

# MRSA-kantojen seulonta rikastusten ja selektiivisen kiinteän kasvatusalustan avulla

## 1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

Euroopan yhteisön referenssilaboratorion ohje: '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) -tuotekuvaus MRSA Select<sup>TM</sup> II.

[http://www3.bio-rad.com/Diagnostics/pdfs/-cmd/MRSASelect\\_Product\\_Insert\\_June\\_2008.pdf](http://www3.bio-rad.com/Diagnostics/pdfs/-cmd/MRSASelect_Product_Insert_June_2008.pdf)

Menetelmää voidaan käyttää myös muille kuin pölynäytteille. Selektiivisenä agarina käytetään BioRadin MRSASelect<sup>TM</sup> II -agaria. Näytteiden säilytysolosuhteet on määritelty tarpeita vastaavaksi.

## 2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu muiden kuin LGA251-tyyppisten (*mecC*) (García-Álvarez *et al.*, 2011) metisilliinille resistenttien *Staphylococcus aureus* -bakteerien (MRSA) eristämiseen sierainlimanäytteistä (näytetikut), ihon sivelnäytteistä ja lihasta sekä ympäristönäytteistä. Menetelmää voidaan soveltuvin osin käyttää myös eläintautiepäilynäytteiden resistenssiominaisuuden seulomiseen.

## 3 Määritelmät

Metisilliinille resistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA) -bakteeri eroaa tavallisista stafylokokkeista antibioottiherkkyytensä osalta. MRSA-bakteereilla on *mecA*- tai *mecC*-geeni ja ne ovat siten vastustuskykyisiä eli resistenttejä kaikille betalaktaamiantibioteille (poikkeuksena anti-MRSA-kefalosporiinit). BORSA-kannoilla (borderline oxacillin-resistant *S. aureus*) ei ole *mec*-geeniä, mutta niiden herkkyys betalaktaamiantibioteille, kuten oksasilliinille, vaihtelee. BORSA-kantojen erottaminen MRSA-kannoista pelkän antibioottiherkkyyismäärityksen perusteella ei aina ole mahdollista.

Vuonna 2011 karakterisoitu *mecC* on nukleotidisekvenssiltään  $\leq 70$  %:sti samankaltainen *mecA*:n kanssa (García-Álvarez *et al.*, 2011). Nämä *mecC*-MRSA-kannat kasvavat kromogeenisillä kasvatusalustoilla hyvin vaihtelevasti (Cuny *et al.*, 2011), joten menetelmä ei sovellu näiden kantojen seulomiseen. Euroopassa *mecC*-geeniä on erityisesti todettu naudoilla (Pantosti, 2012).

## 4 Periaate

Metisilliinille vastustuskykyiset *Staphylococcus aureus* (MRSA) -kannat on mahdollista seuloa esiin elvyttävän ja lievästi valikoivan esirikastuksen, selektiivisen rikastuksen ja selektiivisen kiinteän elatusaineen avulla. MRSA-kannat kasvavat kiinteällä elatusalustalla niille tyypillisen värinä ja kokoisina pesäkkeinä. Selektiivisenä alustana käytetään BioRadin MRSASelect™ II -agaria. Selektiivisten antibioottien lisäksi agar sisältää kromogeenia, joka muuttuu stafylokokeilla yleisen fosfataasientsyymin vaikutuksesta voimakkaan vaaleanpunaiseksi. Eläintautiepäilynäytteet voidaan siirrostaa myös suoraan kiinteälle elatusaineelle.

## 5 Mahdolliset virhelähteet

Eräät sikojen sierainnäytteissä joskus esiintyvät BORSA-tyypit voivat muodostaa varsinaisia MRSA-kantoja selvästi muistuttavia pesäkkeitä. BORSA-kannat antavat kuitenkin aina negatiivisen tuloksen PBP2'-pikatestissä eikä niillä ole *mecA*- tai *mecC*-geeniä.

Erityisesti jotkin enterokokit voivat kasvaa MRSA Select™ II -maljoilla 18–28 h inkuboinnin jälkeen pistemäisinä pesäkkeinä, ja jos kasvustoa on runsaasti, sen väri voi muistuttaa MRSA-pesäkkeiden väriä.

## 6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskennellessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223.

MRSA-kantoja käsitellessä pöytäpinnat on aina peitettävä imupaperilla ja työvaiheet, joissa käsitellään nesteviljelmiä, tehdään laminaarikaapissa. Pölynäytteiden käsittely tehdään aina suojakaapissa.

## 7 Laitteet ja välineet

Mikrobiologinen perusvälineistö  
Lämpökaappi 37,0 ±1,0 °C

## 8 Elatusaineet ja reagenssit

Esirikastusliemi: Müller-Hinton liemi, jossa 6,5 % NaCl

- 300 ml / helposti avattava avosuinen astia (pöly- ja tossunäytteet)
- 30 ml / avosuinen astia (korvantaussivelynäytteet, pienet liinat)
- 3 ml / putki (näytetikkunäytteet)
- 225 ml / pullo, pussi tai muu soveltuva astia (elintarvikenäytteet)

Selektiivinen rikastusliemi: Tryptoni-soija-liemi (BBL™ TSB, BD 211768 )

- 9 ml / putki, johon lisätään 10 µl seuraavia antibioottiliuoksia:
  - o Kefoksitiini (Cefoxitin sodium salt, C4786, Sigma) 3,5 mg / ml liuotettuna veteen

- Atstreonaami (Aztreonam, A6848, Sigma) 75 mg / ml liutotettuna dimetyylisulfoksidiin (DMSO)

MRSASelect™ II -maljat (BioRad), tilausnumero: 63757

## 9 Suoritus

### 9.1 Näytteiden säilytys

Näytteet tulee säilyttää +2...+8 °C:ssa ennen tutkimuksen aloittamista. Näytteiden tutkiminen aloitetaan laboratoriossa mahdollisimman pian näytteiden saapumisen jälkeen, kuitenkin viimeistään viikon kuluessa näytteiden otosta. Poikkeuksena elintarvikenäytteet, jotka tulee aloittaa viimeistään 3 vrk kuluessa näytteiden otosta.

### 9.2 Esirikastus

**Ympäristönäytteet:** Esirikastettavien ympäristönäytteiden käsittelyssä on syytä käyttää suojakäsineitä, jotta näyte ei kontaminoituisi käsittelijän ihon normaaliflooran stafylokokeilla. Ympäristönäytteiden esirikastuskäsittely suoritetaan vetokaapissa. Pölynäytteen ottoon käytetty pintasivelypöyhy tai tossunäytteenä käytetty jalkinesuoja laitetaan astiaan, jossa on 300 ml esirikastuslientä ja painellaan nestepinnan alle. Astiaa sekoitetaan, jotta nähdään pölyn sekoittuvan liemeen.

**Geelikuljetusputkissa saapuvat näytteet:** Näytteenottotikkua katkaistaan steriileillä saksilla esirikastusliemiputkeen ja putkea sekoitetaan koeputkisekoittajalla.

**Korvantaussivelynäytteet:** 1 sivelyliina laitetaan astiaan, jossa 30 ml esirikastuslientä ja painellaan nestepinnan alle. Astiaa sekoitetaan.

**Lihanäytteet:** Elintarvikenäytettä silputaan/ pilkotaan 25,0 g ± 0,5 g ja silputtu/pilkottu näyte laitetaan 225 ml esirikastusliemeen sopivankokoiseen Stomacher - pussiin tai steriiliin purkkiin/pulloon. Astiaa sekoitetaan.

Esirikastusliemiä inkuboidaan 37,0 ± 1,0 °C, 16-20 h.

Esirikastusliemiastiat ja -putket säilytetään jääkaapissa maljojen lukemiseen saakka.

### 9.3 Selektiivinen rikastus

Selektiivisessä rikastuksessa 1 ml inkuboitua esirikastuslientä siirretään putkeen, jossa on 9 ml antibioottisilla täydennettyä rikastuslientä. Inkubointi 37,0 ± 1,0 °C, 16–20 h.

### 9.4 MRSASelect -maljoille siirrostaminen ja inkubointi

Rikastusliemiputket sekoitetaan huolellisesti koeputkisekoittajalla ja 10 µl silmukallinen selektiivirikastettua lientä levitetään maljan pinnalle joko dreijan avulla alkaen maljan keskeltä tai perinteistä hajotusviljelytekniikkaa käyttäen. Hajotusviljely tehdään neljään sektoriin silmukkaa välillä vaihtaen. Tavoitteena on, että lähellä dreijatun maljan ulkoreunaa tai hajotusviljellyn maljan harvakasvuisimmalla alueella on inkuboinnin jälkeen yksittäisiä, toisistaan selvästi erillisiä pesäkkeitä. Maljoja inkuboidaan 37,0 ± 1,0 °C, 18–28 h. Maljojen inkubointia voidaan jatkaa 48 h asti, jos kasvua ei ole aiemmin havaittavissa.

Eläintautiepäilynäytteistä voidaan seuloa MRSA-bakteeria myös ilman rikastuksia siirrostamalla näytemateriaalia suoraan MRSA-selektiiviselle agarille. Inkubointi  $37,0 \pm 1,0$  °C, 18–28 h, tarvittaessa 48 h.

## 9.5 Maljojen lukeminen

Tyypilliset MRSA-pesäkkeet MRSASelect™ II -maljalla ovat 18–28 h inkuboinnin jälkeen pieniä, halkaisijaltaan n. 1-2 mm, ja väriltään voimakkaan vaaleanpunaisia (katso kuva). Valmistaja kuvaa väriä sanoilla ”strong pink”.



## 9.6 Varmistuskokeet

Eristettyjen kantojen tunnistaminen lajitasolle vaatii lisätestejä. Siirrosta MRSASelect™ II -maljalta 1-5 tyypillisen näköistä pesäkettä verimaljalle varmistuskokeiden tekemistä varten. Yhdenkin pesäkkeen toteaminen MRSA:ksi riittää näytteen MRSA-positiivisuuden varmistamiseksi. Varmista bakteerilaji MALDI Biotyperilla (LAB 7085). Erotta MRSA-kannat BORSA-kannoista PBP2'-pikatestillä (Evira 3565) tai PCR:llä (Evira 3550 tai Evira 3590).

## 10 Sisäinen laadunvarmistus

Positiivinen kontrollikanta *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 Evira 467.  
Negatiivinen kontrollikanta *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 Evira 259.

Rikastusliemen ja maljojen toimivuus tulee varmistaa jokaisesta erästä siirrostamalla sekä positiivinen että negatiivinen kontrollikanta rikastusliemiputkiin ja maljoille kuten näytteet. Tulokset merkitään serverille erikseen sovittuun taulukkoon.

MRSASelect™ 2 -maljojen eräkohtainen sertifikaatti talletetaan huoneessa A233 olevaan kansioon 'Analyysitodistukset'.

Menetelmän toimivuus testataan vuosittain käyttäen ympättyjä näytteitä. Liha-, sively- ja tikkunäytteet ympätään vähintään kahdella eri tasolla lähellä validoinnissa todettua osoittamiskykyä, niin että vähintään isompaa ympästä käytettäessä, tuloksen tulee olla MRSA-positiivinen. Lisäksi testaukseen otetaan mukaan negatiivisia näytteitä. Tulokset ja testaukseen osallistujat kirjataan 'vertailutkimussuunnitelmat ja -toteumat' -taulukkoon.

## 11 Tulosten ilmoittaminen

Tulokset ilmoitetaan varmistuskokeiden jälkeen. Positiivinen seulontatulokset ilmoitetaan ja kirjataan Elmo-järjestelmään MRSA-bakteeri 'todettiin' ja negatiivinen tulos ilmoitetaan MRSA-bakteeria 'ei todettu'.

## 12 Menetelmän validointi

Menetelmässä käytetty malja on validoitu Evirassa 2010 sekä vertailu MRSASelect™ ja MRSASelect™ II -maljojen välillä 2015. Seulontamenetelmä sian sierainlimanäytteille on validoitu 2013 sekä sianliha- ja ihon sivelynäytteille 2015. Validointiaineiston säilytys: menetelmästä vastaavan huone (alkuperäiset paperit) ja [\\evira.local\evira\TUTOMIBI\AMB\MRSA\\_ASIAT\Evira3563\\_MRSA-seulonta\Validointiaineisto](\\evira.local\evira\TUTOMIBI\AMB\MRSA_ASIAT\Evira3563_MRSA-seulonta\Validointiaineisto).

## 13 Menetelmän status

Kansainvälisen menetelmäkokoelman menetelmä	<input type="checkbox"/>
Virallinen menetelmä	<input type="checkbox"/>
Sisäinen menetelmä	<input checked="" type="checkbox"/>

## 14 Laadunvarmistusmenettelyt

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input type="checkbox"/>
Menetelmävertailut	<input type="checkbox"/>
Vertailukantojen/kontrollikantojen käyttö	<input checked="" type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet (sisäinen vertailututkimus, ns. sokkokoe)	<input checked="" type="checkbox"/>
Rinnakkaismääritykset	<input type="checkbox"/>
Valvontakortit	<input type="checkbox"/>

## 15 Viitteet

COMMISSION DECISION of 20 December 2007, Official Journal of the European Union, 17.1.2008, L 14/19.

Cuny, C. *et al.* 2011. Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany, *PLOS One*, 6 (9): e2460.

García-Álvarez, L. *et al.* 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study, *Lancet Infect Dis*, 11(8): 595-603.

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

## 16 Menetelmän käyttöönottovuosi

Menetelmän ensimmäinen versio on otettu käyttöön vuonna 2010.

Alkuperäisen ohjeen laatijat Merja Outavaara ja Lasse Nuotio 26.5.2010.

## 17 Muutokset edelliseen versioon

Lisätty kohtaan 2 soveltamisala ja vaihdettu näytemateriaali elintarvike lihaksi.

Päivitetty kohta 10.

Lisätty kohdat 14 ja 16.

Ohjeen päivittäjä Suvi Nykäsenoja. 17.12.2015