

Örebro Universitet

Institutionen för hälsovetenskap och medicin

Enheten klinisk medicin

Program: Biomedicinska analytikerprogrammet med inriktning laboratoriemedicin

Kurs: BMLV C, Biomedicinsk laboratorievetenskap, Examensarbete 15 hp

Datum: 2015-05-15

## Jämförelse av selektivitet för *Clostridium difficile* mellan två olika odlingsmedier

Författare: Katrin Bülow

Handledare: Torbjörn Norén, MD, Infektionsläkare, Universitetssjukhuset Örebro.

Laborationshandledare: Karin Johansson, Molekylärbiolog, PhD,

Laboratoriemedicinska länskliniken, Molekylär diagnostik Universitetssjukhuset

Örebro.

## SAMMANFATTING

*Clostridium difficile* är en sporbildande grampositiv stav som växer anaerobt. Behandling med antibiotika innebär en ökad risk för infektion med *C. difficile* då den normala tarmfloran rubbas och *C. difficile* lättare kan växa till. För att identifiera *C. difficile* kan selektiva odlingsmedium användas. Syftet med den här studien var att undersöka om de kromogena substratet chromID™ *C. difficile* selekterar fram *C. difficile* bättre efter 24 timmars anaerob inkubering än den selektiva *Clostridium difficile* agar (CDAGP) som i dagläget används i det mikrobiologiska laboratoriet på Universitetssjukhuset Örebro (USÖ) efter 48 timmars anaerob inkubering. Antalet faeces-prover var 117 och dessa odlades på CDAGP, som inkuberades anaerobt i 48 timmar, och på chromID™ *C. difficile*, som inkuberades anaerobt i 24 timmar. Identifiering av de olika kolonierna på plattorna gjordes med hjälp av Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight masspektrometry (MALDI-TOF MS). Det gjordes en statistisk jämförelse av medelvärdet på antalet bakteriearter per platta, utöver *C. difficile*, som identifierats på de två olika odlingsmedierna. Resultatet visade att det fanns en signifikant skillnad avseende detta där chromID™ *C. difficile* selekterade bort fler andra bakterier än CDAGP. *C. difficile*-kolonierna var tydligare på chromID™ *C. difficile* än på CDAGP. Av de prover som svarades ut som positivt växt av *C. difficile* hade 63% kunnat svaras ut minst 24 timmar snabbare med chromID™ *C. difficile* än med CDAGP.

**Nyckelord:** *Clostridium difficile*, chromID, Cykloserine A, cefoxitinA

# INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INTRODUKTION .....	1
<i>Clostridium difficile</i> .....	1
Diagnostisering .....	2
Bakterieidentifiering .....	3
Syfte .....	4
MATERIAL & METOD .....	4
Odling .....	4
Analys med MALDI-TOF MS .....	5
Bearbetning av data/Statistik .....	5
Etiska överväganden .....	6
RESULTAT .....	6
Identifierade bakterier .....	6
Tidsbesparing .....	8
Kännetecken .....	8
Identifieringsproblem .....	9
DISKUSSION .....	9
Slutsats .....	12
REFERENSER .....	13
Bilaga 1 .....	15

## INTRODUKTION

### *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile* är en grampositiv stav som bildar sporer och växer anaerobt. *C. difficile* orsakar ungefär 30 % av all antibiotikaassocierad diarré (1). Behandling med antibiotika medför en ökad risk för infektion med *C. difficile*, det är speciellt cefalosporiner, kinoloner och klindamycin som ökar risken. Äldre personer löper större risk att drabbas av en infektion med *C. difficile* och även personer som behandlas med protonpumpshämmare eller kortikosteroider löper större risk. Dessutom kan det innebära en större risk att behandlas i samma rum som någon med *C. difficile*-infektion har vårdats på tidigare (2). Sporererna som bakterien bildar kan nämligen överleva på en yta i månader och kanske till och med år eftersom de inte är känsliga för varken upphettning eller desinfektionsmedel (1,2). Cirka 2-5% av befolkningen har *C. difficile* i tarmen utan att vara sjuka av den. Först om personen behandlas med antibiotika ökar risken att bakterien ska orsaka sjukdom eftersom risken att bakterien ska växa till ökar när den normala tarmfloran är nedsatt på grund av antibiotikan (3).

Bakterien producerar minst två biologiskt aktiva toxiner, toxin A och toxin B. Båda dessa toxiner binder till vissa receptorer på epitelet i kolon. Toxinerna orsakar olika enterocytförändringar som exempelvis att aktinskelettet kollapsar. Genomsläpligheten i tight junction påverkas av framförallt toxin B medan toxin A även har en kemotaktisk påverkan på neutrofiler. Toxin A kan också sända enterocyter i apoptos och aktivera enteriska neuroner. Sedan 1970-talet har de varit känt att någon av dessa toxiner, eller båda, måste påvisas för att ett fynd av *C. difficile* ska kunna klassas som patogent (1). *C. difficile* förekommer i en rad olika ribotyper med lite olika egenskaper (2). *C. difficile* är en av de vanligaste vårdrelaterade tarmpatogerna. Man har sett utbrott med särskilt virulenta ribotyper, exempelvis på ett sjukhus i södra Sverige som ledde till att ett drygt 30-tal patienter insjuknade samt ett flertal dödsfall (4). För att minska smittspridningen finns bland annat åtgärder som innebär att en patient med *C. difficile*-infektion skall flyttas till ett enkelrum (2).

I Sverige har antalet nya fall av *C. difficile* minskat från 2011 till 2013, antalet nya fall år 2012 var 8 104 och minskade till 7 814 år 2013. De tio senaste åren har det däremot setts en ökning av rapporterade fall av *C. difficile* i världen. Fallen har dessutom i högre utsträckning varit av allvarigare grad med ett större antal dödsfall som följd. Några av flera troliga orsaker till ökningen av rapporterade fall är en ökad användning av antibiotika, större spridning av *C. difficile*-ribotyper med högre virulens men också att övervakningen har förbättrats (5).

### **Diagnostisering**

Den diagnostiska säkerheten kan ökas med hjälp av odling men eftersom det med odling inte går att bestämma om bakterien är toxinbildande eller inte, krävs specifika toxintest för att säkerställa detta. Bakterieisolat från odlingar kan användas till molekylärbiologiska typningar vid svåra fall eller ovanligt mycket fall av *C. difficile*-infektioner (4). Vid diagnostisering av *C. difficile*-infektion är cytotoxin B assay samt odling av toxinproducerande *C. difficile*-prover klassat som ”golden standard” (6).

För att identifiera *C. difficile* med odling kan ett selektivt medium innehållande cykloserine och cefoxitin användas (figur 1). Cykloserine inhiberar framförallt *Escherichia coli* men även andra gramnegativa bakterier. Cefoxitin har ett bredare inhiberingsområde då det inhiberar tillväxten av både gramnegativa och grampositiva bakterier. *C. difficile* inhiberas såklart inte av dessa antibiotika men inte heller *Enterococcus* inhiberas (7).

Det finns även kromogena odlingsmedium som isolerar *C. difficile*. På dessa odlingsmedium skall växt av *C. difficile* ses redan efter 24 timmars anaerob inkubering. På ett av dessa kromogena odlingsmedium växer *C. difficile* vanligtvis som svarta kolonier (figur 2), men det kan även förekomma *C. difficile*-kolonier som är ofärgade på samma odlingsmedium (8).



Figur 1. Odlingsmedium innehållande Cykloserine A och cefoxitinA med växt av *Clostridium difficile* efter 48 timmars anaerob inkubering. Fotograf Bülow K



Figur 2. Kromogent odlingsmedium med växt av *Clostridium difficile* efter 24 timmars anaerob inkubering. Fotograf Bülow K

### Bakterieidentifiering

Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight masspektrometry (MALDI-TOF MS) kan användas för att identifiera bakterier som odlats på agarplattor. Vid MALDI-TOF MS används matrix, och den som är vanligast vid analys av peptider och triglycerider är  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid. Matrixet som användes vid MALDI-TOF behöver innehålla en stark kromofor som kan absorbera energi från UV-lasern som också används vid denna metod. Denna kromofor är viktig för att skydda proteinerna i provet från sönderfall. Provmaterial och matrix sätts på provplattan där dessa två får torka och kristallisera med varandra. Provet bestrålas sedan med en UV-laser och för att inte provet ska bli för varmt, vilket kan skada provet, bestrålas det bara under en kort period. Fotonerna från UV-lasern skapar radikala katjoner av matrixet, eftersom molekylerna ligger så nära varandra kan de också enkelt reagera med varandra. Matrixmolekylerna reagerar med varandra och fria elektroner, vilket medför att de så småningom kan föra över en proton till provmolekylerna så att de joniseras. Jonerna går sedan genom ett elektrostatiskt fält och in i TOF-röret där jonerna sorteras efter massa och laddning. Beroende på vilken massa och vilken laddning jonerna har går de med olika hastighet genom TOF-röret. Masspektrometern (MS) läser av hur jonerna kommer från TOF-röret och skapar av det ett spektrum, vilket sedan kan jämföras med

referensspektra i en databas där det matchas med ett identiskt eller det mest liknande spektrat. Även bakterier som är relativt nära besläktade med varandra går att skilja med denna metod eftersom proteinsammansättningen hos de olika arterna, stammarna och underarterna är olika. Detta gör att olika bakterier genererar olika spektra och kan identifieras som olika bakterier, såvida spektrat finns med i databasen (9).

### **Syfte**

Syftet med denna studie var att undersöka om det kromogena substratet chromID<sup>TM</sup> C. difficile selekterar fram *C. difficile* bättre efter 24 timmars anaerob inkubering, än den selektiva platta som i dagläget används i det mikrobiologiska laboratoriet på Universitetssjukhuset Örebro (USÖ) efter 48 timmars anaerob inkubering.

## **MATERIAL & METOD**

### **Odling**

Faeces-prover med frågeställning om *C. difficile* från 117 patienter som analyserades. Proverna odlades först på *Clostridium difficile* agar (CDAGP) (97% Fastidious Anaerobe agar base (Acumedia, Lansing, Michigan USA), 0,5% *Clostridium difficile* Supplement; 97% Cykloserine A och 3% cefoxitinA (Lab M, Heywood, Storbritannien), 0,1% defibrinerat hästblod (SVA, Uppsala, Sverige)), som används inom rutin på USÖ. Denna fick inkubera anaerobt i 37°C i 48 timmar. Efter 24 timmar odlades samma prover även på chromID<sup>TM</sup> C. difficile (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, Frankrike); köttpepton (svin) 0,78%, taurocholat (nöt) 0,1%, jästextrakt 0,34%, Natriumklorid 0,58% selektiv blandning 0,03%, kromogen blandning 0,03% och agar 1,26% med anaerob inkubering i 37°C i 24 timmar. Odlingarna på dessa prover kunde då läsas av samtidigt, CDAGP efter cirka 48 timmar och chromID<sup>TM</sup> C. difficile efter cirka 24 timmar. Det gjordes även ett litet test, vid tre odlingstillfällen, där även chromID-plattorna inkuberades i totalt 48 timmar med avläsning efter både 24 timmar och 48 timmar.

## Analys med MALDI-TOF MS

En jämförelse mellan CDAGP och chromID™ *C. difficile* gjordes genom att analysera de kolonytyper som växte på varje platta med MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremer, Tyskland). För att identifiera bakterierna sattes de som dubbelprover på en analysplatta med hjälp av en tandpetare som doppades i den koloni som skulle analyseras och sedan gnuggades först på en position på analysplattan och sedan på en position till. Varje position med prover täcktes med 0,5 µl 70% myrsyra (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) som fick torka innan 1 µl matrix ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) (Bruker Daltonics, Bremer, Tyskland) sattes på varje position. Efter detta analyserades proverna på analysplattan i MALDI-TOF MS. Dataserna som användes till MALDI-TOF MS var MALDI Biotyper 3.1 och Biotyper Real Time Classification. Till en början analyserades inga prover om, så prover som inte gav något resultat vid första MALDI-TOF MS analysen förblev oidentifierade. Detta ändrades efter några dagar då de oidentifierade analyserades om minst en gång.

## Bearbetning av data/Statistik

Selektiviteten hos de två odlingsmedierna jämfördes i en korstabell genom att lista vilka bakterier som kunnat identifieras och hur ofta de identifierats på respektive odlingsmedium. Resultaten från denna studie jämfördes även med de resultat som rutinpersonalen på USÖ fått fram med rutin-plattan, CDAGP.

En hypotesprövning gjordes med nollhypotesen ( $H_0$ ) att det växer lika många bakteriearter, förutom *C. difficile*, per platta på de två odlingsmedierna som jämförts. Mothypotesen ( $H_1$ ) var då att det inte växer lika många bakteriearter, förutom *C. difficile*, per platta på de två odlingsmedierna som jämförts. Signifikansnivån valdes till  $\alpha = 0,01$ . Medelvärdet för antalet bakteriearter per platta för varje odlingsmedium och standardavvikelsen för antalet bakteriearter per CDAGP beräknades med hjälp av Microsoft Excel 2007. Värdet på testvariabeln för CDAGP beräknades med hjälp av formeln:  $t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$  där  $\bar{x}_1$  är medelvärdet för CDAGP och  $\bar{x}_2$  är medelvärdet för chromID-plattorna,  $s$  är standardavvikelsen och  $n$  är antalet prover. Därefter jämfördes testvariabelns värde med tabellvärdet 2,617 som motsvarar det kritiska värdet för ett tvåsidigt test med  $\alpha = 0,01$  och 120 frihetsgrader.



## **Etiska överväganden**

Inget samtycke krävdes från patienterna eftersom proverna aidentifierades och de kan inte spåras utifrån rapporten.

## **RESULTAT**

Efter att de första 11 chromID-plattorna som faeces-prover odlades ut på hade inkuberats i 24 timmar kunde ett svart färgomslag ses på de flesta av plattorna men det fanns inga tydliga kolonier. Plattorna inkuberades därför i ytterligare 24 timmar för att se om det skulle bli någon skillnad. Efter totalt 48 timmar sågs fortfarande svart färgomslag i agarn och även en del nya kolonier hade dykt upp. På en av plattorna upptäcktes då *C. difficile*-kolonier som inte varit synliga efter 24 timmar. På de resterande chromID-plattorna som inkuberats i totalt 48 timmar fanns inga nya *C. difficile*-kolonier efter 48 timmar. Det blev alltså ingen förändring när det gäller förekomsten av *C. difficile* från 24 timmar till 48 timmar och fortsättningsvis inkuberades chromID-plattorna i 24 timmar enligt tillverkarens missiv.

## **Identifierade bakterier**

På 117 prover identifierades, utöver *C. difficile*, 30 olika typer av bakterier. Det var sju bakteriearter som kunde identifieras utöver *C. difficile* på chromID-plattan medan det var 28 olika bakterier, utöver *C. difficile*, som kunde identifieras på CDAGP. På chromID-plattan kunde någon annan bakterie än *C. difficile* identifieras 15 gånger medan det var 154 gånger som någon annan bakterie än *C. difficile* kunde identifieras på CDAGP. Den bakterie som identifierats på flest chromID-plattor, förutom *C. difficile* som identifierades 22 gånger, var *Clostridium hathewayi* som identifierades sex gånger. *Bacteroides uniformis* och *Clostridium tertium* identifierades på en chromID-platta var, men dessa bakterier identifierades aldrig på CDAGP. På CDAGP var den vanligaste bakterien *Lactobacillus rhamnosus* som identifierades på 30 plattor medan *C. difficile* endast identifierades på 17 plattor. *Clostridium hathewayi*, som var vanligast utöver *C. difficile* på chromID-plattorna, identifierades bara en gång på CDAGP medan den som vara vanligast på CDAGP inte identifierades alls på chromID-plattorna. Av de bakteriesläkten som kunde identifieras mer än en gång, *Bacteroides*, *Candida*, *Clostridium* och *Lactobacillus*, selekteras *Candida* bort helt med chromID-plattan.

*Lactobacillus* som var det bakteriesläkte som var den vanligaste på CDAGP selekterades nästan bort helt med chromID-plattan, det var bara *Lactobacillus mucosae* som kunde identifieras en gång på chromID-plattan medan *Lactobacillus* identifierades hela 74 gånger på CDAGP. De två andra bakteriesläktena identifierades inte nämnvärt mer eller mindre på någon av plattyperna (tabell 1).

Tabell 1. Bakterier som identifierats efter 24 timmar på chromID-plattor och 48 timmar på CDAGP samt antalet CDAGP respektive chromID-plattor bakteriearterna har identifierats på.

<b>Bakterieart</b>	<b>chromID</b>	<b>CDAGP</b>
<i>Alistipes finegoldii</i>		2
<i>Bacteroides caccae</i>		1
<i>Bacteroides ovatus</i>	2	9
<i>Bacteroides uniformis</i>	1	
<i>Bacteroides vulgatus</i>	2	2
<i>Candida albicans</i>		6
<i>Candida glabrata</i>		5
<i>Clostridium bolteae</i>		6
<i>Clostridium clostridioforme</i>		18
<i>Clostridium difficile</i>	22	17
<i>Clostridium glycyrrhizinilyticum</i>		3
<i>Clostridium hathewayi</i>	6	1
<i>Clostridium innocuum</i>		2
<i>Clostridium prefringens</i>	2	4
<i>Clostridium tertium</i>	1	
<i>Collinsella aerofaciens</i>		8
<i>Enterococcus faecalis</i>		3
<i>Flavonifractor plautii</i>		6
<i>Lactobacillus casei</i>		1
<i>Lactobacillus mucosae</i>	1	2
<i>Lactobacillus oris</i>		2
<i>Lactobacillus paracasei</i>		29
<i>Lactobacillus plantarum</i>		1
<i>Lactobacillus reuteri</i>		4
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		30
<i>Lactobacillus sakei</i>		3
<i>Lactobacillus vaginalis</i>		2
<i>Morganella morganii</i>		2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		1

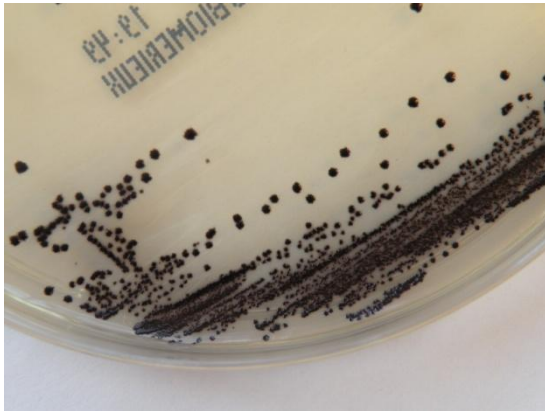
Medelvärdena för antalet bakteriearter per platta beräknades, med hjälp av Microsoft Excel 2007, till  $\bar{x}_1 = 1,3$  och  $\bar{x}_2 = 0,1$ . Standardavvikelsen för värdena från CDAGP beräknades, också med hjälp av Microsoft Excel 2007, till  $s = 0,8$ . (All rådata till beräkningarna finns i bilaga 1) Testvariabeln beräknades till  $t = \frac{1,3-0,1}{\frac{0,8}{\sqrt{117}}} = 16,2$  och vid jämförelse med tabellvärdet 2,617 drogs slutsatsen att  $H_0$  kan förkastas. Det finns alltså en statistiskt signifikant skillnad mellan CDAGP och chromID-plattorna när det gäller växt av antalet bakteriearter, med undantag för *C. difficile*, per platta.

### **Tidsbesparing**

Av de 19 prover som, av rutinpersonalen på USÖ, svarats ut som positiv växt skulle resultatet kunnat påskyndas med minst 24 timmar i 12 fall med hjälp av chromID-plattan. I 18 fall skulle resultatet varit klart efter 24 timmar. Det var bara ett prov från den första odlingen som det hade tagit 48 timmar att ge ett positivt slutresultat med chromID-plattan.

### **Kännetecken**

På chromID-plattorna var de flesta *C. difficile*-kolonierna svarta, eller grå, med ojämn kant (figur 3). De var inte så stora men ändå större än kolonier av andra bakterier som även de växte på chromID-plattorna. Det fanns även *C. difficile*-kolonier på en av chromID-plattorna som hade samma storlek som de svarta *C. difficile*-kolonierna fast dessa var ofärgade (figur 4). *C. difficile*-kolonier kan alltså även vara ofärgade men det vanligaste verkar ändå vara att de är svarta eller grå.



Figur 4. Svarta *Clostridium difficile*-kolonier på chromID™ *C. difficile*. Fotograf Bülow K



Figur 3. Ofärgade *Clostridium difficile*-kolonier på chromID™ *C. difficile*. De svarta markeringarna i den röda ringen gör att några kolonier syns tydligare. Fotograf Bülow K

På CDAGP har *C. difficile* en speciell doft som påminner om ladugård. Denna doft är av intresse vid bestämning av *C. difficile* för att inte någon annan bakterie ska misstas för att vara *C. difficile*. På chromID-plattorna kunde ingen sådan lukt kännas.

Ett par prover som svarades ut som positivt för *C. difficile*, av rutinpersonalen, noterades inte alls på CDAGP i denna studie. Det var ett av proven som inte svarats ut förrän efter fyra dagar. Det andra provet hade däremot svarats ut efter 48 timmar.

### Identifieringsproblem

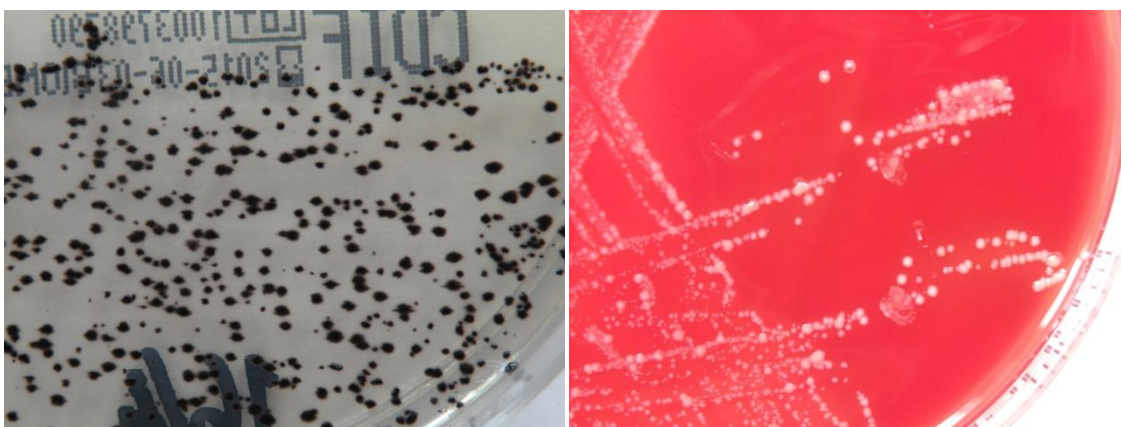
Många kolonier som växte på plattorna kunde inte identifieras med hjälp av MALDI-TOF MS. Det var flest oidentifierade de första dagarna då proverna inte analyserades om. De flesta kolonier som förblev oidentifierade från de dagar då proverna analyserades om var så små att de var nästan omöjliga att få tag på för att sedan kunna sätta på analysplattan. Det var dessutom färre prover som var i behov av att analyseras om längre in i studien. *C. difficile* hade oftast ett högt träffvärde på MALDI-TOF MS medan många av de andra bakterierna oftare hade ett lägre träffvärde.

### DISKUSSION

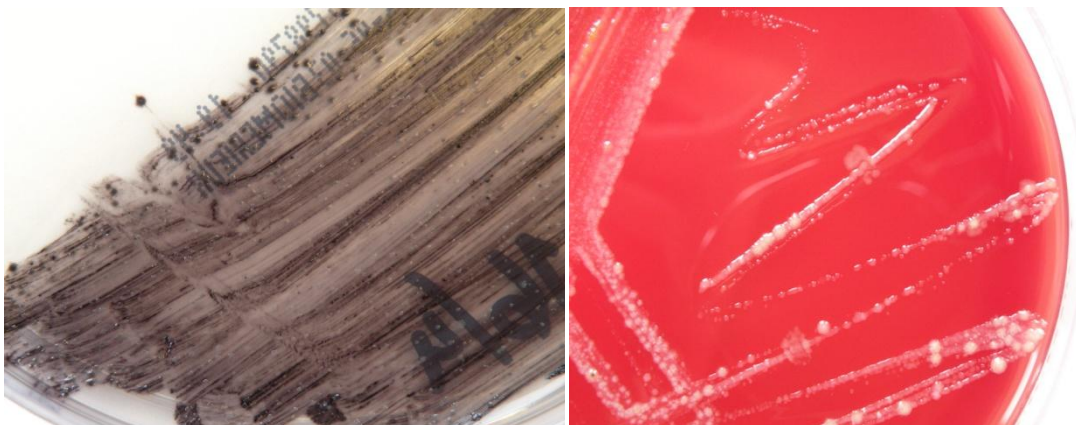
Eftersom det bara uppkom nya *C. difficile*-kolonier efter 48 timmar på chromID-plattorna från det första odlingstillfället antogs att det var något som gjorts annorlunda

på just dem, som orsakade färgomslaget utan växt av några kolonier. Därför togs beslutet att bara inkubera chromID-plattan i 24 timmar eftersom det enligt tillverkaren ska räcka med 24 timmar. Det var dessutom det som var syftet med studien, att se om chromID™ *C. difficile* selekterade fram *C. difficile* bättre efter 24 timmars anaerob inkubering än CDAGP efter 48 timmars anaerob inkubering.

Det faktum att *C. difficile* inte har den karaktäristiska doften av ladugård på chromID-plattorna kan eventuellt vara en nackdel då utseendet blir den enda parametern när det gäller odlingen. Däremot görs rutinmässigt ett toxintest på varje *C. difficile*-prov som kan ge en viss vägledning. Dessutom har *C. difficile*, utifrån denna studie, ett tydligt utseende på chromID™ *C. difficile*. Däremot var det svårare att se *C. difficile* på CDAGP då den till och med missades helt på en platta (figur 5 och 6). Det fanns naturligtvis en viss skillnad i hur tydligt *C. difficile* kunde visualiseras även på chromID™ *C. difficile* vissa var väldigt tydliga (figur 5) och andra var mindre tydliga (figur 6). På en chromID-platta växte ofärgade *C. difficile*-kolonier (figur 3), troligtvis var det en specifik ribotyp som har det utseendet. Enligt en annan studie var ribotyperna BR023, BR020, BR014, UCL 20a och UCL 412 ofärgade på chromID™ *C. difficile* (8).



Figur 5. Prov 112 odlat på chromID™ *C. difficile* efter 24 timmars anaerob inkubering till vänster och CDAGP efter 48 timmars anaerob inkubering till höger. Fotograf Bülow K



Figur 6. Prov 113 odlat på chromID™ *C. difficile* efter 24 timmars anaerob inkubering till vänster och CDAGP efter 48 timmars anaerob inkubering till höger. Fotograf Bülow K

Det var ett antal bakterier som inte kunde identifieras med MALDI-TOF MS och i början, när de oidentifierade inte analyserades om, hade säkert några av dem kunnat identifieras bara genom att analysera om dem. Mot slutet av studien började det märkas att övning ger färdighet då inte lika många analyser på MALDI-TOF MS behövde köras om. Studien hade troligtvis varit bättre med säkrare resultat om den utförts av någon som från början hade större erfarenhet och vana vid faecesodling. För att få mer exakta och säkrare identifieringar av de bakterier som inte var *C. difficile* borde renodlingar ha gjorts på de kolonier som inte kunde identifieras med MALDI-TOF MS direkt från de selektiva medierna. De bakterier vars växt borde inhiberas av de selektiva medierna men som ändå växer där, kanske inte uppvisar normalt utseende och kan därför vara lite svåridentifierade i MALDI-TOF MS vilket skulle kunna förklara att de fick lite lågt träffvärde ibland. Många kolonier liknar varandra väldigt mycket på CDAGP och det kan inte uteslutas att vissa bakterier har missats då de kan ha haft koloniutseenden som var för lika för att skilja åt.

Även i en annan liknande studie där chromID™ *C. difficile* (bioMérieux) jämförts med ett icke kromogent odlingsmedium erhöles resultatet att det var en signifikant skillnad mellan chromID-plattan och det icke kromogena odlingsmediet när det gällde växt av andra bakterier än *Clostridium difficile*. ChromID-plattorna selekterade bort mer än den andra (10).

Rent kostnadsmässigt skulle det eventuellt innebära en viss förlust för det mikrobiologiska laboratoriet på USÖ att byta ut CDAGP mot chromID™ *C. difficile* då priset för CDAGP är 15,30 kronor och listpriset för chromID™ *C. difficile* är 16,75 kronor. Däremot är tillverkningen av CDAGP, som utförs på USÖ, arbetskrävande då de har kort hållbarhet och behöver tillverkas två gånger i veckan. Till det görs då även funktionskontroller för varje tillverkningsomgång. När det gäller tiden skulle det betyda att det i cirka 63% av fallen skulle gå att lämna ett slutresultat minst 24 timmar tidigare med chromID™ *C. difficile* än med CDAGP, och det är ju också värdefullt.

Genom att upptäcka *C. difficile* snabbare kan också eventuella åtgärder, som flytt till enkelrum, utföras snabbare vilket borde minska smittspridningen på sjukhusen. Men även om det skulle vara någon patient som inte är inlagd på sjukhus behöver denne få diagnosen så fort som möjligt för att minska smittspridning till personer i dennes närhet.

### **Slutsats**

Denna studie visar att chromID™ *C. difficile* selekterar fram *C. difficile* bättre, med färre andra växande bakteriearter, efter 24 timmars anaerob inkubering än CDAGP efter 48 timmars anaerob inkubering.

## REFERENSER

1. MediaWiki (Referensmetodik klinisk kemi) [Internet]. -: Föreningen för Medicinsk Mikrobiologi och Folkhälsomyndigheten. 2009 – [citerad 2015 Apr 21]. Tillgänglig från:  
[http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Clostridium\\_difficile](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Clostridium_difficile)
2. Toepfer M, Magnusson C, Norén T, Hansen I, Iveroth P, Offenbartl K. Lömskt och omfattande utbrott av Clostridium difficile. Läkartidningen. 2014;111(1-60):24-26
3. Sjukdomsinformation om Clostridium difficile-infektion [Internet]. Solna: folkhälsomyndigheten; - [uppdaterad 2015 Feb 20; citerad 2015 Maj 12]. Tillgänglig från:  
<http://www.folkhalsomyndigheten.se/amnesomraden/smittskydd-och-sjukdomar/smittsamma-sjukdomar/clostridium-difficileinfektion/>
4. Clostridium difficile [Internet]. Stockholm: Internetmedicin; - [2014 Dec 18; citerad 2015 Maj 13]. Tillgänglig från:  
<http://www.internetmedicin.se/page.aspx?id=223>
5. Medvetna åtgärder kan ligga bakom färre fall av besvärliga tarmbakterier [Internet]. Solna: folkhälsomyndigheten; 2014 Okt 14 [citerad 2015 Maj 12]. Tillgänglig från: <http://www.folkhalsomyndigheten.se/nyheter-och-press/nyhetsarkiv/2014/oktober/medvetna-atgarder-kan-ligga-bakom-farre-fall-av-besvarliga-tarmbakterier/>
6. Norén T, Alriksson I, Andersson J, Åkerlund T, Unemo M. Rapid and Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for Clostridium difficile Detection Challenges Cytotoxin B Cell Test and Culture as Gold Standard. Journal of clinical Microbiology 2011;49(2):710–711.
7. American Society for Microbiology. Manual of clinical microbiology. 8. ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2003.



8. Van Broeck J, Ngyuvula Mantu E, Soumillion K, Delmée M. Evaluation of a new 24 h culture medium for the isolation of *Clostridium difficile* from stool samples. 24<sup>th</sup> ECCMID Barcelona 2014 Poster P0731. Tillgänglig från: [http://www.chromagar.com/fichiers/1400074091Poster\\_CHROMagar\\_C.difficile\\_ECMID\\_2014\\_.pdf?PHPSESSID=f6b1bd927f41735046bb24c7ddf0fba9](http://www.chromagar.com/fichiers/1400074091Poster_CHROMagar_C.difficile_ECMID_2014_.pdf?PHPSESSID=f6b1bd927f41735046bb24c7ddf0fba9)
9. Andrew E. Clark. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology [Internet] Clin Microbiol Rev. 2013 Jul; 26(3): 547–603. Tillgänglig från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/db.ub.oru.se/pmc/articles/PMC3719498/>
10. Carson K.C, Boseiwaqa L.V, Thean S.K, Foster N.F, Riley T.V. Isolation of *Clostridium difficile* from faecal specimens – a comparison of chromID *C. difficile* agar and cycloserine-cefoxitin-fructose agar. Journal of Medical Microbiology. 2013;62:1423-1427.

## Bilaga 1

Provnr.	antal bakteriearter/platta		chromID
	CDAGP		
1	0		0
2	1		0
3	1		0
4	2		0
5	3		0
6	2		0
7	0		0
8	1		0
9	1		0
10	1		0
11	1		0
12	0		0
13	0		0
14	2		0
15	0		0
16	1		0
17	1		0
18	1		0
19	3		0
20	0		0
21	2		1
22	2		0
23	1		0
24	0		0
25	1		0
26	1		0
27	2		0
28	1		0
29	1		0
30	1		0
31	2		0
32	1		0
33	1		1
34	2		0
35	1		0
36	2		0
37	0		0
38	1		0
39		1	0
40		1	0
41		1	0
42		1	0
43		1	0
44		2	0
45		2	1
46		1	1
47		0	0
48		0	0
49		1	0
50		2	0
51		1	0
52		1	0
53		2	0
54		1	0
55		2	1
56		0	0
57		2	1
58		0	0
59		1	0
60		1	0
61		2	1
62		2	0
63		0	0
64		2	0
65		1	0
66		3	0
67		1	0
68		1	0
69		1	0
70		2	0
71		1	0
72		2	0
73		1	0
74		2	0
75		2	0
76		2	0
77		2	0
78		0	0
79		1	1

80	1	2
81	2	0
82	1	0
83	0	0
84	2	0
85	1	0
86	1	0
87	2	0
88	1	0
89	0	0
90	2	0
91	4	0
92	2	0
93	0	0
94	1	0
95	2	0
96	2	0
97	2	0
98	3	1
99	0	0
100	3	0
101	2	0
102	2	1
103	2	0
104	1	0
105	2	1
106	1	0
107	1	0
108	1	1
109	1	0
110	2	0
111	1	1
112	2	0
113	2	0
114	2	0
115	2	0
116	1	0
117	2	0