



JÖNKÖPING UNIVERSITY  
*School of Health and Welfare*

# Jämförelse av CIN-agar och CHROMagar™ *Y. enterocolitica* vid identifiering av humanpatogena *Yersinia enterocolitica*

**HUVUDOMRÅDE:** *Biomedicinsk laboratorievetenskap*

**FÖRFATTARE:** *Malin Nilsson*

**HANDLEDARE:** *Susanne Karlgren, Pia Karlsson och Sara Mernelius*

**JÖNKÖPING** 2018 Juni

## Sammanfattning

Humanpatogena stammar av bakterien *Yersinia enterocolitica* kan orsaka akut gastroenterit. För identifiering av bakterien odlas fecesprover ut på CIN-agar. På senare år har en kromogen agarplatta framtagits som differentierar mellan patogena och apatogena stammar av *Y. enterocolitica*. Syftet med studien är att jämföra och utvärdera två CIN-agar, med agarbaser och supplement från två olika företag (Liofilchem och Oxoid), och CHROMagar *Y. enterocolitica* (CHROMagar). Odling av fecesprover samt seriespädning av sex *Y. enterocolitica* stammar och en *Y. pseudotuberculosis* utfördes. Vid utodlade fecesprover jämfördes växt och hämning av övriga bakterier. Vid seriespädning räknades antal kolonier på plattorna för respektive spädning, samt utseende av kolonier på plattor bedömdes. Resultatet tyder på att skillnad av hämningseffekt av *Y. enterocolitica* och utseende på kolonierna finns mellan de två CIN-agarplattorna. Oxoid's CIN-agar erhöll större kolonier, lägre hämningseffekt av *Y. enterocolitica* och detektionsgräns än Liofilchem's CIN-agar. På CHROMagar-plattan växte de patogena stammarna med bleklila kolonier och de apatogena stammarna med blåa kolonier. Hämningseffekt av *Y. enterocolitica* hos CHROMagar-plattan är densamma som Oxoid's CIN-agar. Slutsatsen är således att Oxoid's CIN-agar och CHROMagar har samma hämningseffekt av *Y. enterocolitica* men CHROMagar differentierar mellan patogena och apatogena stammar. Liofilchem's CIN-agar har högre hämningseffekt än CHROMagar och Oxoid's CIN-agar.

Nyckelord: CAY, *Yersinia pseudotuberculosis*, seriespädning, fecesodling

## Abstract

### Comparison of CIN-agar and CHROMagar *Y. enterocolitica* in identification of pathogenic *Yersinia enterocolitica*

Pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* can cause acute gastroenteritis in humans. To identify the bacterium, cultivation of stool samples on CIN-agar are performed. A chromogenic medium has been developed that differentiate between pathogenic and nonpathogenic strains of *Y. enterocolitica*. The purpose is to compare and evaluate two CIN-agar, with agar bases and supplements from two companies (Liofilchem and Oxoid), and CHROMagar *Y. enterocolitica* (CHROMagar). Growth of stool samples and serial dilutions of six *Y. enterocolitica* strains and one strain of *Y. pseudotuberculosis* were performed. Comparisons of the growth and inhibition of other bacteria were done for the stool samples. Colonies for each dilution were counted and appearance of the colonies was evaluated. The result indicates that a difference in inhibitory effect on *Y. enterocolitica* and appearance of colonies exist between the two CIN-agar. All strains grew with larger colonies on Oxoid CIN-agar than on Liofilchem's. Oxoid CIN-agar and CHROMagar have a lower inhibitory effect on *Y. enterocolitica* than Liofilchem's. On CHROMagar, the pathogenic strains grew with mauve colonies, whilst the nonpathogenic strains grew with blue colonies. Thus, the conclusion is that CHROMagar and Oxoid CIN-agar have less inhibitory effect on *Y. enterocolitica* than Liofilchem's. CHROMagar can differentiate between pathogenic and nonpathogenic strains.

Keywords: CAY, *Yersinia pseudotuberculosis*, serial dilution, stool cultivation

# Innehållsförteckning

<b>Bakgrund .....</b>	<b>1</b>
Patogenes.....	1
Selektiva medium .....	2
Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-agar .....	2
CHROMagar™ <i>Y. enterocolitica</i> .....	2
Utvärdering av agarplattor .....	3
Fecesdiagnostik vid Länssjukhuset Ryhov, Jönköping.....	3
MALDI-TOF MS .....	4
Eskulinhydrolys.....	4
<b>Syfte.....</b>	<b>5</b>
<b>Material och metod.....</b>	<b>6</b>
Studiedesign och stammar .....	6
Utodling av fecesprover och agarplattor.....	7
MALDI-TOF .....	7
Eskulinhydrolys test.....	7
Agglutination .....	7
Seriespädning.....	8
Seriespädning med två stammar .....	8
Seriespädning tillsatt i eSwab.....	8
Inkubering och avläsning .....	8
Databearbetning .....	9
Etiska överväganden.....	9
<b>Resultat .....</b>	<b>10</b>
Seriespädning.....	10
Seriespädning med två bakteriestammar.....	12
Eskulinhydrolys test.....	14
Seriespädning av <i>Y. enterocolitica</i> tillsatt i eSwab.....	14
<b>Diskussion .....</b>	<b>16</b>
Resultatdiskussion.....	16
Seriespädning .....	16
Seriespädning med två bakteriestammar .....	17
Seriespädning av <i>Y. enterocolitica</i> tillsatt i eSwab.....	17
Metoddiskussion.....	18
<b>Slutsatser.....</b>	<b>20</b>
<b>Omnämmanden.....</b>	<b>21</b>
<b>Referenser .....</b>	<b>22</b>

# Bakgrund

## Patogenes

*Yersinia enterocolitica* är en gramnegativ, fakultativt anaerob bakterie som tillhör familjen Enterobacteriaceae, och kan tillväxa i temperaturer från -2°C och upp till 42°C, men den optimala temperaturen är vid 28–29°C. Hos människor kan bakterien orsaka akut gastroenterit, med symtomen feber, buksmärtor, och diarré, som kan vara blodig. Det finns över 50 distinkta serotyper av *Y. enterocolitica*, men bara ett fåtal av dem är humanpatogena. De främsta humanpatogena stammarna tillhör biotyperna 1B, 2, 3, 4, och 5 (1). Dessa biotyper kan delas in i serotyper, varav den vanligast serotypen i Sverige är serotyp O3 (2). Den apatogena biotypen är biotyp 1A. En annan medlem av *Yersinia spp.* är *Yersinia pseudotuberculosis*. Ett fåtal *Y. pseudotuberculosis* stammar anses också vara humanpatogena och kan orsaka milda enteriska symtom, så som diarré (1). De flesta fallen av en infektion med *Yersinia spp.*, yersinios, anses vara sporadiska utan en tydlig källa (3). Den främsta smittvägen för *Y. enterocolitica* är vanligen fekalt-oralt via intag av kontaminerad föda eller vatten. Ökad risk för infektion är vid intag av rått eller otillräckligt tillagat fläskkött, då kontamination av köttet kan ha skett vid bearbetning av köttet. *Y. enterocolitica* har även påvisats hos andra domesticerade djur, så som hundar och katter. Bakterien har hittats i feces från hundar. Det spekuleras att närkontakt med djuren kan orsaka infektion, främst hos småbarn, men detta har ännu inte bevisats (1). Isolering av patogena *Y. enterocolitica* från fecesprover har sina svårigheter orsakad av en stor mängd bakterier i bakgrundsfloran (3, 4, 5), *Yersinia spp.* långsamma tillväxt, samt dess optimala tillväxttemperatur som är 28°C istället för 37°C, som vanligen är den optimala tillväxttemperaturen för övriga enteropatogena bakterier. Alltså är odling, på icke-selektiva medium, som utförs under förhållanden som är lämpliga för andra enteropatogena bakterier inte en effektiv metod för isolering av *Yersinia spp.* (4, 5).

Patogenesen hos *Yersinia spp.* attribueras till en plasmid, plasmid *Yersinia* Virulence (pYV). pYV styr syntesen av *Yersinia* adhesin A (YadA). Apatogena *Yersinia spp.* saknar denna plasmid och därmed förmågan att bilda YadA. YadA som är en adhesin kan binda till ett antal eukaryota extracellulära molekyler och cellytmolekyler, och spelar stor roll i skyddandet av bakterien (6, 7). *In vitro* ökar YadA den hydrofoba effekten av ytan på bakterien, samt främjar autoagglutination (7). YadA ger även resistens mot bakteriedödande aktivitet av humanserum genom att främja fixering av faktor H, vilket leder till nedbrytningen av C3b avsatt vid

bakterieytan. Som en följd av det här förhindras bildandet av membranattackkomplexet (6, 7). YadA bidrar även till den långvariga tiden av fekal utsöndring av bakterien (7), vilket är cirka 4–8 veckor efter genomgången sjukdom (2).

## **Selektiva medium**

### **Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-agar**

Vid identifiering av *Yersinia spp.* kan Cefsulodin-irgasan-novobiocin (CIN) agar användas, vilket är ett *Yersinia* selektivt medium (2). Detta medium som har utvecklats för isolering av *Y. enterocolitica* innehåller antibiotikum cefsulodin, irgasan, och novobiocin för att inhibera tillväxt av andra Enterobacteriaceae, vilket är till en fördel för *Yersinia spp.* då dessa är mer långsamväxande. På CIN-agar bildar *Y. enterocolitica* kolonier som är mindre än 1 mm i diameter. Kolonierna har en djupröd prick i mitten, på grund av mannitol fermentation, och en genomskinlig zon runt pricken, dessa kolonier kallas för "bull's-eye". Den djupröda pricken är ojämn och upphöjd. CIN-agar rekommenderas att inkuberas vid 30°C. De begränsningar som CIN-agar har, är att ett antal andra Enterobacteriaceae arter, som till exempel *Citrobacter freundii* och *Citrobacter braakii*, kan växa och producera utseendemässigt liknande kolonier som *Y. enterocolitica* kolonierna. Samt att CIN-agarn inte differentierar mellan patogena och apatogena *Y. enterocolitica* stammar, samt andra *Yersinia spp.* (8). Detektionsgränsen av *Y. enterocolitica* på CIN-agar är  $10^3$  till  $10^6$  colony-forming units (CFU) per g feces (3).

### **CHROMagar™ *Y. enterocolitica***

Då differentiering av patogena och apatogena *Y. enterocolitica* inte är möjligt med CIN-agar har kromogena medium utvecklats. Specifika enzymer hos målorganismen klyver av substratet i mediumet och den frisläppta kromoforen färgar mikroorganismen. CHROMagar™ *Yersinia* (CAY) (CHROMagar™) är en kromogen agarplatta specifik för identifiering av patogena *Y. enterocolitica* stammar. De patogena (YadA<sup>+</sup>) stammarna erhåller en bleklila färg, medan de apatogena (YadA<sup>-</sup>) stammarna av *Y. enterocolitica* och övriga Enterobacteriaceae växer med blåmetalliska kolonier. En tidigare studie har gjorts om CAY där de dragit slutsatsen att CAY är lika sensitiv som CIN-agar men är mer specifik med ett lågt antal falskt-positiva resultat. Samt att det tyder på att CAY har en lägre hämmande effekt på rensuspension av *Y. enterocolitica* än CIN-agar. Den CIN-agarplattan som användes i studien är tillverkad av Oxoid.

Då några stammar av *Y. pseudotuberculosis* är patogena testades 19 stammar på CAY, ingen utav de stammarna växte på CAY (9).

### **Utvärdering av agarplattor**

Vid utvärdering av agarplattor kan bland annat detektionsgräns beräknas i CFU/ml samt CFU/g feces. En definition av detektionsgränsen för *Y. enterocolitica* är följande - den lägsta koncentration av *Y. enterocolitica* med odlingsbar bakterie som kan detekteras vid minst 50% av replikat, där detektion vid så lågt som en koloni detekteras i varje replikat, och minst tre av sex positiva replikat (10). En låg detektionsgräns eftersträvas.

Utöver beräkning av detektionsgräns kan hämningseffekten av målbakterien studeras. Vid studien med jämförelse av CAY och CIN-agar beräknades vilken utav agarplattorna som främjade växten av *Y. enterocolitica* mest. Med andra ord vilken platta som hade lägst hämningseffekt av *Y. enterocolitica*. Antal kolonier på respektive platta, CAY och CIN, räknades och jämfördes med antal kolonier på en icke-selektiv Mueller Hinton agar (MHA). På så vis drogs slutsatsen att hämningseffekten av *Y. enterocolitica* var något lägre på CAY jämfört med CIN-agar, då fler kolonier växte på CAY än på CIN-agar vid samma mängd CFU/ml (9).

### **Fecesdiagnostik vid Länssjukhuset Ryhov, Jönköping**

Ett fecesprov samlas och transporteras i eSwab, tillverkade av Copan. ESwab är ett vätskebaserat universal samlings och transportsystem, innehållande 1 ml vätska, som är till för att bevara viabiliteten hos bakterierna (11).

Vid identifiering av *Yersinia spp* i fecesdiagnostik på Mikrobiologilaboratoriet vid Länssjukhuset Ryhov utförs först fecesodling, med hjälp av Walk-away specimen processor Daniele Triva (WASP<sup>®</sup>DT) ett automatiserat utodlingsinstrument, på CIN-agarplatta. CIN-agarplattan inkuberas aerobt i 30°C och avläsning sker två gånger, först efter 18–24 timmar och sedan efter 36–48 timmar. Vid misstänkt *Yersinia spp*. koloni på CIN, fortsätter diagnostiken med Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS) för identifiering av bakteriesläkte och art. Därefter utförs eskulinhydrolys test, för att bedöma om bakterien är patogen eller apatogen. De patogena biotyperna är negativa för eskulinhydrolys och den apatogena biotypen 1A är positiv för eskulinhydrolys. Vid negativt

resultat av eskulinhydrolys testet utförs yersinia-agglutination för serotyp O3 och O9, vid negativt resultat för de två serotyperna skickas bakterien till Folkhälsomyndigheten för typning.

Den nuvarande CIN-agarplattan som används i rutinen är tillverkad med agarbas och supplement från Liofilchem (Roseto delgi Abruzzi, Italien).

### **MALDI-TOF MS**

MALDI-TOF MS är en avancerad kemisk teknik som använder laserexcitation för att jonisera kemiska funktionella grupper som finns hos proteinerna hos en organism. Organismen appliceras på en platta och sedan tillsätts en kemisk matrix. Lasern exciterar provet och matrixen absorberar energiöverföringen till organismens proteiner och bildar joner. Dessa joner separeras enligt jonernas massa, ju lättare joner desto snabbare färdas de genom en kammare, som sedan mäts med en detektor och ett proteinspektrum bildas för den aktuella organismen och det här proteinspektrum jämförs sedan mot en databas innehållande proteinspektrum för diverse organismer (12).

### **Eskulinhydrolys**

Vid eskulinhydrolys bryts eskulin ned till eskultin vilken vid närvaro av  $Fe^{3+}$  bildar en mörkbrun till svart fällning (12).



## Syfte

Syftet med den här studien är att utvärdera och jämföra två CIN-agarplattor, med agarbas och supplement från två olika fabrikat och en CHROMagar™ *Y. enterocolitica* platta, vid identifiering av *Y. enterocolitica*.

# Material och metod

## Studiedesign och stammar

I den här studien användes CIN-agarbaser och supplement från två olika fabrikat, Oxoid och Liofilchem. Båda CIN-agarbaserna innehåller en blandning av bland annat agar, salter, peptoner och mannitol. Skillnad mellan agarbaserna är mängden av agar och typ av peptoner, varav Oxoid inte avslöjar typ av pepton (13, 14). Supplementen från de två fabrikaten är de tre antibiotikum - cefsulodin, irgasan, och novobiocin. CAY innehåller agar, peptoner, salter samt kromogen och selektiv mix, mer specifikt om innehållet av CAY ges inte då det är en fabriktionshemlighet (9).

Seriespädning av patogena och apatogena *Y. enterocolitica* utfördes för att utvärdera detektionsgräns i CFU/ml samt hämningseffekten av *Y. enterocolitica* CIN-agarplattorna och CAY-plattan. Seriespädning tillsatt i eSwab innehållande feces utfördes för utvärdering av detektionsgräns i CFU/g feces. Spädningarna utgick från en suspension med en turbiditet på 0.5 McFarland, vilket är cirka  $10^8$  CFU/ml (4, 15). De tre agarplattorna användes temporärt i rutinutodlingen av fecesprover för att jämföra plattornas inhibering av övrig normalflora.

Referensstammar var inköpta från Culture Collection, University of Göteborg (Göteborg, Sverige) var följande; CCUG 8233 *Y. enterocolitica* serotyp O3 och CCUG 8239A *Y. enterocolitica* serotyp O9 och är patogena. Samt referensstam CCUG 17342 *Y. pseudotuberculosis*. De här stammarna tinades och odlades ut på blodagarplattor för att sedan plocka bakterier från blodagarplattorna till spädningen. Patientstammar av *Y. enterocolitica*, både patogena och apatogena stammar har isolerats till användning i denna studie, dessa patientstammar benämns som patientstam 1, 2, 3 respektive 4. Patientstammarna som används har isolerats och identifierats med MADLI-TOF, eskulinhydrolys och agglutination. Patientstam 1, 2 och 3 är apatogena stammar och patientstam 4 är patogen och tillhör serotyp O3 enligt agglutination. Två patientstammar av *C. freundii* och en stam *C. braakii* användes också vid utvärdering av plattorna.

## **Utodling av fecesprover och agarplattor**

Fecesprover som samlats och transporterats till mikrobiologilaboratoriet i eSwab (Copan Diagnostics Inc, Brescia, Italien) odlades ut med WASP<sup>®</sup>DT på en CHROMagar<sup>™</sup> *Y. enterocolitica* platta (CHROMagar<sup>™</sup>, Paris, Frankrike) och på två CIN-plattor från olika fabriker. Den första CIN-agarplattan med agarbas och supplement från Liofilchem (Roseto delgi Abruzzi, Italien), den andra CIN-agarplattan med agarbas och supplement från Oxoid (Hampshire, Storbritannien). CIN-agarplattan som tillverkas med agarbas och supplement från Liofilchem kommer härnäst i texten att benämnas YER och CIN-agarplattan som tillverkas med agarbas och supplement från Oxoid kommer fortsättningsvis benämnas som CIN. Plattorna tillverkades enligt företagets anvisningar på substratavdelningen vid mikrobiologilaboratoriet, Länssjukhuset Ryhov och genomgick kvalitetskontroll innan användning och plattorna förvarades mörkt i 2–8°C. Utodlingen av fecesprover skedde med trestyrksmetoden.

## **MALDI-TOF**

Material från en aktuell bakteriekoloni plockades upp och applicerades, med en tandpetare, på en provposition på provplattan och rördes ut. Därefter applicerades 1 µl Matrix (Brukeralfacyano-4-hydroxycinnamic acid) (Bruker, Billerica, USA) på provet och efter matrixen torkade placerades provplattan in i instrumentet MALDI-TOF MS microflex (Bruker, Billerica, USA) och analys startades. Resultat som erhöles vid analys jämfördes automatiskt mot databasen MALDI Biotyper (Bruker, Billerica, USA).

## **Eskulinhydrolystest**

En renkulturkoloni av bakterie togs med en platinös och inokulerades på en blodagarplatta med trestyrksmetoden och en eskulintablett (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Danmark) placerades i primärstryket. Plattan inkuberades sedan aerobt i cirka 22°C 18 till 24 timmar.

## **Agglutination**

En droppe av vardera agglutinationsserum (Reagensia AB, Solna, Sverige) för serotyp O3 och serotyp O9 placerades på ett objektglas och en koloni rördes ut, med platinös, i respektive agglutinationsserum. Objektglaset vickades, och eventuell agglutination noteras.

## **Seriespädning**

Seriespädning av följande bakterier utfördes - CCUG 8233 *Y. enterocolitica*, CCUG 8239A *Y. enterocolitica*, patientstam 1, 2, 3 och 4 och CCUG 17342 *Y. pseudotuberculosis*. Spädning av bakterien utfördes i 0.9 % (w/v) NaCl till 0.5 McFarland, som mättes med en DensiCHEK™ Plus (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankrike), vilket ger ett teoretiskt antal på cirka  $10^8$  CFU/ml. Alltså är följande spädningar baserat på teorin att 0.5 McFarland är  $10^8$  CFU/ml. Tiofaldig seriespädning till  $10^1$  CFU/ml utfördes och spädningar med  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  samt  $10^1$  odlades ut genom pipettering av 100  $\mu$ l till varje platta som racklades ut jämt över agarn. Två seriespädningar av varje bakterie utfördes och varje spädning odlades ut två gånger.

## **Seriespädning med två stammar**

Vid seriespädning med två stammar poolades 1 ml från varje spädning ihop med 1 ml från motsvarande spädning av den andra stammen och blandades med hjälp av vortex. 100  $\mu$ l av poolningen pipetterades och racklades ut på plattorna. Varje poolning odlades ut två gånger. Stammarna CCUG 8233 *Y. enterocolitica* och patientstam 2 poolades tillsammans. Samt CCUG 8233 *Y. enterocolitica* och *C. braakii*.

## **Seriespädning tillsatt i eSwab**

CCUG 8233 *Y. enterocolitica* och patientstam 4 användes vid seriespädning tillsatt i eSwab. En seriespädning av varje stam utfördes och 100  $\mu$ l av spädningarna  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  samt  $10^1$  tillsattes i varsitt eSwab där cirka 10  $\mu$ l feces från ett gammalt patientprov hade tillsatts. 10  $\mu$ l av eSwab lösningen odlades ut på alla tre plattor med trestryksmetoden. En spädning på  $10^3$  odlades även ut på en blodagarplatta som inkuberades aerobt i  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  i 18–24 timmar.

## **Inkubering och avläsning**

CIN, YER och CAY inkuberades i  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  aerobt. Plattorna avlästes efter 18–24 timmars inkubation och återinkuberades efter avläsning och lästes av efter ytterligare 18–24 timmars

inkubation. Antal kolonier räknades och utvärdering av kolonituseenden, samt kontroller av inhibering av övriga bakterier utfördes.

## **Databearbetning**

Statistisk bearbetning, Mann-Whitney U test, med programmet IBM SPSS Statistics 25 (IBM corporation, New York, USA) utfördes, med signifikansnivå på 5% ( $p < 0.05$ ).

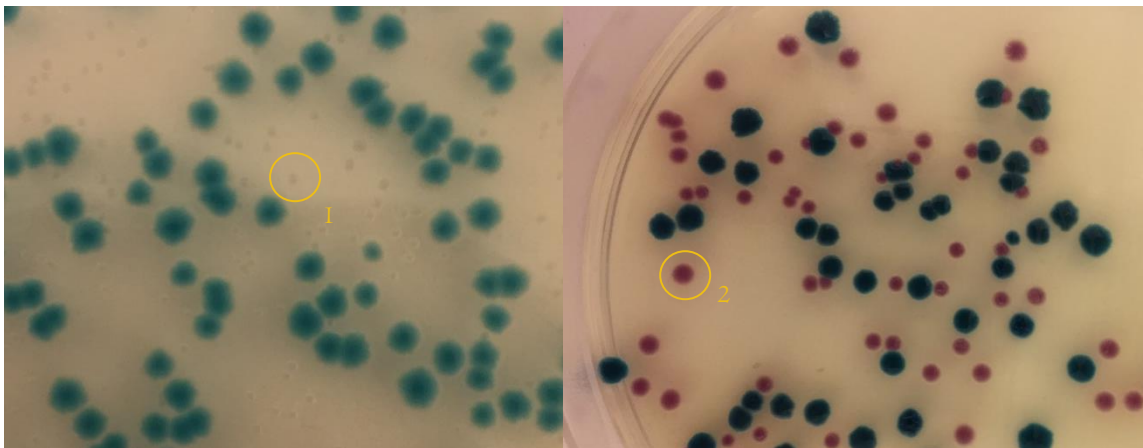
## **Etiska överväganden**

Då utodling av fecesprover skedde genom automatiserat utodlingsinstrument hos laboratoriets rutinutodling, och ges ett lokalt identifikations (LID) -nummeretikett som fästs på plattorna. Dessa LID-nummer kan enbart kopplas till patienter av personal vid laboratoriemedicin, Region Jönköpings län. Plattorna avlästes först av personal på laboratoriet och de svarar ut resultat av odlingen till läkare. Utvärdering av plattorna skedde efter avläsningen av personal, och ingen ny eller ändring av diagnos ställdes vid utvärderingen. Vid användandet av patientstammar identifierades stammarna genom ett nummer och kunde inte kopplas till en person. Tystnadsplikt gällde under och efter studien.

## Resultat

Patogena stammar av *Y. enterocolitica* var transparenta på CAY efter 18–24 timmar inkubation och växte med bleklila kolonier efter 36–48 timmar (figur 1). De apatogena stammarna av *Y. enterocolitica*, samt *C. freundii* och *C. braakii* växte med blåa kolonier efter 18–24 timmar inkubation. Stam CCUG 17342 *Y. pseudotuberculosis* växte inte på CAY. På CIN och YER växte samtliga *Y. enterocolitica* stammar med bull's-eye kolonier efter 18–24 timmar inkubation. *Y. pseudotuberculosis* växte med bull's-eye kolonier efter 18–24 timmar inkubation på CIN och efter 36–48 timmar inkubation på YER.

CIN och YER plattorna erhöll samma resultat vid växt av *Yersinia spp.* i patientprover, att vid växt av *Yersinia spp.* på ena plattan noterades även växt av *Yersinia spp.* på den andra plattan. Skillnad mellan YER, CIN och CAY erhöles vid avläsning av patientprover då CAY differentierade mellan patogena och apatogena *Y. enterocolitica*. Hämning och växt av normalflora var densamma för alla tre plattor.

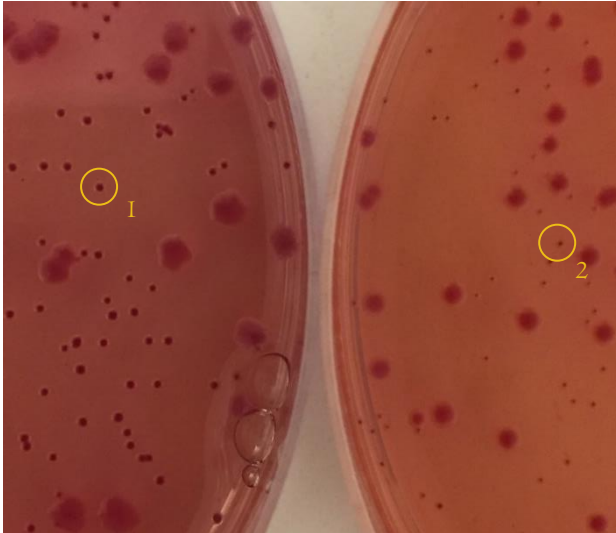


Figur 1. Patogen *Y. enterocolitica* på CAY efter 18–24 timmar inkubation (1), efter 36–48 timmar inkubation (2)

## Seriespädning

Vid avläsning av plattorna vid seriespädning noterades en skillnad av koloniutseendet mellan CIN och YER plattorna. Efter 18–24 timmar inkubation var kolonierna på CIN dubbelt så stora jämfört med kolonierna på YER (figur 2). Efter 36–48 timmar inkubation var kolonierna på båda plattor större än tidigare, dock förblev förhållandet av storleken på kolonierna mellan CIN och YER densamma som för efter 18–24 timmar inkubation. Utöver storleksändring

förändrades utseendet, då kolonierna blev mer diffusa och fick en ljusare färg som saknar bull's-eye. Resultat av antal kolonier vid de olika spädningar av *Y. enterocolitica* stammarna anges i tabell 1, och för *Y. pseudotuberculosis* anges i tabell 2. Det fanns en signifikant skillnad ( $p < 0.05$ ), enligt Mann-Whitney U test, av detektionsgränsen för *Y. enterocolitica* mellan YER och CAY, men inte mellan YER och CIN, eller CIN och CAY. Detektionsgränsen för CAY är lägre än för YER.



Figur 2. *Y. enterocolitica* på CIN (1), *Y. enterocolitica* på YER (2)

Tabell 1. Medelvärde av antal kolonier vid seriespädning av *Y. enterocolitica* stammar.

TEORETISKT ANTAL CFU/ML	Y. <i>ENTEROCOLITICA</i> STAM	CIN	YER	CAY
<b>10<sup>1</sup></b>	CCUG 8233	1,25	0,25	1,25
	CCUG 8239A	1	0,5	2,25
	Patientstam 1	1	0,25	1
	Patientstam 2	0,25	0,25	0,5
	Patientstam 3	0,5	0,25	1,75
	Patientstam 4	0,5	0	0,25
<b>10<sup>2</sup></b>	CCUG 8233	11,25	0,75	18
	CCUG 8239A	9,25	3,75	10,5
	Patientstam 1	6	2,75	6,25
	Patientstam 2	5,25	7,5	6
	Patientstam 3	8,5	4,25	12,5
	Patientstam 4	2,5	0	3
<b>10<sup>3</sup></b>	CCUG 8233	76,5	9,25	128,5
	CCUG 8239A	86,75	50	89,75
	Patientstam 1	62,25	31,5	67,5
	Patientstam 2	77,5	60,75	83,25
	Patientstam 3	96,75	61,25	96,25
	Patientstam 4	13,75	0,25	53,25
<b>10<sup>4</sup></b>	CCUG 8233	n/a	32	n/a
	CCUG 8239A	n/a	n/a	n/a
	Patientstam 1	n/a	n/a	n/a
	Patientstam 2	n/a	n/a	n/a
	Patientstam 3	n/a	n/a	n/a
	Patientstam 4	204,75	7,25	n/a
<b>10<sup>5</sup></b>	CCUG 8233	n/a	n/a	n/a
	CCUG 8239A	n/a	n/a	n/a
	Patientstam 1	n/a	n/a	n/a
	Patientstam 2	n/a	n/a	n/a
	Patientstam 3	n/a	n/a	n/a
	Patientstam 4	n/a	264,75	n/a

**n/a** = Inte tillämplig på grund av överväxt

Tabell 2. Medelvärde av antal kolonier vid seriespädning av CCUG 17342 *Y. pseudotuberculosis*

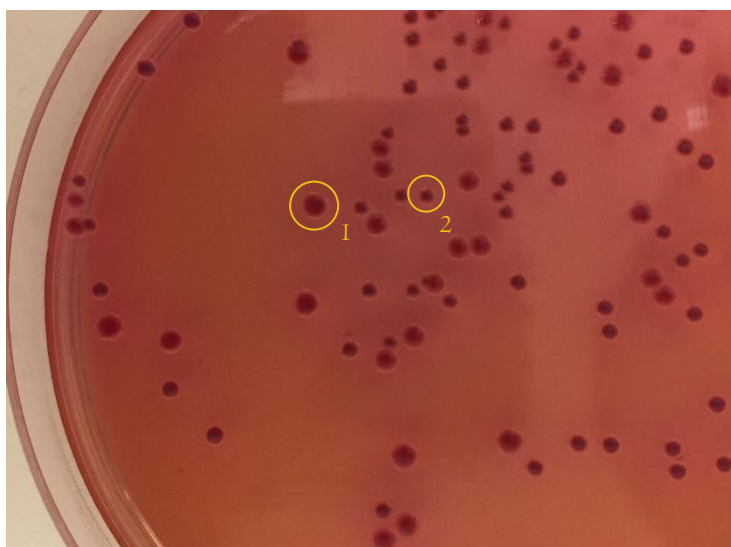
Teoretiskt antal CFU/ml	CIN	YER
<b>10<sup>1</sup></b>	1	0,25
<b>10<sup>2</sup></b>	6,75	6
<b>10<sup>3</sup></b>	65	78

### Seriespädning med två bakteriestammar

Vid seriespädning med CCUG 8233 *Y. enterocolitica* och patientstam 2 differentierades dessa inte vid räkning av kolonier på CIN och YER plattorna, dock observerades det att två sorters



kolonier växte (figur 3). Den visuella skillnaden på dessa två sorters kolonier var storleken och utseendet på dess bull's-eye. De större kolonierna hade en mer diffus bull's-eye visuellt jämfört med de mindre kolonierna vars bull's-eye var mörkare och mer skarpt avgränsad. På CAY kunde stammarna urskiljas då den patogena stammen växte med bleklila färg och den apatogena stammen växte med blå färg. Antal kolonier som erhöles för varje spädning finns i tabell 3 nedan. Det var ingen signifikant skillnad av växt mellan plattorna.



Figur 3. patientstam 2 (1) och CCUG 8233 *Y. enterocolitica* (2) på YER

Tabell 3. Medelvärde av antal kolonier vid seriespädning med patogen (CCUG 8233 *Y. enterocolitica*) och apatogen (*Y. enterocolitica* patientstam 2) stam.

Teoretiskt antal CFU/ml	CIN	YER	CAY	
			Patogen	Apatogen
$10^1$	1,5	0,5	1	0,5
$10^2$	11,75	12,75	6	5,5
$10^3$	121,5	114,5	57	54,75

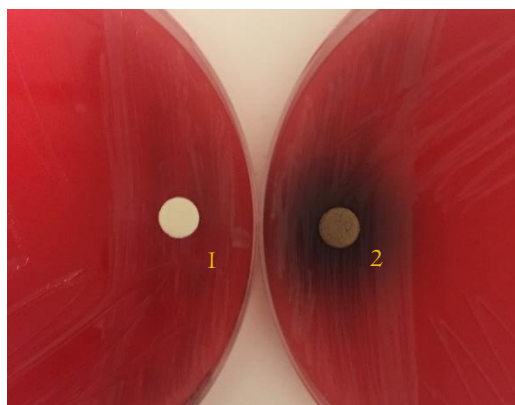
Vid räkning av kolonier vid seriespädning med CCUG 8233 *Y. enterocolitica* och *C. braakii* differentierades dessa två stammar på alla tre plattor. På CIN och YER växte *C. braakii* med kolonier med en mörklila mitt omgiven av en transparent ojäm gräns. Dessa kolonier var visuellt jämförelsevis större än CCUG 8233 *Y. enterocolitica* kolonierna som växte med små kolonier med en tydlig bull's-eye. På CAY växte *C. braakii* med blåmetalliska kolonier efter 18–24 timmar inkubation. CCUG 8233 *Y. enterocolitica* erhöles bleklila kolonier efter 36–48 timmar inkubation. Antal kolonier för varje bakterie på de tre plattorna anges i tabell 4. Det var en signifikant skillnad ( $p < 0.05$ ) av växt mellan CCUG 8233 *Y. enterocolitica* och *C. braakii* på alla tre plattor vid spädning  $10^2$  och  $10^3$  CFU/ml.

Tabell 4. Medelvärde av antal kolonier vid seriespädning med CCUG 8233 *Y. enterocolitica* och *C. braakii*

Teoretiskt antal CFU/ml	CIN		YER		CAY	
	CCUG 8233	C. braakii	CCUG 8233	C. braakii	CCUG 8233	C. braakii
10 <sup>1</sup>	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5
10 <sup>2</sup>	5,75	0,5	2,75	0,25	6	2,75
10 <sup>3</sup>	52	14,75	25,25	16,5	54,25	30,25

### Eskulinhydrolystest

Då två kolonityper observerades på CIN och YER vid seriespädning av två *Y. enterocolitica* fick de genomgå eskulinhydrolystest för att identifiera vilken av kolonierna tillhörde vilken av de två stammarna. De mindre kolonierna erhöll ett negativt resultat vid eskulinhydrolystestet, alltså ingen svart fällning runt eskulintabletten och de större kolonierna erhöll ett positivt resultat, med en svart fällning runt eskulintabletten (figur 4). Alltså tillhörde de mindre kolonierna till stam CCUG 8233 *Y. enterocolitica* och de större kolonierna till stam patientstam 2.



Figur 4. Patogen, eskulinhydrolyst negativ (1), apatogen, eskulinhydrolyst positiv (2)

### Seriespädning av *Y. enterocolitica* tillsatt i eSwab

Enbart växt av de tillsatta *Y. enterocolitica* stammarna erhöles på plattorna. Antal kolonier anges i tabell 5. På blodagarplattan växte övrig normalflora. Detektionsgräns på  $1,25 \times 10^5$  CFU/g feces för CIN och CAY,  $1,75 \times 10^5$  CFU/g feces för YER.

Tabell 5. Medelvärde av antal kolonier vid seriespädning tillsatt i eSwab

Teoretiskt antal CFU/ml tillsatt i eSwab	<i>Y. enterocolitica</i> stam	CIN	YER	CAY
$10^2$	CCUG 8233	0,5	0	0
	Patientstam 4	0	0	0,5
$10^3$	CCUG 8233	1	1,5	1,5
	Patientstam 4	1,5	2	1
$10^4$	CCUG 8233	13	10	10
	Patientstam 4	14	10	11,5
$10^5$	CCUG 8233	90	89	84,5
	Patientstam 4	132,5	106	97,5

## Diskussion

Syftet med den här studien var att utvärdera och jämföra vilken av plattorna, CIN, YER och CAY vid diagnostik av *Yersinia spp.* Därför infördes CIN och CAY temporärt som användes parallellt med den ordinarie YER i rutinen vid utodling av fecesprover. Seriespädning av tre patogena och tre apatogena *Y. enterocolitica* samt en *Y. pseudotuberculosis* utfördes för att bedöma plattornas hämningseffekt av *Y. enterocolitica* och *Y. pseudotuberculosis* samt detektionsgräns.

## Resultatdiskussion

En utseendemässig skillnad mellan CIN och YER är att samtliga *Y. enterocolitica* stammar och *Y. pseudotuberculosis* erhöll större kolonier på CIN än på YER. Även *Citrobacter spp.* växte med större kolonier på CIN, där de även var ljusare i färgen samt hade en mer oregelbunden form. Detta underlättade vid bedömning då deras utseende skiljde sig mer från *Yersinia spp.*'s bull's-eye på CIN än på YER. Personalen som avläste patientproverna observerade ingen utmärkningsbar skillnad av hämning eller växt av övriga bakterier mellan de tre plattorna.

## Seriespädning

Enligt resultatet visar på att hos de prövade stammarna så har CIN något lägre hämningseffekt på *Y. enterocolitica* än YER. Enligt en studie som beskrevs i bakgrunden där de jämförde CAY med en CIN-agarplatta tillverkad av Oxoid, erhöll de resultatet att CAY var lika känslig som CIN-agarplattan. Samt att CAY hade en något mindre hämningseffekt av *Y. enterocolitica* än CIN-agarplattan (9). Hämningseffekten av *Y. enterocolitica* i den här studien var densamma för CIN och CAY. Det var dock en skillnad mellan YER och CAY, där YER hade en större hämningseffekt av *Y. enterocolitica*.

Då enbart 100µl av respektive spädning racklades ut på plattorna bör antal kolonier på plattan multipliceras med tio för att erhålla antal CFU/ml. Alltså skall antal kolonier som erhålls vid t.ex. vid spädning  $10^1$  vara 1 koloni/0.1 ml.

En tidigare studie av jämförelse mellan CIN-agar och en modifierad CIN-agar har utförts. En av metoderna var att fastställa detektionsgränsen för *Y. enterocolitica*. Deras resultat av detektionsgräns för CIN-agar var alltså 10 CFU/ml vid seriespädning med enbart *Y.*

*enterocolitica* (10). Vid seriespädning på CIN erhöles ett resultat av en koloni på >50% av replikaten vid spädning  $10^1$  CFU/ml, alltså erhöles samma detektionsgräns som hos studien med 10 CFU/ml på CIN. Detektionsgränsen för CAY är också 10 CFU/ml. För YER erhöles ett annat resultat då en koloni på <50% av replikaten vid spädning  $10^1$  CFU/ml, alltså är detektionsgränsen på YER >10 CFU/ml. Dock så är den skillnad av detektionsgränsen inte signifikant mellan CIN och YER. Däremot erhöles en signifikant skillnad ( $p < 0.05$ ) av detektionsgränsen mellan YER och CAY, men inte mellan CIN och CAY.

### **Seriespädning med två bakteriestammar**

Trots att två olika sorters kolonier observerades vid seriespädning av CCUG 8233 *Y. enterocolitica* och patientstam 2 så differentierades dessa inte vid räkning på CIN och YER. Anledningen bakom det beslutet var att det även fanns kolonier som inte gick att avgöra om de tillhörde de större och ljusare kolonierna eller de mindre och mörkare kolonierna. Alltså kunde det bli en felmarginal som kunde påverkat eventuella beräkningar vid jämförelse. Dock bör inte någon slutsats dras om att den observerade skillnaden i utseendet mellan de två stammarna kan tillämpas för övriga apatogena och patogena stammar av *Y. enterocolitica*. Däremot så beskrivs det i en annan studie att kolonier av apatogena *Yersinia* stammar tenderar vara lite större än kolonier av patogena stammar (5). Ingen skillnad av antal kolonier på CIN, YER och CAY erhöles vid den här seriespädningen.

Vid seriespädning med CCUG 8233 och *C. braakii* differentierades kolonierna då skillnaden mellan kolonierna var mycket tydligare än hos seriespädning med två *Y. enterocolitica*. Därav blir eventuell felmarginal mindre än den skulle blivit hos differentiering av seriespädning med två *Y. enterocolitica*.

### **Seriespädning av *Y. enterocolitica* tillsatt i eSwab**

För att undersöka ifall enbart växt av *Y. enterocolitica* på plattorna berodde på att den feces som tillsattes saknade normalflora odlades en av spädningarna ut på en blodagarplatta som fick inkuberas aerobt 18–24 timmar i 36°C. På den här plattan sågs då övrig bakterieväxt och därav konstaterades det att den feces som tillsattes inte saknade normalflora. Dock så är det möjligt att den feces inte innehöll andra bakterier som vanligen kan växa på CIN-agarplattor. I en annan studie tillsattes 1 g feces till 10 ml 0.9 % (w/v) NaCl, alltså 0.1 g feces/ml, där de erhöles

detektionsgräns på  $3 \times 10^3$  CFU/g feces på CIN-agar tillverkad av Merck (Dramstadt, Tyskland) (5).

I den här studien där cirka 10 µl feces tillsattes i eSwab, innehållande 1 ml vätska. 1 ml flytande feces antas var 1 g (16), alltså tillsattes cirka 0.001g feces till eSwab. Detektionsgränsen, för seriespädning tillsatt i eSwab innehållande feces, som erhöles i denna studie är cirka  $1.25 \times 10^5$  CFU/g feces och  $1.75 \times 10^5$  CFU/g feces på CIN respektive YER. Det är ingen signifikant skillnad av detektionsgränsen för fecesprover mellan plattorna. Dock bör ytterligare eSwab-prover med fler spädningar och olika mängder feces för att kunna erhålla ett mer korrekt resultat.

## Metoddiskussion

Som nämndes i bakgrunden jämfördes CIN-agar och CAY med MHA vid utvärdering av hämningseffekten av *Y. enterocolitica* (9). Däremot gjordes det här inte i den här studien, utan jämförelsen av hämningseffekten av *Y. enterocolitica* och *Y. pseudotuberculosis* gjordes direkt mellan CIN, YER och CAY. Vilket resulterade i en mindre förbrukning av agarplattor, då MHA inte användes, samt mer tidsbesparing, då räkning av antal kolonier var tidskrävande. Vid ytterligare studie av CIN-agarplattor och CAY kan det vara aktuellt att göra jämförelsen med MHA för en mer noggrann utvärdering.

En påverkande faktor av resultatet är hur färsk stammen är vid spädning, det vill säga ifall stammen är dagsfärsk eller inte. Det här kan ses hos resultatet vid seriespädning av patientstam 4. Då tydlig skillnad i antal kolonier av patientstam 4 mellan alla tre plattor fanns. Växten på YER var signifikant färre än hos både CIN och CAY. En trolig orsak till den här skillnaden är att bakterien inte var dagsfärsk vid seriespädningen. Då patientstam 4 även användes vid seriespädning tillsatt i eSwab där skillnaden mellan antal kolonier var mindre och stammen var dagsfärsk vid seriespädningen tillsatt i eSwab. Ju äldre stammen är desto större risk för att antalet viabla CFU är minskad (17). Även hantering av spädningarna, så som blandning med vortex, kan påverka viabiliteten av bakterierna.

Vid räkning av stor mängd kolonier på en platta ökar risken för felräkning, att antingen kolonier räknas med två gånger eller att vissa kolonier inte räknas. Antal CFU/ml vid seriespädning kan variera beroende på spädningens homogenitet vid pipettering, samt vid inokulering av plattorna

(17). Vid mätning av 0.5 McFarland för samtliga grundspädningar användes en DensiCHEK, för att antalet CFU/ml skulle vara densamma, dock så mäter DensiCHEK enbart turbiditeten av spädningen och inte ifall bakterierna är viabla (18). Alltså kan det faktiska antal CFU/ml avvika från det teoretiska antal CFU/ml.

## Slutsatser

Den här studien visar på att CIN-agarplattan med agarbas och supplement från Oxoid har mindre hämmande effekt på *Y. enterocolitica*, än CIN-agarplattan med agarbas och supplement från Liofilchem. Dock är det ingen signifikant skillnad av detektionsgränsen för *Y. enterocolitica* mellan Oxoid's CIN-agar och Liofilchem's CIN-agar. Hämningen av övriga bakterier på Oxoid's CIN-agar och Liofilchem's CIN-agar är densamma. CHROMagar *Y. enterocolitica* är en användbar platta för direkt identifiering av patogena *Y. enterocolitica* och har samma hämningseffekt av *Y. enterocolitica* som CIN-agarplattan från Oxoid, dock är den inte användbar vid identifiering eller isolering av *Y. pseudotuberculosis*. En ytterligare studie bör utföras för en mer omfattande utvärdering och jämförelse av CIN-agarplattor, från olika fabrikat, och CAY.



## **Omnämmanden**

Tack till Substratavdelning på mikrobiologiska laboriet på Jönköpings Länssjukhus Ryhov för tillverkningen av agarplattorna som användes. Även tack till mina metodhandledare Pia Karlsson och Susanne Karlgren, samt tack till min vetenskapliga handledare Sara Mernelius, för er kunskap och ert stöd under studien.

## Referenser

1. Bari L, Hossain A, Isshiki K, Ukuku D. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods. J Pathog. 2011;2011:420732.
2. Folkhälsomyndigheten. Infektion med *Yersinia enterocolitica* – ett nationellt strategidokument.  
<https://www.folkhalsomyndigheten.se/contentassets/0d6e0b2000c649b8a2a28e2ca1da b97b/infektion-med-yersinia-enterocolitica-ett-nationellt-strategidokument-2013-11-18.pdf>, 2013. [2018-04-18]
3. Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H. Low Occurrence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Clinical and Environmental Samples: a Methodological Problem. Clin Microbiol Rev. 2003;16(2):220-229.
4. Saraka D, Savin C, Kouassi S, Cissé B, Koffi E, Cabanel N, et al.. *Yersinia enterocolitica*, a Neglected Cause of Human Enteric Infections in Côte d'Ivoire. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(1):e0005216
5. Savin C, Leclercq A, Carniel E. Evaluation of a Single Procedure Allowing the Isolation of Enteropathogenic *Yersinia* along with Other Bacterial Enteropathogens from Human Stools. PLOS one. 2012;7(7):e41176.
6. Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, et al. The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62:1315-1352.
7. China B, N'Guyen B, Bruyere M, Cornelis G. Role of YadA in Resistance of *Yersinia enterocolitica* to Phagocytosis by Human Polymorphonuclear Leukocytes. Infect. Immun. 1994;62(4):1275-1281.
8. Petsios S, Fredriksson-Ahomaa M, Sakkas H, Papadopoulou C. Conventional and molecular methods used in the detection and subtyping of *Yersinia enterocolitica* in food. Int J Food Microbiol. 2016;237:55-72.
9. Renaud N, Lecci L, Courcol RJ, Simonet M, Gaillot O. CHROMagar *Yersinia*, a New Chromogenic Agar for Screening of Potentially Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Isoletes in Stools. J Clin Microbiol. 2013;51(4):1184-1187.
10. Tan L, Ooi P, Carniel E, Thong K. Evaluation of a Modified Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar for Isolation of *Yersinia* spp.. PLOS one. 2014;9(8)e106329.

11. Copan Diagnostics Inc. eSwab™ Liquid Based Multipurpose Collection and Transport System. [http://cdn2.copanusa.com/files/5914/2358/6713/Copan\\_ESwab\\_Brochure.pdf](http://cdn2.copanusa.com/files/5914/2358/6713/Copan_ESwab_Brochure.pdf), u.å. [2018-05-18]
12. Tille PM. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 13<sup>th</sup> ed. St. Louis: Elsevier, 2014. p 101, 205.
13. Liofilchem. Yersinia Selective Agar Base. [http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/610111\\_TS.pdf](http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/610111_TS.pdf), 2016. [2018-04-21]
14. Oxoid. Dehydrated Culture Media: Yersinia Selective Agar Base. [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0653&c=UK&lang=EN&org=&print=N](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0653&c=UK&lang=EN&org=&print=N), 2018. [2018-04-21]
15. Stock I, Wiedemann B. An in-vitro study of the antimicrobial susceptibilities of *Y. enterocolitica* and the definition of a database. J Antimicrob Chemother. 1999;43:37-45.
16. Feghoul L, Salmona M, Cherot J, Fahd M, Dalle JH, Vachon C, et al.. Evaluation of a New Device for Simplifying and Standardizing Stool Sample Preparation for Viral Molecular Testing with Limited Hands-On Time. J. Clin. Microbiol. 2016;54(4):928-933.
17. Madigan M, Martinko J, Dunlab P, Clark D. Brock Biology of Microorganisms. 12<sup>th</sup> ed. San Francisco, CA: Pearson, 2008. p 153-157.
18. Sutton S. Determination of Inoculum for Microbiological Testing. Journal of GXP Compliance. 2011;15(3):49-53.