

PREVALENCE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* A MRSA U DOJNÉHO A MASNÉHO SKOTU ZD JESENÍK

Marcela Klimešová^{1,2}, Ivan Manga¹,
Ludmila Nejeschlebová¹, Antonín Ponižil¹,
Jiří Horáček¹, Oto Hanuš², Eva Vondrušková²,
Pavel Žák³

¹ Agritec Plant Research

² Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

³ Zemědělské družstvo Jeseník

Prevalence of *Staphylococcus aureus* and MRSA in dairy and beef cattle of ZD Jeseník

Abstrakt

Byl sledován výskyt a možné rozšíření *Staphylococcus aureus* na farmách ZD Jeseník (farma Bukovice - dojnice, farma Domašov - dojnice a masný skot). Vzorky byly odebrány z nozder od masných krav (plemeno Blonde d'Aquitaine) a z nozder a mléka od krav mléčných (holštýnské plemeno), a to v letech 2012 až 2015. Vedle těchto vzorků se analyzovaly i stěry od ošetřujícího personálu (ruce, nosní sliznice, nosohltan) a z prostředí chovu (konstrukce dojírny, krmný stůl, hrazení stáje, napáječka 1 a 2). U zvířat a v prostředí chovu byl výskyt *S. aureus* za celou dobu sledování negativní. Z celého souboru vzorků byla potvrzena přítomnost *S. aureus* pouze u jednoho ošetřovatele ve výtěru z nosohltanu. U tohoto kmene byla provedena jednak zkouška na citlivost k oxacilinu diskovou difúzní metodou, jednak následná identifikace *mecA* genu pro potvrzení MRSA (methicilin rezistentní *S. aureus*) pomocí metody PCR. Obě použité metody potvrdily, že se nejedná o kmen MRSA. Získaná zjištění svědčí o vysoké hygienické kvalitě mléka, které ZD Jeseník produkuje, a o správném přístupu managementu k provozu chovů a léčbě případných mastitidních onemocnění, které tak zamezuje šíření a přenos patogenních mikroorganismů a jejich rezistentních kmenů mezi zvířaty nebo zvířetem a člověkem, popřípadě i transfer do potravinového řetězce.

Klíčová slova: skot, *Staphylococcus aureus*, MRSA

Abstract

The incidence and possible extension of *Staphylococcus aureus* were monitored in the ZD Jeseník farms (farm Bukovice - dairy cows, farm Domašov - dairy cows and beef cattle). The samples were taken from the nostrils of beef cows (breed Blonde d'Aquitaine) and from the nostrils and milk of dairy cows (Holstein cows) in years 2012 to 2015. In addition to these samples, the swabs from the attending staff (hands, nasal mucosa, nasopharynx) and

from the breeding environment (construction of the milking parlor, feeding table, fencing, drinking bowls 1 and 2) were analyzed. The occurrence of *S. aureus* was negative in animals and breeding environment for the whole period of monitoring. The presence of *S. aureus* was confirmed in only one person in nasopharyngeal swab. In this strain was performed, first the test for sensitivity to oxacillin using disk diffusion method, first, the subsequent identification of *mecA* gene by PCR method to confirm MRSA (methicilin-resistant *S. aureus*). Both methods used confirmed that there is no MRSA strain. These findings suggest a high hygienic quality of milk produced by ZD Jeseník. The right attitude of the management to the farm running and to the possible mastitis treatment and prevention prevents the spread and transmission of pathogenic microorganisms and their resistant strains among animals or between animal and human, or even transfer into the food chain.

Keywords: cattle, *Staphylococcus aureus*, MRSA

Úvod

Staphylococcus aureus je stále nejčastěji citovaným patogenním mikroorganismem vyskytujícím se v prostředí chovu hospodářských zvířat (Merz a kol., 2016). Jeho výskyt byl potvrzen i ve stádě (v bazénovém mléku a mléčných filtrech) zdánlivě zdravých zvířat (Murphy a kol., 2010). V posledních letech je v popředí zájmu výskyt a zvyšující se prevalence methicilin-rezistentních kmenů *S. aureus* (MRSA) a v některých státech i k vankomycinu (VRSA), a to nejen v humánní, ale i veterinární medicíně (Witte a kol., 1997; Boyce, 1990; Ito a kol., 2003; Le Blanc, 2007; Tenover a kol., 2001; Chang, 2003; Bhattacharyya a kol., 2016). Populace stafylokoků, která se vyskytuje u zvířat, je označována jako livestock-associated LA-MRSA (methicilin-rezistentní *S. aureus* s vazbou na chov hospodářských zvířat). Výskyt MRSA byl popsán u různých druhů zvířat, např. u skotu, koní, malých přežvýkavců, velbloudů, drůbeže, ale především u prasat (Štátková a kol., 2009; Köck a kol., 2009; Alzohairy, 2011). Podle některých studií může být LA-MRSA odpovědný za část kmenů MRSA izolovaných z humánních pacientů v nemocnicích, anebo od lidí pracujících v živočišné výrobě. Tato zjištění indikují, že LA-MRSA může představovat významnou příčinu infekcí způsobených MRSA u lidí (Köck *et al.*, 2013). Rezistence k β -laktamovým antibiotikům je způsobena modifikací proteinu PBP2a, který je u stafylokoků kódován genem *mecA*. V roce 2011 byl v izolátech MRSA humánního a animálního původu nalezen nový homolog genu *mecA*, označený *mecALGA251* (Garcia-Alvarez *et al.*, 2011). Mezinárodní skupina pracující na klasifikaci SCC (Staphylococcal Cassette Chromosome) elementů ho přejmenovala na *mecC* (Ito a kol., 2012). Výskyt kmenů MRSA nesoucích gen *mecC* již byl potvrzen prakticky v celé Evropě, u volně žijících zvířat, hospodářských, domácích zvířat i lidí. Dle publikace Paterson *et al.*, (2014) byly kmeny *mecC* MRSA zaznamenány již ve 13 Evropských státech a pocházely ze

Tab. 1 Původ a specifikace vzorků a izolátu *Staphylococcus aureus*

| rok | masné | | | | mléčné | | | | | | | |
|------|---------|------|----------|------|----------|----------|------|--------|----------|------|-----|-----------|
| | farma | skot | personál | | | farma | skot | | personál | | | prostředí |
| | | | nozdry | ruce | nos | | krk | nozdry | mléko | ruce | nos | |
| 2012 | Domašov | 50 | | | | Bukovice | | 40 | | | | |
| 2013 | Domašov | 40 | | | | Bukovice | 20 | 20 | 2 | 2 | 2 | 5 |
| 2013 | | | | | | Domašov | 20 | 20 | 2 | 2 | 2 | 5 |
| 2014 | Domašov | 15 | | | | Bukovice | 20 | 20 | 2 | 2 | 2 | 5 |
| 2015 | Domašov | 40 | 2 | 2 | 2 (1 SA) | Bukovice | 20 | 20 | 2 | 2 | 2 | 5 |
| 2015 | | | | | | Domašov | 20 | 20 | 2 | 2 | 2 | 5 |

14 různých hostitelů. V zájmu hlavně prvovýrobců mléka je chov dojeného skotu s co nejnižším výskytem těchto a jiných patogenních mikroorganismů. Rychlá a spolehlivá diagnostika je součástí účinné a správné terapie postižených zvířat a tím redukuje náklady na léčbu zvířat pro chovatele. Riziko pozitivního nálezu kmenů MRSA neplatí pouze pro prvovýrobce masa a mléka, ale také pro finální potravinové výrobky. Pozitivní nález patogenu pak pro potravinářské výrobce může znamenat citelné ekonomické ztráty.

Práce byla zaměřena na prevalenci výskytu *S. aureus* a jeho rezistentních kmenů MRSA u mléčného a masného skotu Zemědělského družstva Jeseník v průběhu let 2012 až 2015.

Materiál a metody

Původ vzorků

Byly odebrány vzorky z nozder od masných krav (plemeno Blonde d'Aquitaine) a vzorky z nozder a mléka od krav mléčných (holštýnské plemeno) v letech 2012 až 2015 z farem ZD Jeseník (Bukovice - dojnice, Domašov - dojnice a masný skot). Vedle těchto vzorků se analyzovaly i stěry od ošetřujícího personálu (ruce, nosní sliznice, nosohltan) a z prostředí chovu (konstrukce dojírny, krmný stůl, hrazení stáje, napáječka 1, napáječka 2). Vzorky mléka o objemu 10 ml byly odebrány do sterilních vzorkovnic ze všech 4 struků a stěry byly provedeny výtěrovou tyčinkou (Amies s aktivním uhlím, Dispolab, CZ). Během transportu byly vzorky uchovány v termoboxu při teplotě 5 ± 2 °C a po převozu do laboratoře ihned analyzovány. Přehled vzorků je uveden v Tabulce 1.

Mikrobiologické analýzy

Vzorek mléka (0,05 ml) byl bakteriologickou kličkou rozetřen na krevní agar (HiMedia, Indie). Vzorek na výtěrové tyčince byl rovněž rozetřen na povrch krevního agaru. Kultivace proběhla při 37 °C/24 hodin. Kolonie s jasnou β-hemolytickou reakcí byly dále přeočkovány na krevní agar a inkubovány při teplotě 37 °C/24 hodin. Všechny kolonie byly následně konfirmovány koagulázovou reakcí a identifikovány pomocí STAPHYtestu a identifikačního programu TNW Pro 7.0 (Pliva-Lachema, Brno). U všech kmenů *S. aureus* byla provedena diskovou difúzní metodou zkouška na citlivost k oxacilinu a následně pomocí metody PCR identifikace *mecA* genu pro potvrzení MRSA (Bosgelmez-Tinaz a kol., 2006).

Výsledky a diskuse

Výsledky *S. aureus*

Výskyt *S. aureus* byl potvrzen pouze u jednoho ošetřovatele ve výtěru z nosohltanu, avšak nebyl u něj potvrzen výskyt *mecA* genu. Při opakovaném odběru byl výsledek negativní. U zvířat a v prostředí chovu byl jeho výskyt za celou dobu sledování negativní. Výsledky korespondují s dřívějším sledováním u spolupracující farmy v roce 2011. Vzorky byly odebrány v období září až říjen 2011 a celkem bylo provedeno 12 odběrů z mléčného tanku a z filtrů. Výskyt *S. aureus* byl potvrzen v pěti případech, přičemž v bazénovém vzorku mléka byl pozitivní nález jen u jednoho vzorku, a to v počtu 20 KTJ/ml. Podobné výsledky byly zjištěny i ve dvou mléčných automatech ($n = 24$), které ZD Jeseník provozuje a které byly kontrolovány v průběhu roku 2010 a 2011. Výsledek *S. aureus* byl buď negativní nebo menší než 10 KTJ v 1 ml vzorku (Vyletěllová, 2011). Přítomnost *mecA* genu u všech kmenů *S. aureus* a tedy výskyt MRSA byl negativní. Z výsledků veterinárních kontrol bylo navíc zjištěno, že od začátku provozu obou automatů nebyla vznesena ze strany kontrolního orgánu žádná kritická připomínka.

Výskyt a vývoj rezistentních kmenů MRSA v zemích EU

I když u sledovaných provozů byly výsledky velmi pozitivní, v jiných chovech ČR je výskyt *S. aureus* vyšší. Vyletěllová-Klimešová a kol. (2014) sledovali prevalenci stafylokokových infekcí u 12 farem (432 dojníc) a zjistili, že *S. aureus* byl nejčastěji identifikovaným druhem (13,7 % u plemene Holštýn a 1,5 % u plemene Český strakatý skot). Prevalence rezistentních kmenů je dobře zmapována u humánních výsledků prostřednictvím Evropského centra pro prevenci a kontrolu onemocnění (ECDC). Podobné zpracování u veterinárních případů bohužel chybí. V Tabulce 2 je pro názornost uvedena situace a srovnání prevalence rezistentních kmenů MRSA v zemích EU v humánní medicíně od prvního roku hlášení a za posledních pět let. Z výsledků MRSA je zřejmé, že nárůst rezistence o více jak 5 % je signalizován pouze u některých zemí (ČR, Maďarsko, Malta, Německo, Portugalsko, Slovensko). U jiných dochází naopak k jejich poklesu (Bulharsko, Francie, Irsko, Kypr, Lotyšsko, Rakousko, Slovinsko a UK), v ostatních zemích zůstává na stejné úrovni. Nicméně za posledních 5 let je vývojový trend u většiny zemí bez výrazných změn.

Tab. 2 Výskyt rezistence methicilin rezistentních kmenů *S. aureus* (MRSA) v zemích EU

| ČR | 1. hlášení | | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 |
|-------------|------------|------|------|------|------|------|------|
| | 2000 | 4,3 | 13,5 | 14,5 | 13,0 | 13,2 | 13,0 |
| Belgie | 1999 | 23,1 | 20,5 | 17,4 | 16,6 | 16,9 | 13,5 |
| Bulharsko | 2000 | 40,2 | 19,0 | 22,4 | 19,8 | 19,2 | 20,8 |
| Dánsko | 2000 | 0,2 | 1,3 | 1,2 | 1,3 | 1,7 | 2,5 |
| Estonsko | 2001 | 5,1 | 0,7 | 1,7 | 7,7 | 3,5 | 3,1 |
| Finsko | 1998 | 0,0 | 2,3 | 3,2 | 2,1 | 1,8 | 2,5 |
| Holandsko | 1999 | 0,3 | 1,2 | 1,4 | 1,3 | 1,2 | 1,0 |
| Francie | 2001 | 33,4 | 21,6 | 20,1 | 19,2 | 17,1 | 17,4 |
| Chorvatsko | 2001 | 30,9 | 26,1 | 27,7 | 21,3 | 24,0 | 21,3 |
| Irsko | 1999 | 40,0 | 23,9 | 23,7 | 22,6 | 19,9 | 19,4 |
| Island | 1999 | 0,0 | 1,5 | 2,8 | 1,7 | 0,0 | 3,3 |
| Itálie | 1999 | 41,0 | 36,5 | 38,2 | 35,2 | 35,8 | 33,6 |
| Kypr | 2003 | 64,3 | 32,3 | 41,6 | 35,2 | 32,5 | 36,0 |
| Litva | 2006 | 13,2 | 14,1 | 5,8 | 10,2 | 9,4 | 7,9 |
| Lotyšsko | 2004 | 26,4 | 13,7 | 9,9 | 9,0 | 7,0 | 8,2 |
| Lucembursko | 1999 | 16,0 | 16,5 | 20,5 | 15,3 | 9,0 | 12,0 |
| Maďarsko | 2001 | 4,7 | 30,2 | 26,2 | 24,8 | 24,0 | 23,1 |
| Malta | 2000 | 35,5 | 48,1 | 49,2 | 47,5 | 53,8 | 43,6 |
| Německo | 1999 | 8,3 | 20,8 | 16,2 | 15,4 | 12,7 | 11,8 |
| Norsko | 1999 | 0,0 | 0,6 | 0,3 | 1,3 | 0,7 | 1,0 |
| Polsko | 2001 | 15,9 | 13,1 | 24,3 | 25,4 | 16,0 | 21,4 |
| Portugalsko | 1999 | 36,9 | 53,4 | 54,6 | 53,8 | 46,8 | 47,4 |
| Rakousko | 2000 | 17,8 | 7,4 | 7,4 | 7,7 | 9,2 | 7,8 |
| Rumunsko | 2002 | 36,3 | 39,1 | 49,5 | 53,3 | 64,5 | 56,0 |
| Řecko | 1999 | 33,9 | 39,2 | 39,2 | 41,0 | 40,3 | 37,1 |
| Slovensko | 2001 | 5,4 | xxx | 26,1 | 21,7 | 26,6 | 28,0 |
| Slovinsko | 2000 | 21,1 | 12,0 | 7,1 | 10,3 | 9,0 | 13,1 |
| Švédsko | 1998 | 0,0 | 0,5 | 0,8 | 0,7 | 1,0 | 1,0 |
| UK | 1999 | 36,0 | 21,6 | 13,6 | 14,0 | 13,8 | 11,3 |

Poznámka: xxx - Slovensko v roce 2010 nepodalo hlášení

Závěr

Získaná zjištění k prevalenci *S. aureus* svědčí o vysoké hygienické kvalitě mléka, které ZD Jeseník produkuje, a o správném přístupu managementu k provozu chovů a léčbě případných mastitidních onemocnění, které tak zamezuje šíření a přenos patogenních mikroorganismů a jejich rezistentních kmenů mezi zvířaty nebo zvířetem a člověkem, popřípadě i transfer do potravinového řetězce.

Poděkování

Tato publikace vznikla za podpory projektů MZe NAZV KUS QJ1210284 a projektu č. RO1416.

Literatura

- ALZOHAIRY M.A. (2011): Colonization and antibiotic susceptibility pattern of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) among farm animals in Saudi Arabia. *Journal of Bacteriology Research*, 3 (4), 63-68.
- BHATTACHARYYA D., BANERJEE J., BANDYOPADHYAY S., MONDAL B., NANDA P.K., SAMANTA I., MAHANTI A., DAS A.K., DAS G., DANDAPAT P., BANDYOPADHYAY S. (2016): First report on vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in bovine and caprine milk. *Microbial Drug Resistance*. DOI: 10.1089/mdr.2015.0330
- BOŞGELMEZ-TINAZ G., ULUSOY S., ARIDOGAN B., COSKUN-ARI F. (2006): Evaluation of different methods to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* and their clinical laboratory utility. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 25 (6), 410-412.

BOYCE J.M. (1990): Increasing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States. *Infection Control Hospital Epidemiology*, 11 (12), 639-642.

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control. <http://ecdc.europa.eu>

GARCIA-ALVAREZ L., HOLDEN M.T., LINDSAY H., WEBB C.R., BROWN D.F., CURRAN M.D., WALPOLE E., BROOKS K., PICKARD D.J., TEALE C., PARKHILL J., BENTLEY S.D., EDWARDS G.F., GIRVAN E.K., KEARNS A.M., PICHON B., HILL R.L., LARSEN A.R., SKOV R.L., PEACOCK S.J., MASKELL D.J., HOLMES M.A. (2011): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecaA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infectious Disease*, 11 (8), 595-603.

ITO T., HIRAMATSU K., TOMASZ A., DE LENCASRE H., PERRETE V., HOLDEN M.T., COLEMAN D.C., GOERING R., GIFFARD P.M., SKOV R.L., ZHANG K., WESTH H., O'BRIEN F., TENOVER F.C., OLIVEIRA D.C., BOYLE-VAVRA S., LAURENT F., KEARNS A.M., KREISWIRTH B., CHANG S., SIEVERT D.M., HAGEMAN J.C. (2003): Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *New England Journal of Medicine*, 348 (14), 1342-1347.

ITO T., HIRAMATSU K., TOMASZ A., DE LENCASRE H., PERRETE V., HOLDEN M.T., COLEMAN D.C., GOERING R., GIFFARD P.M., SKOV R.L., ZHANG K., WESTH H., O'BRIEN F., TENOVER F.C., OLIVEIRA D.C., BOYLE-VAVRA S., LAURENT F., KEARNS A.M., KREISWIRTH B., KO K.S., GRUNDMANN H., SOLLID J.E., JOHN J.F. JR., DAUM R., SODERQUIST B., BUIST G., International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). (2012): Guidelines for reporting novel *mecaA* gene homologues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (10), 4997-9.

KÖCK R., HARLIUS J., BRESSAN N., LAERBERG R., WIELER L.H., WITTE W., DEURENBERG R.H., VOSS A., BECKER K., FRIEDRICH A.V. (2009): Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28 (11), 1375-1382.

KÖCK R., SCHAUMBURG F., MELLMANN A., KÖKSAL M., JURK A., BECKER K., FRIEDRICH A.V. (2013): Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. *PLoS One*, 8, 2: e55040.

LE BLANC D.M., REECE E.M., HORTON J.B., JANIS J.E. (2007): Increasing incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hand infections: a 3-year county hospital experience. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 119 (3), 935-40.

MERZ A., STEPHAN R., JOHLER S. (2016): *Staphylococcus aureus* isolates from goat and sheep milk seem to be closely related and differ from isolates detected from bovine milk. *Frontiers in Microbiology*, 7, 319. doi: 10.3389/fmicb.2016.00319

MURPHY B.P., O'MAHONY E., BUCKLEY J.F., O'BRIEN S., FANNING S. (2010): Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy animals in Ireland. *Zoonoses Public Health*, 57 (4), 249-57.

PATERSON G.K., HARRISON E.M., HOLMES M.A. (2014): The emergence of *mecc* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 22, 42-7.

STASTKOVA Z., KARPISKOVA S., KARPISKOVA R. (2009): Occurrence of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* at a goat breeding farm. *Veterinary Medicine*, 54 (9), 419-426.

TENOVER F.C., BIDDLE J.W., LANCASTER M.V. (2001): Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*, 7 (2), 327-332.

VYLETĚLOVÁ-KLIMEŠOVÁ M., O. HANUŠ, A. DUFEK, I. NĚMEČKOVÁ, J. HORÁČEK, PONIŽIL A., NEJESCHLEBOVÁ, L. (2014): *Staphylococcus aureus* and other pathogens in relation to breed of cattle and somatic cell count. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20 (6), 1495-1500.

VYLETĚLOVÁ, M., ROUBAL, P., KARPIŠKOVÁ, R., VLKOVÁ, H., HANUŠ, O., BUBIKOVÁ, M. (2011): Mikrobiologická kvalita mléka z jeseníckých automatů. *Mlékařské listy*, 126, 18-21.

WITTE W., KRESKEN M., BRAULKE CH., CUNY CH. (1997): Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospitals. *Clinical Microbiology and Infection*, 3 (4), 414-422.

Přijato do tisku 15. 10. 2016

Lektorováno 9. 11. 2016