

## Indications for the monitoring of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in animals

Pejsak Z., Truszczyński M., National Veterinary Research Institute, Puławy

Task Force on Zoonoses and European Food Safety Authority (EFSA) of the European Union (EU) encourage research on crucial topics concerned with prophylaxis of zoonotic diseases. The accepted strategy requires coordinated partnership among EU Members. This is related to implementation of the same evaluation methods by each of the participants. One of the topics initiated in Belgium, with the intention to be started in other Member Countries including Poland, concerns the prevalence survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in swine, in pig farmers and in their family members. On the basis of the report from Belgium and related other publications the importance of the reservoir of MRSA in the general human population in comparison to pig farmers community was characterized. The isolated MRSA strains were classified in the mentioned survey using molecular typing methods. Basing on these tests for *Staphylococcus aureus* and particularly for MRSA strains, the sequence types (ST) and clonal lineages or genetic clones were differentiated. This enabled to identify strains originated primary from animals, being the source of infection for humans. In the report from Belgium and in other publications the clonal complex ST 398 of MRSA was found to be an important infection reservoir in swine. However, in the same report lower pathogenicity for humans of the strains isolated from animals was observed when compared with strains isolated from humans that had no contact with the animal reservoir. These investigations will be continued in other EU countries, contributing to the final conclusion concerning the risk of swine-originated MRSA strains for human health. It is suggested to extend these surveys to other species of food animals and to the food products.

**Keywords:** methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, swine reservoir, humans.

W ramach Unii Europejskiej, zgodnie ze strategią Wydziału do spraw Zdrowia (DG Sanco) Komisji Europejskiej, jako niezbędna uznana została w 2007 r., oparta o koordynowane działania, współpraca między państwami członkowskimi w zakresie profilaktyki i zwalczania chorób zakaźnych człowieka ([http://ec.europa.eu/health/ph\\_overview/strategy/reflection\\_process\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/ph_overview/strategy/reflection_process_en.htm)). Do tej tematyki należą między innymi: choroby odzwierzęce, reprezentowane przez Grupę Zadaniową do spraw Zoonoz (Task Force on Zoonoses) oraz bezpieczeństwo żywności, będące w gestii Europejskiego Urzędu do spraw Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority – EFSA). Oba wymienione obszary stanowią pole kontaktów między

## Wskazania do monitorowania występowania u zwierząt gronkowca złocistego opornego na metycylinę

Zygmunt Pejsak, Marian Truszczyński

z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

specjalistami medycyny i weterynarii. Dzielące kraje członkowskie granice nie stanowią skutecznej bariery dla drobnoustrojów chorobotwórczych, w tym równocześnie patogennych dla człowieka i zwierząt, co uzasadnia ściśle współdziałanie między państwami członkowskimi UE.

Jednym z tematów podjętych do wspólnej realizacji jest określenie występowania u zwierząt metycylinoopornego gronkowca złocistego (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA). Odnośne badania w ramach Unii Europejskiej zostały zainicjowane w Belgii (1), a zastosowana metodyka i uzyskane wyniki, dotyczące występowania MRSA u świń oraz osób mających z nimi kontakt, przedstawiono w raporcie z 22 sierpnia 2007 r. pt. „Występowanie metycylinoopornego gronkowca złocistego u świń i hodowców świń w Belgii w porównaniu do pozostałej ludzkiej populacji” (Prevalence survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in swine and pig farmers in Belgium compared to other human population). W nawiązaniu do wymienionych badań Grupa Zadaniowa do spraw Zoonoz została poproszona przez EFSA o zorganizowanie w innych państwach Unii Europejskiej analogicznych przeglądów, dotyczących występowania MRSA u trzody chlewnej. W związku z tym w styczniu 2008 r. ogłoszono w Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej decyzję Komisji z 20 grudnia 2007 r. w sprawie wkładu finansowego Wspólnoty na rzecz określenia występowania MRSA w stadach świń hodowlanych w państwach członkowskich UE. W ślad za powyższą decyzją główny lekarz weterynarii RP opracował wytyczne dotyczące przeprowadzenia badań nad występowaniem MRSA w stadach świń hodowlanych w Polsce. Wytyczne te (nr GIW z IX 401 200-3/08) zostały ogłoszone z datą 11 stycznia 2008 r. Zgodnie z tym dokumentem Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego został zobowiązany do wykonania odnośnych prac. Komisja Europejska, w oparciu o dane statystyczne EUROSTAT 2005, wyznaczyła Polsce do zbadania w sumie 327 gospodarstw. Informacje przesłane przez wojewódzkie

inspektoraty weterynarii do Głównego Inspektoratu Weterynarii posłużyły do opracowania harmonogramu pobierania próbek, proporcjonalnie do liczby gospodarstw utrzymujących świnię hodowlaną w poszczególnych województwach, z podziałem na gospodarstwa produkcyjne i reprodukcyjne. Jak w przypadku innych tego rodzaju przeglądów, Komisja Europejska zaleciła pobranie 10% więcej próbek niż wskazana liczba stad, tak że program badawczy obejmuje łącznie 360 gospodarstw.

W celu przybliżenia metod oraz rodzaju badań, które będą realizowane w Polsce odnośnie do MRSA, przedstawiony zostanie w tym artykule, w swych bardziej istotnych elementach, raport z 22 sierpnia 2007 r., zawierający zastosowane techniki oraz wyniki badań wykonanych w Belgii na temat występowania MRSA u świń i ludzi, będących z nimi w stałym kontakcie, w porównaniu do osób niestykających się z tymi zwierzętami.

Raport zawiera wskazania dotyczące pobierania próbek od zwierząt i ludzi. Będą one obowiązywać również w przypadku realizacji analogicznych przeglądów w innych krajach członkowskich, co zgodnie jest ze wspomnianą strategią wspólnych działań, koordynowanych w ramach Unii Europejskiej. Tego rodzaju harmonizacja metod i procedur jest niezbędna przy porównywaniu wyników uzyskiwanych w poszczególnych krajach członkowskich i formułowaniu wspólnych dla kontynentu europejskiego wniosków.

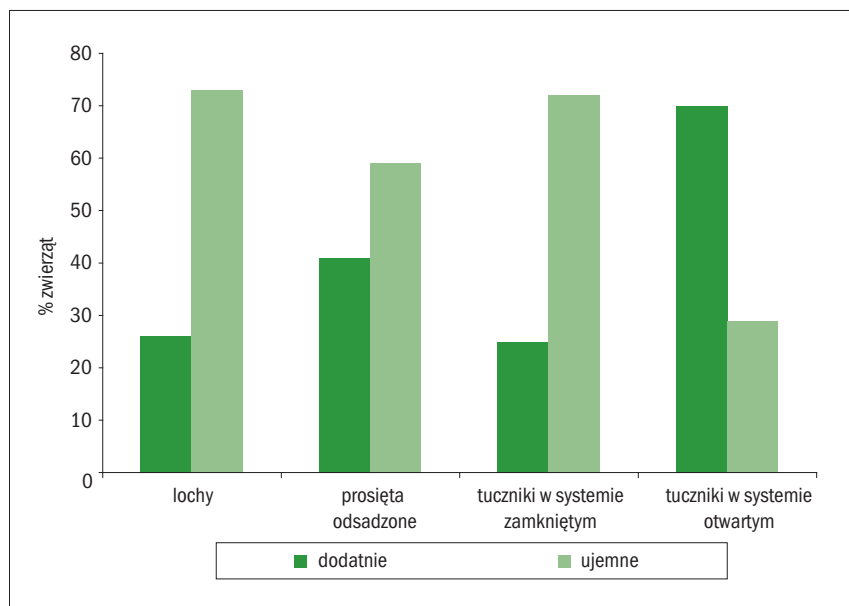
Wykorzystanie dostępnych metod, opartych na właściwościach molekularnych i genetycznych bakterii, do rozróżnienia klonów, linii genetycznych lub typów sekwencyjnych w ramach poszczególnych gatunków, w tym gatunku *Staphylococcus aureus*, umożliwia realizowanie badań epidemiologicznych. Odnoszą się one m.in. do identyfikacji źródeł szczepów antybiotykoopornych, występujących u człowieka i poszczególnych gatunków zwierząt oraz w środowisku ich bytowania. W koordynowanych przez Unię Europejską, a wykonanych w Belgii badaniach, dotyczących określenia rezerwuaru zwierzęcego zoonotycznych szczepów *S. aureus*, wykorzystano elektroforezę pulsacyjną w żelu

agarowym (pulsed field gel electrophoresis – PFGE), typowanie wielomiejscowych sekwencji (multilocus sequence typing – MLST), test *SCCmec* (staphylococcal chromosome cassette mec) i określanie sekwencji *spa* (1,2). Metycylinooporność gronkowca złocistego koduje gen *mecA* znajdujący się w kasecie chromosomowej *SCCmec*. Wykrywany jest za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (polymerase chain reaction – PCR; 3).

Oporny na metycylinę gronkowiec złocisty jest ważnym patogenem człowieka. Wywołuje ropne zapalenie skóry i tkanki podskórnej, zapalenie płuc oraz bakterie-mię. Stanowi znaczące zagrożenie zdrowia człowieka w zakażeniach szpitalnych wywołanych przez szczepy często dodatkowo odporne na dostępne antybiotyki. Jest również przyczyną chorób u zwierząt (2, 4). U bydła i owiec, a rzadziej u kóz i świń, powoduje zapalenie gruczołów mlekowych o ostrym lub przewlekłym przebiegu. Wywołuje też ropnie w tkance podskórnej. U nowo narodzonych jagniąt jest przyczyną posocznicy, a u kilkutygodniowych ropowicy. Stwierdzany jest u kurcząt, kacząt, gąsiąt oraz indycząt w przypadkach ostrego zapalenia stawów. U wszystkich gatunków zwierząt domowych wywołuje czyraczcę. Niewykazujące objawów klinicznych zwierzęta gospodarskie i towarzyszące człowiekowi są, w dużo wyższym odsetku niż chorujące, bezobjawowymi nosicielami gronkowca złocistego. Stanowią zatem poważny rezerwuwar potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka szczepów tego drobnoustroju. Z tego względu zaliczane są do grupy drobnoustrojów zoonotycznych, czyli odzwierzęcych zarazków potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka. Wśród nich znajdują się szczepy odporne na metycylinę (MRSA), a często równocześnie też na penicylinę, oksacylinę, amoksycylinę oraz na inne antybiotyki. Takie szczepy stwarzają duże trudności w antybiotykoterapii wywołanych przez nie chorób u ludzi. Stanowią też źródło genów determinujących antybiotykkooporność u innych bakterii, przejmujących je do swego genomu. Tym samym szczepy gronkowca złocistego przyczyniają się do rozprzestrzenienia się wielorakiej antybiotykkooporności na inne gatunki drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka i zwierząt (1, 2, 4).

Wyniki cytowanego wyżej raportu (1) przedstawiają się następująco. Spośród 1500 próbek, z których izolowano szczepy gronkowca złocistego, 663 okazało się MRSA. Pochodziły one z 34 ferm. **Rycina 1** przedstawia odsetki świń, które były nosicielami i od których nie izolowano szczepów MRSA, zależnie od grup wiekowych (1).

W ocenie ilościowego występowania szczepów MRSA, zależnie od rodzaju



Ryc. 1. Odsetki świń dodatnich (nosiciele MRSA) i ujemnych w poszczególnych grupach wiekowych (1)

chowu, okazało się, że świny w fermach zamkniętych są w mniejszym stopniu zakażone szczepami antybiotykkoopornymi niż w fermach otwartych. Dodatkowo w fermach o zamkniętym typie produkcji prawdopodobieństwo występowania szczepów MRSA było większe u prosiąt w porównaniu do loch i tuczniaków. Wykazano też (1), że bezobjawowe nosicielstwo MRSA u hodowców świń, pracowników ferm trzody chlewnej i członków ich rodzin wynosi 37,8%, a u osób niemających kontaktów ze świnią 1,6%. Jest ono zatem zdecydowanie niższe w tym drugim przypadku. Dowodzi to, że świny i środowisko ich bytowania stanowią poważne źródło szczepów MRSA. Mimo to u ludzi, nosiciele MRSA, powstawanie ropni lub zapaleń skóry wywołanych przez te szczepy było rzadkie. Nie potwierdzało to obaw, co do znaczenia odzwierzęcych szczepów MRSA w rozwoju trudno leczących się antybiotykami chorób ludzi. Wskazywało natomiast na udział w wymienionych stanach patologicznych szczepów MRSA ściśle ludzkich, generowanych intensywną antybiotykoterapią. Mimo to rozważane jest wprowadzenie obowiązku badania osób kontaktujących się ze świnią na obecność MRSA w przypadku konieczności przyjęcia do szpitala. Intencją jest ograniczanie ewentualnie dodatkowo, czyli odzwierzęcego źródła szczepów MRSA, w środowisku osób o osłabionym układzie immunologicznym.

W opublikowanej w 2008 r. z terenu Holandii pracy (5) badano różne rodzaje ferm świń, w tym chlewnie produkujące prosięta na sprzedaż i fermy zarodowe, pod kątem ich roli w transmisji szczepów MRSA do tuczarń. Do badań włączono też jedno centrum inseminacyjne. Badaniem wymazów od 310 świń z 31 ferm wykazano, że w nozdrzach 35 zwierząt (11%)

występowały szczepy MRSA. Zastosowanie metod molekularnych w identyfikowaniu wymienionych szczepów wykazało, że stanowiły one klon MLST 398. W jego obrębie zidentyfikowano następujące typy *spa*: t011, t108, t567, t899 i t939.

W badaniach tych potwierdzona została zależność między nosicielstwem u osób zawodowo kontaktujących się ze świnią szczepów MRSA a ich występowaniem u tych zwierząt. Szczepy te były, oprócz oporności na metycylinę, odporne również na tetracykliny (w 100%), aminoglikozydy (w 55%) i chinolony (w 33%). Jednakże szczepy MRSA izolowane od pracowników zatrudnionych w fermach świń, czyli odzwierzęce, różniły się we właściwościach genetycznych od szczepów MRSA izolowanych od pacjentów z oddziałów szpitalnych i od obsługującego ich personelu medycznego, którzy nie mieli kontaktu ze zwierzętami, czyli od szczepów uczestniczących w zakażeniach u ludzi. Wynik ten może wskazywać, podobnie jak wyniki raportu belgijskiego (1), iż rola szczepów odzwierzęcych w wywołaniu trudno leczących się zakażeń gronkowcowych u ludzi jest znacznie mniejsza niż szczepów ściśle ludzkich, które pojawiają się w następstwie stosowanej w szpitalach intensywnej antybiotykoterapii.

Szczepy MRSA wykryto również u bydła, drobiu, koni, psów, kotów i królików. Jednak, jak dotychczas, trudno ocenić stopień zagrożenia z tych źródeł zdrowia człowieka oraz tego rezerwuaru MRSA dla zdrowia publicznego.

W podsumowaniu stwierdza się (1), że w świetle dotychczasowych danych Unia Europejska uważa za wskazane uzyskanie pełniejszej oceny znaczenia rezerwuaru zwierzęcego szczepów MRSA w wywołaniu trudno leczących się antybiotykami

chorób człowieka. Wyrazem tego jest wspomniana decyzja o finansowaniu analogicznych, jak wykonane w Belgii, badań dotyczących trzody chlewnej (1) w pozostałych krajach członkowskich. Rozważane jest również określenie występowania MRSA, z uwzględnieniem identyfikowania dominujących linii klonalnych, u innych niż świnie gatunków zwierząt rzeźnych. Do tej tematyki rozważa się dołączenie innych gatunków drobnoustrojów, zwłaszcza z rodzaju *Salmonella*. Ważnym wskazaniem jest koncentrowanie się na stadach rodzicielskich, z których pochodzą zwierzęta rzeźne. Dodać należy, że w rozprzestrzenianiu się w populacjach zwierząt szczepów MRSA mają znaczenie przerzuty z jednych miejsc do drugich. Przyszłe badania,

jak wynika z sugestii omawianego raportu (1), powinny też ocenić rolę transmisji do człowieka chorobotwórczych drobnoustrojów z żywności pochodzenia zwierzęcego. Należy brać pod uwagę ryzyko zatrudnionych w rzeźniach i przetwórstwie surowców zwierzęcych pracowników pod kątem zakażeń wywołanych z tych źródeł szczepami MRSA oraz innymi zoonotycznymi gatunkami bakterii, z uwzględnieniem ich oporności na antybiotyki.

### Piśmiennictwo

1. Anon.: Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on a proposal for technical specifications for a baseline survey on the prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in breeding pigs. *EFSA Journal* 2007, 129, 1-14.

2. Leonard F.C., Markey B.K.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. *Vet. J.* 2008, 175, 27-36.
3. Iandolo J.J.: Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 1989, 43, 375-402.
4. Anon.: Centers for Epidemiology and Animal Health, Info Sheet, United States Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. A growing concern for animal and human health. *Veterinary Services* 2007, 1-4.
5. van Duijkeren E., Ikawaty R., Broekhuizen-Stins M.J., Jansen M.D., Spalburg E.C., de Neeling A.J., Allaart J.G., van Nes A., Wagenaar J.A., Fluit A.C.: Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Vet. Microbiol.* 2008, 126, 383-389.

Prof. dr hab. Zygmunt Pejsak, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: zpejsak@piwet.pulawy.pl

## Nowotwory tkanki krwiotwórczej u psów i kotów. Część IV. Białaczki

Rafał Sapierzyński

z Zakładu Patomorfologii Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

### Definicje i klasyfikacja białaczek u zwierząt

Nowotworowe i nienowotworowe rozrosty komórek układu krwiotworzenia przyjęło się dzielić na choroby limfo- i mieloproliferacyjne. W pierwszym przypadku, **chorób limfoproliferacyjnych**, zazwyczaj chodzi o nowotworowe procesy rozrostowe wywodzące się z komórek układu chłonnego (limfocytów), określanymi mianem **chłoniaków** (*lymphoma*). Chłoniaki bywają często nazywane chłoniakami złośliwymi (*lymphoma malignum*) lub chłoniakomięsakami (*lymphosarcoma*), co ma podkreślać ich złośliwy charakter. Należy jednak mieć na uwadze fakt, że każdy chłoniak jest rozrostem mniej lub bardziej złośliwym i dodawanie mu tego określenia nie wydaje się konieczne. Zarówno wśród lekarzy praktyków, jak i studentów medycyny weterynaryjnej istnieją niejasności w odróżnianiu chłoniaków od białaczek limfatycznych. Wydaje się też, że precyzyjne odróżnienie jednych od drugich może być trudne. Pod pojęciem chłoniaka rozumie się rozrost nowotworowy dotyczący limfocytów, z kolei białaczka to nowotworowy proces rozrostowy toczący się pierwotnie w szpiku kostnym. Tak więc mianem **białaczki limfatycznej** (lymphoid laeukaemia) określa się nowotworowy

rozrost dotyczący limfocytów (czyli chłoniak), który pierwotnie rozwinął się w szpiku kostnym (a niekiedy, jak podaje Vail, także w obrębie śledziony; 1). W przypadku gdy dochodzi do wysiewu komórek nowotworowych do krwi, mamy do czynienia z białaczką limfatyczną leukemiczną, a jeżeli tego wysiewu do krwi nie ma, to jest to białaczka limfatyczna aleukemiczna. Z kolei, gdy miejscem wyjścia chłoniaka jest węzeł chłonny lub tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego, grasicy itp., to chłoniak ten nie ma charakteru białaczki (proces nowotworowy nie rozpoczął się pierwotnie w szpiku kostnym), jednakże w przypadku rozsiewu procesu nowotworowego, w przebiegu którego dochodzi do pojawienia się komórek chłoniaka we krwi lub/i w szpiku kostnym, mamy do czynienia z postacią białaczkową chłoniaka, lecz nie jest to w dalszym ciągu pierwotna białaczka limfatyczna.

Odróżnienie białaczki limfatycznej od wielogniskowego chłoniaka może być trudne, szczególnie w przypadku, gdy komórki nowotworowe są obecne w węzle chłonnym, szpiku kostnym oraz we krwi. Najważniejszą cechą różnicującą jest stan węzłów chłonnych, albowiem jeżeli stwierdza się obecność komórek chłoniaka w szpiku kostnym i/lub krwi, bez zajęcia węzłów chłonnych, ani w innych narządach

wewnętrznych, stan taki wskazuje na białaczkę limfatyczną. Z kolei, w sytuacji gdy początkowo obserwuje się powiększenie węzłów chłonnych oraz/lub obecność nacieków nowotworowych w narządach wewnętrznych, a dopiero w drugiej kolejności zidentyfikuje się komórki nowotworowe we krwi lub/i w szpiku kostnym, mamy podstawy do rozpoznania chłoniaka wielogniskowego z rozsiewem nowotworu i obrazem białaczkowym. Poza tym, jak podaje Valli, w przebiegu nowotworów układu limfatycznego komórki nowotworowe są zawsze obecne we krwi obwodowej, czy je się tam wykrywa lub też nie, dlatego też białaczkę limfatyczną lub chłoniaka należy traktować jako różne postacie tej samej choroby niż oddzielne jednostki chorobowe (2). W odróżnianiu pomiędzy ostrą białaczką limfatyczną a białaczką przewlekłą oraz chłoniakiem z wtórnym zajęciem szpiku kostnego pomocne może być barwienie immunohistochemiczne z zastosowaniem przeciwciał przeciwko antygenowi CD34. Antygen CD34 jest antygenem typowym dla komórek blastycznych i jego ekspresję wykazano we wszystkich przypadkach białaczek ostrych (zarówno ostrych białaczek limfoblastycznych, jak i ostrych białaczek szpikowych) i nie obserwowano jej w komórkach chłoniaków i przewlekłych białaczek limfocytarnych (1).

Ze względu na stopień zróżnicowania komórek nowotworowych w przebiegu białaczek pochodzenia limfatycznego dzieli się je na **ostrą białaczkę limfoblastyczną**, która charakteryzuje się rozrostem młodocianych, nie zróżnicowanych komórek linii limfoidalnej (limfoblasty, prolimfocyty), oraz **przewlekłą białaczkę limfocytarną**, w której komórki nowotworowe wykazują pewien stopień zróżnicowania,