

Výskyt rezistentných koagulazo-negatívnych stafylokokov v mäsa voľne žijúcich zajacov poľných (*Lepus europaeus*)

Appearance of resistant coagulase -negative staphylococci in wild hare meat

Jevinová, P., Pipová, M., Nagy, J., Popelka, P.

Department of Food Hygiene and Technology, University of Veterinary Medicine, Komenského, Košice, Slovakia

Abstract

In this study, the strains of typical and untypical coagulase-negative staphylococci isolated from muscle tissues *Lepus europaeus* have been tested for their sensitivity to some antibiotics using disc-diffusion assay. Among 72 staphylococci isolates the sensitivity of was observed to the vancomycin (30 µg, 5 µg), gentamicin (30µg, 10µg,) streptomycin (10 µg) and oxacillin (5 µg). These isolates showed the highest sensitivity to gentamicin 30 µg, oxacillin 5µg and the lowest sensitivity to the vancomycin 5 µg. To the ampicillin 10 µg, 2 µg, oxacillin 1µg, tetracycline 30 µg, 10 µg, methicillin 5 µg, penicillin 10 IU. and erythromycin 15 µg no inhibition was observed in 23 staphylococci strains. The highest resistance to erythromycin 15 µg was ascertaining in 11 isolates (31 %) of 23 staphylococci isolates. At the same time were nine isolates resistant to above one antibiotic of them, and the highest multiresistance was detected to penicillin-ampicillin (6 isolates, 67 %). As seen from the results, resistant coagulase-negative staphylococci can be isolated from the game. Due to its significant increasing of the microbial resistance to antimicrobial substances has become an alarming factor. An important means to solve this world-wide problem of development and spread of the microbial resistance to antibiotics is its monitoring combined with other measures (e. g. rationalisation of antibiotic prescription and other measures).

Key words: antibiotic resistance, *Staphylococcus aureus*, *Lepus europaeus*,

Úvod

Ako uvádza Trupl a kol.(2002), prevalencia infekcií vyvolávaná rôznymi baktériovými druhmi sa mení, a v ostatných asi 25 rokoch sa celosvetovo zaznamenáva narastajúca rola grampozitívnych baktérií. Baktériové druhy, ktoré boli hlavnou príčinou tejto zmeny, zahrňujú *Staphylococcus aures*, koagulázo-negatívne stafylokoky a enterokoky. Súčasne sa zaznamenávajú znepokojujúce trendy nárastu rezistencie týchto baktériových druhov na antibiotiká voľby terapie stafylokokových, enterokokových a pneumokokových infekčných komplikácií. Už dávno je známe, že selekcia rezistentných mutantov sa umožňuje a riadi množstvom antibiotík prítomných v menšom aj väčšom počte u pacientov. K tomu však pristupuje ďalší proces - transfer génov rezistencie. Takto môžu citlivé bunky mikrobov prijať prenosné elementy so súbormi génov rezistencie aj na početné antibiotiká súčasne (Blahová, J., 2002).

Kmene *Staphylococcus aures* sú jedny z najubikvitárnejších baktérií. Patria k najčastejším príčinám ľudských infekcií. Sú príčinou drobných kožných zápalov, alimentárnych intoxikácií, až po život ohrozujúce pneumónie, osteomyelitíd, syndrómy toxického šoku, bakteriálne edokarditídy a septickej stavy. Nachádzame ich ako nosičské

kmene na nosovej sliznici, asi u tretiny ľudskej populácie, na koži, v prostredí, ale aj v potravinách.

V ostatných rokoch sa zaznamenal nárast incidencie multirezistentných stafylokokov označovaných ako MRSA (methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*). Metacilin-rezistentný *Staphylococcus aureus* (MRSA) je však popri penicilíne rezistentný aj voči oxacilínu, metacilínu a všetkým β -laktámovým antibiotikám. MRSA je navyše často nositeľom mnohopočetnej rezistencie aj na iné bežne používané antibiotiká vrátane erytromycínu, klindamycínu a tetracyklínu. V poslednom období sa objavujú izoláty *Staphylococcus aureus* rezistentné voči vankomycínu (Lee, J. H., 2003, Blahová, J. a kol., 2003, Tiemersman, E., W., 2004, Sadari, H. a kol., 2005)

Cieľom štúdie bolo zistiť prevalenciu rezistencie koagulázo-negatívnych stafylokokov izolovaných zo svalového tkaniva zajaca poľného (*Lepus europaeus*).

Materiál a metodika

Bolo odobratých a vyšetrených 17 vzoriek (1 vzorka = 10 g) svalového tkaniva z oblasti dutiny brušnej zajaca poľného. Zo základného riedenia 10^{-1} (10 g vzorky sme zhomogenizovali s 90 ml fyziologického roztoku) sme pripravili ďalšie desaťnásobné riedenie vzorky (10^{-2}), ktoré sme použili na stanovenie počtu baktérií *Staphylococcus aureus* podľa pokynov STN ISO 6888. Ako selektívnu diagnostickú pôdu sme použili Baird-Parkerov agar (HiMedia, India). Na izoláciu vhodných kmeňov stafylokokov sa použili tie Petriho misky, na ktorých porástlo 15 – 150 typických alebo netypických kolónií. Koagulázový test sa vykonal Staphylo PK testom (Imuna Š. Michal'any). Na prípravu suspenzií bakteriálnych buniek sme použili BHI bujón (Oxoid, England), do ktorého sme preočkovávali kolónie vyizolovaných kmeňov stafylokokov. Vyizolovaných 72 koagulázo-negatívnych stafylokokov bolo otestovaných na antibiotiko-rezistenciu mikrobiologickou difúznou metódou. Po inokulácii povrchu Mueller-Hinton agaru (Oxoid) pripravenými suspenziami jednotlivých testovaných stafylokokových kmeňov (0,1 ml), sme na povrch agaru umiestnili antibiotické disky. Pre stanovenie citlivosti a rezistencie koagulázonegatívnych stafylokokov k vybraným antibiotikám, sme použili komerčne vyrábané antibiotické disky (Oxoid, England): vankomycín 30 μ g, 5 μ g (VA), ampicilín 10 μ g, 2 μ g (AMP), gentamycín 30 μ g, 10 μ g (CN), oxacilín 5 μ g, 1 μ g (OX), tetracyklín 30 μ g, 10 μ g (TE), streptomycín 10 μ g (S), erytromycín 15 μ g (E), metacilin 5 μ g (MET), penicilín 10 m. j. (P). Po dvadsaťštyri hodinovej inkubácii pri 37 °C sme zmerali od okraja disku veľkosti inhibičných zón. Na štatistické spracovanie získaných výsledkov sme použili program Graph Pad Prism, 1995.

Výsledky

Zo 17 vzoriek svalového tkaniva bolo izolovaných 72 koagulázo-negatívnych stafylokokov. Citlivosť týchto izolátov k jednotlivým antibiotikám je uvedená v Tabuľkách č. 1-2. Ako vyplýva z týchto výsledkov u všetkých koagulázo-negatívnych stafylokokov bola zaznamenaná citlivosť k vankomycínu, gentamycínu, streptomycínu a oxacilínu (5 μ g). Najvyššia citlivosť podľa priemerných veľkosti inhibičných zón (Tab. č.2), bola zaznamenaná k gentamycínu (30 μ g) a oxacilínu (5 μ g). Naopak najmenšia citlivosť bola zistená k vankomycínu (5 μ g).

Rizikové faktory potravného reťazca V. – 2005, Nitra

Výsledkom našej štúdie bolo zistenie, že 23 koagulázo-negatívnych stafylokokov nevytvárali zóny inhibície k niektorým z uvedených antibiotík: ampicilín 10 µg, 2 µg, oxacilín 1 µg, tetracyklín 30 µg, 10 µg, metecilín 5 µg, penicilín 10 IU. a erytromycín 15 µg. Pričom najväčšiu rezistenciu vykazovalo 11 izolátov (31%) na erytromycínu (15 µg). Deväť stafylokokových izolátov bolo súčasne rezistentných k viacerým antibiotikám. Pričom najväčšia multirezistencia bola zistená na penicilín- ampicilín (6 kmeňov, 67 %).

Tabuľka 1.

Minimálne, stredné a maximálne veľkosti inhibičných zón pre jednotlivé antibiotiká

Antibiotiká (µg)	Počet kmeňov	Minimum	25 % Percentile	Median	75 % Percentile	Maximum
VA 30	72	3	4	5	5	13
AMP 2	72	0	2	9	12	23
CN 30	72	5	8	10	12,5	21
OX 1	72	0	6	8	9	13
TE 30	72	0	7	8	10	17
MET 5	72	0	8	9	10	18
TE 10	72	0	5	7	8	11
CN 10	72	3	7	8	10,25	17
S 10	72	2	4	4,5	8	15
AMP 10	72	0	3	10	14	21
VAN 5	72	2	2	3	3	9
OX 5	72	2,5	9	10	11,5	18
P 10	72	0	2	10	14	19
E 15	72	0	4	7	10	14

Tabuľka 2.

Priemerné veľkosti inhibičných zón pre jednotlivé antibiotiká

Antibiotiká (µg)	Priemer	Štandardná odchýlka	Štandardná chyba
VA 30	5,172	1,724	0,2107
AMP 2	7,784	5,774	0,7054
CN 30	10,78	3,434	0,4195
OX 1	7,239	2,665	0,3256
TE 30	7,896	3,279	0,4006
MET 5	8,843	3,217	0,393
TE 10	6,254	2,771	0,3385
CN 10	8,985	2,973	0,3632
S 10	5,799	2,688	0,3284
AMP 10	9,179	5,967	0,729
VA 5	3,015	1,077	0,1315
OX 5	10	2,867	0,3503
P 10	8,724	6,267	0,7656
E 15	6,56	4,074	0,4977

Diskusia

Všeobecne sa uznáva, že nárast rezistencie mikrobov je pri niektorých antibiotikách explozívny a alarmujúci. Klinická účinnosť určitých antibiotík sa zdá byť stále väčšmi ohrozená. Baktérie nadobúdajú rezistenciu, ktorá sa šíri lokálne, regionálne, ale aj medzinárodne. Práve potravný reťazec sa považuje za jednu z foriem prenosu antibioticko-rezistentných baktérií medzi živočíšnou a ľudskou populáciou (Kožárová a kol, 2001, Lee, J. H., 2003). Antibioticko-rezistentné kmene sa potravou môžu dostať do zažívacieho traktu konzumenta, ktoré sa stávajú zdrojom génov rezistencie pre baktérie prítomné v črevnom obsahu človeka. Mnohí autori prezentujú vo svojich prácach výskyt rezistentných kmeňov *Staphylococcus aureus* a koagulázo-negatívnych stafylokokov izolovaných z potravín, akými sú mlieko, mäso, hydina. Shitandi, A a Mwangi, M., (2004) testovali 216 kmeňov *Staphylococcus aureus* izolovaných zo vzoriek mlieka odobratých z rôznych oblastí v Keni. Najväčšia rezistencia bola potvrdená na penicilín (72,2 %) potom na trimethoprim+sulfametazín (59,2 %), tetracyklín (57,9 %), erytromycín (21,3%), chloramfenicol (46,8 %) a meticylín (7,8%). Ombui J. N. a kol. (2000) testovali 96 izolátov *Staphylococcus aureus* (75 z mlieka a 21 z mletého mäsa). Najvyššia frekvencia rezistencie bola zistená na linkomycín (67,7 %), penicilín (66,7 %) a cotrimoxazol (51 %).

Ako vyplýva z výsledkov našej práce rezistentné koagulázo-negatívne stafylokoky môžeme izolovať aj zo zveriny. Z 72 koagulázo-negatívne stafylokokov izolovaných zo svalového tkaniva zajaca poľného, 23 vykazovalo rezistenciu k niektorým z uvedených antibiotík: ampicilín 10 µg, 2 µg, oxacilín 1 µg, tetracyklín 30 µg, 10 µg, methicylín 5 µg, penicilín 10 IU. a erytromycín 15 µg. Tieto výsledky dokazujú že rezistentné baktérie sa môžu vyskytovať v celom eko-systéme. Pred nami stojí otázka "Aký spôsobom sa dostali rezistentné koagulázo-negatívne stafylokoky do tela zajaca poľného voľne žijúceho v prírode?"

Literatúra

- Blahová, J., Králiková, K., Krčméry, V., sen., Menkyna, R.: Možnosti prevencie antibiotickej rezistencie mikrobov. LEK OBZ, 2002, 51, 7, 213 – 216.
- Blahová, J., Králiková, K., Krčméry, V., st., Menkyna, R.: Európske dimenzie rezistencie na antibiotiká – analýza európskych výsledkov projektov SENTERY a MYSTIC. LEK OBZ, 2003, 52, 4, 123 – 126.
- Kožárová, I., Máte, D., Cabadaj, R.: Veterinary drug residues and the safety of foods of animal origin. Folia Veterinaria, 2001, 45, 4, 214 – 218.
- Lee, J. H.: Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated from major food animals and their potential transmission to humans. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69, 11, 6489 – 6494.
- Ombui J., N., Kimotho A., M., Nduhiu, J., G.: Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and meat. East Afr Med J. 2000, 77, 9, 463 – 467.
- Saderi, H., Owlia, P., Shahrbanooie, R.: Vancomycin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Arch Iranian Med 2005, 8, 2, 100 – 103.
- Shitandi, A., Mwangi, M.: Occurrence of Multiple Antimicrobial Resistance among *Staphylococcus aureus* Isolates from Kenyan Milk. The Journal of Food Technology in Africa 2004, 9, 1, 23 – 25.

Rizikové faktory potravného reťazca V. – 2005, Nitra

Tiemersman, E.,W., Bronzwaer, S., L., A., M., Lyytikäinen, O., Degener, J. E., Schrijnemakers, P., Bruinsma, N., Monen, J., Witte, W., Grundmann, H., and European Antimicrobial Resistance Surveillance system Participants. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. *Emerging Infectious diseases* 2004, 10, 9, 1627 – 1634.

Trupl, J., Roidová, A., Hupková, H., Vaculíková, A., Rovná, D., Molokáčová, M., Ohlasová, D., Purgelová, A., Szovenyiová, Z., Bakoš, I.: Multicentrická mikrobiologická štúdia postavenia antibiotík so zameraním na quinupristín/dalfopristín (SYNERCID[®]) v terapii rezistentnej grampozitívnej infekcie. *Lek. Obz.*, 2001, 51,7, 213 – 216.

Acknowledgements: This study was supported by grant VEGA No 1/0618/03