



JÖNKÖPING UNIVERSITY
School of Health and Welfare

Utvärdering av Copan Eswab™ för viabilitet av bakterier

HUVUDOMRÅDE: *Biomedicinsk laboratorievetenskap*

FÖRFATTARE: *Leonardo Hagman, Olof Hannu*

HANDLEDARE: *Sara Mernelius, Pia Karlsson*

EXAMINATOR: *Emma Carlsson*

JÖNKÖPING 2017 Juni

Sammanfattning

Bakterier har alltid haft en stor inverkan på mänskligheten. För att diagnostisera bakteriella sjukdomar och behandla dem krävs identifiering av bakterien eller bakteriens relevanta egenskaper. Transportmedium har utvecklats för att hålla bakterierna vid liv från provtagning till analys. Syftet med studien var att utvärdera bakteriers viabilitet i det vätskebaserade mediet Copan Eswab jämfört med kolmedium (Copan swab). Bakterierna som ingick i studien var *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Niesseria gonorrhoeae* och *Fusobacterium nucleatum*. Förutom jämförande mellan medierna genomfördes en jämförelse mellan Eswab i kyl och i rumstemperatur. Resultaten för *H. influenzae* (n=9) och *N. gonorrhoeae* (n=9) visade att Eswab gav lika många eller fler överlevande bakterier. Gällande *F. nucleatum* (n=9) visade resultaten att fler överlevde i Copan swab (Copanpinnar) de första 28 timmarna, men även att bakterien inte klarar mer än 28 timmar i rumstemperatur. Gällande *S. pneumoniae* (n=9) och *C. jejuni* (n=9) gav båda opålitliga svar. Ytterligare mätpunkter och studier krävs för att erhålla mer pålitliga resultat gällande hur länge bakterierna överlever i Eswab.

Nyckelord: Eswab, *Haemophilus influenzae*, *Niesseria gonorrhoeae*, *Fusobacterium nucleatum*, transportmedium

Summary

Evaluation of Copan Eswab™ for viability of bacteria

Bacteria have always had a great influence on mankind. To diagnose any bacterial disease and treat it it's necessary to identify the bacteria or any relevant attributes. Different types of specimen transport have been developed to keep the bacteria alive from sampling until the analysis is performed. The purpose of the study was to evaluate the viability of bacteria in the fluid-based media Copan Eswab™ compared with charcoal medium (Copan swab). Bacteria included in the study were: *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Niesseria gonorrhoeae* and *Fusobacterium nucleatum*. The study also tried to compare how bacteria survived in Eswab which was refrigerated and in Eswab room temperature. Results for *H. influenzae* (n=9) and *N. gonorrhoeae* (n=9) showed that an equal amount or more of the bacteria survived in Eswab. More of *F. nucleatum* (n=9) survived in Copan swab (Copan swab sticks) for the first 28 hours, additionally they showed that the bacteria won't survive more than 28 hours in room temperature. Regarding *S. pneumoniae* (n=9) and *C. jejuni* (n=9) both displayed unreliable results. Overall more measurements and additional studies are needed for more reliable results.

Keywords: Eswab, *Haemophilus influenzae*, *Niesseria gonorrhoeae*, *Fusobacterium nucleatum*, specimen transport

Innehållsförteckning

Inledning	1
Bakgrund	2
Patogener	2
Odlings- och transport-medium	3
Copan Eswab™	4
Copan swab.....	4
Odlingsmedium	4
Syfte	5
Material och metod	6
Studiedesign.....	6
Provbredning.....	6
Utodling.....	6
Beräkning av CFU	8
Statistik	8
Etiska överväganden.....	8
Resultat	9
<i>S. aureus</i>	9
<i>H. influenzae</i>	10
<i>F. nucleatum</i>	11
<i>S. pneumoniae</i>	12
<i>N. gonorrhoeae</i>	13
<i>C. jejuni</i>	14
Diskussion	15
Resultatdiskussion.....	15
Metoddiskussion.....	18
Slutsatser	19
Omnämmanden	19
Referenser	20

Inledning

Bakterier har alltid haft en stor inverkan på mänskligheten. Bakterier kan ge upphov till problem som exempelvis diarré, förkylning och sexuellt överförbara sjukdomar. I vissa fall kan infektion leda till pandemier vilka skördar miljontals människors liv. För att diagnostisera bakteriella sjukdomar och behandla dem krävs någon form identifiering av bakterien eller bakteriens relevanta egenskaper. Analyserna kan delas in i genotyp- eller fenotyp-analyser där genotypning ger information om bakteriernas gener och fenotypning om deras egenskaper. Analyser kan endast genomföras om det finns tillgång till provmaterial med bakterierna och gällande deras egenskaper måste bakterierna vara vid liv. I moderna samhällen som Sverige genomförs en provtagning av sjukvårdspersonal eller av patienten. Provet skickas därefter vidare till ett mikrobiologiskt laboratorium som utför analyserna (1, 2).

Om bakteriekolonier påvisas efter inkubering visar det inte bara att det finns en möjlig patogen i provet utan möjliggör också för vidare analyser på bakterien i fråga (1). Många bakterier är känsliga och klarar inte att leva länge utanför rätt miljö eller utan vissa ämnen vilket medför problem när provmaterialet ska transporteras till laboratoriet. Ett exempel är *Neisseria gonorrhoeae* som är känslig mot förändring i fuktighet och temperatur. Den är också känd för att ha färre överlevande bakterier i transportmedel över tid jämfört med andra bakterier (1, 3, 4). Antalet kolonibildande bakterier (CFU) per ml kan variera kraftigt i proverna. Det är dock vanligt att det är mer än $1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml i patientprov (5, 6, 7)

Det första steget som vanligtvis utförs när ett bakterieprov ankommer till laboratoriet är att försöka odla ut provet på ett passande medium. Inokulering måste utföras med lämplig teknik och inkubation av bakterien måste ske i rätt miljö för att bakterierna ska kunna tillväxa (1). För att ta reda på vilken sorts bakterie det rör sig om och egenskaperna krävs att enskilda kolonier existerar. Om det finns mer än en bakterie från samma prov måste de urskiljas åt och vidare analyser ske på båda för sig (1). Det behövs också ett fungerade transportmedel. Om rätt miljö inte bibehålls i transportmediet eller om transportmediet inte innehåller ämnen som bevarar bakteriekulturen kan bakterien riskera att dö alternativt tillväxa, vilket kan resultera i att fel provsvar svaras ut. Därför är det viktigt att transportmedierna fungerar som de ska (1, 8).

Bakgrund

Patogener

Staphylococcus aureus finns i människans normalflora på hud, nasopharynx, perineum och näsan där den inte orsakar infektion hos friska personer. Vid trauma eller nedsatt immunförsvar kan *S. aureus* orsaka allvarliga infektioner som exempelvis toxic shock syndrome (TSS), endokardit och staphylococcal scaled syndrome (SSS) (1, 3, 9). Bakterien kan tillväxa och överleva i en mängd olika miljöer (10). Den är en grampositiv kock, vilken sprids till andra personer genom direktkontakt. För att infektera en värd och skydda sig mot immunförsvaret har *S. aureus* ett flertal virulensfaktorer. Protein A gör att bakterien kan binda till Fc-delen på IgG antikroppar. Därmed kan bakterien undgå delar av kroppens immunförsvar i vissa fall. Meticillinresistent *S. aureus* (MRSA) är en variant av bakterien vilken har utvecklat resistens mot betalaktam, som är den reaktiva delen i beta-laktamantibiotika. Resistensen kan leda till problem vid behandling. Vid diagnostik av *S. aureus* odlas bakterien ut på blodagar. Kolonierna är oftast starkt betahemolyserande och har en krämig gul färg, är lätt genomskinliga samt konvexa (1, 3, 9). Vid misstänkt MRSA utförs utökade analyser för att verifiera bakterien. Ett exempel på analys är PCR som kan används för att identifiera resistensgenen *mecA*. Genen kodar för resistensen mot meticillin hos bakterien (1, 9, 11).

Haemophilus influenzae är en fakultativ anaerob och gramnegativ kockobacill som bland annat kan orsaka infektion i övre luftvägarna. Bakterien kan sprida sig och orsaka sjukdomstillstånd som systemisk eller respiratorisk lunginflammation (1, 12, 13). Tidigare stod *H. influenzae* serotyp b för 95 % av totala antalet infektioner som orsakats av *H. influenzae*. Idag finns vaccin som förhindra infektion *H. influenzae* serotyp b. Hittills har sex stycken serotyper av bakterien identifierats (typ a-f) (13, 14). Beroende på om *H. influenzae* har en polysackaridkapsel eller inte kan den delas in i varianterna icke-typningsbar eller typningsbar, där polysackaridkapsel gör att den klassas som typningsbar. Om ingen polysackaridkapsel finns klassas den som icke-typningsbar (12). Systemiska sjukdomar som orsakas av *H. influenzae* beror huvudsakligen av inkapslade typningsbara stammar. Luftvägsrelaterade infektioner orsakas av icke-typningsbara stammar. Bakterien sprids troligen genom droppsmitta eller att en person kommer i kontakt med sekret från en infekterad person. Den kan växa både aerobt och anaerobt då bakterien är fakultativ anaerob (1, 3, 13). Optimal tillväxtmiljö för *H. influenzae* är 5–10 % koldioxid i 35–37 °C. Kolonierna kan antingen vara platta eller konvexa med lätt gulaktig färg (1, 3). På laboratorier odlas bakterien vanligtvis ut på chokladagarplattor, vilka innehåller faktor X (hemin) och faktor V (nikotinamidadenindinukleotid). De här två faktorerna krävs för tillväxt (1, 3, 12). Bakterien är känslig för små temperaturförändringar och kan lätt torka ut. Den bör därför odlas ut snabbast möjligt efter provtagning (1).

Fusobacterium nucleatum finns i munhålan hos både friska och sjuka människor. Bakterien är en gramnegativ bacill, vilken kan orsaka parodontala sjukdomar som parodontit men även infektioner i nacken och lungorna (1, 15). Den kan binda till ett flertal olika däggdjursceller som exempelvis epitelceller, endotelceller, monocyter och erythrocyter genom adhesion. Bakterien kan på så vis sprida sig och undgå immunförsvaret (15). Bakterien är fusiform, vilket betyder att den till formen är tjockare i mitten men smalnar av ut mot kanterna. Ibland kan även förstörade delar beskådas inuti bakterien. Bakterien är obligat anaerob och dör snabbt när den utsätts för syre. Den tillväxer bra på blodagar där den kan bilda kristallliknande fläckar (3).

Streptococcus pneumoniae är en fakultativ anaerob och grampositiv kock. Bakterien finns normalt i den övre respiratoriska normalfloran samt i normalfloran i nasofarynx. Då den är patogen orsakar den vanligtvis bakteriell meningit, öroninflammation, lunginflammation och sepsis (1, 16, 17). Spridning utav bakterien sker när personer kommer i direktkontakt med kontaminerad respiratorisk sekret (1). Den primära virulensfaktorn hos *S. pneumoniae* är en skyddande polysackaridkapsel som skyddar bakterien mot fagocytos (1, 3, 17). Vid utodling av *S. pneumoniae* på laboratorier används blod- eller choklad-agarplattor. Den optimala tillväxtmiljön för inkubering gällande *S. pneumoniae* är 36°C i 5–10% koldioxid. Bakterien tillväxer med små grå kolonier vilka faller ner i mitten. Kolonierna är lätt glänsande och alfahemolyserande (1, 16).

Neisseria gonorrhoeae är en gramnegativ diplokock. Den enda naturliga värden för *N. gonorrhoeae* är människor där den orsakar könssjukdomen gonorré. Bakterien överförs normalt via samlag genom att fästa på slemhinnorna i cervix, urinrören hos män, anorektala ytor eller svalgytor där den sedan penetrerar cellernas väggar och förökar sig (1, 18). Den fäster och tar sig in i värdcellerna genom att använda sig utav proteinerna Pili, PorB och Opa. Pilin binder till humana celler som saknar cilier som epitelceller i äggledare, vagina och munhålan. PorB förhindrar att *N. gonorrhoeae* fagocyteras intracellulärt genom att hämma fagolysosmelfusion i neutrofila granulocyter. Opa hjälper till att fästa till eukaryota celler (19). Provtagning och utodling bör ej ske i kalla eller torra miljöer då gonokocker riskerar att dö. De är också relativt känsliga för mindre temperaturförändringar (4, 14, 19). Kolonierna kan ha olika utseende fast det är samma bakterie från samma källa. De är oftast mindre, konvexa, vitgrå, skinande och kan ha irreguljära eller mjuka kanter (1, 3).

Campylobacter jejuni är en gramnegativ stav som vanligtvis förekommer hos fåglar. Människor smittas genom zoonotiska infektioner, ofta av mat som inte värmts upp tillräckligt (14, 20, 21). Bakterien kan orsaka feber, buksmärtor och diarré genom histologiska skador på jejunum, ileum och kolon (14, 20, 22). Vid diagnostik på laboratorier får bakterien tillväxa under minst två dagar i ett värmeskåp som håller temperaturen 42°C i kombination med en syrereducerad miljö (5–7%) och ökad koldioxidmiljö (5–10%) (14, 20, 21). Kolonierna hos *C. jejuni* är grå och lätt mukoida. Bakterien är motil vilket gör att den kan flyta ut från kolonierna på agarmediet (1, 3).

Odlings- och transport-medium

Ett viktigt steg i provkedjan från att ett prov tagits till att det svaras ut är transporten. Många bakterier är känsliga för pH-, temperatur- eller syrehalt-förändringar. Därför är det viktigt att transportmediet är förslutet. Bakterierna måste också kunna överleva tillräckligt länge för att klara sig under transporttiden. Mediet de befinner sig i måste därför innehålla lagom mängd av näringsämnen. Ett annat sätt bakterierna kan dö på är att bakterien över tid bildar restprodukter vilket i sin tur ökar tills de dör. Mediet måste därför innehålla ämnen vilka hindrar bildning av restprodukter eller neutraliserar dem. Bakterier vill gärna växa till sig och öka i antal om de får möjlighet. Mediet måste då inte bara hindra att de dör utan också förhindra att de växer till (1, 8).

Copan Eswab™

Copan Italia S.p.A. (Brescia, Italy) är ett italienskt företag som framställt transportmediet Eswab™ för transport av provmaterial som innehåller svamp, bakterier och/eller virus (23). Eswab består av en plastpinne som i spetsen är täckt med en flockad yta med nylonfibrer som sprayats på pinnen. Nylonfibrerna ger en förbättrad kapillärverkan och starkare hydrauliskt upptag utav vätskor. Därmed bidrar de till en förbättrad uppsamling utav celler vid provtagning jämfört med normala fiberlindade pinnar. Pinnen placeras efter provtagning i ett transportrör. För att eluera provmaterialet och erhålla en optimal miljö för bakterierna innehåller transportröret 1 ml flytande amies medium, vilket är en vätska som upprätthåller bakteriekulturen i Eswab (24). Efter provtagning bryts toppen på pinnen av och därefter skruvas ett lock på. När locket är påskruvat hålls pinnen fast av stödmaterial och pinnen med provmaterial kan därefter transporteras till laboratoriet (18, 24).

Copan swab

Copan swab (copanpinnar) är ett transportmedium som tillverkats av samma företag som Eswab™ (Copan Italia S.p.A., Brescia, Italy). Produkten består utav ett transportrör innehållande amies i gel och kol samt en bomullspinne som placeras i röret efter provtagning. Amiesgel är en vanligt förekommande tillsats vid transport av mikroorganismer. För att förhindra att känsliga bakterier dör innehåller gelen kol som absorberar fettsyror i provet. (1, 25).

Odlingsmedium

Blodagarplattor är en agarbas vilken består utav en proteinkälla, natriumklorid, sojabönproteinuppslutning, innehåller en liten mängd naturlig karbohydrat och blod från vanligtvis får, häst eller kanin (1, 14). Chokladagar är en variant av blodagar. Skillnaden mellan chokladar och blodagar är att när chokladagarplattor tillverkas lyseras blodcellerna. Det ger mediet en brun färg som ger namnet. Lyseringen leder till att näringsämnen som hemoglobin, hemin (faktor X) och nikotinamidadenindinukleotid (faktor V) frisätts. Vissa bakterier behöver näringsämnena för sin metabolism och tillväxt (1, 14).

Campagarplattor är ett medium som används för att odla ut bakteriesläktet *Campylobacter spp.* Normalt består den utav en *Campylobacter* selektiv agarbas samt avjoniserat vatten (26). Länssjukhuset Ryhov använder supplementen Fungiozone, Amphoericin B och Cefoperzone (Pia Karlsson, personlig kommunikation).

Syfte

Syftet med studien var att utvärdera bakteriers viabilitet i det vätskebaserade mediet Copan Eswab™ jämfört med kolmedium.

Material och metod

Studiedesign

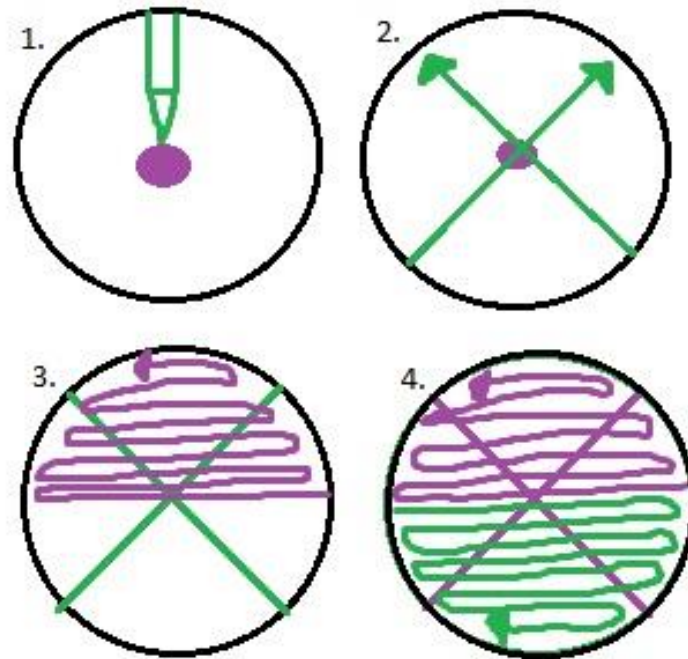
I studien ingick bakterierna *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *C. jejuni*, *S. aureus*, *F. nucleatum* och *N. gonorrhoeae*. Bakterierna som valdes ut hade olika egenskaper, kom från olika familjer och kan leva på olika ställen i människokroppen. De hade varierade behov gällande temperatur, atmosfär och näringskrav för tillväxt och överlevnad. Urval av bakterier begränsades av tillgång på lagrade bakteriestammar och material samt hälsorisker. Studien utfördes på mikrobiologen på länsjukhuset Ryhov i Jönköping.

Provbredning

En suspension för respektive bakterie gjordes som motsvarade absorbansen för 0,5 McFarland standard, vilket gav teoretiskt $1,5 \cdot 10^8$ kolonibildande bakterier per ml. Av bakteriesuspensionen pipetterades 0,1 ml ner i sex stycken Eswab samt tolv stycken provrör. I varje provrör sattes en bomullspinne från en copanpinne som därefter fick stå i fem minuter och absorbera provvätskan. Tre utav Eswabproverna förvarades i temperaturen 4–8 °C och tre rör förvarades i rumstemperatur. För bakterierna *C. jejuni* CCUG 11284, *H. influenzae* ATCC 49776, *S. aureus* CCUG och *S. pneumoniae* ATCC 49619 förvarades nio copanpinnar i 4-8 °C under 24, 48 och 72 timmar, tre pinnar för varje tidpunkt där de sedan odlades ut. Dessutom användes de tre resterande copanpinnarna till nollprov för att ha en grov uppskattning om antalet bakterier vid start. Samma utodling genomfördes för varje Eswab. *F. nucleatum* CCUG 9126 och *N. gonorrhoeae* CCUG 33978 förvarades i 18, 24 och 28 timmar i 4-8 °C och rumstemperatur då bakterierna var kända för att ha svårt att överleva under en längre tid i copanpinnar och Eswab.

Utodling

För att odla ut en bakterie från ett copanpinne togs bomullspinnen ut och placerades i ett provrör innehållande 0,9 ml fysiologisk koksaltlösning. Röret vortexades sedan i 10–15 sekunder. En tiospädning gjordes därefter från provröret genom att 0,1 ml pipetterades upp och överfördes till ett nytt provrör innehållande 0,9 ml fysiologisk koksaltlösning. Det nya provröret vortexades i 5 sekunder och en tiospädning på samma sätt utfördes tills fyra rör med olika kända tiospädningar från varje copanpinne erhållits. Från varje provrör pipetterades 0,1 ml upp och applicerades på en platta med passande agarmedium för bakterien. Provmaterialet ströks ut med en inokuleringspinne med stjärnteknik (se figur 1).



Figur 1. 1. Vätskan som skulle inokuleras pipetterades i mitten av plattan. 2. Två diagonala singelstryk genomfördes i formen av ett kryss med vätskan. 3. Med en ny inokuleringspinne vinklad i 45° ströks vätskan ut från mitten och ut mot kanterna på halva plattan i ett sick-sackmönster. 4. Punkt tre upprepades igen med en ny inokuleringspinne för andra halvan av plattan, vilket gjorde att hela plattan täcktes.

Innan tiospädningar testades en annan metod på spädning med *S. aureus*. Metoden visade sig inte vara optimal för att erhålla mellan 30 och 300 kolonier vid alla koncentrationer av CFU/ml. Spädningarna modifierades och metoden optimerades till tiospädningar vilket gav alla de resultat som redovisas i studien.

Bakterierna *F. nucleatum*, *S. pneumoniae* och *S. aureus* odlades ut på blodagarplatta. För *C. jejuni* användes campagar som odlingsmedium. Bakterierna *H. influenzae* och *N. gonorrhoeae* utodlades på chokladagar. Bakteriernas inkuberingsförhållanden presenteras i nedanstående tabell (se tabell I). Spädning av Eswab utfördes med liknande metod som för copanpinnarna. Avvikande var att 0,1 ml vätska avlägsnades från Eswab med pipett och placerades därefter i 0,9 ml fysiologisk koksaltlösning. Från spädningen genomfördes ytterligare tiospädningar, samt inokulering och inkubation på agarplattor på samma sätt som för copanpinnarna.

Tabell I. Sammanställning av tidpunkter, odlingsmedium, inkubationstider och atmosfärer som använts för alla bakterier. Tiderna inom parentes var utodlingstider vid det andra tillfället för respektive bakterie.

	Utodlingspunkter från nollprov (timmar)	Odlingsmedium	Inkubations Temperatur (°C)	Atmosfär (koncentration)
<i>S. aureus</i>	0, 24, 48, 72 (0, 24, 48)	Blodagar	36	Aerobt
<i>C. jejuni</i>	0, 24, 48, 72	Campagar	42	Aerobt CO ² 5 %
<i>H. influenzae</i>	0, 24, 48, 72	Chokladagar	36	Aerobt CO ² 5 %
<i>F. nucleatum</i>	0, 24, 48, 72	Blodagar	36	Anaerobt
<i>N. gonorrhoeae</i>	0, 18, 24, 28 (6, 12, 24)	Chokladagar	36	Aerobt CO ² 5 %
<i>S. pneumoniae</i>	0, 18, 24, 28 (48, 72)	Blodagar	36	Aerobt CO ² 5 %

Beräkning av CFU

Antalet CFU bestämdes genom att manuellt räkna kolonierna som tillväxt på agarplattan. För att en koloni skulle godtas upprättades specifika riktlinjer. Kolonierna fick inte nudda varandra och behövde vara tillräckligt stora för att lätt kunna urskiljas på plattan. Utseendet hos en koloni behövde även vara desamma som beskrevs i litteraturen.

Om antalet kolonier per platta hamnade mellan 30 och 100 användes plattorna till uträkningar. Förändring av antalet kolonier från nollprov för varje bakterie redovisas i linjediagram. För agarplattor där ett värde mellan 30 och 100 inte kunde erhållas användes den platta vilken hade värden mellan 101 och 300. Om två plattor erhöll värden inom det godkända intervallet 30 och 100 kolonier beräknades ett medelvärde. Resultatet för en platta uteslöts dessutom om det uppfyllde två kriterier. Ifall den hade mellan 30 och 300 kolonier vid två eller mer tiopotenser ifrån än de andra två utodlingarna vid samma mätpunkt. Ifall den hade mellan 30 och 300 och hade en koncentration vilken inte passade in mot trendlinjen med de andra två koncentrationerna bredvid från samma prov.

Statistik

Resultaten för varje transportmedium jämfördes mot varandra med hjälp av wilcoxon's teckenpartest i SPSS version 23.0, med en 5 % signifikansnivå. Vad som beräknas är hur sannolikt det är att mätvärdena är samma.

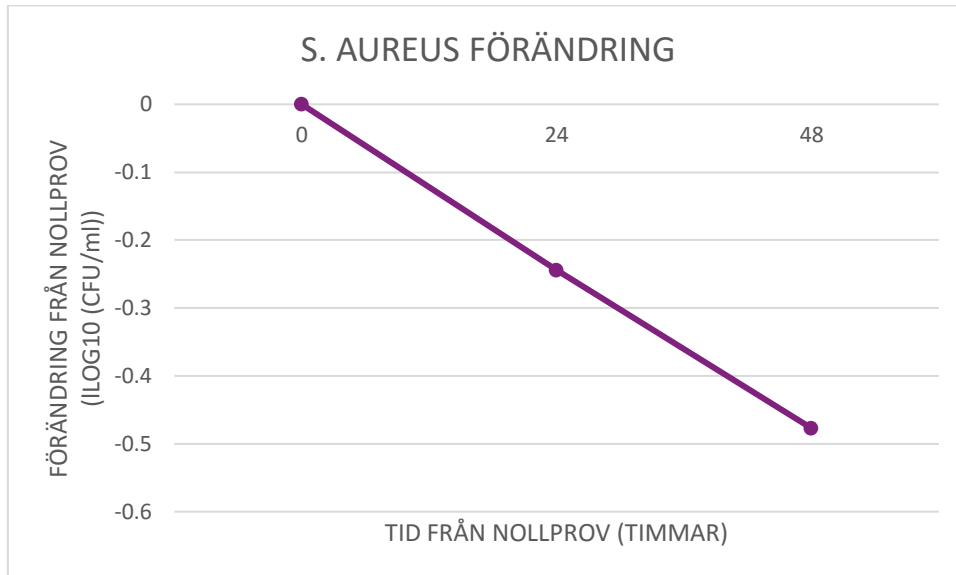
Etiska överväganden

Bakterierna som användes i studien är referensstammar. Inga patientprover eller patientinformation ingick.

Resultat

S. aureus

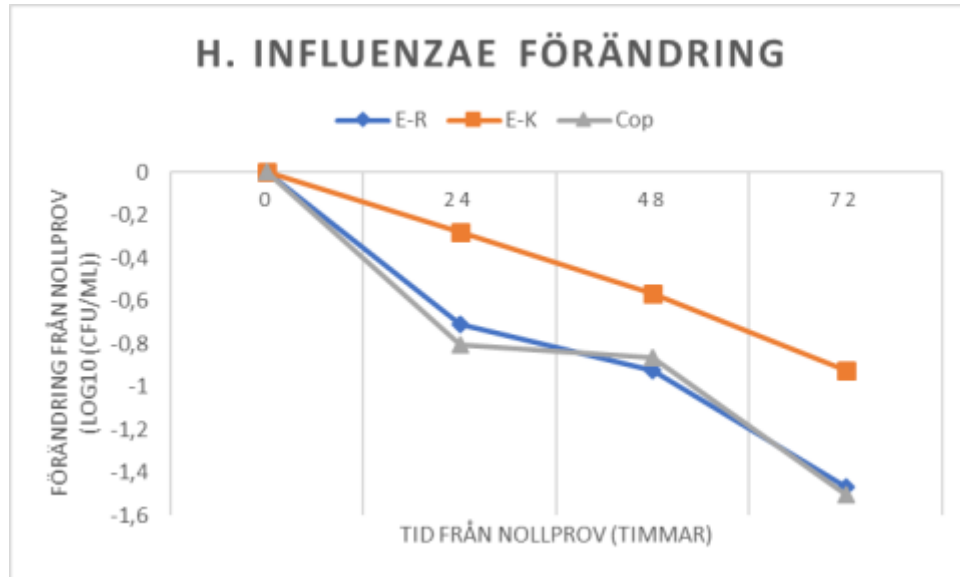
Då inga resultatvärden kunde användas från den första varianten av metoden gällande både Eswab och copanpinnarna modifierades metoden om. Bakterien odlades på nytt ut med endast kyltempererad Eswab vid mätpunkterna 0, 24 och 48 timmar (se figur 2).



Figur 2. Y-axeln representerar medelvärdena för förändring i \log_{10} CFU/ml från nollprov för *S. aureus*. X-axeln representerar tid från nollprov i enheten timmar. Provet förvarades i Eswab vilken befann sig i 4–8 °C. Bara Eswab i kyl odlades ut vid tillfället. Förändringen i \log_{10} CFU/ml beräknades genom att ta antalet uträknade CFU/ml för varje punkt och sedan dela det med antalet CFU/ml för nollpunkten och sedan ta tionde logaritmen på värden.

H. influenzae

Bakterien *H. influenzae* odlades ut efter 0, 24, 48 och 72 timmar ifrån Eswab och copanpinnar (se figur 3).

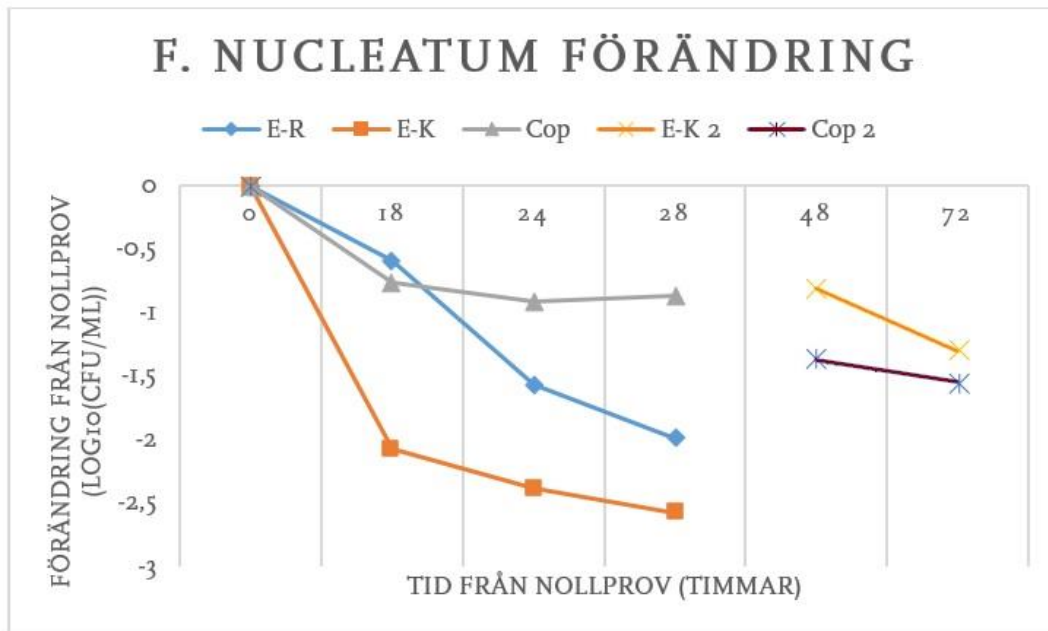


Figur 3. Y-axeln representerar medelvärden för förändring i log₁₀ CFU/ml från nollprov för bakterien *H. influenzae*. X-axeln representerar tid från nollprov i enheten timmar. E-K representerar medelvärdena från de prov från Eswab som förvarades i kyl. E-R redovisar medelvärdena från de Eswab som förvarades i rumstemperatur. Cop visar medelvärdena från de copanpinnar som förvarats i kyl. Förändringen i log₁₀ CFU/ml räknades ut genom att ta antalet framräknade CFU/ml för varje punkt och sedan dela det med antalet CFU/ml för nollpunkten och sedan ta tionde logaritmen på värden.

Statistiska beräkningar för *H. influenzae* visar att det är statistisk fler som överlever för Eswab i kyl än för copanpinnar (n=9) när alla mätpunkter jämförs tillsammans. Även mellan Eswab i rumstemperatur och Eswab i kyl (n=9) ger kyl statistiskt flest överlevande över tid för *H. influenzae* när alla mätpunkter jämförs tillsammans. Samma statistiska förhållande gäller också vid varje tidpunkt för sig (n=3). Det är ingen statistisk skillnad mellan copanpinnar och Eswab i rumstemperatur (n=9) när alla mätpunkter jämförs tillsammans. Samma statistiska förhållande gäller också vid varje tidpunkt för sig (n=3).

F. nucleatum

Bakterien *F. nucleatum* odlades till en början ut enligt det förbestämda tidpunkterna 18, 24 och 28 timmar ifrån nollprovet. Därefter gjordes nya prover med copanpinnar och Eswab som odlades ut vid tidpunkterna 48 och 72 timmar (se figur 4).



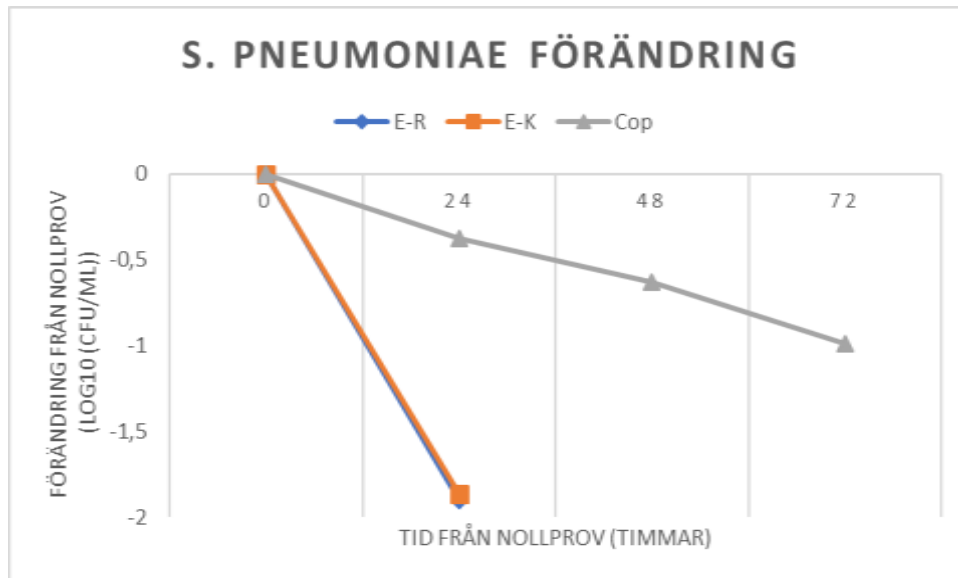
Figur 4. Y-axeln representerar förändring i \log_{10} CFU/ml från nollprov för bakterien *F. nucleatum*. X-axeln representerar tid från nollprov i enheten timmar. E-K representerar medelvärdena från de prov som förvarats i Eswab i kyl. E-R redovisar medelvärdena av de resultat som erhållits av Eswab som förvarats i rumstemperatur. Cop visar medelvärdet för de copanpinnar som förvarats i kyl. E-K 2 redovisar medelvärdet från de nya prov från Eswab som förvarats i kyl. Cop 2 presenterar medelvärdet av de nya resultat som erhållits av copanpinnarna som förvarats i kyla. Förändringen i \log_{10} CFU/ml räknades ut genom att ta antalet framräknade CFU/ml för varje punkt och sedan dela det med antalet CFU/ml för nollpunkten och sedan ta tionde logaritmen på värden.

Statistiskt beräknat har Eswab i kyl minst överlevande över tid gällande de tre första mätpunkterna (18, 24 och 28 timmar, $n=9$) följt av Eswab i rumstemperatur ($n=9$) för *F. nucleatum*. Undantaget är vid 18 timmar där copanpinnarna och Eswab i rumstemperatur har statistiskt sett lika många överlevande bakterier ($n=3$). Samma statistiska förhållande gäller om beräkningar sker på varje mättillfälle för sig för alla förvaringsmetoderna ($n=3$)

Däremot statistiska beräkningar gällande de två senare mätpunkterna (48 och 72 timmar) visar ingen statistisk skillnad mellan Eswab i kyl och copanpinnar ($n=6$) när alla mätpunkter jämförs tillsammans. Samma gäller för varje mätpunkt för sig ($n=3$). Inga kolonier tillväxte för Eswab i rumstemperatur för mätpunkterna 48 och 72 timmar.

S. pneumoniae

Bakterien *S. pneumoniae* i Eswab och copanpinnar odlades ut efter 0, 24, 48 och 72 timmar. Trendlinjen försvinner vid 24 timmar på alla Eswabproven då bakterien inte tillväxte på plattorna (se figur 5).

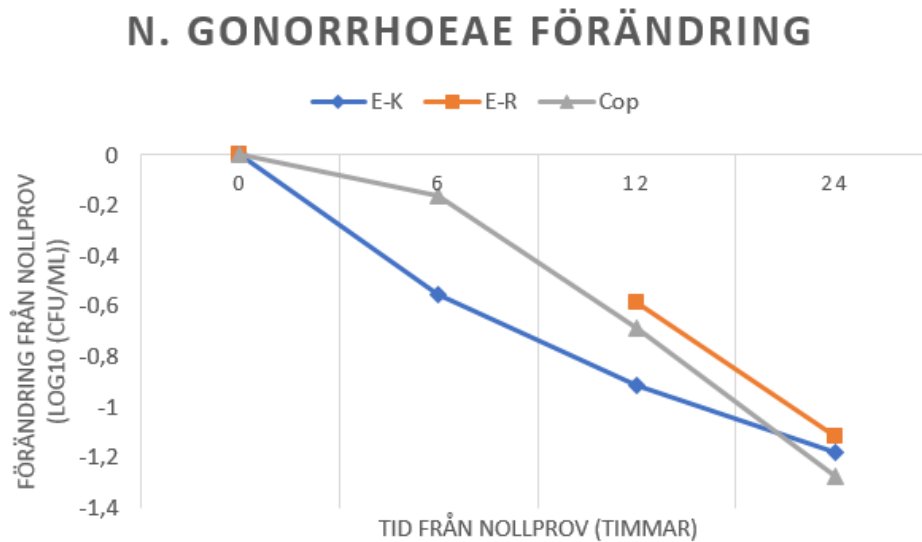


Figur 5. Y-axeln representerar förändring i log₁₀ CFU/ml från nollprov för bakterien *S. pneumoniae*. X-axeln representerar tid från nollprovet i enheten timmar. E-K representerar medelvärdet från de prov från Eswab som förvarades i kyl. E-R representerar resultaten från de Eswab som förvarades i rumstemperatur. Inga kolonier tillväxte vid 24, 48 och 72 timmar på plattorna som odlats ut från E-K och E-R. Cop visar medelvärdet från de copanpinnar som förvarats i kyl. Förändringen i log₁₀ CFU/ml räknades ut genom att ta antalet framräknade CFU/ml för varje punkt och sedan dela det med antalet CFU/ml för nollpunkten och sedan ta tionde logaritmen på värden.

Statistiska beräkningar visar att det är statistisk skillnad mellan Eswab i kyl och copanpinnar (n=3) och även Eswab i rumstemperatur och copanpinnar (n=3) för *S. pneumoniae* vid 24 timmar. Det är ingen statistisk skillnad mellan Eswab i kyl och Eswab i rumstemperatur (n=3) vid 24 timmar.

N. gonorrhoeae

Bakterien *N. gonorrhoeae* odlades ut efter 0, 6, 12 och 24 timmar (se figur 6).

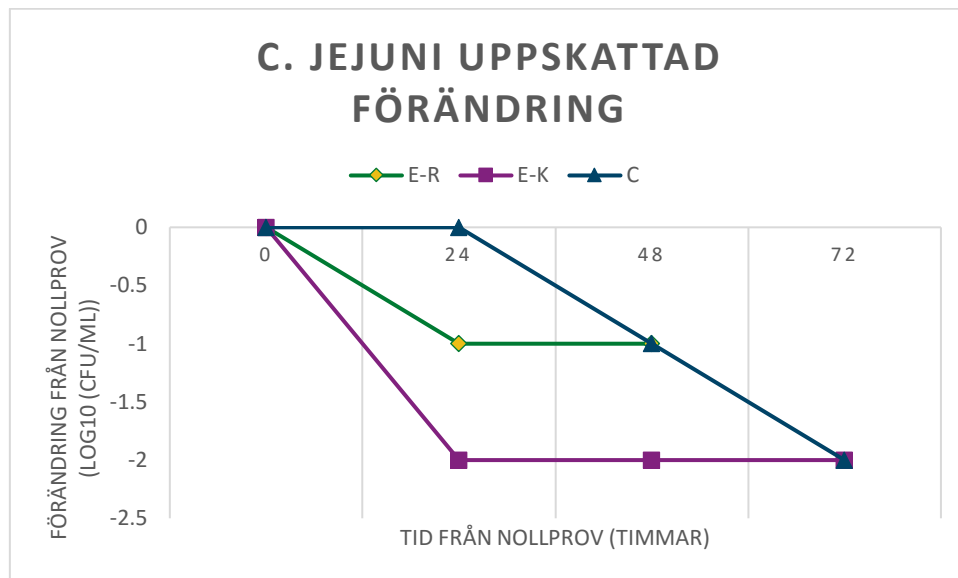


Figur 6. Y-axeln representerar förändring i log₁₀ CFU/ml från nollprov för bakterien *N. gonorrhoeae*. X-axeln representerar förändring i tid från nollprovet i enheten timmar. E-K representerar medelvärdet från de prov från Eswab som förvarades i kyl. E-R representerar medelvärdena från Eswab som förvarades i rumstemperatur. Mätvärde för E-R efter sex timmar saknas då inga kolonier vuxit fram. Cop visar medelvärdet från de copanpinnar som förvarats i kyl. Förändringen i log₁₀ CFU/ml räknades ut genom att ta antalet framräknade CFU/ml för varje punkt och sedan dela det med antalet CFU/ml för nollpunkten och sedan ta tionde logaritmen på värden.

Statistiska beräkningar visar att det inte är någon statistisk skillnad mellan Eswab i kyl, Eswab i rumstemperatur och copanpinnar (n=9 för E-K och Cop, n=6 för E-R) för *N. gonorrhoeae* när alla mätpunkter jämförs statistiskt på samma gång. Det är heller inte någon statistisk skillnad mellan någon av dem vid varje tidpunkt för sig (n=3). Inget av transportmedierna ger statistiskt sett mer överlevande bakterier. Observera att vid 6 timmar växte inga kolonier fram för Eswab i rumstemperatur.

C. jejuni

Beräkning av CFU på agar hos *C. jejuni* försvårades då kolonierna hade flutit ut och täckt över varandra. Endast generella uppskattningar av antalet kolonier som kunde säkerställas beräknas. Det kunde uppskattas vid vilken koncentration bakterien ej gav några kolonier och även när en agarplatta hade mellan 1 och 9 kolonier, 10 och 99 kolonier och när den hade fler än 100 kolonier. Då det var tripplett på varje prov vid varje tidpunkt med ungefär tre olika koncentrationer vilka gav indikationer på rätt koncentration kunde slutsatsen dras inom vilken tiopotens antalet CFU/ml borde ligga. De indikerade tiopotenserna vid varje mätpunkt (0, 24, 48 och 72 timmar från nollpunkt) kunde sedan jämföras mot varandra och redovisas (se figur 7).



Figur 7. E-K representerar Eswab i kyl. E-R visar Eswab i rumstemperatur. C redovisar resultaten från copanpinnarna. Y-axeln motsvarar förändring i antal log₁₀ CFU/ml från nollprov. X-axeln motsvarar antal timmar ifrån nollprov. Alla värden är endast uppskattade då inga säkra värden framgick. Observera att det inte fanns något värde för Eswab i rumstemperatur vid 72 timmar då inga kolonier tillväxte på någon av plattorna.

Diskussion

Syftet med studien var att utvärdera bakteriers viabilitet i det vätskebaserade mediet Copan Eswab jämfört med kolmedium. Rutin är att ställa copanpinnar och Eswab i kyl efter att provtagning är genomförd. Därför var det också av intresse att se hur proverna från Eswab överlevde i rumstemperatur för att simulera att ett prov inte följer rutinen.

Resultaten visar att fler *H. influenzae* överlever i kyltempererad Eswab för alla tidpunkter. Gällande *C. jejuni* är bakteriens resultat svårtolkade, men pekar på de inte överlever mer än 48 timmar i rumstempererad Eswab. För *F. nucleatum* visade resultaten att fler överlevde i copanpinnar de första 28 timmarna, men Eswab i kyl ger lika många överlevande bakterier vid tidpunkterna 48 och 72 timmar som copanpinnarna. *N. gonorrhoeae* överlever lika bra i både Eswab i rumstemperatur och kyl samt även copanpinnarna vid alla tidpunkter.

Resultatdiskussion

Bakterien *S. aureus* odlades ut för att testa metoden. Den första spädningsmetoden som användes gav oanvändbara resultat. Spädningsmetoden modifierades därför till tiospädningar vilket sedan användes för alla andra bakterier. Eftersom Eswab i kyl endast odlades ut med den modifierade metoden som använde tiospädningar kunde de inte jämföras med copanpinnar eller Eswab i rumstemperatur.

Statistiken för *H. influenzae* visade att Eswab i kyl ger statistiskt mer överlevande över tid än både Eswab i rumstemperatur och copanpinnar. Däremot är copanpinnarna och Eswab i rumstemperatur statistiskt lika. Studiens resultat visade att överlevande *H. influenzae* minskade över tid i rumstempererad Eswab ner till $-1,5 \log_{10}$ CFU/ml vid 72 timmar från nollprov. En annan studie har visat samma resultat vid 24 timmar (27). En annan studie har däremot visat motsatt resultat där bakterier har tillväxt över tid vid varje mät punkt för Eswab i rumstemperatur (27). För Eswab i kyl visar den här studiens resultat att bakterien minskar ner till ungefär $-1,5 \log_{10}$ CFU/ml. Två tidigare utförda studier presenterar liknande resultat (27, 28). Enligt det produktblad som ingår med EswabTM redovisade företaget (Copan Italia S.p.A, Brescia, Italy) liknande resultat som den här studien (29).

När *F. nucleatum* odlades ut vid tidpunkterna 0, 18, 24 och 28 timmar överlevde fler bakterier i förhållande till vad som förväntades då bakterien dör snabbt i kontakt med syre (1). Ett nytt försök genomfördes där *F. nucleatum* odlades ut igen vid 0, 48 och 72 timmar för att se hur bakterien överlevde under ännu längre tid. Bakterien var död på Eswabproven i rumstemperatur vid 48 timmar. Problemet var att antalet CFU per koncentration för Eswab kyl var högre vid 48 och 72 timmar vid den nya utodlingen än för samma vid 18, 24 och 28 timmar för den gamla utodlingen. Efter 48 timmar noterades en förändring på $-0,8 \log_{10}$ CFU/ml från nollprovet på Eswab som förvarats i kyl, vilket är en mindre förändring jämfört med proverna som odlats efter 28 timmar ($-2,5 \log_{10}$ CFU/ml från nollprovet). Förklaring till variansen skulle kunna vara att det uppstod ett flertal problem med anaerobklockorna under första försöket. Maskinen som ändrade atmosfären i anaerobklockorna från aerob till anaerob var det lång väntetid på, vilket gjorde att proverna fick stå i aerob atmosfär längre tid än planerat. När väl anaerobklockorna kopplades till maskinen uppstod det problem med katalysatorerna vilket ledde till att

programmet fick startas om vid ett flera tidpunkter innan en anaerob atmosfär kunde upprättas. Vid ett annat tillfälle hade det läckt in syre i en av klockorna.

En orsak till att det blev lägre CFU/ml för Eswab kan vara för att i metoden varje gång bakterien odlas ut ur Eswab öppnas locket och pinnen tas ut. Däremot öppnades copanpinnarna bara en gång eftersom de har gel i sig och inte vätska, vilket gör att pinnen förbrukas. Eswab öppnas en gång vid varje utodlingstillfälle, vilket leder till fler tillfällen där *F. nucleatum* exponeras för syre och därmed fler tillfällen då bakterier dör. Vid 28 timmar har Eswab öppnats tre gånger innan utodling: en gång vid nollprov, en gång till vid 18 timmar och en gång till vid 24 timmar. Efter 24 timmar hade bakteriens CFU minskat med ungefär $-2,4 \log_{10}$ CFU/ml gällande Eswab i kyl. I en annan studie visade *F. nucleatum* en förändring motsvarande ungefär $-2 \log_{10}$ CFU/ml efter 24 timmar på samma medium och temperatur (18). Deras resultat pekar på att fler bakterier överlevt vid 24 timmar än i denna studien. Däremot vid 48 timmar var det ungefär lika många som den här studiens resultat visade (18). Resultaten tillsammans pekar på att mängden överlevande bakterier kan variera. Troligen på grund av bakteriens känslighet mot syre. Enligt det produktblad som ingår med EswabTM erhöll företaget (Copan Italia S.p.A, Brescia, Italy) resultaten $-0,4 \log_{10}$ CFU/ml efter 24 timmar för prov som förvarats i kyl, vilket är fler CFU än denna studiens resultat på $-2,4 \log_{10}$ CFU/ml (29). Efter 48 timmar hade den här studiens resultat visat en förändring på $-0,8 \log_{10}$ CFU/ml, vilket var fler överlevande än företagets redovisade $-1,2 \log_{10}$ CFU/ml. För Eswab som förvarades i rumstemperatur erhöll företaget värdet $-0,6 \log_{10}$ CFU/ml efter 24 timmar och $-1,3 \log_{10}$ CFU/ml efter 48 timmar. Den här studiens resultat visade efter 24 timmar $-1,6 \log_{10}$ CFU/ml, vilket är en tiopotens lägre. På 28 timmars mätpunkt visade den här studiens resultat värdet $-2 \log_{10}$ CFU/ml. Inget värde erhöles vid 48 timmar då inga kolonier växte fram. En annan tidigare studie visar också att förlusten av bakterier i rumstemperatur kan vara mycket större (18). Den här studiens resultat och den tidigare utförda studien tyder på att det finns risk för att mindre antal bakterier överlever i rumstempererad Eswab än vad företaget redovisar.

När *S. pneumoniae* odlades ut på blodagarplattorna första gången hade bakterierna svårt att tillväxa. Efter 48 timmar var bakterien död i Eswab som förvarats i kyl och rumstemperatur. Copanpinnarnas nollprov avvek då inga kolonier tillväxte på nollprovet och efter 24 timmar hade bakterien dött. *S. pneumoniae* odlades om med copanpinnarna för alla tidpunkter för att se ifall det gick att erhålla ett resultat där bakterien inte var död på nollprov. Det andra resultatet är det som redovisas i resultatet (figur 5.). Då första resultatet för Eswab och copanpinnarna skiljde sig gällande överlevnadsgraden på sådant sätt i förhållande till copanpinnarna vid andra tillfället är det troligt att något gick fel vid första utodlingstillfället. I efterhand känns det självklart att även Eswab som förvarats i kyl och rumstemperatur skulle ha gjorts om och inte bara copanpinnarna. En förklaring till varför det inte blev några resultat för copanpinnarna vid första tillfället är att röret med bakteriesuspensionen förväxlats med ett annat rör, vilket bara innehöll fysiologisk koksaltlösning, vid tillsats till copanpinnarna. En annan möjlig felkälla vid första utodlingsförsöket skulle kunna vara att det var svårt att få upp bakterien från agarplattorna då gjorde bakteriesuspensionen gjordes för proverna. Mediet istället för bakterier kan ha höjt absorptionsen, vilket gav färre bakterier. Då copanpinnarnas prover hade en egen bakteriesuspension är det möjligt. Antalet överlevande bakterier i Eswab har i tidigare studier varierat (27, 28, 30) och i en hade avläsning av nollprov redan visat en stor bakterieförlust av *S. pneumoniae* (27). Endast CFU/ml från copanpinnarna erhöles vid alla tidpunkter och då bara för andra tillfället. Det faktum att få värden finns att jämföra med gör att det inte med säkerhet går att säga att det statistiska jämförandet mellan Eswabproven samt copanpinnarna är pålitligt. Om copanpinnarna varierat kraftigt andra gången jämfört mot första är det möjligt att Eswabproven också kan göra det. När företaget (Copan Italia S.p.A, Brescia, Italy) som

tillverkat Eswab™ testade att odla ut *S. pneumoniae* ifrån Eswab som förvarats i kyl erhöles en förändring på $-0,5 \log_{10}$ CFU/ml efter 24 timmar (29). Företaget odlade även ut bakterien efter att Eswab förvarats i rumstemperatur i 24 timmar och fick förändringen $-0,55 \log_{10}$ CFU/ml (29).

I det första försöket odlades *N. gonorrhoeae* efter 0, 18, 24 och 28 timmar. Resultatet gav få kolonier på nollproven. Vid övriga tidpunkter hade bakterien dött. Bakterien odlades ut igen enligt tidpunkterna 0, 6, 12 och 24 timmar. Enligt företaget (Copan Italia S.p.A., Brescia, Italy) ska bakterien överleva upp till 24 timmar i Eswab. Resultatet från andra utodlingsförsöket användes i studien. Efter 24 timmar noterades en förändring på $-1,4 \log_{10}$ CFU/ml. De tidigare resultaten från första utodlingsförsöket gav färre, men inte mer än en tiopotens. Det var ingen statistisk skillnad mellan de tre förvaringssätten. Resultat från andra liknande studier visar att bakterien verkar minska i viabilitet i samma hastighet mot vad som uppvisades under andra utodlingen för både Eswab och liknande temperatur (27, 28, 30). Att bakterien var död vid 6 timmar i rumstemperatur och efter 18 timmar i andra utodlingsförsöket kan ha sin förklaring i att den är mycket känslig. Den kan ha utsatts för något vilket slog ut alla bakterier vid tidigare nämnda tidpunkter. När *N. gonorrhoeae* späddes i koksalt efter 18 timmar i första utodlingsförsöket hade koksaltet inte antagit rumstemperatur då det förvarats i kyl. En annan skillnad var att det var färre CFU/ml i nollproven i första försöket jämfört med andra, vilket gör att minskning i samma takt kunde leda till att inga eller mycket få överlevde vid 24 timmar. Tidigare studier har även visat samma antal i CFU/ml för liknande metoder (30), vilket inte heller är konstigt då *N. gonorrhoeae* är känd för att vara en känslig bakterie (1).

C. jejuni är en långsamt växande och motil bakterie, vilket gjorde det svårt att beräkna kolonierna på agarplattan. Bakteriens motilitet gjorde att den spred ut sig på plattan i form av runda zoner som täckte kolonierna. Svaga uppläringar från kolonier i zonerna kunde ibland synas men övergripande var zonerna otydliga och resulterade i att beräkning av ett flertal kolonier uteblev, vilket gjorde att metoden för bakterien fick gå ifrån den metod som fungerat på de andra bakterierna. Det som kändes säkert att säga var när inga kolonier växte fram, när antalet bakterier var mellan 1 och 9, 10 och 99 samt när de var 100 eller fler. Det var tre-fyra koncentrationer som pekade på vilken tiopotens antalet kolonier var vid varje utodling och tre utodlingar vid varje mätpunkt. Informationen kunde användas för jämförelser. En grov jämförelse gjordes vilken bara visade skillnader i tiopotenser mellan de tre förvaringssätten. Bakterien inkuberades i tre dygn men om den hade fått inkuberas någon dag extra skulle nog fler kolonier synts tydligare då den växer långsamt. Personal vilka arbetar vid mikrobiologen på Ryhov inkuberar *C. jejuni* i 48 timmar, men om bakterien inkuberas över helger kan det bli upp till 96 timmar.

Resultaten visar att *C. jejuni* inte överlever längre än 48 timmar i rumstempererad Eswab. Bakterien minskade kraftigt för Eswab i kyl mellan 0 och 24 timmar, men för de andra två förvaringssätten vid 48 timmar. Efter 72 timmar hade *C. jejuni* i Eswab rumstemperatur troligen dött då inga kolonier växte fram på något av proven. Tidigare studier har visat liknande resultat för Eswab där bakterien inte överlevt mer än 24 timmar i rumstemperatur, men fler överlevt i kyl tempererat (31).

Metoddiskussion

Agarplattor användes vilka hade kolonier mellan 30 och 100 då antalen verkar vara standard. (32, 33, 34, 35). Det finns även en bredare standard gällande plattor vilka har kolonier mellan 30 och 300, vilket gjorde att koloniantal mellan 101 och 300 användes om 30 och 100 inte kunde erhållas (36). Genom att använda tiospädningar blev det lätt att bestämma hur många spädningssteg som skulle användas för varje bakterie för att erhålla mellan 30 och 100 kolonier. Tiospädningar leder då till att utodling utav bakterierna sker snabbare och färre plattor användas. Studien inkluderade flera bakterier som ansågs ha svårt att överleva i transportmedier. Användandet av referensstammar istället för patientprover bidrog till att rätt bakterie odlades ut och minskade risken för kontamination och varierande resultat. Om ett prov behövdes göras om i studien kunde samma bakterie tillhandahållas genom att odla ut stammen på nytt. Skulle arbetet behöva upprepas eller användas till vidare studier kan samma referensstammar användas vilket ökar pålitligheten hos resultaten.

En misstänkt orsak till de varierande resultaten hos copanpinnarna var att mediet i copanpinnarna inte är flytande utan består utav amiesgel. Att det är gel gör att bakterier kan släppa från bomullspinnen i copanpinnarna och stanna kvar i gelen. Då gelen inte används i laborativt arbete kan de leda till förlust av bakterier. När bomullspinnen avlägsnades ur copanpinnarna och vortexades i koksalt följde en del av gelen med. Extra gel kan ha bidragit till att färre eller fler bakterier följt med från pinnen i förhållande till nollprovet. Mer bakterier kunde ha följt med då gelen som omger bomullstoppen innehåller bakterier vilka har släppt från pinnen. Färre kolonier kan ha bildats eftersom amiesgelen innehåller ämnen vilket inhiberar tillväxt och bidragit till att enstaka kolonier inte tillväxt vid utodling på medierna.

En annan orsak till variationen i resultaten för copanpinnarna är att bomullspinnarna placerades i provrör där de fick absorbera den innehållande vätskan. I vissa fall kan det ha varit problem med att absorbera all vätska och små mängder av den kan ha stannat kvar i rören. Därmed blir det lägre antal bakterier i provet. Bomullen på copanpinnarna är inte jämt fördelad. Det är därför möjligt att de släppte ojämnt antal bakterier från pinnarna när det vortexades. Det var svårt att få pinnarna att stå rakt i provrören vilket gjorde att pinnen fick luta emot provrörskanten, vilket kan ha gett en ojämnt fördelad absorption av bakteriesuspensionen. När det gäller Eswab är problemen annorlunda. Det är möjligt att bakterier vilka är känsliga för luft, temperatur och liknande dör i större utsträckning då Eswaben öppnas och stängs vid upprepade tillfällen. Copanpinnarna öppnas bara en gång när de används. Problemet borde vara extra tydligt på *N. gonorrhoeae* och *F. nucleatum*. Då den första är en bakterie som dör för av små förändringar och den andra är en bakterie som dör utav syre. Vortexing av nylonpinnarna i Eswab kan också ge varierande resultat. Det finns inga studier vilka behandlar om de avger alla bakterier i liknande mängd vid vortexing från nylonpinnen och det verkar bara vara teoretiskt att de avger alla. Det är dock troligt att de inte varierar kraftigt från vortexing, speciellt då den initiala suspensionen pipetterades ner i vätskan och inte på pinnen.

Varje gång bakterierna odlades om har det gett nya resultat vilka inte har haft samma förändring över tid likt de tidigare utodlingstillfällena vilket är ett problem. Eftersom flera av de studier som jämförts med den här studiens resultat med visat andra CFU/ml, men också varierande mellan alla de andra studierna också kan det tyda på att fler utodlingar måste ske överlag för varje bakterie.

Slutsatser

Resultaten kan användas som grova riktlinjer och grund för vidare studier men inga säkra slutsatser kan dras då antalet mätvärden är för få. Dessutom var flera av resultaten osäkra. Vad som visade sig i studien var också att nya utodlingar gav nya resultat. Det behövs därför mer studier och fler mätpunkter för säkrare resultat.

Några få slutsatser kan dock dras. De två bakterier som har mest säkra resultat (*N. gonorrhoeae* och *H. influenzae*) visar på jämförbara eller bättre resultat för Eswab. För två av bakterierna dog alla vid rumstemperatur (*F. nucleatum* och *C. jejuni*) efter 48 eller 72 timmar vilket betyder att många bakterier troligen ej klarar rumstemperatur i samma utsträckning som kyltemperatur. De två resultatet var dock mer osäkra.

Omnämmanden

Ett stort tack till Sara Mernelius och Pia Karlsson för handledning och granskning av detta examensarbete. Vi vill även tacka personalen på mikrobiologen på länsjukhuset Ryhov, Jönköping för att ha hjälpt oss med utrustning samt svarat på frågor. Slutligen vill vi tacka Emma Carlsson för bedömning av detta examensarbete.

Referenser

1. Tille P. Diagnostic Microbiology 13th edition. St. Louis, Missouri. Elsevier. 2014, p. 1-3, 62, 81-106, 193-232, 207-227, 404-405, 449-458, 919-929.
2. David R, Florian F, Malgorzata B. Phenotypes and Genotypes. 1st edition. London, Springer London, 2016. p 9-12
3. Church L, Hall G, Koneman E, Janda W, Schreckenberger P, Procop G, Woods G. Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology 7th edition. Philadelphia, United states. 2016 p. 1032-1036.
4. Bhattacharyya S, Gaynor A, Hagan C, Henning T, Jones K, Kalve V, Khubbar M, Papp J, Rudrik T, Travanty E, Xavier K. Recovery of *Neisseria gonorrhoeae* from 4 commercially available transport systems. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease. 2016; 86: 144-7.
5. Bowler P, Hirabayashi S, Suzuki Y, Tachi M, Yonehara Y. Development of an experimental model of infected skin ulcer. International Wound Journal. 2004; 1: 49-55.
6. Levison M, Levison J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. Infect Dis Clin North Am. 2013; 23: 791-7.
7. Knig C, Simmen H. Bacterial concentrations in pus and infected peritoneal fluid – implications for bactericidal activity of antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1998; 42: 227-232.
8. Stuart R. Transport Medium for Specimens in Public Health Bacteriology. Public Health Reports. 1959; 74: 431-8.
9. Davis J, Eichenberger E, Fowler V, Tong S, Holland T. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clinical Microbiology Reviews. 2015; 28: 603-661.
10. Clements M, Chan P, Foster S, Ingham E. The *Staphylococcus aureus* Alternative Sigma Factor Controls the Environmental Stress Response but Not Starvation Survival or Pathogenicity in a Mouse Abscess Model. Journal of Bacteriology. 1998; 180: 6082-89.
11. Mero S, Korkeila M, Pasanen T, Piiparinen H, Tarkka E, Tissari P, Vaara M, Vuopio-Varkila J. A selective broth enrichment combined with real-time nuc-mecA-PCR in the exclusion of MRSA. APMIS. 2010; 118: 74-80.
12. King P. *Haemophilus influenzae* and the lung (*Haemophilus* and the lung). Clinical and Translational Medicine. 2012; 1: 10.
13. Hallström T, Reisbeck K. *Haemophilus influenzae* and the complement system. Trends in Microbiology. 2010; 18: 258-265.
14. Murray P, Pfaller M, Tenover K, Tenaclaw K. Medical Microbiology 7th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012, p. 249-255, 280-281, 296.
15. Han Y. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. Current Opinion in Microbiology. 2015; 23:141-7.
16. Chao Y, Hakansson A, Marks L R, Pettigrew M. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2015; 4:1-16.
17. Bogaert D, Groot D, Hermans P. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. The Lancet Infectious Disease; 4: 144-154.
18. Citron D, Goldstein E, Kerin T, Leoncio E. Comparison of the Copan eSwab System with an Agar Swab Transport System for Maintenance of Fastidious Anaerobic Bacterium Viability. Journal of Clinical Microbiology. 2016; 54: 1364-7.
19. Lai-King N, Martin I. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. The Canadian

- journal of infectious diseases & medical microbiology. 2005; 16: 15-25.
20. Hofreuter D. Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni* Frontiers in cellular and infection microbiology. 2014; 4: 1-19.
 21. Lynn M, Madden R, Pam S. Effect of Incubation Temperature on Isolation of *Campylobacter jejuni* Genotypes from Foodstuffs Enriched in Preston Broth. 2003; 69: 4658.
 22. Anderson R, Epps S, Harvey R, Hume M, Nisbet D, Philips T. Foodborne *Campylobacter*: Infections, Metabolism, Pathogenesis and Reservoirs. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2013; 10: 6292-6304.
 23. Cartuyvls R, Magerman K, Nys S, Vijgen S. Comparison of Copan eSwab with the Copan Venturi Transystem for the quantitative survival of *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* and *Candida albicans*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2010; 29: 453.
 24. Kubasek C, Silbert S, Uy D, Widen R. Comparison of ESwab with Traditional Swabs for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using Two Different Walk-Away Commercial Real-Time PCR Methods. Journal of Clinical Microbiology. 2009; 7: 2641-3.
 25. Copan Italia S.p.A. (Brescia, Italy): Traditional Bacteriology Swab Brochure. <http://www.copanusa.com/products/collection-transport/traditional-bacteriology-transport-swabs/>, 2017 [2017-05-28].
 26. Thermo fisher scientific inc:
CAMPYLOBACTER BLOOD-FREE SELECTIVE AGAR BASE.
http://www.oxid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0739&org=154&c=uk&lang=en 2015 [2017-05-28]
 27. Cheng Y, Min M, Ng L, Sim D, Tan T. Evaluation of bacterial recovery and viability from three different swab transport systems. Pathology. 2014; 46: 230-33.
 28. Audette C, Horn K, Sebeck D, Tucker K. Comparison of the Copan ESwab System with Two Amies Agar Swab Transport Systems for Maintenance of Microorganism Viability. Journal of Clinical Microbiology. 2008; 46: 1655.
 29. Copan Italia S.p.A. (Brescia, Italy): Package Insert. <http://www.copanusa.com/products/collection-transport/eswab/>, 2014 [2017-05-28].
 30. Acevedo V, Carroll K, Hindiyeh M. Comparison of Three Transport Systems (Starplex StarSwab II, the New Copan Vi-Pak Amies Agar Gel Collection and Transport Swabs, and BBL Port-A-Cul) for Maintenance of Anaerobic and Fastidious Aerobic Organisms. Journal of Clinical Microbiology. 2001; 39: 377.
 31. Hirvonen J, Kaukoranta S. Comparison of FecalSwab and ESwab Devices for Storage and Transportation of Diarrheagenic Bacteria. Journal of Clinical Microbiology. 2014; 52: 2334.
 32. Aroonlual L, Bhunia A, Bae E, Fratamico P, Kim H, Rajwa B, Singh A Tang Y. Light Scattering Sensor for Direct Identification of Colonies of *Escherichia coli* Serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145 and O157. PLoS ONE. 2014; 9: 224.
 33. Goh S, Kim Y, Le TH, Liang L, Ng C, Rose J, Yewhoong K. A Comparison of Microbial Water Quality and Diversity for Ballast and Tropical Harbor Waters. PLoS ONE. 2015; 10: 500.
 34. Alla F, Bensoussan D, Decot V, Latger V, Stoltz J, Visanica S, Witz B. Thawed autologous peripheral blood stem cells require modified quantification methods for hematopoietic progenitor cell evaluation. Bio-Medical Materials and Engineering. 2012; 22: 57-67.

35. Hunte C, Kampf G, Shaffer M. Insufficient neutralization in testing a chlorhexidine-containing ethanol-based hand rub can result in a false positive efficacy assessment. *BMC Infectious Diseases*; 5: 48.
36. Hartman P, Hotchkiss D, Tomasiewicz D, Read R, Reinbold G. The Most Suitable Number of Colonies on Plates for Counting. *Journal of Food Protection*. 1979; 43: 282-86.