

Sanna Sorvala

# Metisilliiniresistentin *Staphylococcus aureus* (MRSA) -bakteerin seulontamenetelmän validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Opinnäytetyö

2.12.2013

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Sanna Sorvala Metisilliiniresistentin <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) – bakteerin seulontamenetelmän validointi 27 sivua + 6 liitettä 2.12.2013
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Tutkija, DI Suvi Nykäsenoja Lehtori, FM Jarmo Palm
<p>Tämä työ tehtiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran antibioottiresistenssilaboratoriolle. Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida metisilliiniresistentin <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) -bakteerin seulontamenetelmä sian sierainlimanäytteille. Menetelmä on Euroopan yhteisön referenssilaboration ohjeen 'Laboratory protocols, Isolation of MRSA from dust samples' 2nd Ed 2009 mukainen. Menetelmä on kvalitatiivinen. Validoinnin suureina olivat toteamisraja, uusittavuus ja toistettavuus, sensitiivisyys ja spesifisyys sekä virhenegatiivisuus ja -positiivisuus.</p> <p>Validoinnissa siirrostettiin, siansierainlimanäytetikkuihin keinotekoisesti kolmea eri pitoisuutta MRSA -bakteeria. MRSA -maljalla kasvavat tyypilliset pesäkkeet varmennettiin PBP'2-testillä sekä PCR:llä. Lisäksi tutkittiin kahdeksan vertailututkimusnäytettä sekä kaksikymmentä rutiininäytettä.</p> <p>Kaikissa siirrostetuissa näytteissä todettiin MRSA -bakteeri lukuun ottamatta kahta näytettä, joihin siirrostettu bakteerimäärä oli 100 pmy ja 1000 pmy. Uusittavuus ja toistettavuus olivat yhteneväisiä kahden laborantin kesken. Virhepositiivisia ei ollut ja virhenegatiivisia oli kaksi. Vertailututkimusnäytteiden tuloksissa oli yksi virhenegatiivinen. Tulosten mukaan menetelmä soveltuu MRSA -bakteerin seulontaan sian sierainlimanäytteistä.</p>	
Avainsanat	MRSA, validointi, sierainlimanäytteet

Author(s) Title Number of Pages Date	Sanna Sorvala The Validation of Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) screening method 27 pages + 6 appendices 2. December 2013
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences.
Instructor(s)	Suvi Nykäsenoja, Researcher, M. Sc. Jarmo Palm, Senior Lecturer
<p>This Bachelor's thesis was carried out for the Antibiotic Resistant Laboratory of Finnish Food Safety Authority Evira. The purpose of the study was to validate the screening method of the methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) from pig nasal swab samples. The method followed the guidelines of the European Community reference laboratory manual ' Laboratory protocols, Isolation of MRSA from dust samples"2nd Ed 2009. The method is qualitative. The specifications of the validation were the detection limit, reproducibility and repeatability, sensitivity and specificity, as well as false positivity and negativity.</p> <p>For this validation the nasal swabs were artificially inoculated with three different inoculation levels of MRSA. The samples were cultured according the protocol. Typical colonies were confirmed by PBP'2 -test and PCR. In addition, eight reference samples and twenty routine nasal swab samples were examined.</p> <p>MRSA was found in all of the inoculated swab samples, except for two samples. These samples were inoculated with the bacterial count of 100 cfu and 1000 cfu. Reproducibility and repeatability were similar between the two laboratory technicians. There were two false negative samples and no false positive samples. There was one false negative sample among the reference samples. On the basis of the results the method is suitable for screening of MRSA from pig nasal swab samples.</p>	
Keywords	MRSA, validation, nasal swab samples

## Sisällys

Liitteet

Lyhenteet

1	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
2	Metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	1
1.1	MRSA:n rakenne ja tyypit	1
1.2	MRSA eläimillä	3
3	MRSA-bakteerin seulonta	4
4	Mikrobiologinen validointi	5
4.1	Mikrobien ja pitoisuuksien valinta	6
4.2	Validoinnin suureet	6
4.2.1	Nollanäytteet	6
4.2.2	Toteamisraja, toistettavuus ja uusittavuus	6
4.2.3	Spesifisyys, sensitiivisyys sekä virhepositiiviset ja –negatiiviset tulokset	7
5	Työn kulku	7
5.1	Tavoitteet	7
5.2	Materiaalit ja menetelmät	8
5.2.1	Käytettyjen bakteerikantojen elvytys pakastimesta	8
5.2.2	Sian sierainlimanäytteet validointiin	8
5.2.3	Mikrobiymppien valinta	8
5.2.4	Ymppinäytteiden valmistus ja tiheyden määrittäminen	9
5.2.5	MRSA:n siirrostus sierainlimanäytteisiin	10
5.2.6	Laboratorioon tulevat rutiininäytteet ja vertailututkimusnäytteet	11
5.2.7	MRSA-bakteerin toteaminen sierainlimanäytteistä	11
5.2.8	Toistettavuuden ja uusittavuuden arviointi	13
5.2.9	MRSA-bakteerin varmistustestit	15
6	Tulokset ja tulosten tarkastelu	19

6.1	MRSA-seulontamenetelmän toimivuus ympätyillä sian sierainlimanäytteillä	19
6.1.1	Toteamisraja	19
6.1.2	Toistettavuus ja uusittavuus	20
6.1.3	Spesifisyys, sensitiivisyys, virhepositiivisuus ja -negatiivisuus	20
6.2	Laboratorioon tulleiden rutiininäytteiden sekä vertailututkimusnäytteiden analysointi	22
7	Päätelmät	22
	Viitteet	24

## Liitteet

Liite 1 Liemiviljelmällä siirrostettujen näytteiden tulokset: ympin määrä tikussa  $10^2$  pmy

Liemiviljelmällä siirrostettujen näytteiden tulokset: ympin määrä tikussa  $10^3$  pmy

Liemiviljelmällä siirrostettujen näytteiden tulokset: ympin määrä tikussa  $10^4$  pmy

Liite 2 0-näytteiden tulokset, jotka ovat tulleet samaan aikaan kuin tikut liemiviljelmällä ympättäväksi

Liite 3 Toistettavuus: positiiviset näytteet

Toistettavuus: negatiiviset näytteet

Liite 4 Uusittavuus: positiiviset ja negatiiviset näytteet

Liite 5 Rutiininäytteiden tulokset

Liite 6 Vertailunäytteiden tulokset

## Lyhenteet

CA-MRSA	Community-acquired, avohoidon MRSA
HA-MRSA	Hospital-acquired tai healthcare-associated, sairaalahoidossa kehittynyt MRSA-bakteeri
LA-MRSA	Livestock associated, karjaan yhdistetty MRSA
MH 65	Müller-Hinton rikastusliemi, jossa NaCl-pitoisuus 6,5
MRSA	Metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Metisilliinisensitiivinen <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	Penicillin binding protein (penisilliiniä sitova proteiini)
PCR	Polymeraasiketjureaktio
PVL	Panton-Valentiini Leukosidi, osa MRSA-bakteereista kantaa tätä geeniä ja se voi aiheuttaa MRSA taudinaiheuttajakyvyn. Tätä geeniä ei ole, jos MRSA on negatiivinen Panton-Valentine-Leukosidille.
TSBKA	Tryptonisoijaliemi, jossa kefoksitiinia 3,5 mg/ml ja astreonaamia 75 mg/ml

## 1 *Staphylococcus aureus*

Stafylokokit ovat grampositiivisia, valinnaisesti anaerobisia bakteereja, joiden pallomaiset solut ovat järjestäytyneet viinirypälemäisesti. Solut ovat halkaisijaltaan 0,5–10 µm, ne ovat liikkumattomia soluja, jotka kasvavat 10 %:ssa suolaliuksessa [1, s. 533]. Stafylokokkilajeja on todettu olevan ainakin 20 eri lajia, mutta kaikkein tärkeimmät ovat *Staphylococcus aureus* ja *Staphylococcus epidermidis*. *Staphylococcus* -bakteerit ovat yleisiä iholla, nenässä sekä ruoansulatuskanavassa [2].

*S. aureus* on yleinen ja harmiton bakteeri ihmisten iholla ja limakalvoilla. Noin 25–30 %:lla terveistä ihmisistä esiintyy bakteeria nenän limakalvoilla aiheuttamatta tautia, eli he ovat silloin bakteerin oireettomia kantajia. Infektio tarkoittaa sitä, että *S. aureus* -bakteerin tuottamat toksiinit aiheuttavat henkilölle oireisen taudin. [3]. Melkein jokainen yksilö potee elämänsä aikana *S. aureus* -bakteerin aiheuttamia tyypillisiä infektioita, joita ovat monet näppylät ja paiseet. Bakteeri voi aiheuttaa myös terveille ihmisille keuhkokuumetta, myrkyllisiä shokkeja, verenmyrkytyksiä ja aivokalvontulehduksia [4, s. 30].

Sairaaloissa olevat potilaat ovat alttiita monien bakteerien aiheuttamille infektioille, mutta *S. aureus* -bakteeri on aina ollut yksi yleisimmistä infektioiden aiheuttajista. Bakteerit voivat elää esimerkiksi potilaiden haavoissa sekä katetriin ja hengityslaitteiden sisäänmenoaukoissa. Vakavien *S. aureus* -bakteerin aiheuttamien infektioiden lisääntymisen syynä on mm. laajentunut antibioottien käyttö [4, s. 35–36].

## 2 **Metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

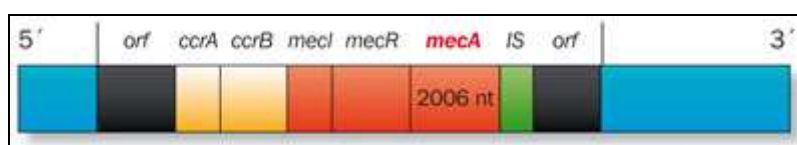
### 1.1 MRSA:n rakenne ja tyypit

Penisilliinin käyttö alkoi 1940-luvulla. Melko pian sen jälkeen stafylokokit kehittivät resistenssin sitä vastaan [2]. Monet *S. aureus* -kannat tuottavat penisilliiniä hajottavaa penisillinaasi-entsyymiä. Näitä bakteeri-infektioita hoidettiin 1960 – luvulta lähtien penisillinaasi-entsyymiä sietävillä stafylokokkipenisilliineillä, esim. metisilliinillä. Ensimmäi-



sen kerran metisilliiniresistentti *S. aureus* (MRSA) löydettiin vuonna 1961, vain vuosi metisilliinin käyttöönoton jälkeen [2]. MRSA-bakteeri leviää ihmisestä toiseen usein käsikosketuksella. Se leviää harvoin ilmateitse, kuten tavallinen flunssavirus [5].

MRSA-bakteerin ja metisilliinisensitiivisen *S. aureus* (MSSA) -bakteerin suurin ero on MRSA-bakteerin kromosomissa oleva *mecA* – geeni, joka tekee MRSA-bakteerit vastustuskykyisiksi kaikille beetalaktaamiantibiooteille. *mecA* – geeni tuottaa muuntunutta penisilliiniä sitovaa proteiinia (PBP2'). [3]. *mecA* – geenisijaitsee kromosomissa *SCCmec* -geenikasetissa, joka sisältää myös rekombinaatiogeneeniä (*ccr*), joiden avulla kasetti voi siirtyä kromosomiin/kromosomista pois (kuva 1). Tällä hetkellä MRSA-bakteereilla tunnetaan 11 erilaista *SCCmec*-tyyppiä [6]. MRSA-bakteereilta on löydetty myös uusi *mec*- geeni, joka sijaitsee myös *SCCmec*-geenikasetissa; tätä kutsutaan *mec C*:ksi [7]. MRSA-bakteerikannat voivat olla myös moniresistenttejä beetalaktaamiantibioottien lisäksi esimerkiksi klindamysiinille, erytromysiinille, aminoglykosideille ja fluorokinoloneille.



Kuva 1. *SCCmec* –geenikasetti [8].

MRSA-bakteerit on tyypillisesti jaettu sairaalahoidossa kehittyneisiin (HA, hospital-acquired tai healthcare-associated) ja avohoidon (CA, community-acquired) MRSA-kantoihin. Sairaaloissa esiintyvä HA-bakteeri on todettu ihmisillä, jotka ovat olleet vuoden sisällä sairaalahoidossa. HA-MRSA -bakteereilla on tyypillisesti *SCCmec* I-III [4, s. 35–36; 9]. Joissakin sairaaloissa eristetyissä *S. aureus* -bakteereista MRSA:n osuus on 60–80 %. Lisääntynyt MRSA -bakteerista johtuva kuolleisuus johtuu enemminkin tehottomista lääkkeitä kuin muuttuneesta MRSA -bakteerien taudinaiheuttamiskyvystä. CA-MRSA -bakteeri esiintyy terveillä ihmisillä, jotka eivät ole olleet sairaalahoidossa tai kirurgisessa leikkauksessa ainakaan vuoteen [4, s. 35–36]. Näillä esiintyy useimmiten kasettikromosomi *SCCmec* IV ([4, s. 35–36]. Vaikka CA-MRSA- ja HA-MRSA -bakteereilla on selviä klinisiä eroja niin ne leviävät samalla tavalla, useimmiten iho- iho kontaktissa tai esim. yhteisten pyyhkeiden kautta [9].

## 1.2 MRSA eläimillä

Ensimmäisen kerran MRSA-bakteeri löydettiin eläimistä Belgiassa vuonna 1972 nautan utaretulehduksen aiheuttajana. Vuoden 2000 jälkeen löydökset eläimissä ovat yleistyneet [10]. MRSA-bakteerikantoja on eristetty mm. seuraeläimistä, hevosista, lehmistä ja sioista. Viime vuosina tuotantoeläimistä eristettyjä kantoja on alettu kutsua LA (livestock associated)-MRSA:ksi. Tätä bakteerimuotoa on havaittu olevan karjatiloilta erityisesti nautoilla, sioilla sekä siipikarjalla [11]. MRSA aiheuttaa pääasiassa pieneläimille iho-, hengitystie- ja leikkaushaavainfektioita, hevosille nivel-, iho- ja leikkaushaavainfektioita sekä maidontuotantoeläimille utaretulehduksia. Terveet eläimet voivat olla myös MRSA:n kantajia [10;12].

Suomessa ensimmäinen eläimestä eristetty MRSA-bakteerikanta todettiin 1990-luvulla hevosesta. Vuosina 2005–2006 MRSA todettiin kahdella nautakarjatilalla ja vuosina 2006–2008 yliopistollisessa eläinsairaalassa esiintyi useampi epidemia. Kaikissa tapauksissa MRSA-kanta oli eri tyyppiä. Sikojen MRSA-tilannetta on tutkittu vuodesta 2008 ja useita eri tiloja on todettu positiivisiksi. Lisäksi MRSA on Suomessa todettu muutamalta yksittäiseltä koiralta ja kissalta. [12].

### MRSA sioilla

Siat ovat pääasiassa MRSA-bakteerin kantajia. Joissakin tapauksissa sioilla on todettu MRSA-bakteerin aiheuttamia tauteja, esimerkiksi utaretulehduksia tai virtsatieinfektioita [13]. Erityinen huomio on sioista löydettyllä LA-MRSA Clonal Complex 398 (CC) -tyypillä. Sioissa MRSA -bakteeri CC398 löydettiin ensimmäisen kerran Alankomaista vuosina 2003–2005 ja sen on todettu leviävän laajalti eurooppalaisessa sikapopulaatioissa [14]. Sioissa tartunnat on todettu pääasiassa oireettomilla eläimillä [13]. Tutkimusten mukaan MRSA CC398 on kehittynyt ihmisten metisilliiniherkästä *S. aureuksesta*. CC 398-tyyppi on levinnyt laajalti karjassa ja se on hankkinut itselleen resistenssin tetrasykliinejä ja metisilliiniä vastaan [15]. Vielä ei tunneta kovin hyvin syitä tämän MRSA-tyypin leviämiseen. Siihen vaikuttavat ainakin eläinten väliset kontaktit, eläinten siirrot sekä mahdollisesti mikrobilääkkeiden käyttö [13].

Ihminen saa karjaan yhdistetyn MRSA-bakteerin helpoiten suorassa kontaktissa eläimiin. On osoitettu, että myös karjatilojen lähistöllä asuvat ihmiset voivat saada MRSA-bakteerin, vaikka eivät ole suorassa kontaktissa tuotantoeläinten kanssa [11]. LA-

MRSA-bakteerikanta CC398 sisältää pääasiassa kasettikromosomin SCC*mec V*, joka on negatiivinen Panton-Valentine leukosidille (PVL) [16]. MRSA CC398 -bakteerin on todettu aiheuttavan ihmisilläkin vakavia infektoita. Ihmiset, jotka ovat saaneet MRSA-bakteeritartunnan eläimiltä voivat kuljettaa bakteerin sairaaloihin [13]. MRSA CC398 voi aiheuttaa tauteja myös ihmisille ja se pystyy leviämään ihmisestä toiseen. Siksi viranomaiset ovat tarkkaavaisia maissa, joissa CC398 on yleinen, hoitaessaan sairaaloissa ihmisiä, jotka ovat karjan kanssa läheisesti tekemisissä [4].

Vuonna 2008 toteutettiin Suomessa ensimmäinen kartoitus, jossa otettiin ympäristöpölynäytteitä 207 sikatilasta. Niistä yhdessä (0,5 %) löydettiin MRSA. Todettu bakteerikanta kuului CC398-ryhmään [12]. Tämän jälkeen Suomessa on tehty kaksi kartoitusta kahden maa- ja metsätalousministeriön (MMM) asetuksen turvin [17;18]. Vuosina 2009–2010 tutkittiin MRSA-kantoja 59 lihasikalatilan teurastetuista sioista ja 36 porsas-tuotantotilan porsaiden patologisista näytteistä. Yhteensä 14 (14,7 %) tilan näytteistä löydettiin MRSA -bakteeri [19]. Kartoituksessa todettiin MRSA-bakteerikantoja CC398 ja CC1. Nämä selvitystiedot ovat osoittaneet, että Suomessakin sikatiloilla esiintyy MRSA-bakteeria, vaikka niiden perusteella ei vielä voidakaan arvioida sen esiintyvyyttä Suomessa [12].

### 3 MRSA-bakteerin seulonta

MRSA-bakteerit ovat resistenttejä kaikille beetalaktaamiantibioteille sisältäen penisilliinit ja kefalosporiinit. MRSA-bakteerikannat voidaan seuloa käyttäen elvyttävää ja lievästi valikoivaa esirikastuslientä ja/tai selektiivistä rikastuslientä sekä selektiivisen kiinteän elatusalustan avulla [20]. Kaksivaiheisen rikastusliemen on todettu lisäävän todettuja MRSA-bakteerihavaintoja sian sierainlimanäytteistä [21].

Rikastusvaiheessa hyödynnetään myös usein *S. aureus* -bakteerien kykyä kasvaa korkeammassa suolapitoisuudessa. Rikastusliemissä on käytetty eri suolapitoisuuksia, mm. 7,5 % [20] sekä 6,5 % [22]. Käytetty suola on ollut natriumkloridi [22; 23]. Selektiivisissä rikastusliemissä on käytetty antibioottien yhdistelmiä, esim. kefoksitiini 75 mg/l ja atstreonaami 3,5 mg/l [23]. De Neellingin mukaan selektiivisinä antibiootteina voidaan käyttää myös oksasiliiniä 4 mg/l ja atstreonaamin 75 mg/l yhdistelmää [24]. On kokeiltu myös selektiivistä rikastuslientä, jossa atstreonaamipitoisuus on 50 µg/ml ja kefoksitiinia 5 µg/ml [25].

Selektiivisinä maljoina voidaan käyttää kaupallisia elatusalustoja, mm. Oxoidin Brilliance MRSA-agaria, jossa tyypilliset MRSA-bakteeripesäkkeet näkyvät sinisinä. Oxoidilla on myös Oxacillin resistance screen Agar (ORSA), jossa tyypilliset pesäkkeet ovat myös sinisiä [26]. Myös BioRadilla on MRSA-selektiivinen kasvualusta MRSA Select™, jossa tyypilliset MRSA-bakteeri pesäkkeet kasvavat pieninä ja vaaleanpunaisina. Koagulaasinegatiiviset stafylokokit eivät hajota kromogeenista substraattia, joten ne näkyvät tällä maljalla värittöminä tai valkoisina pesäkkeinä. Myöskään metisilliinisenitiivinen stafylokokki ei kasva tällä maljalla [27]. Selektiivisiä MRSA- bakteerialustoja ovat myös Biomerieuxin CHROM ID™ MRSA-alustat, joissa tyypilliset pesäkkeet ovat vihreitä. Khanna [22] on käyttänyt BBL:n CHROMagar MRSA -maljoja, jossa tyypilliset MRSA -bakteeripesäkkeet ovat malvanvärisiä ja pyöreitä [28].

Tyypilliset pesäkkeet voidaan varmentaa *S. aureus* -bakteereiksi monella varmistustestillä, kuten gramvärjäyksellä, katalaasitestillä, koagulaasitestillä ja *S. aureus* -bakteerin lateksiliimautumiskokeella. Metisilliiniresistenssin voi varmistaa esimerkiksi PBP2'-pikatestillä tai osoittamalla *mecA*-geeni PCR-menetelmällä [29]. PBP2'-agglutinaatiotestillä osoitetaan bakteerisolun pinnalla oleva muuntunut penisilliiniä sitova proteiini. Testi on pikatesti, joka perustuu penisilliiniä sitovan proteiinin eristämiseen soluseinästä ja sen reaktioon sidotun monoklonaalisen vasta-aineen kanssa, jolloin muodostuu silminnähtävä sakka.

#### **4 Mikrobiologinen validointi**

Validoinnissa osoitetaan menetelmän kelpoisuus tuottamalla vertailuarvoja suureille, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta. Mikrobiologiassa näytteestä analysoidaan mikrobit häiritsevine taustoineen ja materiaaleineen. Menetelmän spesifisyyteen vaikuttavat alustan koostumus ja kasvatusolosuhteet sekä tutkittavien mikrobikantojen ominaisuuksien vaihtelu. Mikrobit ovat eläviä, joten niistä ei pysty tekemään valmisteita, joiden todellinen pitoisuus pysyisi muuttumattomana. Oikeana tuloksena pidetään yleensä menetelmän keskiarvotulosta ja hyväksytyn arvon (referenssimateriaaleilla saatu ”todellinen arvo”) lähekkäisyyttä. [30, s. 2–3].

#### 4.1 Mikrobin ja pitoisuuksien valinta

Mikrobeina käytetään tunnetun mikrobipitoisuuden omaavia referenssimateriaalien puuttuessa laboratorion itse tunnetuista kannoista valmistamia mikrobisuspensioita, joiden pitoisuus määritetään. Yleensä valitaan sellainen mikrobi tai mikrobiryhmä, jota tutkitaan. Validoitaessa kvalitatiivista menetelmää valitaan tutkittavaksi yleensä mikrobipitoisuudet, joista toinen on lähellä toteamisrajaa ja toinen noin kymmenkertainen. [30, s. 11].

#### 4.2 Validoinnin suureet

##### 4.2.1 Nollanäytteet

Näyte on hyvä tutkia ennen mikrobin siirrostusta, ettei se sisällä jo entuudestaan tutkittavaa mikrobia. Jos näyte sisältää jo valmiiksi tutkittavaa mikrobia, sen pitoisuutta ei tiedetä ja koko vaiva tunnetun mikrobimäärän lisäämiseksi on ollut turha. Nollanäytteet on hyvä ottaa mukaan tutkimussarjan viimeiseksi, jotta havaitaan analyysin aikana tapahtuva mahdollinen kontaminaatio [31].

##### 4.2.2 Toteamisraja, toistettavuus ja uusittavuus

Toteamisraja on pienin pitoisuus tutkittavaa mikrobia, jolla voidaan todeta sisältääkö näyte sitä vai ei [32]. Toteamisrajan toteaminen vaatii mikrobiviljelmällä siirrostetut näytteet. Näytteisiin lisätään niin pieniä määriä bakteeria, että osa jää negatiiviseksi ja osa saadaan positiiviseksi [33].

Toistettavuudessa analyysi suoritetaan samalla menetelmällä, samoissa olosuhteissa ja samojen henkilöiden toimesta lyhyellä aikavälillä. Toistettavuus on peräkkäisten toistojen antamien tulosten lähekkäisyys tutkittaessa identtisiä näytteitä [30]. Uusittavuudessa määritetään yksittäisten analyysitulosten lähekkäisyys, kun eri henkilöt tutkivat samoilla menetelmillä identtisiä näytteitä joko samassa tai eri laboratoriossa [30].

#### 4.2.3 Spesifisyys, sensitiivisyys sekä virhepositiiviset ja –negatiiviset tulokset

Menetelmän spesifisyydellä tarkoitetaan sen kykyä löytää tutkittava mikrobi, vaikka näytteessä olisi häiritseviä tekijöitä. Menetelmää validoitaessa on opittava tunnistamaan tyypilliset pesäkkeet varmistamalla ne analyysiä häiritsevän mikrobiston joukosta. Pesäkkeiden laskeminen ja tunnistaminen on aina subjektiivista ja virhepositiivisten sekä –negatiivisten osuus on usein matriisikohtaista. Täydellisen spesifinen menetelmä määrittää vain analysoitavan mikrobin. [30]. Suhteellinen spesifisyys ilmoittaa testillä negatiiviseksi saatujen suhteen odotettuihin negatiivisiin näytteisiin [31].

Menetelmän sensitiivisyys on menetelmän kyky todeta tietyssä materiaalissa vähäiset vaihtelut määritettävien mikrobien pitoisuuksissa. Kvalitatiivisen menetelmän sensitiivisyys ilmoitetaan yleensä menetelmän todettujen positiivisten tulosten prosenttiosuutena odotetuista positiivisista näytteistä. Positiivinen tulos on silloin virhepositiivinen, kun analysoitu näyte ei sisällä tutkittavaa mikrobia. Virhenegatiivinen tulos on silloin, kun saadaan negatiivinen tulos, vaikka analysoitava näyte sisältää tutkittavaa mikrobia. [30].

## 5 Työn kulku

### 5.1 Tavoitteet

Laboratoriossa oli käytössä jo MRSA-bakteerin seulontamenetelmä, joka oli Euroopan unionin mikrobilääkeresistenssilaboratorion ohjeen 'Laboratory protocols, Isolation of MRSA from dust samples' 2nd Ed 2009 [34] mukainen. Ohje on pölynäytteille ja tavoitteena oli validoida kyseinen menetelmä sioista otetuille sierainlimanäytteille. Menetelmävalidointiin valittiin aiemman maljavertailun tuloksena referenssilaboratorion ohjeesta poiketen Bioradin malja. Menetelmä on kvalitatiivinen, joten tuloksena on todettu/ei todettu.

Validointi tapahtui tutkimalla sikojen sieraimista otettuja näytteitä, joihin siirrostettiin tunnettu määrä bakteeria. Bakteerimäärät ( $10^2$  pmy,  $10^3$  pmy,  $10^4$  pmy) valittiin aiempien puhtasviljelmistä tehtyjen kokeiden perusteella. Lisäksi tutkittiin laboratorioon tu-

levia rutiininäytteitä sekä vertailututkimusnäytteitä (referenssinäytteitä). Nollanäytteet tutkittiin rinnakkain varsinaisten validointinäytteiden kanssa, koska näytteiden säilyttämistä pidempään kuin normaalitilanteessa haluttiin välttää bakteeritaustaflooran muutosten minimoimiseksi.

## 5.2 Materiaalit ja menetelmät

### 5.2.1 Käytettyjen bakteerikantojen elvytys pakastimesta

Työssä käytettiin Eviran kantakokoelman MRSA-bakteerikantoja MS271 ja MS279, jotka olivat eristetty sioista. Tiedetään, että näillä MRSA-kannoilla on *mecA*-geeni. Kantoja säilytettiin pakastimessa (-80 °C) pakastusputkissa (10 % glyseroli). Putkista viljeltiin 1 µl:n silmukallinen verimaljoille hajotusviljelyynä. Kantoja uusittiin kerran viikossa viljelemällä kantamaljalta (maljalta, joka oli viljelty pakastimesta) uudelleen verimaljalle. Kannat uusittiin pakastimesta kerran kuukaudessa verimaljoille.

### 5.2.2 Sian sierainlimanäytteet validointiin

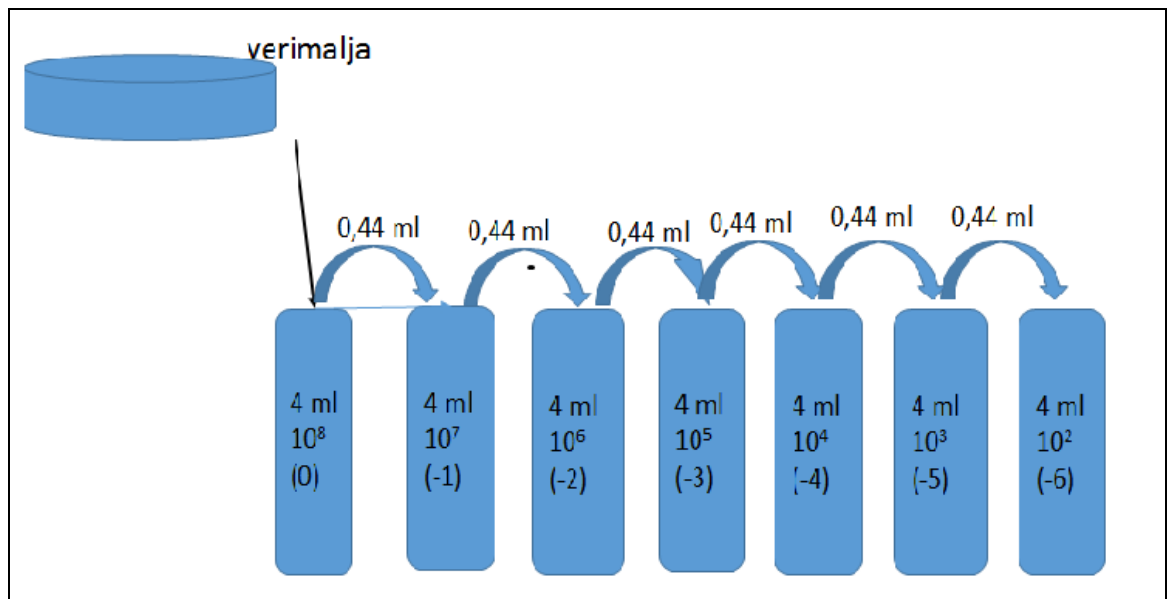
Validointinäytteinä käytettiin Eviran patologian osastolta saatuja sian sierainlimanäytteitä. Ne oli otettu sian sieraimista pumpulitikuilla, jotka oli laitettu elatusainetta sisältävään kuljetusputkeen (Probact transport swab, TS/5-6). Sierainlimanäytetikut jaettiin niin, että yhteen sarjaan kuului neljä näytetikua. Kolmeen näytetikkun siirrostettiin bakteeriliemiviljelmää ja yksi jätettiin negatiiviseksi näytteeksi.

### 5.2.3 Mikrobiymppien valinta

Työhön valittiin kolme mikrobiymppiipitoisuutta. Tavoitteena oli osoittaa menetelmän toimivuus erilaisilla bakteerimäärillä sekä pyrkiä määrittämään pienin todettavissa oleva bakteerimäärä yhtä sierainlimanäytettä (tikkua) kohden. Sierainlimatikkuihin siirrostettaviksi valittiin ymppiipitoisuudet  $10^4$  pmy/ml  $10^5$  pmy/ml ja  $10^6$  pmy/ml. Sierainlimatikuissa olevat bakteerimäärät olivat siis  $10^2$  pmy  $10^3$  pmy ja  $10^4$  pmy.

#### 5.2.4 Ympinäytteiden valmistus ja tiheyden määrittäminen

Sierainlimanäytteiden saavuttua laboratorioon verimaljalla kasvatetusta MRSA-bakteerikannasta tehtiin liemiviljelmä 4 ml natriumkloridi (NaCl)–liuosta (0,9 %) sisältäviin putkiin. Suspension sameus säädettiin nefelometrillä McFarland arvoon 0,5. Tämä vastaa bakteeripitoisuutta  $10^8$  pmy/ml. Liemiviljelmästä tehtiin kymmenkertainen laimennossarja laimennokseen  $10^{-6}$  (pitoisuuteen  $10^2$  pmy/ml) asti. (k—uva 2).



Kuva 2. Bakteerikantojen laimennos

Liemiviljelmän solutiheys määritettiin viljelemällä verimaljoille pintalevityksenä 100  $\mu$ l ja 50  $\mu$ l laimennoksista  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ja  $10^{-6}$ . Maljoja inkuboitiin 1 vrk 37 °C:ssa. Liemiviljelmässä oleva bakteeripitoisuus laskettiin maljoilla olevien pesäkemäärien perusteella kaavan 1 mukaisesti.

Liemiviljelmän tiheys laskettiin kaavalla 1 [35]:



$$N = \frac{c_1 + c_2 + \dots + c_n}{(n_1 V_1 + n_2 V_2 + \dots + n_n V_n) x d}$$

(1)

jossa

$C_1 + C_2 + \dots + C_n$  = pesäkkeiden lukumäärä jokaiselta tuloksen laskentaan käytettävältä maljalta

$n_1$  = ensimmäisen laskentaan käytetyn laimennoksen rinnakkaisten lukumäärä

$n_2$  = toisen laskentaan käytetyn laimennoksen rinnakkaisten lukumäärä jne.

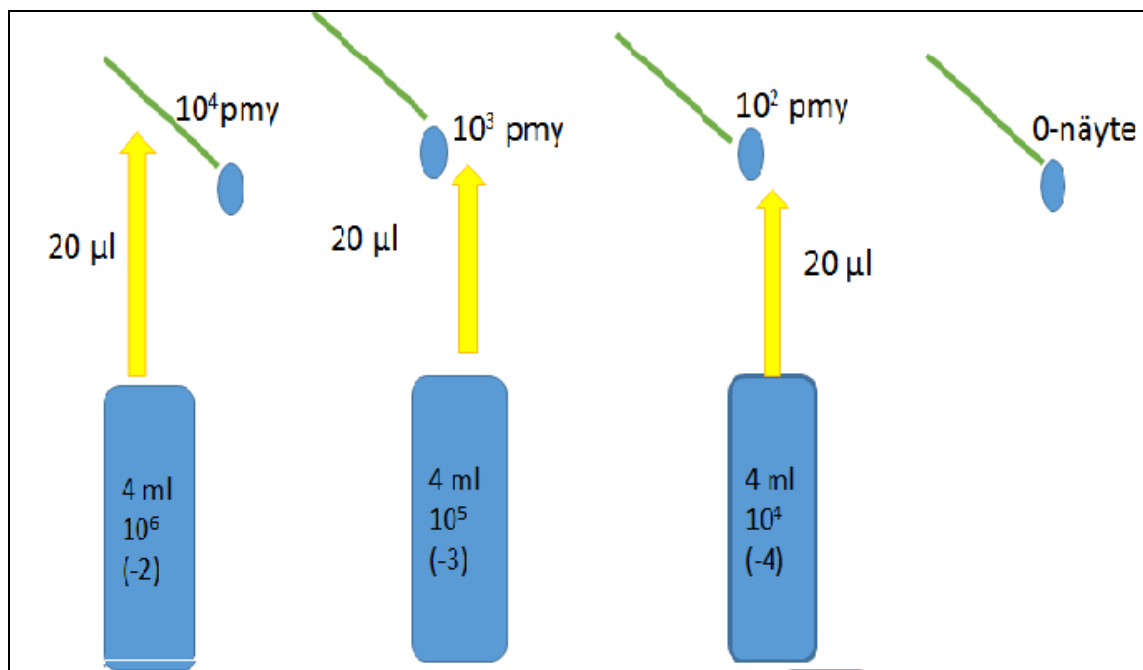
$V_1$  = ensimmäistä pesäkelukua vastaava näytetilavuus (alkuperäistä näytettä)

$V_2$  = toista pesäkelukua vastaava näytetilavuus (alkuperäistä näytettä) jne.

$d$  = pienin laskentaan käytetty laimennos

#### 5.2.5 MRSA:n siirrostus sierainlimanäytteisiin

Kolmeen sierainlimanäytetikkuun siirrostettiin liemiviljelmää laimennoksista -2, -3 ja -4 20 µl niin, että tikuihin olevaksi bakteeripitoisuudeksi tuli noin  $10^4$  pmy,  $10^3$  pmy ja  $10^2$  pmy (kuva 3). Yksi näytetikku jätettiin 0-näytteeksi ja analysoitiin muiden näytteiden mukana normaalisti. Näytetikut jätettiin kylmään 1 - 3 vrk:ksi. Yhteensä sarjoja oli 14. Ympäri siirrostettiin suoraan sierainlimanäytetikkuun ajatellen, että siten se vastaa parhaiten oikeaa näytettä.



Kuva 3. Bakteerien ympärys sierainlimanäytetikuihin

#### 5.2.6 Laboratorioon tulevat rutiininäytteet ja vertailututkimusnäytteet

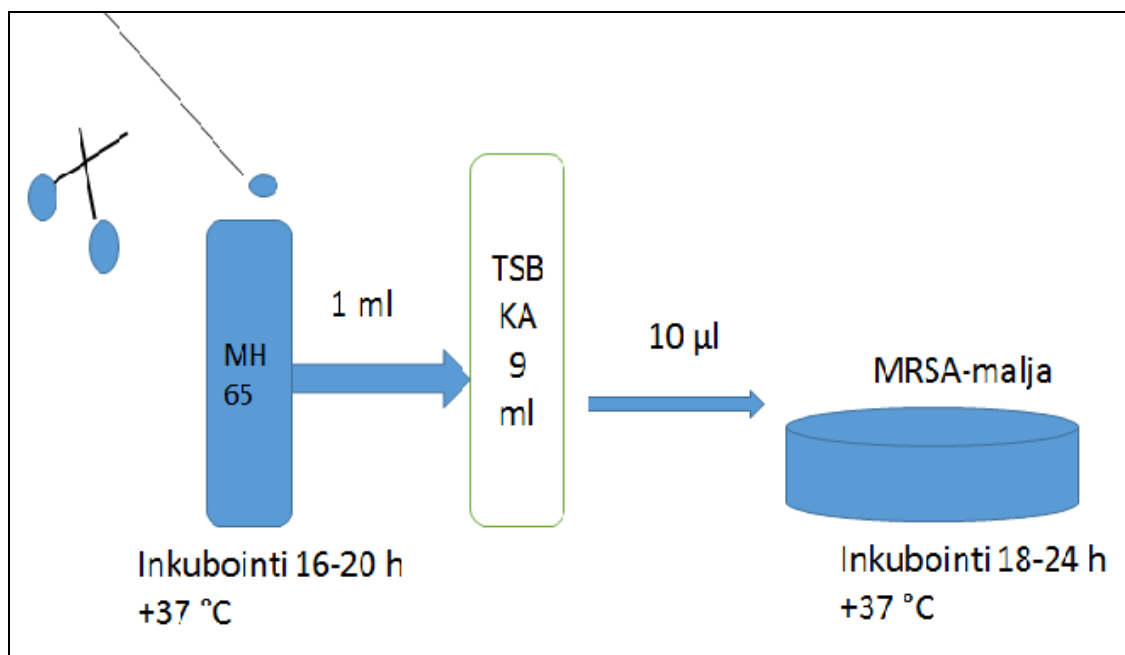
Rutiininäytteiksi valittiin yhdeltä tilalta tulevat sierainlimanäytteet. Näytteet oli otettu 20 sian sieraimesta pumpulitikuilla (Probact transport swab, TS/5-6), ja ne tulivat laboratorioon kuljetuselatusaineputkissa.

Lisäksi tutkittiin Euroopan unionin mikrobilääkeresistenssivertailulaboratoriosta tulleet vertailututkimusnäytteet. Vertailututkimusnäytteitä oli yhteensä kahdeksan. Näytteinä oli kuljetuselatusaineessa olevat pumpulitikut. Vertailututkimusnäytteisiin lisätyt mikrobimäärät olivat  $10^5$  pmy ja  $10^6$  pmy.

#### 5.2.7 MRSA-bakteerin toteaminen sierainlimanäytteistä

Sierainlimanäytetikut katkaistiin steriileillä saksilla 3 ml Müller-Hinton-esirikastuslientä, joka sisälsi 6,5 % NaCl (MH 65), ja inkuboitiin 16–20 h +37 °C:ssä. Inkuboinnin jälkeen 1 ml esirikastuslientä siirrostettiin 9 ml:aan tryptoni-soijalientä (TSBKA) (Tryptoni-soija TSB, BP 211768, BBL™), joka sisälsi kefoksitiinia 3,5 mg/ml (cefoxitin sodium salt, C4786, Sigma, liuotettuna veteen) ja astreonaamia 75 mg/ml (Aztreonam, A 6848,

Sigma, liuotettuna dimetyylisulfoksiiniin). TSBKA-putkia inkuboitin 16–20 h, +37 °C:ssa. Yksi 10 µl:n silmukallinen rikastuslientä hajotusviljeltiin MRSA-spesifisille MRSASelect™-maljoille (63747, Biorad). Maljoja inkuboitin 18–24 h, +37 °C:ssa. (kuva 4). Tyypillisen näköiset pesäkkeet olivat vaaleanpunaisia, pieniä, halkaisijaltaan 1 - 2 mm pyöreitä pesäkkeitä. (kuva 5).



Kuva 4. MRSA -bakteerin toteaminen sierainlimanäytteestä



Kuva 5. MRSA-bakteeripesäkkeitä bioradin MRSA- select maljalla [36].

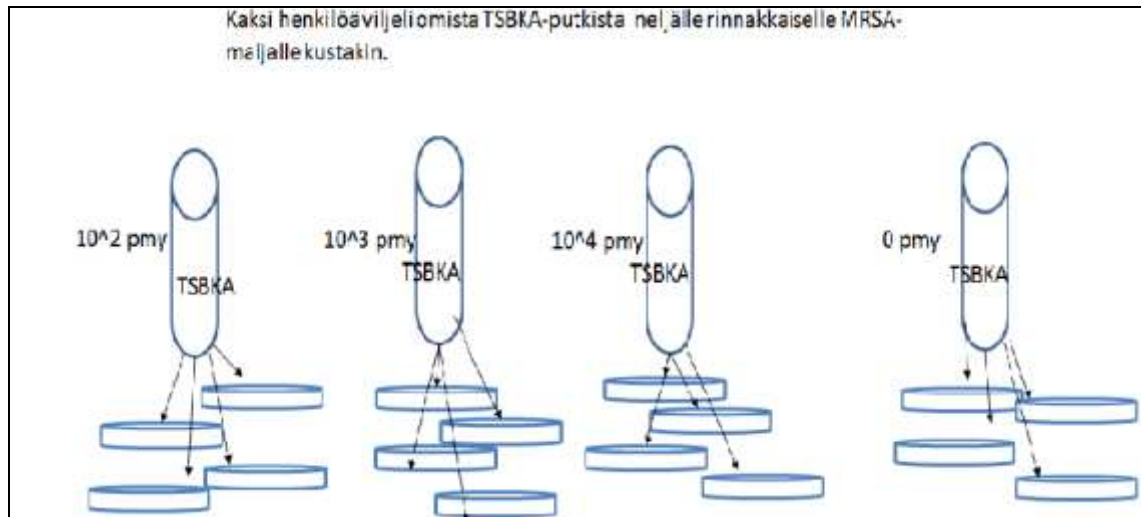
Liemiviljelmällä siirrostetuista näytteistä otettiin jokaisesta sarjan bakteerimäärän ( $10^{-2}$  pmy,  $10^{-3}$  pmy ja  $10^{-4}$  pmy) maljalta yksi tyypillisen näköinen vaaleanpunainen pesäke jatkokoon. Tämä pesäke viljeltiin hajotusviljelynä verimaljalle sekä CO (Chromogenic)-maljalle (Chrom<sup>TM</sup>agar Orientation 254102, BBL), jotta saataisiin viljelmä puhtaaksi ja tuoreeksi. Puhdasviljelmästä tehtiin PBP2'-pikatesti (Penicillin binding protein latex agglutination test, DR0900, Oxoid) sekä varmistettiin bakteerilaji ja *mecA*-geeni PCR:n avulla. Maljat säilytettiin varmistustestien ajan.

Rutiininäytteet ja vertailututkimusnäytteet tutkittiin vastaavalla tavalla. MRSA -maljoilta otettiin yhdestä viiteen tyypillistä pesäkettä jatkokoon. Vähintään yhdestä puhtaaksi viljelystä pesäkkeestä tehtiin PBP2'-pikatesti ja PCR.

#### 5.2.8 Toistettavuuden ja uusittavuuden arviointi

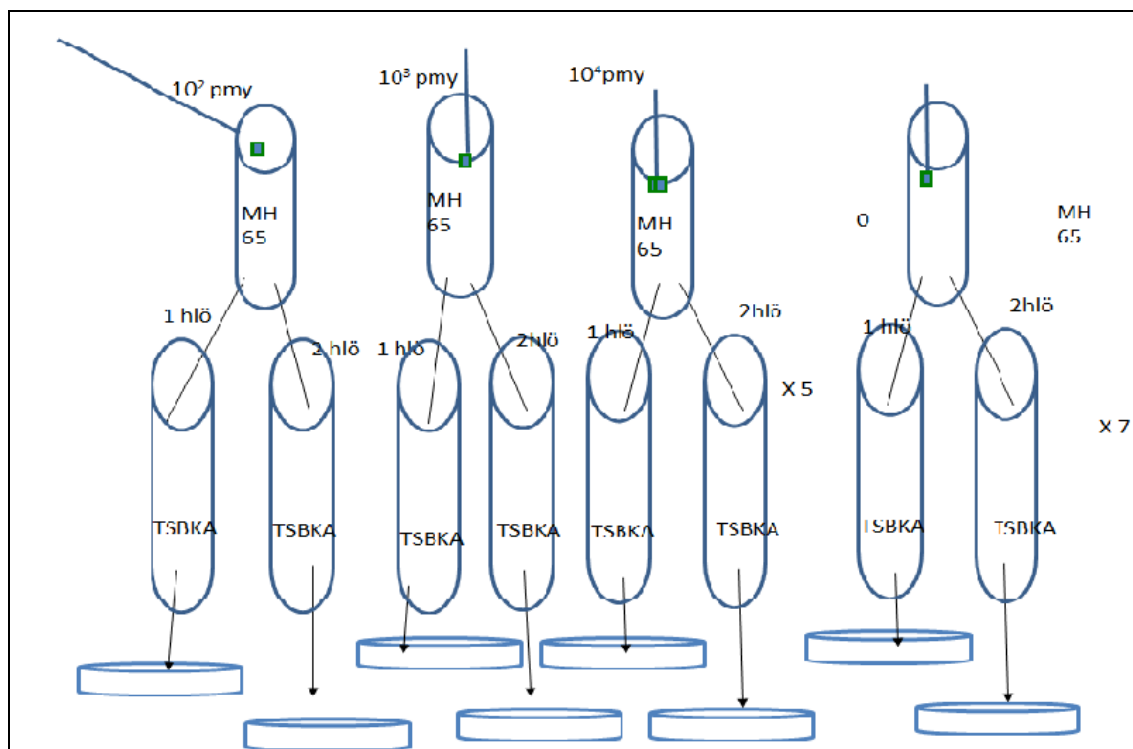
Koska identtisiä sierainlimanäytteitä oli mahdoton saada näytteiden luonteen takia (pumpulipuikot), toistettavuuden ja uusittavuuden arvioinnissa jouduttiin joustamaan.

Toistettavuuden arvioinnissa kaksi laboranttia viljeli 10 µl:n silmukalla samoista TSBKA-rikastusliemiputkista neljä rinnakkaista MRSASelect<sup>TM</sup>-maljaa. Maljat viljeltiin yhden sarjan TSBKA-putkista, joissa olivat bakteerimäärät  $10^2$ ,  $10^3$  ja  $10^4$  pmy (kuva 6). Rinnakkaiset maljat tehtiin myös nollanäytteistä. Toistettavuutta arvioitiin kummankin laborantin rinnakkaisten tulosten perusteella. Maljoilla olleet tyypilliset pesäkkeet varmistettiin PBP2' -testillä.



Kuva 6. Toistettavuuden arviointi

Uusittavuuden arvioinnissa kaksi laboranttia käsitteli viisi sarjaa (laimennokset  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  ja  $10^{-4}$ ) rinnakkain esirikastusvaiheesta lähtien (kuva 7). Maljoilla olleet tyypilliset pesäkkeet varmistettiin PBP2'-testillä. Myös seitsemän negatiivista rutiininäytettä viljeltiin rinnakkain kahden laborantin toimesta.



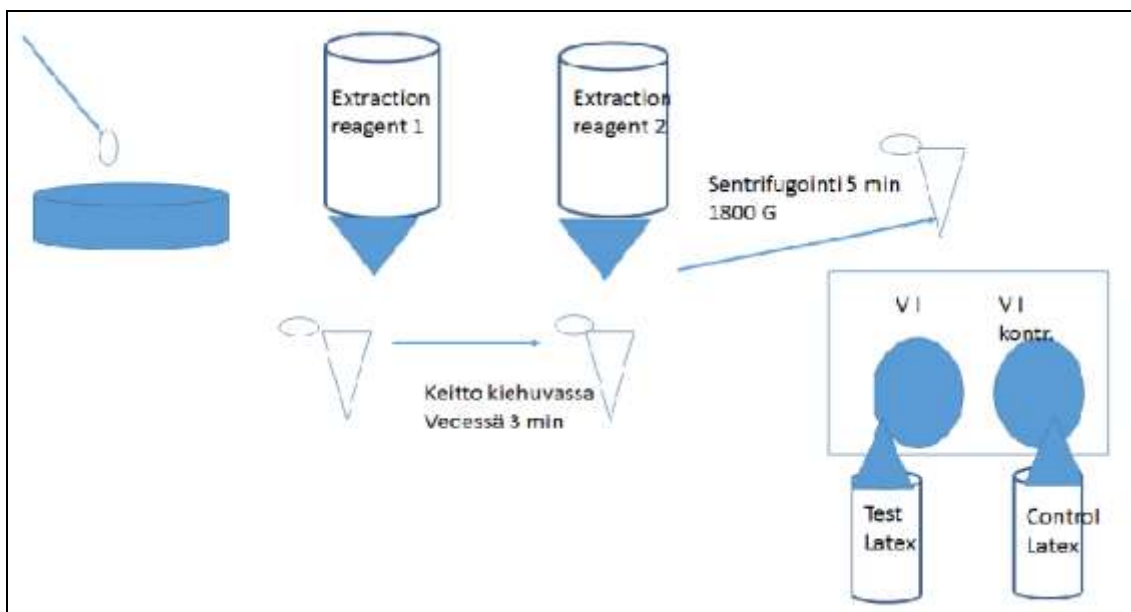
Kuva 7. Uusittavuuden arviointi

## 5.2.9 MRSA-bakteerin varmistustestit

### PBP2'-testi

PBP2'-testi (PBP2' Test Kit, DR 0900A, Oxoid) tehtiin jokaisesta sarjan laimennosmaljalta yhdestä pesäkkeestä. Testissä otettiin verimaljalta puhtasviljelmästä 1 µl:n silmukalla bakteerimassaa joka laitettiin neljään pisaraan uuttoliuosta I. Seosta keitettiin kiehuuvedessä 3 min. Jäähdyneeseen seokseen lisättiin pisara uuttoliuosta II ja tämä sentrifugoitiin 1800 G 5 min.

Testi suoritettiin niin, että testiliuskassa olevaan testiympyrään laitettiin yksi pisara testilateksiliuosta ja kontrolliympyrään yksi pisara kontrollilateksiliuosta. Sentrifugoinnin jälkeen laitettiin kumpaakin ympyrään näyteasupernatanttia 50 µl. Testissä muodostui saostuma 3 min:n kuluessa, jos näyte sisälsi PBP2'-proteiinia. Positiivisena kontrollina käytettiin *S. aureus* ATCC 43300 -kanta ja negatiivisena *S. aureus* ATCC 29213 -kanta. (kuva 8).



Kuva 8. PBP'2 pikatestin suoritus

## PCR

*S. aureus* -bakteeri tuottaa solun ulkopuolista nukleaasia, jota koodaa *nuc* -geeni. MRSA- bakteeri voidaan tunnistaa siitä, että sillä on sekä *nuc*- että *mecA*- geeni. Tutkimuksen tarkoituksena oli osoittaa *mecA*-geenin olemassaolo sekä *S. aureus* -bakteerille spesifinen *nuc*-geeni. Sisäisenä kontrollina toimi PCR-tuote, joka vastasi 16S-geeniä. Tässä työssä käytettiin PCR-menetelmän lähtömateriaalina MRSA-bakteerin dna:ta. PCR tehtiin Eviran menetelmäohjeen Evira 3550 mukaan.

Tutkittavat bakteerit viljeltiin naudan veriagarille. DNA eristettiin kaupallisella kitillä (Master Pure™ Gram positive DNA purification Kit, MGPO4100, Epicentre). Eristys tehtiin suoraan verimaljalla kasvavasta bakteeriviljelmästä. 10 µl:n silmukalla siirrettiin bakteerimassaa putkiin, joissa oli 150 µl TE-puskuria. DNA eristettiin Master Pure™ Gram positive DNA purification Kitin ohjeiden mukaisesti. DNA:n saostuksen jälkeen etanoli poistettiin pelletin jäädessä putkien pohjalle. Näytteet jätettiin kuivumaan. Kun näytteet olivat kuivia, niihin lisättiin 35 µl TE-puskuria ja jätettiin huoneenlämpöön yön yli. DNA-pitoisuus mitattiin NanoDrop-laitteella. Näytteet laimennettiin niin, että DNA-pitoisuus oli 100 ng/µl. Näytteistä monistettiin alukkeiden rajaamaa aluetta monistetta-

vasta geenistä. Alukkeet olivat kohdesekvenssille spesifisiä. PCR:n sisäisenä kontrollina toimi 16 S. (taulukko 1).

Taulukko 1. PCR:ssä käytetyt alukkeet

Geeni	Sekvenssi
<b>mecA1</b>	: 5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3'
<b>mecAll</b>	: 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'
<b>nucA1</b>	5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3':
<b>nucA2</b>	5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'
<b>16S I</b>	5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3'
<b>16S I</b>	5'-AGACCCGGGAACGTATTCAC-3'

PCR-reaktiota varten tehtiin reagensseista seos (mastermix) taulukon 2 mukaisesti yhtä näytettä kohden. Valmista seosta jaettiin 200 µl:n eppendorf-putkiin 49 µl. Mastermix tehtiin erillisessä laboratoriossa ja laminaarikaapissa. Kontaminaation välttämiseksi käytettiin kertakäyttökäsineitä ja hihasuojia. DNA-templaatin lisääminen tehtiin erillisessä näytteenlisäyslaminarissa toisessa laboratoriossa. DNA-templaattia lisättiin 1 µl. Jokaista PCR-ajoa kohden valmistettiin kontrollit ilman alukkeita ja ilman näytettä. Jokaista ajoa kohti tehtiin myös positiivinen kontrolli, joka käsiteltiin samalla tavalla kuin näytteet. Positiivisena kontrollina oli *S.aureus* ATCC 43300. PCR-ajo tehtiin taulukon 3 mukaisesti MJ research PTC-200 -laitteella. Vaiheita 2 - 4 toistettiin 35 kertaa.



Taulukko 2. Mastermix

		kons. seoksessa	Näyte $\mu$ l
	PCR-vesi		40,1
	10X-puskuri	1x	5
25 $\mu$ M alukkeet/primerit,	25 $\mu$ M alukkeet/primerit, <i>mecA I</i>	0,3 $\mu$ M	0,6
	<i>mecA II</i>	0,3 $\mu$ M	0,6
	<i>nucA 1</i>	0,2 $\mu$ M	0,4
	<i>nucA 2</i>	0,2 $\mu$ M	0,4
	<i>16S1</i>	0,1 $\mu$ M	0,2
	<i>16S2</i>	0,1 $\mu$ M	0,2
	10 mM 4dNTP mix	200 $\mu$ M	1
	2 U/ $\mu$ l DNA polymeraasi	1 U	0,5
	näyte/DNA templaatti		1
	Yhteistilavuus $\mu$ l		50

Taulukko 3 PCR-ohjelma

Vaihe	Lämpötila	Aika
nro	$^{\circ}$ C	min
1	94	5
2	94	30 s
3	55	30 s
4	72	1
5	72	5
6	8	pito

PCR-tuotteet ajettiin 1,5 %:sella agarosigeelillä. Geeliin lisättiin 10 µl SYBR Safe -väriainetta (Sybr® DNA gel stain P/N S 3312) ja näytteitä ajettiin 1 % TBE-puskurissa 1,5 h 100 V. Geeliin sijoitettiin molekyylipainomarkkerit (O'gene Ruler 100 bp Plus Dna Ladder 0,1 µg/ml, Thermo Scientific #SM1153) molempiin reunoihin ja näytteiden keskelle. Monistuneiden PCR-tuotteiden kokoja verrattiin positiiviselta kontrollilta monistuneisiin tuotteisiin.

## 6 Tulokset ja tulosten tarkastelu

### 6.1 MRSA-seulontamenetelmän toimivuus ympätyillä sian sierainlimanäytteillä

Bakteeriliemiviljelmällä siirrostettujen näytteiden tulokset ovat liitteessä 1. Samanaikaisesti tutkittujen nollanäytteiden tulokset ovat liitteessä 2. Näytteessä todettiin olevan MRSA-bakteeria, jos selektiivisellä maljalla kasvoi tyypillisen näköinen pesäke, jonka todettiin olevan PBP'2-testiposiitivinen ja jolla todettiin sekä *nuc*- että *mecA*-geenit. Menetelmä on kvalitatiivinen, joten tulokset on merkitty taulukossa positiivisina (+) = todettiin ja negatiivisina (-) = ei todettu.

Sierainlimatikkuihin siirrostetut ympätyt vastasivat hyvin suunniteltuja määriä. Nollanäytteet, jotka analysoitiin samanaikaisesti kuin ympätyt sierainlimanäytteet, olivat negatiivisia. Sierainlimanäytetikuissa ei ollut MRSA-bakteeria ennen siirrostamista ja tuloksia voidaan pitää luotettavina. Tyypillisen MRSA:n näköisiä pesäkkeitä ei laskettu maljoilta, koska menetelmä oli kvalitatiivinen.

#### 6.1.1 Toteamisraja

Toteamisrajaksi saatiin  $10^4$  pmy. Bakteerimäärän ollessa  $10^4$  pmy todettiin MRSA-bakteerin kasvua kaikissa näytteissä (n=14). Keinotekoisesti siirrostettujen näytteiden tulokset olivat positiivisia lukuun ottamatta yhtä bakteerimäärältään  $10^2$  pmy ja yhtä bakteerimäärältään  $10^3$  pmy ympätyä näytettä. Menetelmällä pystytään osoittamaan myös bakteerimäärät  $10^2$  pmy ja  $10^3$  pmy, mutta tällöin saattaa tulla virhenegatiivisia tuloksia. Vääriin negatiivisiin tuloksiin saattoivat vaikuttaa eri työvaiheet, mikrobiympin siirrosta-

minen sierainlimanäytetikkoon, näytteiden siirrostaminen rikastusliemestä toiseen sekä maljalle siirrostaminen.

### 6.1.2 Toistettavuus ja uusittavuus

Toistettavuustulokset ovat liitteessä 3. Validoitavan menetelmän rinnakkaismääritysten tulokset olivat yhteneväiset kahden laborantin analysoimana. Molemmat laborantit saivat positiivisen tuloksen positiivisista näytteistä ja negatiivisen tuloksen negatiivisista näytteistä. Uusittavuudessa tehtiin kahden laborantin toimesta rinnakkain näytteitä MH65-esirikastusliemestä lähtien. Tulokset ovat liitteessä 4. Uusittavuustulokset ovat koottuna myös taulukossa 4. Laboranttien tulokset eivät poikenneet toisistaan. Rinnakkaiset näytteet olivat molemmilla laboranteilla positiivisia siirrostetuissa näytteissä ja negatiivisia nollanäytteissä.

Taulukko 4. Uusittavuustulokset a=positiivisten tulosten lukumäärä, b ja c =kahden laborantin eriavät tulokset, d=negatiivisten näytteiden lukumäärä.

	Lab 1	Lab 2
+	12 (a)	0 (b)
-	0 (c)	7 (d)

### 6.1.3 Spesifisyys, sensitiivisyys, virhepositiivisuus ja -negatiivisuus

Validoitavalla menetelmällä saadut tyypilliset vaaleanpunaiset pesäkkeet olivat PBP2'-testi positiivisia sekä niistä löytyi nuc- että mecA-geenit. Validoitavassa menetelmässä oli 20 negatiivista näytettä ja validoitava menetelmä totesi ne negatiivisiksi, joten menetelmän spesifisyys oli siten 100 %.

Validoitavan menetelmän sensitiivisyys määritettiin todellisten positiivisten tulosten lukumäärästä ympärikohtaisesti kaavalla 3.

$$\text{Herkkyyys} = \frac{P_v}{(PP + FN)} \quad (3)$$

$P_v$  = validoitavan menetelmän antaman positiivisten tulosten määrä. Herkkyyysprosentti on menetelmällä suuri jokaisella ympärikohtaisesti (taulukko 6).

Taulukko 6. Sensitiivisyys

Ympäri	positiivisten lukumäärä	Virhenegatiivisten lukumäärä	PP+FN	sensitiivisyys
	PP	FN		
10 <sup>2</sup>	13	1	14	92,86
10 <sup>3</sup>	13	1	14	92,86
10 <sup>4</sup>	14	0	14	100,00

Virhepositiivisuus: Selektiivisellä maljalla kasvavat positiiviset näytteet todettiin positiiviksi varmistusmenetelmillä. Virhepositiivisia ei todettu.

Virhenegatiivisuus : Laskettiin ympärikohtaisesti prosentiosuutena todellisten positiivisten tulosten lukumäärästä [30] kaavalla 2.

$$FN\% = \frac{FN}{(PP + FN)} \quad (2)$$

PP = validoitavan menetelmän antamien positiivisten tulosten lukumäärä

FN = validoitavan menetelmän antamien virhenegatiivisten tulosten lukumäärä.

Virhenegatiivisia tuloksia todettiin näytteissä, joihin oli lisätty bakteerimäärät 100 pmy ja 1000 pmy. Taulukossa 5 on virhenegatiivisuusprosentit kutakin ympäriä kohden.

Taulukko 5. Virhenegatiivisuus

Ympäri	positiivisten lukumäärä	Virhenegatiivisten lukumäärä	PP+FN	FN %
	PP	FN		
10 <sup>2</sup>	13	1	14	7,14
10 <sup>3</sup>	13	1	14	7,14
10 <sup>4</sup>	14	0	14	0,00

## 6.2 Laboratorioon tulleiden rutiininäytteiden sekä vertailututkimusnäytteiden analysointi

Liitteessä 5 on laboratorioon tulleiden 20 rutiininäytteen analysointitulokset. Näytteistä 9/20 todettiin tyypillisen näköisiä pesäkkeitä, jotka varmistettiin PBP'2-pikatestillä MRSA-positiivisiksi. Samoin tyypillisen näköisistä pesäkkeistä todettiin sekä *mecA*- että *nuc*-geenit.

Vertailututkimusnäytteiden MRSA-seulontatulokset ovat liitteessä 6. Näytteistä neljässä todettiin olevan MRSA-bakteeri, kolme näytettä oli negatiivisia ja yksi oli virhenegatiivinen. Virheelliseen negatiiviseen tulokseen saattaa vaikuttaa se, että referenssinäytteissä bakteeriympäristö oli siirrostettu suoraan kuljetuselatusaineputken elatusaineeseen, eikä näytetikkuihin. Myös vertailututkimusnäytteiden kuljetus voi vaikuttaa tulokseen.

## 7 Päätelmät

Tämä työ tehtiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran antibioottiresistenssilaboratoriolle. Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida metisilliiniresistentin *Staphylococcus aureus* (MRSA)-bakteerin seulontamenetelmä sian sierainlimanäytteille. Työssä validoitiin menetelmä, joka on ollut pitkään käytössä. Käytössä ei ollut vertailumenetelmää, johon olisi voinut verrata validoitavan menetelmän tuloksia. Tulosten perusteella voidaan todeta, että menetelmällä pystyttiin toteamaan MRSA-bakteeri mikrobiviljelmällä siirrostetuista näytteistä ja vertailututkimusnäytteistä. Myöskään virhepositiivisia näytteitä ei todettu. Tutkimuksessa mukana oli myös nollanäytteet. Siansierainlimanäytteissä ei ollut MRSA-bakteeria ennen siirrostamista.

Validoitavan menetelmän toteamisrajaksi saatiin validointiolosuhteissa  $10^4$  pmy. Pienempi määrä MRSA-bakteeria todettiin myös usein, mutta virhenegatiiviset tulokset ovat mahdollisia. Validoitavan menetelmän rinnakkaismääritykset olivat samankaltaiset, joten menetelmän toistettavuus oli hyvä. Kahden eri henkilön suorittamien testitulosten luennan yhteensopivuudella testattiin uusittavuutta. Tulokset eivät poikenneet toisistaan.

Vertailututkimusnäytteiden MRSA-määrät olivat korkeampia kuin validoinnissa käytetyt määrät ( $10^5$  pmy ja  $10^6$  pmy.). Yksi näyte, jossa MRSA-ympäristö oli  $10^6$  pmy, todet-

tiin virhenegatiiviseksi. Vertailunäytteiden käsittely ja elatusaine kuitenkin poikkesivat validoinnissa käytetyistä, joten ne saattavat vaikuttaa tulokseen.

Menetelmällä pystyttiin toteamaan myös laboratorioon tulleista rutiininäytteistä MRSA-bakteeri selektiivisellä MRSA-maljalla. Maljalla olevat tyypilliset pesäkkeet olivat sekä PBP'2 -testissä positiivisia että *mecA*-geenin suhteen positiivisia PCR:ssä.

Tulosten perusteella voidaan sanoa, että menetelmä soveltuu MRSA-bakteerin toteamiseen sian sierainlimanäytteistä.

## Viitteet

- 1 Bauman, R.W. 2004. Microbiology. New York. Pearson Benjamin Cummings.
- 2 *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease Todars Online textbook of bacteriology. Verkkodokumentti. <<http://textbookofbacteriology.net/staph.html>>. Luettu 14.9.2012.
- 3 Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2013. MRSA (Metisiliiniresistentti *Staphylococcus aureus*). Verkkodokumentti. <[http://www.thl.fi/fi\\_FI/web/infektiotaudit-fi/mrsa](http://www.thl.fi/fi_FI/web/infektiotaudit-fi/mrsa)>. Luettu 14.8.2013.
- 4 Lindsay, J. A. 2008. Staphylococcus molecular genetics. Caister Academic Press. 289 s.
- 5 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), overview. WebMd. Viimeksi päivitetty 14.3. 2011. Verkkodokumentti.<<http://www.webmd.com/a-to-z-guides/methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-mrsa-overview>>. Luettu 12.8.2013.
- 6 Welcome to the International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) server. Verkkodokumentti <[http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_ClassificationEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_ClassificationEN.html)>. Luettu 10.9.2013.
- 7 Detection of *mecC*-Positive *Staphylococcus aureus* (CC130-MRSA-XI) in Diseased European Hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Sweden. Verkkodokumentti <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0066166>>. Luettu 19.9.2013.
- 8 Cambio Excellence in Molecular Biology. Clinical Diagnostics M.R.S.A. Verkkodokumentti <<http://www.cambio.co.uk/470/39/products/onarmrsa-screen/>>. Luettu 28.10.2013.
- 9 American Academy of Orthopaedic Surgeons 2008. The silent epidemic: CA-MRSA and HA-MRSA. Verkkodokumentti. <<http://www.aaos.org/news/aaosnow/may08/research1.asp>>. Luettu 14.8.2013.
- 10 Nykäsenoja, S. & Salmenlinna, S. 2010. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) spa type t127 in pigs and humans in Finland. Helsinki.Evira.
- 11 Tiedebasaari 2013. Antibiooteille vastustuskykyinen MRSA-bakteeri voi levitä suurten karjatilojen läheisyydessä asuviin ihmisiin ilman suoria eläinkontakteja. Verkkodokumentti. <<http://tiedebasaari.wordpress.com/2013/02/21/antibiooteille->

- [vastustuskykyinen-mrsa-bakteeri-voi-levita-suurten-kariatilojen-laheisyydessa-asuuihin-ihmisiin-ilman-suoria-elainkontakteja/](#)>. Luettu 14.8.2013.
- 12 Nuotio, L. ym. 2011. Finnish Veterinary Antimicrobial Resistance. Monitoring and Consumption of Antimicrobial Agents. Finres-Vet 2007-2009. Evira publications 1/2011. Verkkodokumentti.  
<<http://www.evira.fi/portal/fi/evira/julkaisut/?a=view&productId=238&lang=en>>. Luettu 19.8.2013.
  - 13 Myllyniemi, A-L. 2013. Tutkimusseminaari Metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus*. Verkkodokumentti.  
<<http://www.evira.fi/portal/fi/tietoa+evirasta/ajankohtaista/arkisto/?bid=1883>>, Luettu 19.8.2013.
  - 14 Comission Decision 2007. Concerning a financial contribution from the Community towards a survey on the prevalence of *Salmonella* spp and Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in herd breeding pigs to be carried out in the member states (2008/55/EC). Verkkodokumentti. < <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:014:0010:0025:En:PDF>> Luettu 6.12.2012.
  - 15 Price, L.B. 2012. *Staphylococcus aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock. *mBio* 3 (1): 1 - 6.
  - 16 Golding, G. R. ym. 2010. Livestock-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 in Humans, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2010 April; 16(4): 587–594. Verkkodokumentti < <http://europepmc.org/articles/PMC3321955> >, Luettu 30.10.2013.
  - 17 Maa- ja metsätalousministeriön asetus nro 2/EEO/2009.
  - 18 Maa- ja metsätalousministeriön asetus nro 3 /EEO/2011.
  - 19 Metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus*. Suositus tartunnan torjunnasta ja ehkäisystä eläimillä. Evira Julkaisuja 9/2010. Verkkodokumentti.  
<<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/17425/Metisilliiniresistentti.pdf?sequence=1>>. Luettu 10.3. 2012.
  - 20 MRSA-kantojen seulonta rikastusten ja selektiivisen kiinteän kasvatusalustan avulla. Menetelmäohje 3563/3 Evira. Verkkodokumentti.  
<[http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet\\_ ja\\_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike\\_ ja\\_rehututkimus/mibi/evira\\_3563\\_v3\\_mrsa\\_kantojen.pdf](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ ja_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ ja_rehututkimus/mibi/evira_3563_v3_mrsa_kantojen.pdf)>. Luettu 1.9.2013.



- 21 Graveland, H. ym. 2011. Persistence of Livestock Associated MRSA CC398 in Humans Is Dependent on Intensity of Animal Contact. PLoS ONE 6(2). Verkkodokumentti. <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0016830>>. Luettu 1.9.2013.
- 22 Khanna, T. ym. 2008. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. Veterinary Microbiology 128: 298 - 303.
- 23 Krause, M. & Cavaco, L. 2009. Laboratory Protocols MRSA Training Course Isolation of MRSA from dust samples. DTU Food National Food Institute. Verkkodokumentti < [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)>. Luettu 20.8.2013.
- 24 de Neeling, A.J. ym. 2007. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. Verkkodokumentti <<http://www.sciencedirect.com.ezproxy.metropolia.fi/science/article/pii/S037811350700065X?np=y>>. Luettu 20.8.2013.
- 25 Graveland , H. ym. 2009. Evaluation of isolation procedures and chromogenic agar media for detection of MRSA in nasal swabs from pigs and weal calves .Accepted Manuscript. Veterinary Microbiology.
- 26 Brilliance TM Chromogenic TM Agars. Thermo Scientific. Oxoid Microbiology Products. Verkkodokumentti. <<http://www.oxoid.com/brilliance/brilliance-chromogenic-agars.asp>>. Luettu 2.9.2013
- 27 Selective and Differential Chromogenic Medium for the Qualitative Detection of Nasal Colonization of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Bio-Rad 63747 Part No 25285B. Verkkodokumentti <<http://www3.biorad.com/Diagnostics/pdfs/-cmd/MRSASelect%20Product%2Insert%20June%202008.pdf>>, luettu 1.9.2013.
- 28 Screening of multidrug resistant organisms. Selection of Publications Chrom ID™ MRSA , Chrom ID™ ESBL, Chrom ID™ VRE. Verkkodokumentti <[http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/Selection\\_of\\_PUBLICATION\\_2010.pdf](http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/Selection_of_PUBLICATION_2010.pdf)>. Luettu 2.9.2013.
- 29 Battisti, A. ym. 2010. Heterogeneity among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from italian pig finishing holdings. Veterinary Microbiology 142: 361–366
- 30 Mikrobiologisten menetelmien validointihje. Elintarvikevirasto 13/1997
- 31 Adamson, R. 2010. Mikrobiologisten menetelmien Validointi. .Mikrobiologisten menetelmien validointi kurssi 30.09.2010. AEL.

- 32 Fortelius, C.. 2001. Analyysimenetelmän virhearviointi ja validointi. Ympäristö-analytiikankurssi, Evtek. Verkkodokumentti. <<http://users.evtek.fi/~carolaf/projiseur/Validointi/sld018.htm>>., Luettu 1.9.2013.
- 33 Hallanvuo, S. 2013. Validointi kvalitatiivisessa mikrobiologisessa analytiikassa – Käytännön esimerkki PCR menetelmän kehittamisestä ja validoinnista – *Yersinia* . Analyysimenetelmän validointi- kurssi. Metropolia ammattikorkeakoulu
- 34 Krause, M.& Cavaco, L.2009. Isolation of MRSA from dust samples. Laboratory protocols. MRSA Training Course. 2<sup>th</sup> edition. Verkkodokumentti. <[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)>. Luettu 1.9.2013.
- 35 Mikrobiologisten tulosten laskeminen . Toimintaohje LAB 703/3. Verkkodokumentti. <[http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet\\_ja\\_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike\\_ja\\_rehututkimus/mibi/lab\\_703\\_v3\\_mikrobiologisten\\_tulosten\\_laskeminen.pdf](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ja_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ja_rehututkimus/mibi/lab_703_v3_mikrobiologisten_tulosten_laskeminen.pdf)> . Luettu 20.8.2013.
- 36 MRSA Select Agar. Bio-Rad. Verkkodokumentti < <http://www.bio-rad.com/en-cy/product/mrsaselect-medium>>, Luettu 15.11.2013.







## Liite 2

0-näytteiden tulokset, jotka ovat tulleet samaan aikaan kuin tikut liemiviljelmällä ympättäväksi

Näyte	Näyte tullut	Tekijä	Tulos
	pvm		
1a	5.10.2012	Sso	0
1b	5.10.2012	Sso	0
2a	9.10.2012	Sso	0
2b	9.10.2012	Sso	0
3a	4.1.2013	Sso	0
3b	4.1.2013	Sso	0
3c	4.1.2013	Sso	0
4a	8.2.2013	Sso	0
5a	27.2.2013	Sso	0
5b	27.2.2013	Sso	0

## Liite 3

Toistettavuus: positiiviset näytteet

Tikkunro	Laskennallinen ympymäärä	Tikussa oleva todellinen ympymäärä	Tikussa oleva bakteerimäärä	Lab 1	Tulos	Lab 2	Tulos
HMIK	pmy/ml	pmy/ml	pmy		pos(+)/neg(-)		pos(+)/neg(-)
HMIK-1833	10 <sup>2</sup>	0,8*10 <sup>2</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-2315	10 <sup>2</sup>	0,8*10 <sup>2</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-2318	10 <sup>2</sup>	0,8*10 <sup>2</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-2321	10 <sup>2</sup>	0,8*10 <sup>2</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-2324	10 <sup>2</sup>	0,8*10 <sup>2</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-1834	10 <sup>3</sup>	0,8*10 <sup>3</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-2316	10 <sup>3</sup>	0,8*10 <sup>3</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-2319	10 <sup>3</sup>	0,8*10 <sup>3</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-2322	10 <sup>3</sup>	0,8*10 <sup>3</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-2325	10 <sup>3</sup>	0,8*10 <sup>3</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-1835	10 <sup>4</sup>	0,8*10 <sup>4</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-2317	10 <sup>4</sup>	0,8*10 <sup>4</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-2320	10 <sup>4</sup>	0,8*10 <sup>4</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-2323	10 <sup>4</sup>	0,8*10 <sup>4</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+
HMIK-2326	10 <sup>4</sup>	0,8*10 <sup>4</sup>	80	hlö 1	+	hlö2	+

## Liite 3

Toistettavuus: negatiiviset näytteet

Tikkunro	Tikussa oleva bakteerimäärä	Lab 1	Tulos	Lab 2	Tulos
HMIK	pmy		pos(+)/neg(-)		pos(+)/neg(-)
HMIK 3193	0	hlö 1	-	hlö 2	-
HMIK 3194	0	hlö 1	-	hlö 2	-
HMIK 3195	0	hlö 1	-	hlö2	-
HMIK3196	0	hlö 1	-	hlö 2	-
HMIK3197	0	hlö 1	-	hlö 2	-
HMIK 3198	0	hlö 1	-	hlö 2	-
HMIK 3199	0	hlö 1	-	hlö 2	-
HMIK 3200	0	hlö 1	-	hlö2	-



## Liite 4

Uusittavuus: positiiviset ja negatiiviset näytteet

Tikkunro	Näyte tullut		Laskennallinen ymppimäärä	Todellinen ymppimäärä	Tekijä	Tulos 1	Tulos 2	Tulos 3	Tulos 4	Tekijä	Tulos 1	Tulos 2	Tulos 3	Tulos 4
HMIK	pvm		pmy	pmy		pos(+)/neg(-)	pos(+)/neg(-)	pos(+)/neg(-)	pos(+)/neg(-)		pos(+)/neg(-)	pos(+)/neg(-)	pos(+)/neg(-)	pos(+)/neg(-)
HMIK-1833	27.2.2013	Positiiviset näytteet	10 <sup>2</sup>	0,8*10 <sup>2</sup>	hlö1	+	+	+	+	hlö2	+	+	+	+
HMIK-1834	27.2.2013		10 <sup>3</sup>	0,8*10 <sup>3</sup>	hlö1	+	+	+	+	hlö2	+	+	+	+
HMIK-1835	27.2.2013		10 <sup>4</sup>	0,8*10 <sup>4</sup>	hlö1	+	+	+	+	hlö2	+	+	+	+
HMIK-3194	3.5.2013	Negatiiviset näytteet	0	0	hlö1	-	-	-	-	hlö2	-	-	-	-
HMIK-3211	3.5.2013		0	0	hlö1	-	-	-	-	hlö2	-	-	-	-
HMIK-3212	3.5.2013		0	0	hlö1	-	-	-	-	hlö2	-	-	-	-

## Liite 5

## Rutiininäytteiden tulokset

	MH	kasvu MRSA-	PBP'2 testi tulos	mec	nuc
		malialla	pos (+)/neg(-)	pos (+)/neg(-)	pos (+)/neg(-)
1	MH 837	-			
2	MH838	-			
3	MH 839	+	+	+	+
4	MH 840	+	+	+	+
5	MH 841	+	+	+	+
6	MH 842	+	+	+	+
7	MH 843	+	+	+	+
8	MH 844	+	+	+	+
9	MH 845	-			
10	MH 846	+	+	+	+
11	MH 847	-			
12	MH 848	-			
13	MH 849	-			
14	MH 850	+	+	+	+
15	MH 851	-			
16	MH 852	-			
17	MH 853	-			
18	MH 854	-			
19	MH 855	+	+	+	+
20	MH 856	-			

## Liite 6

## Vertailunäytteiden tulokset

Näyte	Eristystulos	PBP2	<i>nuc</i>	<i>mecA</i>	<i>mecC</i> *	TULOS	Huom.	EURL-odotettu tulos	
EQAS MRSA 4.1	ei todettu	-	-	-	-	neg	MRSA-ymppi 10 <sup>6</sup>	MRSA (t075)	virheneg.
EQAS MRSA 4.2	todettiin	pos	pos	pos	-	<b>MRSA</b>	MRSA-ymppi 10 <sup>6</sup>	MRSA (t034)	ok
EQAS MRSA 4.3	todettiin	neg	pos	neg	pos	<b>MRSA</b>	MRSA-ymppi 10 <sup>6</sup>	MRSA (t843)	ok
EQAS MRSA 4.4	todettiin	pos	pos	pos	-	<b>MRSA</b>	MRSA-ymppi 10 <sup>6</sup>	MRSA (t1793)	ok
EQAS MRSA 4.5	ei todettu	-	-	-	-	neg		neg	ok
EQAS MRSA 4.6	ei todettu	-	-	-	-	neg		neg	ok
EQAS MRSA 4.7	ei todettu	-	-	-	-	neg		neg	ok
EQAS MRSA 4.8	todettiin	pos	pos	pos	-	<b>MRSA</b>	MRSA-ymppi 10 <sup>5</sup>	MRSA (034)	ok

\* Toinen laborantti teki PCR:n, jossa todettiin *mecC*:n olemassa olo.

