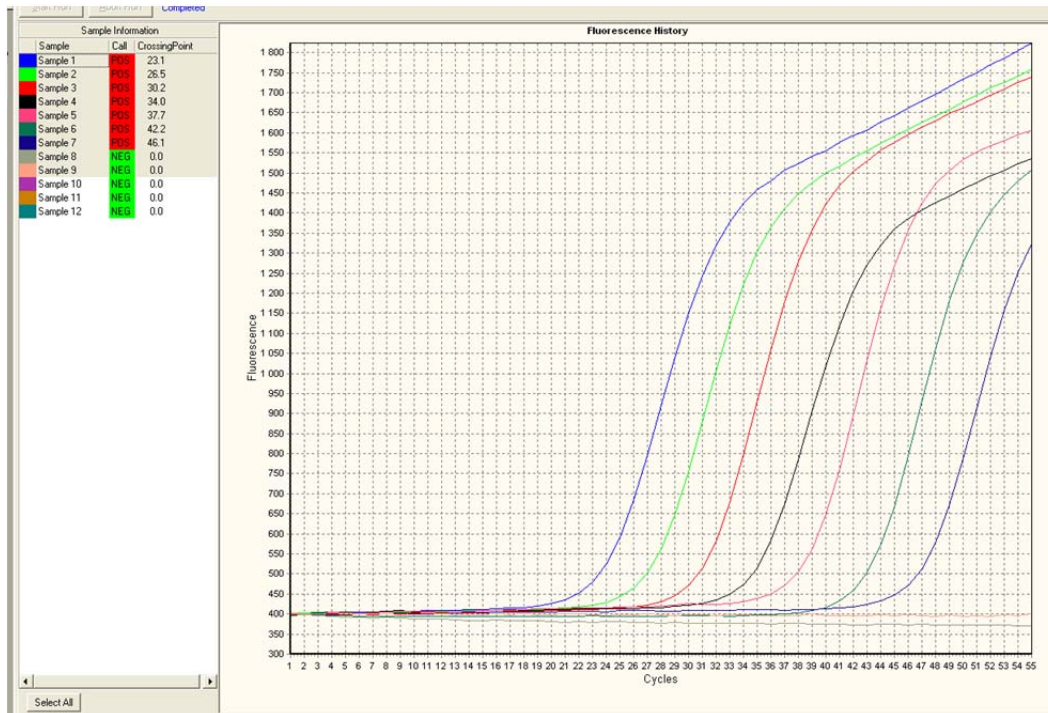


Figur A.9 Del 2, akkumuleringskurver. Brønn 1-3, 1×10^4 genomkopier/mL (blå, grønn og rød); brønn 4-6, 1×10^3 genomkopier/mL (svart, rosa, mørk grønn); brønn 7-9, 1×10^2 genomkopier/mL (blå, grå og rosa).

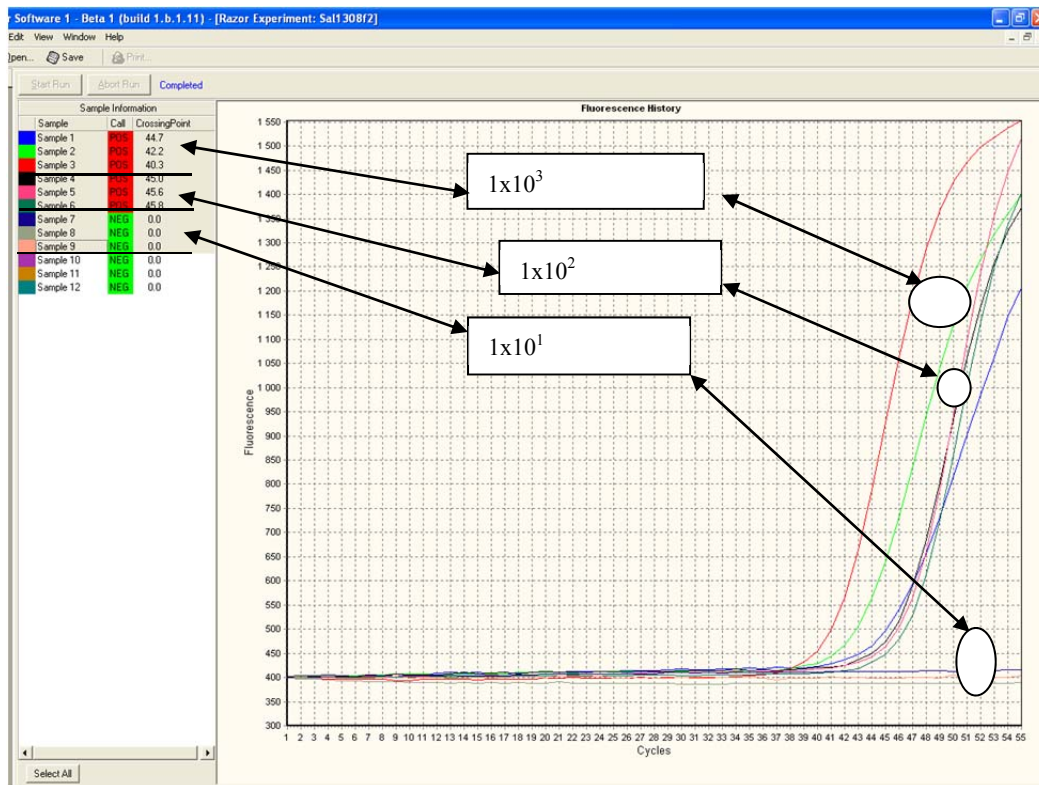
Resultatene viste tre av tre paralleller var positive med 1×10^4 genomkopier/mL (CP: 50,0-44,9-43,8) og likeledes for 1×10^3 genomkopier/ml (CP: 47,2-49,5-49,8). For konsentrasjonen $1,08 \times 10^2$ genomkopier/ml var tre av tre paralleller negative med $1,08 \times 10^2$ genomkopier/ml. Den laveste konsentrasjonen hvor alle paralleller var positive ble dermed 1×10^3 genomkopier/mL.

A.1.5 *S. enterica* sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™

Prøvemateriale: DNA isolert fra oppdyrket renkultur med konsentrasjon 21,2 ng/μl målt med Picogreen-metoden. Del 1, fortynningsrekke fra 1×10^8 genomkopier/ml til 1×10^1 genomkopier/mL en parallell av hver. Del 2, tre konsentrasjoner, 1×10^3 genomkopier/mL, 1×10^2 genomkopier/mL og 1×10^1 genomkopier/mL, tre paralleller av hver.



Figur A.10 Del 1, akkumuleringskurve: Brønn 1, 1×10^8 genomkopier/mL (blå); brønn 2, 1×10^7 genomkopier/mL (grønn); brønn 3, 1×10^6 genomkopier/mL (rød); brønn 4, 1×10^5 genomkopier/mL (svart); brønn 5, 1×10^4 genomkopier/mL (rosa); brønn 6, 1×10^3 genomkopier/mL (mørk grønn); brønn 7, 1×10^2 genomkopier/mL (blå).

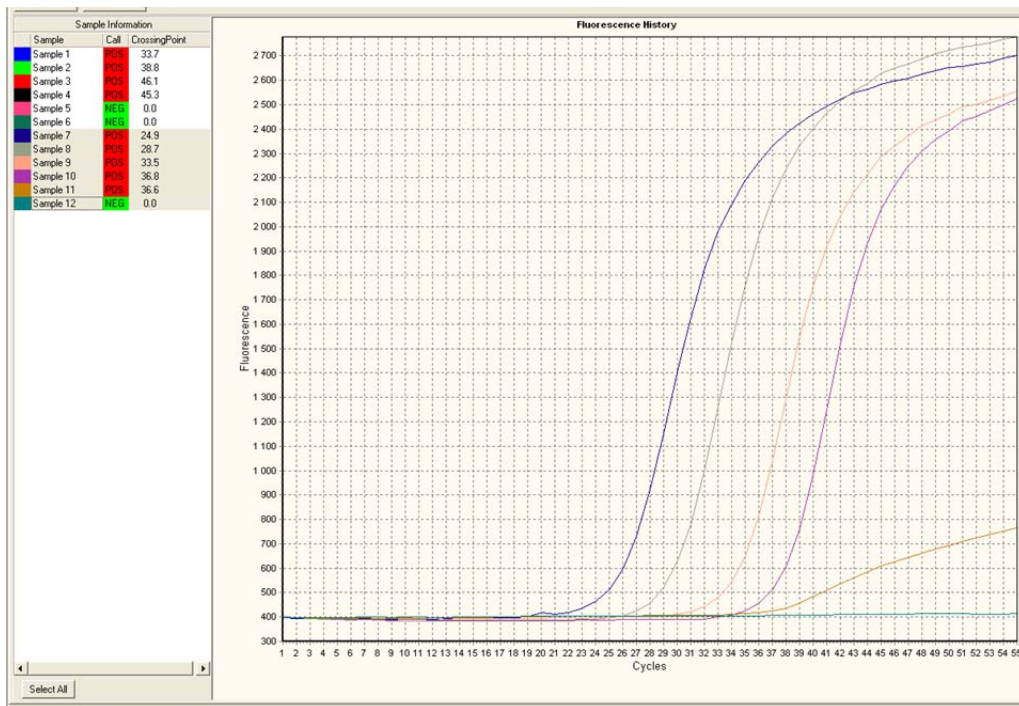


Figur A.11 Del 2, akkumuleringskurver: Brønn 1-3, 1×10^3 genomkopier/mL (blå, grønn og rød); brønn 4-6, 1×10^2 genomkopier/mL (svart, rosa, mørk grønn); brønn 7-9, 1×10^1 genomkopier/mL (blå, grå og rosa).

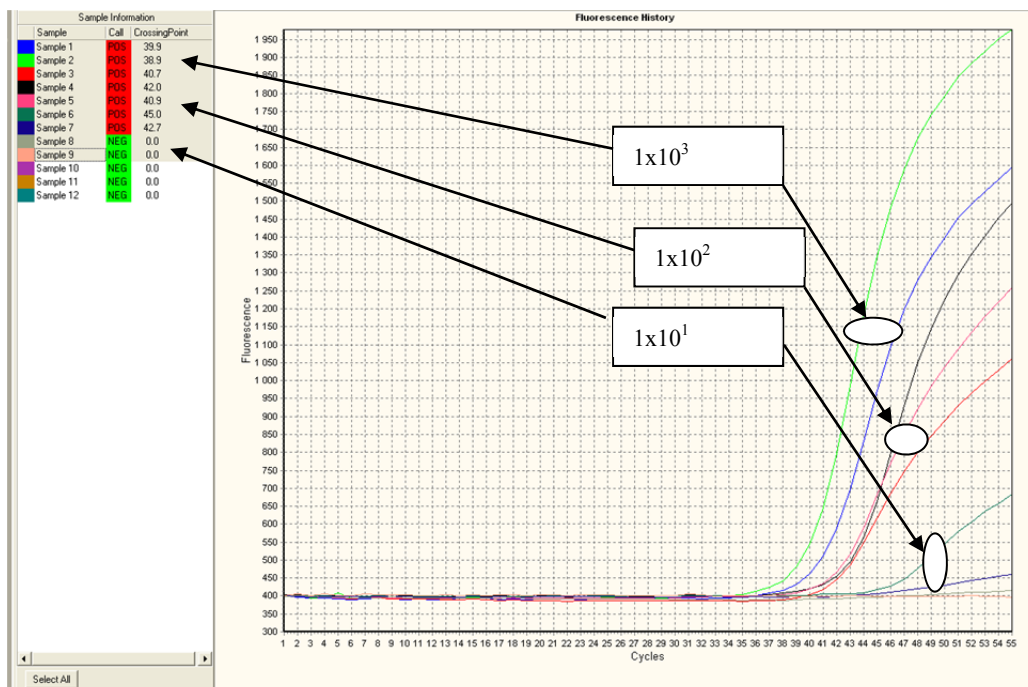
Tre av tre paralleller var positive for konsentrasjonene 1×10^3 genomkopier/mL og 1×10^2 genomkopier/mL. Alle tre paralleller var negative for 1×10^1 genomkopier/mL, den laveste konsentrasjonen hvor alle parallellene var positive ble dermed 1×10^2 genomkopier/mL.

A.1.6 *Y. pestis* sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™

Prøvemateriale: DNA isolert 13.12.2005 med konsentrasjon 6,3 ng/μl målt med Picogreen-metoden. Del 1, fortynningsrekke av prøven fra 1×10^6 genomkopier/mL til 1×10^4 genomkopier/mL en parallell av hver. Del 2, Tre konsentrasjoner 1×10^3 genomkopier/mL, 1×10^2 genomkopier/mL og 1×10^1 genomkopier/mL to og tre paralleller av hver.



Figur A.12 Del 1, akkumuleringskurve: Brønn 7, 1×10^6 genomkopier/mL (blå); brønn 8, 1×10^5 genomkopier/mL (grå); brønn 9, 1×10^4 genomkopier/mL (rosa); brønn 10, 1×10^3 genomkopier/mL (lilla); brønn 11, 1×10^2 genomkopier/mL (brun); brønn 12, 1×10^1 genomkopier/mL (mørk grønn).

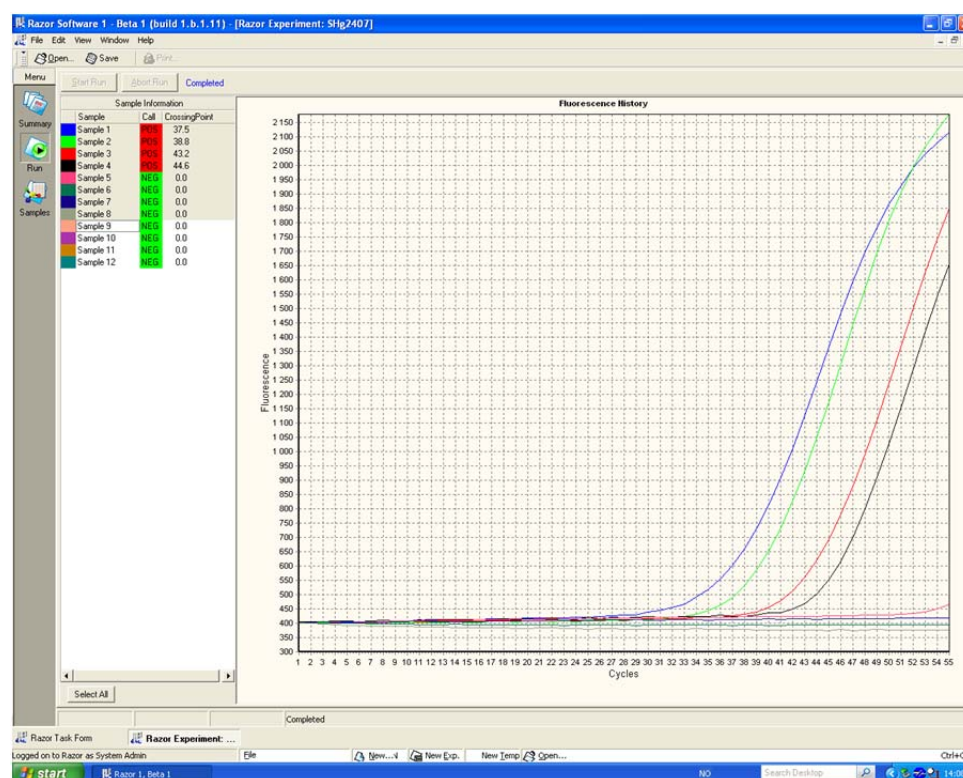


Figur A.13 Del 2, akkumuleringskurver: Brønn 1-2, 1×10^3 genomkopier/mL (blå og grønn); brønn 3-5, 1×10^2 genomkopier/mL (rød, svart og, rosa); brønn 6-8, 1×10^1 genomkopier/mL (grønn, blå og grå).

To av to paralleller var positive for konsentrasjonen 1×10^3 genomkopier/mL (CP: 39,9 – 38,9) og tre av tre paralleller var positive med 1×10^2 genomkopier/mL (CP: 40,7-42,0-40,9). To av tre paralleller var positive med 1×10^1 genomkopier/mL (CP: 45,0 – 42,7). Den laveste konsentrasjonen hvor alle paralleller var positive ble dermed 1×10^2 genomkopier/mL.

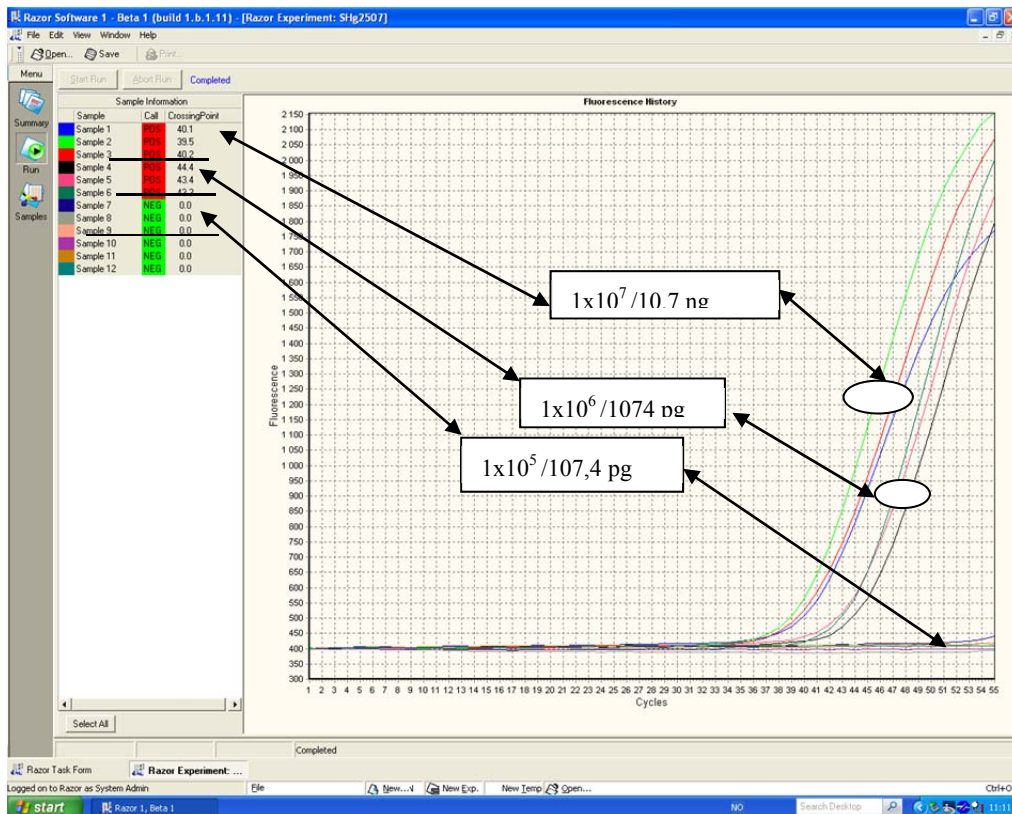
A.1.7 *S. flexneri* sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™

Prøvemateriale: DNA med konsentrasjon 358 ng/μl målt med Picogreen-metoden. Del 1, fortynningsrekke av prøven fra 1×10^9 genomkopier til 1×10^3 genomkopier/mL, en parallell av hver. Del 2, testet tre konsentrasjoner: 1×10^7 genomkopier, 1×10^6 genomkopier og 1×10^5 genomkopier/mL og tre paralleller av hver.



Figur A.14 Del 1, akkumuleringskurve: Brønn 1, 1×10^9 genomkopier/mL (blå); brønn 2, 1×10^8 genomkopier/mL (grønn); brønn 3, 1×10^7 genomkopier/mL (rød); brønn 4, 1×10^6 genomkopier/mL (svart); brønn 5, 1×10^5 genomkopier/mL (rosa); brønn 6, 1×10^4 genomkopier/mL (mørk grønn); brønn 7. 1×10^3 genomkopier/mL (blå).

Resultatene er positive ned til fortynningen 1×10^6 genomkopier/mL.



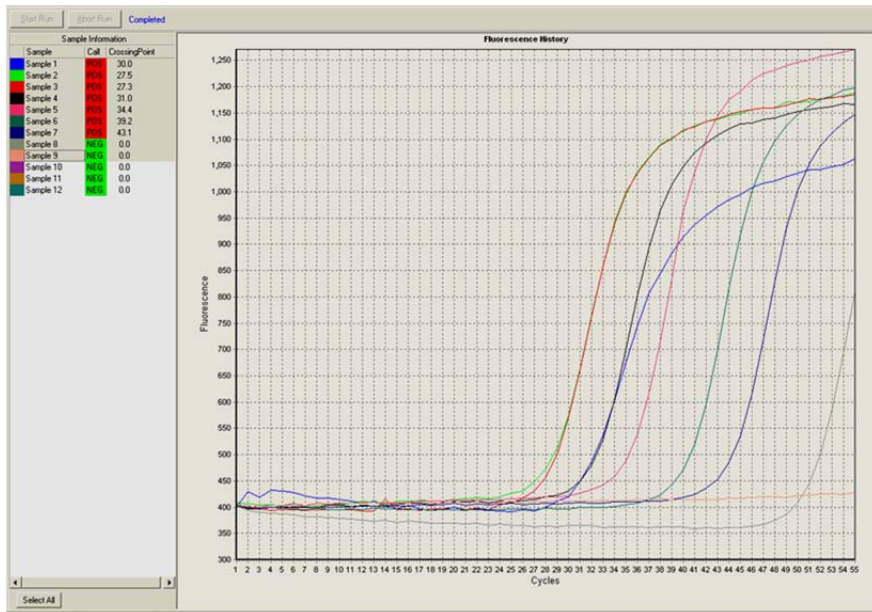
Figur A.15 Del 2, akkumuleringskurver. Brønn 1-3, 1×10^7 genomkopier/mL (blå, grønn og rød); brønn 4-6, 1×10^6 genomkopier/mL (svart, rosa, mørk grønn); brønn 7-9, 1×10^5 genomkopier/mL (blå, grå og rosa).

Tre av tre paralleller var positive for konsentrasjonene 1×10^7 genomkopier/ (CP: 40,1 - 39,5-9 – 40,2) og 1×10^6 genomkopier/mL (CP: 44,4-43,4-43,3). Tre av tre paralleller var negative med 1×10^5 genomkopier/mL. Den laveste konsentrasjonen hvor alle paralleller var positive ble dermed 1×10^6 genomkopier/mL.

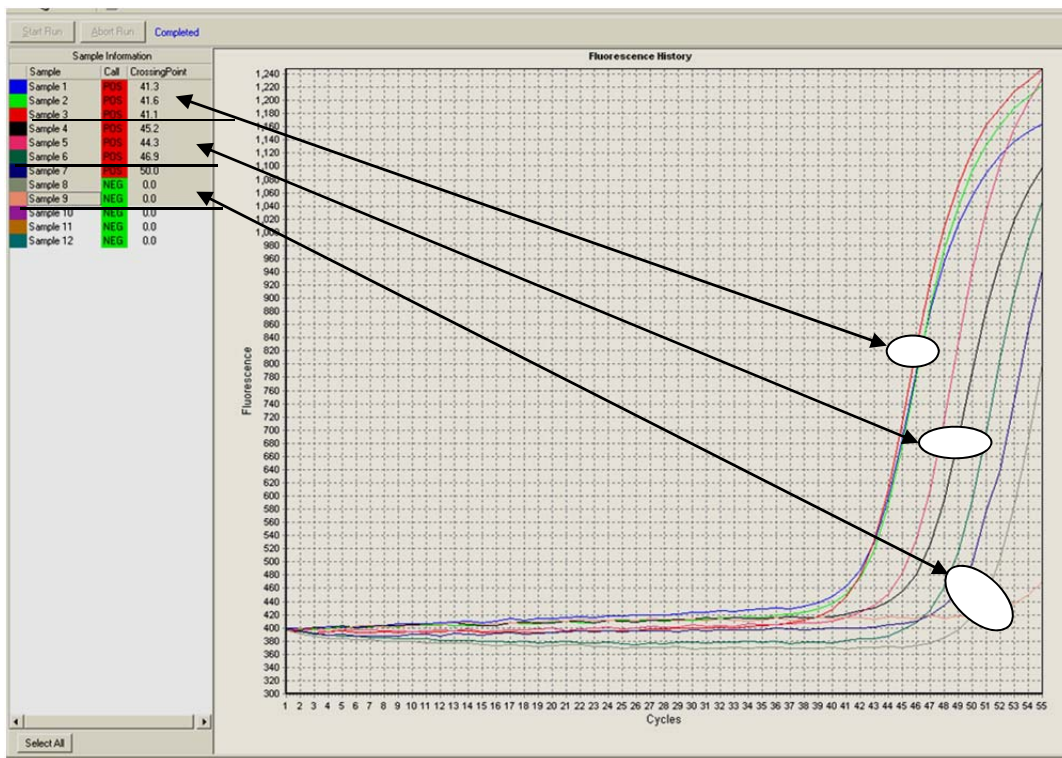
A.1.8 BG sporer: Sensitivitet med tomme reagenskassetter på RAZOR™

Prøvemateriale: Sporer av *Bacillus atrophaeus* (BG). Sporekonsentrasjon i stock-løsning: ca 2×10^9 sporer/mL i 0,02% Triton x-100. Del 1, fortynningsrekke fra 2×10^8 sporer/mL til 2×10^2 sporer/mL, en parallell av hver analysert. Del 2, tre konsentrasjoner, 2×10^4 sporer/mL, 2×10^3 sporer/mL og 2×10^2 sporer/mL med tre paralleller av hver analysert.

Sporene viste positivt resultat ned til konsentrasjonen 2×10^2 sporer/mL.



Figur A.16 Del 1, akkumuleringskurver. Brønn 1, 2×10^8 sporer/mL (blå); brønn 2, 2×10^7 sporer/mL (grønn); brønn 3, 2×10^6 sporer/mL (rød); brønn 4, 2×10^5 sporer/mL (svart); brønn 5, 2×10^4 sporer/mL (rosa), brønn 6, 2×10^3 sporer/mL (mørk grønn, brønn 7, 2×10^2 sporer/mL (blå).



Figur A.17 Del 2, akkumuleringskurver. Brønn 1-3, 2×10^4 sporer/mL (blå, grønn og rød); brønn 4-6, 2×10^3 sporer/mL (svart, rosa, mørk grønn); brønn 7-9, 2×10^2 sporer/mL (blå, grå og rosa).

Tre av tre paralleller var positive med 2×10^4 sporer/mL (CP: 41,3 – 41,6 – 41,1). og med konsentrasjonen 2×10^3 sporer/mL (CP: 45,2- 44,3- 46,9). Bare en av tre paralleller var positiv med 2×10^2 sporer/mL (CP: 50,0). Den laveste konsentrasjonen hvor alle paralleller var positive ble dermed 2×10^3 sporer/mL.

A.2 Utdrag fra DTRA rapport CBRT 2011 - Chemical Biological Radiological Technology Survey (referanse 11)

A.2.1 RAZOR™ EX

Produsenten er nå BioFire Diagnostics, Inc (fra 2012).

RAZOR EX BioThreat Detection System



by Idaho Technology, Inc.

DETECTS THE FOLLOWING:

Demonstrated:
Bacteria (100-1,000 CFU/mL)
Viruses (10e3-10e4 PFU/mL)

DETECTION MATRICES:

Demonstrated:
Environmental water, Food, Powder



DESCRIPTION:

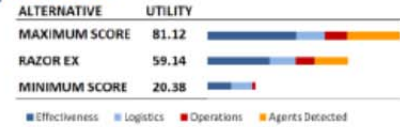
The advanced RAZOR EX BioThreat Detection System utilizes Real-time PCR technology to deliver the most reliable and sensitive field detection and identification of biological pathogens. Designed specifically for use in the field, the RAZOR EX' compact and lightweight design allows it to be hand carried and minimal sample preparation requirements make it easy to use. Powder, swab, water, dry filter, or culture sample types work ideally with the RAZOR EX. Used with The 10™ Target Screen Kit, the RAZOR EX simultaneously tests environmental samples for ten Category A and B BioThreat pathogens with reliable DNA-based results available in less than 30 minutes. Created for first responders and front line military troops, it is easily operated while working in protective equipment under extreme conditions. The new stand-alone, battery powered instrument includes Bluetooth® capabilities for wireless data transmission, bar code reader for data input, and a bright, easy to read color screen. The RAZOR EX utilizes Idaho Technology's patented reagent pouch system—integrated freeze-dried reagents packaged in durable plastic pouches for incomparable ease of use. A variety of pre-formatted pouch configurations are available for bioterror, food screening, or water testing applications.

TECHNOLOGY:

Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) - a molecular, enzymatic reaction that in the presence of a targeted pathogen, amplifies the amount of target DNA. The reaction is coupled with fluorescent probes that provide real-time detection.

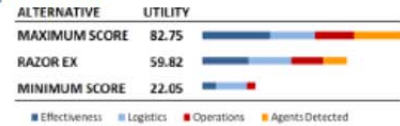
ANALYTICAL Laboratory Ranking

RAZOR EX BioThreat Detection System ranked in the top third of all evaluated products for analytical laboratories and earned 73% of the utility points of the best score.



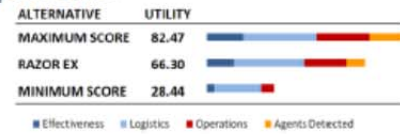
DIAGNOSTIC Laboratory Ranking

RAZOR EX BioThreat Detection System ranked in the top third of all evaluated products for diagnostic laboratories and earned 72% of the utility points of the best score.



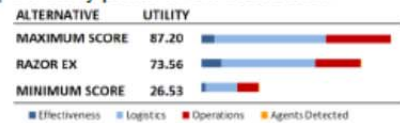
MOBILE Laboratory Ranking

RAZOR EX BioThreat Detection System ranked in the top third of all evaluated products for mobile laboratories and earned 80% of the utility points of the best score.

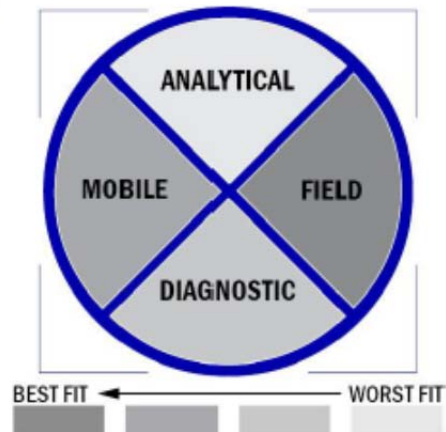


FIELD USE Ranking

RAZOR EX BioThreat Detection System ranked in the top third of all evaluated products for field use and earned 84% of the utility points of the best score.



Summary of Analysis



CONTACT INFORMATION

Idaho Technology, Inc.
390 Wakara Way
Salt Lake City, UT 84108

Point of Contact:
Lou Banks

COST

- \$38,500.00/system or device
- \$200.00/10-plex assay

SPECIFICITY

- False Positives: <1%
- False Negatives: <1%



Evaluation Criteria Provided by Vendor

Throughput of Product:

- 30-60 minutes for detection
- 1 sample, >10 tests/ sample per run
- Currently semi-automated

Signature:

- Sounds or alarms not present
- Screen can be dimmed or turned off
- Less than 200 BTU/hour

Training and Speed:

- Very brief (minutes-hours) training and minimal technical skills
- < 5 minutes set up
- Almost instantaneous down time
- 3-5 steps are required
- DVD/ Customer and manufacturer site training/ Hard-copy manual

Operational conditions:

- Can be used from 4°C to 41°C
- Components should be stored at room temp
- Performance is not influenced by relative humidity
- Between 6 months to 1 year

Transportation:

- Approximately the size of a toaster
- All means of transportation
- Weighs between 5 and 25 kg

Re-use:

- Multiple detection assays
- 0-1 solutions, buffer, and/or reagents
- 1 component

Maintenance:

- No service required
- Preventive maintenance by customer
- Maintenance is included
- Expected life 5-10 years
- No QA required
- Hazardous agent is isolated to discrete elements and/or decontamination requires up to one hour

Physical System

Requirements:

- Batteries
- 2-4 hours battery life
- Does not require water
- External air or gas source not required
- External vacuum not required

Ease of Use:

- Real-time results available
- Data can not be processed while in progress
- No centrifugation steps required
- A single shaking or vortexing, mixing, degassing or filtering step required
- Software will call final result

Sensitivity and Detection:

- 510K clearance capable
- FDA approval capable
- Less than 100 ul for a test

System Maturity:

- Is commercially available and meets mil specs
- Has appeared in peer reviewed publication or independent evaluation
- The technology ownership and intellectual property is fully licensed

Interoperability and System Complexity:

- < 100 GB or single response generated
- Not network capable
- Wireless and wired connections
- Autonomous system with some effort
- Onboard computer chip
- Automatically stores and archives data outputs and creates an electronic record
- The system software is closed and not available for modification
- The system hardware is closed and not available for modification

Bio-Seq PLUS Biological Agent Identifier



by Smiths Detection, Inc

DETECTS THE FOLLOWING:

Demonstrated:
Bacteria (10e3-10e4 CFU/mL)
Virus (10e3-10e4 PFU/mL)

DETECTION MATRICES:

Demonstrated:
Powder



DESCRIPTION:

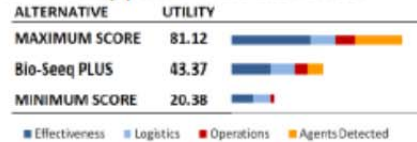
Bio-Seq PLUS is a portable high precision instrument that detects and identifies trace levels of specific biological agents, both bacterial and viral, through DNA replication.

TECHNOLOGY:

Bio-Seq PLUS utilizes Linear After The Exponential Polymerase Chain Reaction (LATE PCR)

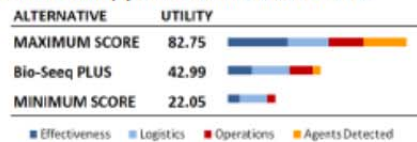
ANALYTICAL Laboratory Ranking

Bio-Seq PLUS ranked in the middle third of all evaluated products for analytical laboratories and earned 53% of the utility points of the best score.



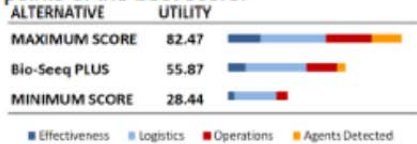
DIAGNOSTIC Laboratory Ranking

Bio-Seq PLUS ranked in the bottom third of all evaluated products for diagnostic laboratories and earned 52% of the utility points of the best score.



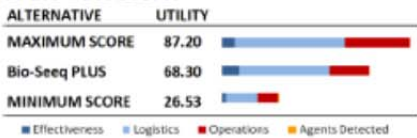
MOBILE Laboratory Ranking

Bio-Seq PLUS ranked in the middle third of all evaluated products for mobile laboratories and earned 68% of the utility points of the best score.

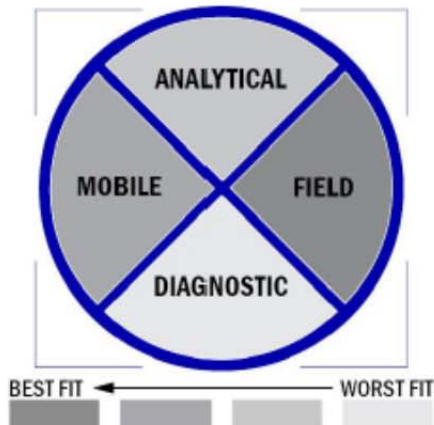


FIELD USE Ranking

Bio-Seq PLUS ranked in the middle third of all evaluated products for field use and earned 78% of the utility points of the best score.



Summary of Analysis



CONTACT INFORMATION

Smiths Detection, Inc.
2202 Lakeside Blvd.
Edgewood, MD 21040

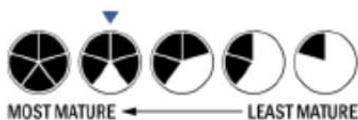
Point of Contact:
Ken Klein
Ken.klein@smithsdetection.com

COST

- \$35,000.00/system or device
- \$32.00/ analysis

SPECIFICITY

- False Positives: above MDL expect 0%
- False Negatives: Not available



Evaluation Criteria Provided by Vendor

Throughput of Product:

- 30-60 minutes for detection
- Multiple samples, single tests/ sample per run
- System not amenable to full or semi-automation

Signature:

- Sounds or alarms not present
- Screen cannot be dimmed or turned off
- Less than 200 BTU/hour

Training and Speed:

- Very brief (minutes-hours) training and minimal technical skills
- No set up
- Almost no down time
- 3-5 steps are required
- Customer and manufacturer sit training/ Hard copy manual

Operational conditions:

- Can be used from 4°C to 37°C
- Components should be stored at room temperature but can withstand temperatures in excess of 45°C for periods of less than 24 hours
- Performance is not influenced by relative humidity
- Between 1 to 3 years

Transportation:

- Approximately the size of a toaster
- All means of transportation
- Weighs between 5 and 25kg

Re-use:

- Multiple detection assays
- 0-1 solutions, buffer, and/or reagents
- 1 component

Maintenance:

- Less than once a year
- Preventive maintenance N/A
- Maintenance is not included
- Expected life 5-10 years
- No QA required
- It likely that exposure to hazardous agent cannot be decontaminated

Physical System

Requirements:

- System used batteries
- 2-4 hours battery life
- Does not require water
- External air or gas source not required
- External vacuum not required

Ease of Use:

- Real-time results not available
- No centrifugation steps required
- No shaking or vortexing, mixing, degassing or filtering steps required
- Software will call final result

Sensitivity and Detection:

- 510K clearance N/A
- FDA approval N/A
- Less than 10 ul for a test

System Maturity:

- Commercially available
- Has appeared in peer reviewed publication or independent evaluation
- The technology ownership and intellectual property is fully licensed

Interoperability and System Complexity:

- < 100 GB or single response generated
- Network capable
- Wireless and wired connections
- Not capable of autonomy
- Onboard computer chip
- Store and archive data outputs and creates an electronic record
- The system software is closed and not available for modification
- The system hardware is closed and not available for modification

T-COR 4 Handheld Real-Time PCR Thermocycler



by Tetracore, Inc.

DETECTS THE FOLLOWING:
 Demonstrated:
 Bacteria (1-100 CFU/mL)
 Viruses (1-100 PFU/mL)

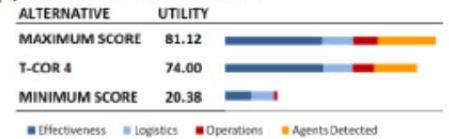
DETECTION MATRICES:
 Demonstrated:
 Blood, Nasal and throat swabs, Stool, Environmental air, Environmental water, Powder



DESCRIPTION:
 Tetracore's T-COR 4 Handheld Real-Time PCR Thermocycler can process four independent samples and is capable of analyzing two targets per sample. The T-COR 4 has a footprint of 9" x 7.5" x 3", weighs 6 pounds, and runs continuously off battery power for 8 hours. The system is capable of running both standard TaqMan® real-time PCR and Isothermal real-time fluorescence based amplification. Isothermal real-time fluorescence based amplification allows for confirmatory analysis in 10 minutes. The user can choose to run the device in either stand alone mode or connected to a PC. Intuitive software allows the user to set up, run, and analyze an experiment. Easy to learn and simple to use, the T-COR 4 is designed for use by both first responders in the field and biologists in the laboratory. We have demonstrated the identification of agents in powder samples, agents in environmental samples, bacteria, and viruses. Tetracore produces 18 dry real-time PCR and 4 dry Isothermal Assays for the T-COR 4. Dry assays developed for the system are subject to accelerated stability testing at 55 degrees Celsius and 45 degrees Celsius, and to real-time stability testing at room temperature. We have data supporting a shelf life of more than 18 months at room temperature. The T-COR 4 is an open system capable of running any customer's assay, in either a wet or dry formulation. A handheld, battery powered centrifuge is included with the system.

TECHNOLOGY:
 A handheld, battery powered, peltier-based thermocycler designed for use with TaqMan® real-time PCR amplification and Isothermal real-time fluorescence based amplification. Isothermal real-time fluorescence based amplification allows for confirmatory analysis in 10 minutes. Tetracore has designed a proprietary, modular optical system such that the instrument can be modified to suit future end users requirements. The developed optical technology enables Tetracore to support the fields of biotechnology, such as nucleic acid detection, polypeptide detection, and environmental sensing.

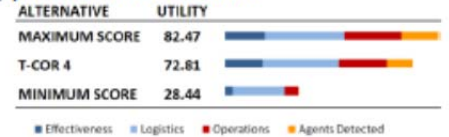
ANALYTICAL Laboratory Ranking
 T-COR 4 ranked in the top third of all evaluated products for analytical laboratories and earned 91% of the utility points of the best score.



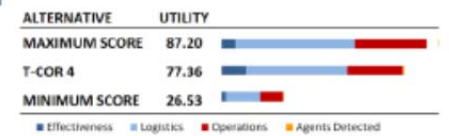
DIAGNOSTIC Laboratory Ranking
 T-COR 4 ranked in the top third of all evaluated products for diagnostic laboratories and earned 85% of the utility points of the best score.



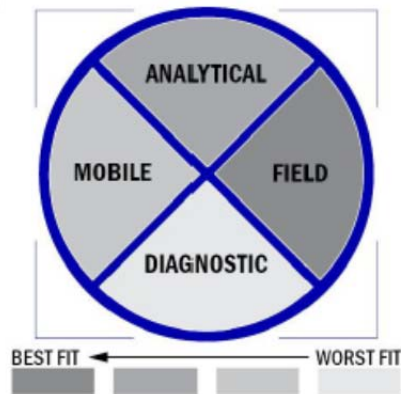
MOBILE Laboratory Ranking
 T-COR 4 ranked in the top third of all evaluated products for mobile laboratories and earned 88% of the utility points of the best score.



FIELD USE Ranking
 T-COR 4 ranked in the top third of all evaluated products for field use and earned 89% of the utility points of the best score.



Summary of Analysis



CONTACT INFORMATION

Tetracore, Inc.
9901 Belward Campus Drive
Suite 300
Rockville, MD, 20850

Point of Contacts:
William M. Nelson, M.D.
David Almassian

COST

- \$16,000.00/system or device

SPECIFICITY

- False Positives: 1%
- False Negatives: FNR cannot be reported as a single number because it is sample type, sample prep, assay, and concentration specific.



Evaluation Criteria Provided by Vendor

Throughput of Product:

- 2 - 15 minutes for detection
- Multiple samples, multiple tests/samples per run
- Fully automated

Signature:

- Sounds or alarms not present
- Screen cannot be dimmed or turned off
- Less than 200 BTU/hour

Training and Speed:

- Very brief (minutes-hours) training and minimal technical skills
- No set-up required
- Almost instantaneous down time
- 3-5 steps required
- DVD/ Web video/ Customer and manufacturer site training/ Hard copy and web manual

Operational conditions:

- Can be used from 4°C - 41°C
- Components should be stored at room temp but can stand temps > 45°C for <24 hours
- Performance not influenced by relative humidity
- Between 1-3 years shelf life

Transportation:

- Approximately the size of a toaster
- All modes of transportation
- Weighs between 1 and 5 kg

Re-use:

- Multiple detection assays
- 0-1 solutions, buffer, and/or reagents
- 1 component

Maintenance:

- Service less than once a year
- Preventive maintenance not applicable
- Maintenance included
- Expected life 3-5 years
- No daily QA required
- Hazardous agent isolated to discrete elements and/or decon requires up to one hour

Physical System

Requirements:

- 4-8 hours battery life
- Requires water aliquots
- External air or gas source not required
- External vacuum source not required

Ease of Use:

- Real-time results available
- Data can be processed while in progress
- Single centrifugation steps
- No shaking or vortexing, mixing, degassing or filtering step
- System calls final result

Sensitivity and Detection:

- 510K clearance not applicable
- FDA clearance not applicable
- Less than 10 ul required for test

System Maturity:

- Is commercially available and meets mil specs
- Has appeared in peer reviewed publication or independent evaluation
- Technology ownership and intellectual property is owned

Interoperability and System Complexity:

- < 100 GB or single positive or negative response generated
- Network capable
- Wireless and wired connections
- Not autonomous
- On board computer chip
- Stores and archives data outputs and creates electronic records
- System software is closed and not available for modification
- System hardware is closed and not available for modification