

**Viabilitet av *Neisseria gonorrhoeae*,
Propionibacterium acnes och
Bacteroides fragilis vid förlängd
förvaring i transportröret COPAN E-
swab™**

Hussein Kassim och Sabine Nord

Examensarbete, 15 hp, kandidatuppsats

Biomedicinsk Laboratorievetenskap

Jönköping, juni 2015

Metodhandledare: Kristina Rundgren, Leg.
Biomedicinsk Analytiker

Vetenskaplig handledare: Sara Mernelius,
Molekylärbiolog

Examinator: Jan Strindhall, Universitetslektor

Sammanfattning

En säker bakteriediagnostik kräver en korrekt provtagningsteknik, ett lämpligt transportsätt och rätt odlingsteknik. På grund av centralisering av verksamheter och ekonomiska begränsningar, är transport av prover till mikrobiologilaboratorium mycket vanligt. Detta medför behov av ett transportmedium som håller känsliga bakterier vid liv under långa transport- och förvaringstider. Dessutom skall transportrören klara av maskinell utodling som kräver ett vätskebaserat provtagningsmedium. Denna övergång minskar även arbetsbelastning och förbättra ergonomin hos personalen. I denna studie utvärderades viabilitet av *Propionibacterium acnes* (n=3), *Bacteroides fragilis* (n=2) och *Neisseria gonorrhoeae* (n=3) i transportmediet från COPAN E-swab™. Alla tre bakterier förvarades i transportrören i 24, 48 och 72 timmar (h) och dessutom i 120h för *P. acnes* och *B. fragilis*. Den ursprungliga koncentrationen samt den procentuella viabilitetsförlusten över tid beräknades med hjälp av viable count. Efter 120h förvaring i transportmediet hade viabiliteten minskat till 47 – 80 % för *P. acnes*, 18 % för *B. fragilis* 1 och 73 % för *B. fragilis* 2. *N. gonorrhoeae* visade en minskad viabilitet med 96 – 99,97 % efter 24h förvaring i 4°C och rumstemperatur. *P. acnes* och *B. fragilis* kunde förvaras i transportmediet i upp till 5 dygn utan att diagnostiken äventyrades. *N. gonorrhoeae* kunde förvaras i transportmediet i 24h för att diagnostik genom odling ska vara möjlig.

Nyckelord: viable count, krävande, anaeroba, bakterier, förvaring.

Summary

“Viability of *Neisseria gonorrhoeae*, *Propionibacterium acnes* and *Bacteroides fragilis* under prolonged storage in the transporttube COPAN E-swab™”

Safe bacterial diagnostics requires proper sampling techniques, suitable specimen transport and correct inoculation techniques. As a result of centralization of operations and economic restraints, transportation of samples to microbiology laboratories is very common. This entails the need for a transport medium that keeps sensitive bacteria alive under the long transport and storage time. Additionally, the transport tube should be convenient for automatic inoculation that requires a liquid based medium. This transition also reduces workload and improves ergonomics of the staff. In this study the survival of *Propionibacterium acnes* (n = 3), *Bacteroides fragilis* (n = 2) and *Neisseria gonorrhoeae* (n = 3) in the transport medium Copan E-swab™ was evaluated. All the species were inoculated in the tubes for 24, 48, 72h and also 120h for *B. fragilis* and *P. acnes*. Initial concentration at start time and the percentage survival over time was calculated with the help of viable count. Viability decreased to 47 – 80 % for *P. acnes*, 18 % for *B. fragilis* 1 and 73% for *B. fragilis* 2 after 120 h storage in the transportmedium. *N. gonorrhoeae* showed a reduction in viability of 96 – 99,97 % after 24h storage in the medium at 4°C and in room temperature. *P. acnes* and *B. fragilis* can be stored in the medium for up to 5 days, without endangering a diagnosis. *N. gonorrhoeae* can be stored in the transport medium for up to 24h to secure a diagnosis through culturing.

Keywords: viable count, fastidious, anaerobic, bacteria, storage

Innehållsförteckning

Inledning	1
Bakgrund	2
Medicinsk bakgrund	2
Metodbakgrund	4
Syfte	6
Material och metod	6
Transportmedium	6
Bakteriestammar	6
Utodling	6
Förberedelser av inokulat och val av lämplig spädning	6
Inokulering och inkubering.....	7
Beräkningar	7
Statistik	8
Etiska överväganden.....	8
Resultat	9
Mätning med DensiChek Plus.....	9
<i>Propionibacterium acnes</i>	9
<i>Bacteroides fragilis</i>	12
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	14
Diskussion	16
Metoddiskussion	18
Säkerhet	19
Bifynd	19
Framtida studier	20
Slutsatser	20
Ett tack till	20
Referenser	21

Inledning

En korrekt provtagningsteknik och en lämplig provtransport är väsentligt för att kunna garantera en korrekt bakteriell identifiering. Centralisering av verksamheten och ekonomiska begränsningar medför ett ökat behov av provtransport till det mikrobiologiska laboratoriet. Mikrobiologiska prover tagna på primärvårdsenheter runt om i länet måste transporteras till mikrobiologilaboratoriet i Jönköping för analys. Transporten till länssjukhuset Ryhov sker en till två gånger dagligen, vilket kan ge en förvarings- och transporttid på upp till tre dagar, om provet är taget på fredag eftermiddag efter transporten har gått. Denna långa förvarings- och transporttid kan medföra att bakteriekoncentrationen i provet minskar till en nivå som är svår att detektera. För att undvika förlust av provmaterial skulle provet kunna skickas med taxi, men det skulle medföra en förhöjd kostnad för vårdgivaren, som inte är nödvändig ifall bakterierna överlever i tillräckligt stor mängd under en längre förvaringstid.

Swab-systemet som innehåller ett flytande amies transportmedium används för provtagning och transport av bakterier. Amies transportmedium är en modifiering av det klassiska Stuart medium (1) som rapporterades 1967. Vid modifikationen ersattes glycerolfosfat med en oorganisk fosfatbuffert, som motverkade proliferation av koliforma bakterier. Den tidigare använda organiska fosfatbufferten, ledde till att icke koliforma patogener utkonkurrerades och därför inte kunde diagnostiseras. Natriumklorid (NaCl)-halten i transportmediet ändrades till 0,3 % för att förbättra miljön för *Neisseria gonorrhoeae*. Magnesium (Mg) och kalcium (Ca) - joner tillsattes till den ursprungliga lösningen för att upprätthålla permeabiliteten av cellmembranet (2). Swabs provtagningspinne är tillverkad av flockad nylon som inte är spunnen som de tidigare pinnar, vilket både ska hjälpa upptag och frigörande av provmaterialet i det flytande mediet (3). Transportsystemet COPAN E-swab™ (COPAN Innovation, Corona, CA) är enkelt att använda och ger möjlighet till kvantifiering och maskinell utodling. Swab transport system är som mest effektivt där provet inte kan tas som aspirat (4).

Bakgrund

Medicinsk bakgrund

Flera laboratorier i Sverige som till exempel Laboratoriemedicin Skåne (5), Västra Götalandsregionen (6), landstinget i Östergötland (7), Dalarna (8) och Värmland (9) har redan bytt till ett flytande amies transportmedium (COPAN E-swab™). Vanligt förekommande krävande bakterier, vilka är känsligast för en förlängd transporttid, är den största utmaningen för att utveckla ett transportsystem som upprätthåller viabiliteten. De anaeroba bakterier som valdes är *Bacteroides fragilis* som är en vanlig patogen vid djupa sår, som bölder, och kan ses som patogen vid sepsis och *Propionibacterium acnes* som vanligtvis förekommer som patogen vid akne och protesinfektioner. *Neisseria gonorrhoeae* valdes för att utvärdera transportmediet för viabiliteten av extra krävande bakterier, då den är svår att hålla vid liv både vid transport och odling.

B. fragilis är en anaerob, gramnegativ, icke sporbildande stav som har pleomorft utseende i mikroskop (10). Den förekommer som normalflora på slemhinnorna och är därför en vanlig patogen i endogena infektioner, vilket ger den en stor kliniskt signifikans (11). *B. fragilis* ses som γ -hemolytiska, gråa kolonier med en diameter av 1 - 4 mm på blodagar (10). Eftersom diagnostiken av *B. fragilis* är beroende av korrekt provtagning, transport och odlingsteknik blir dessa bakterier ofta förbisedda. Infektioner utlöst av *B. fragilis* kan förekomma i hela kroppen och är en känd patogen vid bukinfektioner, bölder och sepsis. Bakteriens virulensfaktorer är adhesiner, aerotolerans och polysackaridkapsel som skyddar mot fagocytos. Stammar som isolerats från patienter med diarrésjukdomar har *B. fragilis*-toxin, ett värmelabilt zink-metalloproteastoxin (11). Den ökande antibiotikaresistensen bland *B. fragilis*-stammar (12) och förekomsten av synergistiska blandinfektioner försvårar behandlingen (13). Det som utmärker *B. fragilis* från andra anaeroba stavar är att dess växt påskyndas av gallsalter (10, 11).

Propionibacterium acnes är en liten grampositiv, anaerob stav som ofta ses i korta kedjor eller klumpar i grampreparat. Den finns som normalflora på huden, dock inte från födseln utan koloniserar huden åren innan puberteten. *P. acnes* associeras med acne vulgaris eftersom bakterien påträffas i de lipidrika hårfolliklarna och kan ge upphov till inflammatoriskt svar

(14) genom att producera lågmolekylära peptider som attraherar leukocyter (11). Det är inte bara *P. acnes* som orsakar acnes vulgaris. *S. epidermidis* tros ha synergieffekt med *P. acnes* i akneinfektioner och studier har bekräftat att i ett aknesår påträffas antingen en blandning av *P. acnes* och *S. epidermidis* eller en renkultur av *P. acnes* eller *S. epidermidis* (15). *P. acnes* kan dock även ses vid andra sjukdomar som sarkoidos, implantatinfektioner och kronisk prostatit, som kan leda till prostatacancer (16).

P. acnes trivs bäst i kroppsdelar rika på talg- och svettkörtlar till exempel ansiktet och kan klara mekanisk stress, uttorkning och osmotisk chock associerade med den tuffa fysiska miljön på huden tack vare strukturell stabilitet från den grampositiva cellvägen. Hos de flesta vuxna är närvaron av *P. acnes* på talgrika hudytor samt i munnen och tarmkanalen fördelaktig eftersom bakterien stabiliserar den komplexa normalfloran i dessa områden. I regel tros bakterien ha en positiv effekt på hälsan eftersom den fyller ut nischer som annars skulle koloniserats av patogena organismer. Bakterien kan dock orsaka infektion om individens immunförvar är försvagat eller om individen är sårbar på grund av trauma eller skada (17).

N. gonorrhoeae är en mikroaerofil, gramnegativ, kockoid diplokok som i sin form liknar en kaffeböna. Den smittar främst via samlag, men även från moder till barn vid förlossning (kongenitalt) och kan förekomma som asymptomatisk infektion. *N. gonorrhoeae*'s virulensfaktorer är pili, poriner, reduktionmodifikationsprotein (rmp-protein), transferrinbindande proteiner, lactoferrinbindande proteiner, hemoglobinbindande proteiner, lipooligosaccharider, IgA1 proteas och β -laktamas. Pilus ger bakterien möjlighet att fästa vid celler utan cilia, som till exempel epitelceller i vagina eller äggledare. Porinerna skyddar bakterien från fagocytos genom att motverka fagolysosm fusion. Rmp - proteinet skyddar mot bakteriocida antigener. Transferrin-, lactoferrin-, och hemoglobinbindande proteiner förser bakterien med järn för tillväxt. Lipooligosaccharider fungerar som endotoxin och β -laktamas bryter ner β -laktam-ringen och gör därmed bakterien resistent mot β -laktam-antibiotika som till exempel penicillin (11).

N. gonorrhoeae anses vara krävande eftersom den växer långsamt, är svår att odla fram och svår att hålla vid liv. Den behöver ett specifikt odlingsmedium chokoladagar (Colombia Blood Agar Base, 215 g, avjoniserat vatten, 5000 ml, defibrillerad hästblod, 410 ml och 500 ml hästserum) eller Gonokock-agar (GC-agar, chokoladagar med tillsatt av Vankomycin, Colistin, Nyastin och Trimethoprim Lactate (VCNT)) och mikroaerofil miljö (5 % CO₂) för odling.

N. gonorrhoeae utlöser gonorré som är en sexuell överförd sjukdom, som ger en infektion i urethra med symptom som sveda vid vattenkastning och pus från urinröret. Ett till tre procent av kvinnor och en mycket mindre andel män som infekteras med gonorré utvecklar komplikationer med sepsis och infektioner av hud och leder. Skälet till att just kvinnor får fler komplikationer än män beror på att de oftare utvecklar en asymtomatisk sjukdom som därför förblir obehandlad, vilket ökar risken för en disseminerad infektion (11).

Under 2014 diagnosticerades 1336 personer med gonorré i Sverige, varav 15 i Jönköpings län. Nationellt ökade gonorrédiagnoserna från 17 fall per vecka i maj 2011 till 24 fall per vecka i december 2014 (18). En studie från 1999 visade att COPAN E-swab™ var ett bra alternativ för isolering av *N. gonorrhoeae* om en direkt inokulering från provtagningspinnen är omöjligt (19).

Metodbakgrund

Total viable count är en metod som kan påvisa hur många levande bakterier som finns i en lösning. Suspensionen späds i en spädningsserie och inokuleras på en lämplig agarplatta. Efter inkubering, där miljö och temperatur bestäms av vilken bakterie som studeras, räknas bakteriekolonierna (colony forming units, CFU) på plattan från den spädning som resulterar i koloniantal som ligger mellan 30 och 300 CFU. På detta sätt kan koncentration av levande bakterie i suspensionen vid inokulationstillfället räknas i CFU per milliliter (CFU/ml) (20).

Clinical and laboratory standard institute (CLSI) dokument M40-A, en kvalitativ kontroll av mikrobiologiska transportsystem, bidrar till standardisering av metoder som används för att utvärdera alla nyttillverkade swab-system (21). I tidigare studier utvärderades transportmediet Copan E-swab™ med flytande amies för viabiliteten av anaeroba och krävande bakterier enligt CLSI M40-A. I denna metod var förändringen i antal CFU acceptabelt för ett transportsystem om den inte översteg värden som ses i tabell 1 (3, 21).

Tabell 1. Kriterier för en acceptabel maximal förändring i CFU från 0 -tid för ett transportmedium enligt CLSI M-40 A.

Förändring i CFU	Rumstemperatur	Kyla
Minskning	1×10^3 CFU \pm 10 %	1×10^3 CFU \pm 10 %
Ökning	Ingen gräns	10 CFU \pm 10 %

Eftersom både fabrikanten (22) och andra (3,4,23) har validerat transportsystemet enligt denna publicerade standard, som använder sig av en referensstammar, valdes i denna studie patientstammar som speglar den kliniska verksamheten bättre.

Verksamheten i Region Jönköpings län, där studien utfördes, använder idag copanpinnar (fast amies medium med koltillsats) för provtagning och transport av anaeroba och krävande bakterier. För att minska arbetsbelastningen och förbättra ergonomin hos medarbetarna, krävs ett bättre provtagningsmaterial som både upprätthåller bakteriernas viabilitet och möjliggör maskinell utodling av patientprover.

Studien ska säkerställa att patientprover tagna och transporterad med COPAN E-swab™ ska ha samma förutsättningar som de prov som tas med det gamla transportsystemet. Vid förlängd transporttid förväntas bakterieantalet i transportmediet minska, men en tillräcklig viabilitet ska garanteras för att kunna säkerställa en korrekt identifiering.

Det finns ett flertal artiklar som behandlar både *B. fragilis*, *P. acnes* och *N. gonorrhoeae* i transportmedier, även i COPAN E-swab™ (3,4,22,23). Då fabrikanten säkerställer en viabilitet av bakterier upp till 48 timmar, verkar även författarna av redovisade studierna ha hållit sig till 48h, även om miljön transportrören förvarades i varierade mellan olika studier, som till exempel i kyla och rumstemperatur (23).

Syfte

Syftet med studien var att utvärdera viabilitet av *N. gonorrhoeae*, *P. acnes* och *B. fragilis* i COPAN E-Swab™ transportmedium. Studien skulle undersöka om det fanns tillräcklig med levande bakterier efter upp till 5 dygn för *P. acnes* och *B. fragilis* samt upp till 3 dygn för *N. gonorrhoeae*, för att kunna diagnosticera dessa bakterier.

Material och metod

Transportmedium

Transportmediet E-swab™ (COPAN Innovation, Corona, CA), som utvärderades, är ett universellt insamlings- och transportrör med flytande amies-medium, där tillverkaren garanterar viabilitet hos aeroba och anaeroba bakterier upp till 48 h och för *N. gonorrhoeae* i 24h.

Bakteriestammar

B. fragilis (n=2), *P. acnes* (n=3) och *N. gonorrhoeae* (n=3) som var isolerade från patienter användes för att utvärdera transportmediet.

Utodling

Frysta stammar av *B. fragilis* och *P. acnes* inkuberades på humanblodagar (columbia blood agar base (Acumedia, Lansing, MI), 5 % human blod) i 36°C i 72h i anaerob miljö för att isolera kolonier. *N. gonorrhoeae* inkuberades på chokladagar i 5 % CO₂ i 36°C i 48h. Färska, isolerade kolonier användes för utvärdering av transportmediet COPAN E-swab™.

Förberedelser av inokulat och val av lämplig spädning

Kolonier från *B. fragilis* (n=2), *P. acnes* (n=3) och *N. gonorrhoeae* (n=3) späddes i steril 0,9 % (w/v) NaCl till en turbiditet av 0,5 McFarland som motsvarar cirka $1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml,

genom att först blanda suspensionen på en vortex och sedan mäta den med en Densicheck plus (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankrike). Vid förberedning av 0,5 McFarland spädning, användes två olika DensiChek Plus för att mäta turbiditeten. Mätningen av McFarland accepterades för värden mellan 0,48 -0,52 och om värden låg på samma turbiditet i tre upprepade mätningar. Därefter späddes bakteriesuspensionen till 1:10, 1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10000 och 1:20000. Viable count på de anaeroba bakterierna utfördes genom att inokulera 50 µl av bakteriesuspensionerna på blodagar som sedan inkuberades i 72 h i anaerob miljö i 36°C. Gonokockerna inkuberades på chokladagar i 36°C med en tillsats av 5 % CO₂ i 48h. Efter inkubering räknades kolonierna på plattor där koloniantalet var mellan 30 och 300. Därefter kunde en lämplig spädning av inokulatet till transportmediet bestämmas. Från 0,5 McFarland-suspension av *B. fragilis*-stammarna användes spädningen 1:20000, vilket resulterade i ett inokulat av ca. $7,5 \cdot 10^3$ CFU/ml. För *P. acnes* användes en 1:5000 spädning, vilket gav ett inokulat på cirka $3 \cdot 10^4$ CFU/ml och för *N. gonorrhoeae* valdes 0,5 McFarland-suspensionen ($1,5 \cdot 10^8$) som inokulat.

Inokulering och inkubering

Hundra µl av bakteriesuspensionen från alla arter och stammar överfördes till ett transportrör, ett rör per undersökningstillfälle, som förvarades i 4°C i 24 – 120h och även i rumstemperatur för *N. gonorrhoeae*. Viabiliteten av bakterierna i transportröret undersöktes vid inokuleringen och efter 24h, 48h, 72h för alla arter samt även efter 120h för *B. fragilis* och *P. acnes*. En nolltids viabilitetsbestämning för bakterierna utfördes genom att överföra 100 µl av bakteriesuspensionen i transportmediet och efter noggrann blandning på vortex, inokulerades 50 µl av innehållet på två lämpliga agarplattor för varje bakterie.

Innehållet av transportrören för de anaeroba bakterierna inokuleras på human blodagar. Med hjälp av sterila glaskulor fördelades suspensionen jämnt och de inkuberades i 72h i lämplig miljö. *N. gonorrhoeae*-suspensionen inokulerades på samma sätt fast på chokladagar och inkuberades i 36°C med en tillsats av 5 % CO₂ i 48h. Därefter räknades kolonier på de två plattor för varje bakterie och ett medelvärde av antalet kolonier beräknades.

Beräkningar

Koncentrationen i transportmediet beräknas för 24, 48 och 72h för alla bakterier och även efter 120h för anaeroba bakterier. Därefter beräknas förlusten av bakterier för varje

mättillfälle, och en procentuell viabilitet för varje dygn. Koncentration av bakterierna beräknades till CFU/ml genom att multiplicera koloniantalet med 20 eftersom 50 µl av inokulatet användes vid inokuleringen. Den procentuella viabiliteten beräknades genom att dividera antal CFU/ml för det aktuella mättillfälle genom CFU/ml från nolltids-viable count. Undersökningsserierna upprepades minst två gånger för att säkerställa tillräckligt med resultat.

Statistik

I denna studie samlades bara en mindre mängd data in (tre bakterier, minst två replikat) och eftersom resultatet inte är normalfördelat användes deskriptiv statistik för att redovisa resultaten. För att jämföra viabilitet av *N. gonorrhoeae* vid förvaring i rumstemperatur och kyl användes Mann-Whitneys U-test, med en 5 % signifikansnivå. Beräkningar utfördes i SPSS 16.0.

Etiska överväganden

Vid denna studie används bakteriestammar som hade isolerats från patienter, artbestämt och frysts för att kunna användas för verksamhetsutveckling och forskning. Vid utvärdering av transportmediet var bara bakterierna som var intressanta. Ingen patientinformation användes i studien, utan bara bakteriernas namn. Eftersom patienterna hade antingen behandlats för sjukdomen som bakterien gav upphov till, eller den hade läkt ut av sig själv, har inte patienterna bakterierna kvar vilket gör att den inte kan ledas tillbaka till patienter. Därför innefattas dessa bakterier inte av Biobankslagen eller Personuppgiftslagen.

Resultat

Mätning med DensiChek Plus

Mätningarna av bakteriesuspensionen med DensiChek plus till 0,5 McFarland varierade för de flesta mätningar och i genomsnitt tog det 12 mätningar per suspension för att få tre efterföljande mätningar på en turbiditet mellan 0,48 – 0,52 McFarland.

Propionibacterium acnes

För *P. acnes* utfördes sju mätningar för tre olika patientstammar (Tabell 2). *P. acnes* 1 (P.a.1) hade efter 120h en viabilitet av minst 80 % (figur I). För *P. acnes* 2 (P.a.2) minskade viabiliteten till 47 % efter 120h (figur II) och *P. acnes* 3 (P.a.3) hade en viabilitet av minst 55 % efter 120h förvaring i transportmediet (figur III).

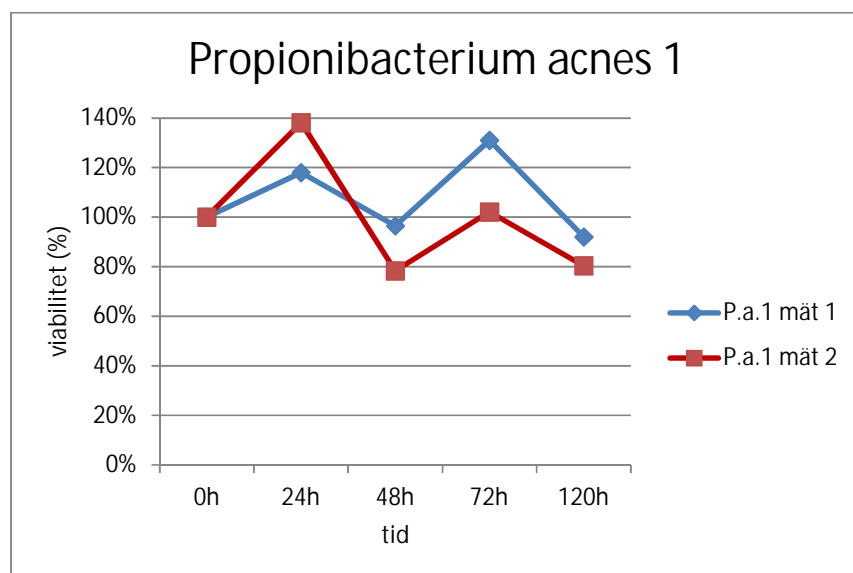
P.a.1 tillväxte i mediet framförallt efter 24h (118 – 138 %) inkubation och även efter 72h (102 – 131 %) inkubation vid både mättillfällena. Efter 120h inkubation i mediet var viabiliteten mellan 80 – 92 % (tabell 2 och figur I).

För P.a.2 har tillväxt av bakterien i mediet skett efter 24 h till maximalt 126 %, 48h (110 %) och 72h (122 %) inkubation vid mättillfället 2. Vid mättillfälle 1, har bakterien först visat en minskad viabilitet efter 24h (47 %) och sedan en viabilitetsökning efter 72h (102 %) förvaring i transportmediet. Vid tredje mättillfället observerades en viabilitetsminskning till 63 % av ursprungskoncentrationen vid 24h, en tillväxt till 72 % efter 48h förvaring i mediet och därefter en minskning av viabla bakterier varje dag till 53 % efter 72h och 47 % efter 120h (tabell 2 och figur II).

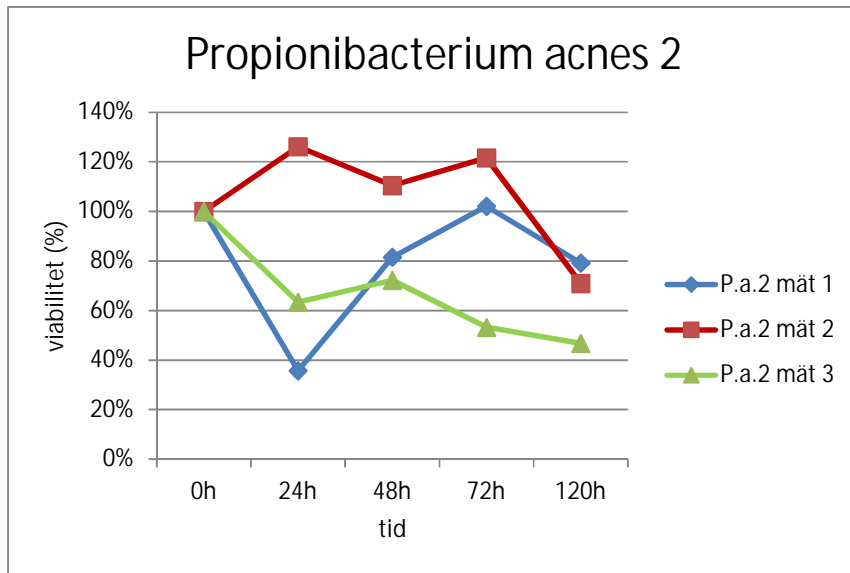
Vid mättillfälle 1 visade P.a.3 en minskning i viabilitet efter 24 h till 97 % och efter 48h ökade viabiliteten till 133 %. Efter 72h förvaring i mediet minskade viabiliteten till 118 %. Vid andra mättillfället minskade viabiliteten först till 43 % för att sedan öka till 88 % efter 48h förvaring i mediet. Därefter minskade viabiliteten till 77 % vid 72h och slutligen till 55 % vid 120h (tabell 2 och figur III).

Tabell 2. Mätningar av viabilitet av *P. acnes* (n=3) i transportröret COPAN E-swab™. Värden avser koncentration i CFU/ml.

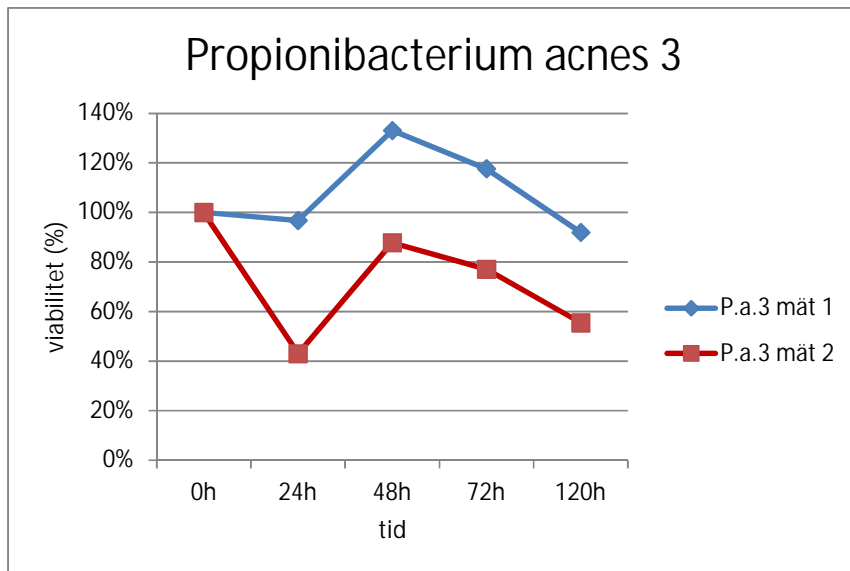
tid	P.a.1 mät 1	P.a.1 mät 2	P.a.2 mät 1	P.a.2 mät 2	P.a.2 mät 3	P.a.3 mät 1	P.a.3 mät 2
0h	1,70*10 ³	9,45 *10 ²	6,10 *10 ²	2,38 *10 ³	6,70 *10 ²	2,30 *10 ³	4,17 *10 ³
24h	2,01*10 ³	1,31 *10 ³	3,87 *10 ²	8,50*10 ³	8,45*10 ²	2,38 *10 ³	1,79 *10 ³
48h	1,64*10 ³	7,40*10 ²	4,40 *10 ²	1,94 *10 ³	8,65 *10 ²	3,06 *10 ³	3,66 *10 ³
72h	2,24*10 ³	9,65 *10 ²	3,25 *10 ²	2,43 *10 ³	8,15 *10 ²	2,71 *10 ³	3,21 *10 ³
120h	1,56*10 ³	7,70 *10 ²	2,85 *10 ²	1,89*10 ²	4,75 *10 ²	2,05 *10 ³	2,31 *10 ³



Figur I. Viabilitet av *P. acnes* patientstam 1, vid förvaring i COPAN E-swab™, i upp till 120h vid två mätningar.



Figur II. Viabilitet av *P. acnes* patientstam 2, vid förvaring i COPAN E-swab™, i upp till 120h, vid tre mätningar.



Figur III. Viabilitet av *P. acnes* patientstam 3, vid förvaring i COPAN E-swab™, i upp till 120h, vid två mätningar.

Bacteroides fragilis

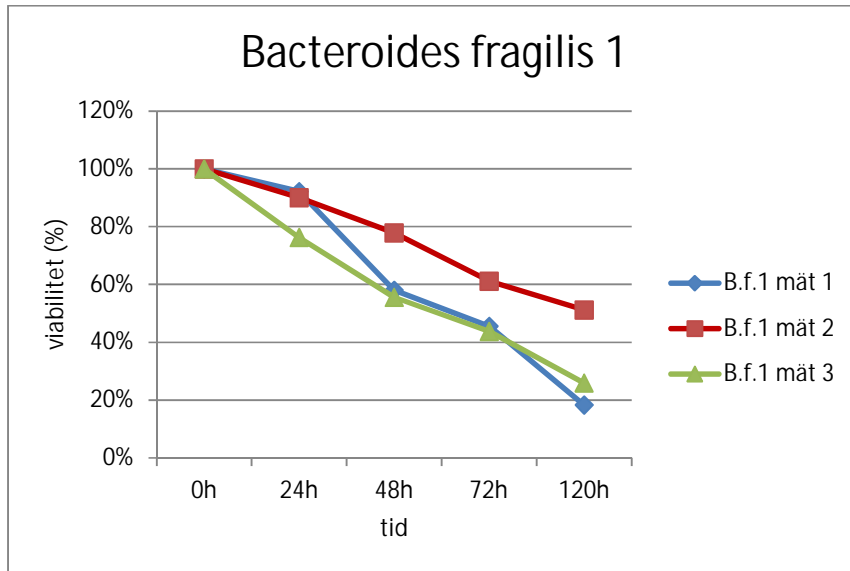
Två patientstammar av *B. fragilis* undersöktes (tabell 3). *B. fragilis* 1 (B.f.1) minskade till ett minimum av 18 % viabilitet efter 120h förvaring h i COPAN E-swab™. *B. fragilis* 2 (B.f.2) hade en viabilitet av mellan 74 – 99 % efter 5 dygns förvaring i mediet.

För B.f.1 hade viabiliteten minskat i genomsnitt med 8 – 30 % per dygn för båda mättillfällena. En viabilitet på 51 % efter 120h förvaring i mediet observerades för denna stam vid det andra mättillfället (tabell 3, figur IV).

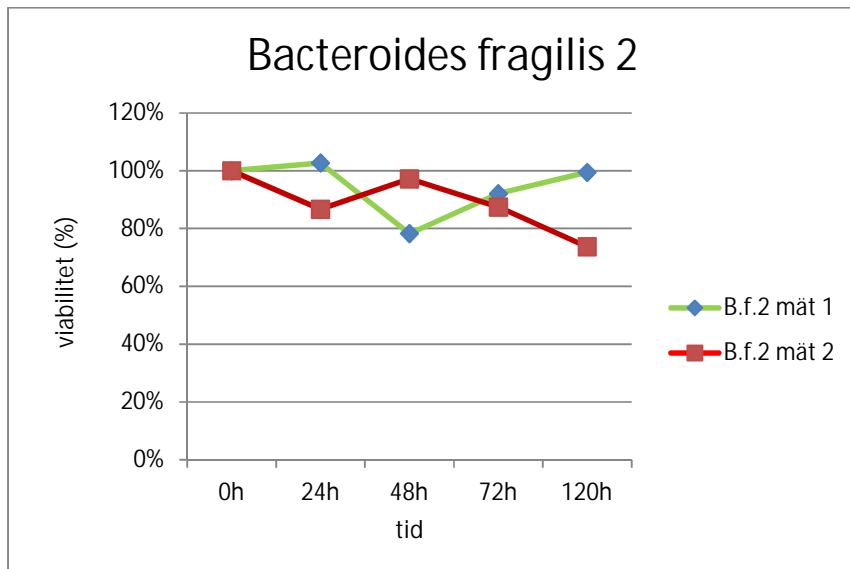
När det gäller B.f.2 vid första mätserie, hade viabiliteten minskat till 87 % efter 24h och sedan ökat till 97 % efter 48h förvaring i mediet. Efter 72h förvaring var viabiliteten på ca samma nivå som det var på 24h förvaring. Efter 120h förvaring hade denna stam en viabilitet på 72 % i denna mätserie. I andra mätningen har viabiliteten ökat maximalt till 103 % efter 24h förvaring i mediet men minskat därefter till 78 % efter 48h förvaring. Efter 72h förvaring i mediet hade en viabilitet på 92 % erhållits vilket var högre än vad som noterades för 48h förvaring. Efter 120h förvaring i transportmediet var viabiliteten på 99 % vid den andra mätserien (tabell 3, figur V).

Tabell 3. Resultat av 3 undersökningar av *B. fragilis* stam 1 och 2 undersökningar av *B. fragilis* stam 2 i transportmediet från 0 – 120h. Värden visar viabilitet i CFU/ml.

tid	B.f.1 mätning 1	B.f.1 mätning 2	B.f.1 mätning 3	B.f.2 mätning 1	B.f.2 mätning 2
0h	6,80*10 ²	3,00*10 ³	3,31*10 ³	4,80*10 ³	6,71*10 ³
24h	6,26*10 ²	2,70*10 ³	2,53*10 ³	4,16*10 ³	6,90*10 ³
48h	3,95*10 ²	2,34*10 ³	1,84*10 ³	4,66*10 ³	5,26*10 ³
72h	3,10*10 ²	1,84*10 ³	1,45*10 ³	4,20*10 ³	6,18*10 ³
120h	1,15*10 ²	1,34*10 ³	8,60*10 ²	3,54*10 ³	6,68*10 ³



Figur IV. Viabilitet av *B. fragilis* patientstam 1 vid förvaring i COPAN E-swab™, i upp till 120h, vid tre mättillfällen.



Figur V. Viabilitet av *B. fragilis* patientstam 2 vid förvaring i COPAN E-swab™, i upp till 120h vid två mättillfällen.

Neisseria gonorrhoeae

Viabiliteten hos de tre gonokockstammar (N.g.1, N.g.2 och N.g.3) mättes över 72h, vilket resulterade i 8 mätningar, varav 3 i rumstemperatur (tabell 4A) och 5 i kyla (tabell 4B). Viabiliteten för *N. gonorrhoeae* inokulerade i transportrör som förvarades i rumstemperatur minskade med 99 - 99,97 % under första dygnet (figur VI A och VI B) Förvaring i rumstemperatur gav ingen statistisk signifikant skillnad mot förvaring i kyla de första 24h (p=0,7).

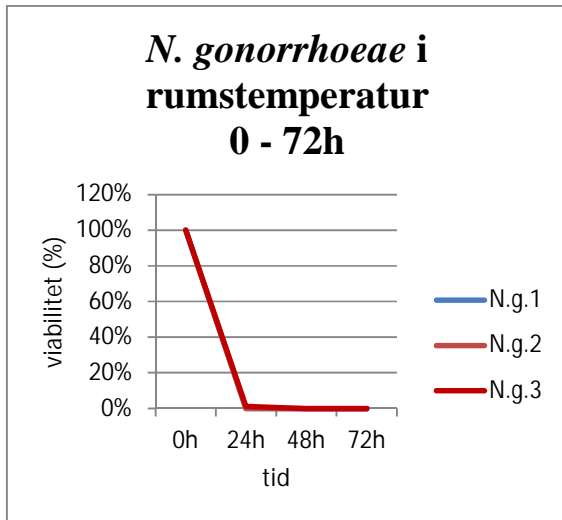
Vid förvaring i kyla minskade viabiliteten med 96,40 – 99,73 % efter 24h och efter 48h kunde även en viss viabilitet upp till 0,20 % ses (se figur VII A och VII B).

Tabell 4 A. Viabilitet av *N. gonorrhoeae* (n=3) som förvarades i rumstemperatur i upp till 72h. Värden avser CFU/ml.

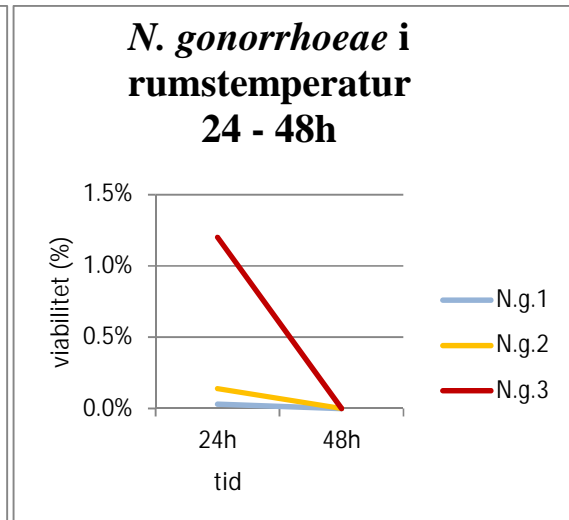
tid	N.g.1	N.g.2	N.g.3
0h	$1,47 \cdot 10^6$	$7,00 \cdot 10^6$	$7,60 \cdot 10^6$
24h	$4,00 \cdot 10^2$	$1,00 \cdot 10^4$	$9,10 \cdot 10^4$
48h	0	0	0
72h	0	0	0

Tabell 4 B. Viabilitet av *N. gonorrhoeae* förvarad i kyla i 72h, 1 mätserie för N.g.1, två mätserier för N.g.2 och N.g.3. Värden avser CFU/ml.

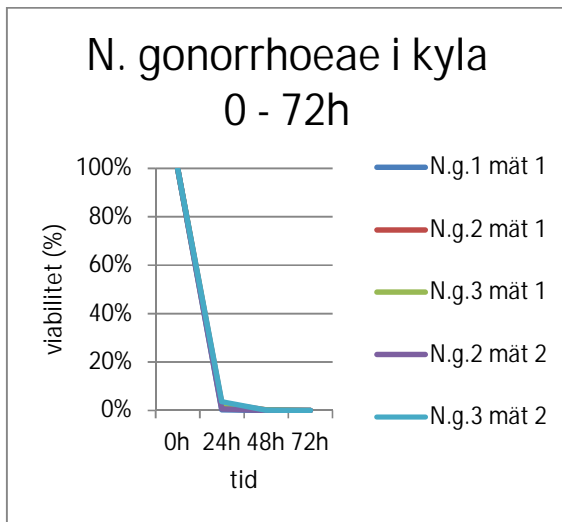
tid	N.g.1 mät 1	N.g.2 mät 1	N.g.3 mät 1	N.g.2 mät 2	N.g.3 mät 2
0h	$1,47 \cdot 10^6$	$7,00 \cdot 10^6$	$7,60 \cdot 10^6$	$1,48 \cdot 10^6$	$1,64 \cdot 10^6$
24h	$3,90 \cdot 10^3$	$1,96 \cdot 10^5$	$1,51 \cdot 10^5$	$9,00 \cdot 10^3$	$5,90 \cdot 10^4$
48h	0	$1,62 \cdot 10^4$	$1,60 \cdot 10^4$	$4,00 \cdot 10^2$	$2,86 \cdot 10^3$
72h	0	$2,00 \cdot 10^3$	0	0	0



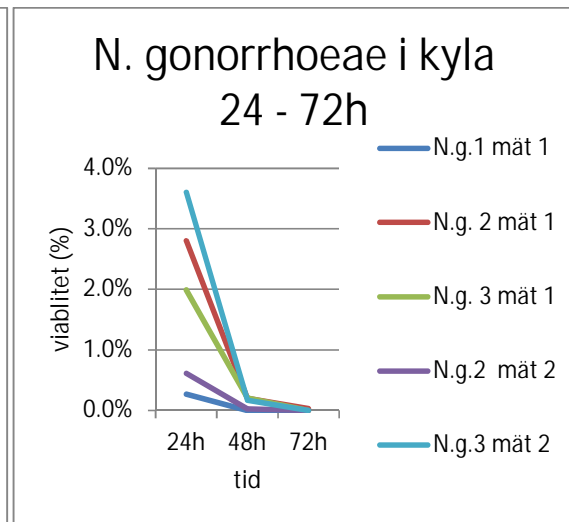
Figur VI A. Viabilitet av *N. gonorrhoeae* förvarad i rumstemperatur i 0 – 72h.



Figur VI B. Viabilitet av *N. gonorrhoeae* förvarad i rumstemperatur, här visas mätvärden från 24 och 48h. OBS figuren visar 0 – 1,4 %.



Figur VII A. Viabilitet i procent av *N. gonorrhoeae* förvarad i kyla i 0 – 72h



Figur VII B. Viabilitet av *N. gonorrhoeae* i kyl, mätvärden från 24 till 72h. OBS figuren visar 0 – 4 % viabilitet.

Diskussion

I denna studie undersöktes viabiliteten hos *P. acnes*, *B. fragilis* och *N. gonorrhoeae* i det flytande transportmediet COPAN E-swab™. Som väntat har viabiliteten i transportröret minskat under längre förvaringstid men är på en acceptabel nivå även efter 120h förvaring i 4°C för *P. acnes* och *B. fragilis* stammarna. För *P. acnes* har det visat sig att viabiliteten av bakterien minskar initialt, men ökar sedan efter längre förvaring i mediet. Detta överensstämmer med tidigare studier (3).

Bakterietillväxt i transportmediet som observerades för *P. acnes* nådde som högst 138 % av den ursprungliga bakteriekoncentrationen, vilket anses acceptabelt, då bakterien är i renkultur. Vid transport av *P. acnes* i en blandflora skulle denna tillväxt kunna leda till problem, framför allt om bakterien utkonkurrerar andra potentiella patogener, som kräver behandling. Samtidigt är proliferationen av *P. acnes* inte säkerställd om andra bakterier som t.ex. *Escherichia coli* är närvarande, som är känd för att kunna föröka sig under de flesta omständigheterna (11). Denna fråga skulle vara värd att undersökas vidare, men kunde inte genomföras inom ramen för denna studie.

Inokulationsmängden för *P. acnes* var låg, mellan 610 och 4165 CFU/ml, vilket ofta överskrids i ett patientprov. Vid inokulering av mer bakteriematerial kan det tänkas att näringen skulle kunna sätta stopp för en stor tillväxt i transportmediet. Även här rekommenderas vidare utredning. Förekomsten av bakterier som kan tillväxa i kyla i transportmediet kan även tyda på att andra bakterier kan tillväxa där, vilket kunde vara ett problem vid diagnostik av till exempel urinvägspatogener som kvantifieras i rutinen.

Eftersom *P. acnes* tillhör normalfloran kan den isoleras både från frisk hud och akne. Dock är det mycket svårare att säkerställa om en mikroorganism har orsakat en infektion när mikroorganism tillhör normalfloran och samtidigt är en opportunistisk patogen. Det är lättare att påvisa att just denna bakterie är orsaken till en infektion, om den isoleras från lokaler som normalt är sterila. Därför är det viktigt att ta hänsyn till kliniska symptom och hälsotillståndet hos patienten från vilken bakterien isoleras. Dessutom är densitet av *P. acnes* i normalfloran

relativt låg och har en stor variation mellan individer (10 bakterier/cm² hudyta - 1,0*10⁷ bakterier/cm² hudyta) men även inom individen (17).

För *B. fragilis* har viabiliteten minskat proportionellt mot förvaringstiden och en signifikant koncentration för diagnos kunde bibehållas även efter 5 dygns förvaring i mediet vilket överensstämmer med tidigare undersökningar (3, 4).

N. gonorrhoeae var den känsligaste av alla tre arter som utvärderas. Från alla försök som gjordes med *N. gonorrhoeae* i denna studie, kunde en tydlig trend observeras, där viabiliteten efter 24h förvaring i mediet sjönk ned till 0,27 %. Mätserier utfördes efter inkubation i både kyla och rumstemperatur, där kylförvaring inte gav en statistisk signifikant skillnad i viabilitet (p=0,7). Eftersom *N. gonorrhoeae* är en mycket krävande bakterie kan viabilitetsförlusten i transportröret bero på andra faktorer såsom frånvaro av koldioxid under förvaring.

N. gonorrhoeae-stammar som isolerats från patienter användes i denna studie, vilket gör det svårt att jämföra med tidigare studier där referensstammar användes för att utvärdera transportmediet. Referensstammen ATCC 43069 har en högre viabilitet efter 24h förvaring i COPAN E-swab™ men minskar till en väldigt låg bakteriekoncentration efter 48h. (3). De flesta tidigare studier har använd sig av referensmetoden CLSI M-40A (21), vilken valdes bort i denna studie eftersom referensstammen inte ge en rätt bild på viabiliteten av patientstammar i transportmediet. I en studie från 2004 framförde skribenterna att ATCC 43069 är en robust stam och är därför inte en bra standard för utvärdering av patientstammar (23). Det är även fördelaktigt med att utvärdera transportmediet med patientstammar eftersom *N. gonorrhoeae* är känd för dess förmåga att ständigt förändra sig för att kunna undgå antibiotika och svara på sin omgivning. I studier, där människor smittas med *N. gonorrhoeae* har det visats att bakterien mutera för att anpassa sig till sin värd, genom att ändra sina ytproteiner. Om bakterierna typas efter infektion av en patient, ses en stor antal kloner som härstamma från en eller ett fåtal föregångare, vilket beskrivs som ”flaskhals”-anpassning till värden (24).

Personal från mikrobiologilaboratoriet Jönköping upplevde att prover från patienter med gonorré innehåller väldigt många bakterier, varför en högre koncentration av inokulatet valdes.

Efter samtal med läkarna på mikrobiologiska laboratoriet är det dock oväsentligt att jämföra koncentration av bakterier i en infektionshärd med den koncentration som användes vid inokulering, eftersom mängden bakterier i olika infektioner har en väldigt stor variation och fler bakterier inte är synonymt med fler symptom.

Metoddiskussion

Vid spädningen av bakteriesuspensionen till 0,5 McFarland användes Densichek Plus, som mäter turbiditeten av bakteriesuspensionen. Vid upprepade mätningar märktes dock en viss skillnad på mätningarna även om bakteriesuspensionen inte ändrades. För att garantera mätsäkerheten, mättes varje suspension tills den visade en stabil McFarlandturbiditet inom 0,48 – 0,52 McFarland för att använda vid överförning till transportmedium. Även mätningar av en och samma suspension på olika Densichek Plus, som alla är kalibrerade mot 0,9 % (w/v) steril NaCl gav olika resultat. Detta bidrar till att även om serierna späddes på samma sätt, skiljde sig bakteriekoncentrationen i inokulatet som tillsattes i transportrören.

Viable count är ingen precis mätning av viabiliteten i provröret då bakteriekoncentrationen bara kan räknas om bakterierna som överfördes till agar plattorna växer där i lagom stor mängd. Plattor med koloniantal under 30 ger statistiskt osäkra resultat, och vid växt av över 300 kolonier kan det inte säkerställas att alla bakterier har kunnat växa till kolonier, och är dessutom svåra att räkna (20).

Det är även viktigt att blanda transportmediet ordentligt efter inkubering, eftersom bakterier inte tillväxer jämt i mediet. Anaeroba bakterier tillväxer bäst i botten av röret, medan mikroaerofila bakterier har den största tillväxten i mitten av röret. För att säkerställa att de 50 µl inokulat som överfördes till agarn var representativ för hela mediet blandades bakteriesuspensionen noggrann på vortex innan lösningen pipetterades över till agar.

Säkerhet

För att säkerställa att förutsättningar för varje mättillfälle i en serie är så lika som möjligt har två transportrör per mättillfället inokulerats med samma mängd (100 µl) av samma suspension, och ett dubbelprov från varje transportrör inokulerades på agarn för viabilitetsbestämning. Detta gav fyra mätvärden för varje startsuspension istället för två och medelvärde för det aktuella mättillfället beräknades. På detta sätt kunde samma koncentration av bakterier i transportmediet säkerställas för varje utförd viable count istället för att minska innehållet i transportröret för varje dag.

För att höja reabiliteten utfördes testserierna av den ena studenten under en vecka och samma undersökning utfördes av den andra studenten veckan därpå. Viable count av kolonier utfördes av båda studenterna och jämfördes innan resultatet noterades för att säkerställa att resultatet inte blir felaktigt på grund av räknefel. Avvikande resultat diskuterades med handledare och även med metodansvariga ifall dessa berörde en annan avdelning.

Bifynd

Vid framställning av humanblodplattor på substratavdelning på mikrobiologen, används blod från patienter som måste tappas på blod på grund av att de har antigen för många röda blodkroppar i blodet (polycytemi) som resulterar i hög hemoglobinvärde (26) eller förhöjt järnvärde på grund av den ärftliga sjukdomen hemokromatos, där kroppen förlorar förmåga att utsöndra järn och få ökad järnabsorption (27). Vid avläsning av *B. fragilis*- viable count hittades plattor där kolonierna inte kunde räknas eftersom växten var hämmad i mitten av plattorna samtidigt som det fanns växt i utkanten av plattorna. Samtidigt hade omsticket av samma stam, en mycket högre koncentration av bakterier och ingen inhibition vilket reste misstanke mot antibiotika i plattan. Efter att har pratat med både metodhandledaren och metodansvarig på substratavdelning kunde det bekräftas att plattorna innehöll antibiotika. Förmodligen fanns antibiotikan i blodet från en venesectionspatient som hade behandlats mot anaeroba bakterier. Substratkontroll på blodagar hade inte utförts i anaerob miljö innan, och utslutning av venesectionsblood vid framställning av blodagarplattor skulle innebära mycket

högre kostnader eftersom blod i så fall hade behövt köpas. Därför rekommenderas att det även sätts anaeroba substratkontroller, som ska möjliggör en säker diagnos av anaeroba patogener även om en venesectionspatient har behandlats med antibiotika.

Framtida studier

För framtida studier föreslås utvärdering av transportmediet COPAN E-swab™. för *N. gonorrhoeae* med hjälp av polymeras chain reaction (PCR). Det är intressant att undersöka med PCR ifall DNA i transportmedium är tillräcklig stabil för att få ett positiv resultat. PCR metoden kunde förlänga förvaringstiden med ett dygn även om andel viabla bakterier har minskat. I den här studien fanns det en liten del överlevande gonokocker efter 48h i transportröret, som skulle kunna användas för att genomföra en resistensbestämning, vilket inte är möjligt med molekylärbiologiska metoder.

Slutsatser

Transportmediet från COPAN E-swab kan användas för att förvara *B. fragilis* och *P. acnes* i upp till 5 dygn utan att bakteriernas viabilitet sjunker så lågt att en diagnos äventyras.

N. gonorrhoeae kan förvaras upp till 24h i 4°C i COPAN E-swab™ för att bibehålla tillräckligt med bakterier för en säker diagnostik.

Ett tack till

Pia Karlsson för all kunskap om viable count samt bakterierna. Kirstin Dienus för all hjälp med substratfrågor. Ett extra stort tack till Kristina Rundgren som hade alltid tid för våra frågor och motiverade oss fler än en gång när det kändes svårt och till Sara Mernelius som trots sin egen dissertation fann tid att hjälpa oss med den vetenskapliga delen av arbetet.

Referenser

1. Mofett M, Young JL, Stuart RD. Centralized gonococcus culture for dispersed clinics: the value of a new transport medium for gonococci and trichomonas. *Br. Med. J.* 1948; 2(4573):421–424.
2. Aimes CR. A modified formula for the preparation of Stuart's transport medium. *Canad. J. Public Health.* 1967; 58:296- 300.
3. Van Horn KG, Audette CD, Sebeck D, Tucker KA. Comparison of the Copan E-swab™ system with two amies agar swab transport systems for maintenance of micro-organism viability. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46:1655–1658.
doi: 10.1128/JCM.02047-07
4. Rishmawi N, Ghneim R, Kattan R, Ghneim R, Zoughbi M, Abu-Diab A, et tal. Survival of fastidious and nonfastidious aerobic bacteria in three bacterial transport swab systems. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45:1278-1283.
5. Labmedicin Skåne: *Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae* samt gonokockodling. Lund: labmedicin Skåne; 2015 [läst 2015-05-22]
Tillgänglig från: <http://www.analysportalen-labmedicin.skane.se/viewAnalys.asp?Nr=1021>
6. Västra Götalandsregionen: Mikrobiologi, provtagning. Göteborg: Sahlgrenska Universitetssjukhus; 2015 [läst 2015-05-08]
Tillgänglig från: <http://www.sahlgrenska.se/su/mikrobiologi-provtagning>
7. Region Östergötland: Genital infektion. Linköping: Region Östergötland; 2015 [Läst 2015-05-08]
Tillgänglig från: <http://lioappl1.lio.se/lmcsortiment/Analysis.aspx?service=236687>
8. Landstinget i Dalarna: Pinnprover. Falun: Landstinget Dalarna; 2015 [läst 2015-08-05]
Tillgänglig från: <http://www.ltdalarna.se/For-varldpersonal/For-varldpersonal/Laboratoriemedicin/Provtagningsanvisningar-Laboratoriemedicin/Provtagningsmateriel/Pinnprover/>
9. Landstinget i Värmland: Byte av provtagningspinne. Karlstad: Landstinget i Värmland; 2015 [läst 2015-08-05]
Tillgänglig från: <http://www.liv.se/For-varldgivarer-och-samarbeten/Analysportal/Nyheter/Byte-av-provtagningspinne/>
10. Winn WCJ, Koneman EW, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. 913.
11. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013. 251 - 252, 261, 343, 345 - 347.

12. Brook I, Wexler HM, Goldstein EJ. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(3):526-46.
13. Brook I. Enhancement of growth of aerobic and facultative bacteria in mixed infections with *Bacteroides* species. *Infect Immun.* 1985; 50(3):929-31.
14. Burton JL, Cunliffe WJ, Stafford I, Shuster S. The prevalence of acne vulgaris in adolescence. *Br. J. Dermatol.* 1971; 85(2):119-26.
15. Puhvel SM, Reisner RM, Amirian DA. Quantification of bacteria in isolated pilosebaceous follicles in normal skin. *J. Invest. Dermatol.* 1975; 65:525-531.
16. Portillo ME, Corvec S, Borens O, Trampuz A. *Propionibacterium acnes*: an underestimated pathogen in implant-associated infections. *BioMed. Research International.* 2013; 2013:10.
17. Bojar RA, holland KT. Acne and *propionibacterium acnes*. *Clin. Dermatol.* 2004; 22: 376-379.
18. Folkhälsomyndigheten: Gonorré. Stockholm: Folkhälsomyndigheten; 2015 [läst 2015-05-08]
Tillgänglig från: <https://www.folkhalsomyndigheten.se/amnesomraden/statistik-och-undersokningar/sjukdomsstatistik/gonorre/>
19. Olsen CC, Schwebke JR, Benjamin WH, Beverly A, Waites KB Comparison of direct inoculation and Copan transport systems for isolation of *Neisseria gonorrhoeae* from endocervical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:3583–3585.
20. Wright A, Harding E. Enumerating Microorganisms: Viable Counts. Fresno, CA: Micro eGuide; 2010 [läst 2015-05-08]
Tillgänglig från http://www.microeguide.com/lab_skills/viable_counts.asp
21. CLSI. Quality control of microbiological transport systems: approved standard M40-A. Wayne, PA:CLSI; 2003 [läst 2015-04-10]
Tillgänglig från: <http://shop.clsi.org/microbiology-documents/M40-A2.html>
22. Menezes L, Monteiro J, Chagas NT, Braga A, Machado A, Pignatari A, et al. Evaluation of the E-swab™ transport system to collect anaerobic bacteria: analysis of gram stain and culture Performance. Sao Paulo: Copan diagnostics; 2010 [läst 2009-05-08]
Tillgänglig från: http://www.copanusa.com/files/3114/2618/4300/Silbert_Poster-2010w.pdf
23. Graver, MA, Wade, JJ. Survival of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates of different auxotypes in six commercial transport systems. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(10):4803–4804. doi:10.1128/JCM.42.10.4803-4804.2004
24. Cohan MS, Cannon JG. Human Experimentation with *Neisseria gonorrhoeae*: Progress and Goals. *J. Infect Dis.* 1999; 179 (2):375-379. doi: 10.1086/513847
25. Beqaj SH, Milish M, Nance E, Soper J, Jordan D. Evaluation of Copan E-swab™ for the collection of specimens for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and Herpes simplex virus by molecular methods. Daytona Beach, FL: Copan Diagnostics; 2015 [läst 2015-05-08]
Tillgänglig från: http://www.copanusa.com/files/9114/2669/3450/18-03-2015_0844_236.pdf
26. Västra Götalandsregionen. Venesection på vårdcentral. Skövde: Skaraborgs sjukhus och primärvården; 2014 [läst 2015-06-01]
Tillgänglig från: <http://www.vardsamverkansskaraborg.se/upload/V%C3%A5rdsamverkanSkaraborg/V%C3%A5rdpolicy/Lokala%20riktlinjer/Venesectionio.pdf>

27. Internetmedicin.se. Hemokrotos, primär. Göteborg: Björnsson E, Olsson S; 2013 [läst 2015-06-01]
Tillgänglig från: <http://www.internetmedicin.se/page.aspx?id=574>