



## KOAGULÁZA-NEGATIVNÍ STAFYLOKOKY V NOSNÍ SLIZNICI KRAV

Marcela Klimešová, Oto Hanuš, Ludmila Nejeschlebová, Eva Vondrušková  
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

### Coagulase - negative staphylococci in nasal mucose of cows

#### Abstrakt

Byl sledován výskyt a možné šíření *Staphylococcus aureus* a koaguláza-negativních stafylokoků (CNS) na dvou mléčných farmách (n = 40; holštýnské plemeno) a na jedné farmě s chovem masného skotu (n = 25; plemeno Blonde d'Aquitaine). Vzorky byly odebírány z nosní sliznice zvířat sterilními odběrovými tyčinkami a analyzovány běžnými laboratorními mikrobiologickými postupy pro izolaci stafylokoků. U všech zvířat byl výskyt *Staphylococcus aureus* negativní. U mléčných krav byly identifikovány koaguláza-negativní druhy *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri* a *Staphylococcus xylosus* a u krav bez tržní produkce mléka pouze *S. epidermidis*.

**Klíčová slova:** CNS, dojnice, krávy bez tržní produkce mléka, nosní sliznice

#### Abstract

The incidence and possible extension of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci (CNS) were monitored in two farms of dairy cows (n = 40; Holstein cows) and in one farm of suckler cows breeding (n = 25; breed Blonde d'Aquitaine). The samples were taken from the nostrils by sterile swabs and analyzed by standard laboratory microbiological procedures for staphylococcal isolation. The incidence of *Staphylococcus aureus* was negative in all of animals. Coagulase-negative species

*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus* were isolated in the case of dairy cows, while only *S. epidermidis* was found in suckler cows.

**Keywords:** CNS, dairy cows, suckler cows, nasal mucosa

#### Úvod

Do 70. let minulého století byly koaguláza-negativní stafylokoky (CNS) označovány pouze jako kontaminanty klinických vzorků. Jako původce onemocnění byl vždy definován jednoznačně jen *Staphylococcus aureus* (Taponen a Pyörälä, 2009). S postupem času se však CNS dostávaly do popředí zájmu jak v humánní, tak i veterinární medicíně. V humánní medicíně nyní představují jeden z hlavních nosokomiálních patogenů, přičemž *S. haemolyticus* a *S. epidermidis* se řadí mezi ty nejvýznamnější (Becker a kol., 2014). *S. haemolyticus* se podílí na vzniku infekcí (endokarditida, septikémie, infekce ran, močových cest), *S. epidermidis* na infekcích chirurgických ran a kontaminaci protetik, např. umělých chlopní, kloubů, intravaskulárních katétrů, *S. sciuri* na zánětlivém onemocnění kůže, *S. warneri* může způsobit aborty, záněty endokardu, *S. saprophyticus* infekci močových cest převážně mladých dívek, *S. xylosus* rovněž infekci močových cest, *S. saprophyticus* je spojován s akutní uretritidou a *S. lugdunensis* s infekční endokarditidou (Murray a kol., 1999; Nováková a kol., 2006; Gordon a kol., 2010; Becker a kol., 2014). Ve veterinární medicíně jsou některé CNS častými původci různých onemocnění od zánětlivých procesů, abscesů nebo sepsí. Jedná se např. o druhy *S. sciuri* (zánětlivé onemocnění kůže u prasat) a *S. warneri* (abortus) (Murray a kol., 1999; Chen a kol., 2007). V mnoha zemích se staly nejběžnějším izolátem boviní mastitidy hlavně druhy *S. simulans* a *S. chromogenes* které byly popsány jako nově vznikající patogeny mastitidy. Prevalence mastitidy CNS je vyšší u prvotek než u starších krav. CNS nejsou patogenní jako ostatní hlavní patogeny mastitidy a infekce většinou zůstává subklinická (Thorberg, 2008), ale jsou i popsány případy klinických infekcí mléčné žlázy (Taponen a kol., 2006). CNS však může způsobit přetrvávající infekce, které vedou ke

zvýšení počtu somatických buněk (SCC) a snížení kvality mléka (Taponen a Pyörälä, 2009). Infekce CNS může poškodit tkáň vemene a vést tak i ke snížení produkce mléka. Nejběžnějšími izoláty jsou *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus* a *Staphylococcus haemolyticus*, přičemž *S. chromogenes* je hlavní druh CNS, který postihuje jalovice a prvotelky, zatímco *S. simulans* byl izolován častěji od starších krav. Krávy s vyšším počtem otelení jsou obecně nakaženy CNS během pozdní laktace, zatímco prvotelky jsou infikovány před nebo krátce po otelení (Taponen a Pyörälä, 2009).

Práce je zaměřena na výskyt stafylokokových druhů v nosní sliznici mléčných a masných krav.

## Materiál a metody

### Původ vzorků

V průběhu roku 2017 bylo odebráno 25 vzorků z nozder od masných krav (1 farma s chovem plemene Blonde d'Aquitaine) a 40 vzorků od krav mléčných (2 farmy s chovem holštýnského plemene). Stěry byly provedeny výtěrovou tyčinkou (Amies s aktivním uhlím, Dispolab, CZ). Během transportu byly vzorky uchovány v termoboxu při teplotě  $5 \pm 2$  °C a po převozu do laboratoře ihned analyzovány.

### Mikrobiologické analýzy

Vzorek na výtěrové tyčince byl rovnoměrně rozetřen na povrch krevního agar (HiMedia, Indie) a Baird Parker agar (HiMedia, Indie) a kultivován při teplotě 37 °C/24 hodin (48 hodin u Baird Parker agaru). Všechny kolonie podezřelé podle fenotypových vlastností růstu na druh *Staphylococcus* byly znovu přeočkovány na krevní agar a inkubovány při teplotě 37 °C/24 hodin a následně identifikovány pomocí koagulázového testu, STAPHYtestu

**Tab. 1** Výsledná druhová identifikace koaguláza-negativních stafylokoků

mléčné krávy		masné krávy
1. farma	2. farma	1. farma
<i>S. equorum</i> (2; 10 %)	<i>S. epidermidis</i> (4, 20 %)	<i>S. epidermidis</i> (2, 8 %)
<i>S. haemolyticus</i> (1; 5 %)	<i>S. equorum</i> (2, 10 %)	
<i>S. xylosus</i> (1; 5 %)		
<i>S. warneri</i> (1; 5 %)		

a identifikačního programu TNW Pro 7.0 (Pliva-Lachema, Brno) a metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Bruker Daltonics s iontovým zdrojem microSCOUT a analyzátozem doby letu TOF ve spojení se softwarovým systémem MALDI Biotyper, SVÚ Jihlava).

## Výsledky a diskuse

Výsledky druhové identifikace jsou shrnuty v Tabulce 1. Je zajímavé, že v žádném ze vzorků nebyl potvrzen výskyt *S. aureus*. Což se může vysvětlit i tím, že *S. aureus* je kontagiózní patogen a nedochází tak ke vzájemnému styku přes vemeno mezi zvířaty, zatímco u CNS je obtížné na základě současných znalostí určit, zda se druhy CNS chovají jako kontagiózní nebo environmentální patogeny. CNS se méně často se podílí na klinicky manifestačních infekcích. Stupeň patogenity je spojen s řadou faktorů virulence specifických pro druh a kmen a je zřejmé, že CNS vykazují méně virulentních vlastností než *S. aureus* s odlišným spektrem onemocnění (Becker a kol., 2014). Nicméně zase kontrolní opatření namířená proti kontagiózním patogenům mastitidy, jako je dezinfekce dojenic po dojení, snižují i infekce CNS ve stádě (Taponen a Pyörälä, 2009; Nejeschlebová a kol., 2015).

Z nosní sliznice mléčných krav byly identifikovány koaguláza-negativní druhy *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* a *S. xylosus* a u krav bez tržní produkce mléka (KBTPM) pouze *S. epidermidis*. (Tabulka 1). V předchozích letech (2003 až 2012) jsme naopak izolovali

**Tab. 2** Výskyt *Staphylococcus* spp. a jejich rezistentních kmenů k meticilinu (Vyleťelová a kol., 2011)

Vzorek	Původ	Počet vzorků	Identifikace	Počet izolátů	MRS (%)	MRS z celkem MRS (%)
Krávské mléko	bazénové mléko	703	<i>S. aureus</i>	326	20 (6,1)	40
			<i>S. epidermidis</i>	7	7 (100)	14
			<i>S. haemolyticus</i>	1	0 (0)	0
	individuální mléko	724	<i>S. aureus</i>	180	3 (1,7)	6
			<i>S. epidermidis</i>	4	1 (0,3)	2
			<i>S. haemolyticus</i>	29	1 (3,5)	2
			<i>S. chromogenes</i>	24	6 (25)	12
Kozí mléko	bazénové mléko	1	<i>S. aureus</i>	1	0 (0)	0
	individuální mléko	75	<i>S. aureus</i>	20	1 (5)	2
			<i>S. epidermidis</i>	3	3 (100)	6
Ovčí mléko	bazénové mléko	38	<i>S. aureus</i>	11	0 (0)	0
	individuální mléko	89	<i>S. aureus</i>	1	0 (0)	0
			<i>S. haemolyticus</i>	2	0 (0)	0
			<i>S. caprae</i>	1	0 (0)	0
Nosní sliznice	zvířata	81	<i>S. aureus</i>	15	0 (0)	0
			<i>S. epidermidis</i>	6	6 (100)	12
Stěry nosu a rukou	člověk	18	<i>S. aureus</i>	3	1 (33,3)	2
Celkem		1729		634	49 (7,7)	100

ze sliznice od dojníc a od KBTPM pouze *S. aureus*, v navazujících letech 2013 až 2016 potom i koaguláza negativní druhy *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. xylosum*, *S. equorum* (Vyleťelová a kol. 2001; Klimešová a kol., 2017). Taponen a kol. (2006) uvádějí u subklinických i klinických mastitid *S. chromogenes* a *S. simulans* jako nejčastěji izolovaný druh.

Nebezpečí výskytu CNS spočívá v jejich možné rezistenci na antibiotika, a tím se stávají i terapeuticky náročnými kvůli velkému podílu kmenů rezistentních na meticilin a rostoucímu počtu izolátů s nižší citlivostí na glykopeptidy (Becker a kol., 2014). Toto zjištění představuje vážný problém neboť CNS jsou významnými původci mastitid dojníc. Gentilini a kol. (2002) uvádí ve své studii nárůst rezistence CNS izolovaných z mastitid dojníc k penicilinu, oxacilinu, erythromycinu a pirlimycinu, Vyleťelová a kol. (2011) izolovali z prvovýroby mléka dojníc methicilin rezistentní kmeny koaguláza negativní stafylokoky (MR CNS), *S. epidermidis* (65 %), *S. chromogenes* (25 %) a *S. haemolyticus* (3,1 %).

*S. epidermidis* je spolu s *Corynebacterium* spp. běžným obyvatelům nosní sliznice u lidí a zvířat spojených s lidskou péčí. V případě kolonizace respiračního traktu se oba chovají jako antagonisté k *S. aureus* (Lina a kol., 2003). Vyšší četnost výskytu *S. epidermidis* nejen v nosní sliznici, ale i v mléce a prostředí hospodářských zvířat byla potvrzena i v předchozích pracích (Vyleťelová a kol., 2011; Klimešová a kol., 2017). Navíc, *S. epidermidis* byl nejčastěji izolovaným rezistentním druhem (Tabulka 2). Vzhledem k tomu, že se v posledních deseti letech objevují u hospodářských zvířat včetně dojeného skotu i specifické klony methicilin rezistentních bakterií *S. aureus* (MRSA), které jsou velmi často multirezistentní, mohou se tak šířit nejen na zvířata, ale i na člověka a vyvolávat méně i více závažná onemocnění (Seguin a kol., 1999; Klimešová a kol., 2017). K nejzávažnějším rezistencím patří ty, které se šíří prostřednictvím plasmidů a to mezidruhově i mezirodově. Nezáleží pak na tom, zda se tyto mechanismy rezistencí vyskytují u patogenních či nepatogenních bakterií (Forbes a Schaberg, 1983; Bloemendaal a kol., 2010; Vaidya, 2011).

## Závěr

Rezistentní kmeny představují vážné riziko nejen v humánní, ale i veterinární medicíně. Vzhledem k možnému mezidruhovému a mezirodovému přenosu rezistence je nutné zaměřit pozornost nejen na běžně se vyskytující problematické patogeny, ale i na možné šíření rezistentních kmenů. I když se CNS méně často podílí na klinicky manifestačních infekcích, je jejich význam důležitý jak ve veterinární praxi, tak v oblasti ochrany zdraví lidí a také v mlékařském průmyslu.

## Poděkování

Tato publikace vznikla za podpory projektů NAZV KUS QJ1510216 a projektu MZe č. RO1417.

## Literatura

- BECKER K., HEILMANN CH., PETERS G. (2014): Coagulase-negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 27 (4): 870-926. doi: 10.1128/CMR.00109-13
- BLOEMENDAAL A. L. A., BROUWER E. C., FLUIT A. D. C. (2010): Methicillin resistance transfer from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a patient during antibiotic therapy. *Plos ONE*, 2010, 5: 1-5. doi.org/10.1371/journal.pone.0011841
- FORBES B. A., SCHABERG D. R. (1983): Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*: evidence for conjugative exchange of resistance. *Journal of Bacteriology*, 153 (2): 627-634. ISSN 0021-9193
- GENTILINI E., DENAMIEL G., BETANCOR A., REBUELTO M., FERMEPIN M. R., DE TORRES R. (2002): Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of Dairy Science*, 85: 1913-1917.
- GORDON Y. C., CHEUNG G. Y. C., RIGBY K., WANG R., QUECK S. Y., BRAUGHTON K. R. et al. (2010): *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. *PLoS One*, 6 (10): e1001133. doi:10.1371/journal.ppat.1001133
- CHEN S., WANG Y., CHEN F., YANG H., GAN M., ZHENG S. J. (2007): A highly pathogenic strain of *Staphylococcus sciuri* caused fatal exudative epidermitis in piglets. *PLoS ONE*, 2 (1): e147. doi:10.1371/journal.pone.0000147.
- KLIMEŠOVÁ M., HANUŠ O., NEJESCHLEBOVÁ L., NEJESCHLEBOVÁ H. (2017): Occurrence of resistant *Staphylococcus* spp. strains in animal rearing. In Proceedings of The IRES International Conference, Hanoi, Vietnam, 25th-26th June 2017.
- LINA G., BOUTITE F., TRISTAN A., BES M., ETIENNE J., VANDENESCH F. (2003): Bacterial competition for human nasal cavity colonization: Role of *Staphylococcal agr* alleles. *Applied Environmental Microbiology*, 69 (1): 18-23. doi: 10.1128/AEM.69.1.18-23.2003
- MURRAY P. R., BARON E. J., PFALLER M. A., TENOVER F. C., YOLKEN R. H. (1999): Manual of clinical microbiology. 7th edition. *American Society for Microbiology*, 1999.
- NEJESCHLEBOVÁ H., KLIMEŠOVÁ M., HANUŠ O., NEJESCHLEBOVÁ L. (2015): Environmentální a kontagiózní mastitidní patogeny na mléčné farmě. *Náš chov*, LXXV, 7: 28-30. ISSN 0027-8068
- NOVÁKOVA D., SEDLÁČEK I., PANTUČEK R., ŠTĚTINA V., ŠVEC P., PETRÁŠ P. (2006): *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 523-528. DOI.10.1099/jmm.0.46246-0
- SEGUIN J. C., WALKER R. D., CARON J. P., KLOOS W. E., GEORGIE C. G., HOLLIS R. J., JONES R. N., PFALLER M. A. (1999): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (5): 1459-1463. ISSN 0095-1137.
- TAPONEN S., SIMOJOKI H., HAVERI M., LARSEN H. D., PYÖRÄLÄ S. (2006): Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API and AFLP. *Veterinary Microbiology*, 115: 199-207. doi:10.1016/j.vetmic.2006.02.001
- TAPONEN S., PYÖRÄLÄ S. (2009): Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, 134 (1-2): 3-8. doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.015
- THORBERG B. M. (2008): Coagulase-negative staphylococci in bovine sub-clinical mastitis. Licentiate Thesis, Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health, Swedish University of Agricultural Sciences, 2008 Uppsala.
- VAIDYA V. K. (2011): Horizontal Transfer of antimicrobial resistance by extended-spectrum  $\beta$  lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Laboratory Physicians*, 3 (1): 37-42, Jan. 2011. doi:10.4103/0974-2727.78563
- VYLEŤELOVÁ M., VLKOVÁ H., MANGA I. (2011): Occurrence and characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant coagulase-negative *Staphylococci* in raw milk manufacturing. *Czech Journal of Food Sciences*, 29 (Special issue): S11-S16. ISSN 1212-1800.

## Korespondující autor:

doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D., Výzkumný ústav mlékařenský s.r.o., Ke Dvoru 12 a, 160 00 Praha 6  
marcela.vyletelova@seznam.cz

Přijato do tisku: 11. 9. 2017

Lektorováno: 20. 9. 2017