

Agritec Plant Research s.r.o.

Zemědělská 2520/16

787 01 Šumperk



Uplatněná certifikovaná metodika MRS 1

(typ výsledků „N“ – Uplatněná certifikovaná metodika)

**Postup při kontrole výskytu bakterií rodu *Staphylococcus* a
jejich rezistentních kmenů u masného skotu a malých
přežvýkavců**

Zpracovala dne: 2.11.2012

RNDr. Marcela Vyletělová, Ph.D., Mgr. Ivan Manga, Ph.D., Agritec Plant Research s.r.o.

I) Cíl metodiky

Cílem metody je zavedení postupu průběžné kontroly šíření rezistentních kmenů v prostředí prvovýroby masa, eliminace jejich výskytu a možného přenosu mezi zvířaty, včetně přenosu mezi masnými a dojnými zvířaty, a přenosu mezi zvířetem a člověkem. Metoda je praktickou pomůckou pro rychlou eliminaci infekcí způsobených bakteriemi rodu *Staphylococcus* a praktickou pomůckou pro odhad možného přenosu a šíření v prvovýrobě potravinových zvířat.

II) Vlastní popis metodiky

Nebezpečí šíření rezistentních kmenů

V posledních letech je alarmující nárůst rezistentních bakteriálních druhů jak v humánní, tak veterinární medicíně. Vzhledem k tomu, že se bakterie rodu *Staphylococcus* běžně vyskytují v prostředí prvovýroby mléka, je možné jeho šíření i na masný skot a jiná společně chovaná zvířata. Výskyt bakterií rodu *Staphylococcus* a jejich rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* (MRSA) a koaguláza-negativních rezistentních stafylokoků (CN-MRS) byl původně popsán v humánní medicíně. V roce 2005 byl však výskyt MRSA potvrzen i u zvířat a od té doby začínají být kmeny MRSA sledovány také ve veterinárním lékařství, a to především u potravinových zvířat. Bylo prokázáno, že infikovaná nebo kolonizovaná zvířata se mohou snadno uplatňovat při šíření těchto kmenů nejenom navzájem, ale i na chovatele a na potravinové suroviny. U zvířat chovaných pro potravinové účely se může šířit i na potravinové suroviny určené k dalšímu zpracování a ke konzumaci, kterým je např. mléko. Z hospodářských zvířat byl vedle skotu popsán výskyt MRSA rovněž u koní a drůbeže, ale především u prasat.

Postup při odběru vzorků

Kontrolu výskytu MRSA a CN-MRS u potravinových zvířat (skot, malí přežvýkavci) je možné provádět pouze v případě fixace zvířat. Kontrola se většinou provádí současně s odběrem krve a vakcinací zvířat. K odběru se používají sterilní stěrové tyčinky, které se přepravují do laboratoře ve transportním médiu s Amiesovou půdou, a houbičky s obsahem pufrované protonové vody. Odebírá se stěr z nosní dutiny a z okolí tlamy a nozder. Odebrané vzorky se přepravují do laboratoře v chladicím boxu o teplotě $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Pokud se jedná o chovy současně masného i dojného skotu je vhodné provést odběr i směsného vzorku mléka. Kontrola šíření rezistentních kmenů tímto způsobem je přístupnější a monitoring může být provádět častěji. Mléko se odebírá ze všech struků do jedné vzorkovnice, které se transportují za stejných podmínek do mikrobiologické laboratoře. Vzorky od ošetřujícího personálu se odebírají pomocí sterilních výtěrových tyčinek z ústní (nosohltan), nosní dutiny a rukou.

Identifikace bakteriálních druhů, rezistence k ATB

K mikrobiologickému vyšetření vzorků se používají selektivní půdy Baird Parker, ORSAB a pomnožování půdy s ATB (TSB+AZT+CXT: TSB + 3,5 mg/l cefoxitin+ 75 mg/l aztreonam). Izolované druhy jsou dále identifikovány pomocí biochemických testů STAPHYtest a identifikačního programu TNW pro 7,0. Kmeny potvrzené jako *S. aureus* jsou vyšetřeny pomocí diskové difúzní metody na citlivosti k oxacilinu a současně je provedena i detekce *mecA* genu pomocí PCR metody pro potvrzení MRSA.

PCR identifikace kmenů MRSA

Izolace bakteriální DNA

Templátová DNA pro PCR byla izolována z plotnových kultur kmenů *S. aureus*. Malé množství kultury (3-5 μl) bylo odebráno bakteriologickým očkem do čisté zkumavky se 180

μl lyzačního pufru (20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 8) obohaceného o lysozym (20 mg/ml). Po inkubaci 30-60 min při 37 °C byla ke vzorkům přidána proteináza K (25 μl, 20 mg/ml). Kompletní lýza byla dosažena inkubací při 56 °C během 1-3 h. Pro další postup izolace byl využit NucleoSpin Tissue kit (Macherey Nagel Inc., Hoerd, France) dle standardního protokolu. Kontrola koncentrace a kvality izolované DNA byla provedena s pomocí spektrofotometru. Metoda se vyznačovala vysokou efektivností izolace a vysokými hodnoty koncentrace získaných izolátů (standardně 250-500 ng/ μl). Pro izolaci DNA lze samozřejmě využít jakýkoliv protokol izolace DNA (např. fenol-chloroformovou extrakci).

Archivace vzorků izolované DNA

Izoláty DNA určené k testaci do několika dnů se uskladňují při 3-5 °C, pro dlouhodobé uskladnění vzorků se doporučuje zamražení na -30 °C, případně -80 °C.

PCR identifikace MRSA

Pro detekci kmenů MRSA byla použita PCR metoda identifikace genu *mecA*, kódujícího rezistenci na meticilin. Sekvence použitých primerů, designovaných programem eprimer3 (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::eprimer3>), byly následující:

přímý: *mecA* F 5 - ACGAGTAGATGCTCAATA - 3

zpětný: *mecA* R: 5 - CTGGAATAATGACGCTATG - 3

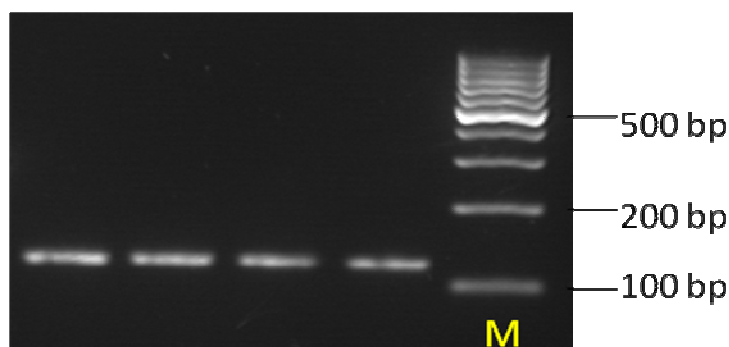
Použitý teplotní a časový profil PCR reakce je uveden v Tab.1. PCR byla prováděná v objemu 25 μl s použitím PPP master mixu (Top-Bio, s.r.o., Praha, Česká republika) obsahujícího Taq DNA polymerázu, s 0,5 μM koncentrací primerů a cca 50 - 150 ng templátové DNA. PCR pufr byl ředěn ultra čistou PCR vodou (Top-Bio, s.r.o., Praha, Česká republika). Přirozeně, k amplifikaci lze použít master mixy různých výrobců, nebo PCR směs namíchanou individuálně z jednotlivých komponentů.

K elektroforetické separaci získaných PCR produktů barvených etidiumbromidem byl použit 3 % agarózový gel (90-110V/ 1h). Výsledek byl vizualizován UV světlem a fotograficky dokumentován (Canon Ultra Cam.). Velikost PCR produktů byla vyhodnocena s pomocí markeru GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, GmbH, St.Leon-Rot, Germany). Metoda zajišťovala specifickou amplifikaci fragmentu genu *mecA* o velikosti 125 bp. Pozitivní PCR test, potvrzující přítomnost kmenů MRSA, ilustruje Obr.1.

Tab.1. Teplotní a časový profil PCR identifikace MRSA

| PCR program | úvodní denaturace | denaturace | annealing | elongace | závěrečná elongace | počet cyklů |
|-------------|-------------------|------------|-----------|----------|--------------------|-------------|
| | 95°C/4min | 94°C/30s | 57°C/30s | 72°C/25s | 72°C/6min | 38 |

Obr.1 PCR genu *mecA*



Kontrola výsledků

Pro vyloučení získání falešně negativních výsledků při identifikaci MRSA byla využívána kontrola amplifikace, která představovala PCR amplifikaci genu *femB*. Gen je dle literárních pramenů (Primer Design Ltd., UK, Genesig *S. aureus* quantification kit, <http://www.primerdesign.co.uk>) a také dle in silico analýzy, provedené programem BLAST (www.ncbi.nih.gov/), přítomný u všech popsanych kmenů *S. aureus*.

Pro PCR amplifikaci (194 bp) byly použity následovné primery:

přímý: 5' - AAGCCAAGTACGATGGATGG - 3'

zpětný: 5' - ATCCAGCACGCTCTTCAGTT - 3'

Při analýze je výhodné používat také negativní kontrolu (kompletně připravený PCR master mix bez DNA), případně i pozitivní kontrolu (testování referenčního kmene MRSA).

Riziko výskytu, určení původu

Výsledkem je zpráva o možném pozitivním/negativním výskytu sledovaných patogenních mikroorganismů. V případě pozitivního nálezu je možné zpracování odhadu o horizontálním nebo vertikálním šíření rezistentních kmenů ve sledovaném chovu. Na základě příbuznosti je možné dále provést pomocí PCR metody srovnání izolovaných kmenů a určení původu kontaminace.

III) Srovnání novosti postupů

Jedná se o implementaci dosažených výsledků do prostředí prvovýroby, které byly získány na základě dřívějšího výzkumu a vývoje a v rámci řešení daného projektu a v rámci koordinační a konzultační metodické činnosti mikrobiologické a molekulární laboratoře. Získané výsledky budou nadále ověřovány v praxi. Metodiku jako takovou nelze srovnávat u nás s jinými dostupnými metodikami, neboť se v současné době jako preventivní opatření nevyužívá.

Novost metodiky spočívá v tom, že podává prvovýrobcům masa nový přehled o zdravotním stavu stáda, o možných ekonomických dopadech z důvodů nutností na výdaje

v rámci léčebného postupu a dále o ekonomických ztrátách v případě šíření rezistentních kmenů i na jiná společně chovaná zvířata.

IV) Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika může být uplatněna v praxi především v prvovýrobě masa, potažmo i v prvovýrobě mléka, pro zamezení šíření rezistentních kmenů v dané prvovýrobě, pro udržení zdravotního stavu stáda, pro eliminaci přenosu rezistentních kmenů mezi zvířaty a člověkem a pro zamezení následných ekonomických ztrát v případě rozšíření i na mléčná zvířata. Metodiku mohou využívat v poradenské službě i akreditovaní poradci, veterinární lékaři, může být rozhodující i v případě sporů při výskytu rezistentních kmenů v návaznosti na další zpracovatelské podniky (jatká), popřípadě při průniku nežádoucích patogenů do obchodního řetězce.

Metodika vznikla na základě spolupráce v projektu mezi výzkumnou organizací a uživatelem výsledku, který je rovněž součástí projektového týmu a u kterého byla metodika prakticky odzkoušena u masného skotu, ovcí a koz. Tuto metodiku lze rozšířit i na jiná potravinová zvířata jako např. prasata, koně, zvířata chovaná v oborách (jelenovití).

Vyvinutá certifikovaná metodika byla předána do užívání v písemné formě Ing. Gabriele Doupovcové.

V) Ekonomické aspekty

Předpokládané ekonomické přínosy (v tis.Kč) vychází ze zkušeností uživatele. Pokud předpokládáme, že cca 0,05% z celé produkce je vyloučeno z dalšího zpracování vzhledem k mikrobiální kontaminaci, můžeme udělat střízlivý odhad podílu kontaminace stafylokoky v této komoditě pro zpracovatele na částku 50 tis Kč ročně (masný skot, kozy, ovce). V případě

rozšíření infekce na mléčné stádo představují roční přínosy pro daného uživatele částku cca 350 tis. Kč.

Jiným nezanedbatelným přínosem pro uživatele jsou socioekonomické ztráty vzniklé v souvislosti s možným onemocněním u lidí, které se těžko odhadují i z důvodu podhlášenosti stafylokokových onemocnění v ČR.

VI) Seznam použité související literatury

BOŞGELMEZ-TINAZ G., ULUSOY S., ARIDOGAN B., COŞKUN-ARI F. Evaluation of different methods to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* and their clinical laboratory utility. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006, vol. 25, p. 410-412.

CUI S., LI J., HU CH. ET AL. Isolation and characterisation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009, vol. 64, p. 680-683.

KWON N.H., PARK K.T., MOON J.S., JUNG W.K., KIM S.H., KIM J.M., HOMG S.K., KOO H.C., JOO Y.S., PARK Y.H. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapeutics*. 2005, vol. 56, p. 624-632.

LEE J.H., JEONG J.M., PARK Y.H., CHOI S.S, KIM Y.H., CHAE J.S., MOON J.S., PARK H., KIM S., EO S.K. Evaluation of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, vol. 42, p. 2780-2782.

SMITH T., MALE M., HARPER A. ET AL. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in Midwestern U.S. swine and swine workers. *Plos One*. 2009, vol.

4, e4258, on-line.

ŠTÁSTKOVÁ Z., MIŠUROVÁ L., POSPÍŠILOVÁ M., KARPÍŠKOVÁ R. Výskyt meticilin rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* v chovu koz. Sborník textů v plném znění, X. Konference mladých v vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí, VFU Brno. 2008, květen, s. 28-30.

ŠTÁSTKOVÁ Z., MIŠUROVÁ L., KARPÍŠKOVÁ R.. Occurrence of MRSA in live-stock farms. Acta Scientiarum Polonorum, 2008, vol. 7, no. 3, p. 59-64.

KARPÍŠKOVÁ S., ŠTÁSTKOVÁ Z., KARPÍŠKOVÁ R. Nález meticilin rezistentních *Staphylococcus aureus* u potravinových zvířat v ČR. Sborník abstraktů, XV. Konference mladých mikrobiologů, Tomáškovy dny, Brno. 2008, červen, s. 20-21.

ŠTÁSTKOVÁ Z., KARPÍŠKOVÁ S., KARPÍŠKOVÁ R. Findings of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* in livestock. Czech Journal of Food Sciences. 2009, vol. 27, special issue 2, p. S2-36-S2-41.

ŠTÁSTKOVÁ Z., KARPÍŠKOVÁ S., KARPÍŠKOVÁ R. Occurrence of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* at a goat breeding farm. Veterinární medicína. 2009, vol. 54, no. 9, p. 419-426.

KARPÍŠKOVÁ S., ŠTÁSTKOVÁ Z., KARPÍŠKOVÁ R. Nálezy meticilin rezistentních *Staphylococcus aureus* u zvířat. Veterinářství. 2009, vol. 59, no. 1, p. 34-38.

VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

ŠTÁSTKOVÁ Z., KARPÍŠKOVÁ R., KOUKALOVÁ K., BOGDANOVIČOVÁ K. Růst *Staphylococcus aureus* a produkce enterotoxinu SEA v masných výrobcích. (Growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin SEA production in meat products). *Maso*, 2011, vol. 22, no. 5, p. 51-52.

ŠTÁSTKOVÁ Z., KARPÍŠKOVÁ R., KOUKALOVÁ K., BOGDANOVIČOVÁ K. Differentiation of

toxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from retail meat products. Czech Journal of Food Sciences, 2011, vol. 29, Special Issue: S17-S22.

VYLETĚLOVÁ M., VLKOVÁ H., MANGA I. Occurrence and characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant coagulase-negative *Staphylococci* in raw milk manufacturing. Czech Journal of Food Sciences, 2011, vol. Special Issue: 11-16.

VYLETĚLOVÁ M., HANUŠ O., KARPÍŠKOVÁ R., ŠŤÁSTKOVÁ Z. Occurrence and antimicrobial sensitivity in staphylococci isolated from goat, sheep and cow's milk. Acta. univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2011, 3: 209-214.

MANGA I, VYLETĚLOVÁ M., KARPÍŠKOVÁ R., ŠŤÁSTKOVÁ Z. Molecular characterization of MRSA strains isolated from livestock milk and meat in the Czech Republic, In: Book of abstracts from the SfAM Summer Conference, Dublin, Ireland, 4–7.7. 2011, P85, 55-56.

MANGA I, VYLETĚLOVÁ M. Rep-PCR-based typing as a tool for tracking of MRSA infection origin. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2012, LX, No. 6, pp. 251–256.

VIII) Ostatní

Dedikace na projekt:

MZe NAZV KUS QJ1210284

Jména oponentů a název jejich organizací:

1) Odborník z daného oboru: prof. Ing. Gustav Chládek, CSc., Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav chovu a šlechtění zvířat, Zemědělská 1, 613 00 Brno: chladek@seznam.cz

2) Pracovník státní správy: MVDr. Jiří Hlaváček, SVS ČR, Slezská 7, 120 56 Praha 2: j.hlavacek@svscr.cz