



Mikrobiologia

MRSA-kantojen seulonta rikastuksen ja selektiivisen kiinteän kasvatusalustan avulla

MRSA-kantojen seulonta rikastuksen ja selektiivisen kiinteän kasvatusalustan avulla

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

Euroopan yhteisön referenssilaboratorion ohje: 'Laboratory protocol, Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from food-producing animals and farm environment, Version 1, June 2018.

Poikkeamat viitemenetelmään:

- Näyttemateriaalina on myös tuore sianliha.
- Selektiivisenä agarina käytetään BioRadin MRSASelect™ II -maljoja, joita inkuboidaan valmistajan ohjeiden mukaisesti.
- Inkubointilämpötilana käytetään 37 ± 1 °C (35...37 °C sijaan).
- Ihon sivelynäytteiden esirikastusliemen tilavuutena käytetään 30 ml.
- Lajinvarmistukseen käytetään MALDI-TOF:a ja *mecA*-geenin varmistukseen myös Evira 3550 PCR-menetelmää.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Menetelmä soveltuu *mecA*-positiivisten metisilliinille resistenttien *Staphylococcus aureus* -bakteerien (MRSA) eristämiseen sierainlimanäytteistä (näytetikut), ihon sivelynäytteistä (sivelyliinat) ja tuoreesta lihasta sekä ympäristönäytteistä. Menetelmää voidaan soveltuvin osin käyttää myös eläintautiepäilynäytteiden resistenssiominaisuuden seulomiseen. Muita *mec*-geenejä (kuten *mecC*) omaavat MRSA-kannat saattavat eristyä menetelmällä, mutta kasvu MRSA-maljalla voi jäädä kitukasvuiseksi.

3 Määritelmät

Metisilliinille resistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA) -bakteeri eroaa tavallisista stafylokokeista 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.



Mikrobiologia

MRSA-kantojen seulonta rikastuksen ja selektiivisen kiinteän kasvatusalustan avulla

Vuonna 2011 karakterisoitu *mecC* on nukleotidisekvenssiltään ≤ 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 luotettavasti 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 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-kannoilla ei kuitenkaan ole *mec*-geeniä.

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

6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratorioissa työskenneltäessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223.

MRSA-kantoja käsiteltäessä 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 \pm 1,0 °C



Mikrobiologia

MRSA-kantojen seulonta rikastuksen ja selektiivisen kiinteän kasvatusalustan avulla

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 (näytetikunäytteet)
- 225 ml / pullo, pussi tai muu soveltuva astia (elintarvikenäytteet)

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

9 Suoritus

9.1 Näytteiden säilytys

Näytteet tulee säilyttää pääsääntöisesti 4...8 °C:ssa ennen tutkimuksen aloittamista. Pölynäytteet tulee kuitenkin säilyttää 18...22 °C:ssa kondensaation estämiseksi. Näytteiden tutkiminen tulisi laboratoriossa aloittaa 3 vrk kuluessa näytteenotosta, lihanäytteet kuitenkin viimeistään viimeisenä käyttöpäivänä.

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 pintasivelypöyhe 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: Näytteenottotikku katkaistaan steriileillä saksilla esirikastusliemiputkeen, jossa esirikastuslientä on 3 ml, ja putkea sekoitetaan koeputkisekoittajalla.

Ihon sivelynäytteet: 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, 16-24 h.

Mikrobiologia

MRSA-kantojen seulonta rikastuksen ja selektiivisen kiinteän kasvatusalustan avulla

Esirikastusliemiastiat ja -putket säilytetään jääkaapissa maljojen lukemiseen saakka.

9.3 MRSASelect -maljoille siirrostaminen ja inkubointi

Esirikastusliemiputket sekoitetaan huolellisesti koeputkisekoittajalla ja 10 µl silmukallinen suspensiota levitetään maljan pinnalle perinteistä hajotusviljelytekniikkaa käyttäen. Hajotusviljely tehdään kolmeen-neljään sektoriin silmukkaa välillä kääntäen/vaihtaen. Tavoitteena on, että hajotusviljellyn maljan harvakasvuisimmalla alueella on inkuboinnin jälkeen yksittäisiä, toisistaan selvästi erillisiä pesäkkeitä. Maljoja inkuboidaan $37,0 \pm 1,0$ °C, 18–28 h. Maljojen inkubointia voidaan jatkaa 48 h asti, jos kasvua ei ole aiemmin havaittavissa tai jos lihanäyte on erityisen rasvainen.

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.

9.4 Maljojen lukeminen

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

Kuva. MRSA-pesäkkeitä MRSA Select™ II -maljalla.



9.5 Varmistuskokeet

Eristettyjen kantojen tunnistaminen lajitasolle vaatii lisätestejä. Siirrosta MRSASelect™ II -maljalta 1-5 tyypillisen näköistä pesäkettä verimaljalle varmistuskokeiden tekemistä varten. Inkuboi verimaljoja $37,0 \pm 1,0$ °C, 22–24 h.

Yhdenkin pesäkkeen toteaminen MRSA:ksi riittää näytteen MRSA-positiivisuuden varmistamiseksi. Varmista bakteerilaji MALDI Biotyperilla (LAB 7085) ja *mec*-geenin olemassaolo PCR:llä (Evira 3550 tai Evira 3590).



Mikrobiologia

MRSA-kantojen seulonta rikastuksen ja selektiivisen kiinteän kasvatusalustan avulla

10 Sisäinen laadunvarmistus

Rikastusliemen ja selektiivisen maljan toimivuus varmistetaan eräkohtaisesti elatusaineiden laadunvarmistusohjeiden mukaisesti.

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 ymppiä käytettäessä, tuloksen tulee olla MRSA-positiivinen. Lisäksi testaukseen otetaan mukaan negatiivisia näytteitä. Tulokset ja testaukseen osallistujat kirjataan 'vertailututkimussuunnitelmat ja -toteumat' -taulukkoon.

11 Tulosten ilmoittaminen

Tulokset ilmoitetaan varmistuskokeiden jälkeen. Positiivinen seulontatulos 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. Sianliha-, ihosively- ja sierainlimanäytteillä tehtiin vuonna 2017 tehtiin menetelmävertailu yksi- ja kaksivaiheisen rikastuksen välillä. Validointiaineiston säilytys: menetelmän vastuuhlö ja \\evira.local\evira\LABRA\MIBO\ANTI\RESISTENSSI_JÄÄMÄT\MRSA_ASIAT\Evira3563_MRSA-seulonta\Validointiaineisto.

13 Menetelmän status

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



Mikrobiologia

MRSA-kantojen seulonta rikastuksen ja selektiivisen kiinteän kasvatusalustan avulla

14 Laadunvarmistusmenettelyt

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

15 Viitteet

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) -tuotokuvaus MRSA *Select*TM II.

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

Menetelmän viitemenetelmä vaihtunut: menetelmässä kaksivaiheinen rikastus muutettu yksivaiheiseksi rikastukseksi. Tekstiä päivitetty ja tarkennettu kauttaaltaan.



Mikrobiologia

MRSA-kantojen seulonta rikastuksen ja selektiivisen kiinteän kasvatusalustan avulla

Ohjeen päivittäjä Suvi Nykäsenoja. 6.2.2019