

Ida Lysebo og Cecilie Biltvedt

Prøvetaking og dyrkningsmetodikk for miljøprøver i vask

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Marthe Lind Kroknes og Nicola Isabelle Kols

Mai 2024

Ida Lysebo og Cecilie Biltvedt

Prøvetaking og dyrkningsmetodikk for miljøprøver i vask

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Marthe Lind Kroknes og Nicola Isabelle Kols
Mai 2024

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



FORORD

Denne bacheloroppgaven er gitt av Seksjon for smittevern ved St. Olavs hospital i forbindelse med avslutningen av bioingeniørutdanningen ved Norges- teknisk-naturvitenskapelige universitet i Trondheim. Praktisk laboratoriearbeid er gjennomført i lokalene til Institutt for bioingeniørfag og Avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs hospital.

En stor takk til prosess- og faglig veileder, spesialbioingeniør Marthe Lind Kroknes, for god veiledning gjennom bachelorperioden. Hun har veiledet med metodeutvikling, gjennomføring av praktisk laboratoriearbeid og i skriveprosessen. Vi vil også takke faglig veileder, seksjonsleder-overlege smittevern Nicola Isabelle Kols for god faglig veiledning og engasjement.

Vi ønsker også å takke Avdeling for medisinsk mikrobiologi for bruk av lokale og utstyr, samt tillaging av reagenser til vårt laboratoriearbeid. En takk til Avdelingene Nyfødt intensiv, Hovedintensiv, Kirurgisk tung overvåking, Sengepost for blodsykdommer og Sengepost for infeksjonssykdommer ved St. Olavs hospital for behjelpelighet ved prøvetakingsrunden. Til slutt vil vi takke Driftsservice ved St. Olavs hospital som stilte med rørlegger til prøvetakingsrunden.

Trondheim, 20. mai 2024

Ida Lysebo

Ida Lysebo

Cecilie Biltvedt

Cecilie Biltvedt

SAMMENDRAG

Bakgrunnen for prosjektet var å utarbeide en prøvetakingsmetodikk for miljøprøvetaking i vask med sikte på potensiell anvendelse under fremtidige utbrudd på sykehuset, ettersom det per dags dato ikke finnes en standardisert metode for denne type prøvetaking.

Håndvaskenheter og tilhørende rørsystem kan potensielt virke som reservoarer for mikroorganismer.

Ved tidligere miljøprøvetaking fra vasker på sykehuset har det blitt benyttet prøvetakingspensler og undersøkelse av vannprøver ved å filtrere vann i en filterpumpe og dyrke filteret. For å etablere en prøvetakingsmetode for miljøprøvetaking i vask ble vannprøver og penselprøver sammenlignet. Det ble tatt penselprøver og vannprøver i 15 vasker ved St. Olavs hospital. Miljøprøvene ble samlet inn fra 5 avdeling, 3 vasker på hver avdeling: vask fra skyllerom, pasientrom og pauserom for ansatte. Vannlåsen fra vaskene ble demontert, og vannet herfra ble overført til steril beholder. Prøvetakingspenselen ble ført rundt overgangen mellom porselen/metall, ned i sluket og i vannlåsen etter demontering. Miljøprøvene ble utsådd, og oppveksten ble identifisert med MALDI-TOF MS.

Resultatene fra penselprøvene og vannprøvene fra avdelingene ved St. Olavs hospital viste oppvekst av flere av de samme patogene bakteriene. Ved fremtidige utbrudd kan man sikre det mest pålitelige resultatet ved å benytte en kombinasjon av penselprøver og vannprøver ved miljøprøvetaking i vask. Det er hensiktsmessig å tilpasse metoden etter hvilken bakterie det er utbrudd av, ved bruk av selektive agarskåler, tilpasse dyrkningsforhold og tilpasse pore størrelsen på filteret til filterpumpen.

ABSTRACT

The background for the project was to develop a sampling method for environmental sampling in sinks for use in future outbreaks, as there currently is no standardized method. It is recognized that handwashing facilities and associated piping systems can serve as reservoirs for bacteria.

In previous environmental sampling from sinks in the hospital, sampling brushes have been used, and water samples have been examined by filtering water in a filter pump and culturing the filter. To establish an effective sampling protocol, we conducted a comparative analysis between water samples and brush samples. Samples were collected from 15 sinks across St. Olavs hospital, Trondheim University Hospital, spanning five departments. Three sinks were examined per department: one in a utility room, one in a patient room, and one in a staff break room. Water samples were obtained from the water trap from the sinks. The water trap was dismantled, and the water was collected into a sterile container. Brush samples were obtained from the transition between porcelain/metal, within the drain, and from the dismantled water trap. The environmental samples were cultured, and the bacteria were identified with MALDI-TOF MS.

Analysis of the brush samples and water samples from various departments at St. Olavs hospital, Trondheim University Hospital, revealed the presence of several of the same pathogenic bacteria. For future outbreak investigation, a combination of brush samples and water samples ensures the most reliable results. The sampling method should be tailored to the specific bacteria that are purportedly causing the outbreak, by using selective agars, adjusting culture conditions, and adjusting the pore size of the filter for the microbiology pump.

INNHOLDSFORTEGNELSE

| | |
|--|------------|
| FORORD | I |
| SAMMENDRAG | II |
| ABSTRACT | III |
| 1 INNLEDNING | 1 |
| 1.1 Miljøprøver..... | 1 |
| 1.2 Teori | 2 |
| 1.2.1 Bakteriemiøjet i vask | 2 |
| 1.2.2 Bakterier i vann | 2 |
| 1.2.3 Prøvetakingsmetoder | 4 |
| 1.2.4 Nøytraliseringsmidler | 5 |
| 1.2.5 Identifikasjon med MALDI-TOF MS | 5 |
| 1.3 Bakgrunn for oppgaven..... | 6 |
| 1.4 Problemstilling..... | 6 |
| 2 MATERIALE OG METODE | 7 |
| 2.1 Vannprøver..... | 7 |
| 2.1.1 Prosedyre vannprøver | 7 |
| 2.2 Penselprøver..... | 8 |
| 2.2.1 Prosedyre penselprøver | 9 |
| 2.3 Inhibitorer og nøytraliseringsmidler..... | 9 |
| 2.3.1 Fortynning av kontrollstamme | 10 |
| 2.3.2 Nøytralisering i vannprøver | 11 |
| 2.3.3 Nøytraliseringsløsning i penselprøver | 13 |
| 2.4 Prøvetaking på avdelingene | 14 |
| 2.5 Avlesning og identifikasjon med MALDI-TOF MS | 15 |
| 2.5.1 Avlesning | 15 |
| 2.5.2 MALDI-TOF MS | 15 |
| 3 RESULTATER | 16 |
| 3.1 Fortynning av kontrollstamme | 16 |
| 3.2 Nøytraliseringsmidler | 17 |
| 3.2.1 Nøytraliseringsløsning i vannprøver | 17 |
| 3.2.2 Nøytraliseringsbuljong i vannprøver | 18 |
| 3.2.3 Nøytraliseringsløsning i penselprøver | 19 |
| 3.3 Prøvetaking på avdelingene | 20 |
| 4 DISKUSJON | 21 |
| 4.1 Fortynninger | 21 |
| 4.2 Nøytraliseringsmidler | 21 |
| 4.2.1 Nøytraliseringsløsninger i vannprøver..... | 21 |
| 4.2.2 Nøytraliseringsbuljong i vannprøver | 21 |
| 4.2.3 Nøytraliseringsløsning i penselprøver | 22 |
| 4.3 Prøvetaking på avdelingene | 23 |
| 4.3.1 Vannprøver | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3.2 Positiv og negativ kontroll | 23 |
| 4.3.3 Valg av filter | 23 |
| 4.3.4 Sentrifugering | 24 |
| 4.4 MALDI-TOF MS resultater..... | 24 |
| 4.5 Sammenligning og videre bruk av prøvetakingsmetodene | 25 |
| 5 KONKLUSJON..... | 26 |
| 6 REFERANSER..... | 28 |
| 7 VEDLEGG | 32 |

1 INNLEDNING

1.1 Miljøprøver

Miljøprøver tas på ulike områder for å innhente data angående mikroorganismenes sammensetning i det gitte materialet. Miljøprøver kan innhentes fra diverse kilder, inkludert vann, jord, luft og overflater.

I sykehusmiljøer er bakteriefloraen annerledes enn i private hjem. Resistente bakterier kan etablere seg i miljøet ettersom det er høyt forbruk av antibiotika. Ved å dyrke miljøprøver med hensyn til bakterier og sopp, kan man lokalisere årsak til et eventuelt utbrudd eller utføre kontroll av sterile områder (1). Miljøprøver ved sykehus er oftest prøver tatt fra overflater, fast inventar, vann og avløp (2).

I januar 2022 ble det erklært et nasjonalt utbrudd av bakterien *Pseudomonas aeruginosa* i pre-fuktede engangsvaskekluter som var i bruk på sykehus over hele landet. Engangsvaskeklutene var av merket Oasis BedBath Unperfumed og produsert i England. Folkehelseinstituttet utformet en sluttrapport for dette nasjonale utbruddet. I henhold til sluttrapporten ble det utført miljøprøvetaking for å finne smittekilden samt for å implementere nødvendige tiltak for å begrense og stoppe utbruddet (2).

Et annet eksempel er utbruddet med *Salmonella Typhimurium* på Oslo lufthavn i august 2017. Folkehelseinstituttet og Mattilsynet sporet Salmonella-utbruddet til et serveringssted, hvor utbruddsstammen ble isolert fra miljøprøver på stedet (3). I slike tilfeller fremheves viktigheten av å benytte en pålitelig prøvetakingsmetode som gir et representativt bilde av bakteriefloraen i miljøet.

1.2 Teori

1.2.1 Bakteriemiljøet i vask

Håndvasker og tilhørende rørsystem kan knyttes til utbrudd på sykehus. Sluket, tilhørende rørsystem og vannlåsen kan fungere som reservoar for bakterier (4). Sammensetningen av mikrober i rørsystemet kan variere, avhengig av vaskens formål og lokasjon. For eksempel kan bakterier fra hudoverflaten overføres til rørsystemet etter håndvask, hvor de kan trives og formere seg under gunstige vekstbetingelser, inkludert næringstilgang, fuktighet, temperatur og pH.

Samfunnet i rørsystemet og vannlåsen kan inneholde rester av mat, drikkevarer, såpe og desinfeksjonsmidler. Områdene er vanskelige å rengjøre, og det kan føre til samfunn av mer motstandsdyktige mikrober (5). Utførelse av miljøprøvetaking i vask kan bidra til kartleggingen av bakteriemiljøet på sykehuset.

En mulig årsak til at bakterier trives i vasken er deres evne til å danne mikrobielle biofilmer, som gir beskyttelse mot eksterne miljøpåvirkninger (4). Mikrobielle biofilmer er samfunn av bakterier innkapslet i en egenprodusert ekstracellulær matriks festet til en overflate eller til hverandre. Biofilm beskytter bakterier mot antimikrobielle midler og kan føre til resistens mot antibiotika (6).

1.2.2 Bakterier i vann

Pseudomonas

Pseudomonas en gruppe gram negative bakterier som trives i fuktige områder. *Pseudomonas* lever normalt i jord, vann og vegetasjon. Bakteriene er mellom 1,5 µm til 3 µm store (7).

Pseudomonas har evnen til å formere seg i tilnærmet rent vann. Ettersom bakteriene trives i fuktige omgivelser, vil steder som vannkraner, håndvasker, rørsystemer og vannkobler være oppvekstkilder til *pseudomonas*bakterier (8).

I *pseudomonas*slekten er *Pseudomonas aeruginosa* den arten som kan forårsake flest alvorlige infeksjoner. *Pseudomonas aeruginosa* forårsaker sjelden sykdom hos friske individer, men er en stor trussel for sykehusinnlagte pasienter, spesielt de med underliggende sykdommer som kreft og brannskader. Den høye dødeligheten forbundet med infeksjon av bakterien skyldes en

kombinasjon av et svekket immunforsvar, mikrobens resistens mot antibiotika og bakteriens produksjon av ekstracellulære bakterielle enzymer og toksiner (7).

***Enterobacter cloacae*-komplekset**

Enterobacter cloacae-komplekset er en del av *Enterobacteriaceae* familien. Komplekset består av flere gramnegative stavformede bakterier. Komplekset består av blant annet artene *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter kobei* og *Enterobacter cloacae* (9). *Enterobacter* finnes naturlig i miljøet, som i jord og vann. I tillegg kan de oppdages i andre miljøer, som i sykehusmiljøet og i industrimiljøer (10). *Enterobacter cloacae*-komplekset er forbundet med nosokomiale infeksjoner (11).

***Klebsiella* arter**

Klebsiella arter er gramnegative stavformede bakterier i *Enterobacteriaceae* familien. Bakteriene varierer i størrelse fra 0,3-1,0 µm i bredden og 0,6-6,0 µm i lengden. *Klebsiella* artene er fakultativ anaerobe og vokser derfor godt i både anaerobe og aerobe miljøer (12). Bakteriene er en del av normalfloraen i tarm hos mennesker, men finnes også i vann (13).

Klebsiella artene, *Klebsiella pneumoniae* og *Klebsiella oxytoca*, er vanlige årsaker til nosokomiale infeksjoner og utbrudd. Pasienter med svekket immunforsvar er spesielt utsatte (14).

Stenotrophomonas maltophilia

Stenotrophomonas maltophilia er en gramnegativ miljøbakterie. Bakterien kan være 0,5 µm i bredden. Miljøbakterien kan leve i jord, vann og planter. Bakterien kan gi sykdom til de med svekket immunforsvar (15,16). De fleste infeksjoner forårsaket av *Stenotrophomonas maltophilia* forekommer som en nosokomial infeksjon (17).

***Acinetobacter* arter**

Acinetobacter arter er små, gramnegative stavbakterier som varierer i størrelse fra 1-1,5 µm i bredden til 1,5 til 2,5 µm i lengden (18). Bakteriene er i omgivelsene, deriblant jord og vann. De kan også finnes i sykehusmiljøet (19). Det har tidligere blitt rapportert infeksjoner som meningitt, lungebetennelse og endokarditt hos immunsvekkede pasienter, forårsaket av *Acinetobacter* arter (20). *Acinetobacter* artene utgjør derimot ingen reel risiko for friske personer. (21).

Arten *Acinetobacter baumannii* er assosiert med antibiotikaresistens og kan overleve i tøffe miljøer. Dette gjør bakterien til en farlig sykehusmikrobe (22).

1.2.3 Prøvetakingsmetoder

Filtrering av vannprøver

Det er strenge krav og retningslinjer for vannbehandling av norsk drikkevann. En metode som benyttes for rensing av drikkevann er membranfiltrering. Membranfiltrering innebærer at vann presses gjennom en membran med en definert porestørrelse. Dette vil separere partikler fra vannet som er mindre enn gitt porestørrelse (23). Membranfiltrering kan også benyttes for å analysere vannbaserte væsker for mikrobiell forurensing. Til dette formålet kan en filterpumpe benyttes (24). Dette innebærer separasjon av mikroorganismer fra prøven ved filtrering, etterfulgt av kultivering av de filtrerte mikrobene for påvisning og identifikasjon.

Ifølge ISO standard 21148 om mikrobiologisk dyrkning ved bruk av membranfiltrering skal filterpumpen være laget av et egnet materiale med en filterholder på minst 50 mL. Filteret skal ha diameter 47 mm til 50 mm og ikke mer enn 0,45 µm porestørrelse. Vakuumpilden som benyttes skal gi en jevn filtreringshastighet og innretningen skal stilles inn slik at den oppnår filtrering av 100 mL væske på mindre enn 2 minutter (25).

Penselprøver

Penselprøver benyttes til mikrobiell prøvetaking. Disse prøvene består av en steril vattpinne (prøvetakingspensel) og et tilhørende transportmedium. Det finnes ulike typer pensler. Valg av penselprøve avhenger av formålet med prøvetakingen og type prøvemateriale (26).

1.2.4 Nøytraliseringsmidler

Før dyrkning og påvisning av levedyktige mikroorganismer i miljøprøver, skal eventuelle inhibitorer i prøven nøytraliseres (25). Under utprøving av ulike farmasøytiske produkter ble det observert at enkelte komponenter i disse produktene kan hemme veksten av mikroorganismer, til tross for at de ikke er cytostatika eller antibiotika. Inhibitorene kan resultere i ikke-representativ vekst ved mikrobiologisk dyrkning (27). I vannprøver fra vasker kan inhibitorer være såper som har blitt skylt ned i vasken.

For å nøytralisere inhibitorene benyttes et nøytraliseringsmiddel. Før et nøytraliseringsmiddel tas i bruk, er det viktig å kontrollere at den har effekt (25). Det finnes ulike inhibitorer som kan nøytraliseres av ulike kjemikalier. De mest brukte metodene for nøytralisering er bruk av lectin fra soyabønner (0,3-0,5%), polysorbate 80 (Tween80 2-4%), eller filtrering og påfølgende vask med en passende mengde såpe (27). Polysorbate 80 og lectin nøytraliserer blant annet alkoholer, ammonium-forbindelser og fettsyrer (28).

1.2.5 Identifikasjon med MALDI-TOF MS

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) utføres i et massespektrometer og benyttes for identifikasjon av bakterier og sopp, se Figur 1 (29). Et massespektrometer er sammensatt av tre funksjonelle enheter: en masseanalysator, en ionekilde og en deteksjonsanordning. Ionekilden ioniserer og overfører prøvemolekylionene til en gassfase. Masseanalysatoren skiller ioner i henhold til deres masse-ladning-forhold (m/z) (30).

Prøven som skal analyseres plasseres på en MALDI-plate sammen med en matriks. Analytten løses i et løsningsmiddel med matriksen og avsettes på platen til tørking og krystallisering. Laserlys vil bestråle prøvene slik at det dannes ioner fra analyttmolekylene. Matriksen er vanligvis en organisk forbindelse som absorberer laserenergi. Videre vil ionene bli dratt gjennom TOF-røret med vakuum, til de treffer en detektor. TOF er en masseanalysator som ekstraherer ioner av analytten som en forsinket ioneekstraksjon. De ekstraherte ionene vil passere gjennom TOF-røret med en hastighet som er omvendt proporsjonal med kvadratrotten til deres masse-ladning-forhold. Ved å beregne denne «flight»-tiden, kan masse-ladning-forholdet til ionene beregnes (29).



Figur 1: MALDI-TOF massespektrometer (MALDI Biotyper Sirius, Bruker®) (31).

1.3 Bakgrunn for oppgaven

Utbrudd på sykehus utgjør en betydelig trussel med potensielle alvorlige konsekvenser for både pasienter og helsepersonell. Kartlegging av kilden til utbruddet er derfor avgjørende for å kontrollere spredning og iverksette forebyggende tiltak. Utbruddsetterforskning kan innebære miljøprøver fra vasker, som være reservoar for mikroorganismer. Prøvetaking i vask kan være nyttig for å kartlegge bakteriemiljøet på sykehuset.

Ved tidligere miljøprøvetaking fra vasker på sykehuset har det blitt benyttet prøvetakingspensler. Det har også blitt foretatt undersøkelse av vannprøver ved å filtrere vann i en filterpumpe og dyrke filteret.

Hensikten med dette prosjektet er å sammenligne og evaluere prøvetakingsmetoder for miljøprøvetaking i vask, ettersom det per dags dato ikke finnes en standardisert metode for denne type prøvetaking. Ved fremtidige utbrudd kan den best egnede prøvetakingsmetoden tas i bruk for å sikre det mest pålitelige resultatet.

1. 4 Problemstilling

Hvilken metode skal benyttes ved miljøprøvetaking i vask, for å sikre det mest pålitelige resultatet ved fremtidige smitteutbrudd?

2 MATERIALE OG METODE

2.1 Vannprøver

Påvisning av bakterier i vannprøver ble utført ved å filtrere vann i Sentino[®] microbiology pump (Cytiva[™]). Sentino[®] filterpumpen oppfyller filtreringsparametere beskrevet i ISO standard 21148. Filterpumpen består av pumpen, en filtertrakt med filter og en utløpsslange, se Figur 2 (24). Det ble benyttet filter med porestørrelse 0,22 og 0,45 µm.

Sentino[®] filterpumpen benytter membranfilter-teknikk hvor pumpen har et peristaltisk strømningsdesign for å trekke prøven gjennom filteret og sender filtratet direkte til avløp eller avfallsinnsamling. Pumpen benytter peristaltikk som eliminerer behovet for en vakuumpkilde. Dette sikrer også at væskestrømmen går i én retning uten potensial for forurensing (24).

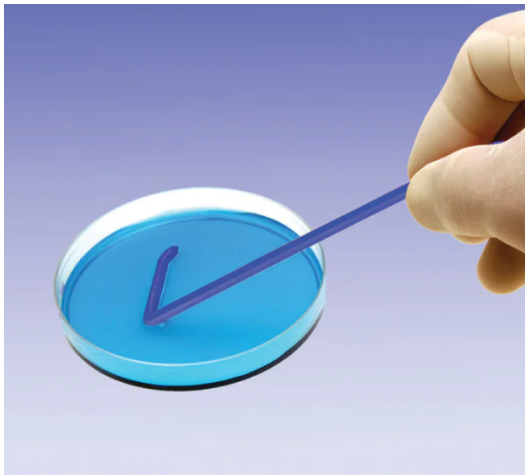


Figur 2: Filterpumpe (Sentino[®] microbiology pump, Cytiva[™]) (24).

2.1.1 Prosedyre vannprøver

Vannprøver ble overført til filtertrakten og filtrert gjennom filterpumpen i henhold til pumpens brukermanual (32). Etter filtrering ble filteret plassert i et 15 mL sentrifugerør ved bruk av sterile pinsetter. Sterilt vann ble overført til det dekket filteret. Sentrifugerøret ble vortexet to ganger i 30 sekunder. Filteret ble fjernet og sentrifugerøret ble sentrifugert ved 2770 RCF (relativ sentrifugalkraft) 30 minutter. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet. 1 mL bunnfallble vortexet i 20 sekunder. 50 µL av bunnfallet ble overført på agarskåler. Bunnfallet ble utsådd med en L-formet cellefordeler (Fisherbrand™) (L-øse) for å få bunnfallet jevnt fordelt på agar, se Figur 3 (33). Agarskålene ble inkubert i 35 ± 2 grader Celsius i 18-24 timer.

Arbeidet med filteret er utført etter prosedyrer fra tidligere upubliserte forsøk internt på Avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs hospital.



Figur 3: L-formet cellefordeler (Fisherbrand™) på agarskål (33).

2.2 Penselprøver

ESwab® Liquid Based Collection and Transport (Copan) ble benyttet for å ta penselprøver i vask, se Figur 4. ESwab® kan opprettholde levedyktigheten for aerobe, anaerobe og andre kravstore bakterier i opptil 48 timer i romtemperatur og kjøleskap. Transportmediet tilhørende ESwab® inneholder 1 mL Liquid Amies (34). Liquid Amies er en saltløsning med en effektiv bufferkapasitet, og benyttes for å opprettholde en osmotisk balanse som ligner på det innvendige humane miljøet (35).



Figur 4: Penselprøve (ESwab® Liquid Based Collection and Transport, Copan). Utstyret består av en prøvetakingspensel og et transportmedium (34).

2.2.1 Prosedyre penselprøver

Penselprøvene ble vortexet i 30 sekunder før utsæd av transportmediet. Det ble benyttet 10^{-2} μL øse. Agarskålene ble inkubert i 35 ± 2 grader Celsius i 18-24 timer.

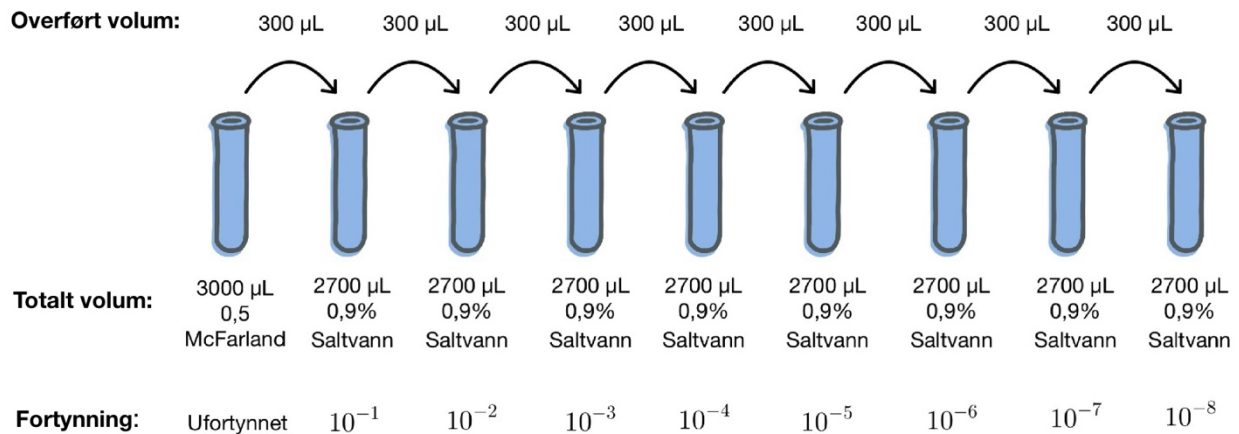
2.3 Inhibitorer og nøytraliseringsmidler

Såper i prøvemateriale kan inhibere bakterievekst. CUTAN Håndsåpe (SC Johnson Professional®) og PURE Dagligrent (NorEngros) er såper som potensielt kan akkumuleres i vasken og vannlåsen ved St. Olavs hospital. Såpene ble anvendt i forsøk med nøytraliseringsmidler.

Det ble benyttet to ulike nøytraliseringsmidler; en nøytraliseringsløsning og en nøytraliseringsbuljong, for å undersøke om de gir økt bakterievekst. Nøytraliseringsløsningen inneholder PBS pH 7,5 med 3,0% Tween80, 3,0% Saponin, 0,5% natriumtiosulfat, 0,1% histidin. Nøytraliseringsbuljongen Dey-Engley består hovedsakelig av glukose, lecitin, natrium thiosulfat, Bacto trypton og Polysorbate 80 (Tween80) (36). Vekst i nøytraliseringsbuljongen indikeres ved et fargeomslag grunnet endring i pH. Fargeomslaget til buljongen, lilla til gul, viser spalting av glukose (37). De to nøytraliseringsmidlene ble valgt på grunnlag av tilgjengelighet hos Avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs hospital.

2.3.1 Fortynning av kontrollstamme

Ved evaluering av nøytraliseringsmidlene ble kontrollstammen *Staphylococcus aureus* fra Culture Collection University of Gothenburg (CCUG 15915) benyttet som positiv kontroll. Det ble laget en bakteriesuspensjon med konsentrasjon 0,5 McFarland. Deretter ble det laget en 10-folds fortynningsrekke av bakteriesuspensjonen, se Figur 5.



Figur 5: 10-folds fortynningsrekke av 0,5 McFarland løsning med *Staphylococcus aureus* i fysiologisk saltvann, 0,9%. Bakteriesuspensjonen består av 3000 µL fysiologisk saltvann og *S. aureus* med 0,5 McFarland. 2700 µL fysiologisk saltvann tilsatt i 8 plastrør. 300 µL av bakteriesuspensjonen ble overført til plastrør med 10^{-1} fortynning og vortexet. 300 µL av denne løsningen ble overført til neste plastrør og vortexet. Gjenta frem til fortynning 10^{-8} . (Figur generert med Notability).

Det ble gjennomført et forsøk der 10^{-3} til 10^{-8} fortynningene fra fortynningsrekken ble direkte utsådd på blodagar i duplikat. Fortynningsrekken ble utsådd for å finne fortynningen av kontrollen som ga tellbare kolonier (færre enn 100 kolonier). Agarskålene ble inkubert i 35 ± 2 grader Celsius i 18-24 timer i CO_2 .

Etter direkte utsæd av fortynningsrekken ble 10^{-5} -fortynning av positiv kontroll benyttet ved bruk av filterpumpen. Basert på resultatet fra 10^{-5} -fortynningen med filterpumpen ble fortynningene 10^{-6} og 10^{-7} av positiv kontroll valgt for å gi tellbare kolonier.

2.3.2 Nøytralisering i vannprøver

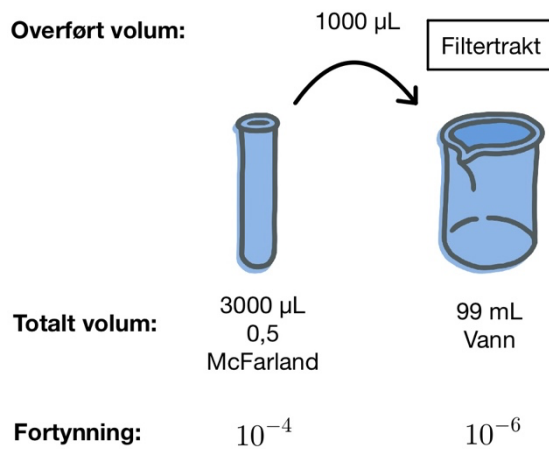
Positiv kontroll tilsatt såpe, med og uten nøytralisering, ble filtrert i filterpumpen. Formålet med dette var å undersøke om nøytralisering øker bakterievekst i vannprøver. Tabell 1 gir en oversikt over gjennomføringen av dette.

Tabell 1: Forsøk med og uten nøytralisering i filterpumpe. Det ble benyttet 0,5 McFarland fortyning med bakteriestammen CCUG 15915.

| Fortynning av 0,5 McFarland suspesjon* | Såpe | Nøytralisering |
|---|-------------|------------------------|
| 10^{-6} | Håndsåpe | Ingen |
| 10^{-7} | 0,5 mL | |
| 10^{-6} | Håndsåpe | Nøytraliseringsløsning |
| 10^{-7} | 0,5 mL | |
| 10^{-6} | Håndsåpe | Nøytraliseringsbuljong |
| 10^{-7} | 0,5 mL | |
| 10^{-6} | Dagligrent | Ingen |
| 10^{-7} | 10 μ L | |
| 10^{-6} | Dagligrent | Nøytraliseringsløsning |
| 10^{-7} | 10 μ L | |
| 10^{-6} | Dagligrent | Nøytraliseringsbuljong |
| 10^{-7} | 10 μ L | |

* Totalvolum 100 mL

Fortynningene 10^{-4} og 10^{-5} av positiv kontroll fra 10-folds fortynningrekke ble fortynnet til 10^{-6} og 10^{-7} i filterpumpens filtertrakt, se Figur 6.



Figur 6: Eksempel på direkte fortynning til 10^{-6} i pumpens filtertrakt uten nøytraliseringsløsning. Filtertrakten ble tilsatt 99 mL vann. 1000 µL av 0,5 McFarland med *S. aureus* i fortynning 10^{-4} ble overført til filtertrakten og blandet. Løsningen i filtertrakten ble da fortynnet til 10^{-6} . (Figur generert med Notability).

I prøver uten nøytralisering ble positiv kontroll fortynnet med springvann i pumpens filtertrakt. I prøver tilsatt nøytraliseringsløsning ble positiv kontroll fortynnet med springvann og nøytraliseringsløsning i filtertrakten. Vann og nøytraliseringsløsning ble tilsatt i forhold på 1:1. Totalvolum i filterpumpens filtertrakt var 100 mL. Såpe ble tilsatt før filtrering. Forsøket ble gjennomført ved bruk av filter med porestørrelse 0,22 µm. Vannprøvene ble utsådd på blodagar i triplikat, og inkubert i 35 ± 2 grader Celsius i 18-24 timer i CO_2 .

I prøver med nøytraliseringsbuljong ble 50 µL av bunnfallet overført til buljongen. Bunnfallet som anvendes er fra prøver uten tilsatt nøytraliseringsløsning etter filtrering med filterpumpen. Buljongen ble inkubert i 18-24 timer. Etter 24 timer ble buljongene utsådd, og inspisert for fargeomslag. Ved utsæd ble 50 µL buljong overført på blodagar, og utsådd med L-øse i triplikat. Agarskålene ble inkubert i 35 ± 2 grader Celsius i 18-24 timer i CO_2 .

Positiv kontroll med nøytraliseringsløsning, med og uten såpe, ble filtrert i filterpumpen, se Tabell 2. Formålet med dette var å undersøke potensielle effekter av nøytraliseringsløsning på bakterievekst i fravær av såpe i vannprøver. I dette forsøket ble både CUTAN Håndsåpe og PURE Dagligrent tilsatt i prøvene. Volumet av hver såpe ble derfor halvert. Vannprøvene ble utsådd på blodagar i triplikat, og inkubert i 35 ± 2 grader Celsius i 18-24 timer i CO₂.

Tabell 2: Forsøk med nøytraliseringsløsning, med og uten såpe.

| Bakterie | Fortynning* | Såpe |
|-----------------------------|------------------|-------------------------------------|
| CCUG 15915 0,5 McFarland | 10 ⁻⁶ | 0,25 mL Håndsåpe 5 µL Dagligrent |
| CCUG 15915 0,5 McFarland | 10 ⁻⁶ | Ingen |

* Totalvolum 100 mL

2.3.3 Nøytraliseringsløsning i penselprøver

Det ble evaluert om nøytraliseringsløsning øker bakterievekst i penselprøver. Det ble tatt prøver fra 5 ulike vasker på Laboratoriesenteret ved St. Olavs hospital. I hver vask ble det tatt én penselprøve med nøytraliseringsløsning og én penselprøve uten nøytraliseringsløsning.

Nøytraliseringsløsning ble tilsatt transportmediet i forholdet 1:1 før prøvetaking.

Prøvetakingspenselen ble ført langs håndtak og rundt overgangen mellom porselen/metall, før den ble stukket ned i sluket. Etter prøvetaking lot vi prøvene stå i 1 time før utsåing.

Penselprøvene ble utsådd på blodagar, og inkubert i 35 ± 2 grader Celsius i 18-24 timer i vanlig atmosfære.

2.4 Prøvetaking på avdelingene

Etter etablering av prøvetakingsmetoder ble det tatt miljøprøver ved St. Olavs hospital. Det ble tatt penselprøver og vannprøver fra 15 separate vasker på sykehuset. Miljøprøvene ble samlet inn fra 5 avdelinger: Nyfødt intensiv, Hovedintensiv, Kirurgisk tung overvåking, Sengepost for blodsykdommer og Sengepost for infeksjonssykdommer. Det ble tatt miljøprøver i tre vasker på hver avdeling: én vask fra skyllerom, én fra pasientrom og én fra pauserom for ansatte.

Prøvetaking av vannprøver ble utført ved at en rørlegger demonterte vannlåsen, og vannet fra vannlåsen ble overført til autoklavert beholder. Den autoklaverte beholderen rommet et volum på 250 mL. Nøytraliseringsløsning ble tilsatt vannet fra vannlåsen i forholdet 1:1. Volumet vann i vannlåsen varierte i vaskene. Vann fra noen vannlåser måtte helles ut fra beholder for å få korrekt forhold mellom vann og nøytraliseringsløsning.

Før prøvetaking med penselprøvene ble det tilsatt nøytraliseringsløsning i transportmediet. Transportmediet ble tatt ut av forpakningen til ESwab[®] uten kontaminering av prøvetakingspenslene. To penselprøver ble tatt fra hver vask. Én prøvetakingspensel ble ført rundt overgangen mellom porselen/metall og ned i sluket den andre ble ført inn i vannlåsen etter demontering.

Vannprøver fra avdelingene ble filtrert i filterpumpen før utsæd. Filter med porestørrelse 0,45 µm ble benyttet. Vannprøvene og penselprøvene ble utsådd på blodagar og Mac Conkey-agar. Agarskålene ble inkubert i 35 ± 2 grader Celsius 18-24 timer i vanlig atmosfære.

Det ble benyttet en positiv og negativ kontroll i oppsettet med filterpumpen. Positiv kontroll besto av 0,5 McFarland CCUG 15915 fortynnet med springvann til 10^{-6} fortynning. Negativ kontroll besto av springvann. Prøvevolum for kontrollene var 100 mL.

2.5 Avlesning og identifikasjon med MALDI-TOF MS

2.5.1 Avlesning

Oppvekst fra forsøk med nøytraliseringsløsning i vannprøver ble semikvantitert ved manuell telling av antall kolonier. Oppvekst fra forsøk med nøytraliseringsløsning i penselprøver og forsøk med nøytraliseringsbuljong ble vurdert kvalitativt, grunnet overvekst.

2.5.2 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS (MALDI Biotyper Sirius, Bruker[®]) ble benyttet for å identifisere bakterier i prøvene fra avdelingene. Kun et utvalg bakteriekolonier fra hver agarskål ble identifisert. På hver agarskål ble det identifisert 2-4 bakteriekolonier basert på morfologi. Det ble avsatt en liten mengde ren bakteriekultur på MALDI-engangsplaten tilhørende instrumentet. 0,7 µL matriks ble avsatt på bakteriene og tørket i ca. 10 minutter. Metallplaten med bakteriekoloni og tørket matriks ble plassert i instrumentet og analysert.

Resultater fra MALDI-TOF blir presentert som en bakterieidentifikasjon med en tilhørende ID-scoreverdi. ID-scoreverdien gjenspeiler hvor sikkert MALDI-resultatet er. Resultater med scoreverdi > 2,0 gir sikker identifikasjon på artsnivå (38).

Vi aksepterte identifikasjoner med score > 2,0. Prøver med score > 1,7 > 2,0 etter to analyseringer ble vurdert etter genusnivå (sp), etter prosedyren til MALDI-TOF på Avdeling for medisinsk mikrobiologi (38).

3 RESULTATER

3.1 Fortynning av kontrollstamme

Direkte utsåing på blodagar med 10-folds fortynningsrekke av 0,5 McFarland CCUG 15915 viser at fortynning 10^{-5} gir tellbare kolonier som kan benyttes til semikvantitering, se Tabell 4.

Tabell 4: Antall kolonier ved ulike fortynninger av 0,5 McFarland av CCUG 15915 ved direkte utsåing på blodagar.

| Fortynning | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} |
|------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Antall kolonier* | >100 < 1000 | 127 | 13 | 2 | 0 | 0 |

*Gjennomsnittlig antall bakteriekolonier av duplikat. Se Vedlegg 1 for antall kolonier per parallell.

Filterpumpen vil oppkonsentrere bakterieoppveksten. Fortynning 10^{-5} av 0,5 McFarland av CCUG 15915 gir 100-1000 kolonier ved bruk av filterpumpe. En lavere fortynning må benyttes for å kunne telle kolonier. Fortynningene 10^{-6} og 10^{-7} av 0,5 McFarland av CCUG 15915 gir tellbare kolonier i forsøk med filterpumpen. Se vedlegg 2.

3.2 Nøytraliseringsmidler

3.2.1 Nøytraliseringsløsning i vannprøver

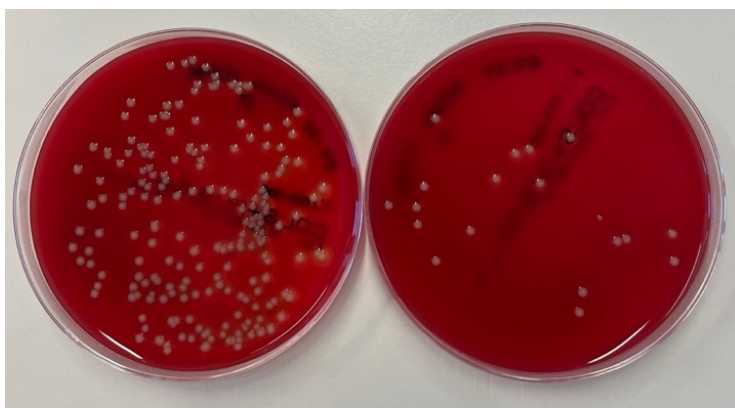
Bruk av nøytraliseringsløsning i filterpumpen viser en klar økning i bakterievekst. Som vist i Tabell 5, vil prøver tilsatt nøytraliseringsløsning ha økt bakterievekst sammenlignet med prøver uten nøytralisering. Nøytraliseringsløsning nøytraliserer håndsåpe og Dagligrent, vist med fortyngninger 10^{-6} og 10^{-7} av 0,5 McFarland av CCUG 15915.

Tabell 5: Antall bakteriekolonier med og uten nøytraliseringsløsning i filterpumpe.

| CCUG 15915 0,5 McFarland | Fortynning | Uten nøytraliseringsløsning* | Med nøytraliseringsløsning* |
|-------------------------------------|-------------------|---|--|
| Håndsåpe | 10^{-6} | 23 | 424 |
| | 10^{-7} | 5 | 9 |
| Dagligrent | 10^{-6} | 66 | 864 |
| | 10^{-7} | 9 | 184 |

* Antall bakteriekolonier er hentet fra en parallell i triplikaten. Se Vedlegg 2 for antall kolonier per parallell.

Figur 7 visualiserer økningen i bakterievekst ved tilsats av nøytraliseringsløsning i filterpumpe før filtrering.



Figur 7: Oppvekst av 0,5 McFarland med CCUG 15915 med fortyngning 10^{-6} . Agar til venstre er prøve med håndsåpe og nøytraliseringsløsning, 187 bakteriekolonier. Agar til høyre er prøve med håndsåpe uten nøytralisering, 19 bakteriekolonier.

I prøver med og uten såpe er bakterieveksten være tilnærmet lik. Nøytraliseringsløsningen har ikke negativ effekt i vannprøver uten såpe. Dette er vist med fortykning 10^{-6} av 0,5 McFarland av CCUG 15915 i tabell 6.

Tabell 6: Antall bakteriekolonier med og uten såpe i filterpumpe.

| CCUG 15915 0,5 McFarland | Antall kolonier* |
|---|-----------------------------|
| Vann, såpe og nøytraliseringsløsning | 43 |
| Vann og nøytraliseringsløsning | 39 |

*Gjennomsnitt av bakteriekolonier i triplikat. Se Vedlegg 3 for antall kolonier per parallell.

3.2.2 Nøytraliseringsbuljong i vannprøver

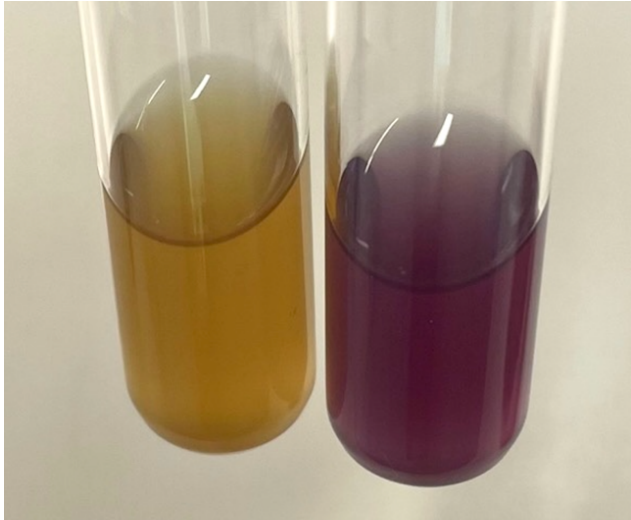
Nøytraliseringsbuljongen vil oppkonsentrere bakteriekonsentrasjonen, som gjør det vanskelig å vurdere mengden vekst. Prøver tilsatt såpe i nøytraliseringsbuljong ga bakterievekst i 4 av 4 prøver utsådd i triplikat.

Tabell 8: Prøver tilsatt såpe i nøytraliseringsbuljong.

| CCUG 15915 0,5 McFarland | Fortynning* | Nøytraliseringsbuljong |
|-------------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| Håndsåpe | 10^{-6} | Vekst |
| | 10^{-7} | Vekst |
| Dagligrent | 10^{-6} | Vekst |
| | 10^{-7} | Vekst |

*Alle fortykninger er utsådd i triplikat.

Nøytraliseringsbuljongen hadde visuelt fargeomslag 48 timer etter tilsats av bunnfall fra filterpumpen, se Figur 8.



Figur 8: Fargeomslag fra lilla til gul i Dey/Engley buljong.

3.2.3 Nøytraliseringsløsning i penselprøver

Penselprøver tatt i vasker på Laboratoriesenteret, med og uten nøytraliseringsløsning, viste tilnærmet lik bakterievekst. Det var vekst i 10 av 10 penselprøver. Nøytraliseringsløsning i penselprøver vil derfor ikke ha negativ effekt på bakterieoppveksten.

Tabell 7: Penselprøver med og uten nøytraliseringsløsning

| Vask | Uten nøytraliseringsløsning | Med nøytraliseringsløsning |
|-------------|--|---------------------------------------|
| Vask 1 | Vekst | Vekst |
| Vask 2 | Vekst | Vekst |
| Vask 3 | Vekst | Vekst |
| Vask 4 | Vekst | Vekst |
| Vask 5 | Vekst | Vekst |

3.3 Prøvetaking på avdelingene

Penselprøvene og vannprøvene fra avdelingene ved St. Olavs hospital hadde oppvekst av flere av de samme patogene bakteriene, se Tabell 9. Både penselprøver og vannprøver er egnet til å finne flere humanpatogene aerobe bakterier ved miljøprøvetaking i vask.

Tabell 9: Sammenligning av potensielt patogene funn ved penselprøver og vannprøver ved prøvetaking på avdeling. Se Vedlegg 4 for mer detaljert oversikt over funn.

| Penselprøver | Vannprøver |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• <i>Enterobacter cloacae</i>-komplekset• <i>Enterobacter bugandensis</i>• <i>Klebsiella oxytoca</i>• <i>Klebsiella pneumoniae</i>• <i>Escherichia coli</i>• Andre miljøbakterier | <ul style="list-style-type: none">• <i>Enterobacter cloacae</i>-komplekset• <i>Enterobacter bugandensis</i>• <i>Klebsiella oxytoca</i>• <i>Klebsiella pneumoniae</i>• <i>Acitenobacter baumannii</i>• Andre miljøbakterier |

I penselprøvene ble de patogene bakteriene *Enterobacter cloacae*-komplekset, *Enterobacter bugandensis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* og *Escherichia coli*, i tillegg til andre miljøbakterier identifisert.

I vannprøvene ble de patogene bakteriene *Enterobacter cloacae*-komplekset, *Enterobacter bugandensis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* og *Acitenobacter baumannii*, i tillegg til andre miljøbakterier identifisert.

Det er kun identifisert et utvalg av bakterier fra hver agarskål fra prøvene på avdelingene. Resultatene viser kun mikrober fra tidspunktet prøvene ble tatt.

4 DISKUSJON

Hensikten med dette prosjektet var å sammenligne og evaluere prøvetakingsmetoder for vannprøver og penselprøver, ettersom det per dags dato ikke finnes en standardisert metode for dette. Målet var at ved et fremtidig utbrudd skal den beste egnede metoden benyttes ved miljøprøvetaking i vask.

4.1 Fortynninger

Ulike fortynninger av positiv kontroll var egnet til direkte utsæd og filtrering. Ved direkte utsæd er det kun en liten andel av totalvolumet som dyrkes. Ved filtrering vil derimot hele totalvolumet, 100 mL, filtreres og dyrkes. Dette resulterer i at alle bakteriene som er til stede vil dyrkes, og fortynningen 10-5 ga derfor for høyt antall kolonier til å semikvantitere.

4.2 Nøytraliseringsmidler

4.2.1 Nøytraliseringsløsninger i vannprøver

I forsøket med og uten nøytraliseringsløsning i vannprøver ble ikke bunnfallet etter filtreringen vortexet før utsåing i triplikat. Dette resulterte i stor forskjell av oppvekst mellom parallellene som ble semikvantitert, se Vedlegg 1. Ved utsåing av parallell 1 ble pipettespissen plassert i bunnen av bunnfallet. Denne parallellen vil ha høyere bakteriekonsentrasjon enn de andre parallellene. Selv om bunnfallet skulle vært vortexet for å få en homogen blanding av filtrerte bakterier, er alle prøver i dette forsøket behandlet på samme måte. Det er likevel en klar forskjell mellom parallellene tilsatt nøytraliseringsløsning og parallellene uten nøytralisering. Optimalt sett kunne dette forsøket ha blitt gjentatt med riktig håndtering av bunnfallet. Bunnfallet ble vortexet i videre forsøk.

4.2.2 Nøytraliseringsbuljong i vannprøver

Nøytraliseringsbuljongen er både et vekstmedium og et nøytraliseringsmiddel. Buljongen inneholder næring som vil oppkonsentrere prøvematerialet, og er hensiktsmessig å bruke i vannprøver ved lite eller ingen vekst. Dette vil øke sjansen til vekst på agar.

Bakteriemengden observert etter utsæd av buljongen gjenspeiler ikke bakteriemengden i vasken. Det er derfor ikke mulig å sammenligne bakterieoppvekst fra nøytraliseringsbuljong med bakterieoppveksten i prøver tilsatt nøytraliseringsløsning. Semikvantitering av bakterieoppveksten fra buljongen var ikke mulig grunnet overvekst. Resultatet ble derfor vurdert kvalitativt.

Å identifisere mikrober som vokser i miljøprøver raskt vil være med på å begrense et eventuelt utbrudd og finne kilden tidlig i forløpet. Nøytraliseringsbuljong må inkuberes med prøvematerialet i 24 timer før dyrking på faste medier. Identifisering av bakterieoppvekst kan derfor ikke skje før 48 timer etter prøvetaking.

For å begrense omfanget av oppgaven valgte vi relativt tidlig å konkludere med forkastning av nøytraliseringsbuljong til fordel for nøytraliseringsløsning. Valget er basert på at nøytraliseringsløsning ga bakterieoppvekst 24 timer før nøytraliseringsbuljong. Optimalt sett kunne det blitt gjort flere forsøk i sammenligningen av de to nøytraliseringsmidlene for å gi et bedre grunnlag til forkastningen.

4.2.3 Nøytraliseringsløsning i penselprøver

Ved validering av nøytraliseringsløsning i penselprøver, lot vi prøvene stå én time på benk før utsåing. I en reel situasjon vil de gå litt tid fra prøvetaking til utsåing grunnet transport til Laboratoriet. Grunnet overvekst var det vanskelig å skille prøver med og uten nøytraliseringsløsning. Basert på vist effekt av nøytraliseringsløsning i vannprøver, gikk vi videre med tilsetning av nøytraliseringsløsning også i penselprøver.

I forsøket med nøytraliseringsløsning i penselprøver ble det først benyttet samme utsåingsteknikk som ved vannprøver. 50 µL av transportmediet ble avsatt på agarskål og utsådd med L-øse. Oppveksten ble for høyt til å kunne skille bakteriekolonier fra hverandre. For å avsette et mindre volum på agarskålene, ble det benyttet 10-2 µL øse og en tre-sektors utsåingsteknikk, på samme måte som en penselprøve fra humant materiale.

4.3 Prøvetaking på avdelingene

4.3.1 Vannprøver

Tilsats av nøytraliseringsløsning i vannprøvene under prøvetakingsrunden ble noe upresist. Overføringen av nøytraliseringsløsning ble utført under selve prøvetakingsrunden, hvilke resulterte i utfordringer med nøyaktig måling av nøytraliseringsløsning. Optimalt sett kunne det vært gjennomført et forsøk om mengden nøytraliseringsløsning hadde stor betydning for dyrkningsresultatet.

Autoklaverte beholdere rommet 250 mL. Grunnet høyt volum i enkelte vannlåser måtte noe vann helles ut. Dette kan ha resultert i at noen bakterier ikke ble overført til beholderen, filtrert og identifisert. Det kan være hensiktsmessig å benytte en beholder som rommer mer enn 250 mL.

4.3.2 Positiv og negativ kontroll

Ideelt sett skulle kontrollene blitt tilsatt såpe og nøytraliseringsløsning for å ligne vannprøvene. Kontrollene ble benyttet for å kontrollere at prøvematerialet ikke ble kontaminert i pumpeprosessen.

Vann fra springen ga ikke bakterieoppvekst ved filtrering. Dette viser en svakhet i metoden med filterpumpen, da drikkevann inneholder bakterier. Metoden burde derfor ikke benyttes ved analyse av drikkevann. I vårt oppsett fungerte springvann som negativ kontroll, men optimalt sett burde sterilt vann benyttes.

4.3.3 Valg av filter

Ved filtrering av vannprøvene på avdelingene ble det nødvendig å bytte filter fra porestørrelse 0,22 μm til filter med porestørrelse 0,45 μm . 0,22 μm filteret ble tett av partiklene som befant seg i vannet. Ved å bytte til et filter med større porer, kan bakterier mindre enn 0,45 μm gå gjennom porene i filteret, og dermed ikke identifiseres.

Klebsiella har varierende størrelse fra 0,3-1,0 μm i bredden og 0,6-6,0 μm i lengden. I vannprøvene fra avdelingene ble både *Klebsiella pneumoniae* og *Klebsiella oxytoca* identifisert ved bruk av filter med porestørrelse 0,45 μm . I et reelt utbrudd er det

hensiktsmessig å undersøke størrelsen på mikroben det letes etter, og vurdere porestørrelse på filter deretter. Ved utbrudd av bakterier med tilnærmet lik størrelse som Klebsiella eller større, kan 0,45 µm filter benyttes.

4.3.4 Sentrifugering

Prosedyren for filterpumpen tidligere brukt ved St. Olavs hospital beskriver at vannprøvene skal sentrifugeres ved 3000 RCF (relativ sentrifugalkraft) i 30 minutter etter filtreringen. Sentrifugen vi hadde tilgjengelig hadde maksimal relativ sentrifugalkraft 2770 RCF. I forsøk med positiv kontroll ble 2770 RCF benyttet, og bunnfallet etter sentrifugering inneholdt tilstrekkelig mengde bakterier. Derfor ble 2770 RCF benyttet i metoden.

4.4 MALDI-TOF MS resultater

Oppveksten av miljøprøvene fra avdelingene ved St. Olavs hospital ble identifisert ved MALDI-TOF MS. Det var overvekst på en rekke av agarskålene. Grunnet mye vekst og tidsomfang ble det valgt å kun teste et utvalg bakteriekolonier på hver agarskål. Resultatene fra MALDI-TOF MS viser derfor ikke et komplett bilde av bakteriemiljøet i vaskene på sykehuset. I tillegg må det tas i betraktning at resultatene kun viser mikrober fra tidspunktet prøvene ble tatt.

Ettersom kun et utvalg bakteriekolonier ble analysert på MALDI-TOF MS, er det tilfeldig hvilke bakterier som ble identifisert i de ulike vaskene. Som vist i Vedlegg 4 ble flere av de samme bakteriene identifisert i vannprøver og penselprøver. I noen vasker ble spesifikke bakterier kun funnet med den ene metoden. Dette kan skyldes at bakteriene ikke var en del av utvalget vi identifiserte på MALDI-TOF MS, deres fravær fra det opprinnelige prøvetakingsområdet, eller deres undertrykkelse på agarskålen.

Overvekst av bakterier kan føre til utkonkurrering av enkelte bakteriearter, ettersom tilgangen til næring blir utilstrekkelig. Overvekst og utkonkurrering kan ha ført til at grampositive bakterier ikke fikk oppvekst på agar.

4.5 Sammenligning og videre bruk av prøvetakingsmetodene

Prøvetakingspenselen til penselprøver er fleksibel og kan lett brukes i lukkede systemer, som sluket i en vask. Under prøvetaking med penselprøver overfører penselen bare en begrenset mengde bakterier fra det berørte området. Det innebærer at biofilm som penselen ikke kommer i kontakt med, forblir uoppdaget. Dermed kan noen bakterier forbli uidentifisert selv om de er til stede i vasken.

Vannprøver gir mulighet til å filtrere alt vann som er til stede i vannlåsen, noe som kan fange opp alle bakterier som befinner seg i selve vannet. Imidlertid kan biofilm i vannlåsen ikke nødvendigvis bli detektert i vannprøvene.

Begge metodene har den svakhet at ikke alle tilstedeværende bakterier nødvendigvis blir inkludert i prøvetakingen. For å sikre en mest mulig representativ oversikt over mikroorganismer i vasken, er det derfor best å kombinere prøvetakingsmetodene for miljøprøvetaking i vask.

Prøvetakingsmetodene kan tilpasses i henhold til det spesifikke bakterieutbruddet. En mulig tilpasning kan være å benytte selektive agarskåler for utbruddsbakterien, hvis det er tilgjengelig. Grunnet hensikten med prosjektet vårt, samt omfang og tidsbegrensning, valgte vi å ikke benytte selektive agarskåler.

5 KONKLUSJON

Basert på resultatene fra bachelorprosjektet kan det konkluderes med at både vannprøver og penselprøver er egnet til å finne flere humanpatogene aerobe bakterier ved miljøprøvetaking i vask. Ved fremtidige utbrudd kan man sikre det mest pålitelige resultatet ved å benytte en kombinasjon av vannprøver og penselprøver ved miljøprøvetaking i vask. En kombinasjonsmetode av vannprøver og penselprøver vil sikre at bakteriene i vasken med større sannsynlighet blir påvist. Det vil være hensiktsmessig å anvende en nøytraliseringsløsning under prøvetaking av både vann- og penselprøver for å fremme økt bakterievekst.

Ved fremtidige utbrudd anbefales det å tilpasse metoden i henhold til det spesifikke bakterieutbruddet. Dette kan oppnås ved å benytte selektive agarskåler, tilpasse dyrkingsforhold, og tilpasse porestørrelsen på filteret til filterpumpen.

BIDRAG

Vi har begge bidratt i arbeidet med planlegging og gjennomføring av laboratoriearbeid. Vi har arbeidet sammen på laboratoriet, og samarbeidet om oppgavene der. Ved innsamling av data ved prøvetakingsrunde deltok begge i lik grad. Ved bearbeidelse av data, utforming av figurer og tabeller, litteratursøk og selve skriveprosessen har vi arbeidet fysisk sammen mesteparten av tiden.

6 REFERANSER

1. Universitetssykehuset Nord-Norge. Labhåndbok - Screening - miljøprøver [Internett]. 2017 [sitert 15. mars 2024]. Tilgjengelig på: <https://labhandbok.unn.no/mikrobiologi/screening-miljoprover-article1667-821.html>
2. Gravningen K, Ødeskaug L, Mari Nythun Utheim, Julie Andrine Korpås, Jørgensen SB, Elstrøm P, mfl. Nasjonalt utbrudd av *Pseudomonas aeruginosa* i sykehus forårsaket av ferdigfuktede ikke-sterile vaskekluter i sykehus, Norge, 2021 – 2022 [Internett]. Oslo: Folkehelseinstituttet; 2022. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2022/nasjonalt-pseudomonasutbrudd-i-sykehus-sluttrapport.pdf>
3. Folkehelseinstituttet. Utbrudd av salmonellose [Internett]. 2023 [sitert 21. mars 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/ut/utbrudd/oversikt-over-storre-utbrudd/utbrudd-av-salmonellose/>
4. Lalancette C, Charron D, Laferrière C, Dolcé P, Déziel E, Prévost M, mfl. Hospital Drains as Reservoirs of *Pseudomonas aeruginosa*: Multiple-Locus Variable-Number of Tandem Repeats Analysis Genotypes Recovered from Faucets, Sink Surfaces and Patients. *Pathogens*. 9. august 2017;6(3):36.
5. Withey Z, Goodall T, MacIntyre S, Gweon HS. Characterization of communal sink drain communities of a university campus. *Environ DNA* [Internett]. 2021 [sitert 15. mars 2024];3(5). Tilgjengelig på: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/edn3.196>
6. Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* [Internett]. 2014;18. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527414000290?via%3Dihub>
7. Iglewski BH. *Pseudomonas*. I: Baron S, redaktør. *Medical Microbiology* [Internett]. 4th utg. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [sitert 20. mars 2024]. Tilgjengelig på: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/>
8. Folkehelseinstituttet. *Pseudomonas*infeksjon [Internett]. 2018 [sitert 15. mars 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/sm/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/pseudomonasinfeksjon---veileder-for/>
9. Annavajhala MK, Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. *Front Microbiol*. 31. januar 2019;10:44.
10. Iversen C. *Enterobacter* [Internett]. 2014 [sitert 29. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/enterobacter>
11. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol*. juli 2012;7(7):887–902.

12. Vanhooren PT, Vandamme EJ. Klebsiella [Internett]. 1999 [sitert 18. mars 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/klebsiella>
13. Folkehelseinstituttet. Bakterier i drikkevann [Internett]. 2018 [sitert 19. mars 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/sm/drikkevann/stoffer-i-drikkevann/smittestoffer-i-drikkevann/bakterier-i-drikkevann/>
14. Nizet V, Klein J. Bacterial Sepsis and Meningitis [Internett]. 2011. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/klebsiella>
15. Wisplinghoff H, Seifert H. *Stenotrophomonas maltophilia* [Internett]. 2010 [sitert 18. mars 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/stenotrophomonas-maltophilia>
16. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clin Microbiol Rev.* januar 2012;25(1):2–41.
17. Said MS, Tirthani E, Lesho E. *Stenotrophomonas Maltophilia*. StatPearls [Internett]. 2024 [sitert 18. mars 2024]; Tilgjengelig på: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572123/>
18. Almasaudi SB. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi J Biol Sci.* 1. mars 2018;25(3):586–96.
19. Onarheim H, Høivik T, Harthug S, Digranes A, Mylvaganam H, Vindenes HA. Utbrudd av infeksjon med multiresistent *Acinetobacter baumannii*. *Tidsskr Den Nor Legeforening* [Internett]. 10. april 2000 [sitert 18. mars 2024]; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2000/04/klinikk-og-forskning/utbrudd-av-infeksjon-med-multiresistent-acinetobacter-baumannii>
20. Carvalheira A, Silva J, Teixeira P. *Acinetobacter* spp. in food and drinking water – A review. *Food Microbiol.* 1. mai 2021;95:103675.
21. Haukeland universitetssykehus. *Acinetobacter* [Internett]. Helse Bergen, Haukeland universitetssykehus; 2017. Tilgjengelig på: <https://www.helse-bergen.no/4a2b1b/siteassets/seksjon/pasientsikkerhet/documents/pasientinformasjon-angaande-acinetobacter.pdf.pdf>
22. Eze EC, El Zowalaty ME, Pillay M. Antibiotic resistance and biofilm formation of *Acinetobacter baumannii* isolated from high-risk effluent water in tertiary hospitals in South Africa. *J Glob Antimicrob Resist.* 1. desember 2021;27:82–90.
23. Norsk Vann. Vannbehandling [Internett]. u.å [sitert 14. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://norskvann.no/vannforsyning-og-drikkevann/vannbehandling/>
24. Cytiva. Cytiva life sciences. u.å [sitert 15. mars 2024]. Sentino microbiology pump. Tilgjengelig på: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/sentino-microbiology-pump-p-36397>

25. Standard Norge. ISO Standard nr. 21148. Kosmetikk - Mikrobiologi - Veiledning for mikrobiologisk undersøkelse [Internett]. ISO; 2017 [sitert 15. mars 2024]. Tilgjengelig på: <https://lese.standard.no/product/2544015/nb>
26. Stormo K, Leiva A. Mikrobiell prøvetaking [Internett]. 2023 [sitert 14. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://metodebok.no/index.php?action=topic&item=k9q7DPpJ>
27. Kruszevska H, Iwona M, Jacek C. Analysis of neutralisation of compounds inhibiting microbial growth, present in pharmaceutical products [Internett]. u.å. Tilgjengelig på: https://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/1999/suppl/042.pdf
28. Standard Norge. ISO Standard nr. 13727. Kjemiske desinfeksjonsmidler og antiseptiske midler - kvantitativ suspensjonstest for evaluering av bakteriedrepende aktivitet i det medisinske området - Prøvingmetode og krav (fase 2, trinn 1) [Internett]. ISO; 2016 [sitert 12. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://lese.standard.no/product/2470507/nb>
29. Li D, Yi J, Han G, Qiao L. MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. ACS Meas Sci Au. 27. juli 2022;2(5):385–404.
30. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(2):380–407.
31. BRUKER. MALDI Biotyper® sirius System (GP + RUO) [Internett]. u.å [sitert 14. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.bruker.com/de/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification/maldi-biotyper-sirius-system-gp-ruo.html>
32. PALL Laboratory. Cytiva life sciences. 2015. User Guide: Sentino® Microbiology Pump. Tilgjengelig på: <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/6GQaNsiGYUyK9WenuOqcFg-original?v=482478f2>
33. Fisherbrand. Fisherbrand L-Shaped Cell Spreaders - Cell Culture Utensils, Cell Spreaders [Internett]. u.å [sitert 14. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.fishersci.com/shop/products/fisherbrand-l-shaped-cell-spreaders-2/p-4249846>
34. COPAN. ESwab® Liquid Based Collection and Transport [Internett]. u.å [sitert 15. mars 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.copanusa.com/products/sample-collection-transport-kits/eswab-liquid-based-collection-and-transport/>
35. RMBIO. Liquid Amies Medium [Internett]. u.å [sitert 21. mars 2024]. Tilgjengelig på: <https://rmbio.com/products/liquid-amies-medium>
36. Lingaas E, Regionalt kompetansesenter for smittevern. Bestemmelse av bioburden på medisinsk utstyr [Internett]. 2022; Oslo. Tilgjengelig på: <https://www.infeksjonskontroll.no/Content/7858/cache=1646386884000/Bestemmelse%20av%20bioburden%20på%20medisinsk%20utstyr.pdf>
37. Thermo Fisher Scientific. D/E Neutralizing Broth [Internett]. 2010. Tilgjengelig på: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/IFU112160.pdf>

38. Haugum K, Bjørkli Rolstad K, Nergård Valle SB. MALDI-TOF MS, Identifikasjon av bakterier og gjærsopp. St. Olavs hospital, Avdeling for medisinsk mikrobiologi; 2024.

7 VEDLEGG

Vedlegg 1: Antall kolonier på hver parallell ved ulike fortynninger av 0,5 McFarland av CCUG 15915 ved direkte utsåing på blodagar.

| Fortynning | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} |
|-------------------------|------------------------|--------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| Antall kolonier* | P1, P2: >100 < 1000 | P1: 110 P2: 143 | P1: 10 P2: 15 | P1: 3 P2: 1 | P1: 0 P1: 0 | P1: 0 P2: 0 |

* P: Parallell

Vedlegg 2: Antall bakteriekolonier på hver parallell ved to fortynninger av 0,5 McFarland av CCUG 15915, med og uten nøytraliseringsløsning i filterpumpe.

| CCUG 15915 0,5 McFarland | Fortynning | Uten nøytraliseringsløsning* | Med nøytraliseringsløsning* |
|---|-------------------|---|--|
| Håndsåpe | 10 ⁻⁶ | P1: 23 P2: 63 P3: 19 | P1: 424 P2: 350 P3: 187 |
| | 10 ⁻⁷ | P1: 5 P2: 2 P3: 0 | P1: 9 P2: 6 P3: 4 |
| Dagligrent | 10 ⁻⁶ | P1: 66 P2: 61 P3: 20 | P1: 864 P2: 133 P3: 50 |
| | 10 ⁻⁷ | P1: 9 P2: 7 P3: 3 | P1: 184 P2: 8 P3: 2 |

* P: Parallell

Vedlegg 3: Antall bakteriekolonier på hver parallell ved fortynning 10^{-6} av 0,5 McFarland av CCUG 15915 med og uten såpe i filterpumpe.

| Prøve | Antall kolonier* | Gjennomsnitt |
|---|----------------------------|---------------------|
| Pos. KTR Vann, såpe og nøytralisering | P1: 39 P2: 39 P3: 51 | 43 |
| Pos. KTR Vann og nøytralisering | P1: 44 P2: 37 P3: 34 | 39 |

* P: Parallell

Vedlegg 4: MALDI-TOF resultater etter prøvetaking på avdelingene St. Olavs hospital.

Resultater fra vannprøver fra vannlås og penselprøver fra vannlås og sluk.

| Nr | Avdeling | Vask | Resultater Filterpumpe | Resultater ESWAB® |
|----|-----------------|------------|--|--|
| 1 | Nyfødt intensiv | Skyllerom | Ingen vekst | Vannlås Ingen vekst |
| | | | | Sluk Ingen vekst |
| 2 | « | Pauserom | <i>Raoultella ornithinolytica</i> <i>Enterobacter kobei</i> <i>Enterobacter roggenkampii</i> | Vannlås <i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas</i> spp. |
| | | | | Sluk <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pseudomonas</i> spp. |
| 3 | « | Pasientrom | <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter</i> spp. | Vannlås <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter</i> spp. <i>Phytobacter ursingii</i> |
| | | | | Sluk <i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> |
| 4 | Hovedintensiv | Skyllerom | <i>Enterobacter cloacae</i> -komplekset | Vannlås <i>Stenotrophomonas</i> spp. <i>Pseudomonas rhodesiae</i> |
| | | | | Sluk Ingen vekst |
| 5 | « | Pauserom | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Vannlås <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Phytobacter</i> spp. |
| | | | | Sluk <i>Pseudomonas nitroreducens</i> <i>Klebsiella</i> spp. |
| 6 | « | Pasientrom | <i>Aeromonas hydrophila</i> | Vannlås <i>Comamonas testosteroni</i> |
| | | | | Sluk <i>Stenotrophomonas</i> spp. |

| | | | | |
|----|--------------------------------|------------|---|--|
| 7 | Kirurgisk tung overvåkning | Skyllerom | <i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Vannlås <i>Enterobacter</i> spp. <i>Citrobacter freundii</i> |
| | | | | Sluk Ingen vekst |
| 8 | « | Pauserom | <i>Chryseobacterium</i> spp. <i>Delftia tsuruhatensis</i> <i>Delftia lacustris</i> | Vannlås Ingen vekst |
| | | | | Sluk <i>Chryseobacterium gambrini</i> |
| 9 | « | Pasientrom | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Enterobacter kobei</i> | Vannlås <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Enterobacter kobei</i> <i>Chryseobacterium</i> spp. |
| | | | | Sluk <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Cytobacillus horneckiae</i> <i>Cupriavidus pauculus</i> |
| 10 | Sengepost for blodsykdommer | Skyllerom | <i>Enterobacter kobei</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Raoultella</i> spp. | Vannlås <i>Enterobacter bugandensis</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Phytobacter ursingii</i> |
| | | | | Sluk <i>Pseudomonas nitroreducens</i> <i>Sphingobacterium multivorum</i> |
| 11 | « | Pauserom | <i>Enterobacter bugandensis</i> <i>Enterobacter cloacae</i> - komplekset | Vannlås <i>Enterobacter bugandensis</i> |
| | | | | Sluk <i>Bacillus</i> sp <i>Enterobacter cloacae</i> - komplekset <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> |

| | | | | |
|----|------------------------------------|------------|--|--|
| 12 | « | Pasientrom | <i>Acidovorax</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | Vannlås <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Acidovorax temperans</i> |
| | | | | Sluk <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> |
| 13 | Sengepost for infeksjons-sykdommer | Skyllerom | <i>Herbaspirillum aquaticum</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Bacillus cereus</i> | Vannlås <i>Meyerozyma</i> spp. |
| | | | | Sluk Ingen vekst |
| 14 | « | Pauserom | <i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Acinetobacter modestus</i> <i>Aeromonas hydrophilia</i> | Vannlås <i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Fictibacillus halophilus</i> <i>Exiguobacterium</i> spp. <i>Escherichia coli</i> |
| | | | | Sluk <i>Bacillus cereus</i> <i>Chryseobacterium</i> spp. <i>Acinetobacter ursingii</i> |
| 15 | « | Pasientrom | <i>Phytobacter ursingii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Bacillus cereus</i> | Vannlås <i>Phytobacter</i> spp. <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| | | | | Sluk <i>Phytobacter ursingii</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Chryseobacterium</i> spp. |

