

Mezilaboratorní srovnávací testy biologických laboratoří armád NATO

**Ústřední vojenský zdravotní ústav Praha
2010**





Biologická ochrana v armádách NATO

Expertní pracovní skupina NATO SIBCRA:

SAMPLING AND
IDENTIFICATION OF
BIOLOGICAL,
CHEMICAL AND
RADIOLOGICAL
AGENTS





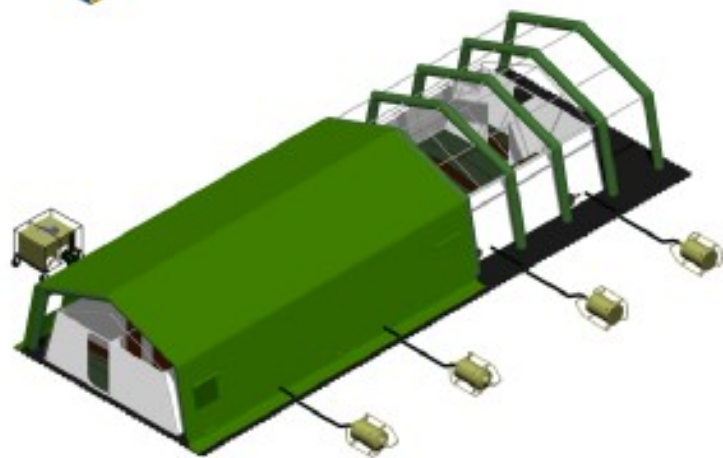
System biologické ochrany AČR

= systém preventivních a represivních protiepidemických opatření, profylaxe, detekce a identifikace bojových biologických látek, včetně izolace a léčení zasažených osob

- Cíle výstavby ozbrojených sil číslo:
E 4490 „Schopnosti ochrany proti zbraním hromadného ničení “
L 4461 „Podpora specialistů na radiální, chemické a biologické zbraně v boji“**
- ukládají ČR kromě jiného do konce roku 2009 vyčlenit do sil vysoké připravenosti NATO biologickou laboratoř a rozvinout schopnosti identifikace bojových biologických látek**
- Garantem plnění – Ústřední vojenský zdravotní ústav**



Mobilní polní mikrobiologická laboratoř





Pojízdná hygienicko epidemiologická laboratoř PHEL-2





Vozidlo biologického průzkumu SCAM BIO





Mezilaboratorní srovnávací testy biologických laboratoří armád NATO v roce 2010

Organizátor: U. S. Army Test & Evaluation Center
(Dugway Proving Ground, Utah, U.S.A.)

Cílem letošních mezinárodních mezilaboratorních testů bylo posoudit schopnost jednotlivých laboratoří spolehlivě identifikovat *Bacillus anthracis* kmen Sterne ve vzorcích „kontaminovaných“ různými druhy desinfekčních prostředků, jejichž přítomnost může proces identifikace vážně komplikovat.



• Z laboratoří v Dugway Proving Ground byly v únoru 2010 rozeslány do všech přihlášených laboratoří ekvivalentní sety 12 „neznámých“ vzorků - stěrových tampónů

• Pro ztížení identifikace obsahovaly vzorky příměs, pro testující laboratoře neznámých, dezinfekčních prostředků.

• Úkolem bylo kvalitativní (ano/ne) vyšetření vzorků na přítomnost *Bacillus anthracis*





Agens ve vzorcích bylo před expedicí inaktivováno γ-zářením o celkové dávce 80,01 kGy

WDL-FRM-409 Rev 1

DTC 0632



Death Certificate

Date: 13 Jan 2010

The following has been rendered non-viable (killed or inactivated):

a. Name of Organism:
Bacillus anthracis Sterne (with silica), Lot# 5V-17Dec2009

b. Place & Date of Sterilization: BLDG 2032, Dugway Proving Ground, Utah on 21 Dec 2009 and 28 Dec 2009

c. Total Dosage: 44.64 kGy/300 minutes and 35.37 kGy/225 minutes (Total 80.01 kGy/525 minutes)

The organism listed in paragraph 1a. was confirmed non-viable (killed or inactivated) by the following:

a. Procedure Used:
7X Nutrient Broth was prepared and approximately 5% of the inactivated product (with and without silica) was incubated in the broth for 48 hours at 34 °C on 14 December 2009. At the end of the incubation period, 10 TSA (Trypticase Soy Agar) agar plates were inoculated with 0.2 mL of inactivated product (10 plates with a product which includes silica and 10 plates with a product which is silica free). 0.2 mL of pre-inactivated product was inoculated on one TSA agar plate for positive control.

b. References (article, sop, etc):
"Inactivation of Biological Agents and Simulants for Antigen Production", WDL-BIO-147, Rev 3

c. Notebook/ Page/ Location of Results: Notebook #455 (Irradiation Record), page 39

d. Place & Date of Confirmation: Life Sciences Test Facility, Life Sciences Division, U.S. Army Dugway Proving Ground, Utah

Based on our knowledge of the sterilization procedure used in paragraph 1 and based on the results of the confirmation procedure used in paragraph 2, we certify, to the best of our knowledge, that the above listed organisms are non-viable.


Stephanie Vacova
Project Officer


Rose D. Hreinson
Biological Safety Officer
Life Sciences Division


Steve Luo
Responsible Officer (RO)
Life Sciences Division

Page 1 of 2



Kritéria výběru metod vyšetření

- metody vhodné pro použití v polních podmínkách mimo stacionární laboratoře a jsou standardní u mobilních prvků biologické ochrany AČR
- skutečnost, že zkoumané agens ve vzorcích není „živé“, ale inaktivované γ -zářením

Z tohoto pohledu je optimální metoda real-time PCR, a to konkrétně v AČR používané kompletní produktové řešení firmy Idaho Technology Inc., založené na lightcycleru R.A.P.I.D., které je možné doplnit „home-made“ identifikačními kity





Další možností, opět na principu real time PCR, je vyšetření automatizovaným systémem GeneXpert firmy Cepheid





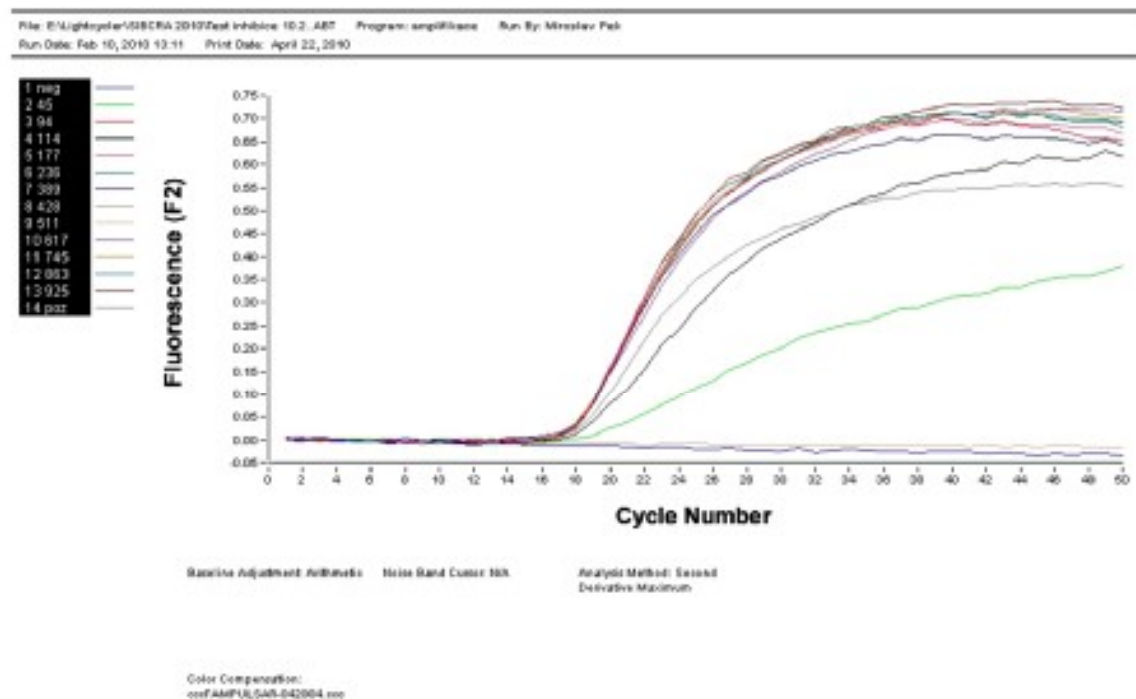
Postup vyšetření vzorků

1. Eluce vzorků ze stěrových tampónů

Vytřepání stěrových tampónů s hledaným agens ve 400 μ l 0,001% Tween v PBS po dobu 60 minut a následná centrifugace – získáno 12 x 400 μ l vzorků.

2. Test inhibice PCR

Ke všem vzorkům jsme přidali přesně definované množství známého agens a provedli jeho identifikaci metodou real-time PCR. Cílem testu bylo zjistit, zda jednotlivé vzorky obsahují inhibitory PCR reakce. Test inhibice prokázal významnou přítomnost inhibitorů ve vzorku č. 511.





Postup vyšetření vzorků

3. Purifikace DNA

Purifikace DNA ze vzorků byla provedena za použití komerční purifikační soupravy IT 1-2-3 DNA Sample Purification Kit (Idaho Technology Inc.).



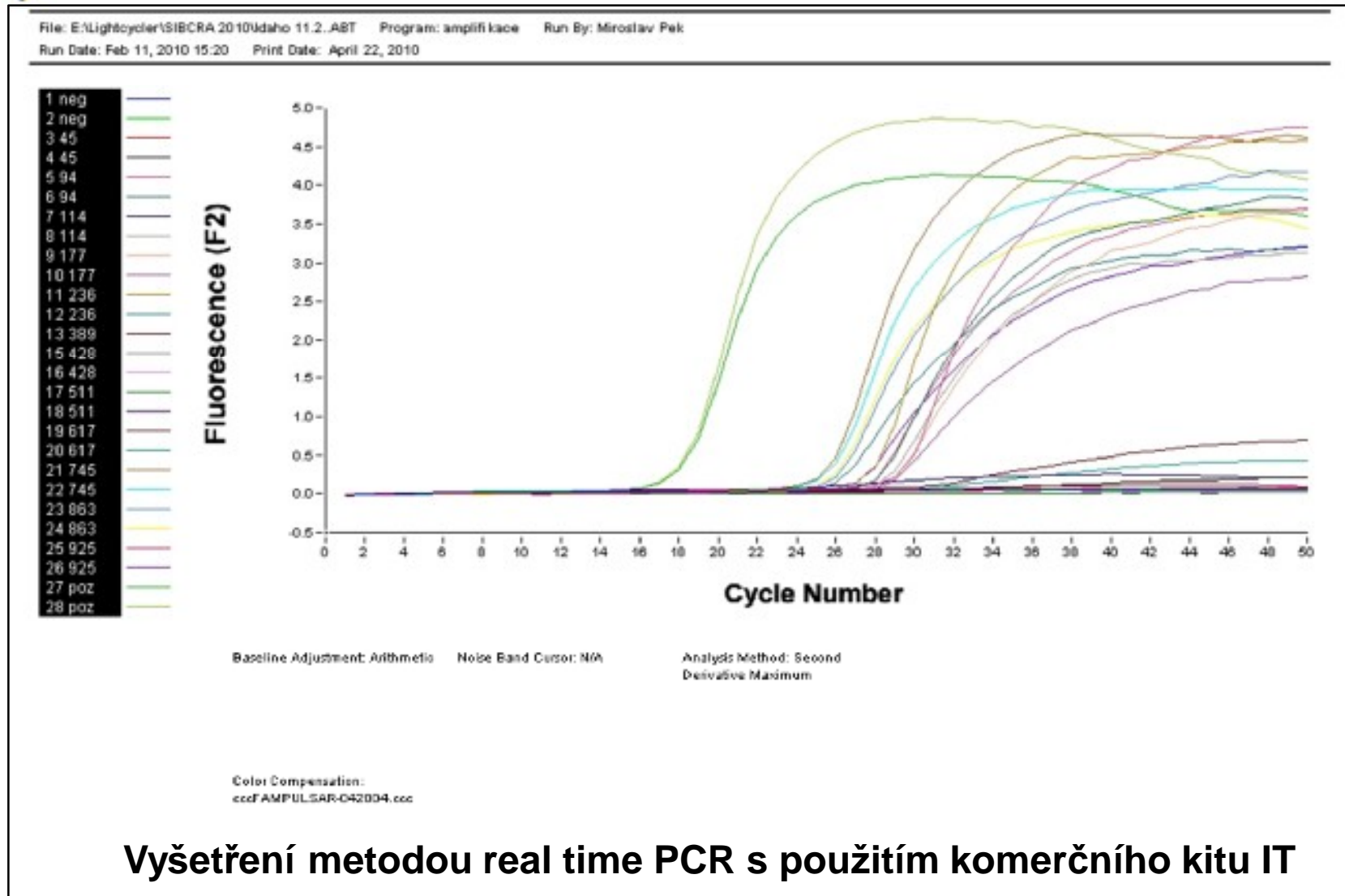
4. Vyšetření metodou real time PCR

Vlastní vyšetření bylo provedeno za použití komerčního kitu Freeze-dried reagent B. anthracis Target 1 (Idaho Technology Inc.) – identifikace zacílena na gen *rpoβ* (RNA polymerase beta subunit). Výsledky PCR reakce na lightcycleru R.A.P.I.D. ukázaly, že vzorky č. 389, 428 a 511 jsou negativní, ostatní pozitivní.





Postup vyšetření vzorků



Wyšetření metodou real time PCR s použitím komerčního kitu IT



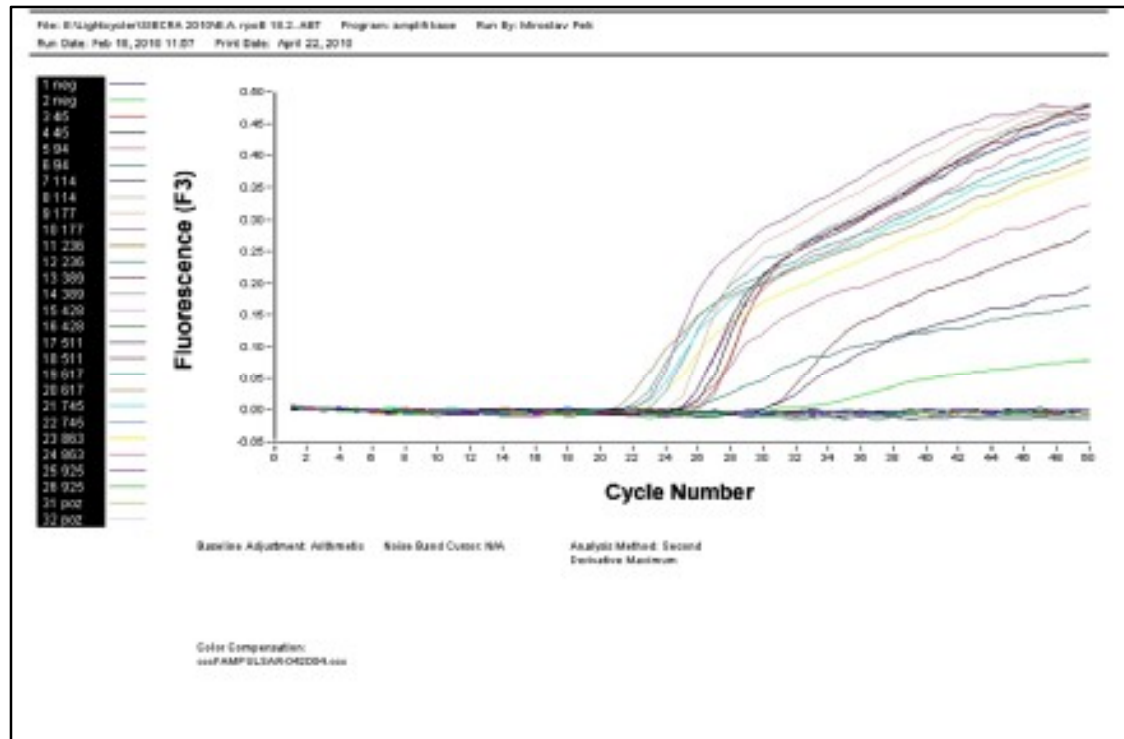
Postup vyšetření vzorků

5. Fenol – chloroformová extrakce

Z důvodu potvrzené přítomnosti PCR inhibitorů ve vzorku č. 511 testem inhibice byla u tohoto vzorku provedena dodatečná fenol-chloroformová extrakce.

6. Vyšetření metodou real time PCR s použitím „home-made“ kitu

Opětovné vyšetření metodou real-time PCR na lightcycleru R.A.P.I.D., tentokrát za použití vlastního „home-made“ vyšetřovacího kitu – opět zacíleného na gen *rpoβ*. Výsledky tentokrát ukázaly, že vzorky č. 389 a 428 jsou negativní, ostatní pozitivní, včetně vzorku č. 511.

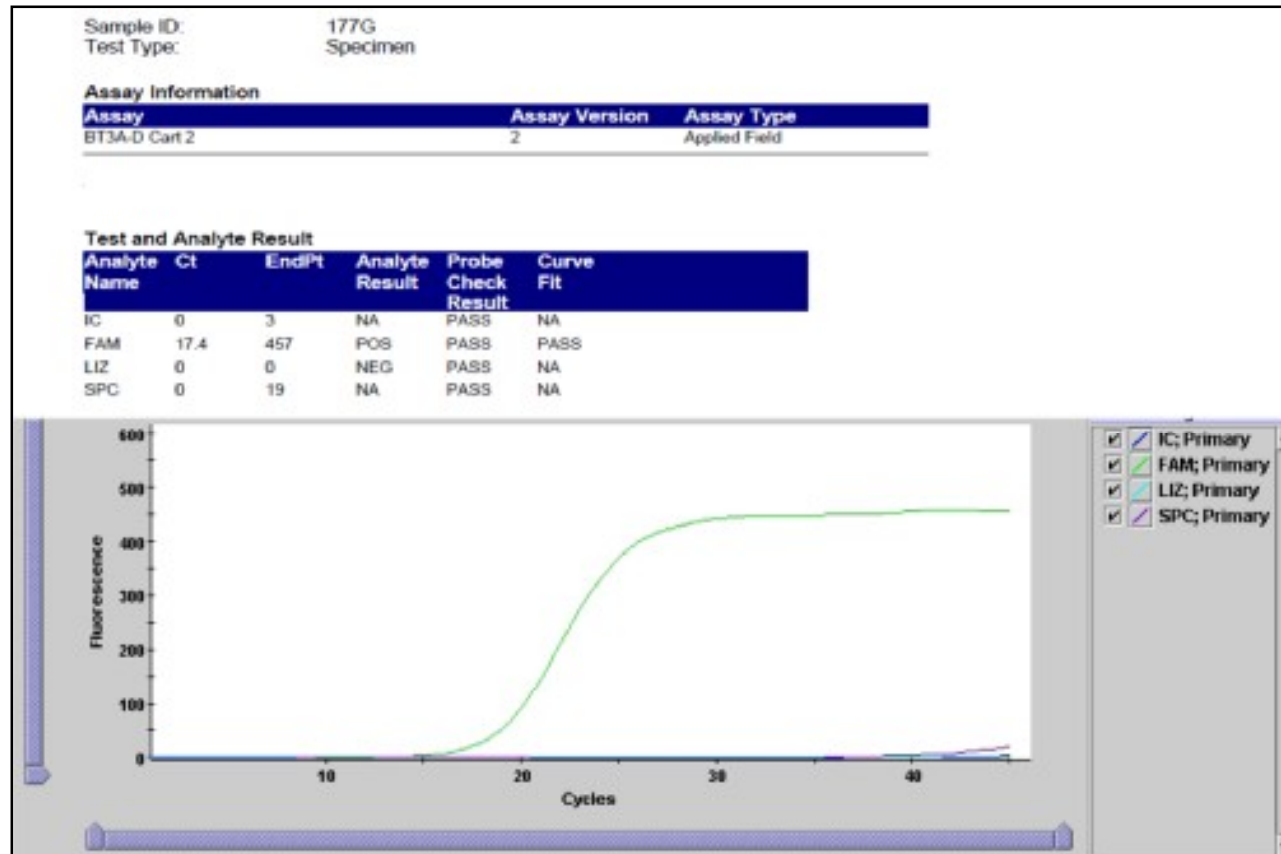




Postup vyšetření vzorků

7. Vyšetření systémem GeneXpert

K vyšetření vzorků byl použit automatizovaný systém GeneXpert firmy Cepheid opět na principu real-time PCR. Identifikace byla v tomto případě zacílena na plasmid pX01. Výsledky vyšetření ukázaly, že vzorky č. 389 a 428 jsou negativní, ostatní pozitivní, včetně vzorku č. 511.





Výsledky provedených vyšetření pomocí komerčních reagents IT (Idaho Technology Inc.), pomocí „home-made“ kitů a dále vyšetření automatizovaným systémem GenExpert včetně výsledného vyhodnocení positivity vzorků shrnuje následující tabulka:

vzorek číslo	IT reagents	„home-made“ kit	Gen Expert	výsledek
45	POZ	POZ	POZ	POZ
94	POZ	POZ	POZ	POZ
114	POZ	POZ	POZ	POZ
177	POZ	POZ	POZ	POZ
236	POZ	POZ	POZ	POZ
389	NEG	NEG	NEG	NEG
428	NEG	NEG	NEG	NEG
511	NEG	POZ	POZ	POZ
617	POZ	POZ	POZ	POZ
745	POZ	POZ	POZ	POZ
863	POZ	POZ	POZ	POZ
925	POZ	POZ	POZ	POZ



Výsledky mezilaboratorních testů

- Testů se v roce 2010 zúčastnilo 15 vojenských laboratoří
- V devíti případech byly laboratoře v identifikaci 100% úspěšné

Summary of Results - 2010 NATO SIBCRA Exercise

Country	Technique	% Correct	False (+)	False (-)
Austria	PCR	100%	0	1
Belgium	PCR	80%	2	0
Czech Republic	PCR	100%	0	0
Denmark	PCR & EM	100%	0	0
Finland (1)	PCR	100%	0	0
Finland (2)	Immunoassay & PCR	90%	0	1
Germany (1)	PCR, ELISA & IF	100%	0	0
Germany (2)	PCR & Immunoassay	90%	0	1
Norway	PCR	100%	0	0
Poland	PCR	100%	0	0
Spain	PCR	90%	0	1
Sweden (1)	PCR	100%	0	0
Sweden (2)	PCR	80%	1	1
Switzerland	PCR	90%	0	1
United States	PCR	100%	0	0



Desinfekční prostředky přidané ke vzorkům

Answer Key - 2010 NATA SIB CRA Exercise

Sample Number	Ba Sterne	Sample Preparation	Decontamination Reagent Type	Vendor	Catalog No.
45	positive	Swab from spores treated with BacDown Detergent	quaternary ammonium detergent	Fisher	04-355-13
114	positive	Swab from spores treated with CiDecon Detergent	Phenolic disinfectant	Fisher	S66875
389	negative	Blank sample - no spores or decontamination reagent	n/a	n/a	n/a
511	positive	Swab from spores treated with LopHen Detergent	low pH phenolic disinfectant	Fisher	04-355-64
617	positive	Swab from spores treated with Sporgon Sporicidal	peracetic acid-based disinfecting solution	Fisher	04-355-72
428	negative	Blank sample - no spores or decontamination reagent	n/a	n/a	n/a
236	positive	Swab from spores treated with Conflikt Detergent	quaternary ammonium disinfectant	Fisher	04-355-52
177	positive	Swab from spores treated with Bacdown Foam Hand Sanitizer	quaternary ammonium detergent	Fisher	04-355-50
863	positive	Swab of spores - no decontamination	n/a	n/a	n/a
925	positive	Swab from spores treated with 10% Bleach	hypochlorite	Fox Packaging CO	n/a
94	positive	Swab from spores treated with 70% Ethanol	ethanol, reagent grade, denatured	Sigma -Aldrich	167380
745	positive	Dried spores milled with fluidizer	n/a	n/a	n/a



Doplňující vyšetření metodou hmotové spektrometrie

Navíc jako potvrzující metoda identifikace, prováděná již ve stacionární laboratoři, byla zvolena hmotové spektrometrie. Nejprve byla provedena série purifikačních kroků pro získání proteinové frakce. Následně byl materiál zpracován a analyzován tandemovým hmotnostním spektrometrem 4800 Plus MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems) a vyhodnocen proti celé proteinové databázi všech bakterií. Výsledky proteomické analýzy pak potvrdily předcházející genomické nálezy i roli hmotové spektrometrie v identifikaci biologických agens.

Sample	SIB CRA Nr	Protein name	Peptide sequence
1	45	Small, acid-soluble spore protein 2 (SASP)	ANGSVGGEITKR
2	94	Small, acid-soluble spore protein 2 (SASP) Elongation factor Tu hypothetical protein BA_3920	ANGSVGGEITKR IAQEFGVQLGADATAR YEIAQEFGVQLGADATAR GITISTAHVEYETETR SVLDNFDQWK GLDGGAVSDM AFR VGDYLANEVEAR
3	114	Small, acid-soluble spore protein 2 (SASP) hypothetical protein BA_3920	ANGSVGGEITKR GLDGGAVSDM AFR VGDYLANEVEAR SFLGER SVLDNFDQWK
4	177	Elongation factor Tu hypothetical protein BA_3920	GITISTAHVEYETETR SVLDNFDQWK GLDGGAVSDM AFR VGDYLANEVEAR
5	236	Small, acid-soluble spore protein 2 (SASP) hypothetical protein BA_3920	IAQEFGVQLGADATAR ANGSVGGEITKR YEIAQEFGVQLGADATAR LVSLAE QQLGGFOK SVLDNFDQWK GLDGGAVSDM AFR VGDYLANEVEAR
6	389		
7	428		
8	511	Small, acid-soluble spore protein 2 (SASP) Small, acid-soluble spore protein 2 (SASP)	YEIAQEFGVQLGADATAR ANGSVGGEITKR LVSLAE QQLGGFOK YEIAQEFGVQLGADATSR
9	617	Small, acid-soluble spore protein 2 (SASP)	ANGSVGGEITKR
10	745	Elongation factor Tu hypothetical protein BA_3920	GITISTAHVEYETETR SVLDNFDQWK GLDGGAVSDM AFR VGDYLANEVEAR
11	863	hypothetical protein BA_3920	GLDGGAVSDM AFR VGDYLANEVEAR
12	925	Hypothetical protein RBTH_01317	VGDYLANEVEAR



Závěr

Výsledky vyšetření provedené v laboratoři Ústředního vojenského zdravotního ústavu byly ve stoprocentní shodě s výsledky organizátora mezilaboratorních testů - laboratoří U. S. Army Test & Evaluation Center.

Bylo potvrzeno, že metody prvotní identifikace používané mobilními prvky biologické ochrany AČR jsou dostatečně citlivé spolehlivé a tedy vhodné svou konstrukcí a robustností pro použití v polních podmínkách.



Děkuji za pozornost!



mjr. MVDr. Radoslav KRUPKA
Ústřední vojenský zdravotní ústav Praha
krupka.r@seznam.cz