

PROJEKTRAPPORT

Harmonisering av metoder för odling av högpatogena bakterier på BSL-3 laboratorium



Johanna Thelaus, Kerstin Kuoppa, Anna-Lena Sahlin, Karin Eld, Tara Wahab

ABSTRACT

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

The aim of this project was to harmonize methods for cultivation of the bacterial category A agents *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* and *Burkholderia spp.*. In 2011 an inventory was performed in order to identify the different solid culture media frequently used at the agencies for cultivation of the bacterial agents. In addition, a search of published peer reviewed literature describing solid culture media for the five agents was performed. Taken together, the result from the inventory and literature search constituted the basis for the design of a side by side test where different types of solid culture media were evaluated for growth of the four bacterial agents.

Results from the side by side test showed small differences in the time required for bacterial growth. However a variety of morphologies of bacterial colonies could be observed for one bacterial strain cultured on different media. This may significantly affect the ability to determine a culture as positive or negative for a specific agent. Moreover differences in both colony morphology and time for observed growth were apparent for the same bacterial strain grown on media prepared with the same recipe but prepared at different laboratories.

We recommend the Horse blood and Tul -agar as "FBD Choice Medium" for cultivation of the studied bacteria from clinical samples. However the recommendation is limited to relatively clean samples with low level of contamination due to lack of selectivity necessary for cultivation from mixed/contaminated samples. There is still a need for further collaboration between agencies to harmonize methods for enrichment and selectivity for cultivation of bacterial agents from complex matrixes as food, environmental and degraded clinical samples.

Titel:	Harmonisering av metoder för odling av högpatogena bakterier på BSL-3 laboratorium Publ.nr. MSB486, ISBN 978-91-7383-286-1
Projekttid:	2011
Projektgrupp:	Johanna Thelaus, Kerstin Kuoppa, Anna-Lena Sahlin, Karin Eld och Tara Wahab
Kontaktperson i FBDs styrgrupp:	Mona Byström (FOI)
Styrgrupp:	Mats Forsman ordf. (FOI), Mona Byström (FOI), Hans Lindmark (Livsmedelsverket), Annelie Lundin Zumpe (Livsmedelsverket), Benjamin Edvinsson (SMI), Andreas Bråve (SMI), Rickard Knutsson (SVA) och Viveca Båverud (SVA)
Finansiering:	Projektet har finansierats genom tilldelning av MSB anslag 2:4 Krisberedskap
Layout:	Tecknarn i Roslagen
Tryck:	Danagårds Grafiska

INNEHÅLL

1. Bakgrund	5
2. Syfte och mål	6
2.1 Delmål	6
2.2 Avgränsningar	6
3. Material och metoder	7
3.1 Inventering av befintliga odlingsmedium samt aktuell vetenskaplig litteratur	7
3.2 Myndighetsgemensam övning	7
3.2.1 Urval av medier till övningen	7
3.2.2 Upplägg av övningen	7
3.2.3 Arbetsflöde vid odling	8
4. Resultat	9
4.1. Inventering	9
4.2. Urval av medier till övning	10
4.2.1 <i>Bacillus anthracis</i>	10
4.2.2 <i>Burkholderia</i> spp.	10
4.2.3 <i>Francisella tularensis</i>	10
4.2.4 <i>Yersinia pestis</i>	10
4.3. Övning	12
4.3.1 <i>Bacillus anthracis</i>	12
4.3.2 <i>Burkholderia</i> spp.	13
4.3.3 <i>Francisella tularensis</i>	14
4.3.4 <i>Yersinia pestis</i>	16
5. Diskussion	18
6. Slutsatser	20
7. Förslag på fortsatt verksamhet	21
8. Bilagor	21
9. Referenser	22



SAMMANFATTNING

Forum för beredskapsdiagnostik (FBD) är ett samarbete mellan fyra svenska myndigheter, Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Smittskyddsinstitutet (SMI) och Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI). Ett av forumets huvudmål är harmonisering av metoder och utrustning mellan de deltagande myndigheterna för att öka beredskapen i Sverige inför en eventuell B-händelse. Vid en avsiktlig eller naturlig spridning av riskklass 3 bakterier är en fungerande krisberedskap, med avseende på medicinska motåtgärder och dekontaminerings förfaranden, beroende av snabba laboratorieresultat. Till skillnad från odlingsdiagnostik, som ofta ses som en gyllene standard, erbjuder molekylär diagnostik metoder som snabbare kan analysera en större mängd prover med frågeställningar om bakteriella riskklass 3 organismer.

Med utvecklingen av nya metodiker för högupplöst identifiering av mikroorganismer (t.ex. MALDI TOF MS) krävs dock ett första steg med odling av organismen i fråga. Med en ökande efterfrågan av mer detaljerad kunskap om organismer för till exempel resistensbestämning, smittspårning, epidemiologi och fylogenetiska studier, aktualiseras behovet av harmonisering av odlingsmetodik mellan myndigheter. Syftet med detta projekt var att öka kompetensen inom odling av bakteriell riskklass 3 organism inom forumet. En inventering av medium som används vid myndigheterna för odling av *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* och *Burkholderia spp.* låg till grund för en myndighetsgemensam övning. Övningen syftade till att utvärdera tillväxthastighet för ovan nämnda riskklass 3 organismer vid odling på olika odlingsmedium.

Projektet har resulterat i en översyn och sammanställning över använda och tillgängliga medier för odling av *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* och *Burkholderia*. Vid den myndighetsgemensamma övningen framkom endast små skillnader i tillväxthastighet. Något som blev tydligt var dock en stor skillnad i koloniers morfologi vid odling på olika odlingsmedium. Detta kan ha stor betydelse för möjligheten att visuellt identifiera en odling som positiv för ett specifikt agens. Vidare framstår Hästblodagar som ett gott alternativ för "FBD Choice Medium" på grund av dess generella användningsmöjlighet för odling av både *B. anthracis*, *Y. pestis*, och *Burkholderia spp.*. Begränsningen för detta odlingsmedium ligger dock i att den saknar selektivitet (antibiotika). Vid odling från ett kontaminerat prov eller från ett prov med bakgrundsflora resulterar detta i överväxt och liten eller ingen möjlighet att isolera eftersökt agens. Resultaten som framkommit i projektet under 2011 visar på ett stort behov av att utvärdera odling av riskklass 3 organismer med avseende på anrikning och selektivitet för att möta behovet av odling från komplexa matriser som livsmedel, miljöprover och kliniska prover innehållande en blandflora.

1. BAKGRUND

FBD fokuserar idag på utveckling och kvalitetssäkring av metodik för molekylär diagnostik av högpatogena bakterier. Ett långsiktigt mål är att utöka förmågan till fler typer av smittämnen som bedöms utgöra en risk och därmed eventuellt föremål för myndighetsgemensamma insatser vid kris.

Under de senaste åren har ett stort fokus lagts på utveckling av molekylär diagnostik, med realtids PCR TaqMan som primärt detektionsverktyg. Även om detta idag kan ses som referensmetodik, där en analys kan utföras på kort tid, ses behov av snabbare, mer kostnadseffektiv och bredare metodik. Med bredare avses i detta sammanhang metodik som inte bara medger detektion av ett specifikt smittämne, utan som ur ett differentialdiagnostiskt perspektiv också kan identifiera ett brett spektra av andra relevanta smittämnen. I dagsläget används främst 16S rRNA sekvensering för detta ändamål, tekniken är dock tidskrävande med manuellt arbete i flera steg och används därför oftast inte rutinmässigt. På sikt bedöms matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) som en teknik lämplig för snabb fenotypisk identifiering av bakterier på genus och art nivå. Tekniken är både snabb och kostnadseffektiv. Med rätt biomarkörer och förutsatt att en etablerad databas används som referens är detta en mycket lovande metod för snabb identifiering av högpatogena eller andra kliniskt relevanta bakterier i blandade prover.

Dock förutsätter dessa nya tekniker en standardiserad odling av mikroorganismer i ett första steg av analyskedjan. Som ett led i utvecklingen av nya fenotypiska metoder för identifiering av bakterier inom FBD har detta projekt fokuserat på att långsiktigt harmonisera och bygga upp odlingskompetens för bakteriella riskklass 3 organismer på de olika myndigheterna. Ett första steg togs under 2010 då man inom projektet "Detektion av *Francisella tularensis*" arbetade med att harmonisera odlings och infrysningmetoder av *Francisella tularensis* (1).

2. SYFTE OCH MÅL

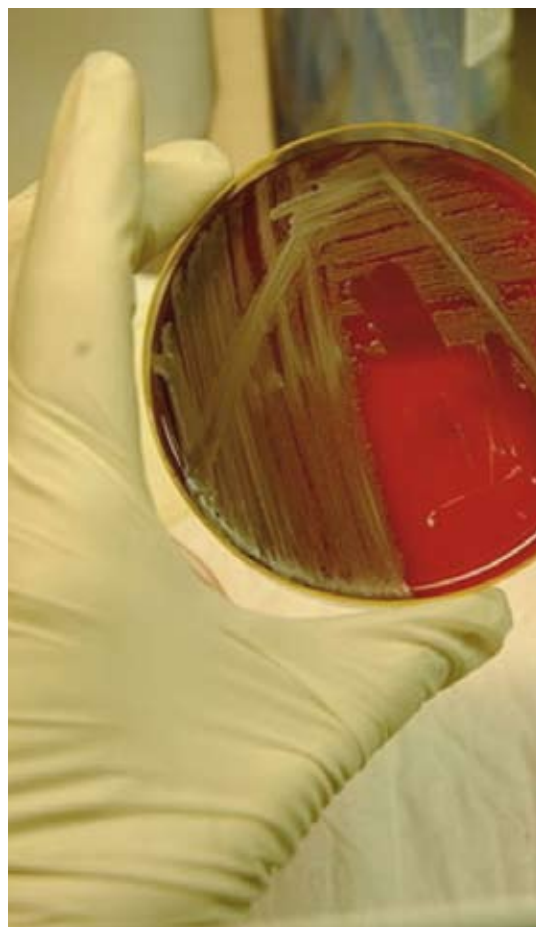
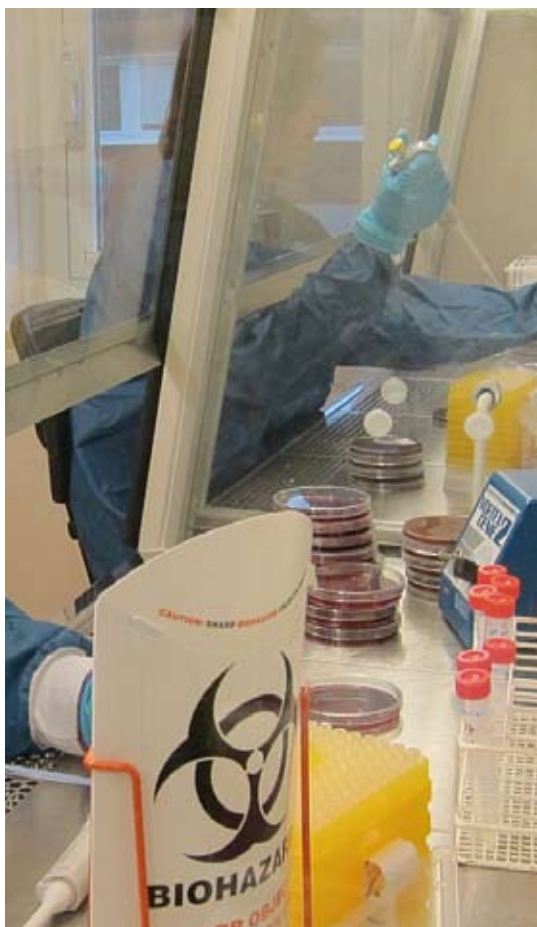
Projektets övergripande mål var att genomföra en myndighetsgemensam övning för harmonisering av medium för odling av *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* och *Burkholderia spp.*. Övningen utformades för att utvärdera tillväxthastighet vid odling på olika fasta odlingsmedium. Både övningen och arbetet inför övningen syftade också till att öka kompetensen inom odling av bakteriella riskklass 3 organismer inom nätverket.

2.1 DELMÅL

- Inventering av befintliga medium vid myndigheterna som används för odling av de fyra riskklass 3 organismerna.
- Inventering av vetenskaplig litteratur för odling av de fyra riskklass 3 organismerna.
- Utvärdering av utvalda medier (identifierade vid inventering) för tillväxt av riskklass 3 organismer i form av en myndighetsgemensam övning.

2.2 AVGRÄNSNINGAR

Övningen utvärderade inte anrikningspotential och selektivitet hos medier.



3. MATERIAL OCH METODER

3.1 DELPROJEKT 1 OCH 2

INVENTERING AV BEFINTLIGA ODLINGSMEDIUM SAMT AKTUELL VETENSKAPLIG LITTERATUR

Projektgruppens medlemmar sammanställde respektive myndighets odlingsmedier för odling av *Bacillus*, *Yersinia*, *Francisella* och *Burkholderia*. Sammanställningen genomfördes med fokus på medium, recept, odlingsförhållanden, selektivitet, matriser och hållbarhet.

Projektgruppen saknade under hösten deltagare från Livsmedelsverket. Samarbetet inom resurslaboratorium för beredskapsdiagnostik (RUB) gör att SVA och Livsmedelsverket utnyttjar samma substratberedning, därför fick SVA representera de båda myndigheterna vid inventering och under efterföljande övning.

På samma sätt som beskrivet ovan genomfördes en litteratursökning över aktuell litteratur för att plocka upp eventuella nya metoder för att förbättra odlingsmöjligheter av riskklass 3 organismerna. Sökningen genomfördes under våren 2011 med fokus på fasta medium, mediers selektivitet samt anrikningspotential (PubMed NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>). Parametrar som också extraherades och finns sammanställda i Bilaga C var; referens, organism, resultat, fördel resp nackdel med medium samt utrymme för egna kommentarer. Arbetet fördelades så att varje myndighet fick ansvar för sökningen rörande ett specifikt agens.

3.2 DELPROJEKT

MYNDIGHETSGEMENSAM ÖVNING

3.2.1 Urval av medier till övningen

Övningsupplägget gjordes utifrån de fasta odlingsmedier som används i den dagliga verksamheten vid respektive myndighet. Dessa odlingsmedier kompletterades med ett urval av intressanta odlingsmedium som identifierades vid litteraturinventeringen.

3.2.2 Upplägg av övningen

Upplägget av övningen utformades som ett "side by side" test där tillväxthastighet jämfördes. Varje myndighet preparerade utvalda medium för respektive organism. Medierna skickades sedan som färdiga agarplattor till en utsedd myndighet som inokulerade alla medier med samma isolat och mängd ymp. Fördelningen var *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* FSC237, *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* FSC200 och *Yersinia pestis* 87-020 odlades vid FOI; *Burkholderia mallei* 10245 China 5 och *Burkholderia pseudomallei* 8708 Bendler B odlades vid SMI samt *Bacillus anthracis* BKT 47219/11 odlades vid SVA. Inokulatet bestämdes utifrån en spädningsserie och från mätning av optisk densitet (OD, på en CO 8000 Biowave, Biochrom Ltd). Bakterieodlingarna inkuberades under identiska förhållanden och tillväxt övervakades och dokumenterades. "Tid till avläsning" bedömdes som den inkuberingstid som behövdes för att bakteriekolonierna var räkningsbara på odlingsplattorna.

Inför övningen utfördes ett förförsök där en kalibreringskurva för OD mot viable count (V.C) fastställdes för varje bakteriestam. Dessutom tillsåg projektdeltagarna att riskbedömning samt tillstånd för användning av aktuellt agens fanns och var uppdaterade på respektive myndighet.

Övningen inleddes vecka 43 med att myndigheterna producerade sina odlingsmedium (FOI den 24-28 oktober, SVA den 31 oktober och SMI den 13 oktober). Under vecka 44 skickades sedan agarplattor mellan myndigheterna. Agarplattor för odling av *F. t. tularensis*, *F. t. holarctica* och *Y. pestis* skickades till FOI, plattor för odling av *B. mallei* och *B. pseudomallei* skickades till SMI och plattor för odling av *B. anthracis* skickades till SVA. Agarplattorna skickades enligt respektive myndighets normala rutiner för godstransport enligt rekommendationer från FBD projektet "Logistik och analysövning" (4).

3.2.3 Arbetsflöde vid odling

a). Bakterierna odlades på följande odlingsplattor: *Y. pestis* på blodagar bas (BAB), *F. tularensis ssp.* på McLeod samt *Burkholderia spp.* och *B. anthracis* på hästblodagar. Kulturerna (uppodlade från frysta stocksar) slammades i 4 mL PBS i rundbottnade skruvlocksrör (Nunc 110 16U Centrifuge tube Screwcap PS/PE SI). Slamningen utfördes med plastinös (blå ögla) till det OD som definierats genom kalibreringskurvan i förförsöket. En blank med bara spädningsmedium användes för att nollställa OD-mätaren inför varje mätning.

b). Från skruvlocksrör med slammade bakterier, gjordes två parallella 10-steps spädningsserier i Falconrör. 100 µL bakterielösning spreds från tre spädningssteg på agarplatta (spädning valdes för att generera räkningsbara agarplattor och definierades i förförsöken). Detta genererade således 6 agarplattor av varje typ av platta per bakteriestam. Metod för rackling valdes av respektive myndighet; FOI och SMI -plastinös och SVA - engångsrackla. För att alla agarplattor skulle hålla likvärdig temperatur vid starten av försöket inkuberades de i 37°C i 30 minuter innan användning.

d). Agarplattor med *B. anthracis*, *Y. pestis* och *Burkholderia spp.* inkuberades i 37°C medan *Francisella spp.* inkuberades i 37°C med 5 % CO₂. Tillväxt övervakades kontinuerligt efter 18h, 24h, 42h, 48h, 66h och 72h eller till dess att växt observerades. Resultat från avläsning dokumenterades genom fotografering och tabell se Bilaga A.



4. RESULTAT

4.1 INVENTERING

Inventeringen resulterade i en sammanställning av de odlingsmedier som vid inventeringstillfället användes vid respektive myndighet för odling av *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* och *Burkholderia spp.* (Tabell 1). Inventeringen fokuserades på odling på fasta medier, recept finns sammanställda i Bilaga B.

Tabell 1. Fasta odlingsmedier/agarplattor som används vid FBD myndigheterna vid odling av riskklass 3 organismerna: *Bacillus anthracis* (Ba); *Yersinia pestis* (Yer); *Francisella tularensis* (F); *Burkholderia spp.* (Bur). För recept se Bilaga B. (s) – selektiv.

Medium	SMI	SVA	FOI
Hästblodagar	Ba, Bur, Yer	Ba, Bur, Yer	
Hematinagar MIK1734	Ba		
Heart infusion agar PLET (s)			Ba
Blodagarbas, BAB			Ba, Bur, Yer
Brain heart infusion agar, BHI		Ba	
Mueller-Hinton agar		Ba, Yer	
MacConkey agar			Bur
Blodagar, Umu			Bur, Yer
Modified Thayer- Martin agar, McLeod			Bur, F
Tul agar	F	F	
Tul agar (s)	F		
Chocolate agar base, CHAB, FP2273 (s)	F		
T5 agar, BHI bas			F
T4 agar, BHIbas (s)			F
Yersinia selective agar base, YSAB (s)			Yer

En litteratursökning på publicerade arbeten med odlingsmedium för *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* och *Burkholderia spp.* utfördes. Inventeringen resulterade i 6 referenser rörande *B. anthracis*, 13 referenser för *Y. pestis*, 23 referenser för *F. tularensis* och 4 referenser för *Burkholderia spp.*. En sammanställning av resultatet från sökningen återfinns i Bilaga C. Där redovisas författare, tidskrift, recept på medium, resultat, fördelar och nackdelar med mediet samt en kort summering.

4.2 URVAL AV MEDIER TILL ÖVNING

Utifrån vår inventering av medier som används vid FBD-myndigheterna och medier beskrivna i litteraturen gjordes ett urval av fasta odlingsmedier som sedan utvärderas i övningen. En sammanställning över de utvalda odlingsmedierna finns i Tabell 2.

4.2.1 *Bacillus anthracis*

SMI och SVA använder Hästblodagarplatta (betecknas MIK2742 och Hästblodagar vid respektive myndighet) för rutinmässig odling av både *B. anthracis*, *Burkholderia spp.* samt *Y. pestis* (Bilaga B). På FOI används ett selektivt medium med polymyxin, lysozyme, EDTA och thallus acetate (PLET) för odling av *B. anthracis* (8). Som komplement valdes från litteraturinventeringen *Bacillus cereus* selective agar base (BCA) från Oxoid, som utifrån morfologi hos bakteriekolonierna skall kunna särskilja *B. anthracis* och *B. cereus* (5). BCA mediet beskrivs som användbart för prover med liten bakgrundsflora som till exempel kött och vävnadsprover. Detta odlingsmedium är dock mycket mindre selektiv än t.ex. ett PLET medium vilket gör att BCA inte lämpar sig för isolering av *B. anthracis* från miljöprover som till exempel vatten och jord där en stor bakgrund av *Bacillus spp.* förekommer.

4.2.2 *Burkholderia spp*

För odling av *Burkholderia spp.* används på FOI MacConkey agar (Oxoid). Förutom Hästblodagar så inkluderades också Ashdown, ett odlingsmedium som i litteraturen anses som lämpligt för att isolera *B. pseudomallei* från kliniska prover. Ashdown är selektivt då det innehåller gentamicin samt tillsats av neutral rött som absorberas av *B. pseudomallei* och ger en karaktäristisk färg på bakteriekolonierna (2). TSM är beteckningen på ett nytt medium som SMI tagit del av genom ett samarbete med en forskargrupp utanför Sverige. Mediet är ännu inte publicerat men baseras på ett basal medium med tillsats av trimethoprim-sulfamethoxazole, polymyxin och sterilt defibrinerat blod från får (Mutton). Fördelen med mediet är att kolonier av *Burkholderia spp.* får en specifik morfologi; mycket små och färgade kolonier med en omgivande grön zon.

4.2.3 *Francisella tularensis*

För odling av *Francisella* används på SMI och SVA en "Tul agar" som är baserad på en baktotryptos agar med tillsats av bland annat kaninblod (5%) (Bilaga B). På FOI används i huvudsak Modified Thayer-Martin agar (McLeod) som också baseras på en baktoagar men istället för blod innehåller tillsats med frystorkat hemoglobin (10). Från litteraturen valdes de Brain Heart Infusion (BHI) baserade odlingsmedierna T4 och T5 med och utan antibiotika selektion, då de bland annat visat sig vara mycket lämpliga för snabb tillväxt av en *F. tularensis holarctica* stam (FSC 200) (6). Den selektiva formen av odlingsmediet, T4, har också använts för att isolera *Francisella spp.* från kontaminerat brunnsvatten (11). Vidare valdes också det selektiva chokladagarmediet (CHAB-PACCV) på grund av att det använts för att isolera *Francisella spp.* från komplexa miljöprover som havsvatten och sjögräs (9).

4.2.4 *Yersinia pestis*

Odling av *Y. pestis* sker på FOI med Yersinia Selective Agar Base (YSAB, Difco) som innehåller tillsats av bland annat irgasan och olika typer antibiotika (Bilaga B). På SMI och SVA används Hästblodagarplatta för rutinmässig odling av *Y. pestis* (Bilaga B). I övningen inkluderades också ett medium som betecknas BIN vilket har en bas av brain heart infusion agar med tillsatser av bland annat irgasan, cholat salter,

nystatin och kristallviolett (3). Enligt Ber et al 2003 skall BIN fungera bättre än MacConkey (Difco) och YSAB för isolering av *Y. pestis* från matriser med bakgrundsflora. Även MacConkey och blodagarbas (BAB) inkluderades i övningen (Bilaga C).

Tabell 2. Urval av fasta odlingsmedier/agarplattor, som utvärderades i övningen; beredningsställe (lodrätt) samt fördelning av agens mellan myndigheterna vid övningen (vågrätt). Medier som valts ut från litteraturen (Litteratur) bereddes av den myndighet som utförde det laborativa arbetet för aktuellt agens. T.ex. Odling av *B. anthracis* utfördes på SVA vilka också producerade BCA mediet. För recept se Bilaga B och C.

	Agens	SMI		SVA	FOI	LITTERATUR		
SVA	<i>B. anthracis</i>	Hästblodagar		Hästblodagar	PLET	BCA		
SMI	<i>B. mallei</i>	Hästblodagar		Hästblodagar	MacConkey	Ashdown	TSM #	
	<i>B. pseudomallei</i>	Hästblodagar		Hästblodagar	MacConkey	Ashdown	TSM #	
FOI	<i>F. t. tularensis</i>	Tul	Tul (s)	Tul	McLeod	CHAB	T4	T5
	<i>F. t. holarctica</i>	Tul	Tul (s)	Tul	McLeod	CHAB	T4	T5
	<i>Y. pestis</i>	Hästblodagar		Hästblodagar	YSAB	BIN	BAB	MacConkey

TSM från SMI samarbete

4.3 ÖVNING

Vid övningen noterades tiden till avläsning som den tid då agarplattorna bedömdes vara räkningsbara. Antal bakteriekolonier på agarplattorna, dvs. viable counts (V.C.) noterades också. Bakterieväxt på respektive odlingsmedium dokumenterades genom fotografering vid avläsningstillfället (Figur 1 till 6).

4.3.1 *Bacillus anthracis*

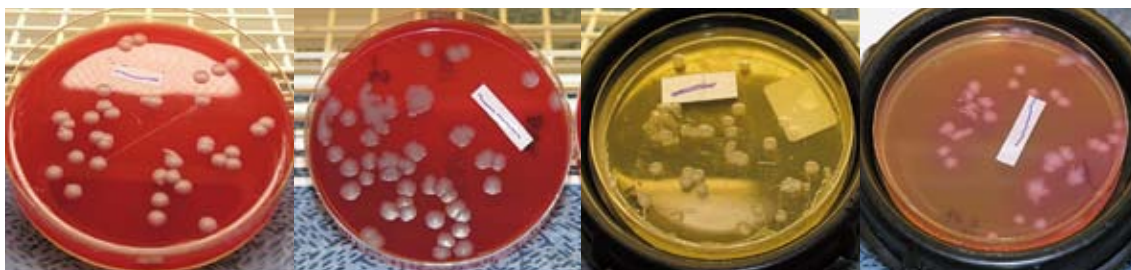
Vid odling av *B. anthracis* observerades avläsningsbar tillväxt efter 18 timmars inkubation (Tabell 3). Antal kolonier per agarplatta kunde räknas på samma spädning för alla odlingsmedier vilket tyder på likvärdigt utbyte. Morfologin hos bakteriekolonierna varierade beroende på odlingsmedium (Figur 1). Typisk *Bacillus* morfologi med utflytande kolonier, luddig yta och diffusa kanter observerades på Hästblodagar berett av SVA och på BCA. Tydligt färgomslag av kolonierna till rosa sågs vid odling på BCA där en uppklarning runt kolonierna observerades efter 48 timmar. Odling på Hästblodagar berett av SMI gav definierade och vaxartade något *E. coli* liknande morfologi på bakteriekolonier. Samma typ av morfologi sågs vid odling av *B. anthracis* på PLET.

Tabell 3. Tid till avläsning i timmar och antal kolonier av *B. anthracis* BKT 47219/11. Bakteriekolonier räknade från (10⁻⁵) spädning. Avläsning - bedömdes som den tid då agarplattorna ansågs vara räkningsbara.

Medium	Avläsning (h)	Antal kolonier	Beredning
Hästblodagar	18	40	SMI
Hästblodagar	18	50	SVA
PLET (s)	18	25	FOI
BCA Oxoid (s)	18	30	SVA

(s) selektiv

Figur 1. *Bacillus anthracis* inkuberade på agarplattor och fotograferade efter 42h inkubering och -5 spädning. Från vänster; Hästblodagar (SMI), Hästblodagar (SVA), PLET (FOI) och BCA Oxoid. Papperet med strecket användes som hjälp för att underlätta vid fotodokumenteringen för att kameran skulle hitta fokus.



4.3.2 *Burkholderia spp*

Tillväxt studerades för *Burkholderia mallei* och *Burkholderia pseudomallei* (Tabell 4). Växt av *B. pseudomallei* på de olika odlingsmedierna var likartad både vad gäller tid till avläsning, och antal kolonier. Alla agarplattorna kunde avläsas på 10-5 spädningen efter 42h inkubering. Undantaget var odling på TSM som kunde avläsas först efter 66h. Vid odling av *B. pseudomallei* observerades en antydan till kolonier redan vid 18h på Hästblodagar och MacConkey agar. Då *B. pseudomallei* odlades på Hästblodagar var bakteriekolonierna stjärnformiga, på MacConkey var kolonierna rosa med en vit hinna, på Ashdown sågs små mörklila kolonier och på TSM sågs en grön zon av uppkläring runt kolonierna (Figur 2).

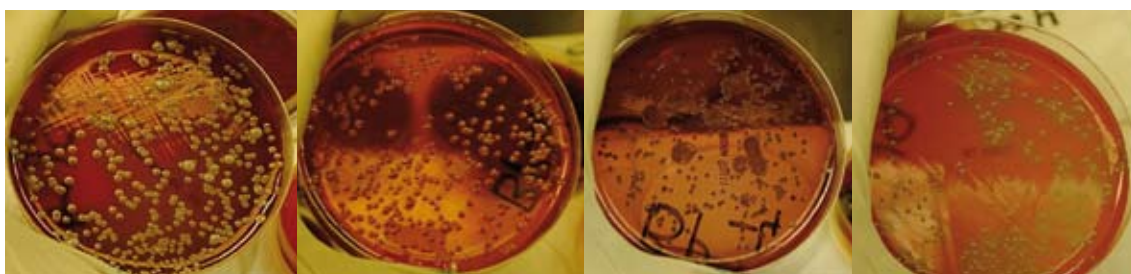
B. mallei uppvisade avläsningsbara kolonier efter 66h på Hästblodagar (Tabell 4). Agarplattor avlästes på -6 spädning. Då övningen avslutades efter 72 timmar sågs ingen växt av *B. mallei* på MacConkey, Ashdown och TSM (figur saknas).

Tabell 4. Tid till avläsning i timmar och antal kolonier *Burkholderia mallei* 10245 China 5 och *pseudomallei* 8708 Bendler B. Bakteriekolonier räknade från (10-6/-5) spädning. Avläsning - bedömdes som den tid då agarplattorna ansågs vara räkningsbara.

Medium	B. mallei		B. pseudomallei		
	Avläsning (h)	Antal kolonier	Avläsning (h)	Antal kolonier	Beredning
Hästblodagar	66	51	42	38	SMI
Hästblodagar	66	80	42	37	SVA
MacConkey	e.n.	-	42	37	FOI
Ashdown (s)	e.n.	-	42	33	SMI
TSM (s)	e.n.	-	66	32	SMI

(s) selektiv; e.n. ej noterad inom 72h

Figur 2. *B. pseudomallei* odlad på, från vänster: Hästblodagar, MacConkey (FOI), Ashdown och TSM (Litteratur). Fotograferat efter 42h inkubering och 10-4 spädning.



4.3.3 *Francisella tularensis*

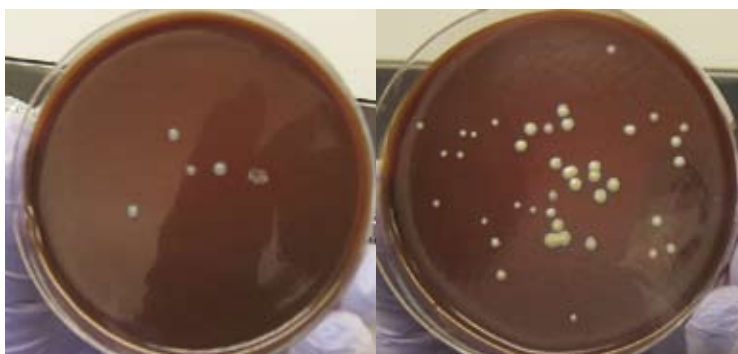
Vid övningen studerades två *F. tularensis* stammar; en *F. t. tularensis* och en *F. t. holarctica*. Tiden till att avläsning av agarplattorna var möjlig varierade mellan bakteriestammarna men också mellan de olika odlingsmedierna. Generellt så var odlingar med *F. t. tularensis* möjliga att läsa av något tidigare än odlingar med *F. t. holarctica* stammen (Tabell 5). Undantaget var växt av *F. t. holarctica* på CHAB där *F. t. holarctica* växte något snabbare än *F. t. tularensis* (Figur 3). CHAB var också det odlingsmedium där tiden till avläsningsbara agarplattor var längst, 7 dygns inkubering jämfört med något enstaka dygns inkubering som räckte för tillväxt av bakterien på Tul. Alla agarplattor kunde avläsas från 10⁻⁷ spädningen, undantaget *F. t. tularensis* stammen odlad på CHAB som räknades på 10⁻⁵ spädning. Små variationer i bakteriernas (*F. t. tularensis* och *F. t. holarctica*) morfologi observerades beroende på odlingsmedium (Figur 4 och 5). Det fanns också skillnaden i tillväxt på odlingsplattor med samma recept men berett på olika laboratorier (Tul).

Tabell 5. Tid till avläsning i timmar och antal bakteriekolonier *F. t. tularensis* FSC 237 och *F. t. holarctica* FSC 200. Kolonier räknade från (10⁻⁷) spädning. Avläsning - bedömdes som den tid då agarplattorna ansågs vara räkningsbara.

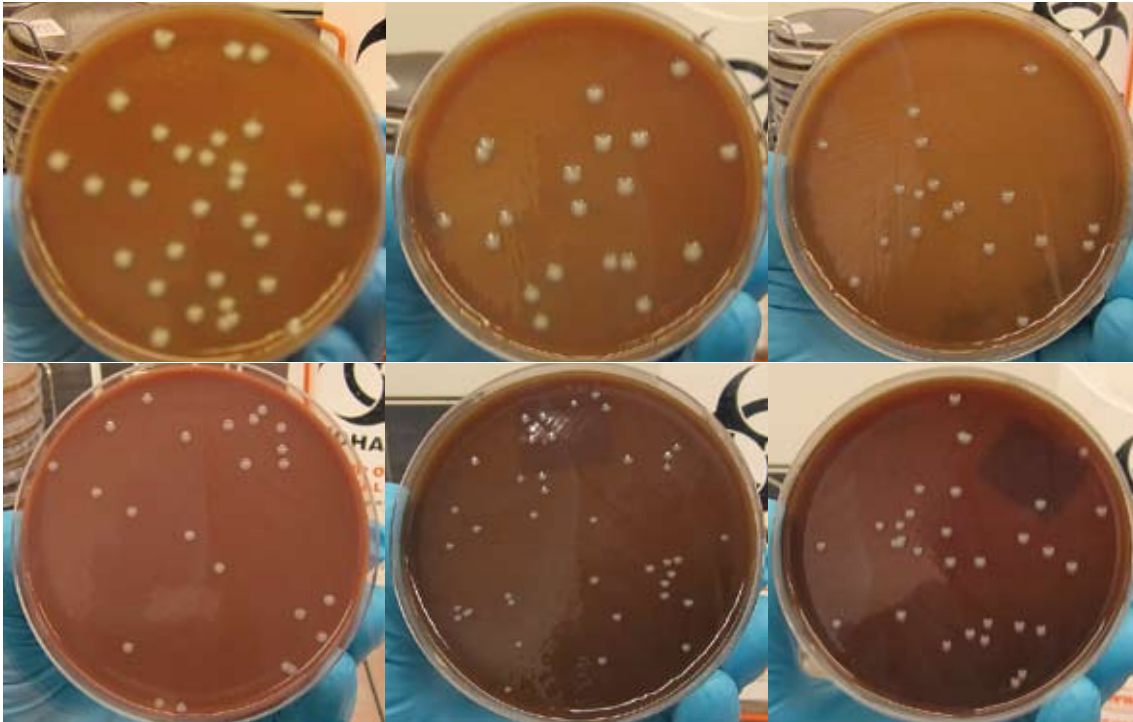
Medium	<i>F. tularensis tularensis</i>		<i>F. tularensis holarctica</i>		Beredning
	Avläsning (h)	Antal kolonier	Avläsning (h)	Antal kolonier	
Tul	23	30	46	53	SMI
Tul (s)	28	19	46	61	SMI
Tul	46	19	164	62	SVA
McLeod	66	22	73	59	FOI
T4 (s)	66	37	164	61	FOI
T5	66	34	73	62	FOI
CHAB (s)	235	4*	164	1	FOI

(s) selektiv; *Avläst från 10⁻⁵ spädning

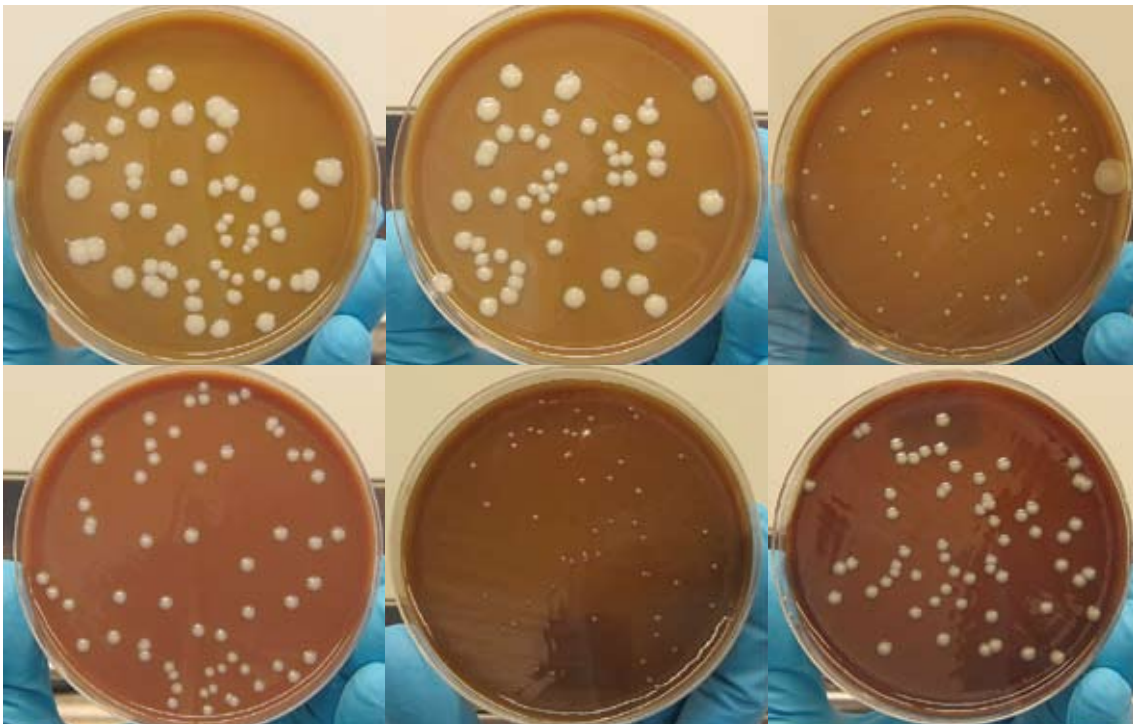
Figur 3. *F. tularensis tularensis* (t.v. 10⁻⁵ spädning) och *F. tularensis holarctica* (t.h. 10⁻⁶ spädning) på CHAB (s) fotograferad efter två veckors inkubering.



Figur 4. Agarplattor med *F. t. tularensis* fotograferade dag 5 (120h), spädning 10-7. Från övre vänstra hörnet Tul, Tul (s) (båda SMI), Tul (SVA), McLeod (FOI), T4 (s) och T5.



Figur 5. Agarplattor med *F. t. holarctica* fotograferade dag 7 (164h), spädning 10-7. Från övre vänstra hörnet; Tul, Tul (s) (båda SMI), Tul (SVA), McLeod (FOI), T4 (s) och T5.



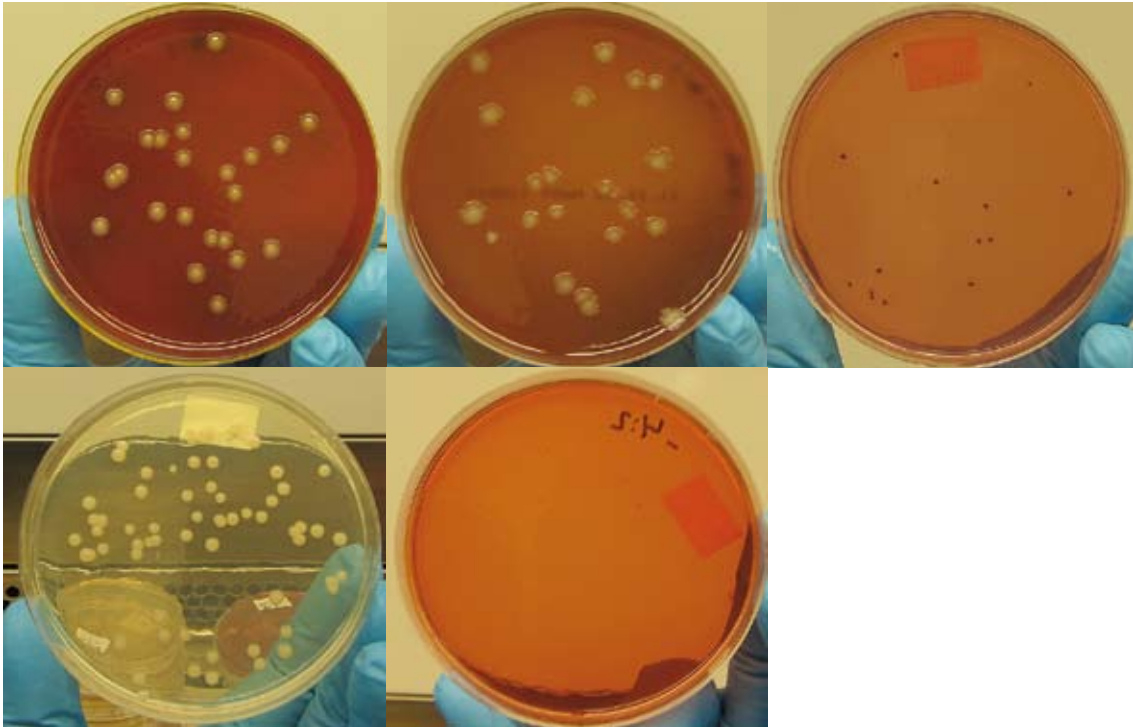
4.3.4 *Yersinia pestis*

Odlingen av *Yersinia pestis* på de utvalda odlingsmedierna resulterade i stora skillnader både vad gäller utbyte, antal bakteriekolonier som växte, och koloniernas morfologi. På Hästblodagar växte *Y. pestis* snabbt och kunde avläsas efter två dygn (Tabell 6). Bakteriekolonierna skilde sig morfologiskt mellan Hästblodagar tillverkad på SVA och SMI (Figur 6). På Hästblodagar från SMI sågs bakteriekolonierna gula och definierade medan kolonierna på SVAs hästblodagar uppvisade röd/lila kolonier med oregelbundna kanter. På YSAB växte *Y. pestis* som mycket små och mörkröda kolonier. På BIN observerades ingen växt efter sju dygns inkubation (bild saknas). BAB genererade god och relativt snabb växt av *Y. pestis* som gula definierade kolonier. På MacConkey kunde antydning till växt av små rosa/bruna bakteriekolonier observeras efter en veckas inkubering.

Tabell 6. Tid till avläsning i timmar och antal kolonier av *Y. pestis* 87-020. Bakteriekolonier är räknade från varierande spädning vilket anges av ^{-x}. Avläsning - bedömdes som den tid då agarplattorna ansågs vara räkningsbara (s) – selektiv.

Medium	Avläsning (h)	Antal kolonier	Beredning
Hästblodagar	49	20 ⁻⁶	SMI
Hästblodagar	49	16 ⁻⁶	SVA
YSAB (s)	88	12 ⁻⁴	FOI
BIN (s)	inte inom 160h	-	FOI
BAB	69	41 ⁻⁵	FOI
MacConkey	160	5 ⁻⁴	FOI

Figur 6. Agarplattor med *Y. pestis* fotograferade efter 7 dagars inkubation. Från övre vänstra hörnet; Hästblodagar (SMI) -6, Hästblodagar (SVA) -6, YSAB -4, BIN ingen växt, BAB -5 och MacConkey.



5. DISKUSSION

För att harmonisera odlingsmetodik för bakteriella riskklass 3 organismer mellan FBD myndigheterna Livsmedelsverket, Smittskyddsinstitutet, Statens Veterinärmedicinska anstalt samt Totalförsvarets Forskningsinstitut fokuserade denna studie på att utvärdera fasta medium för odling av *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* och *Burkholderia spp.*.

En inledande inventering över de odlingsmedier som används vid myndigheterna visade att verksamhet med rutinmässig diagnostik lett till val av odlingsmedier som genererar snabb tillväxt av flera riskklass 3 organismer från matriser med liten bakgrundsflora (eg. Hästblodagar och Tul). För odling från mer komplexa matriser som livsmedel, miljöprover och kliniska prover med blandflora finns ett behov för vidare utveckling av odlingsmedium och metoder som anrikning och selektivitet. Merparten av den litteratur som är publicerad på området är gammal (> 50år) men med ny metodik för högupplöst identifiering av bakterier som t.ex. MALDI TOF MS, där odling krävs som ett första steg, finns ett förnyat intresset för odlingsmetodik och därmed ökar publiceringen inom området starkt.

Vid odlingsövningen fanns skillnader i bakterietillväxt och kolonimorfologi på odlingsmedium med samma grundrecept men berett på två olika laboratorier. Som exempel fanns skillnader i tillväxthastighet främst vid odling av långsamt växande bakterier som *F. tularensis*. Även morfologiska skillnader på bakteriekolonier observerades då samma bakteriestam odlades på olika odlingsmedium. Skillnader skulle bland annat kunna bero på att hästblodet som ingår i Hästblodagar behandlats olika inför beredning av agarplattorna. Vid SMI används defibrinerat blod och vid SVA används citratbehandlat blod. Båda behandlingarna förebygger koagulering men defibrinerat blod har mycket liten tendens att kелera metalljoner, detta resulterar ofta i frodigare kolonier jämfört med odling på medium baserat på citratbehandlat blod.

Vid odling av *B. anthracis* på BCA och Hästblodagar från SVA observeras den typiska fenotypen med utflytande luddiga kolonier. Vid odling av *B. anthracis* på PLET och Hästblodagar från SMI var kolonierna definierade i konturen och vaxartade, nästan *E.coli*-lika. Förutom typen av blod som ingår i medieberedningen kan även ålder på agarplattan och dess fuktighet påverka bakteriemorfologin. Vid övningen var målsättningen att minimera sådan påverkan genom att odlingsmedierna producerades under samma tid (SMI v41, SVA v44 och FOI v43). För att minska risken för att varierande fuktighet och temperatur på agarplattorna skulle påverka bakterietillväxten och morfologin inkuberades alla agarplattor 30 minuter i 37°C innan användning.

Även kolonier av *Y. pestis* varierade i morfologi beroende på vilket odlingsmedium som användes. På BAB noterades *E. coli*-liknande gula kolonier, på YSAB små mörkröda kolonier och på Hästblodagar utflytande gulaktiga kolonier. Förutom morfologiska skillnader som kan bero på innehållet i odlingsmediet eller agarplattans ålder (som diskuterat ovan) uppstår också skillnader i morfologin hos de testade bakterierna beroende på kolonins mognadsgrad det vill säga dess ålder. För att kunna identifiera ett visst agens på agarplatta vid kontamination eller blandflora, underlättar det därför att parallellt inkludera en positiv odlingskontroll och ha tillgång till en snabb och enkel typningsmetod (realtids PCR eller MALDI-TOF) för att säkerställa identiteten hos en bakteriekoloni innan vidare analys eller utställning av remiss svar.

Ytterligare en aspekt att ta hänsyn till vad gäller odlingsmetodik är att vissa prover kan innehålla ett mycket litet antal av eftersökt organism eller en stor andel organismer som befinner sig i vilande tillstånd (dvs. levande men ej odlingsbara). Vid sådana tillfällen är utbytet av bakterier på odlingsmediet viktigt. Det vill säga att optimera odlingsmetoden för att så stor andel som möjligt av ett eftersökt agens växer.

Detta kan till exempel innebära ett anrikningssteg. Under denna övning var utbytet eller antalet bakterier som växte på odlingsmedierna, mätt i V.C., jämförbart vad gäller de odlingsmedier som testades för tillväxt av *B. anthracis*, *Burkholderia* och *F. tularensis*. Undantaget CHAB mediet där endast en liten andel av *F. tularensis* växte. Däremot varierade växten mycket på de olika odlingsmedierna som testades för växt av *Y. pestis* både vad gällde utbyte (V.C.) och tillväxthastighet.

Att det främst är vid odling av *F. tularensis* och *Y. pestis* som skillnader i tid till avläsning observerades kan bero på att bakterierna är tillräckligt långsamväxande för att skillnader kan observeras även vid kontroll 2 gånger per dygn. För en långsamväxande bakterie som *F. tularensis* blir avvägningen mellan selektivitet och utbyte särskilt viktig vid odling från komplexa matriser där *F. tularensis* konkurrerar med snabbväxande bakgrundsflora. Komponenter i ett odlingsmedium som ger snabb växt av ett specifikt agens gynnar ofta även tillväxt av organismer från den bakgrundsflora som förekommer i många matriser, t ex i vatten, jord eller i kliniska prover med hög bakgrundsflora. Detta leder till överväxt av snabbväxande kontaminanter på agarplattan vilket försvårar eller omöjliggör odling och identifiering av den eftersökta organismen. För att undvika växt av kontaminanter kan man därför modifiera sitt medium för att bättre gynna bara en specifik organism (eg. ett selektivt medium). Detta görs ofta genom tillsats av antibiotika eller andra antimikrobiella ämnen. Selektion i ett odlingsmedium kan dock ge långsammare tillväxt och mindre kolonier av den eftersökta organismen, något som kan vara viktigt att ta hänsyn till vid odling från prover med låg frekvens av ett agens. I sådana fall krävs en avvägning mellan selektivitet och utbyte. Denna övning fokuserades på tillväxthastighet, tid till avläsning, som mått på odlingsmediers kvalitet och hade inte som primärt syfte att omfatta selektivitet. Däremot jämfördes bakterieväxt på odlingsmedier med identiskt grundrecept men med och utan selektion.

Odling på selektivt medium (T4) påverkade tillväxthastigheten av *F. tularensis* och framför allt *F. t. holarctica* negativt jämfört med odling på samma medium utan selektion (T5) (Figur 4 och 5). I andra fall hade selektion mindre betydelse till exempel då *F. tularensis* odlades på Tul medium med och utan selektion. Denna skillnad kan bero på vilka ämnen som används för selektivitet men möjligen också den typ av blod som används i odlingsmedierna (Tul och Tul (s) – kanin och T4 (s) och T5 - får). Selektionen i T4 består av amphotericin B, vancomycin, trimethoprim och cefsulodin. Selektionen i Tul (s) består i penicillin, polymyxin B och cyklohexamid. I de mycket selektiva färbloodsbaserade CHAB PACCV finns tillsats av polymyxin B, amphotericin B, cefepime-maxipime, cyclohexamide och vancomycin. Denna sammansättning påverkade kraftigt tillväxthastigheten av *F. tularensis* där agarplattor var avläsningsbara först efter en veckas inkubering (Figur 3). När selektiva medier används för odling av bakteriella agens innebär det ofta att det krävs en längre inkuberingstid än normalt vid odling från t.ex. Hästblodagar eller Tul.

En annan aspekt på val av odlingsmedium är den typ av analys som den odlade organismen sedan skall användas till. Det finns t.ex. studier som visar att *F. tularensis* som vuxit i BHI baserat odlingsmedium uppvisar en aktivitet som är snarlikt uttrycket i bakterien vid infektion av makrofager (7). Det vill säga, mediet som organismen växer på liknar miljön i en makrofag.

Ett mål för projektet var att rekommendera ett FBD choice medium för odling av *B. anthracis*, *Burkholderia spp.*, *F. tularensis* och *Y. pestis* med kriterier som gott utbyte och snabb tillväxt från rena kulturer. Resultatet av övningen visar att detta uppfylls av de odlingsmedier som rutinmässigt används på SMI och SVA, Hästblodagar samt Tul-agar. Under övningen observerades skillnader i odlingsresultat mellan bakteriestammar, i de fall där flera stammar testats, vilket innebär att resultaten inte bör ses som generell och gällanden för alla stammar inom samma art. Generellt, och även för riskklass 3 agens, är det viktigt att vara medveten och uppmärksam om att stamspecifika avvikelser kan förekomma med avseende på morfologi, utbyte och tillväxthastighet. Användningen av FBD choice medium bör avgränsas till den matris som det är utvärderat för, i detta fall rena kulturer.

6. SLUTSATSER

- Det finns god erfarenhet av rutinmässig odling av berörda riskklass 3 agens från kliniska prover vid flera av FBD myndigheterna. Detta utgör en god grund för vidare harmonisering av odlingsmetodiker inom forumet. I denna studie har också befintlig kunskap kring odling av vissa organismer och odling från vissa matriser identifierats t.ex. erfarenheter från odling av *B. anthracis* i livsmedel och *F. tularensis* i miljöprov. Arbetet inom FBD projekt 10 har möjliggjort att sådan kunskap kommuniceras och sprids mellan myndigheter. Begränsningen vid odling ligger ofta i förmågan att odla ett visst agens från ett komplext prov, baserat på selektion, eller att få enstaka organismer i ett prov att växa på odlingsmedium, genom anrikning. Frågeställningar kring selektivitet och anrikning berör också komplexa matriser som livsmedel och miljöprover av olika slag men är även aktuella i fall med kliniska prover med hög bakgrundsflora. Det är en utmaning i att hitta en balans mellan snabbväxande och selektiva odlingsmedia. Selektiviteten kan påverka tillväxten negativt men skapar samtidigt nödvändigt utrymme för ett agens att växa i förhållande till övriga mikroorganismer i provet.
- Under övningen som genomfördes hösten 2011 påvisades att resultatskillnader vid odling vid olika laboratorier kan uppstå redan vid beredningen av odlingsmedium. Medium berett av olika laboratorier men efter samma recept gav varierande resultat i bakterieväxt mätt i tid till avläsning och kolonimorfologi. Generellt drogs slutsatsen att vid odling från kliniska prover med liten bakgrund från andra mikroorganismer så rekommenderas Hästblodagar (för odling av *B. anthracis*, *Burkholderia* och *Y. pestis*) samt Tul (för odling av *F. tularensis*). Dessa odlingsmedier genererar både snabb tillväxt och bra utbyte av de renkulturer som testades i övningen. Resultatet bygger dock på ett litet underlag med endast en stam som representant för varje agens. Fördelen med Hästblodagar är att det är ett medium som fungerar för odling av flera agens (*B. anthracis*, *Burkholderia* och *Y. pestis*), begränsningen ligger i att mediet inte är selektiv vilket ökar risken för överväxt i de fall (matriser) där hög bakgrundsflora förekommer.
- En stor vinst från årets projekt är etableringen av kommunikationsvägar mellan myndigheterna. Dessa nya kontakter möjliggör en mer intuitiv samverkan. Det operativa momentet (odlingsövningen) belyste hur viktigt det är att det finns en etablerad kommunikationsväg, det vill säga att det finns rutiner för hur resultat dokumenteras och kommuniceras, för att möjliggöra förmedling av resultat samt en likvärdig tolkning av resultat oberoende av vilka personer som är inkopplade och vilken myndighet man representerar. Operativt handlar det om förmågan att identifiera morfologier på olika medium samt att likformigt gradera tillväxt. Särskilt utmanande är behovet av att morfologiskt kunna identifiera en specifik organism på ett specifikt odlingsmedium med kontaminerande bakgrundsflora. Att identifiera kolonier via bilder är svårt, för att utföra detta krävs övning och erfarenhet, sådan kunskap är ofta personbunden.

7. FÖRSLAG PÅ FORTSATT VERKSAMHET

Under 2011 har projektet grundlagt en kunskapsmässig bas för vidare utveckling av en harmoniserad odlingsmetodik inom FBD. Sammantaget finns det goda kunskaper och erfarenheter kring odling (olika agens och matriser) fördelat över myndigheterna (FOI, Livsmedelsverket, SMI och SVA). Detta utgör en god grund för att vidare kompetensutbyte och harmonisering mellan myndigheter blir givande för alla parter.

Det finns ytterligare behov av att vidare harmonisera odlingsmetodik, det vill säga metoder för selektivitet och anrikning från komplexa matriser. Utbyte rörande dessa metoder utvecklar ingående myndigheters förmåga till odling från miljöprov, livsmedel och ”gamla” kliniska prover med hög bakgrundsflora vilket motiverar en fortsättning av projektet under 2012.

En planering för framtida behov av odling inom forumet bör innehålla strategier om hur odlingsmetoder kan kopplas till efterföljande analyser för att redan i ett tidigt skede i harmoniseringen kunna bedöma begränsningar och kvalitetskrav på odlingsmetoder. En strategi bör också innehålla en beskrivning av vilka provmatriser som kan vara aktuella för analys inom FBD.

8. BILAGOR

Bilagor (A-C) – finns på FBD:s interna Wiki, under projekt 10 2011. Finns även att tillgå vid förfrågan.

Bilaga A – Resultatmall

Bilaga B – Recept över fasta odlingsmedier som används vid FBD myndigheterna vid odling av riskklass 3 organismerna: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* och *Burkholderia spp.*

Bilaga C – Sammanställning av litteratursökning på publicerade arbeten med odlingsmedium för *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* och *Burkholderia spp.* Författare, tidsskrift, recept på medium, resultat, fördelar och nackdelar med mediet samt en kort summering.

9. REFERENSER

1. Andersson, A., K. Malm, M. Granberg, A. Peterzon, K. Sandstedt, and J. Ågren. 2011. Detektion av *Francisella tularensis*. Swedish Forum for Biopreparedness Diagnostics report 2011.
2. Ashdown, L. R. 1979. An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. *Pathology* 11:293-297.
3. Ber, R., E. Mamroud, M. Aftalion, A. Tidhar, D. Gur, Y. Flashner, and S. Cohen. 2003. Development of an improved selective agar medium for isolation of *Yersinia pestis*. *Appl Environ Microbiol* 69:5787-5792.
4. Bäckman, S., S. Garbom, T. Boskani, G. Bölske, S. Sternberg-Lewerin, and A. Lundin Zumpe. 2011. Logistik och analysövning. Swedish Forum for Biopreparedness Diagnostics report 7.
5. Cheun, H. I., S. I. Makino, M. Watarai, T. Shirahata, I. Uchida, and K. Takeshi. 2001. A simple and sensitive detection system for *Bacillus anthracis* in meat and tissue. *J Appl Microbiol* 91:421-426.
6. Forsman, M., M. Chu, S. Cowley, A. Johansson, R. Grunow, and J. Petersen. 2009. Report on the tularemia wetlab exercise, FOI, Umeå, Sweden.
7. Hazlett, K., S. Caldon, D. McArthur, K. Cirillo, G. Kirimanjeswara, M. Magguilli, M. Malik, A. Shah, S. Broderick, I. Golovliov, D. Metzger, K. Rajan, T. Sellati, and D. Loegering. 2008. Adaptation of *Francisella tularensis* to the mammalian environment is governed by cues which can be mimicked in vitro. *Infect Immun* 76:4479-4488.
8. Knisely, R. F. 1966. Selective medium for *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 92:784-786.
9. Petersen, J., J. Carlson, B. Yockey, S. Pillai, C. Kuske, G. Garbalena, S. Pottumarthy, and L. Chalcraft. 2009. Direct isolation of *Francisella* spp. from environmental samples. *Lett Appl Microbiol* 48:663-667.
10. Sandström, G., A. Tärnvik, H. Wolf-Watz, and S. Löfgren. 1984. Antigen from *Francisella tularensis*: nonidentity between determinants participating in cell-mediated and humoral reactions. *Infection and immunity* 45:101-106.
11. Simşek, H., M. Taner, A. Karadenizli, M. Ertek, and H. Vahaboğlu. 2012. Identification of *Francisella tularensis* by both culture and real-time TaqMan PCR methods from environmental water specimens in outbreak areas where tularemia cases were not previously reported. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9:2353-2357.

