

# Screening för MRSA-stammar med hjälp av anrikningar och selektivt fast odlingsmedium

## 1 Metodreferenser och avvikelser

Europeiska gemenskapens referenslaboratoriums beskrivning: 'Laboratory protocols, Isolation of MRSA from dust samples' 2<sup>nd</sup> Ed 2009.

[http://www.crl-ar.eu/data/images/tc\\_april-2009/3-final%20mrsa%20protocol.pdf](http://www.crl-ar.eu/data/images/tc_april-2009/3-final%20mrsa%20protocol.pdf)

Selective and differential chromogenic culture medium for the isolation and direct identification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)  
produktbeskrivning MRSA *Select*<sup>TM</sup> II.

Metoden kan också användas för andra prover än dammprover.  
Som selektiv agar används BioRad MRSA *Select*<sup>TM</sup> II agar.  
Provernas förvaringsförhållanden har fastställts motsvara behoven.

## 2 Metodens syfte och tillämpningsområde

Metoden är lämpad för isolering av meticillinresistenta *Staphylococcus aureus* (MRSA) bakterier som inte är av typ LGA251 (*mecC*) (García-Álvarez et al., 2011) i slem från näsborrar (provstickor), svabbprover från hud och kött samt miljöprover. Metoden kan i tillämpliga delar även användas för screening av resistensegenskaper i prover där djursjukdom misstänks.

## 3 Definition(er)

Meticillinresistenta *Staphylococcus aureus* (MRSA) skiljer sig från vanliga stafylokocker då det gäller känslighet för antibiotika. MRSA-bakterier har *mecA*- eller *mecC*-genen och de är därför motståndskraftiga, dvs. resistenta mot alla betalaktamantibiotika (med undantag av anti-MRSA cefalosporiner). BORSA-stammarna (borderline oxacillin-resistent *S. aureus*) har ingen *mecA*-gen, men deras resistens mot betalaktamantibiotika, t.ex. oxacillin, varierar. Det är inte alltid möjligt att särskilja BORSA-stammar från MRSA-stammar endast på basis av bestämning av antibiotikaresistens.

*MecC*, som karakteriserades år 2011, har en nukleotidsekvens som liknar *mecA*  $\leq 70$  % (García-Álvarez et al., 2011). Växten av dessa *mecC*-MRSA-stammar är mycket varierande på kromogena odlingsmedier (Cuny et al., 2011) och därför är screening av dessa stammar inte lämplig med den här metoden. I Europa har *mecC*-genen påvisats speciellt i nöt (Pantosti, 2012).

## Screening för MRSA-stammar med hjälp av anrikningar och selektivt fast odlingsmedium

---

### 4 Princip

Det är möjligt att screena för meticillinresistenta *Staphylococcus aureus* (MRSA) stammar med hjälp av en stimulerande och mildt selektiv preanrikning, selektiv anrikning och selektivt fast medium. MRSA-stammar växer på fast medium som kolonier av en färg och storlek som är typiska för dem. Som selektivt medium används BioRad MRSA Select™ II agar. Denna agar innehåller, utöver selektiva antibiotika, kromogen som blir starkt rosafärgad genom det allmänna fosfatasenzymet hos stafylokocker. Preanrikning i två skeden rekommenderas i synnerhet vid analys av miljöprover, som exempelvis dammprover som har strukits av ytor. Vid misstanke om djursjukdom kan proverna även inokuleras direkt på fast medium.

### 5 Felkällor

Vissa BORSA-typer som ibland förekommer i prover från näsborrarna på svin kan bilda kolonier som klart påminner om egentliga MRSA stammar. BORSA-stammar ger ändå alltid ett negativt resultat vid PBP2'-snabbtest och de har varken *mecA*- eller *mecC*-genen.

I synnerhet vissa enterokocker kan växa på MRSA Select™ II plattor efter 18 – 28 h inkubering i punktformade kolonier, och om växten är riklig kan färgen påminna om färgen hos MRSA kolonier.

### 6 Arbetssäkerhet

Vid arbete i ett mikrobiologiskt laboratorium följs verksamhetsbeskrivning LAB 223.

Då MRSA-stammar hanteras ska bordsytorna alltid vara täckta med absorberande papper och de arbetsskeden där vätskekulturer hanteras ska göras i dragskåp. Dammprover hanteras alltid i dragskåp.

### 7 Utrustning och redskap

Mikrobiologisk basutrustning  
Värmeskåp 37,0±1,0 °C

### 8 Substrat och reagenser

Preanrikningsbuljong: Müller-Hinton buljong, med 6,5 % NaCl

- 300 ml/kärl med vid mynning som är lätt att öppna (damm- och sockprover)
- 30 ml/kärl med öppen mynning (strykningsprov bakom örat, små dukar)
- 3 ml/rör (prover på provsticka)
- 225 ml/flaska, påse eller annat lämpligt kärl (livsmedelsprover)

Selektivt anrikningsbuljong: Trypton-soja buljong (BBL™ TSB, BD 211768)

## Screening för MRSA-stammar med hjälp av anrikningar och selektivt fast odlingsmedium

---

- 9 ml/rör, i vilket tillsätts 10 µl av följande antibiotikalösningar:
  - Cefoxitin (Cefoxitin sodium salt, C4786, Sigma) 3,5 mg/ml upplöst i vatten
  - Aztreonam (Aztreonam, A6848, Sigma) 75 mg/ml upplöst i dimetylsulfoxid (DMSO)

MRSA Select™ II plattor (BioRad), ordernummer: 63747

## 9 Utförande

### 9.1 Förvaring av proverna

Proverna ska förvaras vid +2...+8 °C innan analysen inleds.

Undersökningen av proverna inleds i laboratoriet så snart som möjligt efter att proverna har anlänt, dock senast en vecka efter provtagningen. Livsmedelsprover är ett undantag och ska påbörjas senast inom 3 dygn efter provtagningen.

### 9.2 Preanrikning

Miljöprover: Det är bäst att använda skyddshandskar vid hantering av miljöprover som ska preanrikas för att undvika att provet kontamineras av stafylokocker i normalfloran på huden. Preanrikning av miljöprover utförs i dragskåp. Duken som använts till provtagning av dammprov eller skoskyddet som använts som sockprov läggs i ett kärl med 300 ml preanrikningsbuljong och trycks ner under ytan. Kärlet blandas så att man ser dammet blandas i buljongen.

Prover som kommer i transportrör med gel: Provtagningsstickan klipps med steril sax ner i röret med preanrikningsbuljong och röret blandas med en provrörsblandare.

Ytstrykningsprover som tagits bakom örat: 1 duk sätts i ett kärl med 30 ml preanrikningsbuljong och trycks ner under ytan. Rör om i kärlet.

Livsmedelsprover: Livsmedelsprover hackas/sönderdelas 25,0 g ± 0,5 g och det hackade/sönderdelade provet sätts i 225 ml preanrikningsbuljong i en Stomacher-påse av lämplig storlek eller i en steril burk/flaska. Blanda i kärlet.

Inkubera preanrikningsbuljongen vid 37,0 ± 1,0 °C, 16-20 h.

Preanrikningskärlen och -rören förvaras i kylskåp tills plattorna utläses.

### 9.3 Selektiv anrikning

Vid selektiv anrikning sätts 1 ml inkuberad preanrikningsbuljong i ett rör som innehåller 9 ml anrikningsbuljong kompletterad med antibiotikatillsatser. Inkubera vid 37,0±1,0°C16–20 h.

## 9.4 Inokulering och inkubering av MRSA Select™ plattor

Rören med anrikningsbuljong blandas noggrant med provrörsblandare och 10 µl ögla selektiv anrikningsbuljong sprids ut på plattans yta antingen med hjälp av en drejskiva från centrum av plattan eller med traditionell utstryksteknik. Utstryket görs över fyra sektorer och ögla byts emellanåt. Målsättningen är att nära den drejade plattans yttre kant eller på området med minst tillväxt på en platta med utstryk efter inkuberingen finna enskilda kolonier som är klart åtskilda från varandra. Inkubera plattorna vid  $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$  18 – 28 h. Plattorna kan inkuberas i upp till 48 h, om tillväxt inte upptäcks före det.

Då djursjukdom misstänks i proverna kan MRSA-bakterier även screenas utan anrikning genom att inokulera provmaterial direkt på MRSA-selektiv agar. Inkubering vid  $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ , 18–28 h, vid behov 48 h.

## 9.5 Avläsning av plattorna

Typiska MRSA-kolonier på MRSA Select™ II plattor är efter 18–28 h inkubering små, har en diameter av ca 1-2 mm, och är starkt rosafärgade (se bild). Tillverkaren beskriver färgen som "strong pink".



## 9.6 Konfirmeringstester

Identifiering av isolerade stammar på artnivå kräver ytterligare tester. Inokulera 1-5 kolonier med typiskt utseende från en MRSA Select™ II platta på en blodplatta för konfirmeringstest. Av de kolonier som ska konfirmeras räcker det med att påvisa att en koloni är MRSA för att konfirmera att provet är MRSA-positivt.

Konfirmera bakteriearten med MALDI Biotyper (LAB 7085). Särskilj MRSA-stammarna från BORSA-stammarna med PBP2' snabbtest (Evira 3565) eller PCR (Evira 3550 eller Evira 3590).

## 10 Intern kvalitetssäkring

Positiv kontrollstam *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 Evira 467.

Negativ kontrollstam *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 Evira 259.

För varje parti ska säkerställas att anrikningsbuljongen och plattorna fungerar genom att inokulera en positiv och en negativ kontrollstam i rör med anrikningsbuljong och på plattor på samma sätt som med proverna. Resultaten anges på servern i en tabell enligt överenskommelse.

## Screening för MRSA-stammar med hjälp av anrikningar och selektivt fast odlingsmedium

---

MRSASelect™ 2-plattornas certifikat per parti förvaras i mappen "Analysitodistukset" (Analysintyg) som finns i rum A233.

Metoden testas årligen med hjälp av inokulerade prover. Köttprover, utstryk och prover på provsticka inokuleras på minst två olika nivåer nära detektionsgränsen som noterades under valideringen, på så sätt att ett MRSA-positivt resultat uppvisas åtminstone då den större inokuleringen används. Därtill tas negativa prover med i testningen. Resultaten och de som deltog i testningen registreras i tabellen "vertailutukimussuunnitelmat ja -toteumat" (planer för och genomförda jämförande undersökningar).

### 11 Meddelande av resultaten

Resultaten meddelas efter konfirmeringstesterna. Om resultatet av screeningen är positivt ska det meddelas och man för in i systemet ELMO att MRSA-bakterier "påvisades" och om resultatet är negativt meddelas att MRSA-bakterier "inte påvisades".

### 12 Validering av metoden

Plattan som används vid denna metod validerades vid Evira år 2010 samt jämförelsen mellan plattorna MRSASelect™ och MRSASelect™ II år 2015. Metoden för screening av prov från näsborrarna hos svin validerades år 2013. Förvaring av valideringsmaterial: Det rum där den som ansvarar för metoden arbetar (originaldokumenten) och

[\\evira.local\evira\TUTO\MIBI\AMBI\MRSA\\_ASIAT\Evira3563\\_MRSA-seulonta\Validointiaineisto](\\evira.local\evira\TUTO\MIBI\AMBI\MRSA_ASIAT\Evira3563_MRSA-seulonta\Validointiaineisto).

### 13 Metodens status

Metoden ingår i en internationell metodsamling   
Officiell metod   
Intern metod

### 14 Metoder för kvalitetssäkring

Laboratoriernas inbördes jämförande undersökningar   
Metodjämförelser   
Användning av referensstammar/kontrollstammar   
Inokulerade prover (intern jämförande undersökning, s.k. blindprov)   
Parallellbestämningar   
Kontrollkort

Pantosti, A. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health, *Front. Microbiol.* 3: 127.

### 15 Ändringar sedan den tidigare versionen

livsmedels- och fodermikrobiologi

## Screening för MRSA-stammar med hjälp av anrikningar och selektivt fast odlingsmedium

Ytstrykningsprover som tagits bakom örat och livsmedel har lagts till tillämpningsområdet.

Punkterna 2, 6, 9.1 - 9.3, 9.6 och 12 har uppdaterats och ändrats till tillverkarens nya version för MRSA-selektiva plattor.

Anvisningen är sammanställd av Merja Outavaara och Lasse Nuotio. 26.5.2010  
Anvisningen uppdaterades av Suvi Nykäsenoja. 2.7.2015

### **16 Årtal då metoden togs i bruk**

Den första versionen av metoden togs i bruk år 2010.

Den ursprungliga anvisningen utarbetades av Merja Outavaara och Lasse Nuotio 26.5.2010.

### **17 Ändringar till den föregående versionen**

I punkt 2 har tillämpningsområdet lagts till och provmaterialet livsmedel har bytts ut till kött.

Punkt 10 har uppdaterats.

Punkterna 14 och 16 har lagts till.

Anvisningen uppdaterades av Suvi Nykäsenoja. 17.12.2015