

PROJEKTRAPPORT

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

- selektivitet och anrikning vid odling av Bacillus

Johanna Thelaus, Emelie Näslund Salomonsson, Anna-Lena Sahlin,
Karin Eld, Tara Wahab, Mikaela Magnusson

ABSTRACT

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

In 2011 a side by side tests were performed where different types of solid culture media were evaluated for growth of the bacterial category A agents *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* and *Burkholderia spp.* The Horse blood and Tul -agar were recommended as "FBD Choice Medium" for cultivation of the studied bacteria from clinical samples. However, the recommendation was limited to relatively clean samples with low level of contamination due to lack of selectivity. Therefore, during 2012, the project continued in order to further harmonize methods associated to cultivation of bacterial agents from complex matrixes as food, environmental and degraded clinical samples. An exercise was performed allowing for training of germination, enrichment and use of culture media associated to selective culture from water and minced meat samples spiked with *B. anthracis* and *B. cereus* spores.

During the exercise, acid treatment effectively reduced contaminating bacteria from the water sample. However, the same treatment did not reduce contamination from minced meat. The effect of selective methods i.e. heat (germination) and acid treatment, mainly depend on the composition of the bacterial community in the specific matrix used. Culturing of untreated samples (water and minced meat) on PLET-agar did result in clean cultures of *Bacillus*. Since the PLET-agar contains Thallium acetat with severe environmental and health effects, substrate production facilities has excluded the medium from production. Therefore, for cultivation of *B. anthracis* from complex matrixes we recommend a combination of germination, enrichment and culture on Horse blood agar. Such a treatment generated culture plates with enough reduction of contaminating flora for experienced technical personnel to identify *Bacillus* colonies.

Titel:	Harmonisering av metoder för odling av högpato­gena bakterier på BSL-3 laboratorium – selektivitet och anrikning vid odling av <i>Bacillus</i> Publ.nr. MSB574 ISBN: 978-91-7383-354-7
Projekttid:	2012
Projektgrupp:	Johanna Thelaus, Emelie Näslund Salomonsson, Anna-Lena Sahlin, Karin Eld, Tara Wahab och Mikaela Magnusson
Resurspersoner:	Stina Bäckman (FOI), Anne-Louise Bergefur (SVA) och Moa Lavander (Livsmedelsverket)
Kontaktperson i FBDs styrgrupp:	Mona Byström (FOI)
Styrgrupp:	Ida Andersson ordf. (SMI), Mats Forsman (FOI), Mona Byström (FOI), Maiken Karlsson (FOI), Hans Lindmark (Livsmedelsverket), Caroline Schönning (SMI), Andreas Bråve (SMI), Rickard Knutsson (SVA) och Viveca Bäverud (SVA)
Finansiering:	Projektet har finansierats genom tilldelning av MSB anslag 2:4 Krisberedskap
Layout:	Tecknarn i Roslagen
Tryck:	Davidsons Tryckeri AB

INNEHÅLL

1. Bakgrund	5
2. Syfte och mål	6
2.1 Delmål	6
3. Material och metoder	7
3.1 Inventering av metoder och medium vid respektive myndighet	7
3.2 Myndighetsgemensam övning	7
3.2.1 Urval av medier till övningen	7
3.2.2 Övningsupplägg	8
3.2.3 Arbetsflöde vid odling	8
4. Resultat	9
4.1. Inventering	9
4.2. Övning	10
4.2.1 Selektiva metoder; syrabehandling och germinering	11
4.2.2 Anrikning	12
4.2.3 Selektiva odlingsmedium	12
4.2.4 Jämförelse <i>B. anthracis</i> och <i>B. cereus</i> stammar	12
5. Diskussion	16
6. Slutsatser	17
7. Begrepp och förkortningar	18
8. Bilagor	19
9. Referenser	19



SAMMANFATTNING

Forum för beredskapsdiagnostik (FBD) är ett samarbete mellan fyra svenska myndigheter, Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Smittskyddsinstitutet (SMI) och Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI). Ett av forumets huvudmål är harmonisering av metoder och utrustning mellan de deltagande myndigheterna för att öka beredskapen i Sverige inför en eventuell biologisk händelse. Vid en avsiktlig eller naturlig spridning av riskklass 3 bakterier och relevanta virus är en fungerande krisberedskap, med avseende på medicinska motåtgärder och dekontaminationsförfaranden, beroende av snabba preliminära laboratorieresultat.

Med en ökad efterfrågan av mer detaljerad kunskap om organismer till exempel för att kunna utföra resistensbestämning, smittspårning, epidemiologi och fylogenetiska studier, aktualiseras behovet av harmonisering av odlingsmetodik mellan myndigheter. Syftet med detta projekt var att inom forumet öka kompetensen för odling av bakteriella riskklass 3 organismer. Under 2011 utfördes en första del av projektet där respektive myndighets metoder för odling av *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia mallei* och *B. pseudomallei* utvärderades vid en övning. Under 2012 har verksamheten fokuserats kring odling av *Bacillus* från komplexa provmatriser med blandflora som råvatten, livsmedel och gamla kliniska prover. Detta ställer höga krav på selektivitet och anrikning. En inventering av de medium och metoder som används vid myndigheterna för germinering, anrikning och odling av *Bacillus anthracis* låg till grund för en myndighetsgemensam övning. Övningen syftade till att jämföra utfallet vid odling från prover innehållandes blandflora och *Bacillus* sporer beroende på vilka selektiva metoder, anrikningssteg och odlingsmedium som använts.

Projektet har resulterat i en sammanställning över de odlingsmedier och metoder för selektiv odling av *B. anthracis* som används vid myndigheterna. Vid den myndighetsgemensamma övningen framkom att effektiviteten hos de olika selektiva behandlingarna (värme och syrabehandling) beror av sammansättningen av blandflora i provmatrisen. Under övningen framstod syrabehandling som mycket effektiv i att reducera blandflora från råvattenmatris medan samma behandling inte alls påverkade blandfloran i köttfärsmatris. Selektiv PLET-agar var mest effektivt i att reducerar kontaminerande blandflora från komplexa matriser. Dock innehåller PLET-agar det hälsovådliga och miljöfarliga tallium acetat vilket gjort att detta medium inte längre bereds vid vissa substratavdelningar. Istället rekommenderas här en kombination av germinering, anrikning och odling på Hästblodagar, vilket vid övningen genererade odlingsplattor där *Bacillus* morfologi kan avläsas av rutinerad laboratoriepersonal. En sådan provbehandling liknar i mycket de metoder som idag används vid myndigheterna för odling på prover med *Bacillus* frågeställning.

1. BAKGRUND

Forum för beredskapsdiagnostik (FBD) utgör ett värdefullt nätverk för kunskapsöverföring mellan Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI), Smittskyddsinstitutet (SMI), Livsmedelsverket och Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA); myndigheter som alla arbetar med frågeställningar gällande riskklass 3-bakterier. Arbete med riskklass 3-agens utförs vid så kallade BSL 3-laboratorier, vilka finns vid FOI, SMI och SVA. Livsmedelsverkets BSL 3-arbete sker vid SVAs säkerhetslaboratorium, där dessa två myndigheter bygger upp ett gemensamt Resurslaboratorium för beredskapsdiagnostik (RUB).

Ett övergripande syfte med FBD är att stärka laboratorieberedskapen och effektivt kunna utnyttja de ingående myndigheternas samlade kompetens och kapacitet i händelse av storskalig spridning av allvarlig smitta. Inom FBD har PCR TaqMan-metoder harmoniserats mellan myndigheterna för att kunna analysera förekomst av riskklass 3-bakterier; *Bacillus anthracis*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* och *Yersinia pestis*. En av de viktigaste aspekterna för att möjliggöra detektion är provberedning vilken varierar beroende på provtyp. Genom samverkan mellan myndigheter som har stor erfarenhet inom skilda områden täcker FBD in väldigt många provtyper, såsom humanprover, djurprover, miljöprover och livsmedel.

Som ett led i utvecklingen av nya fenotypiska metoder för identifiering av bakterier inom FBD har detta projekt fokuserat på att långsiktigt harmonisera och bygga upp odlingskompetens för bakteriella riskklass 3 organismer. Ett första steg togs under 2010 då projektet "Detektion av *Francisella tularensis*" arbetade med att harmonisera odlings- och infrysningsmetoder av *Francisella tularensis* (1). Ett andra steg togs under 2011 då projektet "Harmonisering av metoder för odling av högpatogena bakterier på BSL-3 laboratorium" inventerade och övade metoder för odling av *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia mallei* och *B. pseudomallei* på fasta odlingsmedier.

2012 års projekt avser harmonisera myndigheternas beredskap för att analysera komplexa prover med blandflora. Odling från sådana prover ställer ytterligare krav på odlingsmedium i form av selektivitet för ett specifikt agens. Detta projekt har sammanställt de medium och metoder som används vid myndigheterna vid germinering, anrikning, odling och kontroll av avdödning av *Bacillus anthracis* sporer. Informationen har sedan legat till grund för en myndighetsgemensam övning. Vid övningen jämfördes utfallet vid odling från komplexa prover med en blandflora (ett miljöprov och ett kliniskt prov) som spikats med *B. anthracis* och *B. cereus* sporer, då selektiva metoder, anrikningssteg och selektiva odlingsmedier används.

2. SYFTE OCH MÅL

Projektets övergripande mål var att genomföra en myndighetsgemensam övning i odlingsmetodik för harmonisering av odling av riskklass 3 organism. Övningen utformades för att mellan myndigheterna harmonisera metoder för germinering, anrikning och selektivitet vid odling av *B. anthracis* från olika matriser. Både övningen och arbetet inför övningen syftade också till att öka kompetensen inom odling av bakteriella riskklass 3 organismer inom nätverket.

2.1 DELMÅL

- Inventering av odlingsmetodiker vid de olika myndigheterna. Avser metoder för sporulering, germinering, anrikning och selektivitet vid odling från kliniska prover, livsmedelsmatriser, och miljömatriser. Med odlingsmetoder avses odling både i syfte att isolera/amplifiera samt kontrollera avdödning.
- Genomföra en myndighetsgemensam övning i odlingsmetodik med avseende på germinering, anrikning och selektivitet för odling av *B. anthracis* från olika matriser.

Avgränsningar

Arbetet med ovanstående punkter avgränsades till att omfatta *Bacillus anthracis*.



3. MATERIAL OCH METODER

3.1 INVENTERING AV METODER OCH MEDIUM VID RESPEKTIVE MYNDIGHET

Vid projektets inledning hölls en workshop med stöd av Joakim Ågren från SVA och Moa Lavander från Livsmedelsverket för att inom projektgruppen bredda agenskunskap om *Bacillus* men också för att ta del av den verksamhet vid Livsmedelsverket som rör identifiering av *Bacillus* i matmatriser. Information från workshopen togs till vara i inventeringen och vid utformning av odlingsövningen.

Projektgruppens medlemmar sammanställde också respektive myndighets metoder och medier för sporulering, germinering, anrikning, odling och kontroll av avdödning av *Bacillus anthracis* (Figur 1). Sammanställningen genomfördes med fokus på medium för anrikning och selektiv odling av bakterien från komplexa prover med blandflora. Som utgångspunkt för sammanställningen användes den inventering av fasta medium för odling av prover med *B. anthracis* frågeställning som togs fram i projektet FBD2012/9(7).

Befintliga metoder vid respektive myndighet



Figur 1. Upplägg av projektet "Harmonisering av metoder för odling av högpatogeta bakterier på BSL 3 laboratorium", fokusområden för projektets verksamhet under 2011 och för 2012.

3.2 MYNDIGHETSGEMENSAM ÖVNING

3.2.1 Urval av medier till övningen

Vid odlingsövningen som genomfördes 2011 inom FBD projekt 2012/9 identifierades en selektiv PLET-agar som lämplig för isolering av *B. anthracis* från komplexa prover (6, 7). Även Hästblodagar (MIK2742) rekommenderades då det är det odlingsmedium som rutinmässigt används vid SMI och SVA's BSL3 laboratorier vid odling från prover med frågeställning om *B. anthracis*. Hästblodagar har dock ingen tillsats av antibiotika eller andra ämnen som har negativ effekt på kontaminerande flora. Inför övningen bereddes odlingsmedium vid respektive substratberedning med grundrecept för PLET-agar enligt Luna *et al* 2009 (6); för 1L medium Bacto agar (Difco) 25g, Heart infusion broth (BD) 25g, EDTA 14 mg, tallium acetat (Sigma) 1.9 mg, sulfamethoxazole 38 µg/mL, trimethoprim 2 µg/mL, polymyxin B 15 000 U/L, lysozym 150 000 U/L. Grundrecept för Hästblodagar; för 1L medium Blod agar bas 43 g och 50 mL Hästblod (defibrinerat eller citrerat) till pH 7,3 (ingen tillsats av L-tryptofan).

3.2.2 Övningsupplägg – spikning av matriser

Vid planering av övningsupplägget genomförde projektgruppen en gemensam genomgång av respektive myndighets riskbedömning för odling av *B. anthracis* på BSL3 laboratorie. Vid övningen följdes respektive myndighets rutiner och instruktioner för arbete på BSL3 laboratorie.

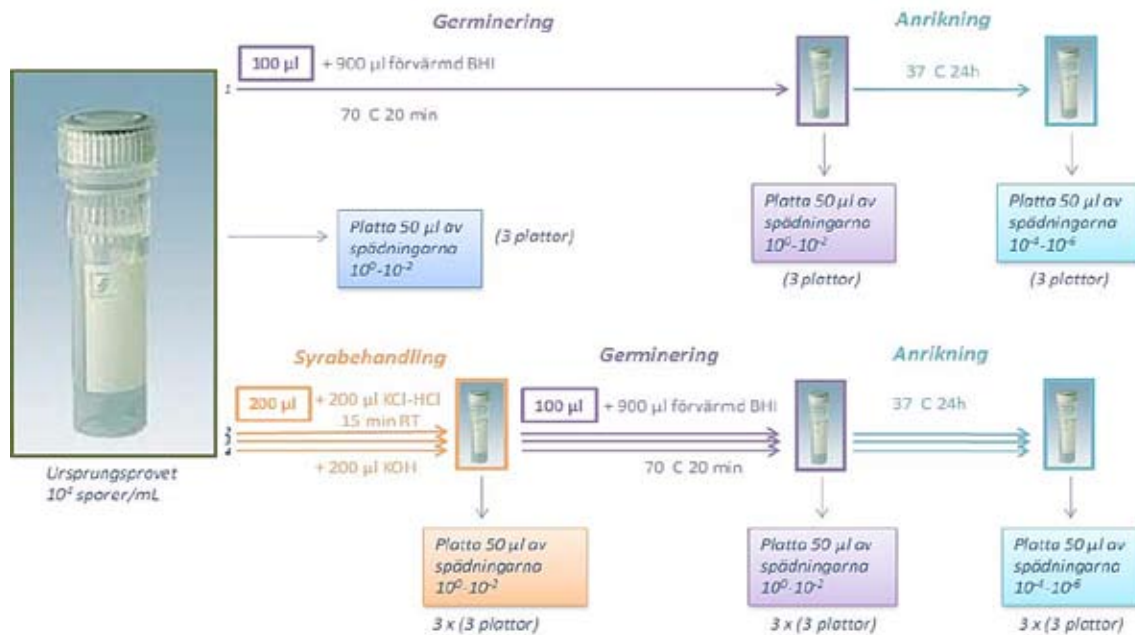
Inför övningen förbereddes två typer av provmatriser; ett eluat från ultracentrifugering av råvatten, framtaget av FBD projekt 14-2012, samt köttfärs som legat framme i rumstemperatur under 2 dygn. De två provmatriserna spikades vid SVA/RUB BSL3 laboratorie med $\sim 10^4$ sporer/mL från två olika *Bacillus* sporstockar; en *B. anthracis* (ATCC 4229) och en *B. cereus* (F2085/98). *B. anthracis* stammen är attenuerad då den saknar en av två plasmider som i normalfallet återfinns i vildtyps *B. anthracis* stammar (4). Ytterligare en specifik egenskap för stammarna är att de båda växer på PLET-agar. Spikning av två provmatriser resulterade i 4 olika provtyper (*B. anthracis* sporer i köttfärs/vatten och *B. cereus* sporer i köttfärs/vatten) som sedan användes vid övningen. Spikade provmatriser skickades med bud till SMI och FOI.

Övningen designades för att deltagare skulle få tillfälle att använda och utvärdera effekten av tre olika förbehandlingsmetoder (syrabehandling, germinering och anrikning) inför odling av *Bacillus* stammar på ett selektivt och ett icke-selektivt odlingsmedium. Resultat i form av fotodokumentation av odlingsplattor samt räkning av kolonier registrerades efter 24h växt vid 37 °C på odlingsmedium. Övningen genomfördes på BSL3 laboratorier vid SVA, SMI och FOI. Resultat från de olika laboratorier jämfördes för att få begrepp om variation mellan laboratorier. För att också få en uppskattning om variationen i resultat inom varje laboratorie utfördes triplikat på en serie av behandlingsmetoder för respektive prov typ, Figur 2.

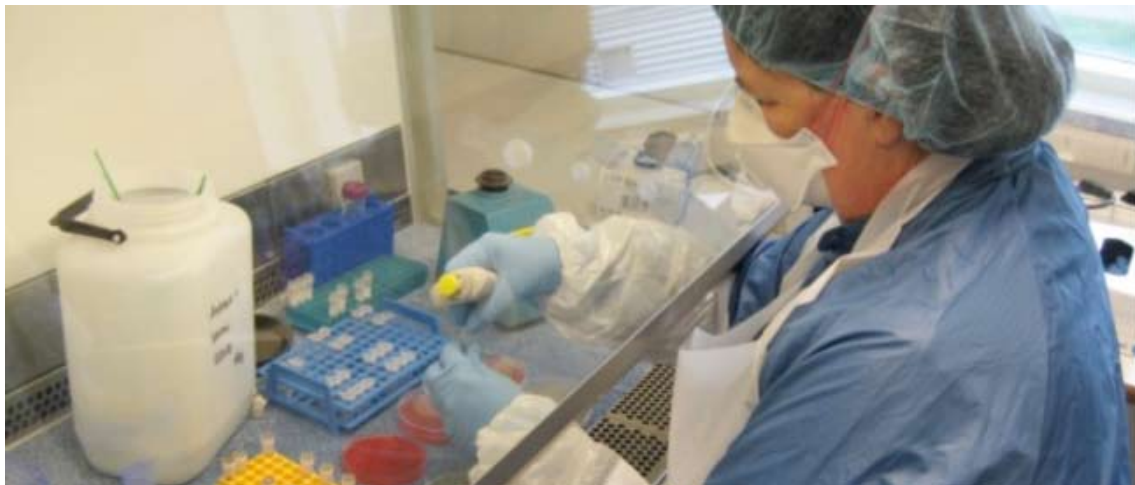
3.2.3 Arbetsflöde vid odling

Vid övningen utfördes först tre förbehandlingsmetoder av de spikade provmatriserna: syrabehandling, germinering och anrikning, innan prov togs för spädningsserie om sex stycken 10x spädningssteg och odling på två typer av odlings-medium (selektiv PLET-agar och Hästblodagar). Delprov för spädningsserie och efterföljande odling togs också ut för kontroll av effekten av enskilda behandlingssteg (obehandlat, efter syrabehandling, efter germinering). En schematisk beskrivning av övningsupplägget finns i Figur 2. Ett protokoll med arbetsbeskrivning för det laborativa arbetet återfinns i Bilaga A.

Syrabehandling har tidigare beskrivits som en effektiv metod för att bli av med konkurrerande blandflora i komplexa prov-matriser som råvatten, till exempel vid odling av syratåliga bakterier som *Legionella* och *Francisella* (2, 5). Syrabehandlingens effekt på *Bacillus* sporer utvärderades här vid ett förförsök där odling från syrabehandlade sporstockar av *B. anthracis* och *B. cereus* jämfördes med odling från obehandlade sporstockar. Metoden för germinering som tagits fram vid RUB innebär att prov sätts i förvärmad BHI för att sedan inkuberas i 70 °C i 20 minuter. Syftet med detta är dels att få *Bacillus* i sporform att bli vegetativa men också att många konkurrerande bakterier i provet inte tål en sådan upphettning utan avdödas. Anrikningssteget innebär att provet inkuberas vid 37 °C under en tid för att *Bacillus* bakterier skall kunna växa till i antal och på så sätt konkurrera ut blandflora och öka i utbyte.



Figur 2. Flödeschema som beskriver arbetet vid förbehandlings (syrabehandling, germinering och anrikning) samt odling under övningen. Schemat beskriver övningsupplägget för en provmatris, en sporstam och ett sorts odlingsmedium. Pilar representerar provflödet, tre pilar innebär att triplikat användes. Då övningen omfattade två provmatriser (vatten och köttfärs), två sporstammar (*B. anthracis* och *B. cereus*) samt två olika typer av odlingsmedium (PLET-agar och Hästblodagar) omfattade hela övningen totalt 336 odlingsplattor vid respektive laboratorium (FOI, SMI och RUB). Plattor; odlingsmedium där prov sprids och som inkuberas i 37°C under 24 h för avläsning av *Bacillus* kolonier.



4. RESULTAT

4.1 INVENTERING OCH FÖRSÖK

En genomgång av de metoder vid våra myndigheter som används för odling av *B. anthracis* finns sammanfattad i Bilaga B. Inventeringen täcker respektive myndighets metoder för sporulering, germinering, anrikning, odling och kontroll av avdöning.

Den kombinerade metod för germinering och anrikning av *Bacillus* sporer som identifierades vid inventeringen har arbetats fram vid RUB, främst med avsikten att kunna analysera livsmedelmatriser med molekylär metodik (PCR) men även för odling. Metoden bygger på att provmatris sätts till förvämt BHI medium och inkuberas vid hög temperatur (70 °C och 37 °C). Odling från diverse livsmedelsmatriser sker sedan till största delen på icke selektivt Hästblodagar. Hästblodagar är det odlingsmedium som också används rutinmässigt vid myndigheter som hanterar odling från kliniska matriser med *Bacillus* frågeställning.

Förutom att använda germinering i syfte att få sporer att bli vegetativa bakterier fungerar metoden som en selektiv behandling då den höga temperaturen (70 °C) avdödar många värmekänsliga organismer. Vid inventeringen identifierades ytterligare en selektiv behandling som syftar till att bli av med konkurrerande blandflora i komplexa prov-matriser. Syrabehandling har visat sig effektiv för att reducera blandflora från råvatten vid odling av syratåliga bakterier som *Legionella* och *Francisella* (2,5). Då metoden, vad vi känner till, inte tidigare använts vid odling av *Bacillus* utvärderades syrabehandlingens effekt på *Bacillus* sporer vid ett förförsök. Vid försöket visade sig sporens förmåga att växa på odlingsmedium vara oförändrad efter en syrabehandling (data visas ej här). Syrabehandling inkluderades därför som en selektiv behandling i den myndighetsgemensamma övningen.

Det selektiva odlingsmedium som identifierades vid inventeringen var varianter av PLET-agar som också utvärderades under övningen i projektet FBD2012/9. Vid inventeringen uppmärksammades att odlingsmedium med samma namn ibland bereds utifrån olika recept på olika substratavdelningar. T.ex. finns olika varianter av PLET och modifierad PLET-agar med liknande grundrecept men med avgörande skillnader. Vid en förövning visade sig dessa skillnader i recept ha stor effekt på tillväxt av vissa *Bacillus*-stammar både vad gäller tillväxthastighet och utbyte (data visas ej här).

Inventeringen täckte in de metoder som används vid respektive myndighet för kontroll av avdödning, däremot gjordes ingen heltäckande inventering av avdödningsmetoder. Det vill säga metoder som används t.ex. inför att ta ut DNA prover från BSL3 laboratorium.

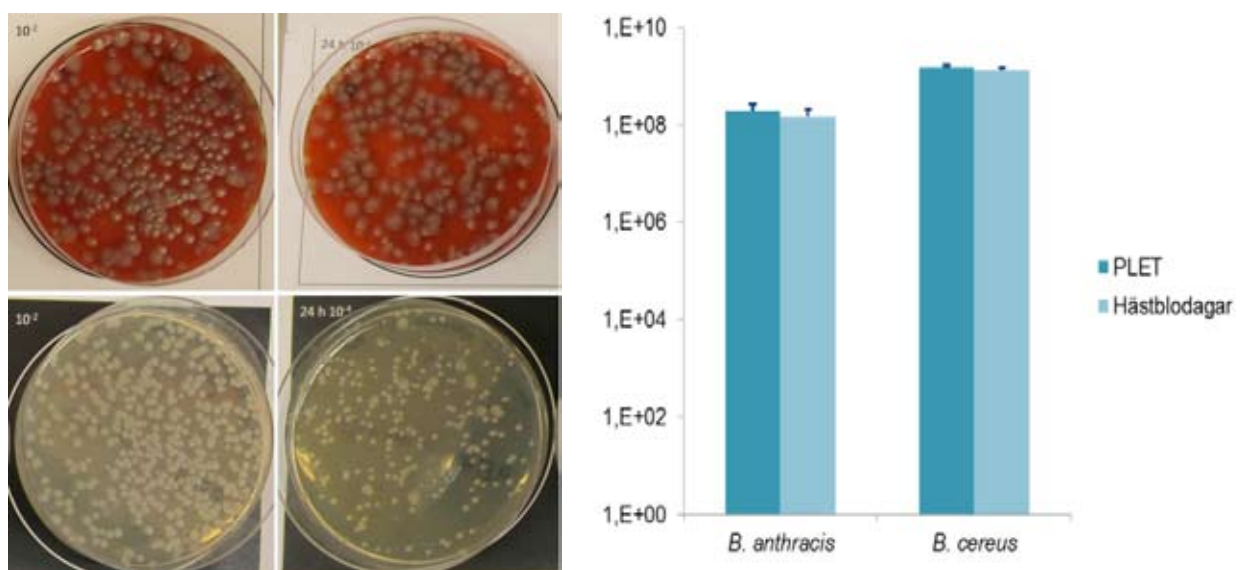
4.2 ÖVNING

Vid övningen fick respektive laboratorium möjlighet att öva selektiva metoder, anrikning samt användning och avläsning av *Bacillus* stammar på två olika odlingsmedium. Till viss del utvärderades också hur olika metoder och medium kunde reducera kontaminerande blandflora. Resultatet av behandlingar och det selektiva mediets effekt på odlingsresultatet avlästes som förmågan att visuellt skilja ut *Bacillus* kolonimorfologi på odlingsplattor samt genom att antal *Bacillus* kolonier räknades och den ursprungliga colony forming units (cfu) beräknades för provmatrisen.

Avsikten med övningen var att varje myndighet skulle bereda medium enligt egna rutiner. Samtliga myndigheter är knutna till externa substratberedare. En av substratavdelningarna kunde inte leverera något medium till övningen på grund av problem med autoklaver. En annan substratavdelning bereder inte längre PLET-agar på grund av att mediet innehåller tallium acetat. Tallium acetat har en stor miljö och hälsopåverkan och hanteras därför inte längre på den aktuella substratavdelningen. Inför övningen fick istället odlingsplattor skickas mellan myndigheter. Transporten skedde efter respektive myndighets normala rutiner för godstransport enligt rekommendationer från FBD projektet "Logistik och analysövning" (3).

De spikade provmatriserna; eluat från ultrafiltrerat råvatten och köttfärs, skickades med bud från SVA/Livsmedelsverket till FOI och SMI tisdagen den 9:e oktober kl. 09:00. Paket mottogs samma dag, både på FOI och SMI. Övningen startade den 10:e oktober kl. 08:00.

Generellt observerades tillväxt av *Bacillus* (kolonier tillräckligt stora för att kunna avläsas) efter 18 timmars inkubation vid 37 °C. Som positiv kontroll användes ursprungliga sporstockar av *B. anthracis* och *B. cereus* stammarna. Vid ett förförsök uppskattades sporkoncentrationen i dessa sporstockar till $2,5 \times 10^6$ cfu/mL (*B. anthracis*) och omkring 1×10^7 cfu/mL (*B. cereus*). Positiva kontroller gick genom hela provarbetningskedjan med syrabehandling, värme behandling, 24h anrikning samt odling över natt på odlingsmedium; PLET (selektiv) och Hästblodagar (Figur 2). Utbytet av bakterier efter behandlingarna var jämförbart vid odling på de två olika odlingsmedierna PLET och Hästblodagar (Figur 3). Vid en jämförelse av bakterieutbytet vid de olika laboratorierna (SMI, SVA/Livsmedelsverket och FOI) observerades en mycket liten variation vilket tyder på att metoderna är robusta och resultatet reproducerbart.



Figur 3. Positiva kontroller; de ursprungliga sporstockarna av *B. anthracis* och *B. cereus* stammarna har behandlats med syra, värme och 18-24h anrikning. Prover har sedan spridits på Hästblodagar och selektivt PLET-agar. T.v. odlingsplattor Hästblodagar (röda) och PLET-agar (gula) med *B. anthracis* till vänster och *B. cereus* till höger. T.h. diagrammet visar medelvärdet och standardavvikelse för colony forming units (CFU) beräknade efter avläsning av *B. anthracis* och *B. cereus* från PLET-agar respektive Hästblodagar. Medelvärdet baseras på resultat från de tre BSL 3 laboratorier som deltog vid övningen (SMI, SVA/Livsmedelsverket och FOI).

4.2.1 Selektiva metoder; syrabehandling och germinering

Germinering med syfte att få *Bacillus* sporer att bli vegetativa bakterier påverkar inte förmågan att få *Bacillus* att växa på odlingsplattor. Utbytet av *Bacillus* var jämförbart då ett obehandlat prov spreds direkt på odlingsmedium jämfört med att ett prov som först germinerats sprids på odlingsmedium (Figur 5 och 6). Germinering, som i praktiken innebär en temperaturhöjning till 70 °C är i sig också en selektiv metod då värmekänsliga organismer dödas. Germinering av vatten och köttfärsmatris reducerade bakgrundsflora och resulterade i avläsningsbara Hästblodagar plattor, men inte utan kontaminerande blandflora (Figur 4).

Syrabehandling dödar organismer som är känsliga för lågt pH. Vid övningen visade sig syrabehandling effektivt reducera blandflora från vattenmatrisen (Figur 4). Däremot var odlingsplattor med prov från syrabehandlad köttfärsmatris ej läsbara på grund av överväxt av blandflora. Ett nollresultat i graferna (Figur 5 och 6) kan alltså ha två orsaker; att inga *Bacillus* vuxit eller att avläsning av odlingsplattorna

inte var möjlig då allt för mycket blandflora innebär att det inte går att urskilja *Bacillus* kolonier. Detta inträffar då odlingsmediet och/eller förbehandlingen inte är nog selektiv.

Trots att det i köttfärsmatrisen fanns en hög andel syratåliga bakterier noterades ändå ett större utbyte av *Bacillus* efter anrikning om provet först genomgått både germinering och syrabehandling jämfört med endast germinering (Figur 5 och 6). Det innebär att det är olika typer av organismer som slås ut vid de olika behandlingarna och en kombination av de båda ger en bred tillämpning för att avdöda blandflora i komplexa prov.

4.2.2 Anrikning

Vid övningen varierade tiden för anrikningen mellan 18 och 24h vid de olika laboratorierna. Anrikning resulterar i ett större utbyte av *Bacillus* dvs. mängden bakterier som växer på platta nära fördubblas från omkring 10^4 bakterier/mL vid odling från ett obehandlat prov till upp emot 10^9 bakterier/mL vid odling från ett prov som anrikats (Figur 5 och 6).

Generellt genererade anrikningssteget ett bättre utbyte av *Bacillus* men anrikningssteget gav också större variationer i resultat mellan laboratorier. Tillväxten av *B. anthracis* var lägre än förväntat vid anrikning vid två av tre laboratorier. Vid ett av laboratorierna registrerades inte något resultat efter anrikning då tillväxten av bakterien överskattades och prover späddes för mycket inför spridning på odlingsmedium. Vi tolkar resultatet med dålig tillväxt av *B. anthracis* vid anrikningssteget som att det i dessa prover fanns blandflora som konkurrerade ut *B. anthracis*. Anrikningens effektivitet borde därför till stor del bero på de selektiva metodernas (germinering och syrabehandling) effektivitet i att inför anrikningen reducera blandflora. Från de provmatriser som hanterades vid övningen observerades inte att anrikningen i sig bidrog till att reducera blandflora. Anrikning är alltså inte selektivt utan ett steg för att öka utbytet av andelen ursprungssporer i matrisen som går att detektera på odlingsmedium. Ett anrikningssteg innebär också att tiden till att svar kan ställas förlängs med ytterligare ett antal timmar.

4.2.3 Selektiva odlingsmedium

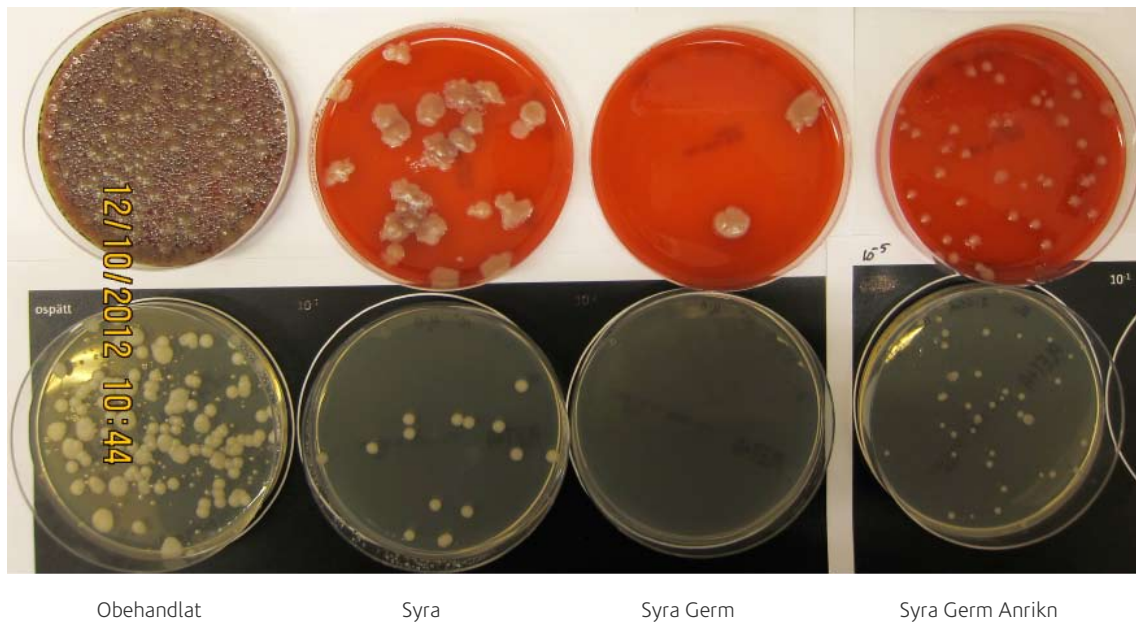
Vid odling från de två provmatriserna vatten och köttfärs reducerades i princip all kontaminerande blandflora vid odling på PLET-agar (Figur 4). Då PLET-agar användes kunde *Bacillus* kolonier utläsas direkt från obehandlade provmatriser. Utbytet av antalet *Bacillus* var jämförbart vid odling på PLET agar och Hästblodagar trots att PLET är ett starkt selektivt medium (Figur 3). Resultatet vid övningen indikerar att utbytet av *B. anthracis* efter anrikning är något sämre på PLET-agar jämfört Hästblodagar (Figur 5). Dock kan detta också bero på att antalet *Bacillus* kolonier som växer på Hästblodagar efter anrikning och från obehandlat prov överskattas då dessa odlingsplattor har stor andel kontaminerande blandflora.

Morfologin hos *Bacillus* kolonierna varierade markant beroende på odlingsmedium (Figur 4). Typisk *Bacillus* morfologi med utflytande kolonier, luddig yta och diffusa kanter observerades på Hästblodagar.

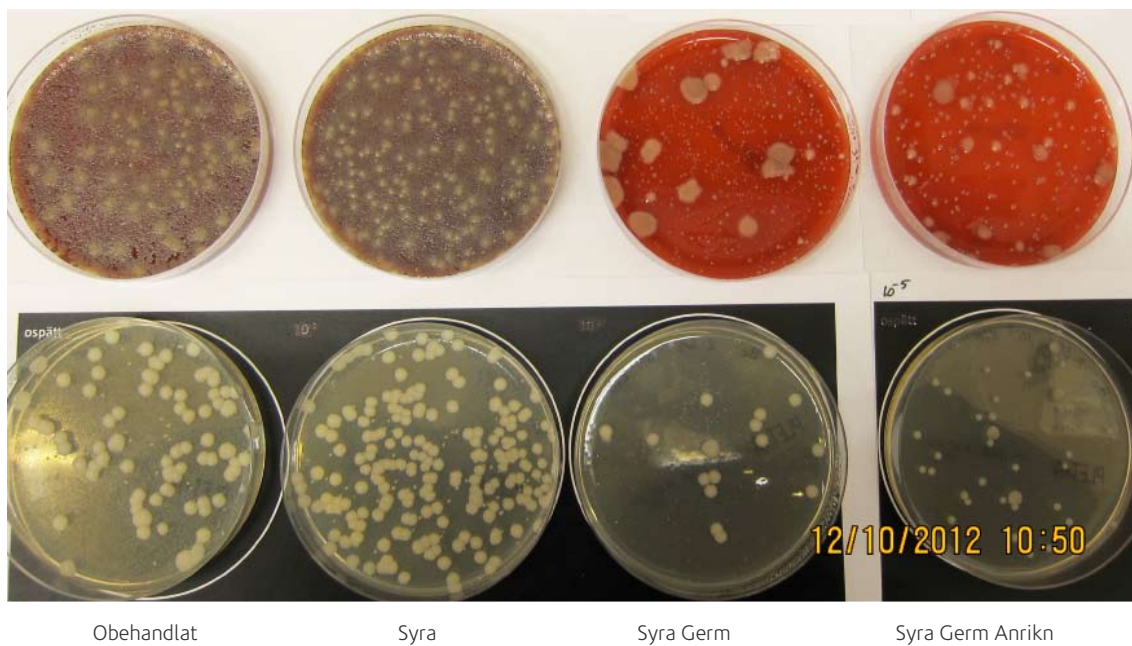
4.2.4 Jämförelse *B. anthracis* och *B. cereus* stammar

De båda stammarna *B. anthracis* och *B. cereus* som användes vid övningen tål syrabehandling och germinering. Tillväxten av bakteriestammarna vid anrikning var mer variabel för *B. anthracis* jämfört med *B. cereus*. Båda stammarna växte också väl på Hästblodagar och PLET-agar. Utbytet av *B. anthracis* efter anrikning var dock något lägre på PLET-agar jämfört Hästblodagar (Figur 5). Men om orsaken till detta var ett sämre utbyte av *Bacillus* på PLET-agar eller om antalet *Bacillus* överskattats vid avläsning från de relativt kontaminerade Hästblodagar plattorna kunde inte fastställas (se stycke 5.2.3).

VATTEN



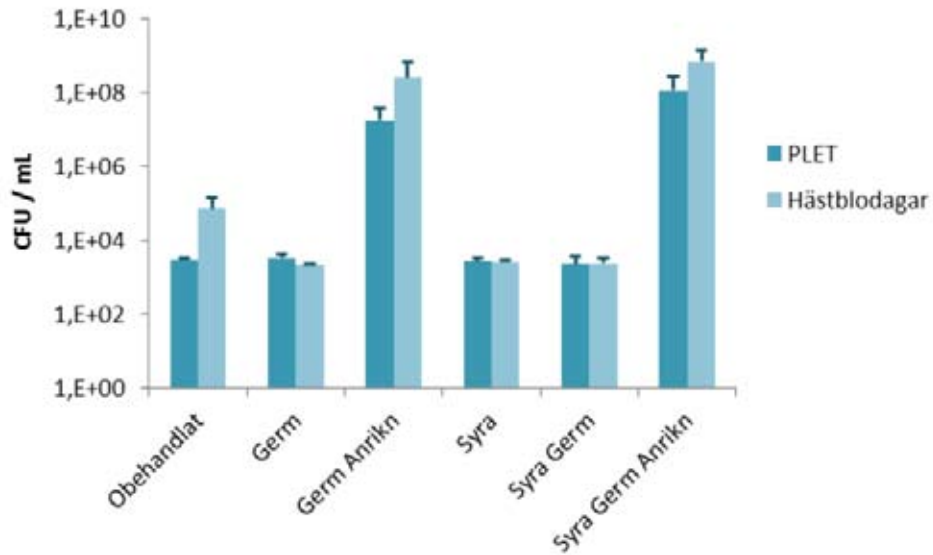
KÖTTFÄRS



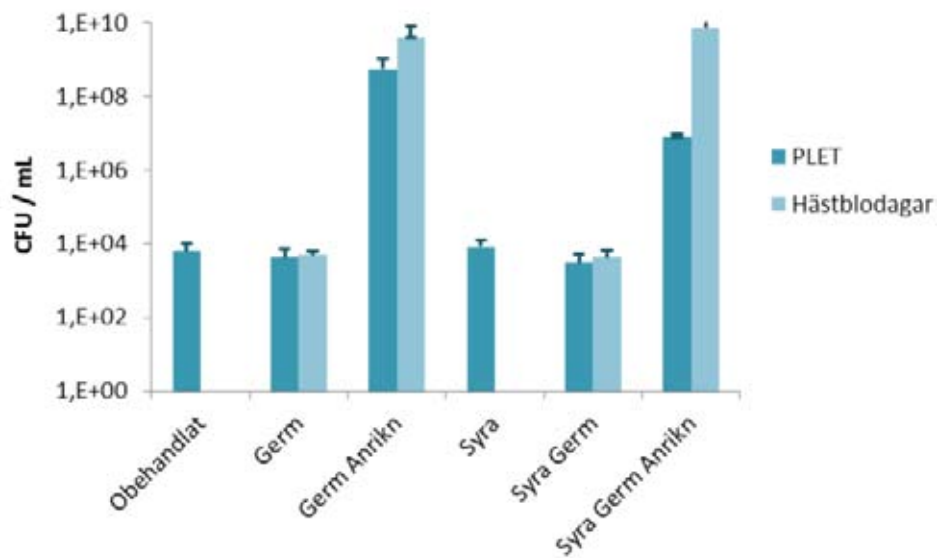
Figur 4. Odningsskålar med prov från behandlade provmatriserna vatten och köttfärs (över och under, respektive) spikade med sporer av *B. cereus*. Prov är tagna efter de olika behandlingsstegen; obehandlat, syrabehandling, syrabehandling-germinering samt syrabehandling-germinering-anrikning. Prov är sedan spridda och inkuberade på Hästblodagar (röda odningsskålar) och PLET-agar (gula odningsskålar).

B. anthracis

VATTEN



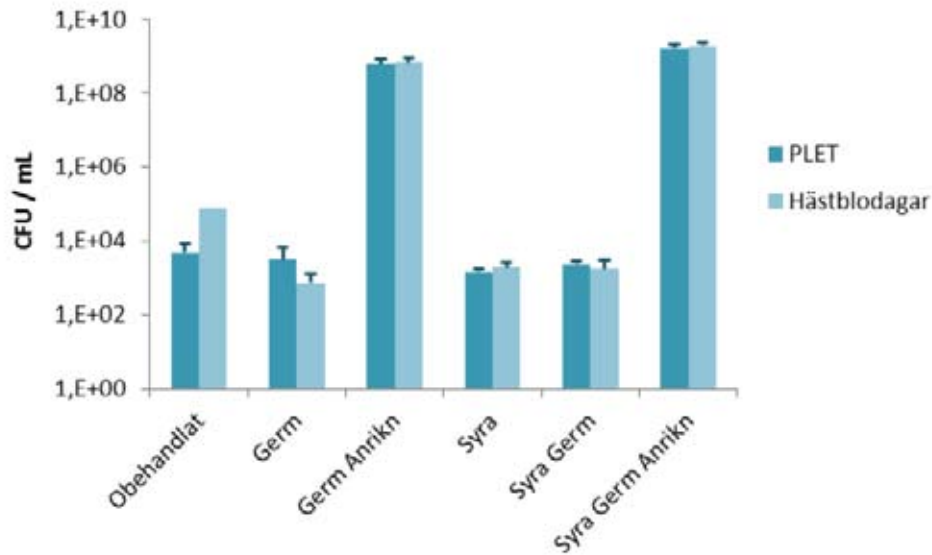
KÖTTFÄRS



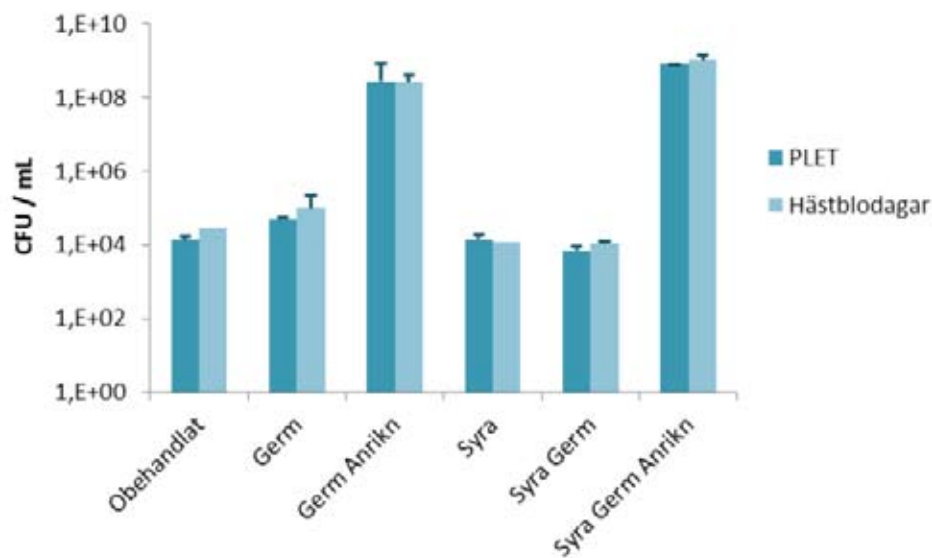
Figur 5. *B. anthracis* colony forming units (CFU) efter behandling av vattenmatris (över) och köttmatris (under) spikad med *B. anthracis* sporer. Prov har tagits ut efter de olika behandlingarna (obehandlat, germinering, germinering-anrikning, syra, syra-germinering och syra-germinering-anrikning) och sedan spridits på PLET och Blodagar medium. Utifrån antal kolonier på odlingsplatta har CFU i provet beräknats.

B. cereus

VATTEN



KÖTTFÄRS



Figur 6. *B. cereus* colony forming units (CFU) efter behandling av vattenmatris (över) och köttmatris (under) spikad med *B. cereus* sporer. Provet har tagits ut ifrån de olika behandlingarna (obehandlat, germinering, germinering-anrikning, syra, syra-germinering och syra-germinering-anrikning) och sedan spridits på PLET och Blodagar medium. Utifrån antal kolonier på odlingsplatta har CFU i provet beräknats. Staplar som saknar felstaplar (Obehandlat prov från vattenmatris samt obehandlat och syrabehandlat prov från köttmatris odlad på hästblodagar) baseras på resultat från ett laboratorium, övriga laboratorier ansåg att odlingsplattorna var för kontaminerade för att kunna utläsa kolonier av *Bacillus*.

5. DISKUSSION

Med syfte att harmonisera odlingsmetodik för bakteriell riskklass 3 organismer mellan FBD myndigheterna Livsmedelsverket, Smittskyddsinstitutet, Statens Veterinärmedicinska Anstalt samt Totalförsvarets Forskningsinstitut fokuserade denna studie på att öva metoder för odling av *B. anthracis* från komplexa matriser med bakgrundsflora. Övningen omfattade metoder för germinering, anrikning och selektiv odling av *B. anthracis*.

Vid övningen framkom att odling på selektiv PLET-agar är den metod som med minst antal laborativa moment genererar renkultur av *Bacillus* vid odling från matriser med blandflora (råvatten och köttfärs). Däremot innebär användning av PLET-agar hantering av det hälsovådliga och miljöfarliga tallium acetat. Tillgång till PLET-agar är därför också begränsad då vissa substratavdelningar slutat tillverka mediet pga. tallium acetats skadliga effekter. Ett lika bra resultat med avseende på renhet i odlingen men med ett större utbyte av *Bacillus* kolonier fås då provmatrisen innan odling germineras och anrikas. Anrikningen innebär ytterligare ett dygns väntan innan provsvar kan ges men hanteringen av det hälsovådliga och miljöfarliga tallium acetat undviks då odling kan ske på Hästblodagar. Tiden för anrikningen kan i sig ha stor inverkan på utbytet av *Bacillus*. Vid övningen genomfördes anrikningen under 18-24h. Effekten av anrikningstiden på utbytet av *Bacillus* vid odling från livsmedelsmatriser undersöks vid RUB.

De selektiva metoder som ingick vid övningen bygger på att slå ut värmekänsliga och syrakänsliga organismer. Den reducerande effekten av dessa metoder på blandfloran beror av blandfloras sammansättning eller karaktär. Vid övningen visade det sig att vattenmatrisen bestod av en stor andel syrakänsliga organismer medan blandfloran i köttfärsen överlevde en sänkning av pH. Däremot reducerades blandfloran lika effektivt i både vatten och köttfärsmatrisen av en kraftig temperaturhöjning (germinering). Vilken selektiv metod som skall användas vid odling från en specifik matris bör därför avgöras baserat på provmatrisens karaktär.

Övningen tyder på att de *B. anthracis* och *B. cereus* stammar som användes svarade lika vid germinering, syrabehandling och odling på Hästblodagar respektive PLET-agar. *B. anthracis* stammen som användes var dock mycket variabel i tillväxt vid anrikning. Detta tyder på att stammen är känslig för konkurrens av blandflora. Resultatet från övningen visade en mycket liten variation i CFU som erhållits vid de tre olika BSL3 laboratorerna vid odling av *B. anthracis* och *B. cereus* från vatten och köttfärsmatrisen. Resultat från ett förförsök visar också att små skillnader i odlingsmediets recept eller tillredningsrutin kan påverka både utbyte och morfologi hos eftersökt *Bacillus*. Samma namn på recept garanterar inte att beredningen är identisk vid olika substratavdelningar. Vid denna övning producerades alla PLET-agar plattor på samma substratberedning vilket kan ha bidragit till det samlade resultat som erhöles.

Laboratoriepersonalens erfarenhet påverkar kraftigt förmågan att läsa ut positiv eller negativ odling från en odlingsplatta med kontaminerande blandflora. Variationer i bedömningen av vilka odlingsplattor som är läsbara bygger på erfarenhet och praxis på det specifika laboratoriet. Vid övningen observerades också skillnader i koloni-morfologi vid odling på Hästblodagar och PLET-agar. *B. cereus* stammen som användes vid övningen uppvisade i sig också varierande kolonistorlek, speciellt vid odling på PLET-agar (Figur 3). Att morfologi, kontaminerande blandflora och erfarenheter hos laboratoriepersonal varierar gör att det i princip är nödvändigt att fotodokumentera odlingsplattor för att harmonisera en analys mellan laboratorier. Gemensam fotoutrustning och fotomallar underlättar en sådan kommunikation.

Övningen som genomfördes var mycket omfattande och tidskrävande med långa arbetsdagar på BSL3 laboratoriet. Arbetet inkluderade dels de selektiva behandlingarna men främst spädningsserier, spridning på och avläsning av odlingsplattor. Varje laboratorium genererade omkring 350 odlingsplattor på

två arbetsdagar. På två av laboratorierna fanns tre personer som kontinuerligt arbetade med övningen under två dagar. Vid det tredje laboratoriet utfördes övningen av en person vilket inte är en rimlig arbetsbelastning. Vid övningen framkom också att skillnader i avfallshantering hade stor inverkan på logistiken kring odlingsarbetet och tidsåtgången för övningen. Ytterligare en flaskhalsar som identifierades var tillgång till inkubatorer och svårighet att samsas med annan verksamhet. En etablerad kontaktväg mellan de olika säkerhetslaboratorierna är också att föredra för att hantera frågeställningar under insatsens gång. Vid ett skarpt läge finns också möjligheten att några av laboratorierna väljer att förlägga vissa moment till handskbox vilket ytterligare försvårar arbetet.

De resultat som framkommit under denna övning är specifika för de två *Bacillus* stammar som inkluderats, de specifika provmatriserna och den spikningsnivå som använts. Resultatet från övningen visar att kontaminerande blandflora effektivt kan reduceras med selektiva behandlingar och odlingsmedium för att framgångsrikt odla *Bacillus* från provmatriser med blandflora.



6. SLUTSATSER

- **Vilken metodik bör användas inom FBD vid odling av högpatogena bakteriella agens från matriser med blandflora?**

En kombination av germinering, anrikning och odling på Hästblodagar innebär ett arbetsflöde som inte skiljer sig så mycket mot de på myndigheterna redan existerande rutiner. En sådan metodik kan med en erfaren laboratoriepersonal vara nog selektivt för att kunna avläsa *Bacillus* morfologi på odlingsplattor. Dock garanterar en sådan provbehandling inte rena odlingar utan kontaminerande blandflora. Odling på PLET- agar å andra sidan genererar de renaste kulturerna med avseende på *B. anthracis* men den negativa miljö och hälsoeffekten av tallium acetat, gör att användning av PLET-agar ofta undviks.

- **Kan vi arbeta med kliniska-, livsmedels- och miljöprover med samma metodik eller finns behov att harmonisera de olika provtyperna var för sig?**

För odling från komplex matris med blandflora inom FBD bör germinering och anrikning med efterföljande odling på Hästblodagar vara den mest tillämpbara metodiken med potential att fungera på många olika provtyper.

- **Att tänka på vid en stor odlingsinsats inom FBD?**

En större mängd odlingar är logistiskt, materiellt och arbetsmässigt omfattande. En mer systematisk insats för att odla från komplexa matriser (matriser med blandflora) genererar snabbt stora kvantiteter odlingsplattor som är utrymmeskrävande. Detta innebär en utmaning på ofta redan trånga BSL-3 laboratorier. Kanske behöver BSL-3 laboratoriet samtidigt kunna användas av annan verksamhet. Med skarp *B. anthracis* frågeställning kan också visst arbete förflyttas till en mer svårarbetad handskbox. En stor mängd avfall genereras och avfallshantering blir en viktig fråga för att lösa säkerhet och logistik. Frågeställningar kring biosäkerhet och arbetsmiljö fångas upp vid riskbedömning av arbete.

- **Värdet av att öva?**

Den genomförda inventeringen samt efterföljande övning har inneburit stora fördelar för de ingående myndigheterna i form av kunskapsuppbyggnad och konkret tillämpning av nya metoder som rör odling av *B. anthracis* med avseende på selektivitet och anrikning.



7. BEGREPP OCH FÖRKORTNINGAR

Anrikning	Process för att öka antalet av en specifik bakterie (<i>Bacillus</i>) från en blandning av bakterier i ett prov. Sker genom inkubering i rikt medium.
BSL 3	Biosafety level 3, skyddsnivå 3.
CFU	Colony forming unit, kolonibildande enhet. Varje koloni på odlingsplattan motsvaras av en levande bakterie i det spridna materialet.
FOI	Totalförsvarets forskningsinstitut.
Germinering	Då bakterie sporer blir vegetativa bakterier, växer på odlingsmedium.
Provmatrix	Typ av prov som används vid övningen, kan till exempel vara vatten, jord, eller livsmedel.
RUB	Resurslaboratorium för beredskapsdiagnostik, SVA och Livsmedelsverkets gemensamma BSL 3-arbete.
SMI	Smittskyddsinstitutet.
Spika	Att tillsätta mikroorganismer till en provmatrix, till exempel bakterier till vatten. Förekommer här även som ”spikning”.
Sporulering	Då vegetativa bakterier (bakterier som växer på odlingsmedium) blir sporer.
SVA	Statens veterinärmedicinska anstalt.
Utbyte	Antal bakterier som växer på odlingsmedium i förhållande till ursprungsmängden sporer i provmatrisen.

8. BILAGOR

- Bilaga A** Protokoll med instruktioner för det laborativa arbetet vid övningen.
Finns på FBD:s interna Wiki, under projekt 13 2012. Finns även att tillgå vid förfrågan.
- Bilaga B** Inventering av metoder och medium associerade till germinering, anrikning, selektiv odling och kontroll av avdödning av *B. anthracis* som finns vid de olika myndigheterna.
Finns på FBD:s interna Wiki, under projekt 13 2012. Finns även att tillgå vid förfrågan.

9. REFERENSER

1. **Andersson, A., K. Malm, M. Granberg, A. Peterzon, K. Sandstedt, and J. Ågren. 2011.**
Detektion av *Francisella tularensis*. Swedish Forum for Biopreparedness Diagnostics report 8/2011. (Publ.nr. MSB333, ISBN 978-91-7383-177-2)
2. **Bopp, C. A., J. W. Sumner, G. K. Morris, and J. G. Wells. 1981.**
Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. J Clin Microbiol 13:714-719.
3. **Bäckman, S., S. Garbom, T. Boskani, G. Bölske, S. Sternberg-Lewerin, and A. Lundin Zumpe. 2011.**
Logistik och analysövning. Swedish Forum for Biopreparedness Diagnostics report 7/2011. (Publ.nr MSB332, ISBN 978-91-7383-176-5)
4. **Green, B. D., L. Battisti, T. M. Koehler, C. B. Thorne, and B. E. Ivins. 1985.**
Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. Infect Immun 49:291-297.
5. **Humrighouse, B. W., N. J. Adcock, and E. W. Rice. 2011.**
Use of acid treatment and a selective medium to enhance the recovery of *Francisella tularensis* from water. Appl Environ Microbiol 77:6729-6732.
6. **Luna, V. A., J. Gullede, A. C. Cannons, and P. T. Amuso. 2009.**
Improvement of a selective media for the isolation of *B. anthracis* from soils. J Microbiol Methods 79:301-306.
7. **Thelaus, J., K. Kuoppa, A. Sahlin, K. Eld, and T. Wahab. 2012.**
Harmonisering av metoder för odling av högpatogena bakterier på BSL-3 laboratorium. Swedish Forum for Biopreparedness Diagnostics report 9/2012. (Publ.nr. MSB486, ISBN 978-91-7383-286-1)

