

Fusobacterium necrophorum

Detektion og identifikation på et selektivt medie

Projektet omhandler en sammenligning mellem 3 pladesubstrater; Fuso-pladen, AVN-pladen og den anaerobe plade, til identifikation af bakterien *Fusobacterium necrophorum*. Vi fandt ud af, at Fuso-pladen er mere sikker at aflæse end AVN-pladen og den anaerobe plade. På grund af selektiviteten vokse stort set de samme bakteriekolonier på Fuso-pladen og AVN-pladen, men Fuso-pladen er mere sikker at aflæse, på grund af at bakterien danner β -hæmolyse på denne plade.

Bachelorprojektet blev udarbejdet af Dorte Christiansen Leth og Boris Hoyer Mathiasen, bioanalytikerstuderende på 7. semester, VIA University College, Aarhus.

Statens Serum Institut ønskede en validering af Fuso-pladen i forhold til den anaerobe plade, hvilket denne rapport dannede grundlag for.

Det er gennem mange år dokumenteret, at *Fusobacterium necrophorum* kan forårsage pharyngitis, specielt ved unge og unge voksne, hvor den kan være skyld i mere end 20 % af tilfældene af akut pharyngitis.^{i,iii,iii} *F. necrophorum* er også mistænkt for at forårsage 20 % af recidiverende, vedvarende eller kroniske halsbetændelser.ⁱⁱ Ud over dette kan *F. necrophorum* også forårsage mellemørebetændelse hos børn, peritonsillære abscesser hos unge og unge voksne samt bihulebetændelse hos voksne (30-50 år).^{iv} Yderligere kan pharyngitis forårsaget af *F. necrophorum*, om end sjældent, udvikle sig til Lemierres syndrom, en alvorlig og livstruende infektion, som er blevet estimeret til at have en højere forekomst, sygelighed og dødelighed end gigtfeber, ved unge og unge voksne i den vestlige verden.^v

F. necrophorum er en langsomtvoksende, kanamycin- og metronidazolsensitiv, gram-negativ obligat anaerob pleomorf stav.^{vi} *F. necrophorum* kan inddeles i to underarter: subsp. *necrophorum* og subsp. *funduliforme*. Den førstnævnte er mest fundet som patogen ved dyr, den sidstnævnte forårsager infektioner i mennesker.^{vi} *F. necrophorum* er sandsynligvis en del af normalfloraen i det menneskelige svælg.ⁱⁱⁱ Isolation og iden-

tifikation af obligat anaerobe bakterier som *F. necrophorum* fra normalfloraen i svælg kan være svær og tidskrævende.^{vii}

En selektiv anaerob agar til isolation af gram-negative anaerobere eksisterer, men selvom mediet er blevet brugt til at isolere *F. necrophorum*, indikerer studier, at der skal anvendes forlænget inkubationstid, hvorfor et bedre selektivt medie vil kunne øge detektionsraten og reducere identifikationstiden af *F. necrophorum*.^{ii,vii,ix}

Materialer og metode

Prøveindsamling

Alle svælgpodninger sendt til KMA Viborg i perioden oktober og november 2009 blev inkluderet. Laboratoriet servicerer 150 privatpraktiserende læger med et populationsgrundlag på ca. 230.000 mennesker.

Prøvehåndtering

Alle svælgpodningerne blev transporteret i Stuarts transportmedie (SSI) og udsået anaerobt inden for 24 timer på tre forskellige anaerobe agarmedier fra SSI, beskrevet i tabel 1. Ved at dreje podedepinden 120 grader blev en tredjedel af bakterierne fra overfladen af podedepinden udsået på den *F. necrophorum*-selektive agar, endnu en tredjedel på den anaerobe vancomycin- og nalidixin- (AVN) agar og den sidste tredjedel på SSI anaerob agar. De tre anaerobe agarmedier blev udsået ved hjælp af trekantspredning, og på pladerne blev lagt kanamycin-disc (1000 μ g) i første strøg og en metronidazol disc (5g) mellem første og andet strøg, som kan ses på figur 1.

Podedependene blev efterfølgende udsået på 5 %-blodplade (fåreblod) og inkuberet aerobt, her blev de undersøgt for β -hæmolytiske streptokokker og andre aerobe patogener. Sluteligt blev podedependene overført til 1 ml saltvand og opbevaret i 24 timer før DNA-ekstraktion.

Inkubation af agarplader

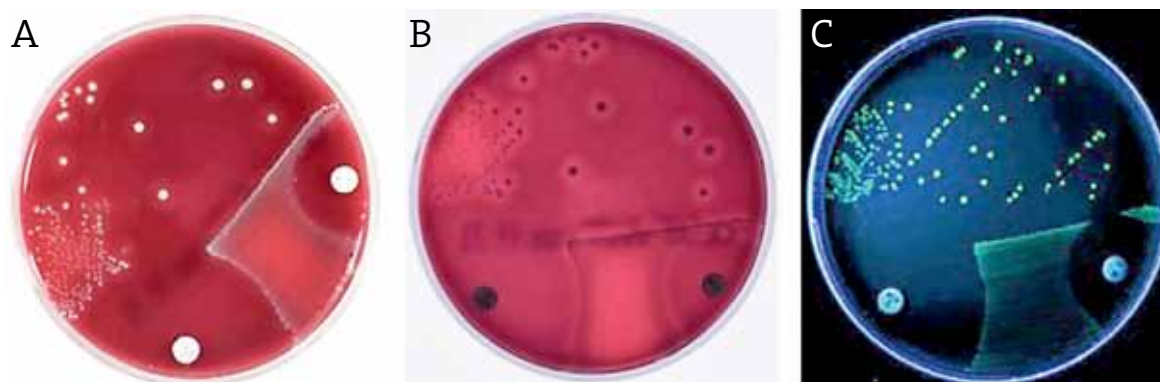
De tre anaerobe medier blev inkuberet i 5 % H₂, 10 % CO₂, og 85 %



Boris Hoyer Mathiasen // bioanalytiker
Nuklearmedicinsk Afdeling
Sygehus Lillebælt
Vejle Sygehus



Dorte Christiansen Leth // bioanalytiker
Klinisk Mikrobiologisk Afdeling
Aalborg Sygehus



FIGUR 1 *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme*: kolonimorfologi, β -hæmolyse og fluorescens. Kolonimorfologi, β -hæmolyse og fluorescens fra en renkultur af *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* som set på det *F. necrophorum*-selektive agar. (A) Kolonierne fremtræder cirkulære, let forhøjede med glat kant og hvidlige i farven, nogle gange let gullige, ofte med en voksagtig konsistens. Kolonierne kan glide på pladen, hvis de bliver skubbet til. (B) En klar zone omkring *F. necrophorum*-kolonierne ses som et resultat af β -hæmolyse af hestebloodet i pladen (C). Når kolonierne bliver eksponeret for UV-lys (365 nm), ses grønlig fluorescens.

NO₂ v/v i 2 dage ved 35 °C før første aflæsning og yderligere 2 dage inden sidste aflæsning. Renkulturer af *F. necrophorum* blev inkuberet anaerobt i 1-2 dage på den anaerobe agar eller 5 %-hesteblood ved 35 °C.

Håndtering af *F. necrophorum*-mistænkte kolonier

Formodede *F. necrophorum*-kolonier fra de tre plader blev gramfarvet ved hjælp af farvemaskine. Bakterierne blev herefter rencyrt anaerobt på den anaerobe agar med kanamycin og metronidazol og aerobt på en anden anaerob plade, hvor ingen vækst var forventet. Antibiotisk sensitivitet blev udført på en tredje anaerob agar. Yderligere blev alle mistænkelige kolonier fra SSI anaerob agar og AVN agar rencyrt anaerobt på 5 %-hesteblood for at undersøge for β -hæmolyse.

Detektion og adskillelse af *F. necrophorum*

F. necrophorum blev identificeret på baggrund af kolonimorfologien, som vist på figur 1A og β -hæmolyse som vist på figur 1B. Lugten af smørsyre og grønlig fluorescens ved eksponering af ultraviolet lys var en del af identifikationen, fluorescens ses på billede 1C. Yderligere krævede identifikation af *F. necropho-*

rum fund af gram-negative pleomorfe stave, som vist på figur 2, og sensitivitet over for kanamycin, metronidazol, colistin og resistens til vancomycin, som beskrevet af Tage Justesen (<http://tagejustesen.dk/anaerobebakterier/>). *F. necrophorum* blev differentieret fra andre *Fusobacterium* spp. Vha. β -hæmolyse på hesteblood, den typiske kolonimorfologi, blev *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* differentieret fra *F. necrophorum* subsp. *necrophorum*, desuden på baggrund af kolonimorfologi og de karakteristiske pleomorfe stave.

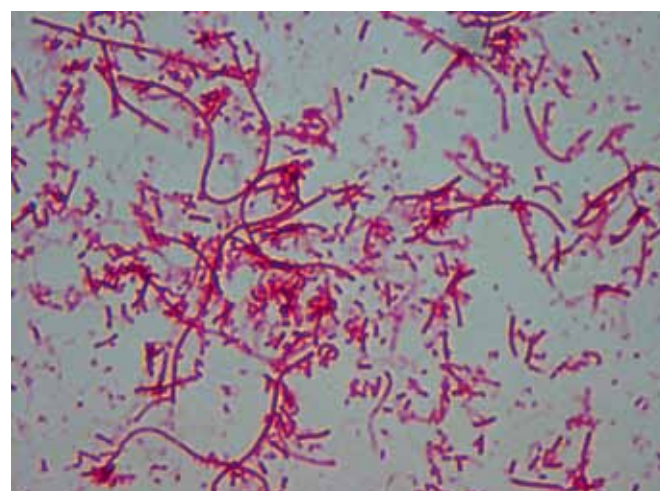
Antibiotisk modtagelighed

Alle stammer af *F. necrophorum* blev testet på SSI anaerob agar for modtagelighed af penicillin og metronidazol.

Real-time PCR og DNA-ekstraktion

Inden DNA-ekstraktion blev svælgpodningerne vortex-mikset i nogle enkelte sekunder, og 700 μ l saltvand blev oprenset ifølge producentens vejledning, elueret i 50 μ l elueringsbuffer og opbevaret ved 4 °C, indtil de skulle analyseres.

Real-time Polymerase Chain reaction (PCR) blev udført som beskrevet af Jensen et al. En 10-folds seriel fortynding af kendt koncentration (10⁴-10⁷ CFU/ml) med *F. necrophorum* subsp.



FIGUR 2 *Fusobacterium necrophorum* subsp. : Gram-farvning. Gram-farvning af *F. necrophorum* fra en svælgpodning. *F. necrophorum* er gram-negativ, blandet lange og korte stave, sommetider med krøllede og sammenfildrede lange stave, som vist.

TABEL 1. INGREDIENSER I DE TRE ANAEROBE MEDIER

Vand ¹	900 ml Agar	6,8 g
Pepton	13,4 g Leverautolysat	16 ml
Natriumklorid	4,5 g Defibrineret hesteblood ²	62 ml
Citronsyre	0,14 g Cystein HCL	0,45 g
Dikaliumhydrogenfosfat	1,6 g K-vitamin	0,0009 g
Stivelse	1,8 g Nalidixin ³	5,0 mg
Gærekstrakt	0,9 g Vancomycin ³	2,5 mg

SSI, Statens Serum Institut; AVN, anaerob Vancomycin og Nalidixin

¹ pH var justeret til 7,4 +/- 0,1.

² Den SSI-anaerobe agarplade og AVN-agarpladen var varmebehandlede, hvilket gjorde dem ubrugelige til detekteringen af β -hæmolyse.

³ Nalidixin og Vancomycin var tilsat AVN-agarpladen og den *F. necrophorum*-selektive plade.

funduliforme ATCC 51357 blev anvendt til koncentrationsbestemmelse af svælgpodningerne.

Kliniske informationer

Skriftlige kliniske data var opgivet fra de fleste privatpraktiserende læger eller hospitalet og registreret i MADSDatabasen – et system for standardiseret håndtering af prøver og administrationsdata fra laboratoriet.

Statistisk analyse

For at bestemme sensitiviteten på de tre agarplader anvendtes en χ^2 -test. Statistisk analyse blev udført vha. SPSS til Windows, version 16,0.

Resultater

Dyrknings- og real-time PCR-resultater

I alt blev 139 svælgpodninger screenet for *F. necrophorum*. Podningerne stammede fra patienter fra 0 til 57 år med en median på 20 år. 94 % af patienterne var mellem 10 og 40 år. Klinisk information blev hentet fra MADSDatabasen og viste, at mindst 81 af patienterne havde ondt i halsen. Sparsom eller ingen information var at finde for de sidste 58 patienter. *F. necrophorum* blev identificeret i 45 podninger af real-time PCR, og på agarpladerne blev 32, 29 og 11 af podningerne positive på henholdsvis *F. necrophorum* selektiv agar, AVN-agar og SSI anaerob agar. Disse data er vist i tabel 2. 91 % (29 af 32) af *F. necrophorum* identificeret på den *F. necrophorum*-selektive agar blev observeret med karakteristisk pleomorfe stave ved mikroskopering, som vist på figur 2.

F. necrophorum blev identificeret vha. real-time PCR og på den *F. necrophorum* selektive plade fra 25 (31 %) og 18 (22 %) af de 81 patienter med ondt i halsen. En koncentration på 10⁶-10⁸ CFU/ml var fundet ved 16 (20 %) af de 81 podninger.

Det *F. necrophorum*-selektive medie var meget pålidelig til detektion af *F. necrophorum* ved middel og høje koncentrationer,

men sensitiviteten faldt i takt med lavere koncentrationer, som illustreret i tabel 2. Den SSI-anaerobe agar, normalt anvendt i Danmark, havde en signifikant lavere sensitivitet end det *F. necrophorum*-selektive medie ($p = 0,0008$). *F. necrophorum* var identificeret næsten tre gange så ofte på den *F. necrophorum*-selektive agar, sammenlignet med det SSI-anaerobe agar, som vist i tabel 2.

Sammenvoksende kolonier i første strøg blev observeret på den *F. necrophorum*-selektive agar ved koncentrationer over 9,1 x 10⁵ CFU/swab, 10 kolonier eller mindre var observeret i første strøg ved koncentrationer på 10⁵ – 8,6 x 10⁵ CFU/swab, og 5 kolonier eller mindre blev observeret, når koncentrationen var mindre end 10⁵ CFU/swab. Ved sammenvoksende kolonier i første strøg var der også altid vækst i andet og tredje strøg.

Fra en podning blev *F. necrophorum* detekteret af den *F. necrophorum*-selektive agar og AVN-agar, men var negativ ved real-time PCR.

Antibiotisk sensitivitet

Alle *F. necrophorum*-stammer var sensitive til pencillin og metronidazol, resistensaflysning blev normalt udført efter 24 timer.

To eller fire dages inkubation

Ingen nye kolonier af *F. necrophorum* blev observeret på nogle af de tre agarplader efter 4 dages inkubation.

Fordele ved den *F. necrophorum*-selektive agar

Vancomycin og nalidixin i den *F. necrophorum*-selektive agar og AVN-agar hæmmede væksten af de fleste gram-positive og mange gram-negative bakterier, hvilket gør det væsentligt lettere at detektere *F. necrophorum*-kolonier sammenlignet med den SSI-anaerobe agar. Modsat AVN-agar og SSI-anaerobe agar kunne β -hæmolyse aflæses primært på den *F. necrophorum*-selektive agar, hvilket er specielt hjælpsomt for den uerfarne i detektionen af *F. necrophorum*.

Selvom det ikke blev undersøgt direkte i dette studie, vil detektionen af *F. necrophorum* uden brug af en selektiv agar, som fx den SSI-anaerobe agar, tage længere tid end ved brug af den *F. necrophorum*-selektive agar til endelig identifikation.

Omkostninger

Udgiften til den *F. necrophorum*-selektive agar, AVN-agar og SSI-anaerobe agar var henholdsvis 10, 21 og 9 kr./plade. Materi-

Pladesubstratet (*F. necrophorum*-selektiv agar) omtalt i denne artikel kan købes ved SSI. Varenummer 74215.

TABEL 2. SENSITIVITET OG SPECIFICITET FOR DETEKTIONEN AF *F. NECROPHORUM* PÅ DE TRE ANAEROBE AGARPLADER

CFU/podning	<i>F. necrophorum</i> -selektiv agar			AVN-agar			SSI anaerob agar		
	< 105	105-106	≥106	< 105	105-106	≥106	< 105	105-106	≥106
Dyrkning/ PCR-positiv ¹	5/16	3/4	24/25	3/16	2/4	24/5	0/16	1/4	10/25
Sensitivitet	0.31	0.75	0.96	0.19	0.50	0.96		0.000.25	0.40
95 % konfidens-interval	0.11-0.59	0.19-0.99	0.80-1.00	0.04-0.46	0.07-0.93	0.80-1.00	0.00-0.17	0.06-0.81	0.21-0.61
Kvantitet ²	+	++/+++	+++	+	+/+++	+++		+	+++
Specificitet	0.99			0.99			1.00		

SSI, Statens Serum Institut; AVN, Anaerob Vancomycin og Nalidixin

¹ Sensitiviteten og specificiteten af de tre anaerobe agarplader blev evalueret imod en kvantitativ PCR-analyse.

² Dyrkningerne var registreret som +++, hvis der var vækst i alle 3 strøg, ++ hvis der var vækst i det første og det andet strøg, og +, hvis der kun var vækst i det første strøg.

elle omkostninger inkl. rendyrkninger til identifikation af *F. necrophorum* på den *F. necrophorum*-selektive agar, AVN-agar og SSI-anaerobe agar var henholdsvis 19, 54,35 og 42,65 kr./identifikation. Hvis lønninger skulle inkluderes, ville dette yderligere favorisere brugen af den *F. necrophorum*-selektive agar, da færre renkulturer er nødvendige. Priserne for PCR-analysen var mellem 60 og 200 kr./prøve afhængig af prøveantal.

Diskussion

Vores studie viser, at *F. necrophorum* normalt kan blive detekteret og differentieret fra andre *Fusobacterium* spp. efter to dages inkubation på den *F. necrophorum*-selektive agar. Klinikere kan derfor normalt have resultater inden for tre arbejdsdage. Den standard SSI-anaerobe agar, der bliver brugt i Danmark, kan ikke anbefales til anvendelse ved identifikation af *F. necrophorum* fra svælgpodninger. Derfor er den *F. necrophorum*-selektive agar meget pålidelig ved middel og høje koncentrationer, som vist i tabel 2.

AVN-agaren skal opfattes som en 1.-generations *F. necrophorum*-selektiv agar med en sensitivitet som den *F. necrophorum*-selektive agar. AVN-pladens manglende evne til at vise β-hæmolyse kræver en rendyrkning på 5 %-hesteblood, hvilket er dyrere.

Vi har erfaret, at real-time PCR har en højere sensitivitet end den *F. necrophorum* selektive agar, men kun ved lave koncentrationer af *F. necrophorum*, hvilket er i overensstemmelse med et lignende studie.ⁱⁱⁱ Det kan ikke anbefales at anvende PCR som rutineundersøgelse i klinikken, da PCR-analysen er væsentligt dyrere end dyrkning og ikke giver et billede af bakteriens resistensmønster. Til trods for dette er real-time PCR hurtigere og tager kun 4-5 timer for at opnå et resultat.

Vores studie viser at sammenvoksede kolonier, observeret på den *F. necrophorum*-selektive agar, betyder, at der er en koncentration på 10⁶ CFU/swab eller mere, hvorimod lavere koncentrationer giver separate kolonier. Et lignende studie, der undersøgte en rask kontrolgruppe for tilstedeværelsen af *F. necrophorum* i halsen med real-time PCR, fandt ud af, at raske unge kan have op til 3 x 10⁶ CFU/swab, men normalt mindre.ⁱⁱⁱ Patienter med klinisk tonsillitis havde en højere forekomst og højere koncentration af *F. necrophorum* end patienter uden kliniske tegn.ⁱⁱⁱ Dette indikerer, at svælgpodninger fra patienter med ondt i halsen som følge af *F. necrophorum* normalt vil betyde sammenvoksede kolonier på den *F. necrophorum*-selektive agar, dette er sjældent set ved patienter uden kliniske tegn.

Ud over at have en højere sensitivitet, har vi fundet ud af, at den *F. necrophorum*-selektive agar ikke i så høj grad kræver rutinerede bioanalytikere. Den kræver færre rendyrkninger og er formentlig billigere og hurtigere end andre dyrkningsmetoder. Alt sammen forhold, som favoriserer brugen af den *F. necrophorum*-selektive plade til detektion af *F. necrophorum* i fremtiden.^{iii,viii} ■

Artiklen er en oversat og forkortet udgave af originalartiklen: (BANK, S., NIELSEN, H. M., HOYER MATHIASSEN, B., CHRISTIANSEN LETH, D., HAGELSKJÆR KRISTENSEN, L. and PRAG, J. (2010), *Fusobacterium necrophorum* – detection and identification on a selective agar. *APMIS*, 118: 994–999. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02683.x) Læs originalartiklen på <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0463.2010.02683.x/full>.

ⁱ Amess JA, O'Neill W, Giollariabhaigh CN, Dytrych JK. A six-month audit of the isolation of *Fusobacterium necrophorum* from patients with sore throat in a district general hospital. *Br J Biomed Sci* 2007; 64:63-5.

ⁱⁱ Batty A, Wren MW, Gal M. *Fusobacterium necrophorum* as the cause of recurrent sore throat: comparison of isolates from persistent sore throat syndrome and Lemierre's disease. *J Infect* 2005; 51:299-306.

ⁱⁱⁱ Jensen A, Hagelskjær Kristensen L, Prag J. Detection of *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme* in tonsillitis in young adults by real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13:695-701.

^{iv} Ehlers KT, Rusan M, Fuursted K, Ovesen T. *Fusobacterium necrophorum*: most prevalent pathogen in peritonsillar abscess in Denmark. *Clin Infect Dis* 2009; 49:1467-72.

^v Centor RM. Expand the pharyngitis paradigm for adolescents and young adults. *Ann Intern Med* 2009; 151:812-15.

^{vi} Jensen A, Hagelskjær Kristensen L, Nielsen H, Prag J. Minimum requirements for a rapid and reliable routine identification and antibiogram of *Fusobacterium necrophorum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27:557-63.

^{vii} Aliyu SH, Marriott RK, Curran MD, Parmar S, Bentley N, Brown NM, et al. Real-time PCR investigation into the importance of *Fusobacterium necrophorum* as a cause of acute pharyngitis in general practice. *J Med Microbiol* 2004; 53 (Pt 10):1029-35.

^{viii} Batty A, Wren MW. Prevalence of *Fusobacterium necrophorum* and other upper respiratory tract pathogens isolated from throat swabs. *Br J Biomed Sci* 2005; 62:66-70.

^{ix} Wren MW. Multiple selective media for the isolation of anaerobic bacteria from clinical specimens. *J Clin Pathol* 1980; 33:61-5.