

## **FFI RAPPORT**

### **PÅVISNING AV BIOLOGISKE TRUSSELSTOFFER - ET STUDIUM AV TEKNOLOGIER OG METODER FOR BRUK I FORSVARET**

BLATNY Janet Martha, FYKSE Else Marie, OLSEN Jaran Strand

**FFI/RAPPORT-2005/03621**



**PÅVISNING AV BIOLOGISKE TRUSSELSTOFFER  
- ET STUDIUM AV TEKNOLOGIER OG  
METODER FOR BRUK I FORSVARET**

BLATNY Janet Martha, FYKSE Else Marie, OLSEN  
Jaran Strand

FFI/RAPPORT-2005/03621

**FORSVARETS FORSKNINGSINSTITUTT**  
**Norwegian Defence Research Establishment**  
Postboks 25, 2027 Kjeller, Norge



P O BOX 25  
 NO-2027 KJELLER, NORWAY  
**REPORT DOCUMENTATION PAGE**

**SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE**  
 (when data entered)

1) PUBL/REPORT NUMBER FFI/RAPPORT-2005/03621	2) SECURITY CLASSIFICATION UNCLASSIFIED	3) NUMBER OF PAGES 46
1a) PROJECT REFERENCE Beskyttelse/87401/	2a) DECLASSIFICATION/DOWNGRADING SCHEDULE -	
4) TITLE PÅVISNING AV BIOLOGISKE TRUSSELSTOFFER - ET STUDIUM AV TEKNOLOGIER OG METODER FOR BRUK I FORSVARET.  DETECTION OF BIOLOGICAL THREAT AGENTS FOR MILITARY PURPOSES.		
5) NAMES OF AUTHOR(S) IN FULL (surname first) BLATNY Janet Martha, FYKSE Else Marie, OLSEN Jaran Strand		
6) DISTRIBUTION STATEMENT Approved for public release. Distribution unlimited. (Offentlig tilgjengelig)		
7) INDEXING TERMS IN ENGLISH: IN NORWEGIAN:		
a) <u>Biological threat agents</u>	a) <u>Biologiske trusselstoffer</u>	
b) <u>Detection and identification</u>	b) <u>Deteksjon og identifikasjon</u>	
c) <u>Equipment / Technical devices</u>	c) <u>Utstyr / Teknologi</u>	
d) <u>Biosensor</u>	d) <u>Biosensor</u>	
e) <u>Military use</u>	e) <u>Militær bruk</u>	
THESAURUS REFERENCE:		
8) ABSTRACT  This report describes various methods for detection and identification of biological (B) threat agents and different technical devices that may be used for military purposes. Various approaches may be used for B-detection and identification, and some commercially available technical devices are presented here. The report contributes to a series of technological insights to the CHOD Norway's Defence Study 2007 and is outlined from the Norwegian Defence and Research Establishment.  The methods for B-detection and identification and the corresponding technical devices are dependent on the type of sample and the type of B-agent to be analysed. The development of "detect-to-warn" equipment is limited compared to "detect-to-treat" devices. Several methods are needed for verification studies of B threat agents, in which PCR is a promising molecular approach for B-identification. However, the methods may be limited in their sensitivity and specificity. Future approaches seem to include biosensors using microarrays, nanotechnology or mass spectrometry together with optical methods with enhanced sensitivity and specificity. Also, micro-systems involving both automatic sample processing and B-identification will probably be commercially available in near future (10-15 years).		
9) DATE 2005-11-21	AUTHORIZED BY This page only Jan Ivar Botnan	POSITION Director

ISBN 82-464-0990-5

**UNCLASSIFIED**

**SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE**  
 (when data entered)



**INNHOOLD**

	<b>Side</b>	
1	SAMMENDRAG	7
2	INTRODUKSJON	8
3	UTFORDINGER VED B-VERIFIKASJON	11
4	UTSTYR FOR DETEKSJON OG IDENTIFIKASJON AV B-TRUSSELSTOFFER	14
4.1	Deteksjon av B-trusselstoffer	17
4.1.1	Flowcytometri	19
4.2	Oppsamler	20
4.3	Identifikasjon av B-trusselstoffer	23
4.3.1	PCR instrumenter produsert for feltbruk	25
4.3.2	Immunologiske analyser	26
4.3.3	Microarrays	28
5	MIKROBRIKKETEKNOLOGI	33
6	NANOTEKNOLOGI	33
7	BIOSENSORER	34
8	INTEGRERTE DETEKTORSYSTEMER	37
8.1	Integrerte systemer for militær bruk	37
8.2	Sivile integrerte systemer	41
9	FREMTIDENS TEKNOLOGI	42
10	KONKLUSJON	43
11	REFERANSER	44





## PÅVISNING AV BIOLOGISKE TRUSSELSTOFFER - ET STUDIUM AV TEKNOLOGIER OG METODER FOR BRUK I FORSVARET

### 1 SAMMENDRAG

Denne rapporten beskriver ulike metoder for deteksjon og identifikasjon av biologiske (B) trusselstoffer og er et teknologispill til Forsvarsstudie 2007. Dette arbeidet er et begrenset studium av teknologier og metoder for bruk i Forsvaret for påvisning av B-trusselstoffer. De fleste teknologiene er også anvendelige for det sivile samfunnet. Eksempler på forskjellige metoder og utstyr er gitt i rapporten for å belyse hvor langt den teknologiske utviklingen har kommet. Det gis ingen anbefalinger for valg av utstyr da dette er avhengig av formål og bruk, og krever omfattende uttesting. Kostnadsberegninger er ikke inkludert i denne rapporten da dette varierer veldig i henhold til formål, instrument, laboratorium og personell. Rapporten definerer hva B-trusselstoffer er og redegjør for hvorfor det kan være vanskelig å påvise slike trusselstoffer.

Utvikling av gode og hurtige påvisningsmetoder for B-trusselstoffer bidrar til å oppnå en effektiv beredskap mot bruken av slike trusselstoffer. Valg av utstyr for påvisning av B-trusselstoffer i en militær sammenheng kan ofte være noe forskjellig fra en sivil situasjon, men mange av komponentene er like. Generelt settes ulike komponenter sammen etter formål og behov for å oppnå ønsket type utstyr. Utstyr for tidlig varsling ("*detect-to-warn*") av et B-angrep er under utvikling og delvis tilgjengelig, men utstyret kan ofte ha begrensninger mht sensitivitet og spesifisitet. Derimot, finnes utstyr og metodikk for rask deteksjon av B-trusselstoffer i ulike prøver mht "*detect-to-treat*" prinsippet. Bioteknologien har hatt en rivende utvikling de siste 20 årene, og det er all grunn til å tro at denne utviklingen vil fortsette. Trenden går mot utvikling av miniatyriserte systemer og såkalte "lab-on-chip" optiske brikker, samt forbedring av sensitivitet og spesifisitet av nåværende identifikasjonssystemer.

## 2 INTRODUKSJON

Biologiske (B) trusselstoffer omfatter levende mikroorganismer (bakterier, rickettsier<sup>1</sup>, virus, sopp) og toksiner (giftstoffer) som kan forårsake sykdom eller død hos mennesker, dyr og planter (Atlas, 2002). Toksinene kan produseres av levende organismer eller fremstilles industrielt. B-trusselstoffer inkluderer også bioregulatorer som kan endre kroppens fysiologiske tilstand, for eksempel blodtrykk og smertefølelse. Tabell 2.1 viser en inndeling av biologiske- og kjemiske (C) trusselstoffer i henhold til Biologi- og Kjemivåpenkonvensjonen. B-våpen er definert som et B-trusselstoff og dets leveringsmiddel (f.eks. bombe, missil, spraytanker). For å konstruere et effektivt B-våpen kreves det detaljert kunnskap om bl.a. produksjon, stabilitet, overlevelse, spredning og levering av B-trusselstoffene.

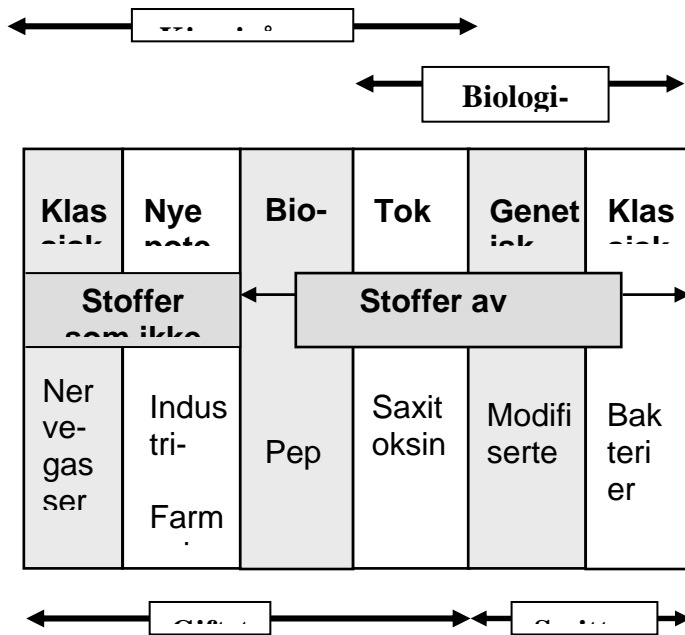
Det finnes flere potensielle B-trusselstoffer (tab. 2.2), og valg av mikroorganismer for B-krigføring og/eller B-terrorhendelser er avhengig av terroristenes motivasjon, hensikt og mulighet. Mange trusselstoffer er ikke smittsomme mellom mennesker. Noen er zoonotiske<sup>2</sup> og/eller finnes naturlig i miljøet. De tidligere B-våpenprogrammene i USA og Sovjetunionen har vist at mange av B-trusselstoffene kunne lages i form av aerosoler for å oppnå effektiv spredning og enkel smitte via inhalasjon. Produksjon av B-trusselstoffer foregår etter ”dual-use” prinsippet. Utstyr som kan benyttes til produksjon av B-trusselstoffer brukes legalt innenfor farmasøytisk industri, meieri- og bryggeriproduksjon og bioteknologisk industri, såkalt ”dual-use” utstyr.

Ved bruk av B-trusselstoffer i krigføringssammenheng er det ofte statlige aktører som står bak slike hendelser. Utvikling av B-våpen ble et satsningsområde i flere land etter 2. verdenskrig. USA, Storbritannia, Japan og Sovjetunionen, samt Irak, hadde alle statlige B-våpenprogrammer. Biologi- og toksinvåpenkonvensjonen, som forbyr utvikling, produksjon og lagring av B-våpen, ble fremforhandlet i 1972, med virkning fra 1975. I dag er det 154 medlemsland som har ratifisert avtalen og 16 land som har signert men ikke ratifisert. Allikevel er det land som fremdeles mistenkes for produksjon av B-våpen. I 1992 innrømmet President Jeltsin at utslippet av *Bacillus anthracis* sporer i Sverdlovsk i 1979, hvor 66 mennesker døde, kom fra en militær forskningsstasjon for utvikling av B-våpen (Meselson et al., 1994). Etter oppløsningen av Sovjetunionen ble et omfattende og offensivt B-våpenprogram avslørt. Sovjetunionen arbeidet bl.a. med å konstruere antibiotika resistente stammer av *B. anthracis* (anthrax), *Yersinia pestis* (pest) og *Francisella tularensis* (harepest), multiresistente *Burkholderia mallei* (snive) og *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis) og nye virulente stammer av *F. tularensis* og *Y. pestis*. FN's spesialkommissjon (UNSCOM) avdekket på 1990-tallet at Irak hadde et aktivt biologisk våpenprogram med blant annet produksjon av anthraxbakterier, botulinum- og aflatoksiner. Irak erkjente produksjon av 8500 liter anthraxbakterier og 19 000 liter botulinumtoksin (Aas, 1997).

<sup>1</sup> Rickettsier: Obligate intracellulære parasitter som er sykdomsfremkallende.

<sup>2</sup> Zoonotisk : smitte fra dyr til mennesker

Tabell 2.1. Inndeling av biologiske og kjemiske trusselstoffer i henhold til Biologi- og Kjemivåpenkonvensjonen.



Spredning av anthraxpulver via brev og gjennom postfordelingssystemet i USA 2001 viste seg å være meget effektivt mht infeksjon via inhalasjon. Hendelsen førte til 22 sykdomstilfeller (11 med hudanthrax, 11 med lungeanthrax) hvorav 5 døde, og mer enn 30 000 ble behandlet med antibiotika (Jernigan et al., 2002, Inglesby et al., 2002). Noen av årsakene til økt fokus på anthrax er at *B. anthracis* danner sporer som er meget stabile og har en overlevelsestid > 80 år. Inhalasjon av sporer kan føre til lungeanthrax som har høy dødelighet hvis infeksjonen ikke blir behandlet. Pulveret med anthraxsporer viste seg å inneholde tilsetningsstoffer (trolig silika) for å gjøre sporene antistatiske og lette spredningen av partiklene, samt et stoff for å oppnå bedre binding av silika til sporenes overflate (Matsumoto, 2003). Det ble hevdet at slik kunnskap bare kunne komme fra eksperter med kjennskap til B-våpenproduksjon. Bakteriestammen benyttet i angrepet ble identifisert som Ames, en virulent<sup>3</sup> stamme som ble benyttet i det amerikanske B-våpenprogrammet (Keim et al., 2000, Read et al., 2002, Fraser, 2004).

<sup>3</sup> Virulens: Et smittestoffs (her B-trusselstoff) evne til å fremkalle sykdom.

Det finnes en rekke eksempler på B-sabotasje utført av enkeltmennesker eller gruppe. I løpet av perioden 1960-1999 var det 209 tilfeller av B-terrorhendelser inkludert trusler om bruken av slike stoffer (Melin, 2000). Kun 14 av disse har vært ”vellykkede”. I disse hendelsene ble det benyttet HIV infisert blod, ricin, eller infisert vann og mat. I 1984 benyttet den religiøse Rajneesh sekten *Salmonella* spp. for å kontaminere mat i en salatbar i Oregon i USA, hvor 750 mennesker ble syke (Török et al., 1997). Det tok over ett år før det ble avdekket at dette var en bevisst terrorhendelse, og det skjedde etter tilståelse fra en av medlemmene i sekten. I 1996 ble 12 personer forgiftet av muffins som inneholdt *Shigella dysenteriae* ved St. Paul Medical Center i Dallas, USA (Kolavic et al., 1997). En tidligere kvinnelig ansatt hadde tilgang til de nedfrosne kulturene av *S. dysenteriae* som ble benyttet i angrepet.

Tabell 2.2. Potensielle B-trusselstoffer<sup>4</sup>.

Mikroorganisme	Sykdom	Dødelighet (ubehandlet)	Inkubasjonstid <sup>5</sup>	Infeksiøs dose <sup>6</sup>
<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrax (miltbrann)	Høy	1-6 d	8.000-50.000 sporer
<i>Yersinia pestis</i>	Pest	Høy	2-3 d	100-500 cfu
<i>Francisella tularensis</i>	Tularemi (harepest)	Moderat	2-10 d	10-50 cfu
<i>Coxiella burnetii</i>	Q-feber	Lav	10-40 d	30-3.000 cfu
<i>Brucella</i> spp.	Brucellose	Lav	5-60 d	10-100 cfu
<i>Burkholderia mallei</i>	Snive	Moderat	10-14 d	Antatt lav
<i>Vibrio cholerae</i>	Kolera	Moderat/høy	4 t-5 d	10-500 cfu
<i>Rickettsia prowazek</i>	Epidemisk tyfus	Høy	8 d – 16 d	
<i>Variola major</i>	Kopper	Høy	7-17 d	10-100 pfu
<i>Filovirus</i> (f eks Ebola, Marburg)	Viral blødningsfeber	Høy	4-21 d	1-10 pfu
Venezuelan Equine Encephalitis (VEE)	Encefalitt	Lav	1-5 d	10-100 pfu
<i>Clostridium botulinum</i> <sup>7</sup>	Botulisme	Høy	1-5 d	0,003µg/kg (LD <sub>50</sub> for typeA)
Ricin (toksin)		Høy	18-24 t	3-5 µg/kg LD <sub>50</sub> i mus
Aflatoksin	Carcinogen Forgiftning	Moderat/Høy		9000 µg/kg

<sup>4</sup> Data er hentet fra Kortepeter et al. (2001) og Andersen (2005).

<sup>5</sup> Avhengig av dose, d: dager, t: timer.

<sup>6</sup> LD<sub>50</sub>: Dose som gir død for 50 % av individer som eksponeres, cfu: colony forming units, pfu: plaque forming units.

<sup>7</sup> Toksinene fra *C. botulinum* er B-trusselstoffer.

### 3 UTFORDINGER VED B-VERIFIKASJON

Historisk sett har det vært større fokus på C-trusselstoffer enn B-trusselstoffer mht bruk, beskyttelse, medisinsk behandling, deteksjon og verifikasjon. Dette skyldes trolig at trusselen om bruken av B-trusselstoffer har ikke vært vurdert som like stor og sannsynlig som bruken av C-trusselstoffer. Dette har endret seg, og flere eksperter med både sikkerhetspolitisk- og fagkompetanse har uttalt at bruken av B-trusselstoffer er en av de største globale truslene, til tross for at infeksjonssykdommer som malaria, tuberkulose og AIDS dreper flere millioner mennesker hvert år. Spesielt etter Gulf krigen (1990), avsløringen av B-våpenprogrammet i tidligere Sovjetunionen (1992), Iraks deklarasjon av B-våpen (1994) og anthraxbrevene i USA (2001), har både militære enheter og sivile instanser hatt økt fokus på B-trusselen. Dette har ført til noe økte bevilgninger fra nasjonale myndigheter for å bedre den sivile beredskap mot B-terror. Internasjonalt har det vært en kraftig økning i bevilgninger til både sivile og militære forskningsinstitutter for utvikling og forbedring av B-deteksjonsutstyr.

B-trusselstoffer er isolater av organismer som finnes naturlig. B-trusselstoffer skiller seg fra andre trusselstoffer fordi de er levende organismer som forårsaker infeksjoner. Slike sykdommer har fulgt menneskene til alle tider og finnes i et stort mangfold i naturen. *B. anthracis* er naturlig forekommende bl a i Russland, Midtøsten og Canada (såkalt endemisk). *F. tularensis* (harepest) finnes mange steder i Europa, bl a i Norge. Å skille mellom et naturlig utbrudd og et intensjonelt angrep kan i mange tilfeller være vanskelig, og kilden for et utbrudd må lokaliseres for å kunne fastslå dette. Bakterier og andre mikroorganismer vil med tiden (evolusjon) endre noen av sine egenskaper, f eks for å bedre sin overlevelse. Nye arter vil oppstå som et resultat av den naturlige utviklingen. Slike nye patogene mikroorganismer som utgjør en global trussel kan f eks være SARS virus, Hendra virus og ”avian flu” virus (fugleinfluenzavirus) eller mikroorganismer som oppstår i ny form som f eks West Nile virus og multiresistent *Mycobacterium tuberculosis* (tuberkulose).

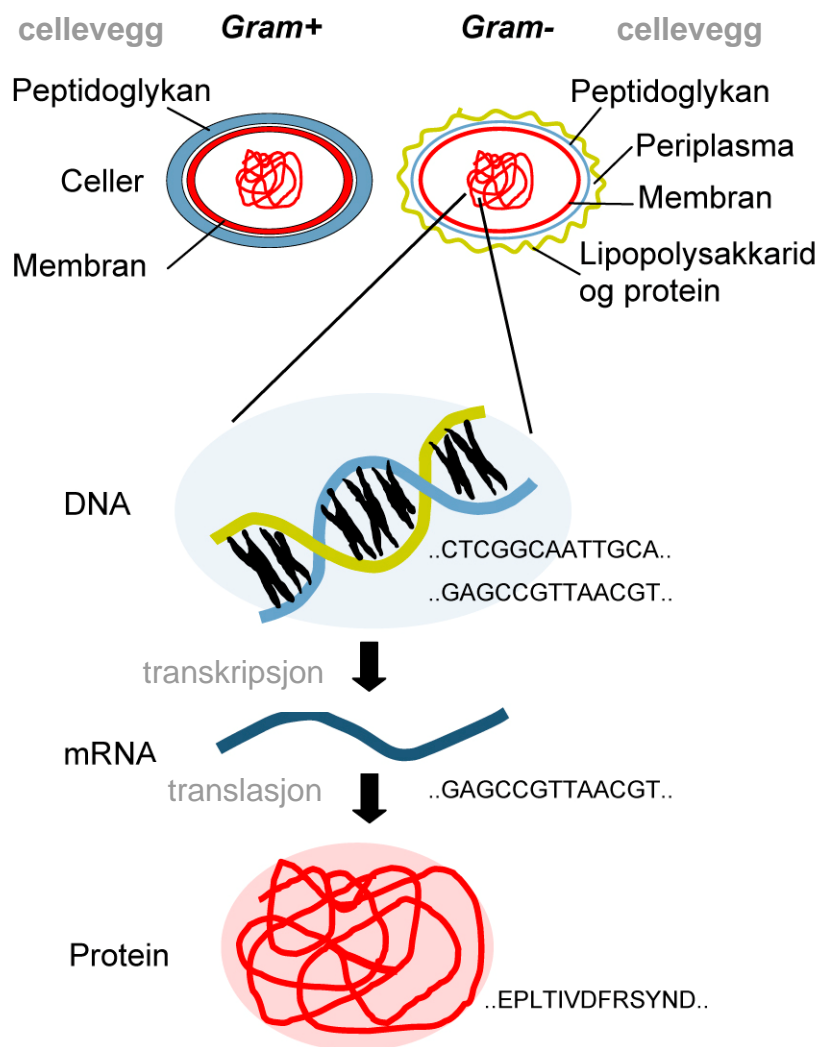
Det naturlige miljøet inneholder kjente og ukjente mikroorganismer. En mikroorganisme kan endre sitt livstadium avhengig av ernæringsstatus, f eks levende *B. anthracis* bakterieceller kan danne sporer i næringsfattige områder. Noen B-trusselstoffer har nært beslektede organismer i det naturlige miljø. Denne komplekse biologiske bakgrunnen krever at påvisningen er veldig selektiv slik at B-trusselstoffer kan differensieres fra annet harmløst materiale. B-trusselstoffer er sammensatt av en rekke ulike organiske forbindelser som proteiner, karbohydrater, lipider og DNA/RNA (fig 3.1). Ved immunologiske eller genetiske påvisningsmetoder benyttes hhv spesifikke proteiner eller DNA til den enkelte mikroorganismen for identifisering. Det er derfor nødvendig med kunnskap om genomet (DNA sekvensen) til mikroorganismen, samt dens fysiologi. I henhold til NATO-dokumentet, AEP10<sup>8</sup>, skal det benyttes tre forskjellige uavhengige metoder for *verifikasjon* av B-trusselstoffer; genetiske, immunologiske og biokjemiske/mikrobiologiske metoder.

<sup>8</sup> AEP10: NATO Handbook for sampling and identification of B and C agents.

Forekomsten av et B-trusselstoff er ikke nødvendigvis bevis på en B-terrorhendelse. Et mistak her kan føre til unødvendige falske alarmer og feil bruk av ressurser, samt store økonomisk konsekvenser. For verifikasjon av et potensielt B-angrep bør mistenkelige sykdomsutbrudd kunne spores til miljøisolater eller andre kilder som gjøres vha DNA-fingeravtrykksmetoder (genotyping). Slike metoder må også benyttes til å skille nært beslektede bakteriestammer som gjennom evolusjonsprosessen har utviklet seg innenfor en felles art. Slike stammer kan ha forskjellige virulensegenskaper. FFI har etablert genetiske fingeravtrykksmetoder for genotyping.

Både for identifikasjon og verifikasjon er prøvetaking og analyse av ulike kliniske- og miljøprøver viktig. Type prøve, enten klinisk (blod, vev), miljø (vann, luft, jord) eller mat, samt prøveprosesseringsprosessen er avgjørende for valg av riktig utstyr og metodikk. Disse faktorene kan påvirke resultatet av analysene. Formålet med analysene bidrar også til dette valget. Ved f eks en aerosolspredning av B- og C-trusselstoffer vil dråper av C-trusselstoffene fordampe og kunne detekteres direkte med håndholdte detektorer. B-aerosolene vil også kunne fordampe, men dampen kan ikke måles på tilsvarende måte som for C-trusselstoffene. B-partiklene vil etter hvert falle ned og deponeres i miljøet. Derfor er det ofte nødvendig at miljøprøver, som kan være kompliserte matrikser (f eks jord), analyseres for innhold av B-trusselstoffer. Håndtering og opparbeidelse av slike prøver kan være krevende mht tid og utførelse, noe som kan hindre en rask identifikasjonsanalyse. FFI har en forskningsaktivitet på prosessering og analyse av miljøprøver (vann, luft). På grunn av det store mangfoldet av mikroorganismer som finnes i naturen (luft, vann, jord) kreves kompetanse for tolkning av deteksjons- og identifikasjonsdata.

B-trusselstoffer kan opptre i meget lave konsentrasjoner og likevel være farlige. Dette setter høye krav til påvisningsutstyrets sensitivitet. De kliniske symptomene ved eksponering for B-trusselstoffer opptrer etter en gitt inkubasjonstid (tab 2.2). For C-trusselstoffer opptrer symptomene nærmest momentant etter eksponering. Dette kan føre til at nødvendig beskyttelse og medisinsk behandling ikke initieres raskt nok ved eksponering mot B-trusselstoffer. De fleste C-trusselstoffer, også i dødelige doser, kan analyseres direkte med håndholdte detektorer i sanntid (Tørnes et al, 2005). Dette fører til at verneutstyr kan tas i bruk før en evt eksponering for slike doser. Generelt, så har den teknologiske utviklingen av varslingsystemer og detektorer for C-trusselstoffer kommet lenger enn for B. Deteksjon av C-trusselstoffer på laboratoriet og i felt anses for å være enklere enn deteksjon av B-trusselstoffer. Ved C-deteksjon, foretas målinger av en gass/damp blanding fra C-trusselstoffet som vanligvis befinner seg i væskeform ved romtemperatur (væske → damp). Med dagens B-deteksjonsutstyr, følger man ofte prinsippet "*detect-to-treat*". Utstyr for "*detect-to-warn*" prinsippet er fremdeles under utvikling, men noe finnes kommersielt tilgjengelig. Dette gjelder for analyse av luftprøver. Det er viktig at en "falsk trygghets" situasjon ikke skapes. Optimalt B-deteksjonsutstyr for militær bruk bør være robuste og lettanvendelige systemer. De fleste slike systemer krever innsikt i faget og bruken av utstyret, men det finnes noe utstyr til bruk for et "ikke-trenet øye". I en feltoperasjon enten nasjonalt eller internasjonalt er det hovedsakelig veterinærer og medisinsk personell som er ansvarlige for testing og opprettholdelse av hygiene, mat, vann og miljø.



Figur 3.1. Skjematisk fremstilling av en Gram-negativ (Gram-) og en Gram-positiv (Gram+) bakteriecelle og dannelse av protein fra DNA<sup>9</sup> via RNA<sup>10</sup>.

<sup>9</sup>DNA : deoksyribonukleinsyre

<sup>10</sup>RNA : ribonukleinsyre, mRNA : messenger RNA

## 4 UTSTYR FOR DETEKSJON OG IDENTIFIKASJON AV B-TRUSSELSTOFFER

I en fiktiv situasjon med utslipp av B-trusselstoffer i form av aerosoler er det ønskelig å kunne oppnå en tidlig varslings ("detect-to-warn"). Dette kan tildels oppnås for analyse av B-partikler i luft. Selv om noe utstyr er tilgjengelig, er dette utstyret begrenset mht analysekapasitet, rekkevidde, spesifisitet og sensitivitet. B-deteksjonssystemer for analyse av luft inneholder generelt fire enheter; i) et trigger system, ii) en oppsamler, iii) en detektor og iv) et identifiseringssystem (fig 4.1). En trigger er vanligvis en partikkelanalysator som kan indikere type, mengde, størrelse og form av partikler tilstede (kap 4.1). En endring i partikkelsammensetningen kan indikere behov for en videre og mer detaljert analyse av luftprøven. Luft blir konsentrert og samlet vha en lufthøster (kap 4.2). Luftprøven, som vanligvis er i væskeform, blir analysert for innhold av B-trusselstoffer og de gitte trusselstoffene blir videre identifisert (kap 4.3). I mange tilfeller er trigger og detektorenheten overlappende mht funksjon, da både detektoren og triggeren kun kan differensiere mellom biologiske og ikke-biologiske partikler i prøven. Et fåtall integrerte identifiseringssystemer er tilgjengelige, hvor både prøvetaking og identifikasjon foregår automatisk.

God prøvetaking og riktig prøveoppbehandling er viktig for resultatet av deteksjons- og identifikasjonsanalysen. Vanligvis er prøvetaking og oppbehandling separert fra påvisningsdelen. Tilgjengelige deteksjons- og identifikasjonssystemer er generelt testet for *B. anthracis* eller *B. anthracis*-simulanter (BG-sporer<sup>11</sup>). Simulanter for levende celler, virus og toksiner er hhv *Erwinia herbicola*, MS2 og ovalbumin.

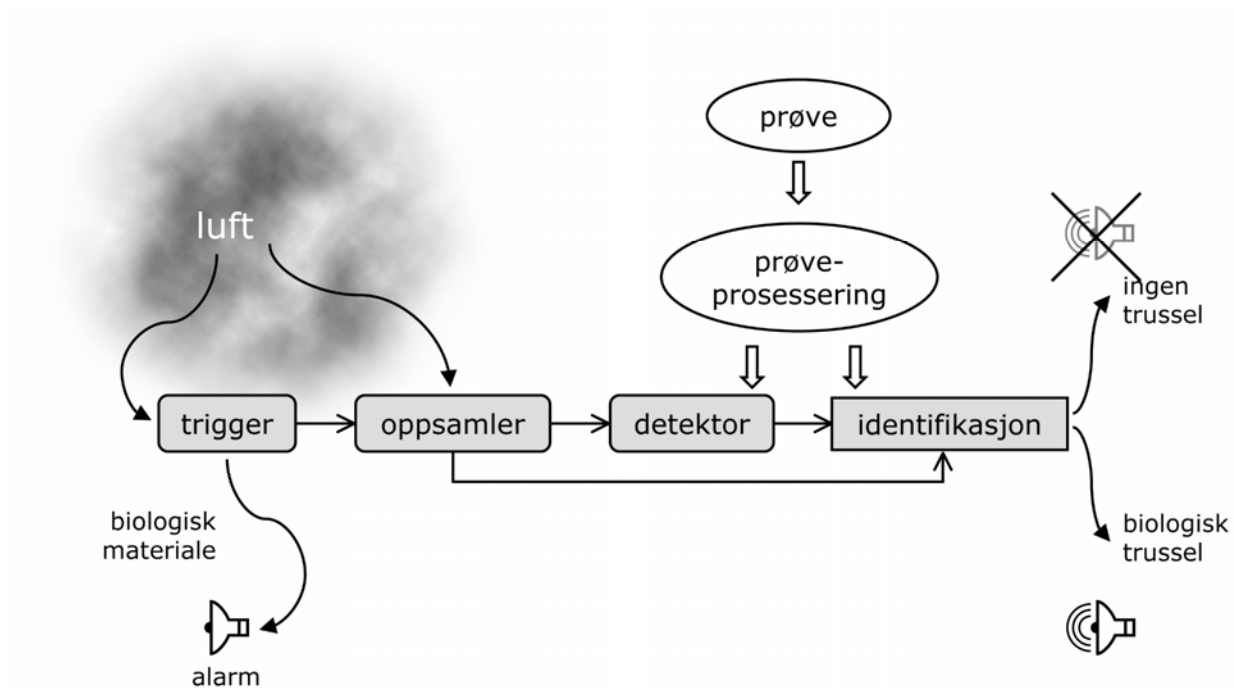
En oversikt over ulike instrumenter er gitt i Fruchey og Emanuel (2005), Wästerby et al., 2003 og Lim et al., 2005. Nedenfor følger en kort beskrivelse av ulike deteksjons- og identifikasjonsmetoder og noen eksempler på utstyr.

Det er viktig å skille mellom betegnelse deteksjon og identifikasjon. Ofte er det snakk om spesifikk og ikke-spesifikk deteksjon, hvor spesifikk deteksjon tilsvarer identifisering av trusselstoffet.

Tabell 4.1 gir en oversikt og pris på ulike kommersielle instrumenter beskrevet nedenfor for påvisning av B-trusselstoffer. Tilgjengelige kommersielle etablerte analyser for påvisning av B-trusselstoffer for noen av instrumentene er oppsummert i tabell 4.2.

<sup>11</sup> BG-sporer: Sporer av *Bacillus globigii*, en simulant for *B. anthracis* sporer.





Figur 4.1. Et deteksjonssystem for påvisning av B-trusselstoffer i luft består vanligvis av flere enheter; trigger, oppsamler, detektor og identifiseringsenhet.

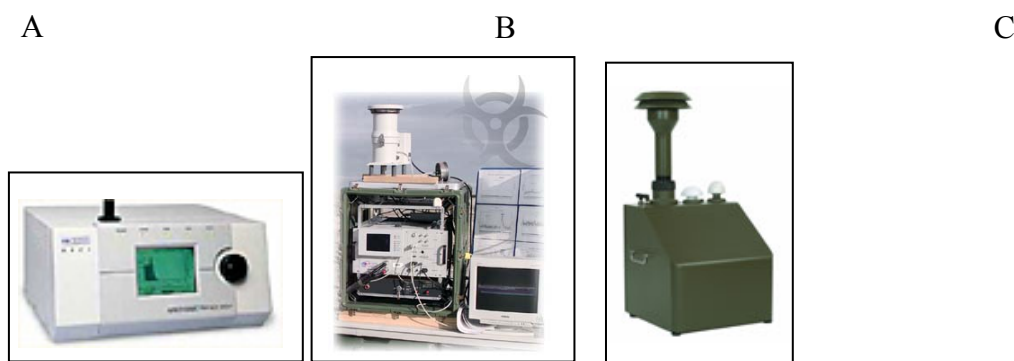
Tabell 4.1. Oversikt over tilhørende kategorier av noen utvalgte kommersielle instrumenter for påvisning av B-trusselstoffer (se også fig 4.1). Instrumentene er kort beskrevet i denne rapporten.

Instrument	Type instrument						
	Produsent	Trigger	Oppsamler	Detektor	Identifikasjon	Integrerte systemer	Pris (1000) NOK (eksl moms)
FLAPS 2	TSI	X		X			
3321 APS	TSI	X					320
UVAPS 3314	TSI	X		X			800
VeroTect	Biral			X			
CFAD	Biotrace International			X			
Microcyte	BioDetect			X			280
Miniflow	Lawrence Livermore National Laboratory			X			
ICAS	Biotrace International		X				
BBDS	Biotrace International		X	X			800
XXM/2A	Dycor		X				
BioCapture	Mesosystems		X				
BioBadge	Mesosystems		X				
SpinCon®	Sceptor Industries		X				350
OMNI 3000	Sceptor Industries		X				100
SASS 2000	Research International		X				100
LightCycler PCR	Roche				X		300
SmartCycler PCR	Cepheid				X		300
GeneExpert	Cepheid				X		700
R.A.P.I.D	Idaho Technologies				X		480
RAZOR	Idaho Technologies				X		320
Bio-Seqq	Smiths Detection				X		240
Sector Imager 6000	Meso-Scale Discoveries				X		2 000
Luminex <sup>100</sup> Analysis System	Multimetrix GmbH				X		250
M1R	BioVeris Corporation				X		400
M384	BioVeris Corporation				X		800
Molecular biology workstation	Nanogen				X		1 300
Portable molecular biology work station	Nanogen				X		
APSYS	Bruker Daltronics				X		
RAPTOR	Naval Research Laboratory				X		400
NRL Array Biosensor	Naval Research Laboratory				X		100
QTL Handheld Biosensor	QTL Biosystems				X		
Bio Threat Alert	Tetracore Inc				X		
BIDS	USA					X	
JPBDS	USA					X	
IBIDS	England					X	
CIBADS II	Canada					X	
NBCerburus	Smiths Detection					X	
APDS	Lawrence Livermore National Laboratory					X	

#### 4.1 Deteksjon av B-trusselstoffer

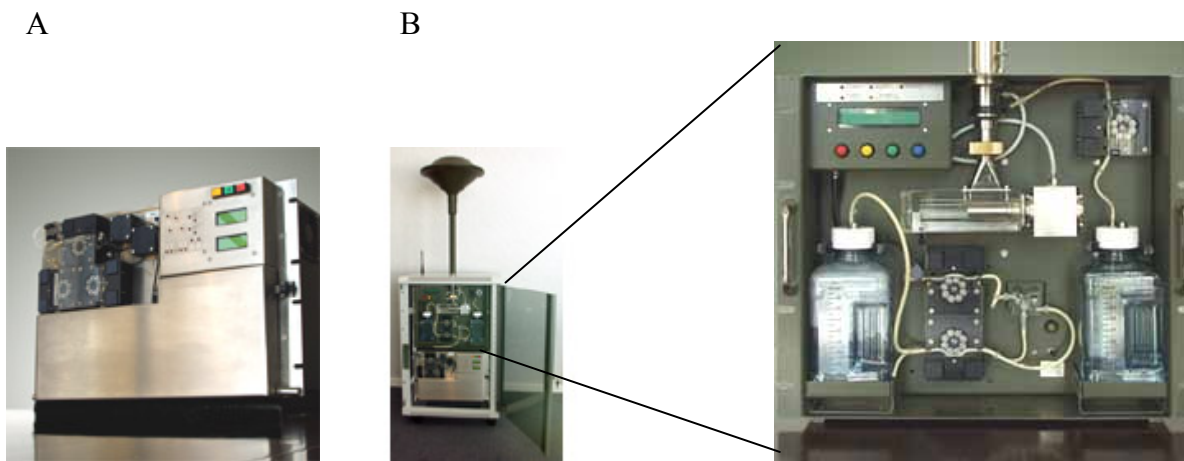
Deteksjon av antall, størrelse og form på partiklene i luft kan gjøres ved å bruke en partikkelanalysator; en trigger (fig 4.1). Lys som treffer en partikkel spres på en karakteristisk måte avhengig av størrelse og form på partikkelen. Fluorescens innebærer at molekyler eller levende mikroorganismer som er eksponert for lys av en viss bølgelengde (UV-lys) sender ut lyset ved en annen bølgelengde. Instrumenter av denne typen vil gi en alarm hvis en oppkonsentrering av partikler av en bestemt størrelse og form detekteres. Stand-off (avstands) deteksjon kan også benyttes som en trigger for tidlig varslings. Denne formen for deteksjon er beskrevet i FFI rapporten av Rustad og Gran (2006).

*FLAPS 2* (Fluorescence Aerodynamic Particle Sizer) fra TSI er en partikkelanalysator med en analysekapasitet på 1 liter luft per minutt. Den kan telle partikler i størrelsesorden 1,5 til 15  $\mu\text{m}$  og detektere levende mikroorganismer. TSI tilbyr flere partikkeltellere egnet for innendørs omgivelser. Andre eksempler på partikkelanalysatorer fra TSI er UVAPS 3314 og Modell 3321 APS og VeroTect fra Biral (fig 4.2).



*Figur 4.2. Partikkelanalysator TSI Modell 3321 APS (A) og FLAPS 2 (B) (foto A og B: <http://www.tsi.com>) og VeroTect (C) (foto: <http://www.biral.com>) for deteksjon av B-trusselstoffer.*

Levende mikroorganismer i aerosolform kan påvises vha UV lys (som beskrevet ovenfor) og vha bioluminescens. Bioluminescens er basert på deteksjon av ATP<sup>12</sup> som finnes i alle levende organismer (ikke virus). Continuous Flow ATP Detector (CFAD) (fig 4.3) benytter denne metoden for deteksjon av levende mikroorganismer i en væskeprøve. Med CFAD er det mulig å skille bakterielt ATP fra ”bakgrunns ATP”. ATP reagerer deretter med et enzym som produserer luminescens. Slike reaksjoner er svært følsomme og gjør bioluminescens-metoden veldig sensitiv. For kontinuerlig måling av bakterielt ATP i luften kan CFAD kombineres med en lufthøster (kap 4.2). Ved bruk av spesifikke lytiske bakteriofag enzymer eller antistoffer kombinert med bioluminescens-metoden kan denne analysen gjøres mer spesifikk.



Figur 4.3. ATP-detektorer. Continuous Flow ATP Detector (CFAD) (A) og Biotrace Biological Detection System (BBDS) (B) fra Biotrace International, UK (foto: <http://www.biotrace.co.uk/>).

<sup>12</sup> ATP: adenosin 5' trifosfat. ATP produseres under energimetabolismen i alle levende organismer (ikke virus).

#### 4.1.1 Flowcytometri

Flowcytometri er en teknikk hvor celler eller partikler i en væske blir analysert i det prøvematerialet passerer forbi en laser eller diode. Lysspredningen fra partiklene (avhengig av partiklenes størrelse, form, brytningsindeks) måles med en detektor etter at lysstrålen har passert væskestrømmen. Identifikasjon og kvantifisering er mulig ved bruk av bestemte fluorescensmerkede antistoff som bindes til partiklene. Denne metoden kan benyttes til å skille levende celler fra døde og for å differensiere mellom biologiske partikler og ikke-biologiske partikler. Flowcytometri benyttes ofte i integrerte detektorsystemer hvor luften blir kontinuerlig overvåket (kap 8).

*Microcyte* fra BioDetect er et robust system spesielt utviklet for analyse av bakterier i felt (fig 4.4). Systemet detekterer og kvantifiserer celler i størrelsesorden 0,4-15  $\mu\text{m}$ . Lyskilden er en diodelaser (650-900 nm), vekten er ca 12 kg og analysetiden er ca 10 minutter avhengig av prøvens konsentrasjon. FFI har hatt instrumentet til uttesting, og deteksjonsgrenser for B-simulanter ble estimert til  $10^3$ - $10^4$  celler/ml (Gran et al., 2002).

*Miniflow* er et miniaturisert flowcytometer utviklet av Lawrence Livermore National Laboratory. I motsetning til vanlige flowcytometre krever ikke dette instrumentet tilførsel av væske for å fokusere prøvestrømmen forbi lyskilden. Dette er en stor fordel hvis systemet skal operere ubemannet. En optisk sensor detekterer lysspredning fra partiklene, og instrumentet er 10 x mer sensitivt enn andre tilsvarende konvensjonelle detektorer. Instrumentet benytter en såkalt grønn laser (HeNe), er 36  $\text{cm}^3$  stort, veier 15 kg og krever 1 kW effekt.



Figur 4.4. Flowcytometeret *Microcyte* fra BioDetect (foto: <http://www.biodetect.biz/>).

## 4.2 Oppsamler

Partikler i luft kan konsentreres og samles ved hjelp av en lufthøster. Oppsamlingen kan skje fra luft til luft, luft til væske og fra luft til en overflate. Sistnevnte f eks vha en agarskål som inneholder vekstmedium for oppdyrking av mikroorganismene. I slike tilfeller kan det benyttes en ”slit sampler” hvor en strøm av luft føres ned på en agarskål med vekstmedium. Partikler fra luft oppkonsentreres vha av en impaktor eller en impinger. I en impinger blir partiklene fra lufta ”kastet inn” i væsken, mens i en impaktor blir partiklene absorbert av væske. Sistnevnte anses som en mer skånsom metode. Effektiviteten av oppkonsentreringen er avhengig av partiklenes størrelse. Generelt kan lufthøstere samle opp partikler i størrelsesorden 1- 20  $\mu\text{m}$ . Partikler i størrelsesorden 0,5 – 3  $\mu\text{m}$ , som ved inhalasjon føres ned i lungene, vil forårsake størst skade ved et B-aerosol angrep. Luft- eller væskeprøver kan videre analyseres for tilstedeværelse av B-trusselstoffer vha PCR eller immunologiske metoder. Siden B-partikler i luft ofte aggregeres eller bindes til andre partikler i luften (f eks støvkorn) benyttes ofte uttrykket ”Agent Containing Particles Per Liter of Air” (ACPLA). En av de største utfordringene ved lufthøsting er å samle opp store nok mengder luft for deteksjon.

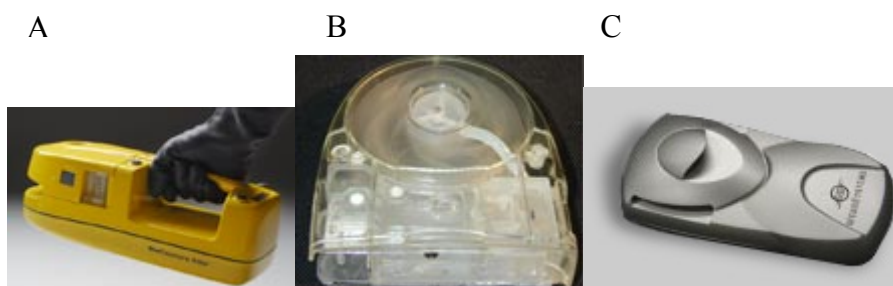
*Biotrace Intelligent Cyclone Air Sampler (ICAS)* høster luft med en justerbar flowrate opp til 750 l/minutt vha av en ”wetted-wall cyclone” til en væskeprøve som kan brukes videre for deteksjon og identifikasjon. Oppkonsentreringsfaktoren er på ca  $10^6$ . ICAS sammen med Continuous Flow ATP Detector (CFAD) utgjør Biotrace Biological Detection System (BBDS) (fig 4.3). BBDS er en detektor for ikke-spesifikk ”real-time” påvisning av B-materiale i luft. Sverige, Canada og England har benyttet BBDS i ulike feltforsøk.

*Dycor XMX/2A* er en konsentrator (impinger) med en flowrate på 600 l/minutt for partikler i størrelsesorden 1 – 10  $\mu\text{m}$ . Den er koblet til en FLAPS (kap 4.1) og et varmeapparat som gjør den egnet til bruk ved temperaturer ned til  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ . *Dycor XMX/2L-MIL* (fig 4.5) er et system egnet til mer robust bruk for militæret og har en flowrate på 800 l/minutt. Den foretar en preseleksjon av partikler slik at kun partikler mellom 1 - 10  $\mu\text{m}$  blir oppkonsentrert. Systemet benytter enten oppsamling av partikler i væske eller på tørr filter. Totalförsvarets forskningsinstitut, FOI, Sverige, har tidligere testet ut XMX/2L-MIL i feltforsøk.



Figur 4.5. Lufthøster Dycor XMX/2 L-MIL for oppsamling av B-partikler ved temperaturer ned til  $-10^{\circ}\text{C}$  (foto: <http://www.dycor.com>).

*BioCapture*® 650 (fig 4.6) utviklet av Mesosystems er en håndholdt batteridrevet lufthøster med flowrate 200 l/minutt for oppsamling av partikler i størrelsesorden  $0,5 - 10 \mu\text{m}$  i en væskeprøve. Det må benyttes skreddersydde oppsamlingspatroner og oppsamlingstiden er opp til 60 minutter. *BioCapture*® 650 sies å være velegnet for såkalte "first responders". Mesosystems har også utviklet en bærbar batteridrevet *BioBadge*<sup>TM</sup> 100 for oppsamling (tørr form) av aerosoler ( $1-10 \mu\text{m}$ ) opp til 9 timer. Personer som oppholder seg i eksponert området kan bære denne oppsamleren på seg (vekt 250 g).



Figur 4.6. Håndholdt lufthøsteren *BioCapture*® 650 (A) med beholdere for oppsamling av luft til væske (B). *BioBadge* (C) er en batteridreven bærbar oppsamler av partikler i luft (foto: <http://www.mesosystems.com>).

*SpinCon*® og *OMNI 3000* (fig 4.7), Sceptor Industries, er impaktorer for oppkonsentrering av luft i en væskeprøve. *SpinCon*® har en kapasitet på 450 l/minutt, høster partikler i størrelsesorden 0,2 til 10 µm. Oppkonsentreringsfaktoren er mellom 225 000 – 16 millioner avhengig av tiden det høstes. *SpinCon*® har vært benyttet ved flere store arrangementer i USA, bl a det amerikanske fotballmesterskapet, Super Bowl, Olympiske leker og Boston Maraton. *SpinCon*® er en del av BioHazard Detection System (BDS) utviklet for det amerikanske postverket, US Postal Service. *OMNI 3000* er en mindre og bærbar lufthøster med en kapasitet på 300 l/minutt. Den benyttes i et integrert system i rekognoseringskjøretøyer og ubemannede kjøretøy for deteksjon av B-trusselstoffer. FFI har benyttet både *SpinCon*® og *OMNI 3000* til høsting av luftprøver for identifikasjon av B-trusselstoffer.

*SASS 2000 Plus*<sup>TM</sup> fra Research International er en impinger og samler opp partikler i størrelsesorden 2 – 10 µm med en flowrate på 225 l/minutt (fig 4.7). Konsentrasjonsfaktoren er på ca 50 000. FFI har tidligere benyttet *SASS 2000 Plus*<sup>TM</sup> i studier av mikrofloraen i luft.



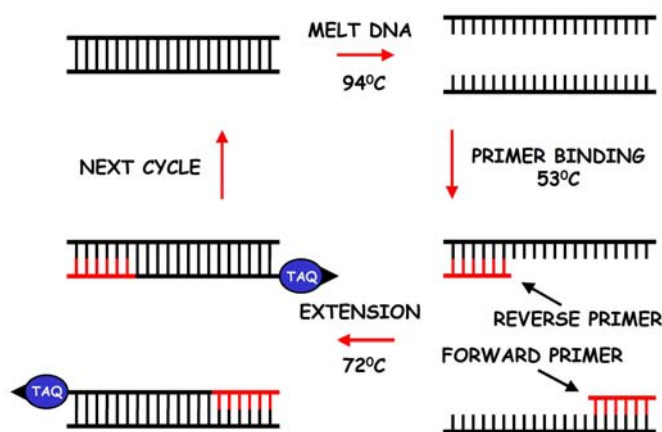
Figur 4.7. Lufthøsterne *SASS 2000 Plus*<sup>TM</sup>, *SpinCon*® og *OMNI 3000* (foto: FFI og <http://www.sceptorindustries.com>).



### 4.3 Identifikasjon av B-trusselstoffer

Biomolekyler som for eksempel arvestoff (DNA), antistoff og ulike reseptormolekyler kan benyttes for identifikasjon. Identifikasjon ved hjelp av DNA og antistoffer forutsetter at det finnes kunnskap om de B-trusselstoffene som skal påvises.

DNA-molekylet består av to komplementære kjeder som danner en dobbelheliks. Sekvensen av nukleotider i et gen bestemmer de unike egenskapene til genproduktet som vanligvis er et protein (fig 3.1). I prinsippet kan alle levende organismer identifiseres på bakgrunn av deres unike DNA-sekvens. Primere og genprober<sup>13</sup> er segmenter av DNA som spesifikt gjenkjenner og binder seg (hybridiserer) til en bestemt DNA sekvens. Primere brukes for amplifisering (mangfoldiggjøring) av DNA eller RNA med PCR<sup>14</sup>. PCR er en etablert, sensitiv molekylærbiologisk metode (fig 4.8) hvor genprober med fluorescerende markører brukes til deteksjon av det amplifiserte produktet (real-time PCR). I teorien kan ett DNA-molekyl detekteres. Prøven varmes opp og avkjøles i sykluser, og for hver syklus doubles mengden DNA. Etter 30 sykluser er det teoretisk 268 millioner DNA-molekyler. Bruk av genprober og PCR til identifikasjon forutsetter at DNA-sekvensen er helt eller delvis kjent. Genomene til 241 mikroorganismer er pr i dag fullstendig sekvensert. Databaser og bioinformatikk benyttes til utvelgelse av spesifikke markørgener og primere/prober for disse. I dag anvendes PCR bl a til påvisning av sykdomsfremkallende mikroorganismer i vann og matforsyninger, dyr, planter, kliniske prøver og av mikroorganismer i luft.



Figur 4.8. Skjematisk fremstilling av DNA-amplifisering vha PCR. En PCR-syklus inneholder tre trinn; i) dobbeltrådet DNA (dsDNA) varmes opp (94°C) til det denatureres (de to trådene separeres), ii) primerne binder seg til enkelttrådet DNA (ssDNA) ved en lavere temperatur (50-65 °C), og iii) enzymet Taq polymerase syntetiserer en komplementær DNA tråd ved å addere nukleotider til primeren (72 °C).

<sup>13</sup> Primer / Gen probe = små ssDNA (enkeltrådet DNA) fragmenter (oligoer) fra en bestemt region av DNA sekvensen.

<sup>14</sup> PCR : polymerase chain reaction

Ved FFI er PCR-teknikken godt innarbeidet og egne applikasjoner for analyse av flere B-trusselstoffer er utviklet og etablert ved hjelp av PCR instrumentene *LightCycler* og *SmartCycler* (fig 4.9). Generelt kan PCR analyser etableres for en hvilken som helst mikroorganisme (og instrument) så lenge DNA sekvensen er kjent evt delvis kjent. Sensitiviteten er avhengig av hvilken reaksjon som kjøres, men under 10 organismer kan ofte detekteres (Fykse et al., 2004). Sensitivitet og spesifisitet er avhengig av primere og prober. For enkelte PCR-instrumenter er det utviklet kommersielle applikasjoner for enkelte mikroorganismer (tab 4.2). Bruk av DNA-baserte metoder krever i de fleste tilfeller omfattende prøveopparbeidelse hvor DNAet blir ekstrahert fra mikroorganismene og forurensinger fjernes.

*Lightcycler* er en real-time PCR thermocycler utviklet av Idaho Technology (overtatt av Roche Applied Science) og 32 prøver kan analyseres samtidig i løpet av ca 30 minutter. En ny modell av *LightCycler* kan analysere opp til 384 prøver samtidig.

*SmartCycler* er et real-time PCR instrument utviklet av Cepheid i samarbeid med det amerikanske forsvaret. Hver blokk kan analysere 16 prøver samtidig, men flere blokker kan kobles sammen. Prøvene analyseres i løpet av 30-40 minutter. *GeneXpert* fra Cepheid er et automatisert real-time PCR-system hvor alle trinn som kreves for analyse og påvisning av DNA er integrert; prøveopparbeidelse, DNA amplifisering og deteksjon av det amplifiserte produktet. *GeneXpert* bygger på samme teknologi som *SmartCycler*, men kun kommersielle applikasjoner kan kjøres på instrumentet (tab 4.2).

A



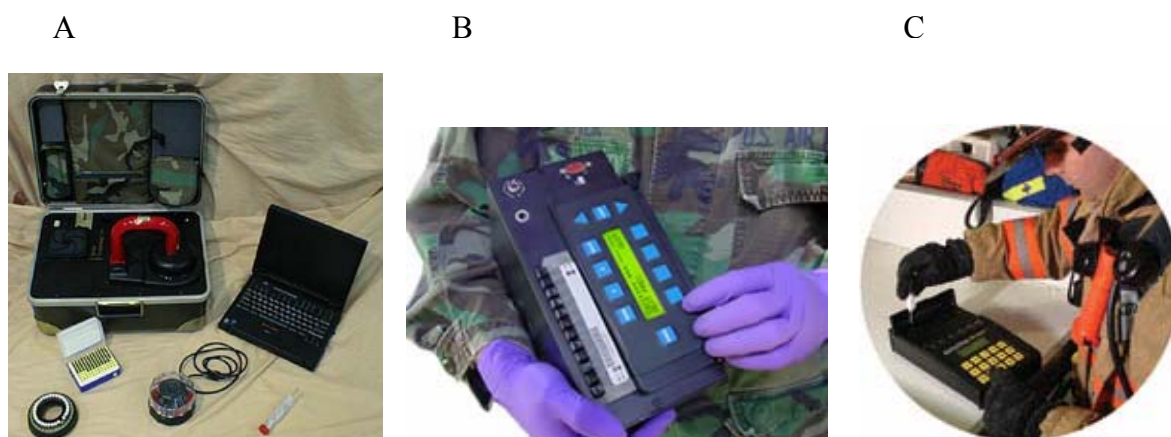
B



Figur 4.9. Real-time PCR instrumentene ved FFI; *LightCycler* (A) og *SmartCycler* (B) (foto: FFI).

### 4.3.1 PCR instrumenter produsert for feltbruk

Nedenfor er det beskrevet et utvalg av PCR hurtiganalysesystemer. Disse kan brukes av ”first responders” og i felt ved ulike militære operasjoner for å gi en indikasjon på hvilket B-trusselstoff som er tilstede. En mer detaljert analyse er nødvendig for verifikasjon. Generelt kreves et prøveopparbeidelsestrinn før PCR hvor DNA blir ekstrahert fra mikroorganismene.



Figur 4.10. Håndholdte og bærbare PCR instrumenter egnet for feltbruk; R.A.P.I.D (A), RAZOR (B) og Bio-Seeq (C) (foto: <http://www.idahotech.com> og <http://smithsdetection.com>).

*R.A.P.I.D* (fig 4.10) er en bærbar real-time PCR thermocycler, en variant av LightCycler, med integrert softwarepakke og kobling til PC. Instrumentet kan analysere 32 prøver på ca 30 minutter. *R.A.P.I.D* er utviklet av American Air Force og Idaho Technology, veier ca 25 kg og kan bæres i en ryggsekk. Sensitiviteten er estimert til 1-1000 cfu/ml.

*RAZOR* (fig 4.10) er en liten batteridrevet real-time PCR thermocycler uten kobling til PC (Idaho Technology). Den veier ca 4 kg og kan analysere 12 prøver samtidig i løpet av 30 minutter. Den er enklere i bruk og de nødvendige reagensene er tilgjengelig i frysetørket form. *RAZOR* er fremdeles under utvikling, men det er etablert hurtigmetoder for de samme B-trusselstoffene som *R.A.P.I.D*.

*Bio-Seeq* (fig 4.10) er en batteridreven bærbar håndholdt PCR maskin utviklet av Smiths Detection (Emanuel et al., 2003). *Bio-Seeq* er en videreutvikling av HANNA (hand-held nucleic acid analyzer) fra Lawrence Livermore National Laboratories. *Bio-Seeq* har en vekt på ca 3 kg og kan analysere 6 prøver samtidig. Analysetiden er ca 20 minutter. Sensitiviteten er på ca 100 – 1000 CFU/ml.

Det er etablert kommersielle analyser for et utvalg av B-trusselstoffer med *R.A.P.I.D*, *RAZOR* og *Bio-Seeq* (tab 4.2).

### 4.3.2 Immunologiske analyser

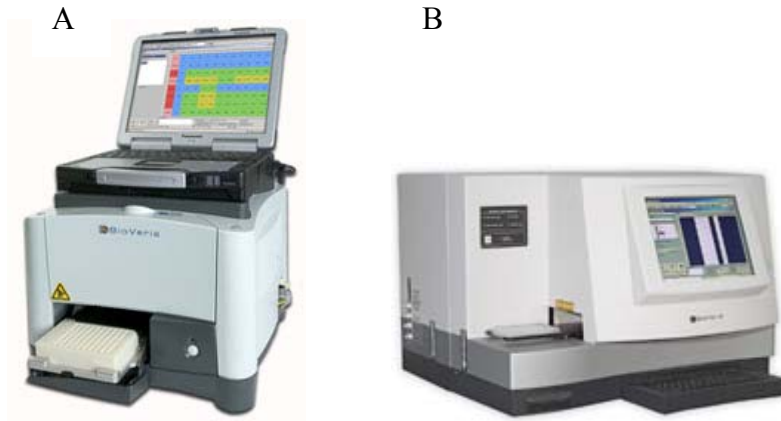
Det finnes en rekke forskjellige immunologiske hurtiganalyser. Tetracore Inc. har utviklet en enkel immunologisk analyse, *Bio Threat Alert*, for påvisning av ni B-trusselstoffer (tab 4.2) i miljøprøver. Prøven appliseres på en teststrip som inneholder de nødvendige reagensene (spesifikke antistoffer). Tilstedeværelse av B-trusselstoffer vises ved hjelp av en fargeindikator. Sensitiviteten er  $> 100\ 000$  cfu/ml.

*Luminex<sup>100</sup> Analysis System* (fig 4.11) fra Multimetrix GmbH er et manuelt immunobasert flowcytometer egnet for diagnostiske laboratorier. Instrumentet kan foreta 100 analyser samtidig. Analysen utføres på overflaten av antistoffbelagte mikrokuler hvor antistoff-antigen bindingen detekteres vha to lasere. Det er utviklet kommersielle testkit for tre ulike B-trusselstoffer (tab 4.2) Analysen tar 30-40 minutter og deteksjonsgrensen er  $> 100\ 000$  cfu/ml.



Figur 4.11. Flowcytometeret *Luminex<sup>100</sup> Analysis System* fra *Multimetrix GmbH* (foto: [www.multimetrix.com](http://www.multimetrix.com)).

*M-SERIES<sup>®</sup> MIR og M384* fra BioVeris Corporation er to analyseinstrumenter basert på elektrokjemiluminescens (ECL) i et flowsystem hvor 96 eller 384 prøver kan analyseres samtidig (fig 4.12). Spesifikke antistoffer er immobilisert på magnetiske kuler eller merket med en ELC markør og bindes til antigenene. Kulene fester seg på en elektrodeoverflate og ELC-markøren sender ut lys som detekteres. Det er ni kommersielt tilgjengelige analyser for B-trusselstoffer (tab 4.2). Deteksjonsgrensen er 100-1000 cfu/ml.



Figur 4.12. Elektrokjemiluminescens instrumenter (ECL) fra BioVeris Corporation; M-SERIES<sup>®</sup> M1M (A) og M-SERIES<sup>®</sup> M384 (B) (foto: [www.bioveris.com](http://www.bioveris.com)).

Sector Imager 6000 fra Meso-Scale Discoveries er et ECL instrument hvor reaksjonen skjer direkte i 96, 384, eller 1536 brønners microtiterplater av karbon som fungerer som elektroder (fig 4.13). Instrumentet er beregnet på storskala analyser ("high throughput") med mulighet for helautomatisering og multiplex reaksjoner. Det er utviklet åtte ulike analyser for B-trusselstoffer (tab 4.2). Deteksjonsgrensen er 100-1000 cfu/ml.

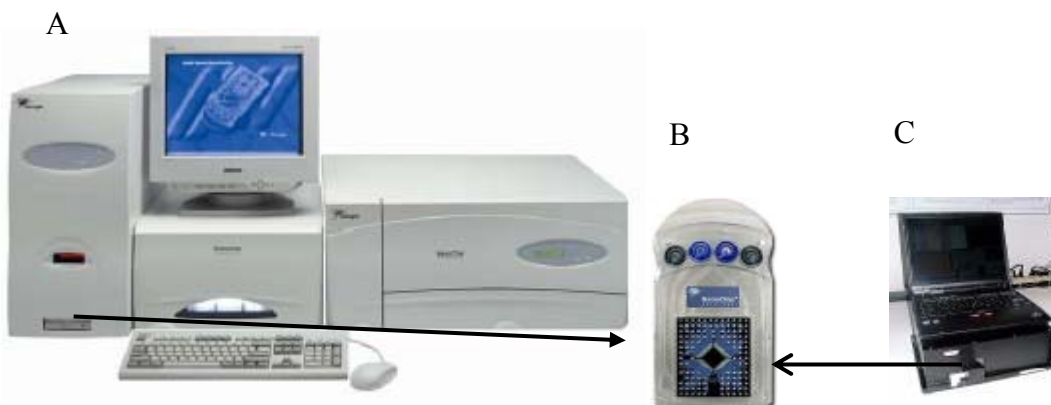


Figur 4.13. ECL instrumentet Sector Imager 6000 fra Meso-Scale Discoveries (foto: [www.meso-scale.com](http://www.meso-scale.com)).

### 4.3.3 Microarrays

Microarray (DNA-mikromatrise teknologi) tillater at flere tusen DNA sekvenser eller gener kan detekteres og analyseres samtidig på en mikrobrikke. Fluorescensmerkede ssDNA<sup>15</sup>-prober er bundet til ulike posisjoner på mikrobrikkens overflate og selve påvisningen skjer ved at komplementære ssDNA bindes til disse probene (hybridisering). Hybridiseringen detekteres ved avlesning av fluorescens og resultatene tolkes vha tilhørende dataanalyser. Denne teknologien har også vært viktig for videreutvikling av biosensorer (kap 7). Microarray teknologien er viktig for studier innen ”genomics” (studier av gener og deres ekspresjon) og ”proteomics” (studier av protein og deres funksjon). Det finnes tilgjengelige microarrays for påvisning av bl a *B. anthracis*, *Y. pestis*, *C. botulinum*, *Brucella* spp. og virus tilhørende orthopox familien (inkluderer koppevirus). To eksempler på kommersielle microarray systemer er beskrevet nedenfor for påvisning av B-trusselstoffer.

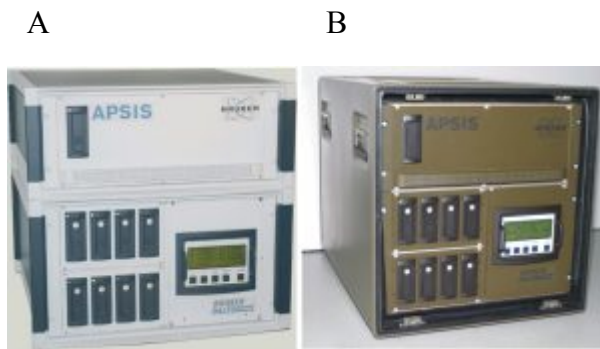
Firmaet Nanogen har utviklet en bioelektronisk brikke, *NanoChip® Electronic Microarray*, der opp til 1200 prøver kan analyseres samtidig (NanoChip cartridge). DNA (eller RNA) fra en mikroorganisme oppkonsentreres vha elektriske felt og hybridiseres til komplementær ssDNA bundet til brikken. Et miniatyrisert automatisert instrument (Portable Molecular Biology Workstation) er utviklet primært for deteksjon av B-trusselstoffer (fig 4.14).



Figur 4.14. *NanoChip® Electronic Microarray for analyse av DNA; Molecular Biology Work station (A), prøver appliseres i NanoChip Cartridge (B), Portable Molecular Biology Workstation (C) (foto: <http://www.nanogen.com/technologies/microarray/>).*

<sup>15</sup> ssDNA: single stranded DNA, dvs enkelttrådet DNA. DNA er en dobbeltrådet heliks.

*Assay Processing and Specific Identification System (APSIS)* fra Bruker Daltronics benytter microarray-teknologien til påvisning av spesifikke B-trusselstoffer (fig 4.15). Instrumentet er produsert for å kunne anvendes i felt. Det finnes applikasjoner for screening og identifikasjon av *B. anthracis* og koppevirus.



*Figur 4.15. Microarray systemet APSIS (A). APSIS beregnet for feltbruk (B) (foto: [http://www.global-defence.com/2003/bruker\\_profile.htm](http://www.global-defence.com/2003/bruker_profile.htm)).*





Tabell 4.2. Oversikt over tilgjengelige kommersielle etablerte analyser for noen av instrumentene beskrevet i denne rapporten.

Instrument	Analyse	Kommersielle analyser for B-trusselstoffer																
		<i>B. anthracis</i>	<i>Y. pestis</i>	<i>F. tularensis</i>	<i>Brucella spp</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>C. burnetii</i>	<i>R. prowazekii</i>	<i>V. cholerae</i>	Orthopox <sup>16</sup> virus	Koppe virus	VEE	MS-2 virus	Dengue fever virus	Ricin	<i>C. botulinum</i>	SEB <sup>17</sup>	Diverse
LightCycler	PCR	X	X	X						X	X					X		
SmartCycler	PCR	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X			Hanta virus
GeneExpert	PCR	X															X	
R.A.P.I.D	PCR	X	X	X	X	X				X		X						
RAZOR	PCR	X	X	X	X	X				X		X						
Bio-Seq	PCR	X	X	X														
Molecular biology workstation	M <sup>18</sup> .array	X	X			X				X								
Portable molecular biology work-station	M.array	X	X			X				X								
APSYS	M.array PCR	X				X				X	X	X						
RAPTOR	Ab <sup>19</sup>	X	X	X	X	X			X			X		X	X	X	X	
NRL Array Biosensor	M.array Ab	X	X	X	X				X					X	X	X	X	Afla toksin
QTL Biosensor	Ab	X												X	X	X		
Bio Threat Alert	Ab	X	X	X	X					X				X	X	X	X	
Sector Imager 6000	Ab	X	X	X		X						X		X	X	X		
Luminex <sup>100</sup> Analysis	Ab	X				X						X						
M-series M1R	Ab	X	X	X		X				X	X			X	X	X	X	
M-series 384 Analyzer	Ab	X	X	X		X				X	X			X	X	X	X	
APDS	Ab/PCR	X	X	X			X					X		X	X	X	X	Marburg virus

<sup>16</sup> Orthopoxvirus: Familie av virus som bl a inkluderer kopper, kukopper, musekopper

<sup>17</sup> SEB: *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B

<sup>18</sup> M.array: Microarray

<sup>19</sup> Ab: Antistoff



## 5 MIKROBRIKKETEKNOLOGI

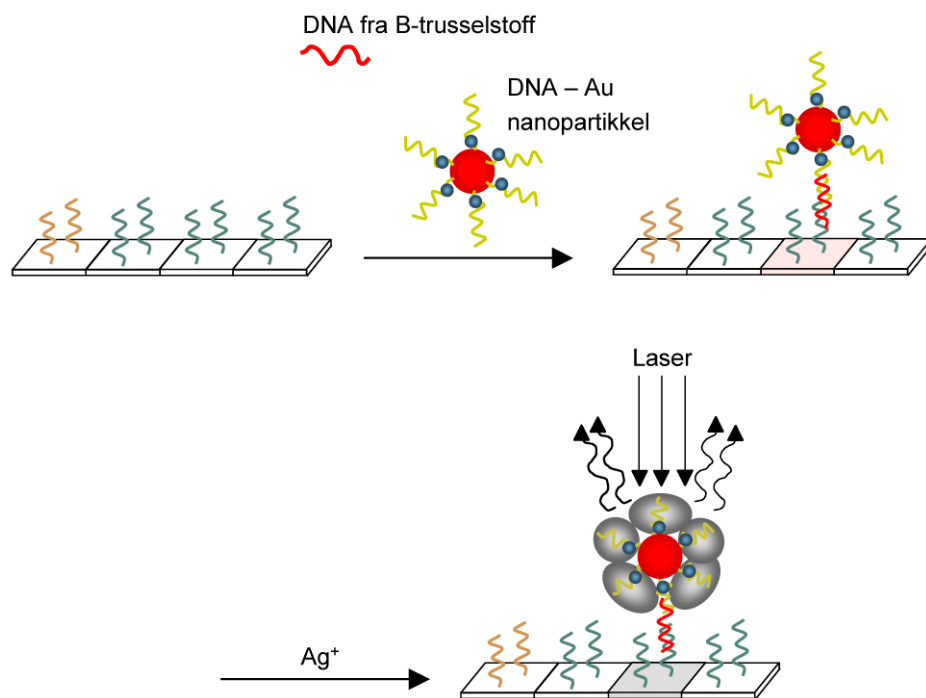
Mikrochipen, eller silisiumbrikken, har fått en viktig funksjon i den biologiske verdenen og benyttes til ulike analytiske funksjoner innen grunnforskning, rettsmedisin, diagnostikk, avsløring av narkotikamisbruk, genetisk testing, separasjonsteknikker og påvisning av mikroorganismer. Mikrobrikkene har strukturer i mikrometerstørrelsen og reaksjonskammere for mikroliter og nanoliter volum. En enkel brikke er vanligvis 1-2 cm<sup>2</sup>. Ved å tilføre elektriske pulser til brikken vil ventiler eller porter åpnes eller lukkes og væske kan strømme gjennom kanalene. Stadig flere typer og varianter av brikker blir tatt i bruk.

Det er i dag mulig å utføre en rekke PCR-analyser samtidig ved bruk av bioelektroniske brikker (Belgrader et al, 1998). Det finnes også mikrobrikker for lysering og prøveopparbeidelse (Lean et al, 2004, Hoffman et al, 2005) og mikrobrikker som kombinerer prøveopparbeidelse og PCR (Panaro et al, 2005).

## 6 NANOTEKNOLOGI

Nanoteknologi er et kollektivt begrep som refererer til teknologiske utviklinger i nanometerskala innenfor ulike fag- og forskningsfelter (bl a fysikk, kjemi, biologi, molekylærbiologi, medisin, elektronikk, materialvitenskap). Innen nanoteknologien kan egenskapene til et materialsystem bestemmes ved å kontrollere minst en dimensjon ned til 0,1 – 100 nm, dvs på atomnivå. Bruken av nanoteknologi til helsemessige formål, diagnose, levering av medisiner ved behandling er i økende vekst. Nanoteknologien kan benyttes til å detektere og identifisere B-trusselstoffer og det er mulig å detektere helt ned på enkeltmolekyl nivå. Dette er bedre enn ved andre genetiske påvisningsmetoder. Ulike typer nanopartikler som f eks gull (Au), silisium, magnetiske partikler (ferrofluider) og kvanteprikker kan benyttes til molekylærdiagnostikk etter ”lab-on-a-chip” prinsippet (review Jain, 2005, Simmel and Dittmer, 2005).

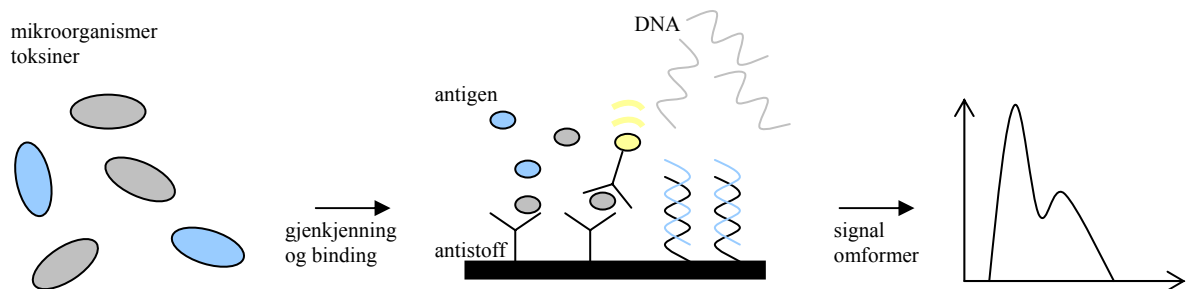
Figur 6.1 illustrerer hvordan DNA-Au nanopartikler festet til Raman-aktive fargestoffer (f eks Cy3) kan benyttes til B-identifikasjon. En mikrobrikke kan være overflate behandlet med ssDNA-prober som sammen med DNA-Au nanopartiklene gjenkjenner og binder spesifikke ssDNA fra et B-trusselstoff (ShadThaxton and Mirkin, 2004). Ved bestråling med en gitt bølgelengde (laser) vil lys med en annen bølgelengde eksiteres og et bestemt Raman spektrum oppnås. Gjenkjenning av andre biomolekyler resulterer i andre Raman spektra. Sensitiviteten i analysen øker da signalene forsterkes i nærvær av sølvioner (Ag<sup>+</sup>). Deteksjonsgrensen med bruk av DNA-Au partikler er pr i dag på femtomol nivå (10<sup>-15</sup>) (Jain, 2005). Det arbeides aktivt internasjonalt for å utvikle slike bio-nanosensorer.



Figur 6.1. DNA-Au nanopartikler i nærvær av aktive Raman fargestoffer (blå sirkel = Cy3) til identifikasjon av B-trusselstoffer (se tekst for beskrivelse). Figuren er modifisert etter ShadThaxton and Mirkin (2004).

## 7 BIOSENSORER

En biosensor er et deteksjonsinstrument som kombinerer en spesifikk biologisk reaksjon med en fysisk-kjemisk detektor. Biologiske gjenkjenningsmolekyler kan være antistoffer, enzymer, DNA, reseptorer, celler eller vevsbiter. Det oppstår vanligvis en biologisk eller en biokjemisk endring når biomolekylene gjenkjenner det som skal detekteres (mikroorganismer, toksiner) som videre overføres gjennom en signalomformer til detektoren (fig 7.1). Detektorene kan være optiske instrumenter, akustisk baserte omformere som piezoelektriske krystaller eller elektroder av ulike typer for elektrokjemisk anvendelse. Fordeler med bruk av biosensorer er at de vanligvis er raske, sensitive og spesifikke. Det finnes noen kommersielt tilgjengelige biosensorer for påvisning av B-trusselstoffer. En biosensor for påvisning av bl a næringsmiddelpatogener, hvorav noen er definert som B-trusselstoffer, har blitt konstruert (Radke and Alocilja, 2005). FFI har tidligere utgitt en rapport om ulike biosensorer for identifikasjon av B-trusselstoffer (Fykse et al., 2000). Denne rapporten beskriver tre eksempler på biosensorer basert på immunologiske analyser (antistoffer).



Figur 7.1. Skjematisk fremstilling av en immunologisk og en DNA-basert biosensor.

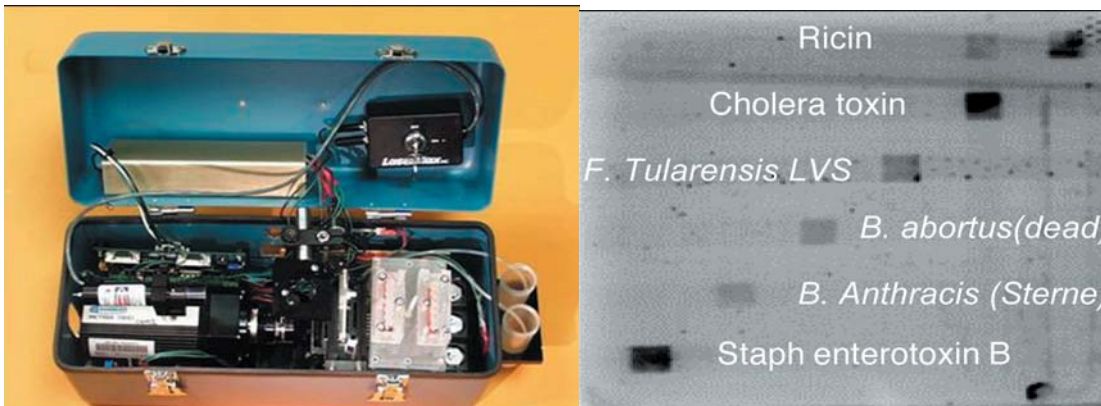
*RAPTOR* fra Naval Research Laboratory (NRL) (fig 7.2) er en batteridreven bærbar immunologisk basert fiberoptisk biosensor (6.5 kg) beregnet for militært bruk som kan identifisere flere ulike B-trusselstoffer (tab 4.2). *RAPTOR* benytter fluorescensmerkede antistoff i analysen, deteksjonsgrensen er  $100 - 10^5$  cfu/ml for bakterier og analysen tar ca 20-30 minutter.

*QTL Handheld Biosensor* er utviklet av QTL Biosystems og det amerikanske forsvaret for identifisering av B-trusselstoffer (tab 4.2). Den veier ca 2 kg, er håndholdt og batteridrevet (16 t) og kan detektere  $< 10\ 000$  *B. anthracis* sporer (fig 7.2).



Figur 7.2. Bærbare biosensorer egnet for felt bruk i forsvaret; *RAPTOR* og *QTL Biosensor* fra hhv Research International og QTL Biosystems (foto: hhv <http://www.resrchintl.com> og <http://www.qtlbio.com/>).

*NRL Array biosensor* (fig 7.3) er en automatisk, bærbar (vekt ca 6 kg), batteridreven biosensor for identifikasjon av flere B-trusselstoffer samtidig (tab 4.2). Antistoffer som spesifikt gjenkjenner B-trusselstoffet er bundet til en mikrobrikke. Et fluorescensmerket antistoff bindes til antistoff-trusselstoff komplekset, og reaksjonen detekteres av et CCD kamera. Sensitiviteten er  $< 1000$  cfu/ml for bakterier og  $< 500$  pg/ml for toksiner. Analysetiden er på ca 30 minutter pr prøve.



Figur 7.3. *NRL Array biosensor* (foto: <http://www.nrl.navy.mil>).

## 8 INTEGRERTE DETEKTORSYSTEMER

For deteksjon av B-trusselstoffer i luft er det utviklet systemer som kobler sammen komponentene skissert i fig 4.1. Det ikke utviklet tilsvarende systemer for analyse av vann-, jord- og overflateprøver. Generelt krever systemene, som inneholder ulik grad av automatikk, noe manuell oppfølging og kompetent tolking av analyseresultater.

### 8.1 Integrerte systemer for militær bruk

To ulike systemer skiller seg ut ved å være tilpasset militære kjøretøyer for taktiske operasjoner; *Biological Integrated Detection System (BIDS)* og *Integrated Biological Detection System (IBDS)*, utviklet i hhv USA og England.

*BIDS* er et mobilt detektorsystem plassert på en Humvee (M1097) (fig 8.1). Systemet har vært i kontinuerlig utvikling siden 1996. Systemet er utstyrt med reservedeler og strømaggregat og skal være operativt i tre dager om gangen. Den første modellen, Non-Developmental Item (NDI BIDS), var manuell i alle analysesteg, mens den etterfølgende modellen Pre-planned product Improvement (P3I BIDS) er halvautomatisert og inneholder FLAPS2 (kap 4.1), flowcytometri (kap 4.1.1), massespektrometri og metoder for immunoanalyser (kap 4.3.2) (Bio-Detector, Smiths Detection). P3I BIDS har i flere år vært implementert i det amerikanske forsvaret, men blir erstattet med dens etterfølger, *Joint Biological Point Detection System (JBPDS BIDS)*.



Figur 8.1. P3I BIDS er et delvis automatisert integrert detektorsystem som benyttes i det amerikanske forsvaret (foto: <http://www8.janes.com>).

*JBPDS* systemet er utviklet av General Dynamics Armament and Technical Products for det amerikanske forsvaret. *JBPDS* (ca 125 kg) er i ferd med å erstatte tidligere detektorsystemer benyttet i hæren, flyvåpenet og marinen (fig 8.2). Systemet er helautomatisk med kontinuerlig monitorering av luften og automatisk prøveinnsamlingen ved alarm (<http://www.nap.edu>). Spesifikk analyse av inntil ti ulike B-trusselstoffer kan utføres og analysetiden er ca 20 minutter. Systemet er utstyrt med en værstasjon, GPS og kommunikasjonssystemer og er planlagt integrert i neste generasjons *BIDS*. *JBPDS* blir videreutviklet og målsettingen er å fremskaffe et lettere, mindre, mer følsomt og energibesparende system.

A



B



Figur 8.2. Det amerikanske *JBPDS* systemet som skal overta for *BIDS*. Bildet viser instrumentet plassert bak på en Humvee (A) og *JBPDS* integrert i *BIDS* (B) (foto: <http://www.gdatp.com/>).

*IBDS* er en videreutviklet versjon av *Prototype Biological Detection System (PBDS)* som ble konstruert for operasjoner under Golfkrigen i 1990 av det britiske forsvaret. *IBDS* er et helautomatisert integrert system som kan transporteres med lastebil eller fly (Hercules) (fig 8.3). Strøm tilføres fra eget aggregat eller fra nødstrømsbatterier. Konteineren er utstyrt med aircondition, kull- og HEPA-filter. En uspesifikk sensor, *ASPECT*, måler kontinuerlig forandringer i B-aerosol konsentrasjonen, partikkelstørrelse og form. *ASPECT* skal, eller er allerede, erstattet med *VeroTec* (kap 4.1.1). Ved alarm trigges en lufthøster (kap 4.2) og B-trusselstoffer analyseres kontinuerlig vha immunoanalyse med *Bio-Detector*. Instrumentet kan analysere inntil åtte B-trusselstoffer samtidig. *IBDS* er også utstyrt med GPS, værstasjon, radiokommunikasjon og overvåkningskameraer.





*Figur 8.3. IBDS er et helautomatisk integrert biologiske detektorsystem benyttet i det britiske forsvaret (foto: <http://www8.janes.com>).*

*Canadian Integrated Biochemical Agent Detection System (CIBADSII)* er basis for flere integrerte C- og B-detektorer utviklet av Canadian Defense Research Establishment, Suffield, i samarbeid med General Dynamics, Canada, University of Alberta, Canadian Force, Dycor og TSI. I CIBADSII II/4WARN CB System V.3 blir innholdet av luftpartikler kontinuerlig overvåket med FLAPS2. Ved deteksjon av forhøyede konsentrasjoner av B-partikler gis en alarm. Lufthøsteren Dycor modell XMX samler opp B-partikler og B-trusselstoffene blir identifisert vha immunologiske metoder. Instrumentet er også utstyrt med en C-detektor, værstasjon og GPS. Systemet er tilsluttet en kontroll- og beslutningsentral som kan ta imot data fra flere detektorer. Informasjonen fra detektorene kan benyttes til risikovurderinger (Wästerby et al., 2003).



*Figur 8.4. 4WARN CB System V.3 er et automatisk integrert detektorsystem for B- og C-trusselstoffer utviklet av det kanadiske forsvaret i samarbeid med General Dynamics (foto: <http://www.suffield.drdc-rddc.gc.ca/>).*

*4WARN CB System V.2* er en B-detektor fra General Dynamics. Systemet har et enklere varslingsystem enn CIBADSII. Det er også mer kompakt, lettere og mer energibesparende. Systemet er helautomatisk og består av enhetene BioSentry (partikkelanalysator) og BioIdent (immunoanalyse). BioSentry monitorerer luften kontinuerlig. Ved alarm blir lufthøsteren MicroVic aktivert (MesoSystems Technology, 400 l/minutt). Den kan analysere inntil elleve B-trusselstoffer samtidig, deteksjonsgrensen er 10 ACPLA<sup>20</sup> og analysetiden er 15-20 minutter. Instrumentet er utstyrt med en værestasjon, GPS og radiokommunikasjon.

*NBCerberus* er et fleksibelt system utviklet av Smiths Detection for deteksjon av radioaktive-, B- og C-trusselstoffer (fig 8.5). NBCerberus inneholder en ASPECT, en lufthøster og en Bio Detector, samt en værestasjon, GPS og radiokommunikasjon. Analysen tar ca 15 minutter og kan analysere åtte B-trusselstoffer.



*Figur 8.5. NBCerberus er et fleksibelt system utviklet av Smiths Detection. Systemet benytter flere av de samme analysemodulene som er integrert i IBDS (foto: <http://trace.smithsdetection.com/>).*

<sup>20</sup> Agent Containing Particles Per Liter of Air (se kap 5.2)

## 8.2 Sivile integrerte systemer

Etter 11 september 2001 er det blitt utviklet integrerte systemer for B-deteksjon til bruk i det sivile samfunn. Lawrence Livermore National Laboratory har utviklet et automatisk deteksjonssystem for luftprøver, *Autonomous Pathogen Detection System (APDS)* (fig 8.6), som kan kontinuerlig monitorere og analysere luftprøver og er spesielt beregnet for bruk ute (f eks stadion, store arenaer, flyplasser, offentlige plasser o l). Partikler i luften samles opp vha en lufthøster og analyseres ved både PCR og immunologiske metoder (tab 4.2). Sensitiviteten er på 1000 – 10 000 cfu/ml og analysetiden er beregnet til ca 1 time.



*Figur 8.6. Et integrert B-deteksjonssystem for sivil bruk. Autonomous Pathogen Detection System APDS, utviklet av Lawrence Livermore National Laboratory, for analyse av luftprøver ved hjelp av PCR og immunologiske analyser (foto: <http://www.llnl.gov>).*

## 9 FREMTIDENS TEKNOLOGI

Bioteknologien har hatt en rivende utvikling de siste 20 årene og det er ingen grunn til å tro at denne utviklingen vil reduseres. Det er forventet at mange av de nåværende B-deteksjonssystemene vil bli mer automatiserte, oppnå økt sensitivitet og spesifisitet i løpet av 10-15 år. Teknologiske nyvinninger for de ulike komponentene utvikles og prøves ut, og trolig vil bruken av microarray teknologi og biosensorer økes. Det vil utvikles raskere, enklere, mer spesifikke og sensitive genetisk (molekylærbiologiske) metoder for identifikasjon. Utvikling av mikroteknologi og nanoteknologi forventes å bidra til en slik utvikling. Utviklingen av ”*detect-to-warn*” utstyr som inkluderer bl a partikkelanalyser vil trolig fortsette og bli mer spesifikke mht B-identifikasjon. BIDS og IBDS er eksempler på integrerte systemer beregnet for ”*detect-to warn*”. For effektiv medisinsk behandling må potensielle smittestoffer identifiseres så raskt som mulig. Optimalt vil være å kunne starte behandlingen før symptomene bryter ut.

Til tross for at selve identifiseringsprosessen av B-trusselstoffer kan foregå ganske raskt kreves det vanligvis et prøveprosesseringsstrinn som inkluderer ekstraksjon av mikroorganismens DNA. Dette utøves ofte manuelt i dag. Det er forventet en økning i utviklingen av automatiserte systemer som kan utføre både prøveprosesserings og identifisering. I dag finnes det noe utstyr (på utviklingsstadiet) som benytter mikrofluidikk til dette formålet.

Beskrivelsen av en UAV (”*unmanned aerial vehicle*”) med innebygget biosensor for deteksjon av B-trusselstoffer er nylig blitt publisert (Naimushin et al., 2005). Biosensoren benytter Surface Plasmon Resonance (SPR) for deteksjon av B-trusselstoffer. Dette eksemplet viser at ved å kombinere flere forskjellige systemer med ulikt formål fra ulike fagområder så kan nye produkter for B-deteksjon utvikles. Ved Naval Research Laboratory i USA er en fiberoptisk biosensor integrert med en luftsamler og plassert på et modellfly. Systemet var i stand til å samle bakterier fra en aerosol, identifisere disse og overføre resultatene til de stasjonært plasserte fagpersonene (Ligler et al., 1998).

Andre biodeteksjonsmetoder som er under kraftig utvikling er Light Scattering Surface Plasmon Resonance (LSSPR), surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), Matrix Assisted Laser Desorption Ionization og Time of Flight Mass Spectroscopy (MALDI-TOF-MS). Det arbeides intenst i enkelte land (bl a Nederland og USA) med utvikling og bruk av massespektroskopi for identifisering av B-trusselstoffer da selve identifiseringen kan foregå i løpet av et par minutter. Det er allikevel nødvendig med et prøveopparbeidelsestrinn før identifiseringsanalysen.

## 10 KONKLUSJON

Denne rapporten beskriver ulike metoder for deteksjon og identifikasjon av B-trusselstoffer og er et teknologiinnspill til Forsvarsstudie 2007. Deteksjon av B-trusselstoffer er en vanskelig og kompleks prosess og et enkelt system for deteksjon og identifikasjon av slike trusselstoffer finnes ikke. Forskjellige analysemetoder for B-verifikasjon må brukes. Utvikling av gode, spesifikke og hurtige påvisningsmetoder for B-trusselstoffer bidrar til en effektiv beredskap mot bruken av slike trusselstoffer.

I denne rapporten er det gitt eksempler på metoder og kommersielt tilgjengelig utstyr for generell deteksjon, deteksjon av partikler av biologisk opprinnelse og metoder for identifikasjon, samt prøvetakingsutstyr for luftprøver. ”*Detect-to-warn*” utstyr er fortsatt under utvikling og utprøving, men noe utstyr er tilgjengelig både militært og sivilt. Der er allikevel noen begrensinger mht spesifisitet og spesifisitet av dette utstyret. Derimot er det mange anvendbare teknikker og utstyr for ”*detect-to-treat*” prinsippet, bl a PCR og immunologiske analyser. Bruken av hurtiganalysesystemer kan gi en indikasjon, men videre analyser ved et laboratorium med fagkompetanse er vanligvis nødvendig for verifikasjon. Såkalte integrerte systemer (både militære og sivile) er satt sammen av ulike komponenter og fungerer helt eller delvis automatisk.

B-trusselstoffer kan være aktive i lave doser slik at påvisningsmetodene må være sensitive. Deteksjon og identifikasjon av B-trusselstoffer er et felt i rask utvikling på grunn av den teknologiske utviklingen innen flere fagfelt, bl a mikrobrikke- og nanoteknologien. Spesielt utviklingen innen bioteknologi har bidratt til stor fremdrift angående sensitivitet og spesifisitet. Det er forventet at utstyr for B-identifikasjon vil bli raskere, oppnå høyere sensitivitet (på enkeltmolekyl nivå) og bli mer automatisert i nær fremtid (10-15 år). Dette i motsetning til utstyr for prøveprosessering som ikke har kommet like langt i den teknologiske utviklingen som trolig fremdeles vil omfatte noen manuelle trinn i lang tid fremover.

## 11 REFERANSER

Andersen B M (2005): Bakterier og sykdom Gyldendal Akademisk.

Atlas R M (2002): Bioterrorism: from threat to reality, *Annu Rev Microbiol.* **56**, 167-185.

Belgrader P, Benett W, Hadley D, Long G, Mariella R Jr, Milanovich F, Nasarabadi S, Nelson W, Richards J, Stratton P (1998). Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument, *Clin Chem.* **44**, 3846-3852.

Emanuel P A, Bell R, Dang J L, McClanahan R, David J C, Burgess R J, Thompson J, Collins L, Hadfield T (2003): Detection of *Francisella tularensis* within infected mouse tissues by using a hand-held OCR thermocycler, *J Clin Microbiol.* **41**, 689-693.

Fraser C M (2004): A genomics-based approach to biodefence preparedness, *Nature Reviews* **5**, 23-33.

Fruchey I R, Emanuel P A (2005): Market Survey: Biological detectors, guide for selection of biological devices and systems. Critical Reagent Program.

Fykse, E M, Olsen J S Økstad OA (2000): Oversikt over biosensorer for identifikasjon av biologiske våpen. FFI/Rapport-00492, Forsvarets forskningsinstitutt.

Fykse, E M, Olsen J S, Skogan G (2004): Påvisning av biologiske stridsmidler ved bruk av real-time PCR. FFI/Rapport-04247, Forsvarets forskningsinstitutt.

Gran, H C, Skogan G, Olsen J S (2002): Evaluation of Optoflow Microcyte® Flow Cytometer, FFI/Rapport-2002/00772, Forsvarets forskningsinstitutt.

Hofmann O, Murray K, Wilkinson A S, Cox T, Manz A (2005): Laser induced disruption of bacterial spores on a microchip, *Lab Chip.* **4**, 374-377.

Inglesby T V, O'Toole T, Henderson D A, Bartlett J G, Ascher M S, Eitzen E, Friedloger A M, Gerberding J, Hauer J, Hughes J, McDade J, Osterholm M T, Parker G, Perl T M, Russell P K, Tonat K, Working group on civilian Biodefense (2002): Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management, *JAMA*, **287**, 2236-2253 (Erratum in: *JAMA* 2002 **288**, 1849).

Jain K K (2005): Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics, *Clinica Chimica Acta* **358**, 37-54.

Jernigan D B, Raghunathan P L, Bell B P, Brechner R, Bresnitz E A, Butler J C, Cetron M, Cohen V, Doyle T, Fischer M, Greene C, Griffith K S, Guarner J, Hadler J L, Hayslett J A,

Meyer R, Petersen L R, Phillips M, Pinner R, Popovic T, Quinn C P, Reefhuis J, Reissman D, Rosenstein N, Schuchat A, Shieh W, Siegal L, Swerdlow D L, Tenover F C, Traeger M, Ward J W, Weisfuse I, Wiersma S, Yeskey K, Zaki S, Ashford D A, Perkins B A, Ostroff S, Hughes J, Fleming D, Koplan J P, Gerberding J L, The National Anthrax Epidemiologic Investigation Team (2002): Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: Epidemiologic findings, *Emerg Infect Disease* **8**, 1019-1028.

Keim P, Price L B, Klevytska A M, Smith K L, Schupp J M, Okinaka R, Jackson P J, Hugh-Jones M E (2000): Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*, *J Bacteriol.* **182**, 2928-2936.

Kolavic S, Kimura A, Simons S, Slutsker L, Barth S, Haley C (1997): An outbreak of *Shigella dysenteriae* Type 2 among laboratory workers due to intentional contamination, *JAMA* **278**, 396-398.

Kortepeter, M., G. Christopher, T. Cieslak, R. Culpepper, R. Darling, J. Pavlin, J. Rowe, K. McKee Jr. og E. Eitzen, Jr., USAMRIID'S Medical Management of Biological Casualties Handbook. Maryland USA, 2001.

Lean M, Hsieh H B, Voelkel A R, Jensen J L (2004): High speed MEMS device for sample preparation of bio agents in water, 2nd Joint Conference on Point Detection for Chemical and Biological Defense, March 1-5, Williamsburg, VA.

Ligler F S, Anderson G P, Davidson P T, Foch R J, Ives J T, King D K, Page G, Stenger D A, Whelan J P (1998): Remote sensing using airborne biosensor, *Environ Sci Technol.* **32**, 2461-2466.

Lim D V, Simpson J M, Kearns E A, Kramer M F (2005): Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare, *Clin Microbiol Rev.* **18**, 583-607.

Matsumoto G (2003): Anthrax powder: State of the art? *Science* **28**, 1492-1497.

Melin L (2000): Terrorism och kriminalitet, FOI rapport 1551-864.

Meselson M, Guillemin J, Hugh-Jones M, Langmuir A, Popova I, Shelokov A, Yampolskaya O (1994): The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979, *Science* **266**, 1202-1208.

Naimushin A N, Spinelli C B, Soelberg S D, Mann T, Stevens R C, Chinowsky T, Kauffman P, Yee S, Furlong C E (2005): Airborne analyte detection with an aircraft-adapted surface plasmon resonance sensor system, *Sensors and Actuators B* **104**, 237-248.

Panaro N J, Lou X J, Fortina P, Kricka L J, Wilding P (2005): Micropillar array chip for integrated white blood cell isolation and PCR. *Biomol Eng.* **6**, 157-62.

Radke S M, Alocilja E C (2005): A microfabricated biosensor for detecting foodborne bioterrorism agents, *IEEE Sensors Journal* **5**, 744-750.

Read T D, Peterson S N, Tourasse N, Baillie L W, Paulson I T, Nelson K E, Tettelin H, Fouts D. E, Eisen J A, Gill S R, Holtzapple E K, Økstad O A, Helgason E, Rilstone J, Wu M, Kolonay J F, Beanan M J, Dodson R, Brinkac L M, Gwinn M, DeBoy R T, Madpu R, Daugherty S C, Scott Durkin A, Haft D H, Nelson W C, Peterson J D, Pop M, Khouri H M, Radune D, Benton J L, Mahamoud Y, Jiang L, Hance I R, Weidman J F, Berry K J, Plaut R D, Wolf A M, Watkins K L, Nierman W C, Hazen A, Cline R, Redmond C, Thwaite J E, White O, Salzberg S L, Thomason B, Friedlander A M, Koehler T M, Hanna P C, Kolstø A B, Fraser C M (2002): The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria, *Science* **296**, 2028-2033.

Rustad G, Gran H C (2006): Avstandsdeteksjon av kjemiske og biologiske stridsmidler. Teknologinnsnitt til FS 07. FFI rapport-00050, Forsvarets forskningsinstitutt.

ShadThaxton C, Mirkin C A (2004): DNA-Gold-Nanoparticle Conjugates. I Nanobiotechnology, Niemeyer C, Mirkin C (Eds), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. ISBN 3-527-30658-7. s 288 – 307.

Simmel F C, Dittmer W U (2005): DNA Nanodevices. *Small* **1**, 284-299.

Tørnes J Aa, Busmundrud O, Engøy T, Olsen J S (2005): Equipment for detection of weapons of mass destruction onboard ships, FFI/RAPPORT-2005/00944, Forsvarets forskningsinstitutt.

Török T, Tauxe R, Wise R, Livengood J, Sokolow R (1997): A large community outbreak of salmonellosis caused by intentional contamination of restaurant salad bars. *JAMA* **278**, 389-395.

Wästerby P, Gustafson I, Tjärnhage T (2003): Instrument för indikering av biologiske aerosoler, FOI-R-1096-SE.

Aas P (1997) Håndtering av en avtalebryter. UNSCOMs og IAEAs nedrustning av Iraks masseødeleggelsesvåpen, *Internasjonal Politikk* **55**, 41-60.