



Mikrobiologi

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

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

1 Metodreferenser och avvikelser

Europeiska gemenskapens referenslaboratoriums beskrivning: 'Laboratory protocol, Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from food-producing animals and farm environment, Version 1, June 2018.

Avvikelser till referensmetoden:

- Metoden kan också användas för färskt svinkött.
- Som selektiv agar används BioRad MRSA Select™ II agar som skall inkuberas enligt tillverkarens instruktioner.
- Som inkuberingsstemperatur används 37 ± 1 °C (i stället för 35...37 °C).
- Volymen som används för preanrikningsbuljong för svabbprov från hud är 30 ml.
- Till artkonfirmering används MALDI-TOF och för konfirmering av *mecA*-genen även PCR-metoden Evira 3550.

2 Metodens syfte och tillämpningsområde

Metoden är lämpad för isolering av meticillinresistenta *Staphylococcus aureus* (MRSA) bakterier från näsborrar (provstickor), svabbprover från hud, svinkött och miljöprover. Metoden kan i tillämpliga delar även användas för screening av resistensegenskaper i prover där djursjukdom misstänks. MRSA-stammar som har andra *mec*-gener (såsom *mecC*) kan eventuellt isoleras med metoden, men tillväxten på MRSA-plattan kan vara svag.

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-resistant *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* ≤ 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).



Mikrobiologi

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

4 Princip

Det är möjligt att screena för meticillinresistenta *Staphylococcus aureus* (MRSA) stammar med hjälp av en stimulerande och mild selektiv preanrikning 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. 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 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 eller som en mattliknande tillväxt, 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 arbetskedan 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)

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



Mikrobiologi

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

9 Utförande

9.1 Förvaring av proverna

Proverna ska förvaras som regel vid +4...+8 °C innan analysen inleds. Dammprover ska ändå förvaras i 18...22 °C för att förhindra kondensation. Undersökningen av proverna borde inledas i laboratoriet inom 3 dygn efter provtagningen, köttprover dock senast på sista förbrukningsdagen.

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. Kärlt 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 (3 ml) och röret blandas med en provrörsblandare.

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

Köttprover: 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, 16-24 h.

Preanrikningskärlen och -rören förvaras i kylskåp tills plattorna utläses.

9.3 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 tre eller 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 ± 1,0 °C 18 – 28 h. Plattorna kan inkuberas i upp till 48 h, om tillväxt inte upptäcks före det eller köttprovet är särskilt fet.

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 ± 1,0 °C, 18–28 h, vid behov 48 h.



Mikrobiologi

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

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. Inkubera blodplattorna vid $37,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ 22 – 24 h.

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) och förekomsten av *mec*-genen med PCR (Evira 3550 eller Evira 3590).

10 Intern kvalitetssäkring

Säkerställ per parti att anrikningsbuljongen och den selektiva plattan fungerar enligt anvisningarna för kvalitetskontroll av substraten.

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 "vertailututkimussuunnitelmat ja -toteumat".

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".



Mikrobiologi

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

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, och av prov från svinkött och hud år 2015. År 2017 gjordes en metodjämförelse mellan anrikning i en fas och anrikning i två faser med svinköttsprover, svabbprover från hud och prover i slem från näsborrar. 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.

13 Metodens status

Metoden ingår i en internationell methodsamling	<input checked="" type="checkbox"/>
Officiell metod	<input type="checkbox"/>
Intern metod	<input type="checkbox"/>

14 Metoder för kvalitetssäkring

Laboratoriernas inbördes jämförande undersökningar	<input type="checkbox"/>
Metodjämförelser	<input type="checkbox"/>
Användning av referensstammar/kontrollstammar	<input type="checkbox"/>
Inokulerade prover (intern jämförande undersökning, s.k. blindprov)	<input checked="" type="checkbox"/>
Parallellbestämningar	<input type="checkbox"/>
Kontrollkort	<input type="checkbox"/>

15 Referenser

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.

Larsen, J., Sunde, M., Islam, MD. Z., Urdahl, A. M., Barstad, A., Larsen, A. R., Grøntvedt, C. A & Angen, Ø. Evaluation of the EURL-AR method to isolate MRSA from pig and dust samples.

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

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



Mikrobiologi

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

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

Metodens referensmetod har ändrats: Anrikningen i två faser har ändrats till anrikning i en fas. Texten har uppdaterats och preciserats alltigenom.

Anvisningen uppdaterades av Suvi Nykäsenoja. 6.2.2019