



Årsrapport 2007

Nasjonalt
referanselaboratorium for
MRSA

Oppsummering

Referanselaboratoriet har etablert rutinemessig spa-typing på alle isolater tilsendt i 2007 i tillegg til pulsfelt gelelektroforese (PFGE). Undersøkelse i forhold til Panton Valentine Leukocidin (PVL) ble innført i rutinen mot slutten av 2007. Ellers har laboratoriet hatt fokus på logistikk og interne rutiner. Avd. for Medisinsk Mikrobiologi ved St. Olavs Hospital har gjennom hele 2007 avgitt ressurser til funksjonen for å kunne håndtere alle prioriterte oppgaver.

I løpet av 2007 har referanselaboratoriet mottatt isolater fra alle helseregioner, men mangler fortsatt endelig avtale om oversending av nye MRSA-isolater med enkelte medisinsk mikrobiologiske laboratorier. Referanselaboratoriets årsoversikt er følgelig mangelfull da vi fremdeles mangler MRSA-isolater fra to vesentlige aktører i Helse Øst. Samarbeidet mellom referanselaboratoriet og innsenderlaboratoriene har fungert godt. Laboratoriet jobber kontinuerlig med å få de nasjonale data så komplette som mulig. Samarbeidet mellom laboratoriet og Folkehelseinstituttet (FHI) har også fungert bra gjennom kvartalsvis utveksling av data. Dette vil på sikt kunne gi oss mer utfyllende informasjon vedrørende epidemiologi, genotypi og klinikk. Utveksling av data mellom de to institusjonene har gjort den totale oversikten over nyopplagte MRSA, mer komplett.

Resultater

Referanselaboratoriet fikk i 2007 totalt tilsendt 434 MRSA-isolater (unike pasienter), hvilket tilsvarer 73 % av landets samlede innmelding av MRSA-tilfeller. (Totalt meldt i Norge 2007 til Fhi var 593 tilfeller, hvorav 343 tilfeller meldt som infeksjon og 250 meldt som MRSA-bærertilstand).

Alle MRSA-isolatene er analysert med PFGE. Den initiale karakteriseringen er gjort på basis av gruppetilhørighet ut fra PFGE (dvs klynger / Clusters av isolater med samme PFGE-mønster (identisk eller innen 4-5 båndforskjeller iht internasjonalt aksepterte tolkningsregler ad modum Tenover). Til de ulike clusters vil man kunne relatere kjente epidemiske MRSA-stammer mht sekvenstyper og klonale komplekser (CC), samt funn av andre sekvenstyper blant norske isolater. Vurdering av CC er i 2007 gjort for alle isolater. 83% (361 isolater) forekom i de fem hyppigste clustre. Den geografiske fordeling er vist i tabell 1 og 2. Fordeling av alle isolater er vist i figur 8. Alle isolatene (n=434) i 2007 er karakterisert ved hjelp av spa-typing. Totalt 107 ulike spa-typer er funnet. 57 spa-typer er funnet kun hos enkeltpersoner. Den geografiske fordeling av de 6

hyppigste spa-typene er vist i tabell 3 og 4.

Fordeling av alle isolater er vist i figur 9.

Geografisk spredning basert på pasientens hjemkommune er vist i fig. 10 – 15. Disse spa-typene omfatter 42 % (182 isolater) av alle undersøkte MRSA-isolater.

Samarbeidet med FHI har resultert i bedre innsikt i epidemiologi og klinikk. Oversikt for dette for 2007 kan sees i tabell 5.

Mot slutten av 2007 ble rutine mht. PVL etablert.

Rutinemessig undersøkelse av abscesser/sår ble innført fra september 07. Tall vedrørende PVL blir presentert i 2008.

Aktiviteter

Foredrag:

November 2007, Regional samling for smittevernpersonell: "MRSA-referanselaboratoriet St. Olavs Hospital – metoder og regionale data (Msc i molekylærmedisin Janne Fossum).

Studier:

Bacheloroppgave: Sammenligningsstudium av metoder for påvisning av MRSA (Christer Andersen og Anne Britt Folden).

Bacheloroppgave: Sammenligning av to pulsfelt gel elektroforese maskiner (Ann-Helen Leknes og Anne Moslet).

Videreføring av EARSS-studien "Spa-typing – Identifying the dominant *Staphylococcus aureus* strains causing invasive infections in the European region: A joint EARSS/SeqNet.org initiative". Deltakelse i "Nordic study on MRSA detected outside hospitals".

Deltakelse i RAF-M prosjekt 2007 "Screening for nedsatt glykopeptidfølsomhet hos *Staphylococcus aureus*".

Annet:

Deltakelse i kvalitetskontroll i typing av MRSA: "Quality Control for Molecular Diagnostics, "QCMD 2007 Methicillin Resistant *S. aureus* Typing EQA Pilot Study".

Hospitering i 8 mnd. som fagansvarlig laborant ved Stafykoklab, Antibiotikaresistens & Sygehushygiejne, Mikrobiologi og Diagnostik, Statens Serum Institut, København, Danmark (Fagansvarlig bioingeniør Lillian Marstein).

Mars 2007, Bilthoven, Nederland: Deltakelse på 2ndEARSS/SeqNet.org Workshop.

April 2007, Rhodos, Hellas: Deltakelse på SeqNet.org Meeting.

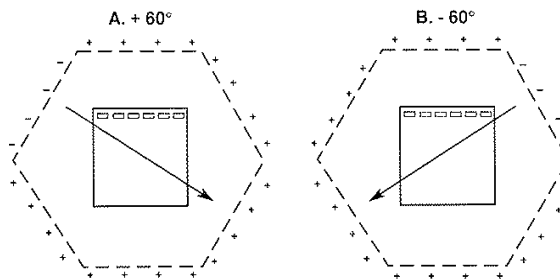
Mai 2007, RAF-M. Gøteborg.

Juni 2007, NFIM/NFMM, Vårnøte i Oslo.

Metodebeskrivelser

PFGE – Pulsfelt gelelektroforese

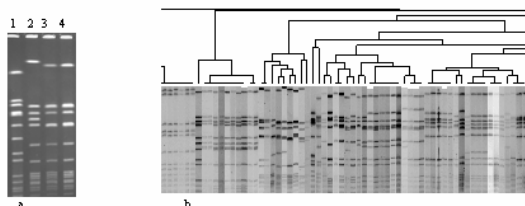
PFGE er fremdeles metoden som er ansett som gullstandard for molekylær epidemiologisk karakterisering av utbrudd over en kort tidsperiode og i begrensede geografiske områder. Diskrimineringsstyrken er utmerket, men metoden er arbeidskrevende, tar lang tid og er avhengig av bioingeniørens erfaring. Metoden er basert på tilfeldig distribusjon av restriksjons endonuklease kutteseter i genomet. Ved bruk av restriksjonsenzym kuttes genomet i fragmenter med forskjellig lengde. For *S. aureus* er enzymet SmaI godt egnet, da det gir et mønster av 8 – 20 fragmenter med størrelser fra 8 til 800 kb når det blir analysert av pulsfelt gelelektroforese (Figur 1).



Figur 1. Separasjon av store restriksjonsfragmenter krever bruk av pulsfelt av elektrisk strøm fra 24 elektroder plassert i en heksagonal kontur som veksler retning over 120° fast vinkel og en forlenget elektroforesetid. Figuren er hentet fra CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System, Instruction Manual and Application Guide.

Stammene differensieres av antall og størrelse på fragmenter som et resultat av forskjellige genetiske hendelser som endrer endonuklease restriksjonssete. Enkle punktmutasjoner, insesjoner, delesjoner, inversjoner eller transposisjoner kan føre til tap eller vinning av et nytt restriksjonssete, som fører til 3 fragmenters forskjell mellom stammene.

Tolkningen av fragmentmønster mellom stammene kan gjøres manuelt, basert på objektive kriterier (Figur 2a), eller gjøres med standardisert dataanalyse (Figur 2b).



Figur 2. Bilde av PFGE som viser fragmentmønster av 3 forskjellige MRSA stammer (brønn 2-4) med standard i brønn 1 (a), og dendrogram som viser genotypisk innbyrdes slektskap mellom valgte MRSA stammer v.h.j.a. databasert klusteranalyse (b).

Stammer kan klassifiseres som like, nært beslektet, mulig beslektet eller ulike. Klassifiseringen "nært beslektet" brukes om 1 - 3 fragments forskjell mellom stammene, som mest sannsynlig skyldes én genetisk hendelse. "Mulig beslektet" brukes om 4 - 6 fragments forskjell, mens stammer som har mer enn 7 fragments forskjell blir regnet som ulike. Kriteriene er nyttig i tolkningen av fragmentforskjeller, men bør brukes med forsiktighet, og bare når man sammenligner epidemiologisk beslektede bakteriestammer.

Spa-typing

Spa-typing er basert på analyse av deler av ett gen som ligger i x-regionen på *Staphylococcus* protein A genet (*spa*). 3'-enden av genet har en repetisjonsregion som består av et variabelt antall av vanligvis 24 bp repetisjoner med interne nukleotidforskjeller i hver repetisjon. Denne x-regionen av *spa* utsettes for spontane mutasjoner, tap av repetisjoner, og opptak av repetisjoner.

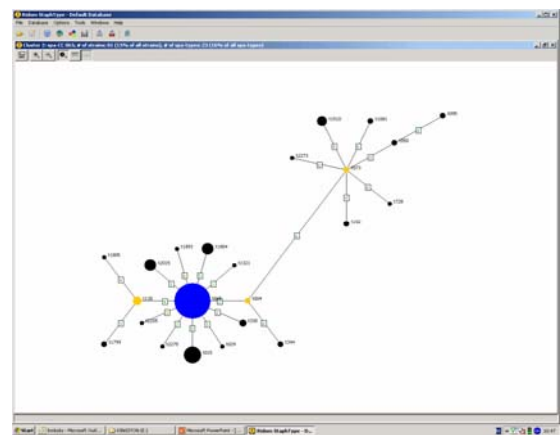
Den sekvensbaserte metoden av spa-typing tildeler repetisjonen en numerisk kode som er unik for hver nukleotidkombinasjon, og spa-typen blir bestemt av rekkefølgen av spesifikke repetisjoner. Spasekvensen blir automatisk tildelt en spa-type ved synkronisering med RIDOM StaphType database 4. Sekvensdata er levert av SeqNet.org.

Eksempel:

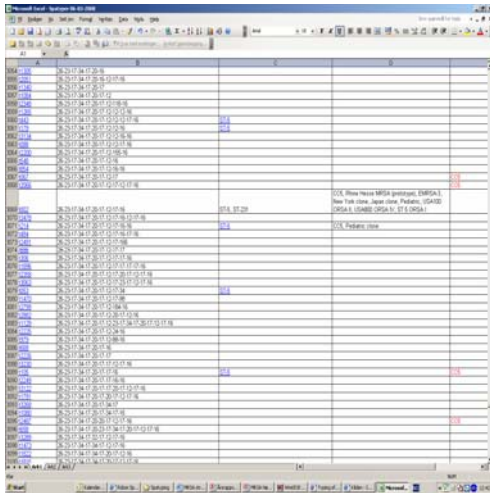
Spa-type t002

Numeriske koder på repetisjoner:
26-23-17-34-17-20-17-12-17-16

AAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGT
(Nukleotidrekkefølge for repetisjon 17)



Figur 3. BURP analyse



Figur 4. Excel analyse

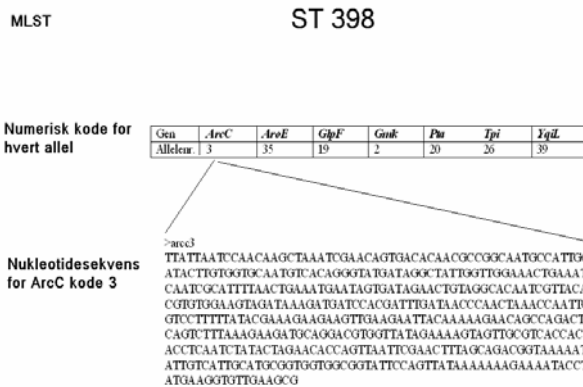
Slektskapet mellom forskjellige spa-typer kan analyseres bl.a. ved hjelp av BURP analyser (Figur 3) eller regneark der man sorterer på repetisjoner (Figur 4). Spa-typer og repetisjoner kan lastes ned via nettsidene til RIDOM, www.ridom.de/spaserver/

MLST – Multi Locus Sequence Typing

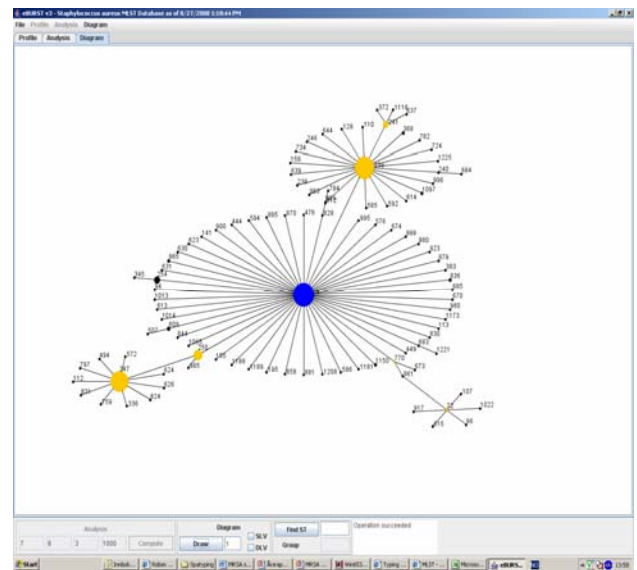
MLST er basert på sammenligning av DNA sekvenser fra konserverte “husholdnings” gener som er karakterisert med lavt seleksjonspress. For *S. aureus* analyseres 7 genfragmenter der hver av dem er ca 450- 500 bp. Den spesifikke DNA sekvens for hvert gen i en stamme blir gitt et allelnummer ved innsending til en universal database (<http://saureus.mlst.net/>).

Sekvenstypen av en *S. aureus* stamme er basert på kombinasjonen av allelnummer på hver av de 7 genene.

Eksempel:



Ved hjelp av eBURSTanalyse kan forskjellige stammer bli gruppert i klonale kompleks (CC) av nært beslektede stammer som har minst fem eller seks alleler felles. Opprinnelsen for hver CC er den genotypen med flest singel eller dobbel locus varianter (Figur 5). MLST skiller bare de store klonale slektene og dens diskriminerende evne er ikke god nok for separasjon av stammer i en klonal gruppe når hensikten er å undersøke lokale utbrudd. Likevel er metoden nyttig i beskrivelsen av den evolusjonelle historien til MRSA, men er arbeidskrevende og kostbar.



Figur 5. eBURST analyse

Referanser

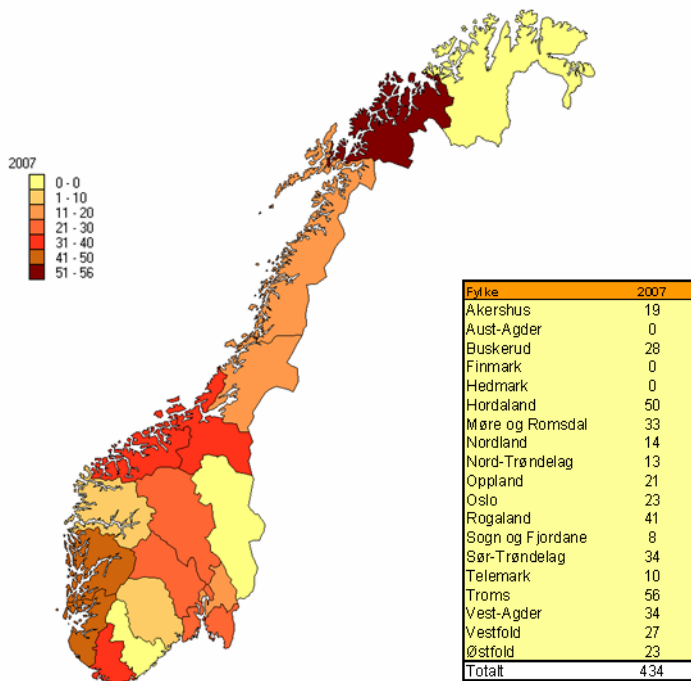
Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol Sep*;33(9):2233-9.

Melles DC, van Leeuwen WB, Snijders SV, Horst-Kreft D, Peeters JK, Verbrugh HA, van Belkum A. (2007) Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods May*;69(2):371-5. Epub 2007 Feb

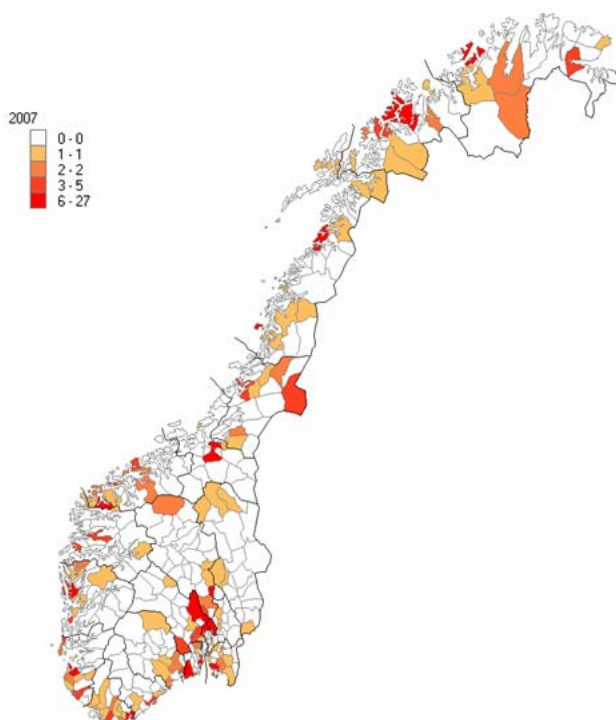
Harmsen D., Claus H., Witte W., Rothgänger J., Claus H., Turnwald D., & Vogel U. (2003) Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting using a novel software for spa-repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol* 41:5442-8

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7687-7692.

Oversikt MRSA 2007

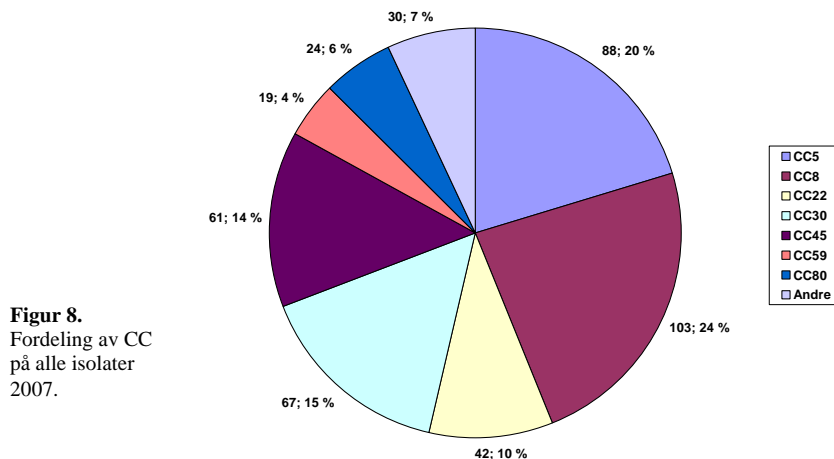


Figur 6.
Fylkesvis oversikt over antall isolater pr. innsenderlaboratorium.



Figur 7.
Innsendte isolater fordelt på pasientens hjemkommune.

Hyppigst forekommende klonale komplekser (CC) 2007



Tabell 1: Hyppigst forekommende MLST klonale komplekser (CC) bedømt ved PFGE-clustre og spa-typing fordelt på fylker

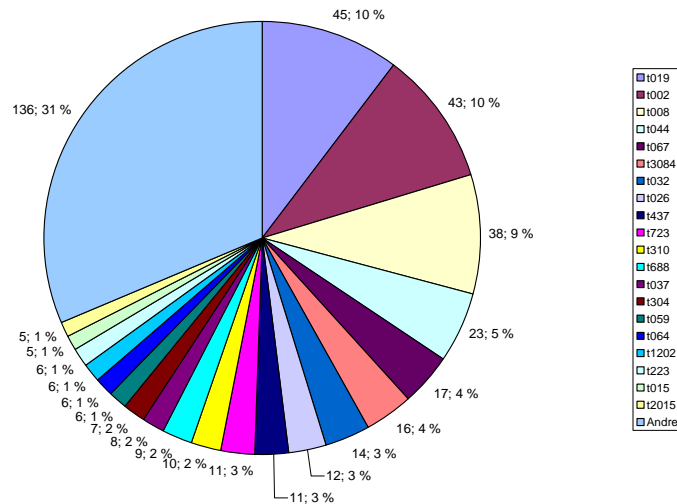
Antall innsendte isolater	Fylke	CC 5	CC 8	CC 22	CC 30	CC 45
23	Østfold	4	8	0	5	3
19	Akershus	4	5	2	3	2
0	Hedemark (via LH)	0	0	0	0	0
21	Oppland	7	4	1	3	2
23	Oslo	7	10	0	2	1
28	Buskerud	14	1	0	4	2
27	Vestfold	4	3	2	11	4
10	Telemark	2	4	0	0	1
0	Aust-Agder (via VA)	0	0	0	0	0
34	Vest-Agder	1	14	4	7	3
41	Rogaland	8	13	2	7	5
50	Hordaland	12	12	6	4	5
8	Sogn og Fjordane	0	0	1	1	5
33	Møre og Romsdal	11	8	1	5	2
34	Sør-Trøndelag	3	14	5	1	2
13	Nord-Trøndelag	1	1	3	2	6
14	Nordland	1	0	9	1	0
56	Troms	9	6	6	11	18
0	Finmark (via UNN)	0	0	0	0	0
434	TOTALT	88	103	42	67	61

Tabell 2: Hyppigst forekommende MLST klonale komplekser (CC) bedømt ved PFGE-clustre og spa-typing fordelt på helseregioner

Antall MRSA	HELSEREGION	CC 5	CC 8	CC 22	CC 30	CC 45
70	Nord-Norge	10	6	15	12	18
80	Midt-Norge	15	23	9	8	10
99	Vest-Norge	20	25	9	12	15
99	Sør-Norge	21	22	6	22	10
86	Øst-Norge	22	27	3	13	8
434	TOTALT	88	103	42	67	61

Hyppigst forekommende spa-typer 2007

Figur 9.
Fordeling av spa-typer på alle isolater 2007.



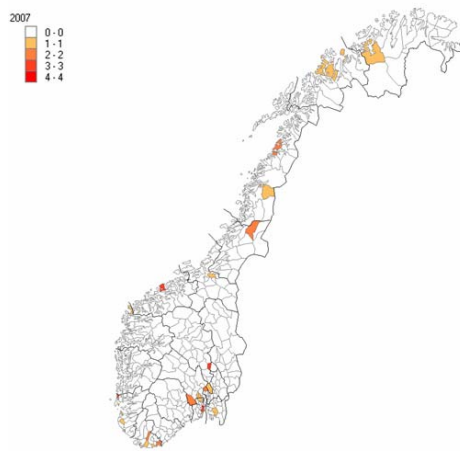
Tabell 3: Hyppigst forekommende spa-typer fordelt på fylker

Antall innsendte isolater	Fylke	t019	t002	t008	t044	t067	t3084
23	Østfold	1	2	1	0	2	0
19	Akershus	1	1	1	2	1	0
0	Hedemark (via LH)	0	0	0	0	0	0
21	Oppland	3	3	2	1	2	0
23	Oslo	2	2	3	0	0	0
28	Buskerud	4	9	0	2	1	0
27	Vestfold	10	4	1	2	0	0
10	Telemark	0	2	3	0	0	0
0	Aust-Agder (via VA)	0	0	0	0	0	0
34	Vest-Agder	6	0	6	3	0	0
41	Rogaland	5	5	6	2	2	0
50	Hordaland	1	3	6	3	1	0
8	Sogn og Fjordane	1	0	0	0	0	0
33	Møre og Romsdal	3	3	2	1	8	0
34	Sør-Trøndelag	1	0	4	4	0	0
13	Nord-Trøndelag	2	1	0	0	0	0
14	Nordland	1	1	0	1	0	0
56	Troms	4	7	3	2	0	16
0	Finnmark (via UNN)	0	0	0	0	0	0
434	TOTALT	45	43	38	23	17	16

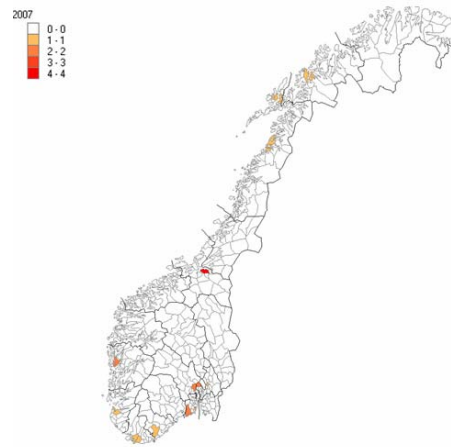
Tabell 4: Hyppigst forekommende spa-typer fordelt på helseregioner

Antall MRSA	HELSEREGION	t019	t002	t008	t044	t067	t3084
70	Nord-Norge	5	8	3	3	0	16
80	Midt-Norge	6	4	6	5	8	0
99	Vest-Norge	7	8	13	5	3	0
99	Sør-Norge	20	15	10	7	1	0
86	Øst-Norge	7	8	7	3	5	0
434	TOTALT	45	43	38	23	17	16

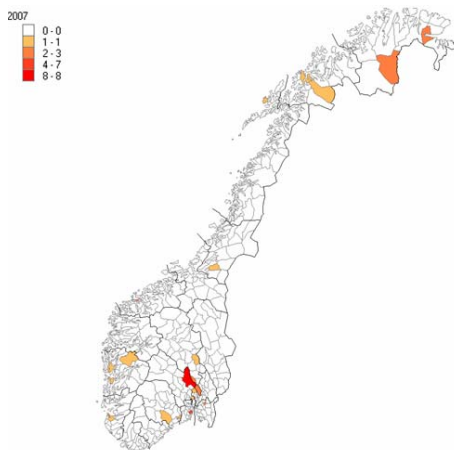
Hyppigst forekommende spa-typer fordelt på pasientens hjemkommune



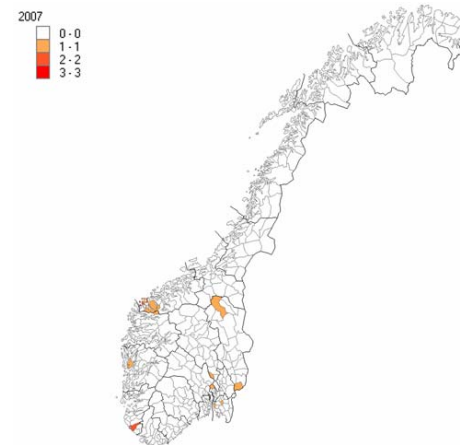
Figur 10.
Spa-type t019. 45 isolater fordelt på pasientens hjemkommune



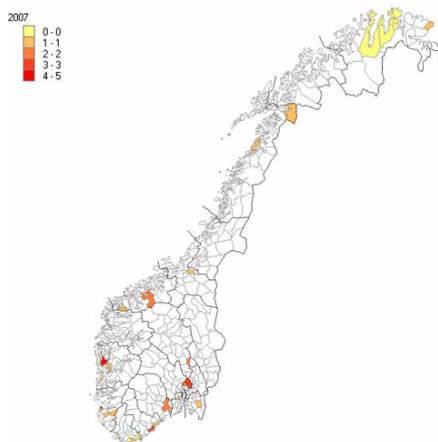
Figur 13.
Spa-type t044. 23 isolater fordelt på pasientens hjemkommune



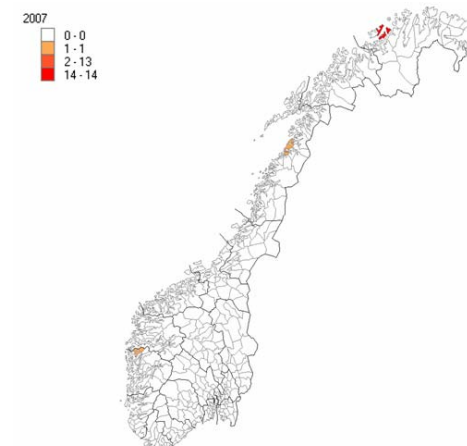
Figur 11.
Spa-type t002. 43 isolater fordelt på pasientens hjemkommune



Figur 14.
Spa-type t067. 17 isolater fordelt på pasientens hjemkommune



Figur 12.
Spa-type t008. 38 isolater fordelt på pasientens hjemkommune



Figur 15.
Spa-type t3084. 16 isolater fordelt på pasientens hjemkommune

Klinikk i forhold til hyppigst forekommende spa-typer 2007

Tabell 5:

Hyppigst forekommende spa-typer i forhold til klinikk 2007 (n=434)

Klinisk diagnose	Totalt antall	Spa-typer					
		t019	t002	t008	t044	t067	t3084
Hud- og sårinfeksjoner	194	36	21	26	17	1	1
Luftveisinfeksjoner	15	1	1	1	1	0	0
Postoperative sårinfeksjoner	16	0	3	0	1	2	0
Ledd- og benvevsinfeksjoner	6	0	0	1	0	0	0
Urinveisinfeksjoner	9	0	1	0	0	0	0
Blodbaneinfeksjoner	4	0	0	0	0	1	0
Andre	16	0	2	0	1	0	1
Sum infeksjoner	260	37	28	28	20	4	2
Ukjente	36	3	4	4	2	1	0
Bærere	138	5	11	6	1	12	14
Totalt	434	45	43	38	23	17	16