

Riikliku programmi “Põllumajanduslikud
rakendusuringud ja arendustegevus
aastatel 2015–2021”

**Metitsilliinresistentsete stafülokokkide levimus,
antibiootikumiresistentsus ja levikuteed veistel ja koertel Eestis**



Tartu, 2018

Projektijuht: Piret Kalmus

Asutus: Eesti Maaülikool, Kreutzwaldi 1, Tartu, 51014; registrikood: 74001086; e-posti aadress: info@emu.ee, telefon: 7313001; pangarekviisidid: EE571010102000084008

Projektijuhi kontaktandmed: Telefon: 7313291, GSM: +3725136247, piret.kalmus@emu.ee

Projekti algus: 01.01.2017

Tulemuste esitamise tähtpäev: 01.03.2018

Projekti põhieesmärk ja hüpoteesid:

Käesoleva projekti eesmärgiks oli hinnata metitsilliinresistentsete stafülokokkide (MRS) levimust eesti koerapopulatsioonis ja iseloomustada veiste piimaproovidest ja koerte kliinilisest materjalist pärinevate MRS resistentsust. Projektis esitati kaks suuremat uurimisküsimust:

1. Milline on koertel bakternakkuseid põhjustavate mikroobide antibiootikumiresistentsus? Milline on nosokomiaalinfektsioone põhjustavate metitsilliinresistentsete stafülokokkide (MRS) ja *Acinetobacter* spp. esinumus väikeloomakliinikute keskkonnas?
2. Milline on veiste udarapõletikke põhjustavate koagulaasnegatiivsete stafülokokkide (KNS), *Staphylococcus (S). aureus`e* ja koertelt isoleeritud *S. pseudointermedius`e* antibiootikumiresistentsus? Milline on MRS levimus kõikide kogutud stafülokokkide hulgas?

Projektitulemuste lühikokkuvõte:

Metitsilliinresistentsete stafülokokkide levimus koertelt ja veistel isoleeritud stafülokokkide hulgas oli madal, sest 180st uuritud tüvest 2,7% omas metitsilliiniresistentsust kodeerivat *meqA* geeni. Väikeloomakliinikute pinnaproovides (n = 358) oli MRS esinumus 15,3%, kusjuures oluliselt sagedamini esines MRS ainult inimestega seotud pindadel. Keskkonnast pärit nosokomiaalinfektsioonide vältimiseks peaksid väikeloomakliinikud koostama bioohutuse kava. Veistelt ja koertelt isoleeritud stafülokokkide fenotüübiline resistentsus oli

erinev. Suuremat tähelepanu peab pöörama reservantibiootikumide suhtes tekkinud resistentsuse vähendamisele.

(tulemused, soovitud, kuni 600 tähekohta)

Projektitulemuste lühikokkuvõte inglise keeles:

The prevalence of methicillinresistant staphylococci was low in the present study. Out of 180 staphylococcal isolates, only 2,7% carried *meqA* gene. The occurrence of methicillinresistant staphylococci in the environment of small animal clinic was 15,3%. The incidence of MRS was higher in swabsamples collected from the human-related sites compare to animal related sites. For prevention of nosocomial infection in small animal clinic, an appropriate biosecurity measures should be implemented. Phenotypic resistance of stahylococci isolated from dairy cattle and dogs was different. More attention should be paid on increase of resistance against „third line“ antibiotics and resitance monitoring in the national level should be continued.

(tulemused, soovitud, kuni 600 tähekohta)

Kogu projektiperioodi finantsaruanne, koos kulude selgitusega:

Kululiik	Periood 01.01.- 31.12.2017	Periood 01.01.-01.03. 2018	KOKKU	Selgitus
Personalikulud, puhkusetasu (netosumma)	1985,32		1985,32	Töövõtulepingu tasu ja personalikulud on ühes kululiigis koos
töövõtulepingu alusel makstud tasud				
palga ja töötasuga seotud maksud	671,05		671,05	Sotsiaalmaks, tulumaks jt. seadusega ettenähtud maksud
transpordikulu	333		333	
lähetuskulud	4955,00		4955,0	Lähetus 1. P. Kalmus Esinemine suulise ettekandega antimikroobsest resistentsusest. Lähetus 2. B. Aasmäe osavõtt AMR ümarlauast Taanis ning Hollandis. Lähetus 3. Stafülokokkide isoleerimise ja identifitseerimise õppereis.
hoonete, maa, vahendite, teadusaparatuuri, instrumentide, seadmete, inventari ostmise, liisimise, kaasajastamise, paigalduse kulud				
teadusaparatuuri, instrumentide, seadmete, inventari hoolduskulud				

lepingulise teadustegevuse, välistest allikatest ostetud, litsentsitud teadmiste ja patentide kulud				
ostetud tööde (analüüside) kulud	36601,39	3189,1	39790,5	Proovimaterjali hankimise ja proovide analüüsiga seonduvad kulud
muud tegevuskulud	224,34	61,78	286,12	Proovide kullerteenused (MRSA proovid)
tarkvaralitsentsid, juurdepääsumaksud				
erialaspetsiifilise tarkvara kulud				
üldkulud ²	1979,00		1979,00	
käibemaks				
KOKKU	46749,1	3250,9	50000	

1 Projekti elluviimiseks tehtavad kulud peavad olema tegevustega otseselt seotud ja elluviimiseks vältimatult vajalikud

2 Üldkulud on projekti elluviimisega kaudselt seotud kulud (kontoritarvete ja -tehnikate kulud), sealhulgas taristu ülalpidamise kulud (vee, kütte jm kulud) ja amortisatsioonikulu. Üldkulu ei tohi arvestada teistelt teadus- ja arendusasutustelt või laboratooriumitelt tellitud tööde maksumuselt (allhankelt).

Projektis esitatud eesmärkide saavutamine (sh kasutatud meetodika):

Uurimistööga täideti kõik projektis püstitatud eesmärgid. Käesoleva projekti esmaseks eesmärgiks oli välja selgitada väikeloomadelt isoleeritud stafülokokkide antibiootikumiresistentsus ja MRS esinemus. Uurimistöö üheaastase perioodi jooksul koguti proovid 15st väikeloomakliinikust üle Eesti. Patsientidelt võeti erinevate bakternakkuste esinemisel 185 proovi bakteriloogiliseks analüüsiks. Proovid külvati aeroobsete bakterite kasvukeskkonda ning bakteriliik kinnitati MALDI-TOF meetodikaga. Antibiootikumitundlikkus hinnati kõigepealt diskdifusiooni meetodil. Resistentsuse

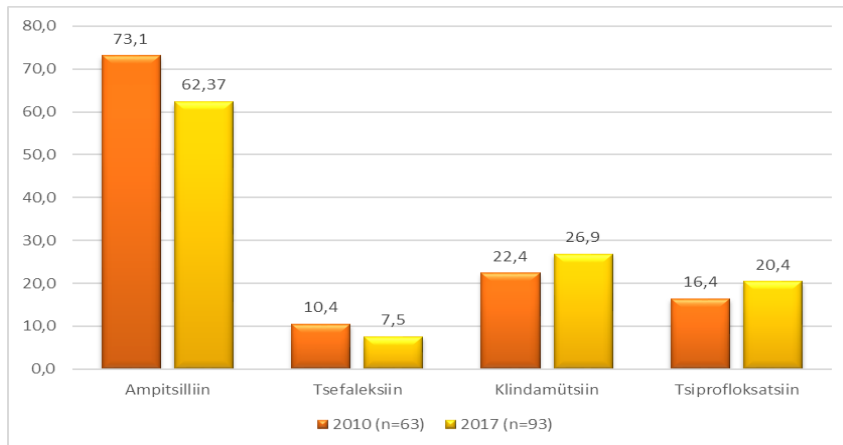
piirmääradeks kasutati EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) epidemioloogilisi piirnorme (EUCAST ECOFF). Väikeloomakliinikute keskkonnast pärinevate pinnaproovide uurimises osales 23 väikeloomakliinikut. Pinnaproovid koguti pärast rutiinset ruumide ja inventari puhastust. Proovide võtmiseks kasutati käsnaeid (*3M™Hydrated-Sponges*) ning tehti ka ka „sokiproov“ kliinikute põrandatest. Kokku võeti 358 pinnaproovi, mis külvati selektiivsele MRSA söötmele (mannitool soola agarile oksatsilliiniga). *Acinetobacter* spp. isoleerimisks kasutades standardseid mikrobioloogilisi meetodeid ja *Acinetobacter* spp. liigid kinnitati MALDI-TOF analüüsil. Uurimistöö teise küsimuse lahendamiseks uuriti mikrodilutsiooni meetodil TREK EUST plaatidel kokku 83 veistelt ja koertelt isoleeritud stafülokokitüve (25 *S. aureus*; 25 KNS, 37 *S. pseudointermedius* isolaati). Mikrodilutsiooniga määrati antibiootikumitundlikkus 19 erineva toimeaine suhtes. Fenotüübilise metitsilliiniresistentsuse tuvastamisel, uuriti neid tüvesid edasi metitsilliiniresistentsust kodeerivat geeni *meqA* kinnitamiseks. Uuringus kasutati PCR analüüsi.

Uuringu tulemused

1. Koertel bakternakkuseid põhjustavad mikroobid ja nende antibiootikumiresistentsus.

Kokku saadeti Veterinaar- ja Toidulaboratooriumisse 2017 aastal 185 väikeloomadelt võetud proovi. Kõige enam proove pärines kõrvanõrest (n = 63, 35%), nahanõrest (n = 40, 22%), haavanõrest (n= 27; 14%) ning silma- ja kurgunõrest (n = 18, 10%). Kõrvanõrest isoleeriti enim *Pseudomonas (P.) aeruginosa* (28,5%), millele järgnesid koagulaasnegatiivsed stafülokokid (KPS) (25,3%) ning koagulaaspositiivseid stafülokokid (19%). Nahapõletike korral oli peamiseks bakternakkust põhjustavaks mikroobiliigiks KPS (37%), KNS (27,5%) ning *P. aeruginosa* (17,5%). Haavanõrest isoleerus enim KPS (29,6%) ja *Escherichia coli* (18,5%). Kokku tuvastati kaks metitsilliiniresistentset *S. pseudointermedius* tüve (üks tupenõrest ja teine haavanõrest). Seega oli MRS levimus 93 isoleeritud stafülokokki hulgas 2,1%. MRS ülekandes loomadele on üheks nakkuse allikaks MRSA-positiivne inimene. Kuna Eestis jääb inimestel MRSA levimus samuti alla 5%, võime öelda, et MRSGa nakkuse tase lemmikloomadel on madal. Jooniselt 1 selgub, et võrreldes 2010 aasta samalaadse uuringuga, on beetalaktaamantibiootikumide resistentsus vähenenud,

kuid suurenenud on nii klindamütsiini kui tsiprofloksatsiini suhtes resistentsete mikroobitüvede osakaal. Eeskätt on tsiprofloksatsiini resistentsus kõrge KNS hulgas.



Joonis. 1. Isoleeritud *Staphylococcus* spp resistentsete tüvede osakaal (%) 2010 ja 2017 aastal.

2. Metitsilliinresistentsed stafülokokid ja *Acinetobacteria* spp. loomakliinikute pinnaproovides.

Kokku võeti 23st eesti väikeloomakliinikust 358 pinnaproovi. Igast kliinikust koguti proovid ainult inimestega kokkupuutuvatelt pindadelt ning loomadega seotud pindadelt. Keskmiselt võeti ühest kliinikust 15,5 pinnaproovi. MRS (n=55) isoleerus 18 (78,3%) ning *Acinetobacteria* spp (n = 28) 15 (65,2%) kliiniku pinnaproovidest. Seega saab väita, et kliinikute keskkond võib olla nosokomiaalinfektsioonide leviku kohaks ning ülekannet inimestele ja patsientidele ei saa välistada.

Tabel. 1. Kliinikute pinnaproovidest isoleeritud metitsilliinresistentset stafülokoid ning *Acinetobacteria* spp. liigiline kuuluvus.

Metitsilliinresistentset stafülokoid	%	<i>Acinetobacteria</i> spp	%
<i>S. haemolyticus</i> (n= 25)	45,5	<i>A. lwoffii</i> (n = 14)	50
<i>S. epidermidis</i> (n = 14)	25,4	<i>A. schindleri</i> (n = 4)	14,3
<i>S. warneri</i> (n = 5)	9,1	<i>A. radioresistens</i> (n = 4)	14,3
<i>S. aureus</i> (n= 4)	7,3	<i>A. calcoaceticus</i> (n = 4)	14,3
<i>S. sciuri</i> (n = 3)	5,5	<i>A. ursingii</i> (n = 2)	7,1
<i>S. hominis</i> (n = 2)	3,6		
<i>S. felis</i> ; <i>S. capitis</i> (n = 2)	3,6		
Kokku (n = 55)	100	Kokku (n= 28)	100

Metitsilliinresistentset stafülokoid isoleeriti oluliselt sagedamini (OR = 1,76, 95% CI 1.173 - 3.329, p = 0,001) ainult inimestega kokku puutvatelt pindadelt võrreldes loomadega kokku puutuvate pindadega. See näitab, et arvutiklaviatuuride, kraanide, ukseinkide ja teiste tiheda kasutusega kohtade puhastust ning desinfektsiooni tuleb parandada. Loomadega kokku puutuvatest instrumentidest oli kõige enam MRSga saastunud inhalatsioonivoolikute sisepind (21,4%), mille kaudu võivad resistentset mikroobid sattuda looma hingamisteedesse.

3. Veistelt ja koertelt isoleeritud stafülokokkide antibiootikumiresistentsus.

Käesolevas uuringus kasutati esmakordselt nii laia mikrodilutsiooni paneeli antibiootikumiresistentsuse hindamiseks (19 toimeainet).

Tabel. 2. Veistelt ja koertelt isoleeritud stafülokokkide antibiootikumiresistentsus

Antibiootikum	Läviväärtus µg/ ml*	Veised		Koerad
		KNS % (n=25)	<i>S. aureus</i> % (n=25)	<i>S. pseudointermedius</i> % (n=37)
Penitsillin	≥ 0,25	25	62,5	62,2
Tsefoksitiim	≥4	25	4,2	5,4
Mupirotiin	≥2	0	4,2	0
Erütromütsiin	≥1	8,3	50	24,3
Klooramfenikool	≥16	0	4,2	18,9
Klindamütsiin	≥0,25	20,8	4,2	24,3
Tetratsükliin	≥1	37,5	20,5	40,5
Fusidiinhape	≥ 0,5	16,7	0	10,8
Gentamütsiin	≥2	16,7	0	10,8
Kanamütsiin	≥8	4,2	2,8	32,4
Streptomütsiin	≥16	25	4,2	18,9
Tsiprofloksatsiin	≥1	0	4,2	10,8
Trimetoprim	≥2	8,3	20,5	10,8
Sulfometoksalool	>256	4,2	8,3	8,1
Kinupristin/dalfopristiin	≥1	0	29,2	0
Rifampitsiin	>0,06	16,7	0	0
Vankomütsiin	≥4	0	0	0
Linesoliid	≥4	0	0	0
Tiamuliin	≥2	25	0	0

Isoleeritud *S. aureus* hulgas oli suurim resistentsus arenenud penitsilliini (62,5%), erütromütsiini (50%) ja streptogramiinide suhtes (29,5%). Kuna streptogramiinid (dalfopristiin/kinupristiin) on oluline ravimrühm inimeste vankomütsiiniresistentsete stafülokokkide ja enterokokkide raviks, vajab sellelaadne kõrge resistentsuse leidmine edasist uurimist. *S. aureus* hulgas identifitseeriti üks MRSA tüvi. Veistelt pärit neli KNS olid fenotüübilt metitsilliiniresistentsed, millest üks omas ka *meqA* geeni. Koertelt pärit *S. pseudointermedius* oli enim resistentne penitsilliini (62,2%) tetratsükliini (40,5%) ning kanamütsiini (32,4%) suhtes. Kuna koertel kasutatakse lokaalseks raviks fusidiinhapet ja klooramfenikooli, on nende toimeaine suhtes resistentsete tüvede osakaal vastavalt 10,8% ja 18,9%. Üks *S. pseudointermedius* tüvi omas MR kodeerivat *meqA* geeni. Tulemuste kokkuvõttena võib öelda, et MRS levimus oli ka nende andmete põhjal madal (3,4%). Siiski on resistentsus arenenud resevantibiootikumide, nagu makroliidide, kinoloonide ja rifampitsiinide suhtes.

Projekti elluviimiseks kasutatud töökohtade arv, tööülesannete kirjeldus ja jaotus uurimisgrupi liikmete vahel:

Dotsent Piret Kalmus, projektijuht. Projektijuhi tööülesanded käesolevas projektis olid uurimistöö metoodika väljatöötamine, proovide kogumise koordineerimine, uurimistulemuste statistiline analüüs ja projekti aruande koostamine.

Doktorant Birgit Aasmäe, põhitäitja. Projekti põhitäitja viis läbi veistega seonduvad uurimised ning analüüsis saadud tulemusi. Doktorant Aleksandr Dedjulja, põhitäitja. Projekti põhitäitja kogus proovid loomakliinikute pindadelt, koordineeris proovide kogumist ning analüüsis koertega seonduvaid uurimistulemusi.

Liidia Häkkinen (Veterinaar- ja Toidulaboratoorium). Laboranalüüside läbiviimine.

Projektiga seotud taristu kasutamine projekti elluviimisel:

Projekti eesmärkide elluviimiseks vajalikud laboratoorse analüüsid telliti Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi bakterioloogia-patoloogia osakonnast. Veterinaar- ja Toidulaboratoorium kasutas proovide uurimiseks ja analüüsiks akrediteeritud laborimetoodikaid. Proovide kogumiseks loomakliinikutest ja küsitluste läbiviimiseks vajalikud vahendid hangiti tellimustööna.

Soovitused ja ettepanekud:

1. Tuginedes saadud uurimistulemustele näeme vajadust parandada nii loomaarstide kui loomaomanike teadlikkust antibiootikumide kasutamisest.
2. Antibiootikumiresistentsust puudutavad edaspidised uuringud on vajalikud, et hinnata resistentsusgeenide ülekannet loomade, inimeste ja keskkonna vahendusel. **Väga oluline on jätkata erinevatelt loomaliikidelt pärit mikroobide resistentsuse uuringuid rahvuslikul tasandil, et ellu viia antimikroobse resistentsuse tegevuskavas kirjeldatud eesmärgid.**
3. Väikeloomade bakternakkuste ravimisel kasutatakse liigselt ja põhjendamatult kinoloone ja makroliide, mis on reservpreparaadid ja tuleb jätta raskete, esmavaliku antibiootikumide suhtes resistentsete bakternakkuste raviks. Tarvis on läbi viia vastavasisulisi koolitusi väikeloomi ravivatele loomaarstidele.

4. Informatsioon resistentsuse võimaliku leviku ja ohtlikkuse kohta tuleb viia kõigi loomade raviga kokku puutuvate inimesteni, samuti soovitud mõistliku, resistentsuse teket maksimaalselt vältiva antibiootikumiravi kohta.

Muud olulised asjaolud:

Käesoleva rakendusuringu põhjal on valmimas doktorant Aleksandr Dedjulja teadusartikkel ning uuring on üks tema doktoritöö osa. 2017 aastal valmisid ravijuhised produktiivloomade bakternakkuste raviks.