

Mechanizmy rezistencie na antibiotiká u animálnych stafylokokov

Prof. MVDr. Vladimír Kmeť, DrSc. - ÚFHZ SAV Košice

MVDr. Štefan Miholics - Regionálna veterinárna a potravinová správa Komárno

MVDr. Gabriela Gadusová - Veterinárny a potravinový ústav Košice

Druhy zvierat

Drobné cicavce

druh *Apodemus* (žerie semená a bezstavovce),

druh *Clethrionomys* (hlavne zelené rastliny a semená)

druh *Sorex*-piskor (hlavne bezstavovce a v zime aj semená)

Ošípané (ciciaky a odstavčatá)

Kravske mlieko a ovčie syry

APVV projekt: Drobné cicavce ako potenciálny zdroj zoonotických baktérií a rezistencie na antibiotiká (2015-2018)

Apodemus agrarius - ryšavka



A. flavicollis



Clethrionomys glareolus - hrdziak



Bakteriálna rezistencia na antibiotiká drobných cicavcov (literárny prehľad)

- Literák a kol. (2010) *izolovali* u ***Apodemus agrarius*** jeden kmeň *E. coli* s *bla*TEM, *cat*, *strA*, *sul1*, *sul2*, *tetB*, integron 1 s kazetou *dhfr12-orf-aadA2*.
- Mallon a kol. (2002) ***vanA*** genotyp *E. faecium* - z ***A. sylvaticus***

Stafylokoky: MRSA a MRCoNS

- **Poliaci Malyzsko a kol., február 2014** z piskora obyčajného (*Sorex araneus*) **izolovali meticilín rezistentný *S. saprophyticus*** (MIC Oxacilínu 32 mg/L and a cefoxitin 4 mg/L).Obsahoval nový *mecC* alotyp, **mecC2**



Stafylokoky - pokračovanie

- Španieli Gomez a kol. 2014 v apríli publikovali MRSA z *A. sylvaticus* s *mecC* génom a novým *blaZ-SCCmecXI*
- MIC of oxacilínu bola 16 mg/L a cefoxitínu 8–16 mg/L.

Najčastejší výskyt drobných cicavcov

Druh	2011					2012					2013			Spolu
Lokality	C	H	B	R	Σ	C	H	B	R	Σ	C	R	Σ	
<i>Apodemus agrarius</i>	16	2	22	125	165	4	7	32	113	156	4	23	27	348
<i>Apodemus flavicollis</i>	45	35	9	17	106	9	22	16	87	134	14	68	82	322
<i>Clethrionomys glareolus</i>	70	19	-	35	124	41	20		57	118	8	22	30	272
<i>C. suaveolens</i>	-	-	-	-	-	-	-	3	1	4	-	1	1	5
<i>Microtus arvalis</i>	-	-	-	5	5	1	-	-	8	9	-	-	-	14
<i>Microtus minutus</i>	-	-	1	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Neomys fodiens</i>	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>M. subterraneus</i>	2	2	-	-	4	1	1	1	2	5	-	-	-	9
<i>Rattus norvegicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	11	11	-	4	4	15
<i>Sorex araneus</i>	6	-	1	2	9	-	4	-	2	6	2	-	2	17
<i>Sorex minutus</i>	1	1	-	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Spolu	142	59	33	188	422	56	54	52	281	443	28	119	146	1011

Pracovná hypotéza

U **drobných cicavcov** na Slovensku predpokladáme prítomnosť metecilín rezistentných koaguláza negatívnych kmeňov (**MRCoNS**).

Výskytu rezistentných baktérií môžu nasvedčovať aj miesta odchyty drobných cicavcov v **urbáne**,

na lokalite s **pasením kôz**

na lokalite s výskytom **jelenej zveri** a s **pastvou dobytká**.

Materiál a metodika

- Na odchyt **drobných cicavcov** boli použité živolovné pasce, po narkotizácii s CO₂ boli odobraté **vzorky čreva**.
- **Ošípané- výtery z rekta**, **Kravske mlieko** a **ovčie syry**.
- **MIC stafylokokov** boli testované pomocou Miditech MIC20 Gram+.
- **Gény blaZ a mecA** PCR podľa Martineau a kol. 2000, Strommenger a kol. 2003 (532 bp), **mecC** (Cuny a kol. 2011)
- **ermA, ermB, ermC** (RNA metylázy) a **msrA** – makrolidový eflux
- **tetK** - tetracyklín, **dfrS1, G, K** – trimetoprim, **qacA** - biocid.
- mutácie v **rpoB** (beta podjednotka RNA polymerázy) - rezistencia na rifampicín.

Mutácie v géne *rpoB*

- **Jedna mutácia**

- 481His → Asn - MIC 4 mg/L rifampicínu
- 486Leu → Ser - 4 mg/L

- **Dve mutácie**

- 481His/Asn+466Leu/Ser – 32 mg/L

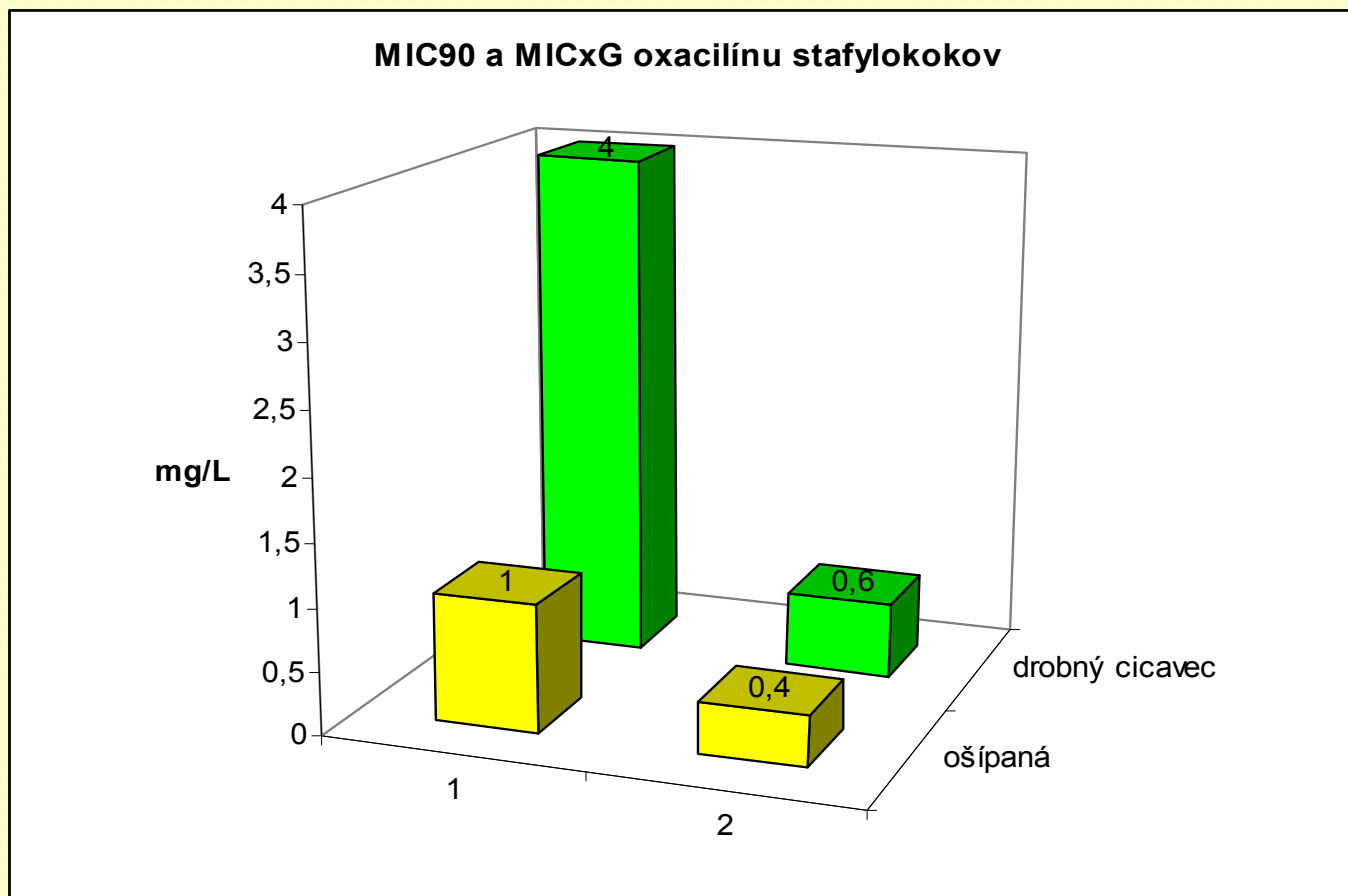
- **Tri mutácie**

- 481His/Asn+466Leu/Ser+477Ala/Asp – 128 mg/L

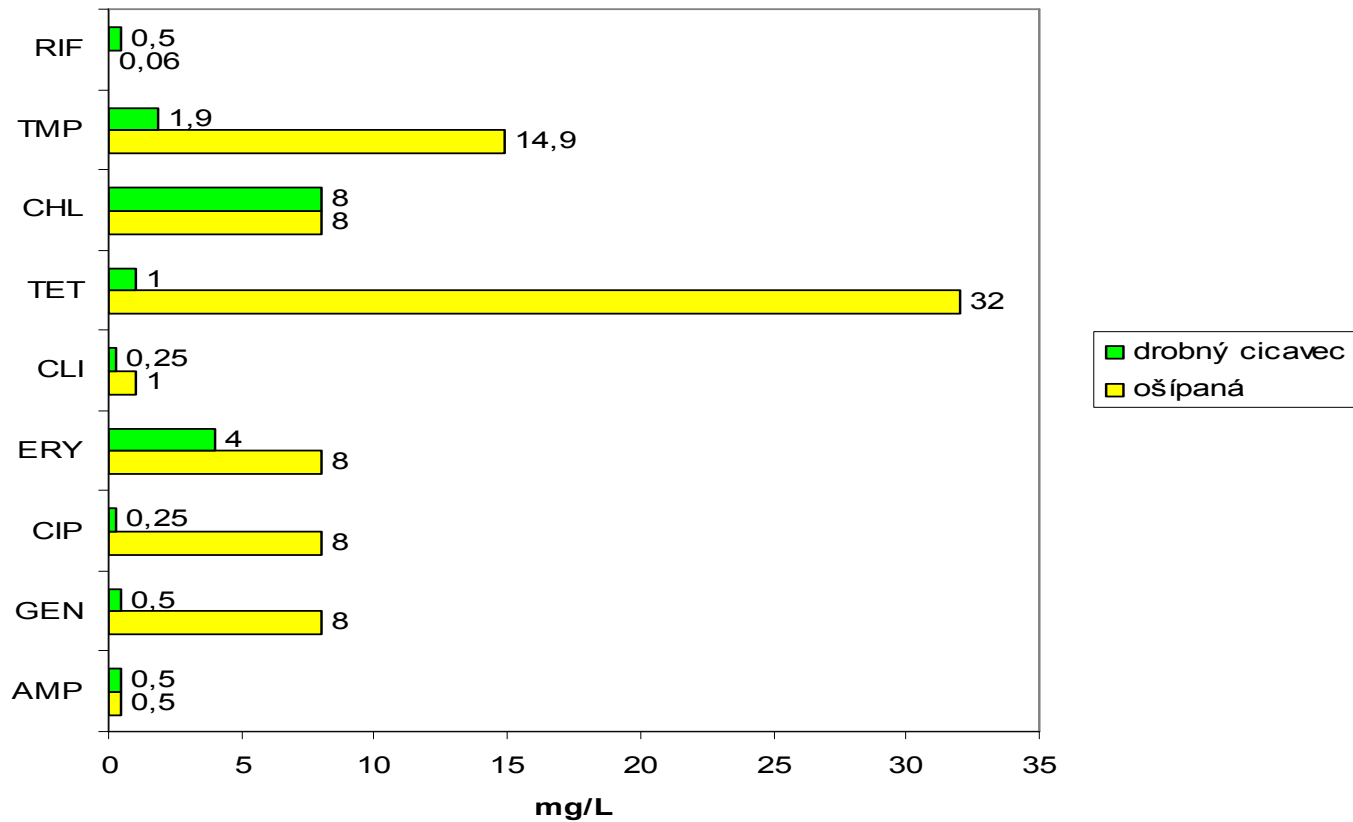
Faktory virulencie stafylokokov vo vzťahu k biofilmu

- *agri* (*agrD*), *agrII* (*agrC*) – QS regulón faktorov virulencie (Shopsin a kol. 2003)
- *sirB* – siderofór, vychytávanie železa (399 bp, 61 °C, Dale a kol. 2004)
- *cna* – kolagén viažúci proteín (423 bp, 55 °C, Tristan a kol. 2003)
- *eno* - laminín viažúci proteín (302 bp, 55 °C, Tristan a kol. 2003)
- *icaAD* – PIA polysacharidový medzibunkový adhezín (primer fcv: 355 bp, 49 °C, Rumi a kol. 2013)
- *tuf* – detekcia CoNS (Hwang a kol. 2011, 412 bp, 56 °C)

Porovnanie hodnôt MIC90 a geometrického priemeru MIC oxacilínu



MIC90 antibakteriálních látek stafylokokov



Charakterizácia stafylokokov izolovaných z čreva drobných cicavcov

Druh	Rezistencia-MIC	PCR-rezistencia	PCR-virul.	Intepret.
<i>S.xylosus</i> 1	OXA-1, Tmp-4			MRCoNS
<i>S.sciuri</i> 2	OXA-0.5, Tmp			MRCoNS
<i>S.hominis</i> 3	Ery, Cli	<i>ermC</i> , <i>msrA</i>		
<i>S.warneri</i> 6	Ery, Cli	<i>msrA</i>		
<i>S.aureus</i> 27	Amp, Tmp-2	<i>blaZ</i>	<i>icaAD</i>	
<i>S. haemolyticus</i> 28	OXA-1, Rif	<i>rpoB</i> -bez mutácie	<i>sirB</i> , <i>cna</i>	MRCoNS
<i>S.sciuri</i> 29	Amp, OXA-1, Ery, Rif	<i>blaZ</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i> , <i>rpoB</i>	<i>sirB</i>	
<i>S.aureus</i> 30	OXA-2, FOX-4	<i>mecA</i>	<i>icaAD</i>	???
<i>S.haemolyticus</i> 31	OXA-1			MRCoNS
<i>S.xylosus</i> 32	OXA-1, Rif, Tmp-4	<i>blaZ</i> , <i>rpoB</i>	<i>sirB</i>	
<i>S.aureus</i> 33	OXA-4, Rif, Tmp-4	<i>mecA</i> , <i>rpoB</i>	<i>icaAD</i>	MRSA
<i>S.aureus</i> 34	Amp, Tmp-2	<i>blaZ</i>	<i>icaAD</i>	
<i>S.xylosus</i> 35	OXA-1		<i>sirB</i> , <i>can</i>	MRCoNS
<i>S.xylosus</i> 36	OXA-2, Tmp		<i>sirB</i>	MRCoNS
<i>S.xylosus</i> 37	Amp, OXA-4, Ery, Cli	<i>blaZ</i> , <i>mecA</i> , <i>ermC</i>		MRCoNS
<i>S.xylosus</i> 38	Amp, OXA-4	<i>blaZ</i> , <i>mecA</i> , <i>qacA</i>		MRCoNS
<i>S.aureus</i> 39	OXA-4, Rif	<i>mecA</i>		MRSA

Výsledky sekvenovania

Sekvencia génu *rpoB* *S. haemolyticus* 28 (query 201)

MIC Rif -1 mg/L, bez mutácie v pozícii 481 H → N

Query 21

IGLSRMERVVRRERMSIQDTE SITPQQLINIRPVASIKEFFGSSQLSQFMDQANPLAELT 200

IGLSRMERVVRRERMSIQDTE SITPQQLINIRPVASIKEFFGSS**S**QLS**Q**FMD**D**QANPL**A**ELT

Sbjct 1

IGLSRMERVVRRERMSIQDTE SITPQQLINIRPVASIKEFFGSSQLSQFMDQANPLAELT 60

Query 201

HKRRLSALGPGGLTRERAQMEVRDVHYSHYGRMCPIETPEGPNIGLINS**L**SSYARVNEFG
380

HKRRLSALGPGGLTRERAQMEVRDVHYSHYGRMCPIETPEGPNIGLINSLSYARVNEFG

Sbjct 61

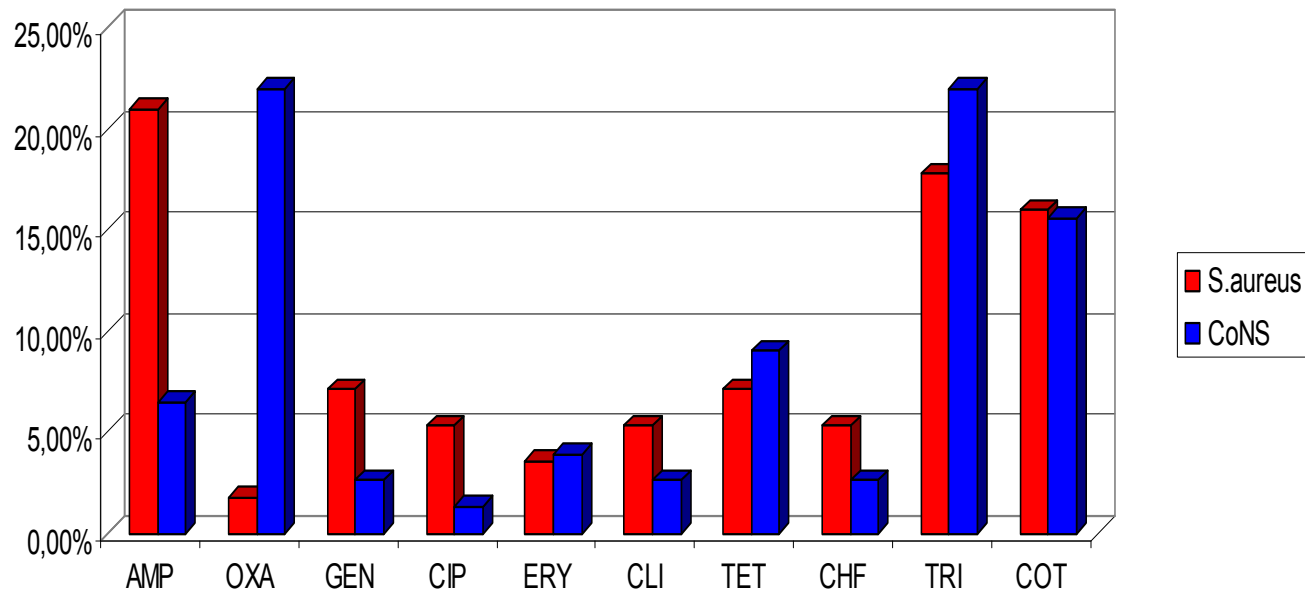
HKRRLSALGPGGLTRERAQMEVRDVHYSHYGRMCPIETPEGPNIGLINSLSYARVNEFG
120

Výsledky vybraných stafylokokov izolovaných od ošípaných

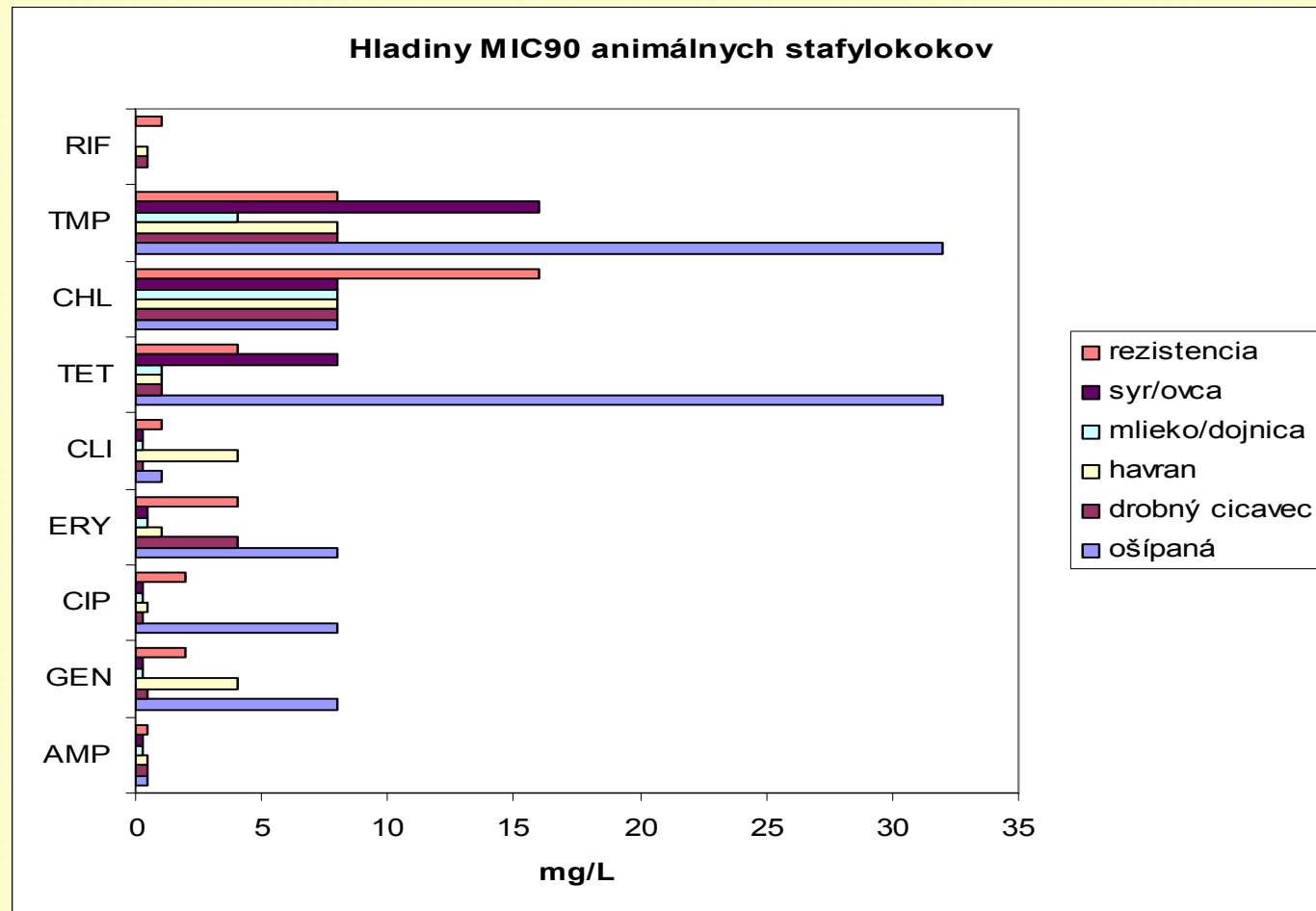
Druh /zvierat	Rezistencia - MIC	PCR - rezistencia	Intepretácia
CoNS 10-odstav	Ery, Cli, Tet	<i>ermC, msrA, tetK</i>	MLSB/c
CoNS 9 - odstav	Amp, OXA-4, Ery, Cli, Tet, Tmp	<i>blaZ, tetK</i>	PNC, MRCoNS, MLSB/c
CoNS 8- prasnica	ERY, CLI, Tet	<i>ermC, msrA</i>	MLSB/c
CoNS 7 - ciciak	Amp, Ery, Cli, Tmp,	<i>blaZ, ermC</i>	PNC, MLSB/c
<i>S.aureus</i> 26 -odstav	Amp, OXA-4, Ery, Cli, Gen, Tmp, Tet	<i>blaZ, ermC, msrA, tetK</i>	MRSA, aminogl. PH(2'')-AC(6')
<i>S.chromogenes</i> 24-ciciak	citlivý		
			MRCoNS, aminogl. PH(2'')-AC(6')
<i>S.saprophyticus</i> 25-cicial	Amp, OXA-4, Ery, Cli, Rif-i, Gen, Tmp, Chl	<i>blaZ, ermC, msrA, tetK</i>	MLSB/c, Multirezist.

- bolo zistené, že tieto kmene majú širšie spektrum rezistencie (faktory virulencie neboli detekované)

Rezistencia na antibiotiká u stafylokokov z mlieka a syrov



Porovnanie MIC90 stafylokokov: **hladina rezistencie**, syr a mlieko, havran a drobný cicavec, **ošípané**



Závery

U **hlodavcov** boli detekované **dva MRCoNS a dva MRSA**, ktoré obsahovali aj gén *mecA*.

Šesť fenotypicky pozitívnych MRCoNS, s nižšou MIC OXA-1 nemalo *mecA*.

Rezistencia na tetracyklín nebola detekovaná.

Gén *mecC* nebol detekovaný.

Niektoré kmene rezistentné na penicilín mali gén *blaZ*,

Erytromycín: gény *ermC* a *msrA*,

Gény rezistencie na trimetoprím „dfr“ neboli detekované.

Voľne žijúce drobné cicavce mali MRCoNS a MRSA.

U stafylokokov z ošípaných bolo širšie spektrum mechanizmov rezistencie – selekčný tlak antibiotík

V mlieku a syroch boli MRCoNS

Ďakujeme za pozornost'