

Vetservis spravodajca

Odborný časopis pre veterinárne poradenstvo a diagnostiku 3-2015



www.vetservis.sk

vetServis

Najčastejšie patogény mliečnej žľazy a ich antibiotická rezistencia •
Vývoj a trendy antimikrobiálnej rezistencie

Periodicita vydávania - štvrťročník • IČO vydavateľa 36682144 • Dátum vydania - 10.9.2015 • Ročník 16

ISSN 1337-6691

Milí kolegovia.

Napriek rôznym krízam, ktoré sa na nás valia zo všetkých strán, musíme ďalej fungovať. Dve z týchto kríz sa nás však dotýkajú o poznanie viac než iné. Áno, problémy s mliekom sa dali očakávať a zrejme už všetci musíme rátať s tým, že sa budú periodicky opakovať. Je otázkou, či z dôvodu embarga, uvoľnenia kvót, alebo špekuláciami na burzách, kde sa sušené mlieko zaradilo medzi obchodované komodity. Ostáva len veriť, že stavy mliečneho dobytku na Slovensku to úplne nezdecimuje.

V treťom čísle nášho časopisu sa s Vami podelíme o skúsenosti s diagnostikou mastitíd HD, ktorú sme realizovali v laboratóriách spoločnosti Vetservis v posledných dvoch rokoch, a ktorej výsledky ukazujú zaujímavé trendy v zastúpení patogénov a ich rezistencii. Antibiotická rezistencia je problém, ktorý presahuje veterinárnu branžu a práve využívanie, či skôr zneužívanie, antibiotík v chove zvierat je jednou z príčin stúpajúcej rezistencie patogénov v humánnej medicíne. Problematikou mechanizmov rezistencie a jej monitoringom sa zaoberá aj vedecký tím profesora Vladimíra Kmeťa z Ústavu fyziológie hospodárskych zvierat SAV v Košiciach, s ktorého názormi a výsledkami sa taktiež môžete oboznámiť.

V úvode som spomínal dve krízy, ktoré sa nás, veterinárnych lekárov, dotýkajú. Určite ste zaregistrovali ako dopadla naša alma mater v poslednom hodnotení Akreditačnej komisie. Nechcem a nebudem špekulovať o príčinách tohto výsledku, na to si urobí každý (kto chce) vlastný názor. Verme, že tento nelichotivý výsledok nie je až tak dramatický ako na prvý pohľad vyzerá a držíme palce aby sa s ním naša univerzita čo najskôr dokázala vysporiadať.

Za celý tím spoločnosti Vetservis prajem príjemné čítanie.

Ivan Holko

Veterinárne poradenstvo

MVDr. Peter Supuka, PhD. – králiky, drobné hlodavce a kožuštinové zvieratá

MVDr. Juraj Salaj, PhD. – vakcinológia a veterinárna história

MVDr. Miloslav Struhár – holuby

MVDr. Darina Pospíšilová PhD. – hydina a ekologické chovy

MVDr. Ľudovít Černek, PhD. – ošípané, HD

MVDr. Miriam Árvayová – laboratórna diagnostika

Doc. MVDr. Ivan Holko, PhD. – konzultácia odborných príspevkov do časopisu



vetservis

laboratórna diagnostika a poradenstvo

Z obsahu tohto čísla:

■ str. 3

Najčastejšie patogény mliečnej žľazy a ich antibiotická rezistencia (Holko I., Árvayová M., Černek Ľ., Tančin V., Supuka P., Pospíšilová D., Salaj J.)

■ str. 8

Vývoj a trendy antimikrobiálnej rezistencie (Kmeť V.)

Najčastejšie patogény mliečnej žľazy a ich antibiotická rezistencia

Doc. MVDr. Ivan Holko, PhD., MVDr. Miriam Árvayová, MVDr. Ľudovít Černek, PhD.,
*Prof. Ing. Vladimír Tančin, DrSc., MVDr. Peter Supuka, PhD., MVDr. Darina Pospíšilová, PhD., MVDr. Juraj Salaj, PhD.

VETSERVIS s. r. o., Kalvária 3, Nitra

*Slovenské poľnohospodárske a potravinárske centrum, Hlohovecká 3, Lužianky

V období rokov 2013 – 2014 bolo vyšetrených 633 štvrtkových vzoriek mlieka pochádzajúcich zo 42 chovov zo západného Slovenska. Vzorky boli odobraté zo zvierat s klinickou alebo subklinickou mastitídou. Zo vzoriek bolo izolovaných 521 bakteriálnych kmeňov, pričom 17.7% vzoriek bolo negatívnych.

Najväčší podiel z izolovaných patogénov predstavovali koaguláza-negatívne stafylokoky (35.9%), nasledované *Escherichia coli* (14.8%), *Staphylococcus aureus* (12.5%), *Streptococcus uberis* (10.9%) a *Streptococcus agalactiae* (5.8%). Týchto 5 najpočetnejších zástupcov (416 kmeňov) bolo testovaných na citlivosť voči 16 antibiotikám zo skupiny penicilínov (AMX, AMC, CLOX, PEN), cefalosporínov (LEX, CEF, CEQ), tetracyklínov (TET), aminoglykozidov (STR, NEO, KAN), linkosamidov (LCM), ansamycinov (RIF), sulfonamidov (SXT) a chinolónov (EFX) a iných (NVB). Celkovo 260 kmeňov (62.5%) bolo rezistentných aspoň na 1 antibiotikum, pričom najväčší podiel rezistentných kmeňov bol u *Str. agalactiae* (100%), *Str. uberis* (86%) a *E. coli* (79%). Najviac rezistentných kmeňov bolo voči aminoglykosidom (STR, NEO), cefalosporínom I. generácie a penicilínom, najmenej voči cefalosporínom II.-IV. generácie a chinolónom. Celkovo 61 kmeňov (14.7%) vykazovalo rezistenciu na 3 a viac skupín antibiotík súčasne (multirezistencia), kde najväčší podiel reprezentujú *Str. uberis*, *Str. agalactiae* a *E. coli* (38.6%, 23.3%, 18.2%).

Úvod

Mastitída – zápal mliečnej žľazy je považovaná za jedno z najdôležitejších ochorení dojníc a je jednou z hlavných indikácií pre použitie antibiotík u tejto kategórie zvierat (Mitchel a kol., 1998; Bradley, 2002; DANMAP, 2003). Najčastejšou príčinou mastitíd sú bakteriálne infekcie vyvolané jedným z piatich najbežnejších patogénov mliečnej žľazy, a to *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* a rôzne Gram - negatívne baktérie, aj keď podľa odbornej literatúry, zápal vemena môže spôsobiť viac ako 130 rôznych druhov mikroorganizmov (Watts, 1988).

Rastúci trend antibiotickej rezistencie baktérií predstavuje hrozbu ako v humánnej tak vo veterinárnej medicíne. Z tohto dôvodu je sledovanie rezistencie patogénov a komenzálnych baktérií odporúčané aj Medzinárodným úradom pre nákazy zvierat OIE. Takýto monitoring poskytuje údaje dôležité pre terapeutické rozhodnutia a zároveň ukazuje trendy vo vývoji rezistencie baktérií, ktoré môžu byť zohľadnené pri regulácii použitia jednotlivých antimikrobiálnych liečiv v praxi.

V tejto práci sú sledované 2 ciele: 1. Zistiť zastúpenie jednotlivých druhov mikroorganizmov – potenciálnych patogénov mliečnej žľazy z mlieka dojníc s klinickou resp. subklinickou mastitídou. 2. Stanoviť antibiotickú rezistenciu najčastejšie sa vyskytujúcich patogénov vemena.

Materiál a metodika

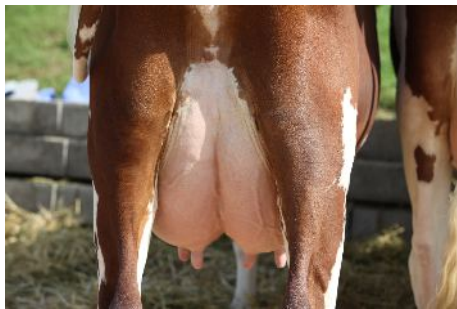
Vzorky

V priebehu rokov 2013 – 2014 bolo vyšetrených 633 štvrtkových vzoriek mlieka z celkovo 512 zvierat pochádzajúcich zo 42 chovov s konvenčným systémom poľnohospodárstva z regiónov západného Slovenska. Zvieratá boli vybrané na základe prejavov klinickej alebo subklinickej mastitídy. Vzorky boli odobraté asepticky do sterilných skúmaviek v objeme 10 ml a vo vychladenom stave dopravené v ten istý deň do laboratória.

Kultivácia

Vzorky mlieka (inokulum 10 ul) boli kultivované na krvnom agare (5 % ovčej krvi) pri teplote 37°C po dobu 16 až 24 hodín. *S. aureus* bol identifikovaný na základe typickej morfológie kolónií, α a β - hemolýzy resp. koagulázovej reakcie ak nebola prítomná zóna hemolýzy. Koaguláza - negatívne stafylokoky neboli ďalej typizované. Streptokoky boli identifikované na základe morfológie kolónií, CAMP – testu a 12 biochemických reakcií (hippurát, aesculín, salicínu, sorbitol, manitol, rafinóza, laktóza, sacharóza, inulín, trehalóza, škrob a glycerín) s použitím automatického identifikačného systému BBL Crystal® (Becton, Dickinson & Co., New Jersey, USA).

Enterokoky boli potvrdené na základe kultivácie na pôde Slanetz & Bartley Medium (Oxoid Ltd., Basingstoke, Anglicko) a typizácie pomocou systému BBL



Crystal® (Becton, Dickinson & Co., New Jersey, USA). Gram-negatívne baktérie s typickou morfológiou kolónií, a pozitívne na kyselinu p-nitrophenyl-b-D-glucopyranosiduronikóvu (PGUA) a indol boli považované za *Escherichia coli*. Pre iné gram-negatívne baktérie, bol použitý identifikačný systém BBL Crystal® (Becton, Dickinson & Co., New Jersey, USA). *Bacillus* spp. boli identifikované na základe morfológie kolónií, farbenia podľa Grama a produkcie katalázy. Kvasinky boli kultivované na agare s kvasničným extraktom, glukózou a chloramfenikolom GKCH (Oxoid Ltd., Basingstoke, Anglicko). Vzorka mlieka bola klasifikovaná ako pozitívna ak z nej bola kultivovaná aspoň jedna kolónia tvoriaca jednotka (CFU) *S. aureus* alebo *Str. agalactiae*. Pre ďalšie druhy baktérií, bola na pozitívnu klasifikáciu potrebná prítomnosť aspoň troch CFU/ml. Vzorky boli klasifikované ako kontaminované ak z nich bolo izolovaných tri alebo viac druhov mikroorganizmov, pričom nebolo možné určiť dominantný patogén vemená.

Testovanie ATB rezistencie

Koaguláza-negatívne stafylokoky, *S. aureus*, *Str. uberis*, *Str. agalactiae* a *E. coli* boli testované na citlivosť voči 16 antibiotikám diskovou difúznou metódou podľa manuálu CLSI (CLSI, 2012). Boli použité nasledujúce antibiotické disky (Oxoid Ltd., Basingstoke, Anglicko): amoxicilín AMX (25 µg), amoxicilín + kyselina klavulanová 2:1 AMC (30 µg), kloxacilín CLOX (5 µg), penicilín PEN (10 IU), cephalexin LEX (30 µg), ceftiofur CEF (30 µg), cefquinom CEQ (30 µg), streptomycín STR (10 µg), neomycín NEO (30 µg), tetracyklín TET (30 µg), linkomycín LCM (2 µg), rifaximin RIF (40 µg), sulfametoxazol + trimetoprim SXT (25 µg), enrofloxacin EFX (5 µg), novobiocin NVB (30 µg). Intermediárne citlivé kmene boli klasifikované ako rezistentné.

Výsledky

Zo vzoriek bolo izolovaných 521 bakteriálnych kmeňov, pričom 17.7% vzoriek bolo negatívnych. Výsledky kultivácie mikroorganizmov sú uvedené v Tabuľke 1. Zo 633 vzoriek mlieka bolo celkovo izolovaných 21 kmeňov kvasiniek a 500 kmeňov baktérií zaradených do 25 druhov. Najčastejšie izolovaným bakteriálnym druhom boli koaguláza-negatívne stafylokoky CoNS (35.9%), nasledované *E. coli* (14.8%), *S. aureus* (12.5%), *Str. uberis* (10.9%) a *Str. agalactiae* (5.8%).

Tabuľka 1. Prehľad patogénov izolovaných z mlieka dojníc v období 2013-14.

Druh patogéna	Počet izolátov	% (n=521)
Koaguláza negatívne stafylokoky (CoNS)	187	35.9
<i>Escherichia coli</i>	77	14.8
<i>Staphylococcus aureus</i>	65	12.5
<i>Streptococcus uberis</i>	57	10.9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	30	5.8
Kvasinky	21	4.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	17	3.3
<i>Streptococcus viridans</i>	9	1.7
<i>Streptococcus</i> spp.	8	1.5
<i>Streptococcus bovis</i>	6	1.1
<i>Micrococcus</i> spp.	5	<1.0
<i>Enterococcus durans</i>	5	<1.0
<i>Enterococcus casseliformis</i>	4	<1.0
<i>Lactococcus lactis</i>	4	<1.0
<i>Pseudomonas</i> spp.	4	<1.0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	3	<1.0
<i>Corynebacterium</i> spp.	3	<1.0
<i>Bacillus</i> spp.	3	<1.0
<i>Proteus</i> spp.	2	<1.0
<i>Acinetobacter</i> spp.	2	<1.0
<i>Pasteurella multocida</i>	2	<1.0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	<1.0
<i>Flavimonas oryzae</i>	2	<1.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	<1.0
<i>Serratia</i> spp.	1	<1.0
<i>Clostridium perfringens</i>	1	<1.0

Výsledky testovania antibiotickej rezistencie sú zhrnuté v Tabuľke 2. Zo 416 testovaných izolátov bolo 260 (62.5%) rezistentných aspoň na jedno antibiotikum, pričom najväčší podiel rezistentných kmeňov bol u *Str. agalactiae* (100%), *Str. uberis* (86%) a *E. coli* (79%). Najviac rezistentných kmeňov všeobecne bolo voči streptomycínu a neomycínu, ďalej voči cefalexínu a penicilínu. Najmenej rezistentných kmeňov bolo voči ceftiofuru, cefquinomu, sulfametoxazolu a enrofloxacinu. Celkovo 61 kmeňov (14.7%) vykazovalo rezistenciu na 3 a viac skupín antibiotík súčasne (multirezistencia), z čoho najväčší podiel reprezentujú *Str. uberis*, *Str. agalactiae* a *E. coli* (Obrázok 1, Tabuľka 3).

Najširšie spektrum rezistencie bolo u *Str. uberis*, ktorý vykazoval rezistenciu voči 14 druhom antibiotík zo 16 testovaných. Ostatné patogény, CoNS, *S. aureus*, *Str. agalactiae*, a *E. coli*, mali spektrum rezistencie 8 – 10 druhov antibiotík.

Všeobecne najnižšia miera rezistencie bola zaznamenaná voči amoxicilínu potencovanému kyselinou klavulanovou, ceftiofuru, cefquinomu, sulfametoxazolu potencovanému trimetoprimom a enrofloxacinu.

Najčastejší patogén CoNS vykazoval najvyššiu rezistenciu voči streptomycínu, neomycínu (36.4%, 20.9%) a kloxacilínu (14.4%). Medzi testovanými kmeňmi nebola zaznamenaná rezistencia voči amoxicilínu, tetracyklínu, ceftiofuru, cefquinomu, rifaximínu a enrofloxacinu, sulfametoxazolu potencovanému trimetoprimom a enrofloxacinu.

S. aureus vykazoval navyššiu rezistenciu voči streptomycínu a neomycínu (44.6%, 21.5%) a novobiocínu (15.4%). Naopak, neboli zaznamenané žiadne kmene *S. aureus* rezistentné voči amoxicilínu, amoxicilínu potencovanému kys.

klavulanovou, ceftiofuru, cefquinomu, rifaximinu, sulfametoxazolu + trimetoprim a enrofloxacinu.

Str. uberis vykazoval najvyššiu rezistenciu voči streptomycínu (78.9%), kloxacilínu (42.1%) a rifaximinu (26.3%). Často bola zaznamenaná aj rezistencia voči cefalexinu (22.8%) a neomycínu (14.0%). Medzi testovanými kmeňmi *Str. uberis* nebola zaznamenaná rezistencia voči linkomycínu a enrofloxacinu.

Str. agalactiae vykazoval najvyššiu rezistenciu voči neomycínu a streptomycínu (80%, 70%), penicilínu (23.3%) a enrofloxacinu (23.3%) a žiadnu rezistenciu voči amoxicilínu potencovanému kys. klavulanovou, ceftiofuru, cefquinomu, rifaximinu a sulfametoxazolu + trimetoprim.

Testované kmene *E. coli* boli najviac rezistentné voči rifaximinu (58.4%), amoxicilínu (45.4%) amoxicilínu potencovanému kys. klavulanovou (22.1%) , streptomycínu (35.1%) a neomycínu (24.7%). Žiadna rezistencia *E. coli* nebola zaznamenaná voči ceftiofuru, cefquinomu, sulfametoxazolu + trimetoprim a enrofloxacinu.

Tabuľka 2. Antibiotická rezistencia izolovaných patogénov mliečnej žľazy (% rezistentných).

Antibiotikum	CoNS (n=187)	Staphylococcus aureus (n=65)	Streptococcus uberis (n=57)	Streptococcus agalactiae (n=30)	Escherichia coli (n=77)
AMX			3.5		45.4
AMC			3.5		22.1
CLOX	14.4	6.1	42.1	16.7	nt
PEN	5.9	10.8	10.5	23.3	nt
LEX	13.9	10.8	22.8	10.0	3.9
LEX/KAN	11.2	10.8	22.8	10.0i	3.9
CEF			5.3		
CEQ			5.3		
TET		10.8	8.8	13.3	2.6
STR	36.4	44.6	78.9	70.0	35.1
NEO	20.9	21.5	14.0	80.0	24.7
LCM	4.8	10.8		6.7	nt
RIF			26.3		58.4
NVB	4.8	15.4	3.5	16.7	nt
SXT			5.3		
EFX				23.3	

Celkovo 260 z 416 izolátov (62.5%) bolo rezistentných aspoň na 1 ATB.

Diskusia

Druhové zastúpenie patogénov mliečnej žľazy.

Najčastejšie sa vyskytujúcim patogénom mliečnej žľazy v našom monitoringu boli koaguláza negatívne stafylokoky CoNS (35.9%). Čo sa týka etiológie mastitíd, CoNS patria do skupiny sekundárnych patogénov a ich význam môže stúpať pri cielenom tlmení niektorého z primárnych patogénov. Vo viacerých krajinách, ktoré realizovali ozdravovacie programy sú charakteristické aj zmeny zastúpenia jednotlivých druhov patogénov mliečnej žľazy. Napríklad vo Fínsku bol v období 1994 – 2001 zaznamenaný, popri znížení výskytu *S. aureus*, súčasne nárast koaguláza negatívnych stafylokokov. (Myllys a kol., 1998, Pitkälä a kol., 2004) Rovnaké trendy boli zaznamenané v štúdií z amerického Wisconsinu v období 1988 – 2001 (Makovec & Ruegg, 2003). Naproti tomu, vo Flámsku (Belgicko) sú dominantné mastitídne patogény *Str. uberis*, *S. aureus* a pri klinických mastitídach aj *E. coli* (Supré a kol., 2014). V Nemecku mali najvyššiu prevalenciu *Str. agalactiae*, *S. aureus* a *Str. uberis* (Tenhagen a kol., 2009).

Na Slovensku je nedostatok rozsiahlych štúdií, ktoré mapujú výskyt a zastúpenie jednotlivých druhov patogénov mliečnej žľazy. Napríklad v práci autorov Idris et al. (2013), v ktorej vyšetrili 290 vzoriek mlieka z regiónu západného Slovenska, predstavovali CoNS 17.9% izolátov a boli taktiež predominantným patogénom nasledovaným *E. coli* a *S. aureus*, čo je v zhode s našimi výsledkami. V predchádzajúcej štúdií Foltysa a Kirchnerovej (2005) bolo popísané zníženie prevalence *S. aureus* v rokoch 2001 – 2002 z 29.3% na 10.3%, čo je porovnateľná úroveň ako sme zaznamenali v našej práci (12.5%). Naproti

PROFYMAST

emulsio ad us. vet.

Zloženie:

Aqua purificata, Paraffinum liquidum, Alcohol cetyllicus, Alcohol cetylstearyllicus, Oleomacrogolum, Menthae piperitae etheroleum - 0,5%, Acidum stearicum, Dinatrii edetas dihydricus, Cera alba, Methylparabenum.

Popis:

Homogénna emulzia bielej farby s vôňou mäty.

Farmakoterapeutická skupina

Veterinárny kozmetický prípravok.

Druh a kategória zvierat:

Hovädzí dobytok - dojnice.

Charakteristika:

Prípravok na povrchové ošetrovanie mliečnej žľazy.

Indikácie:

Ošetrovanie povrchu mliečnej žľazy. Zvláčnenie pokožky mliečnej žľazy (napr. proti vysušeniu slnečným žiarením na pastve).

Po vyojení sa omyje mliečna žľaza vlažnou vodou (bez mydla, mydlo znižuje účinnosť prípravku). Pred použitím je nutné prípravok dôkladne pretriasť.

Spôsob použitia:

Zvonka na mliečnu žľazu.

Ochranná lehota:

Bez ochranných lehôt.

Spôsob uchovávanía:

Pri teplote do 25 °C, chrániť pred mrazom a priamym slnečným žiarením. Uchovávať mimo dosahu detí.

Čas použiteľnosti: 24 mesiacov

Veľkosť balenia:

100 ml, 250 ml, 1000 ml, 5000 ml.



Mastitis Test NK

Zloženie prípravku

Detergent (Abeson tea) 100,0 g
Fenolová červeň 0,2 g
Aqua purificata do 1000,0 ml

Charakteristika

Používa sa k vyhľadávaniu dojníc podozrivých z ochorenia mliečnej žľazy ako rýchla maštalná skúška a ako informatívne stanovenie počtu somatických buniek v mlieku. Reagens dáva pozitívnu reakciu po zmiešaní s mliekom so zvýšeným počtom somatických buniek a so zmenenou aktuálnou reakciou (pH). K týmto zmenám v mlieku dochádza spravidla pri podráždení parenchýmu mliečnej žľazy bakteriálnymi a abakteriálnymi vplyvmi. Po zmiešaní prípravku s mliekom so zvýšeným obsahom somatických buniek dochádza ku zmene konzistencie vo forme rôzne viskózneho gélu. Pri súčasnej zmene pH mlieka dochádza k farebnej zmene zmesi. Žlté zafarbenie svedčí o kyslej reakcii, červené o zásaditej.

Spôsob použitia

Na miskách posudzovacej palety sa zmieša cca 2 ml čerstvého mlieka s 2 ml Mastitis NK testu a pri nakláňaní palety sa posudzuje reakcia, ktorá nastupuje spravidla do 30 sekúnd.

Veľkosť balenia

Fľaštička 250 ml s dávkovačom,
fľaša 1000 ml – náhradne balenie.

Spôsob skladovania:
Pri teplote
do 25 °C.



tomu Vasil' a kol. (2005, 2009) popisujú ako predominantný mastitídny patogén *Str. uberis*, nasledovaný CoNS a *E. coli*, avšak vzorky pochádzali z inej oblasti Slovenska.

CoNS nie sú tak patogénnym druhom ako primárne patogény vemena, preto sa uplatňujú prevažne pri subklinických a chronických mastitídach, kde však môžu významne znižovať kvalitu mlieka. Vyskytujú sa prevažne u mladých kategórií zvierat (prvôstky). Ich význam v poslednej dobe vzrastá a zaradili sa medzi nebezpečné patogény mliečnej žľazy (Pyrälä a Taponen, 2009).

Zastúpenie *E. coli* medzi pôvodcami mastitíd je pripisované hlavne hygiene prostredia dojníc (Sumathi a kol, 2008; Liu a kol., 2014). Aj z tohto dôvodu je ich úplná eliminácia problematická. V našej práci sme zaznamenali zastúpenie *E. coli* ako druhé najčastejšie medzi izolovanými patogénmi, pričom testované kmene vykazovali často multirezistenciu voči antibiotikám používaným v liečbe mastitíd, čo zvyšuje význam tohto nálezu.

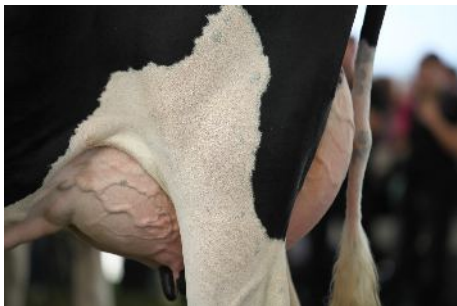
Antibiotická rezistencia.

Liečba a prevencia mastitíd je na Slovensku zameraná predovšetkým na aplikáciu antibiotík, spravidla intramárne. O tomto trende svedčí aj relatívne vysoký podiel kmeňov rezistentných aspoň voči jednému antibiotiku (62,5%). Väčšie znepokojenie môže vyvolať výskyt tzv. multirezistentných kmeňov (rezistentných na 3 a viac skupín antibiotík), ktorých podiel predstavuje až 14,7%, pričom z tohto podielu boli zaznamenané aj kmene rezistentné súčasne voči 7 až 8 antibiotikám (*S. aureus*, *Str. uberis*). Na Slovensku sa v terapii pomerne často využívajú preparáty na báze neomycínu, streptomycínu a novobiocínu. Nami získané výsledky ukazujú najvyššiu mieru rezistencie u *S. aureus* práve voči streptomycínu, neomycínu a novobiocínu (44,6%, 21,5%, 15,4%). U CoNS a *Str. agalactiae* predstavuje rezistencia voči streptomycínu a neomycínu taktiež najvyšší podiel. Pri *Str. uberis* bola zaznamenaná okrem toho aj vysoká rezistencia voči kloxacilínu (42,1%). Celkovo je priaznivejšia situácia v rezistencii voči amoxicilínu (AMX, AMC), ceftiofuru, cefquinomu, sulfametoxazolu+trimetoprimu a enrofloxacinu, kde bola zaznamenaná takmer 100% citlivosť u všetkých stafylokokov aj streptokokov.

Najčastejší patogén CoNS vykazoval celkovo 45,5% rezistentných kmeňov, no len s malým výskytom multirezistencie (5,9%). Okrem neomycínu a streptomycínu boli zaznamenané aj kmene rezistentné voči kloxacilínu a cefalexínu. V práci Perrsona a kol. (2011) boli CoNS druhým najčastejším patogénom pri subklinických mastitídach vo Švédsku, pričom 37% kmeňov bolo rezistentných voči penicilínu. Podobne ako v našej práci boli najčastejšie izolované CoNS aj v štúdiu z Južnej Kórei, kde autori zaznamenali najvyššiu rezistenciu voči streptomycínu a neomycínu (Park a kol., 2012).

S. aureus vykazoval v našej práci 100% citlivosť voči amoxicilínu (AMX, AMC), ceftiofuru a cefquinomu, rifaximinu, sulfametoxazolu+trimetoprimu a enrofloxacinu, rezistencia voči penicilínu bola 10,8%. V prácach švédskych autorov Bengtssona a kol. (2008) ako aj Perrsona a kol. (2011) bola citlivosť *S. aureus* voči penicilínom uspokojivá (do 10%), naproti tomu v najnovšej štúdii realizovanej v Poľsku bola najvyššia rezistencia *S. aureus* práve voči penicilínu, a to až 41% (Jagielski a kol., 2014). Ešte vyššiu mieru rezistencie *S. aureus* voči penicilínu (86%) zaznamenali v Iráne (Jamali a kol., 2014). Tieto rozdiely možno pripísať jednak výberu antibiotík v cielej terapii mastitíd zaužívaných v danej krajine, ale významnú mieru hrajú aj „neantibiotické“ metódy prevencie mastitíd, ktoré sa využívajú najmä v krajinách s ekologickým a integrovaným systémom poľnohospodárstva, ku ktorým patrí aj Švédsko. Podľa práce Parka a kol. (2012) aj samotný prechod na ekologický extenzívny systém chovu dojníc štatisticky znížil mieru rezistencie patogénov vemena u tých istých zvierat.

Antibiotická rezistencia *E. coli* je osobitným problémom, nakoľko sa nejedná o špecifický patogén mliečnej žľazy a na mastitídach sa podieľa sekundárne, predovšetkým pri akútnych zápaloch. Vďaka všeobecne vysokej rezistencii však môže *E. coli* spôsobiť pri terapii mastitíd značné problémy. V našej štúdii sme zaznamenali až 79% podiel kmeňov rezistentných aspoň na jedno antibiotikum. Relatívne vysoký bol aj podiel multirezistentných kmeňov, ktorý



predstavoval 18.2%. Najvyššia miera rezistencie u nami testovaných *E. coli* bola voči rifaximínu, amoxicilínu (AMX) a streptomycínu (58.4%, 45.4%, 35.1%). Podobne ako u ostatných izolovaných druhov, aj pri *E. coli* bola rezistencia voči neomycínu relatívne vysoká (24.7%). Najčastejšou multirezistenciou bola kombinácia amoxicilín (AMX, AMC), streptomycín, neomycín a rifaximin. Najvyššia citlivosť testovaných *E. coli* bola voči cefalexínu, ceftiofuru, cefquinomu, tetracyklínu, sulfametoxazolu + trimetoprimu a enrofloxacinu. Podľa výsledkov štúdie Bengtssona a kol., (2008) bola rezistencia *E. coli* izolovaných z mastitíd vo Švédsku iba 12.3%, pričom dominovala rezistencia voči streptomycínu, podobne ako u nás. V štúdiu Liu a kol. (2014) bolo rezistentných až 87.1% izolátov *E. coli*, pričom najvyššia rezistencia bola voči streptomycínu

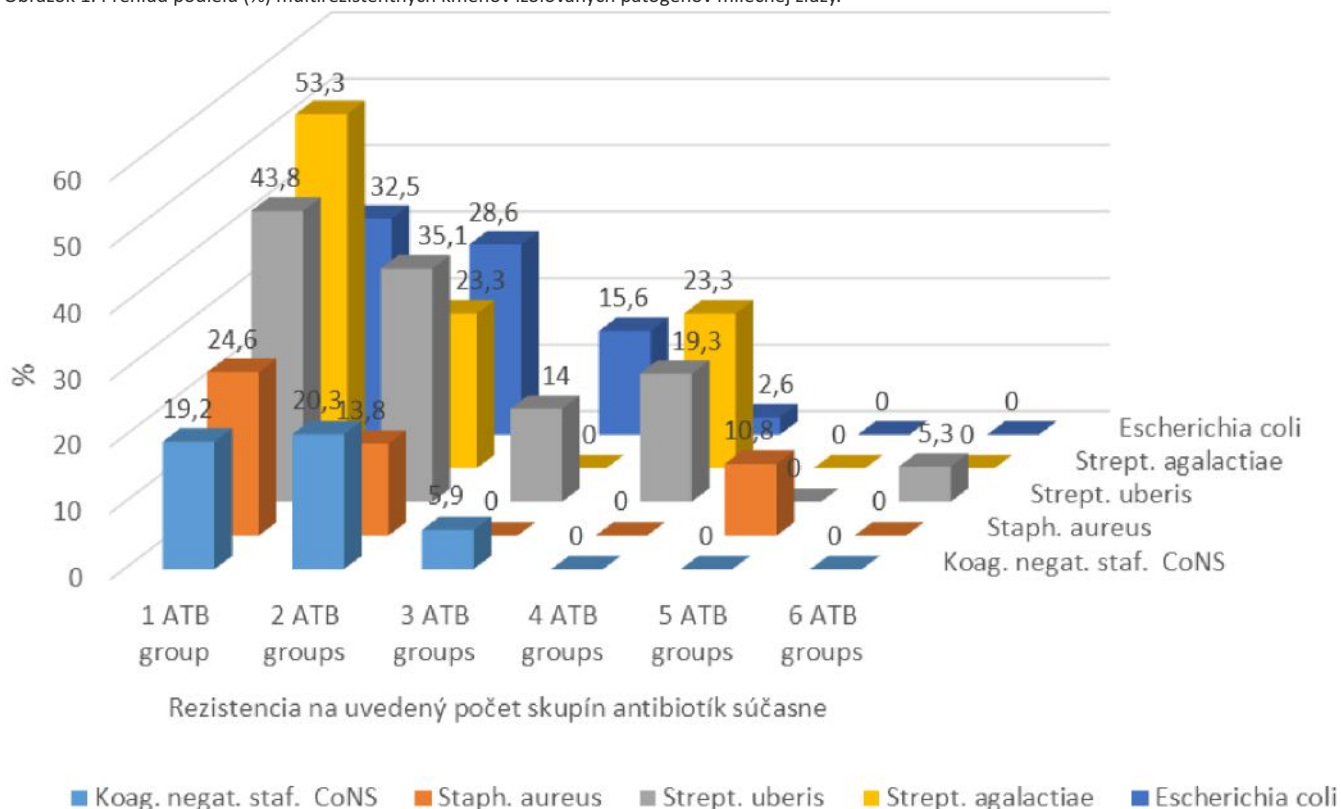
(67.1%), ampicilínu (56%), cefalotínu (44%) a tetracyklínu (48%) a väčšina kmeňov bola multirezistentná. Tieto výsledky čiastočne korelujú s našimi, najmä čo sa týka vysokého podielu rezistentných a multirezistentných *E. coli*, ako aj rezistencie na streptomycín. Aj pri *E. coli* je možné vysvetliť rozdiely v rezistencii systémom chovu dojníc, ako aj zaužívanými antibiotikami pri tlmení mastitíd.

Záver

Výsledky našej štúdie potvrdili trend rastúcej rezistencie patogénov mliečnej žľazy najmä v podmienkach intenzívneho chovu dojníc. Dominancia koaguláza negatívnych stafylokokov a *E. coli* medzi pôvodcami mastitíd svedčí o cielenom potláčaní špecifických patogénov akými sú *S. aureus*, čo však rieši problém iba klinických mastitíd, aj to len čiastočne. Najvyššiu mieru rezistencie všeobecne vykazovali patogény voči, u nás najpoužívanejším, makrolidom (STR, NEO). To svedčí o systémovom zlyhavaní paušálnych prístupov v antibiotickej preskripcii a preventívnej aplikácii antibiotík u zasušených dojníc. Na druhej strane je možné konštatovať celkovú uspokojivú citlivosť voči potencovaným penicilínom, cefalosporínom 2. generácie sulfonamidom a chinolónom. Výskyt multirezistentných kmeňov, najmä *E. coli*, môže spôsobovať problémy v terapii akútnych mastitíd, preto je potrebné pri ich vyššom výskyte klásť väčší dôraz na hygienu prostredia. K celkovému zlepšeniu by malo viesť aj upustenie od zaužívaných postupov antibiotickej prevencie mastitíd s využitím imunostimulácie a podpory prirodzenej mikroflóry vemea.

Literatúra dostupná u autorov.

Obrázok 1. Prehľad podielu (%) multirezistentných kmeňov izolovaných patogénov mliečnej žľazy.



Vývoj a trendy antimikrobiálnej rezistencie

Prof. MVDr. Vladimír Kmeť, DrSc

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4, 040 01 Košice, e-mail: kmetv@saske.sk



Na Ústave fyziológie hospodárskych zvierat SAV v Košiciach sa od roku 2005 zaoberáme problematikou rezistencie na beta-laktámové antibiotiká a fluorochinolóny u indikátorových *Escherichia coli*. Výsledky sú zverejnené na webovej stránke SlovARVet (www2.saske.sk/atbres). Poznatky zo severských štátov (Dánsko, Švédsko, Nórsko) ukázali, že po zákaze antibiotických stimulátorov rastu stúpla spotreba terapeutických antibiotík. Nepriamym ukazovateľom zvýšenej spotreby terapeutických antibiotík je trend vyššieho výskytu ESBL (beta-laktamáz s rozšíreným spektrom účinku) najmä typu CTX-M a plazmidovej chinolónovej rezistencie typu *qnrS* u potravinových zvierat.

Karbapenemázy a metalo-betalaktamázy.

Súčasným svetovým trendom vo vývoji rezistencie na antibiotiká je narastanie výskytu karbapenemáz a metalo-betalaktamáz u *Enterobacteriaceae* a pseudomonád u pacientov v nemocniciach, ako dôsledok terapie karbapenémovými antibiotikami používanými pri terapii infekcií spôsobených baktériami s rozšíreným spektrom betalaktamáz (ESBL). Metalobetalaktamázy typu IMP-7 u pseudomonád boli dávnejšie popísané aj na Slovensku (Ohlasová a kol. 2007), v poslednom období sa vyskytli aj VIM-2 a NDM-1 (Kmeť a kol. 2013, Genbank KF282709). Aj v Česku Hrabák a kol. (2009, 2013) popísali výskyt VIM-2 u *Serratia marcescens* a KPC-2, KPC-3 u *Klebsiella pneumoniae*. Pre identifikáciu a konfirmáciu karbapenemázy produkujúcich enterobakteriaceí bol vypracovaný laboratórny manuál EuSCAPE, ktorý obsahuje rýchly kolorimetrický Carba NP test (Nordmann a kol. 2012), ako aj metodiku PCR na detekciu štyroch hlavných karbapenemázových génov (OXA-48, NDM, VIM a KPC).

Výskyt karbapenemáz u zvierat.

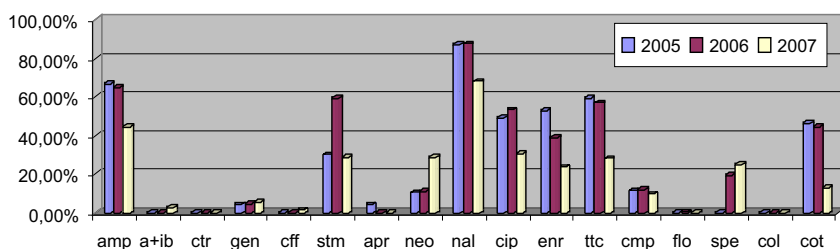
V západnej Európe v Nemecku detekovali VIM-1 u *E. coli* a *Salmonella infantis* z ošípaných a hydiny a v Belgicku a Francúzsku OXA-23 u acinetobaktera z HD a koní. V Číne dokonca detekovali aj metalo-betalaktamázy typu NDM u acinetobaktera z ošípaných a hydiny (EFSA, 2013). Pretože karbapenémy sa na terapiu zvierat v Európe nepoužívajú otázny je aj pôvod. Ako jednu z hypotéz uvádzajú Poirel a kol. (2012) terapiu kráv amoxycilínom s kyselinou klavulánovou, ktorá mohla vytvoriť selektívny tlak na šírenie sa beta-laktamázy OXA-23, s poznámkou, že OXA-23 kóduje len zníženú citlivosť na karbapenémy.

Na Slovensku rezistenciu na karbapenémy u *E. coli* prakticky u zvierat nemáme, z 921 animálnych a environmentálnych kmeňov, izolovaných v rokoch 2011–2014 na ÚFHZ SAV iba 6 bolo rezistentných na ertapeném. Treba však poznamenať, že ertapeném, nie je vhodným indikátorovým antibiotikom na detekciu karbapenemáz. V roku 2010 táto skutočnosť nebola ešte známa, preto sme ho zaradili do zostavy VetMIC Miditech testu. Karbapenémy môžu degradovať aj iné mechanizmy rezistencie ako napr. strata porínov (OmpK36) kombinovaná s ESBL alebo s naprodukciou plazmidovej ampicilínázy. Plazmidové CMY-2 ampicilínázy sú najčastejšie detekované u animálnych *E. coli*.

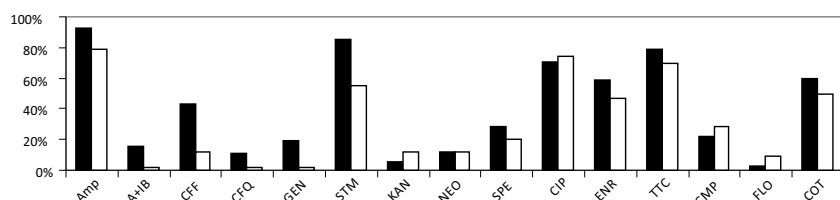
Rezistencia na cefalosporíny a fluorochinolóny u animálnych *E. coli*

V grafoch č. 1 a 2 vidíme postupné narastanie rezistencie *E. coli* na cefalosporíny u hydiny. V rokoch 2005–2007 sme testovali len ceftriaxon, avšak v ďalších rokoch sme pridali aj veterinárny ceftiofur (3. generácia) a cefchínóm (4. gen.). Štandardne vysoká je rezistencia *E. coli* na fluorochinolóny a to už od roku 2005 na úrovni 50–60 % až na 70% v roku 2009. Dokázali sme aj výskyt génu *qnrS1* u hydiny a sekvencia je uložená v GenBank pod č. GQ162867 (Kmeť, Kmeťová, 2010). U kmeňov *E. coli* z hydinového mäsa a z trusu a od teliat sme dokázali aj výskyt beta-laktamázových génov CTX-M1 (Kmeť, 2008, Genbank EU401703), CTX-M15 a CMY-2. Aj v ďalších rokoch sme zaznamenali výskyt génov ESBL u hydiny, často spojený s mobilnými elementami (integrón 1 a transpozón 3). Hodnoty MIC cefalosporínov u *E. coli* animálneho pôvodu sú však výrazne nižšie ako u humánných kmeňov *E. coli*.

Graf č. 1 Výskyt antimikrobiálnej rezistencie komenzálnych *E. coli* u brojlerových kurčiat (Kmeť a kol. 2007, Slov.Vet.Časopis)



Graf č. 2 Rezistencia na antibiotiká *E.coli* izolovaných z mäsa a trusu hydiny (2009) (Kmeť a kol. 2011, sympóziu Zoonózy Bratislava)

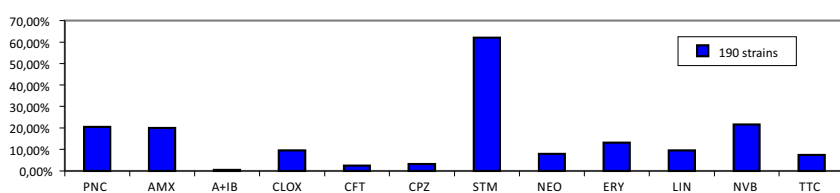


Rezistencia stafylokokov z mastitíd, v mlieku a v syroch.

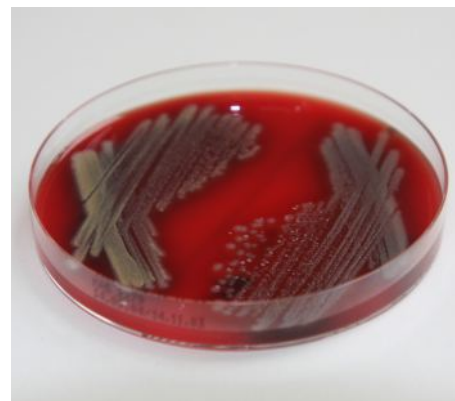
Ďalším dôležitým mechanizmom rezistencie na antibiotiká sú meticilín rezistentné stafylokoky MRSA a meticilín rezistentné koaguláza negatívne stafylokoky MRCoNS. Podľa údajov www.SNARS.sk (Slovenská databáza antimikrobiálnej rezistencie) koaguláza negatívne meticilín rezistentné stafylokoky predstavujú na oddeleniach anesteziológie a intenzívnej medicíny (OAIM) nemocníc vážny problém (Nikš, 2012).

V chovoch HD sa naplno odráža zlá ekonomická situácia vo výskyte rezistencie na antibiotiká u stafylokokov. Chovatelia nemajú finančné prostriedky na drahé antibiotiká, výsledkom je záchyt prevažne citlivých baktérií v mlieku. Je to dobrá správa pre spotrebiteľa. Na grafe č. 3 vidíme iba nižší výskyt rezistentných stafylokokov izolovaných od kráv s mastitídou. Rezistencia na kloxacilín bola 9, 5%, na erytromycín 13,2 %, na amoxycilín a penicilín na úrovni 20 % a na novobiocín 21% stafylokokov bolo rezistentných (Vasil' a kol. 2013).

Graf č. 3 Antibiotická rezistencia koaguláza negatívnych stafylokokov izolovaných z mlieka dojnic s mastitídou (Vasil' a kol. 2013)



Podobné výsledky sme dosiahli aj v rezistencii stafylokokov izolovaných z nepasterizovaného kravského mlieka a ovčích syrov (Kmeť, Straková, 2013). Fenotyp MRCoNS sa vyskytoval iba u 12, 7 % kmeňov. Gén *mecA* u MRCoNS bol izolovaný skôr ojedinele.



Rezistencia na antibiotiká u laktobacilov.

V súvislosti s riešením projektov štrukturálnych fondov sme začali aj testovanie citlivosti na antibiotiká u laktobacilov a laktokokov, kde je dôležité stanovenie tzv. získanej rezistencie probiotických a štartérových kultúr podľa ISO normy 10932 (Kmeť a kol. 2011, Slov. Vet. Časopis). Z výsledkov nášho štúdia, ale aj predchádzajúcich výsledkov testovania laktobacilov izolovaných z mliečnych výrobkov a jogurtov (Kmeť, Demánková 2008) vyplýva, že laktobacily na slovenskom trhu resp. izolované z ovčích syrov spadajú do kategórie tzv. wild type (citlivých) izolátov.

Laktobacily s génmi rezistencie na tetracyklín (*tetM*, *tetS*, *tetL*), erytromycín (*ermB*) a gentamicín (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*) sme izolovali z trusu brojlerov (Bujňáková, Kmeť 2013). To poukazuje na významnú skutočnosť, že aj črevné laktobacily môžu byť zdrojom génov rezistencie.

Otázka na záver: Aký bol dôsledok zákazu kŕmnych antibiotík u potravinových zvierat? Európsky úrad pre bezpečnosť potravín EFSA nemá doteraz relevantné údaje (Sympóziu SOMED 2012, Valencia). Namiesto kŕmnych antibiotík sa častejšie používajú terapeutické antibiotiká, najmä cefalosporíny a fluorochinolóny, výsledkom čoho je zvýšený výskyt ESBL u animálnych enterobakteriaceí.

Literatúra dostupná u autora

PROGAL



***Potencovaný probiotický přípravek
pro přežvýkavce.***

Vhodný pro:



Teřatá



Jahňatá



Kozřatá

200g

PROGAL

PROGAL® je potencovaný probiotický prípravok s obsahom *Lactobacillus casei* a potencujúcej zložky, ktorý brzdí rast a množenie nežiaducich mikroorganizmov - patogénov. Laktoflóra obsiahnutá v prípravku má vysokú schopnosť konkurenčného boja s nežiaducimi mikroorganizmami a vytvára tzv. mikrobiálnu bariéru voči patogénom a potencionálnym patogénom. Obsadením väzobných miest na črevnom epiteli zamedzuje prieniku patogénov do organizmu a zároveň znamená ich postupné vytlačanie z organizmu a prostredia.

PROGAL® stabilizáciou vnútorného prostredia a podporou rastu fyziologickej mikroflóry priaznivo ovplyvňuje tráviace procesy a využiteľnosť krmív ako aj prírastky u zvierat. Ochranou tráviaceho traktu a optimalizáciou tráviacich procesov zabraňuje výskytu hnačkových ochorení.

PROGAL® svojim pôsobením na lymfatický systém zvyšuje obranyschopnosť organizmu.

PROGAL® produkuje vitamíny B1, B2, B6, B12, niacín, kyselinu listovú a kyselinu pantoténovú. Zvyšuje stráviteľnosť proteínov. Laktobacilly vplyvom rôznych chemických látok (napr. konzervačné látky v potrave) antibiotík, chemoterapeutík sa v organizme strácajú a preto je nutné ich v črevnom systéme obnovovať.

Charakteristika

Potencovaný probiotický prípravok.

Probiotická zložka: *Lactobacillus casei* CCM 7159.

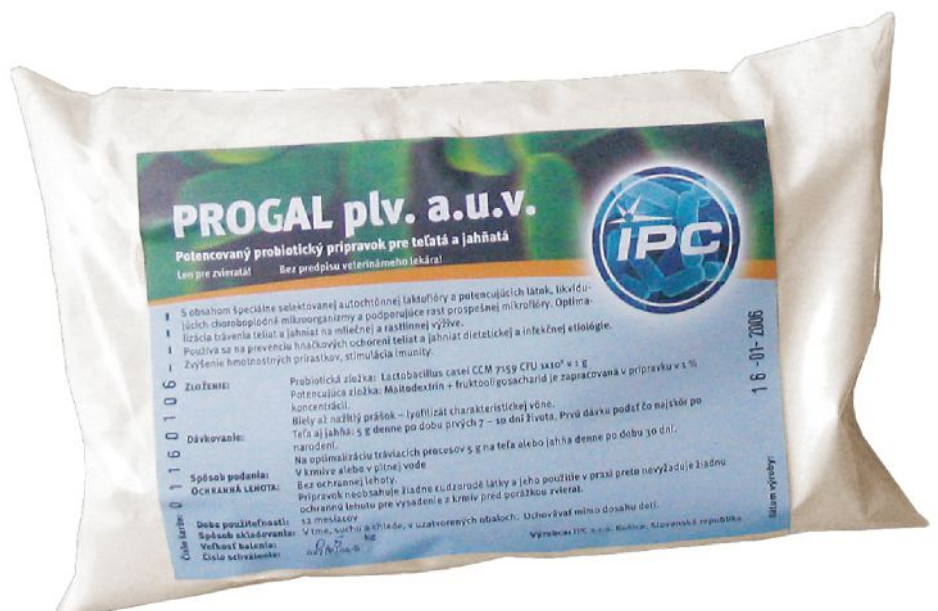
Potencujúca zložka: Maltodextrín, fruktooligosacharid v 1 % konc. v prípravku.

Indikácie

Preventívne, terapeuticky pri hnačkových ochoreniach. Zvýšenie imunity zvierat hlavne v kritických obdobiach, prvé dni života mláďat, jarne obdobie, pri zmene krmiva. Preventívne a podporne pri hnačkách a respiračnom syndróme teliat. Preventívne pri enterotoxémii jahniat. Podpora imunity v zimnom období, počas pôrodov. Pri pasteurelóze, listerióze pri kokcidióze oviec, jahniat, preventívne. Pri dlhodobom podávaní

ovciam, jahňatám aj na sanovanie prostredia.

Znižovaním prítomnosti potenciálnych patogénov a ich vytesňovaním z prostredia výrazne znižuje početnosť a výskyt mastitíd v stáde.





Ponuka laboratórnych vyšetrení pre hovädzí dobytok a malé prežúvavce

Bakteriológia a mykológia:

- Základné kultivácie kvalitatívne aj kvantitatívne (aeróbne a anaeróbne)
- Špeciálna diagnostika – typizácia bakteriálneho pôvodcu
- Uchovávanie izolovaných bakteriálnych kmeňov – výroba autovakcíny
- Stanovenie antibiotickej rezistencie (disková difúzna metóda)
- Stanovenie toxinogenity *Clostridium perfringens* (PCR)
- Stanovenie virulencie *E. coli* (serologicky, PCR)
- Dôkaz *Salmonella* spp. (kultivačne)
- Dôkaz *Listeria monocytogenes* (kultivačne)
- Dôkaz *Campylobacter* spp. (kultivačne, PCR)
- Dôkaz *Mycobacterium* spp. (PCR)
- Dôkaz *Mycoplasma bovis* (PCR)
- Dôkaz *Chlamydomphila* spp. (PCR)
- Mykologické vyšetrenie (kultivačne s typizáciou)

Virológia a serológia:

- Rota- a Coronavírus (dôkaz pôvodcov metódou ELISA)
- BVD (dôkaz pôvodcu metódou RT-PCR)
- BRSV (dôkaz pôvodcu metódou RT-PCR)
- BHV4 (dôkaz protilátok metódou ELISA)
- IBRgE (dôkaz protilátok metódou ELISA)
- PI 3+BRSV+*Mycoplasma bovis* (dôkaz protilátok metódou ELISA)
- BVD (dôkaz protilátok metódou ELISA)
- *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (dôkaz protilátok metódou ELISA)
- Leptospiroza (dôkaz a kvantifikácia protilátok metódou MAL)
- Q-horúčka / *Coxiella burneti* (dôkaz protilátok metódou RVK)
- *Chlamydomphila* spp. (dôkaz protilátok metódou RVK)
- Maedi-Visna/CEAV (dôkaz protilátok metódou ELISA)

Parazitológia

- Koprologické vyšetrenie
- *Cryptosporidium parvum* (dôkaz protilátok metódou ELISA)

vetServis

VETSERVIS, s.r.o., Kalvária 3, 949 01 Nitra
www.vetservis.sk