

Mikrobiologie syrového kravského mléka,
dynamika rezistence - **výskyt**
rezistentních kmenů *Staphylococcus*
spp. v chovech zvířat

doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D.

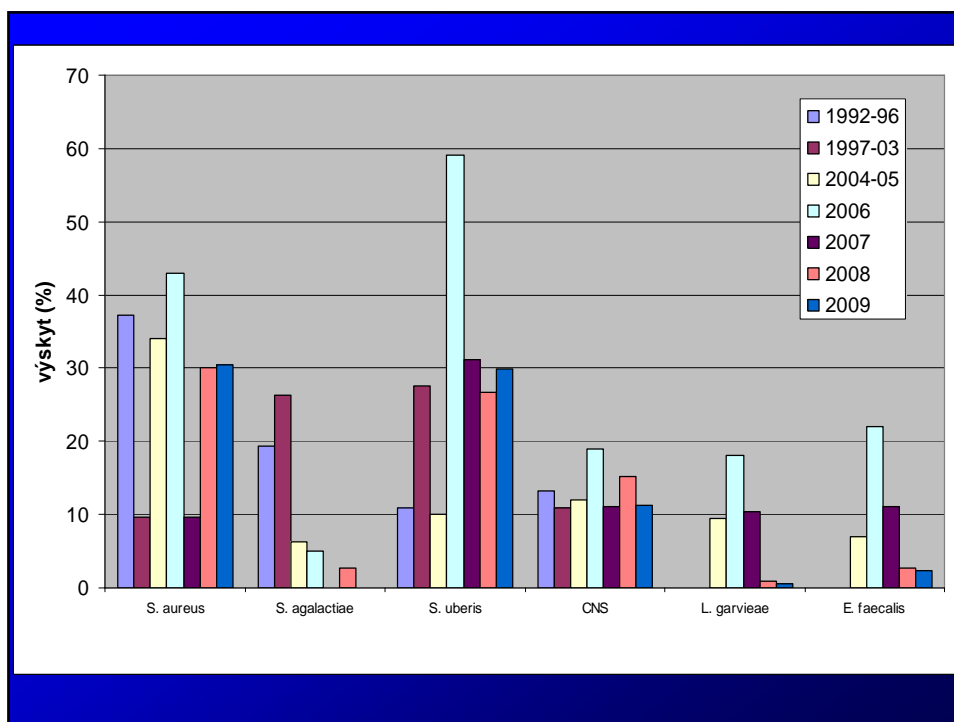
Výzkumný ústav mlékárenský Praha

Dny prvovýroby mléka 2016

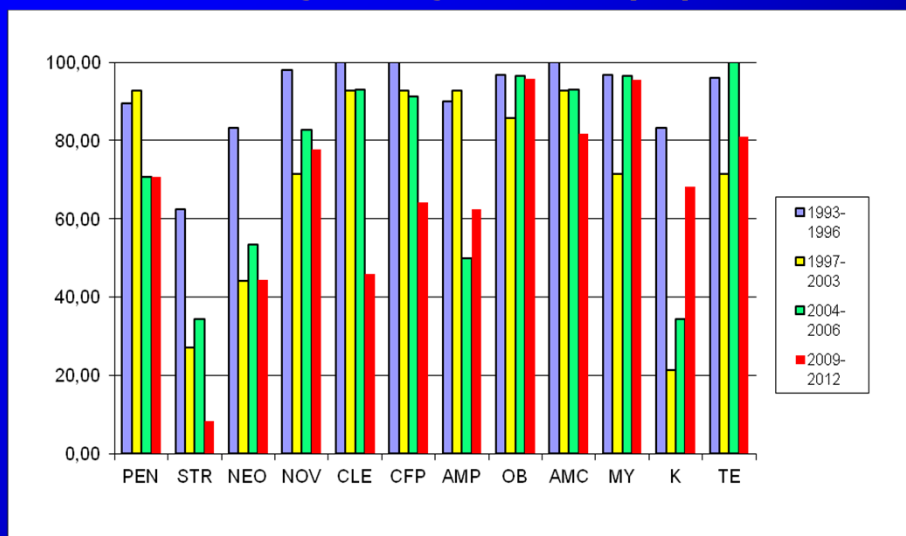
Hustopeče, 3. – 4. 11. 2016

Vývoj vybraných mastitidních druhů

	SA	STA	SU	SH	n	Izol.
1993-6	37,2	19,4	10,9	13,2	4485	129
1997-3	9,6	26,3	27,6	10,9	5515	156
2004-5	34,1	6,2	10	8,2	1547	452
2006	21,4	2,5	29,4	5	569	201
2007	9,6	0	31,1	3,7	370	135
2008	30,1	2,6	26,6	9,6	903	229
2009	21,7	0	29,9	6,0	489	167
2010	10,4				732	201
2011	5,5				603	219
2012	18,9				836	281
CELKEM						
%	26,8	7,1	21,4	8,0	13834	1469



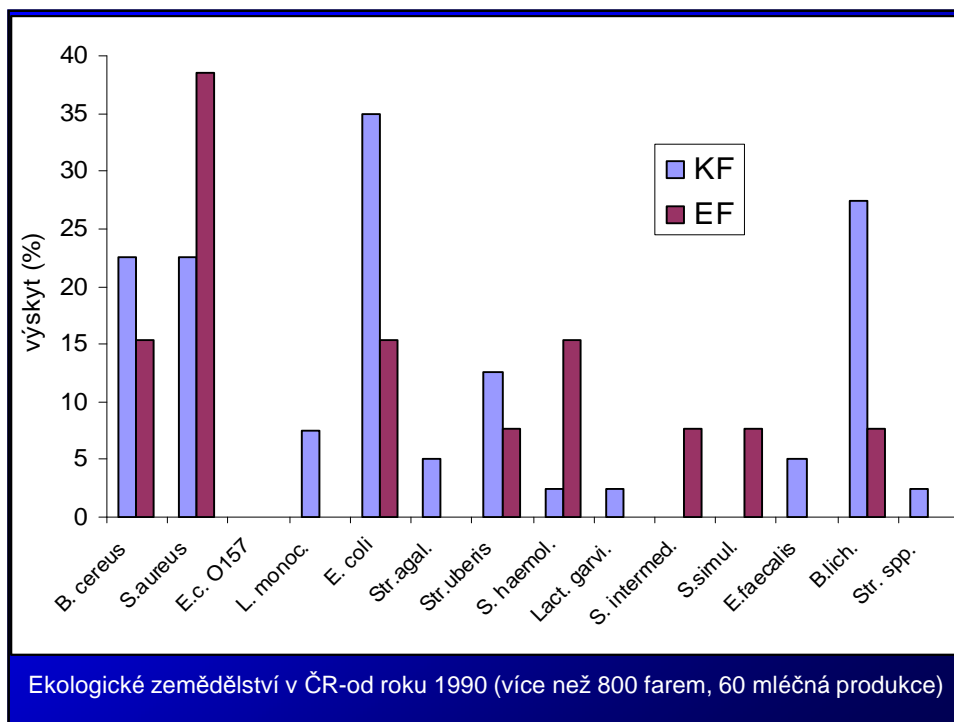
Vývojový graf citlivosti *S. aureus* k vybraným ATB (%)



Vyjma cloxacilin OB, linkomycin MY, u ostatních nárůst > 15%; STR 54,2%

Srovnání výskytu *S. aureus* a jiných patogenů v konv. a ekol. chovech

	Konvenční farmy (n=40)			Ekologické farmy (n=18)		
	počet	%	CFU/ml	počet	%	CFU/ml
CPM (CFU/ ml)	1.4.10 ⁴ - 2.0.10 ⁶			9.10 ³ - 2,6.10 ⁵		
<i>S. aureus</i>	9	22,5	<1 - 1.0.10 ³	5	38,5	<1 - 2.2.10 ²
<i>S. agalactiae</i>	2	5	<1 - 9.0.10 ²	0	0	<1
<i>S. uberis</i>	5	12,5	<1 - 1.3.10 ³	1	7,7	<1 - 2.0.10 ²
<i>S. haemol.</i>	1	2,5	<1 - 4.0.10 ¹	2	15,4	<1 - 7.0.10 ¹
<i>S. intermedius</i>	0	0	<1	1	7,7	<1 - 3.0.10 ²
<i>S. simulans</i>	0	0	<1	1	7,7	<1 - 4.0.10 ¹
<i>L. garvieae</i>	1	2,5	<1 - 3.2.10 ²	0	0	<1
<i>E. faecalis</i>	2	5	<1 - 8.8.10 ²	0	0	<1
<i>E. coli</i>	14	35	<1 - 1.6.10 ²	2	15,4	<1 - 3.0.10 ²
<i>Strep. spp.</i>	1	2,5	<1 - 1.2.10 ³	0	0	<1



Problematika rezistentních kmenů

- MRSA – první izolované kmeny od lidí v roce 1960, později potvrzené u zvířat, hlavně prasat
- Postoperační infekce – příčina úmrtí, nebezpečí přenosu od bacilonosičů
- Nebezpečí přenosu mezi humánními a animálními kmeny
- Nebezpečí přenosu mezidruhově, tzn. Přenos nejen uvnitř druhu *S. aureus*, ale i *S. aureus* a *S. epidermidis*

Methicilin rezistentní *S. aureus* – rozdělení podle výskytu

- MR *S. aureus* - 3 skupiny podle jejich genetických a epidemiologických charakteristik: jsou to HA-MRSA (hospital acquired), CA-MRSA (community associated) a LA-MRSA (livestock associated)
- Liší se: v citlivosti na antibiotika, v místech a velikostech chromozomální kazety (SCCmec), genovou expresí enterotoxinů apod.

Kmeny CA-MRSA byly poprvé hlášeny koncem 90. let 20. století u pacientů, kteří nepobývali ve zdravotnickém zařízení. Později se ukázalo, že infekce CA-MRSA byly způsobovány kmeny MRSA, které se lišily od dříve studovaných nemocničních kmenů. Nové kmeny CA-MRSA se rychle rozšířily po USA (např. klon USA300) a staly se nejčastější kožní infekcí u běžných občanů. Tyto kmeny také často způsobují kožní infekce u atletů, vězňů a vojáků.

Odběr vzorků

Kravné mléko	bazénové vzorky	703
	individuální vzorky	724
	stěr z nozder	81
	personál	18
Kozí mléko	individuální vzorky	75
Ovčí mléko	bazénové vzorky	39
	individuální vzorky	89
Celkem		1729

Identifikace MRS

- Inkubace vzorků při 37 °C/ 20 h v 5 ml Mueller – Hinton bujónu s přidavkem 6,5 % NaCl,
- 1 ml inokula sekundárně inkubován při 37 °C/ 20 h ve 4 ml TSB + 3,5 mg/l cefoxitinu + 75 mg/l aztreonamu),
- Baird – Parker agar, krevní agar a selektivní ORSAB,

- Identifikace STAPHY test a TNW pro 7.0 a Biolog III
- ATB disky oxacilin, tetracyklin, erytromycin, chloramfenikol, Ko-trimoxazol, amoxicilin)klavulan. kys., klindamycin, gentamicin, ciprofloxacin, vankomycin, teikoplanin, rifampicin, cefoxitin,
- Identifikace SA 442 fragmentu (identifikace *Staphylococcus aureus*) a *mecA* nebo *mecC* genu kódujícího rezistenci k methicillinu

Výsledky MRS

Druhové zastoupení		Počet	%	MRS	%
MRSA	<i>S.aureus</i>	557	87,72	25	4,5
	<i>S. hyicus</i>	1	0,16	1	100
MR-CNS	<i>S.epiderm.</i>	20	3,15	17	85
	<i>S.haemolyt.</i>	32	5,04	1	3,1
	<i>S. chromog.</i>	24	3,78	6	25
	<i>S. caprae</i>	1	0,16	0	0
	celkem	635		50	7,9

Koaguláza pozitivní – *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*

MRS v prvovýrobě kravského mléka

MRS=50	Bazénové mléko			Individuální		
	S.sp.	MR	%	S.sp.	MR	%
MRSA	326	20	6,13	180	3	1,67
MRSHY	neg.			1	1	100
MRSE	7	7	100	4	1	25
MRSH	1	0	0	29	1	3,45
MRSCH	neg.			24	6	25

MRS v prvovýrobě kravského mléka

MRS=50	Nos.dut. krav			Personál		
	S.sp.	MR	%	S.sp.	MR	%
MRSA	15	0	0	3	1	2
MRSHY	neg.			neg.		
MRSE	6	6	12	neg.		
MRSB	neg.			neg.		
MRSCH	neg.			neg.		

MRS v kozím mléce

MRS = 50	Individuální		
	S.sp.	MR	%
MRSA	20	1	5
MRSE	3	3	100

MRS v ovčím mléce

	Bazénové mléko			Individuální		
	MRS = 50	S.sp.	MR	%	S.sp.	MR
MRSA	12	0	0	1	0	0
MRSH	neg.			2	0	0
MRSCA	neg.			1	0	0

Citlivosti k ostatním ATB

nález	OX	TE	E	C	SXT	AMC	DA	CN	CIP	VA	TEC	RD	FOX
<i>S. haemolyticus</i>	V	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	V	+
<i>S. haemolyticus</i>	V	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	V	+	V	+	V	+	V	+	-	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	V	+	-	+	+	-	V	V	V	+	+	+	+
<i>S. haemolyticus</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
Staph.aureus	-	+	+	+	+	-	+	+	V	+	+	+	+
Staph.aureus	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	V
Staph.aureus	-	-	+	+	+	-		-	+	+	+	+	V
Staph. haem.	-	-	+	+	+	-		-	+	+	+	+	-
Staph.aureus	-	+	+	+	+	-	V	V	+	+	+	+	V
Staph.aureus	-	-	+	+	+	-		-	+	+	+	+	V
<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	+	+	-	V	+	-	+	+	+	V
<i>S. haemolyticus</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>S. haemolyticus</i>	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-

OX (oxacillin), T tetracycline, E (erythromycin), DA (clindamycin), SXT (trimethoprim-sulfamethoxazole), AMC (amoxicillin-clavulanic acid), C (chloramphenicol), CN (gentamicin), CIP (ciprofloxacin), VAN (vancomycin), TEC (teicoplanin), RD (rifampicin), FOX (cefoxitin), NV (novobiocin)

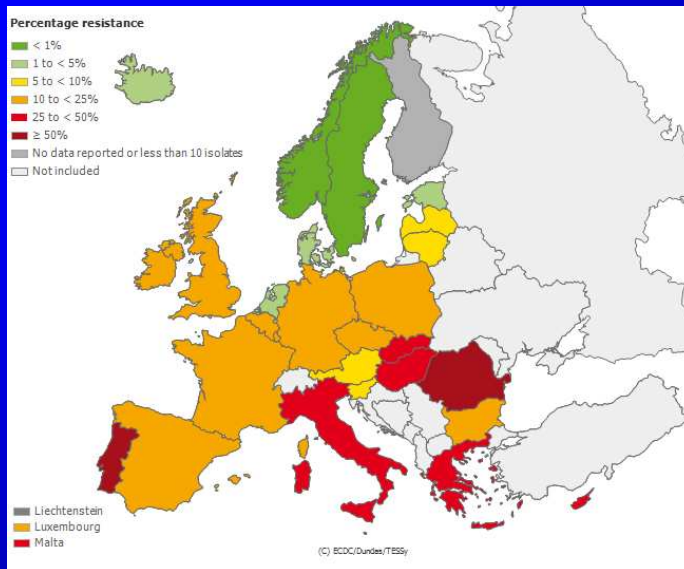
Predikční tabulka pro *S. aureus*

bazén CFU/ml <i>S.</i> <i>aureus</i>	odhad prevalence	hranice spolehlivosti (90%)		odhad počtu SB
				(tis)
0	0	0	3	150
10	1,7	0	8	160
50	7,3	0	17,7	180
100	12,6	2,1	26	210
200	20,5	5,7	38,4	240
300	26,7	8,5	47,8	290
500	36,2	12,7	62,6	360
700	43,5	15,8	74,2	410
1000	52,1	19	88,3	450
1500	62,9	22,3	100	600

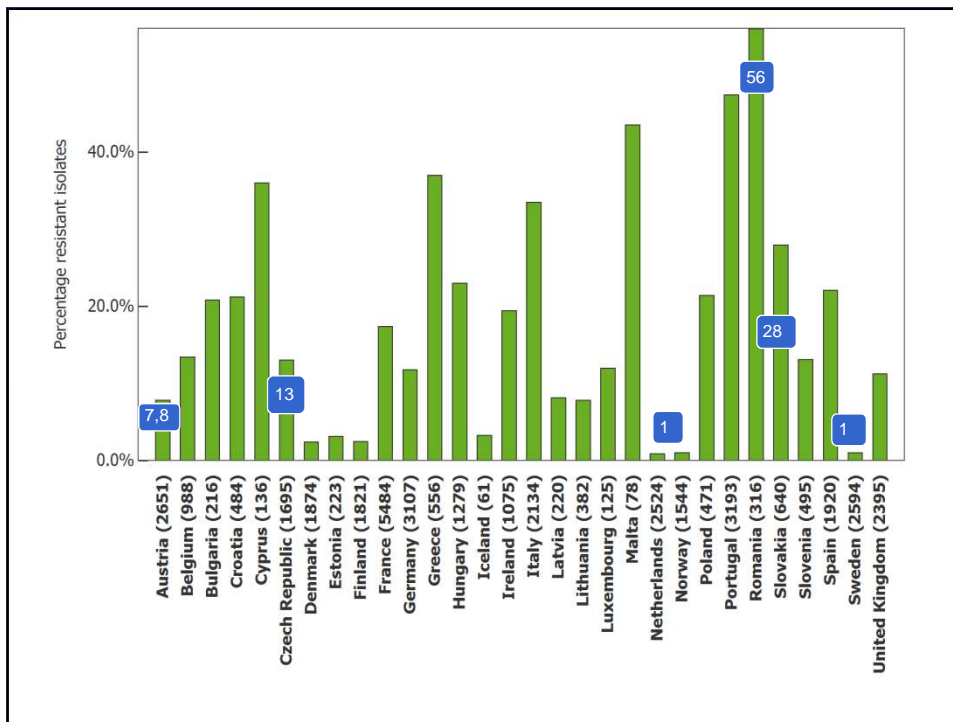
Hodnocení chovu podle výskytu *S. aureus* v bazénovém vzorku mléka

<i>S. aureus</i> (CFU/ml)	Hodnocení
10 - 40	chov bez problémů
50 - 190	slabé, únosné promoření, malý vliv na obsah SB
200 - 490	silnější výskyt patogenů, možný vliv na obsah SB
500 - 890	velmi závažné promoření patogeny, značný vliv na SB
900 a více	typ mastitidního chovu, značný vliv na obsah SB

Mapa MRSA v Evropě (2014)



ECDC - Evropské centrum pro prevenci a kontrolu onemocnění



	1. hlášení		2010	2011	2012	2013	2014
Holandsko	1999	0,3	1,2	1,4	1,3	1,2	1,0
Norsko	1999	0,0	0,6	0,3	1,3	0,7	1,0
Švédsko	1998	0,0	0,5	0,8	0,7	1,0	1,0
Dánsko	2000	0,2	1,3	1,2	1,3	1,7	2,5
Finsko	1998	0,0	2,3	3,2	2,1	1,8	2,5
Estonsko	2001	5,1	0,7	1,7	7,7	3,5	3,1
Island	1999	0,0	1,5	2,8	1,7	0,0	3,3
Rakousko	2000	17,8	7,4	7,4	7,7	9,2	7,8
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
UK	1999	36,0	21,6	13,6	14,0	13,8	11,3
Německo	1999	8,3	20,8	16,2	15,4	12,7	11,8
Lucembursko	1999	16,0	16,5	20,5	15,3	9,0	12,0
ČR	2000	4,3	13,5	14,5	13,0	13,2	13,0

	1. hlášení		2010	2011	2012	2013	2014
ČR	2000	4,3	13,5	14,5	13,0	13,2	13,0
Slovinsko	2000	21,1	12,0	7,1	10,3	9,0	13,1
Belgie	1999	23,1	20,5	17,4	16,6	16,9	13,5
Francie	2001	33,4	21,6	20,1	19,2	17,1	17,4
Irsko	1999	40,0	23,9	23,7	22,6	19,9	19,4
Bulharsko	2000	40,2	19,0	22,4	19,8	19,2	20,8
Chorvatsko	2001	30,9	26,1	27,7	21,3	24,0	21,3
Polsko	2001	15,9	13,1	24,3	25,4	16,0	21,4
Maďarsko	2001	4,7	30,2	26,2	24,8	24,0	23,1
Slovensko	2001	5,4	xxx	26,1	21,7	26,6	28,0
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
Řecko	1999	33,9	39,2	39,2	41,0	40,3	37,1
Malta	2000	35,5	48,1	49,2	47,5	53,8	43,6
Portugalsko	1999	36,9	53,4	54,6	53,8	46,8	47,4
Rumunsko	2002	36,3	39,1	49,5	53,3	64,5	56,0





Děkuji za pozornost