

# Dyreassosiert MRSA



Nettundervisning  
28 November 2013

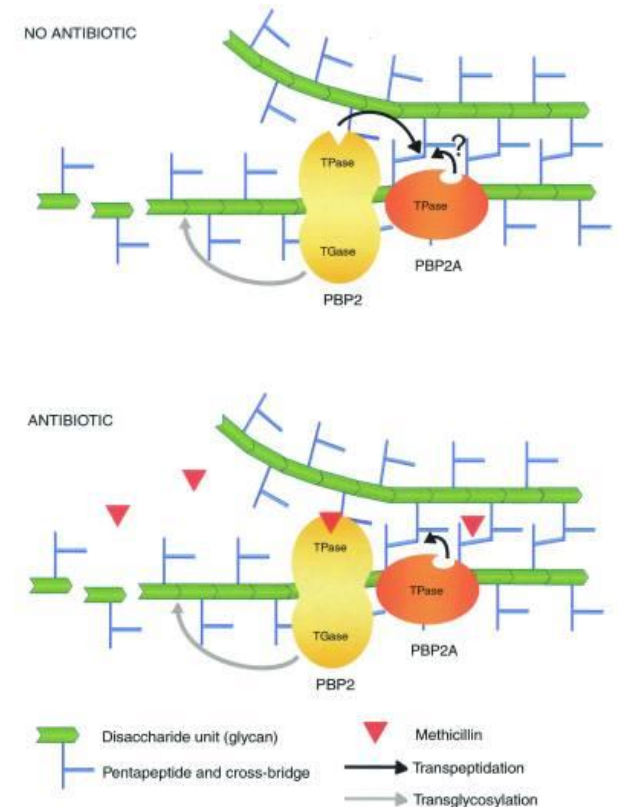
Kjersti Wik Larssen  
St.Olavs Hospital

# Innhold

- Kort om MRSA
  - Genotyping/ nomenklatur
- Dyreassosiert MRSA
  - Hva
  - Epidemiologi
  - Konsekvenser
    - Smittevern
    - Diagnostikk

# Hva er MRSA

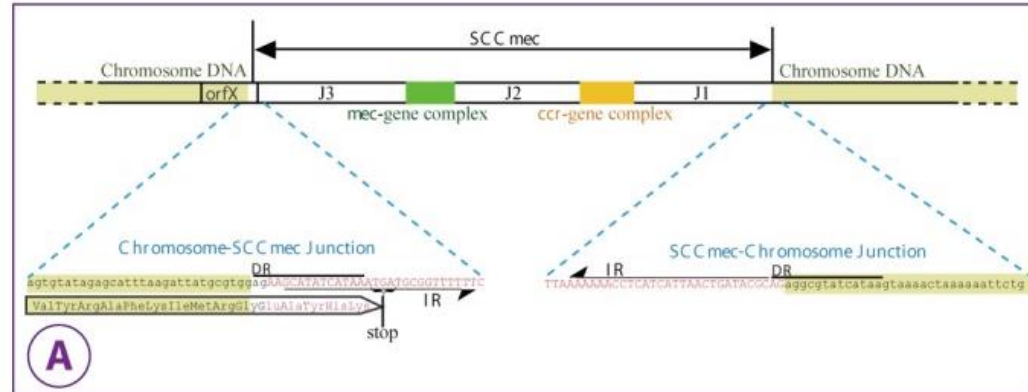
- *S.aureus* med **nytt gen** som koder for et endret penicillinbindende protein: **PBP2a** eller **PBP2c**
- PBP2a/2c har lav affinitet for betalaktamantibiotika
  - Celleveggsyntesen fortsetter
  - Gir resistens mot alle betalaktamantibiotika



Pinho MG et al. PNAS 2001;98:10886-10891

# SCC*mec* struktur

- Genet som koder for endret PBP2, *mecA* eller *mecC*, sitter i en kromosomkasett, *SCCmec*.
  - lokalisert på 3' enden av *orfX* genet.
  - 11 ulike typer per i dag
- Kombinasjon type *mec*-gen kompleks og type *ccr* – gen kompleks gir *SCCmec* typen
  - Subtype *SCCmec* basert på ulikheter i J (Junkyard) regionene

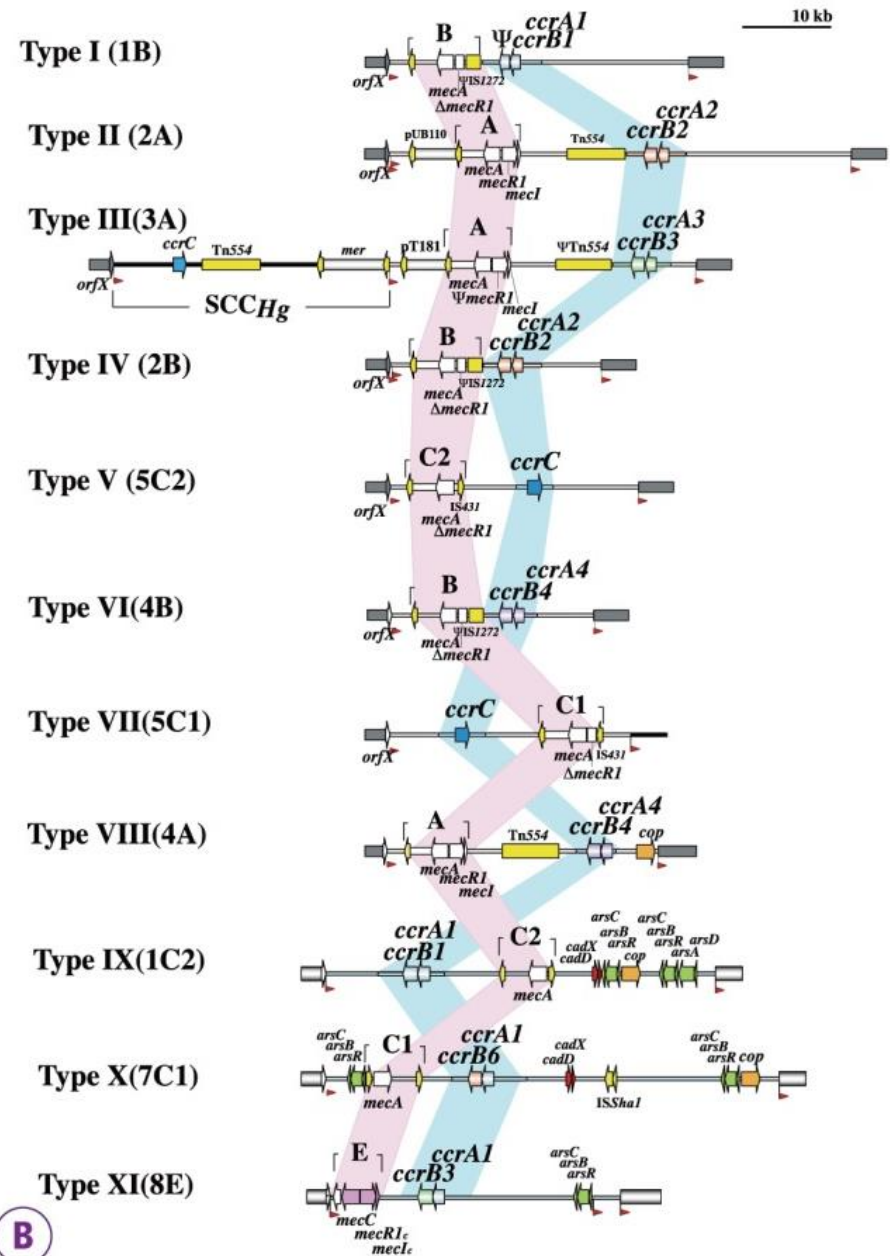


Hiramatsu K et al. *Infect Chemother* 2013;45:117-136

***mec* genkompleks:** *mecA/C*, *mecI* (repressor)  
*mecR1*(transmembran signal transducer)  
***ccr* gen kompleks:** *ccrA*, *ccrB*, *ccrC* (rekombinasegener)  
**Junkyard (J) regioner:** kan inneholde resistensgener  
 Evt **IS elementer** (IS 431, IS 1272) eller **transposoner**

# SCCmec typer

- *Type I-III store*
  - *Multiple resistensgener*
- *Type IV og V små*
  - *Sjelden multiresistens*
  - *Utbredt blant KNS*
  - *Tendens til å:*
    - *Spres lettere*
    - *Mer virulente*
    - *Raskere vekst*
    - *Lavere grad av betalaktamresistens (heteroresistens)*



**B**

Hiramatsu K et al. Infect Chemother 2013;45:117-136

# Nomenklatur *mec* gen

- Påvist fire grupper *mecA* homologer.
  - *mec* gentype basert på sekvenslikhet med *mecA* prototype:
  - *mecA* (*S.aureus* N315)
    - >95 % homologi med N315: *mecA*
    - >70 %, <95 % homologi med *mecA*: *mecA1* (*S.sciuri*), *mecA2* (*S.vitulinus*)
  - *mecB* (*Micrococcus caseolyticus*)
  - *mecC* (*S.aureus* LGA251)
- } <70 % homologi med prototype

Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A et al. Guidelines for reporting novel *mecA* gene Homologues. Antimicrob Agents Chemother 2012

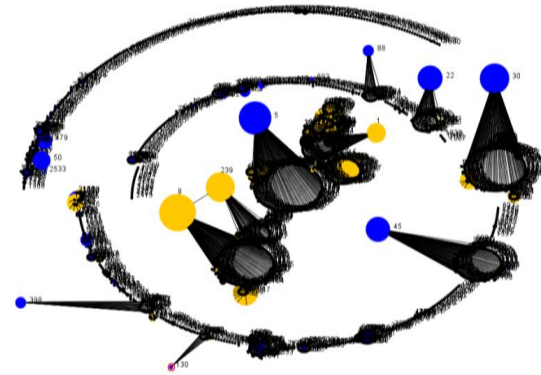
# MRSA klassifisering

- Sekvenstype (ST) + SCC*mec* type
  - Eg ST8-MRSA-IV
- En ST *S.aureus* kan ha ulike SCC*mec*
  - Resistens ervervet til ulike tider
    - Eg ST8-MRSA-II
- *spa*-type (*S.aureus*)
- Tilstedeværelse av enkelte gener, eg:
  - PVL

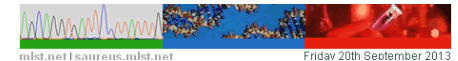
# Multi Locus Sekvenstyping (MLST)

- Sekvensering av et område i 7 husholdningsgener
  - ~ 450 - 550 bp

- **Gener som inngår for *S. aureus***
- *arcC* - carbamate kinase
- *aroE* – shikimate dehydrogenase
- *glpF* – glycerol kinase
- *gmk* – guanylat kinase
- *pta* – phosphate acetyltransferase
- *tpi* – triosephosphate isomerase
- *yqiL* – Acetylene coenzyme A acetyltransferase



MLST  
Multi Locus Sequence Typing



Friday 20th September 2013

Egnet for langsiktig /global epidemiologi

Variasjon som utvikles  
langsomt (Lite mutasjoner/  
stabile over tid)



# Eksempel MLST

MLST

ST 398

Numerisk kode for hvert allel

Gen	<i>ArcC</i>	<i>AroE</i>	<i>GlpF</i>	<i>Gmk</i>	<i>Ptu</i>	<i>Tpi</i>	<i>YqiL</i>
Allelenr.	3	35	19	2	20	26	39

Nukleotidsekvens for ArcC kode 3

>arc3  
TTATTAATCCAA CAAGCTAAATCGAACAGTGCACAA CGCCGGCAATGCCATTGG  
ATACTTGTGGTGCAA TGTCACAGGGTATGATAGGCTATTGGTTGGAAACTGAAAT  
CAATCGCAATTTAACTGAAATGAA TAGTGATAGAACTGTAGGCACAA TCGTTACA  
CGTGTGGAAAGTAGATA AAGATGATCCACGATTTGATA ACCCAACTAAACCAATTG  
GTCCTTTTATA TACGAAA GAAGAA GTTGAAGAA TTACAAAAGAA CAGCCA GACT  
CAGTCTTTAAAGAAAGATGCAGGACGTGGTTATAGAAAAGTAGTTGCGTCACT  
ACCTCAA TCTA TACTAGAACA CCAGTTAA TTCGAAC TTTAGCAGACGGTAAAAAT  
ATTGTCATTGCA TGCGGTGGTGGC GGTA TTCAGTTA TAAAAAAGAAAA TACCT  
ATGAAGGTGTTGAAGCG

Ut fra nukleotidsekvens tildeles et allelnummer

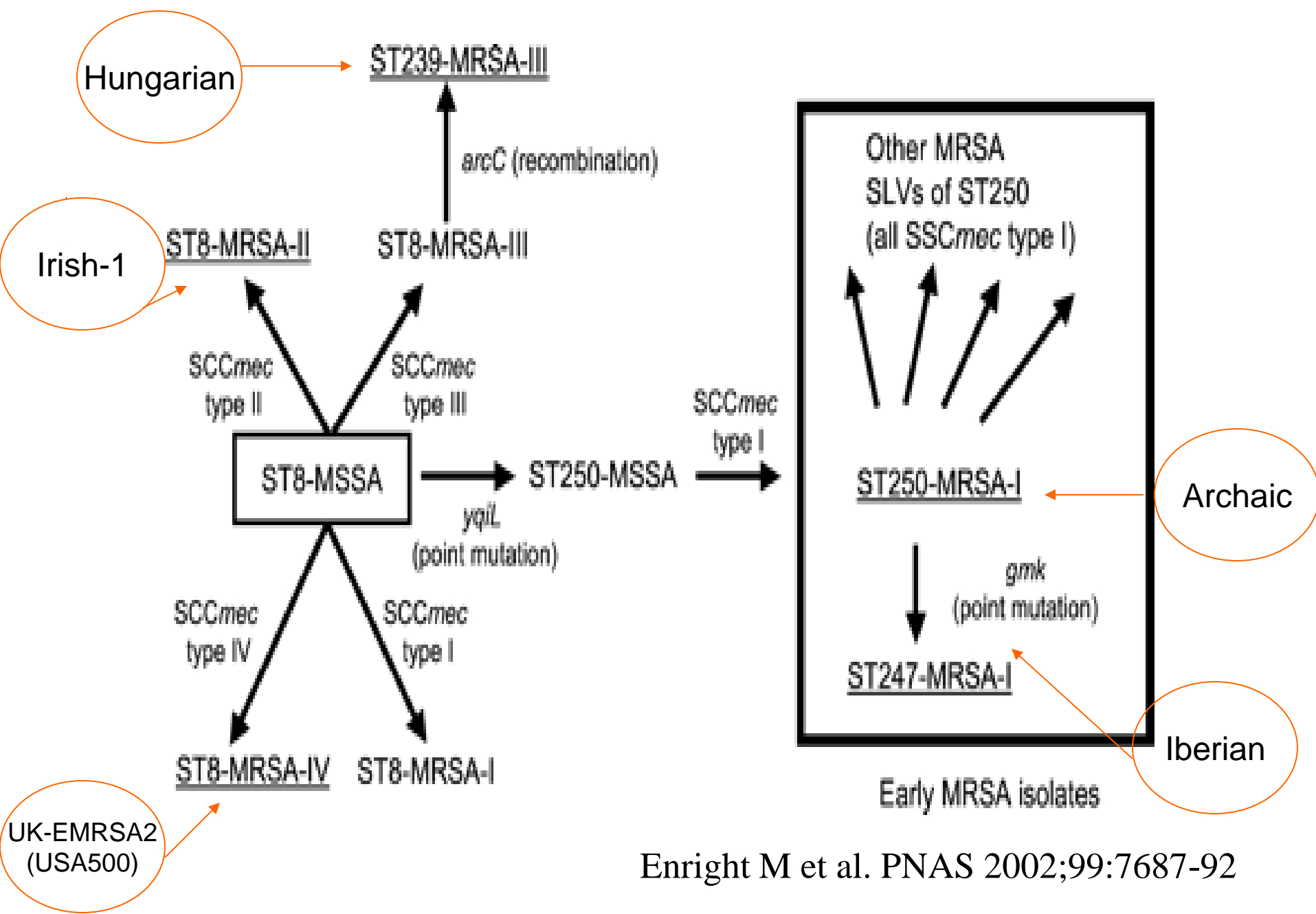
Sammensetningen av allele varianter gir sekvenstypen

Andre sekvenstyper har andre kombinasjoner av allele numeriske koder

ST8 (Irsk): 3-3-1-1-4-4-3

ST 250 (Archaic): 3-3-1-1-4-4-16 (singel locus variant av ST 8)

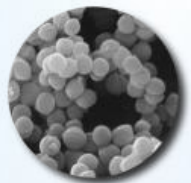
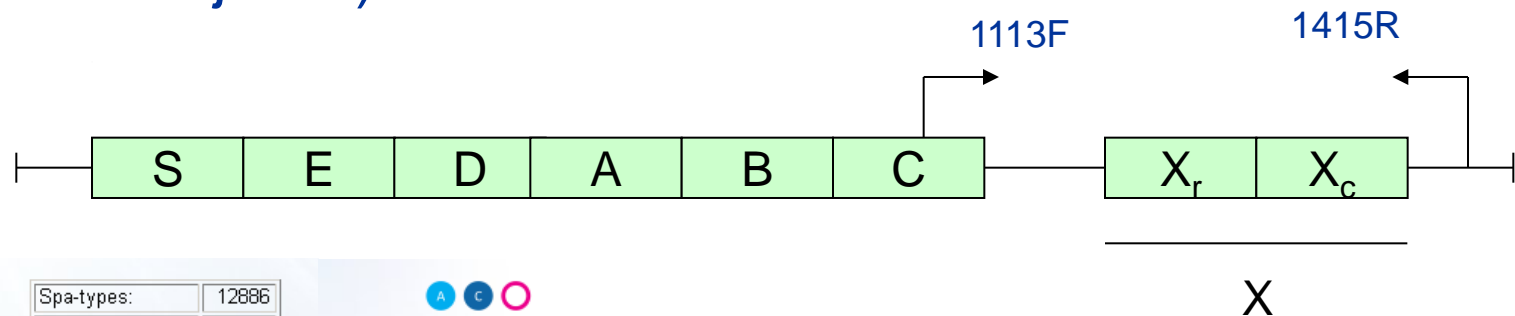
ST 247 (Iberisk): 3-3-1-12-4-4-16 (singel-locus variant av ST-250, dobbel locus variant av ST-8)



Enright M et al. PNAS 2002;99:7687-92

# spa-typing

- Single locus sequence typing (SLST) :  
Basert på analyse av deler (X-regionen) av ett gen: *Staphylococcus* protein A genen (*spa*).
- Egnet for kort tids/ lokal epidemiologi
  - Fokus på variasjoner som utvikles raskt (hyppige mutasjoner)



Spa-types:	12886
Repeats:	617
Total strains:	278405
Strain records:	135528
Strain countries:	102
Registered users:	574
User countries:	54



ridom  
BIOINFORMATICS

[SpaServer.ridom.de](http://SpaServer.ridom.de)

# spa-typing

Nukleotidrekkefølge for repetisjon 17: AAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGT

Spa-type	Repeat succession
<a href="#">t001</a>	26-30-17-34-17-20-17-12-17-16
<a href="#">t002</a>	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16
<a href="#">t003</a>	26-17-20-17-12-17-17-16
<a href="#">t004</a>	09-02-16-13-13-17-34-16-34

Inneholder ulike antall av 24 bp repetisjoner som kan ha ulik basesammensetning innad i hver repetisjon.

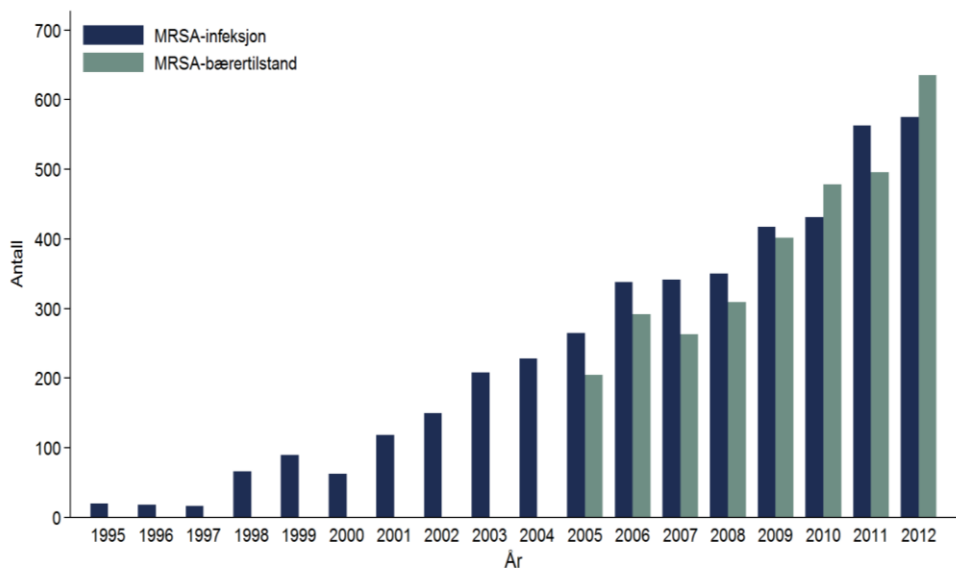
Hver unike sammensetning av baser i en 24bp repetisjon tildeles en nummerkode. Rekkefølgen av numeriske koder angir en spatype.

# MRSA inndeling

- HA-MRSA (Health care associated)
  - Ofte *SCCmec* I,II,III
  - Som regel PVL negative
  - Ofte multiresistens
- CA-MRSA (Community acquired)
  - Ofte *SCCmec* IV,V
  - Som regel PVL positive
  - Sjelden multiresistens
- LA-MRSA (Livestock associated)
  - *SCCmec* IVa,V,XI
  - Som regel PVL negative
  - Resistens mot antibiotika og metaller brukt i dyreproduksjon
  - Mindre human-human transmisjon?
  - Mindre virulens?

Grensene mellom CA-HA viskes til dels ut, særlig i områder med mye MRSA

# MRSA i Norge



Number of MRSA cases per 100,000 person-years in Norway 1995-2012, by infection and colonisation.

2012:

53% koloniserte (n=635)

47% infeksjoner (n=575)

- 2012: 1210 MRSA tilfeller (MSIS)
- Andel MRSA i blodkultur: 1,0%
  - 11 tilfeller, 10 sykehus
  - Nivå som 2008-2011
  - Økning i EARS-net (1,3%)
- Andel MRSA i sår: 0,7%
  - Nivå som i 2010 og 2011
- 2013:
  - MRSA øker (CA-MRSA + import)
  - LA-MRSA

NORM, NORM-VET 2012

# Dyreassosiert MRSA



Pigs carrying methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* were found on US farms for the first time in 2007.

**FARMING UP  
TROUBLE**

NATURE | VOL 499 | 25 JULY 2013

Estimert at over 60% av kommende menneskepatogene bakterier stammer fra dyr  
Cutler, Emerging Infect Dis 2010

# Dyreassosiert- MRSA

- *S.aureus*: evne til å kolonisere ulike verter
  - Fagtyping, biotyping og typing av enzymer og toxiner viste at *S.aureus* stammer hadde ulik vertsassosiasjon. (Devriese LA, J Appl Bacteriol 1984)
  - Molekylære teknikker har bekreftet dette. *S.aureus* med ulik genetisk bakgrunn har preferanse for ulike virveldyr. (Cuny C, Int J Med Microbiol 2010)
  - Enkelte *S.aureus* sekvenstyper har evne til å kolonisere et bredt utvalg arter



# Dyreassosiert-MRSA

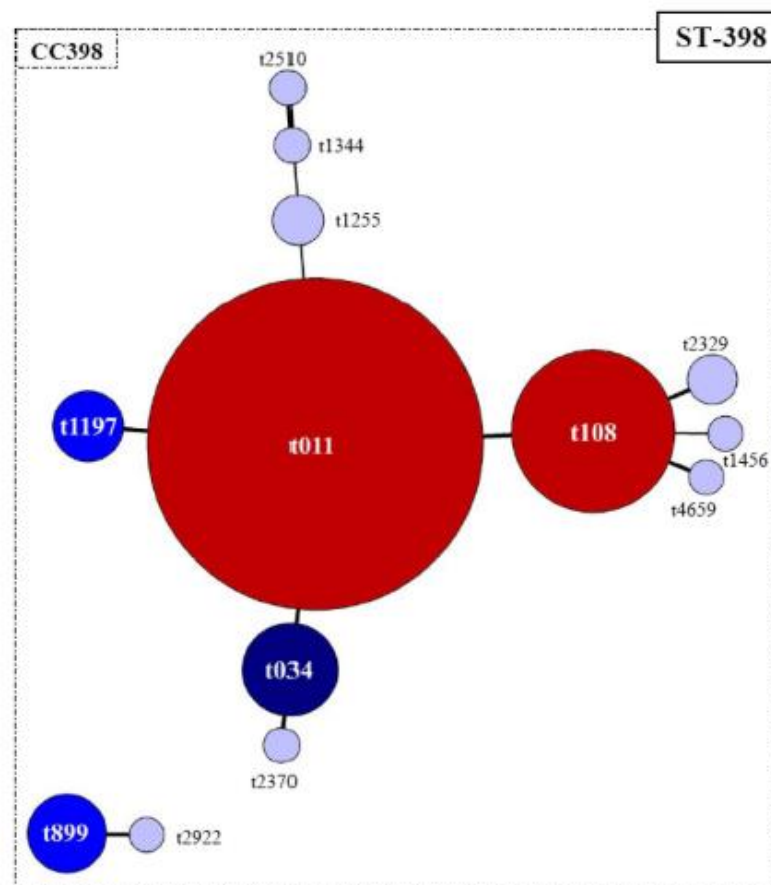
Principal MRSA clones shared between animals and humans.

Lineage	Clone*	Companion animals	Horses	Pigs	Poultry	Cattle	Humans
CC1	ST1			•		•	•
CC5	ST5 (USA100)	•		•	•	•	•
CC8	ST8 (USA500)		•				•
	ST254		•				
CC9	ST9		•	•			
CC22	ST22 (EMRSA-15)	•					•
	ST36 (EMRSA-16)	•					•
CC97	ST97			•			•
CC130	ST130					•	•
CC398	ST398*	•	•	•	•	•	•

Pantosti A, *Frontiers in microbiology* 2012

# LA-MRSA Historikk

- MRSA første gang påvist i Belgia i 1972 hos kyr med mastitt. (Devriese LA, 1972)
- CC 398 påvist i 2005 i Frankrike og Nederland (Armand-Lefevre L et al, Voss A et al. Emerg Infect Dis 2005)
- LA-MRSA med *mecC* første gang beskrevet i 2011 (UK + danmark) (Garcia Alvarez L et al. Lancet infect Dis 2011)
  - CC130 i hovedsak
- Også LA-MRSA i andre CC



Pantosti A, *Frontiers in microbiology* 2012

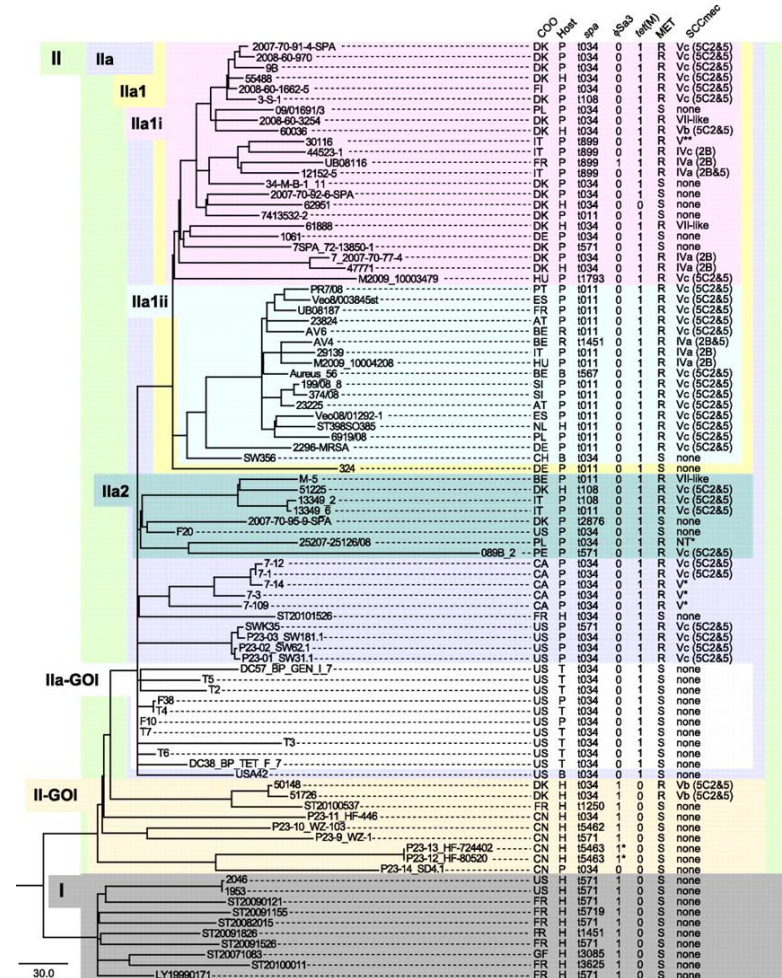
# Egenskaper LA-MRSA CC 398

- Stort vertsspekter (**gris, kveg**, kylling, hest, menneske)
- Ikke typbar med PFGE (*smal*)
- Ofte ST 398 (og *spa* t034 og t011-67%)
  - SCC*mec* IVa, V, eller VII liknende
- Tetracyclinresistens (99-100%)
  - Ofte andre resistensgener
    - Makrolider (70%) og Klindamycin
    - Trimetoprim (65%), TMS (4%)
    - Gentamycin (14%)
    - Ciprofloxacin (1-8%)
    - *czrC* (50%)
- Som regel PVL negative, fravær av enterotoxiner

Verkade E, Kluytmans J. Infect.Genet.Evol 2013  
Pantosti A, Frontiers in microbiology 2012  
Petinaki, CMI 2012  
Cuny C. Int J Med Microbiol 2012

# Opphav LA-MRSA CC 398

- Helgenomsekvensering
  - Start som human MSSA i CC398
    - Til gris
  - Erverv av *mecA* og *tetM* hos svin (flere ganger, -ulike SCC*mec*)
  - Tap av profag  $\phi$ Sa3
  - Reintroduksjon til menneske som LA-MRSA CC 398
    - Mindre virulent, mindre transmisjon, mindre evne til kolonisering?



Price LB, mBio 2012  
Rinsky JL PLoS ONE 2013

Price L B et al. mBio 2012; doi:10.1128/mBio.00305-11



# Epidemiologi LA-MRSA CC398

- Rask spredning etter 2005
  - Mange land/ produksjonsdyr
    - Danmark, Japan, USA, Spania, Tyskland, Belgia..
  - Nederland Europas største eksportør av gris
    - Italia, Spania, Ungarn..
- Stor forskjell i forekomst
  - Industriell dyreproduksjon og handel
  - Antibiotikaforbruk i landbruket
- Overvåkning varierer
  - Veterinær -medisin
  - Human -medisin
  - Matvarer

**“IN 2009,  
80% OF THE  
ANTIBIOTICS  
SOLD IN THE  
UNITED STATES  
WERE USED ON  
FARMS.”**

NATURE | VOL 499 | 25 JULY 2013

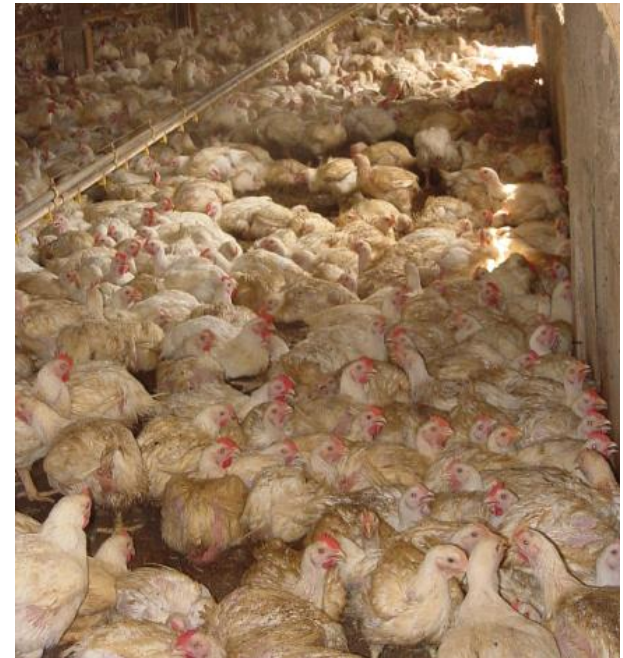
# LA-MRSA infeksjon og transmisjon

- Vidt infeksjonsspekter
  - Mindre alvorlige infeksjoner
    - Mindre virulente
    - Men også sett ved
      - Osteomyelitt
      - Bakteriemi
      - Endokarditt
- Griser i hovedsak ikke syke av LA-MRSA
- Smitte via:
  - Direkte kontakt med smittede dyr
    - Hyppighet og intensitet
  - Forurensing av miljø
  - Mat (omdiskutert)
- Mindre human-human smitte enn øvrig MRSA?
  - Kan endres?
  - Utbrudd på sykehus og sykehjem beskrevet

# Risikofaktorer LA-MRSA

- Dyr:
  - Antibiotikabruk
  - Handel/ innkjøpsdyr
  - Besetningsstørrelser
  - Smittebarrierer/gårdshygiene
    - miljøforurensing
- Mennesker:
  - Nær kontakt med dyr (svin, kveg)
  - Tetthet svinebesetninger
  - Avstand til svinebesetninger
  - Husstandsmedlemmer til personer med LA-MRSA
    - 2-10%
  - Generell befolkning NL + DK
    - 0,2% (<0.01 – 1,2%)

R.Skov, personlig meddelelse

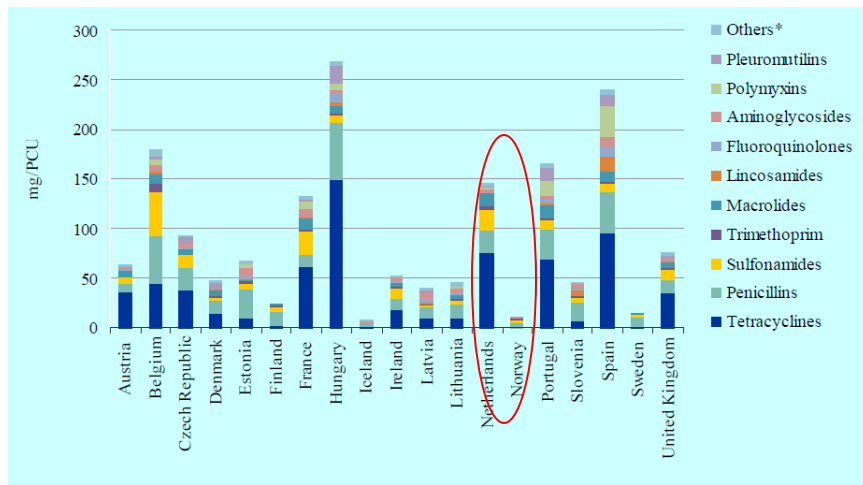


Silbergeld EK. Annu.Rev. Public Health 2008

Ciccolini M et al. Epidemics 2012  
Graveland H et al. PLoS ONE 2010  
Verkade E, Kluytmans J. infect.genet.Evol 2013  
vanCleef et al Emerg Infect Dis 2011  
Cuny et al Int J Med Microbiol 2013

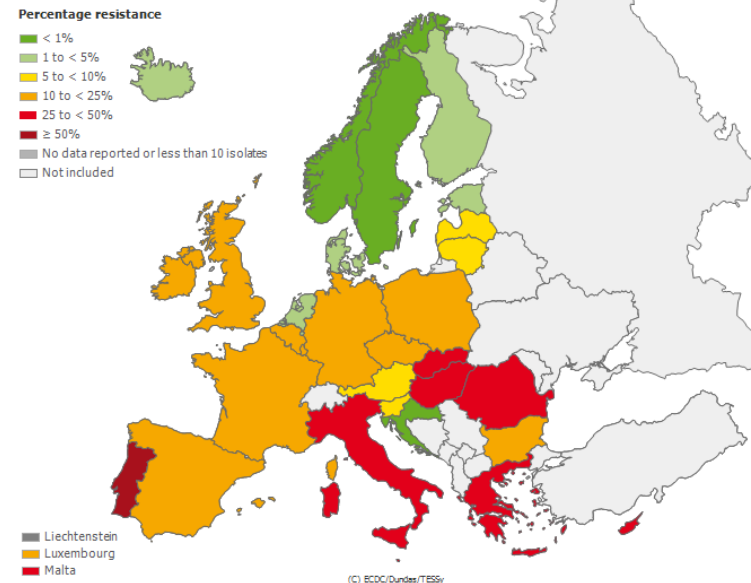
# Dyreassosiert MRSA-årsaker

- Sammenhengen mellom antibiotikaforbruk og antibiotikaresistens velkjent fra humanmedisin



Antibiotikasalg til matproduksjonsdyr EU 2010

NORM/ NORM-VET 2012



Proportion of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates in participating countries in 2011





# Forekomst LA-MRSA dyrestammer og miljøprøver

- Norge:
  - Lite resistens hos dyr
  - Lite antibiotikabruk
  - God overvåkning (NORM)
- 2008: ingen MRSA hos svin
- 2011: t034 i 3% av prøver fra slaktegris. Alle fra samme slakteri. Fant ikke positiv svinebesetning ved oppfølging.
  - Miljøprøver fra slakteri positive-kontaminasjon?
- 2012: t034 i en av 175 prøver fra besetninger
- 2012: Ingen MRSA hos 117 kyr med *S.aureus* mastitt (NORM 2012)
- Danmark 2012:
  - 77% av slaktesvin CC398 MRSA
    - 13% i 2009, 44% i 2011
    - 16% i griseflokker i 2010 og 2011
  - CC398 i 1,8% av melkeprøver (Danmap 2012)
- Nederland:
  - MRSA i kjøttprodukter 10-31% (Dutch Food and Safety Authority, 2007)
- Tyskland:
  - 30% infisert broilerkylling i butikk (100-1000 CFU/ml) (Cuny C, Int J Med Microbiol 2013)

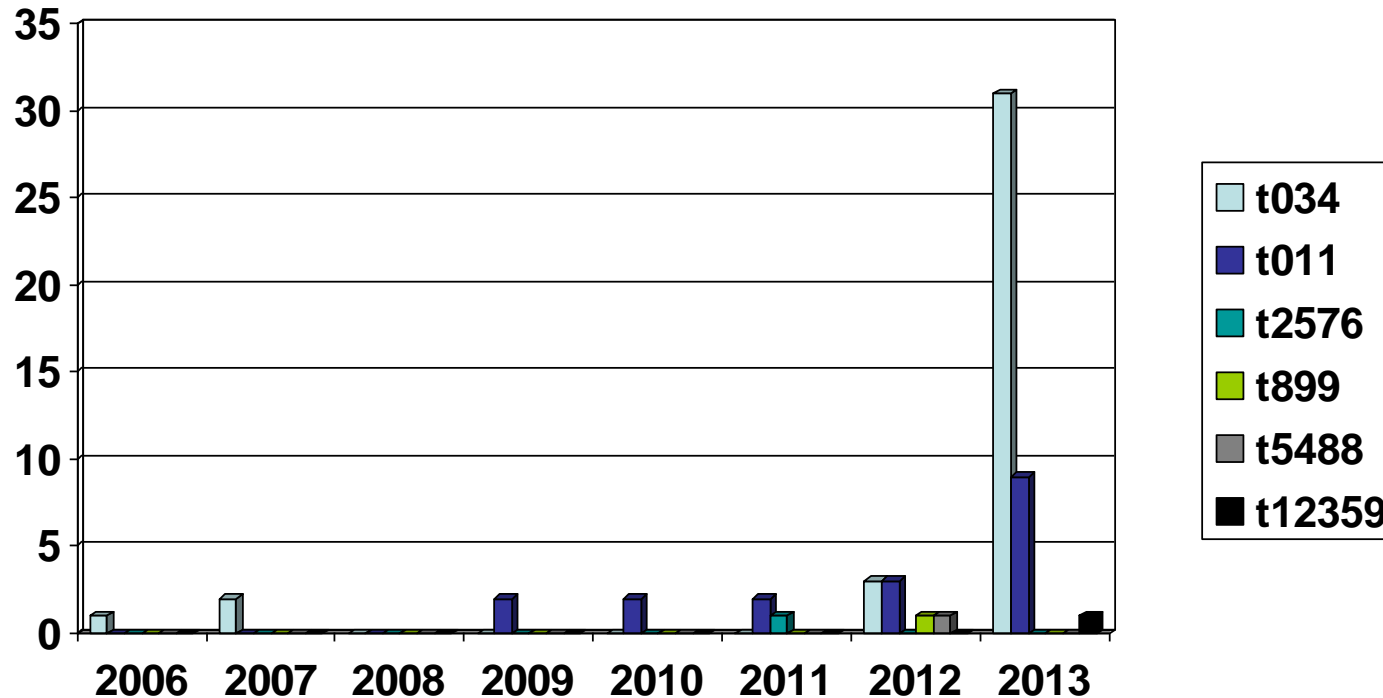
# CC 398 i Norge 2013

- Utbrudd med LA-MRSA (*spa* t034) i svine-besetninger og personer som arbeider med griser
  - Østlandet: 11 gårder
  - Rogaland: 5 gårder
- Screening og sanering av ansatte
- Tiltak:
- 3 smågrisprodusenter:
  - pålagt nedslakting
  - Vask + desinfeksjon av husdyrrom før nye griser inn
- Slaktegris:
  - vask + desinfeksjon av lokale før nye griser inn.

# Forekomst LA-MRSA i Norge

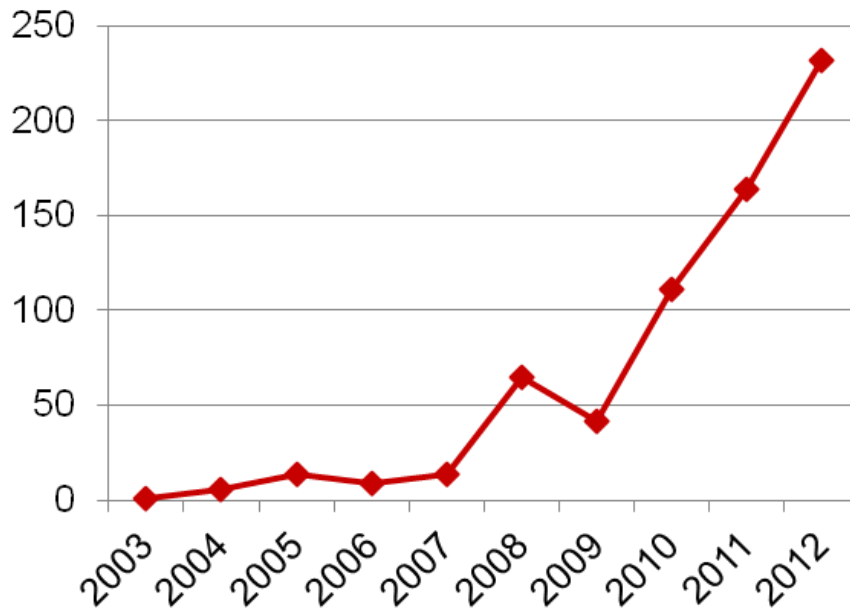
## Humane stammer

- Lav forekomst frem til og med 2012



## LA-MRSA CLONES

### CC398



- Danmark: t034 raskest økende spatype.
  - > 450 tilfeller så langt i 2013 (R.Skov)
    - 42 i 2009, 111 i 2010, 164 i 2011, 232 i 2012
  - Nær relasjon til svin/ husstandsmedlem hos 79%
- Nederland: 25-35% andel av MRSA hos de med kontakt med griser/kalver (mot 0,03% i befolkning for øvrig) (van Rijen CID 2008)

# Foreløpig resistensdata LA-MRSA 2013 Norge. Alle stammer.

t011				
	n	S	I	R
FOX	12	0,00 %	0,00 %	100,00 %
ERY	12	33,33 %	0,00 %	66,67 %
CLI	12	0,00 %	0,00 %	100,00 %
FUC	12	100,00 %	0,00 %	0,00 %
LZD	12	100,00 %	0,00 %	0,00 %
TMS	12	83,33 %	0,00 %	16,67 %
TCY	12	0,00 %	0,00 %	100,00 %
GEN	12	50,00 %	0,00 %	50,00 %
MUP	12	91,67 %	8,33 %	0,00 %
NOR	12	41,67 %	0,00 %	58,33 %
RIF	12	100,00 %	0,00 %	0,00 %

t034				
	n	S	I	R
FOX	83	0,00 %	0,00 %	100,00 %
ERY	83	87,95 %	0,00 %	12,05 %
CLI	76	0,00 %	1,32 %	98,68 %
FUC	83	98,80 %	0,00 %	1,20 %
LZD	83	100,00 %	0,00 %	0,00 %
TMS	83	100,00 %	0,00 %	0,00 %
TCY	83	1,20 %	0,00 %	98,80 %
GEN	83	100,00 %	0,00 %	0,00 %
MUP	83	77,11 %	22,89 %	0,00 %
NOR	83	7,23 %	0,00 %	92,77 %
RIF	83	100,00 %	0,00 %	0,00 %

# MRSA *mecC*

- Første gang påvist i engelske melkekuer i 2007
  - Humane tilfeller tilbake til 1975 (Danmark)
- 3 ulike MLST linjer (CC130, CC705 og ST 425).
  - 60% var *spa* type t843 (CC130)
- Påvist i flere land og ulike dyr (enkeltrappor)ter)
- *mecA* negative humane MRSA isolat:
  - Danmark: 24 tilfeller 2012 (9 i 2009, 21 i 2010, 37 i 2011. (<1% av alle MRSA)
    - 67% med infeksjon

GarciaAlvarez, Lancet 2011

Danmap 2012

# MRSA *mecC* i Norge

- 11 stammer til nå i Norge
  - 5 før 2011 (retrospektiv undersøkelse 13 BORSA stammer 2006-2009)
  - 5 etter 2011 (rutine)
  - 1 katt
- Ulike deler av landet
  - 5 fra Rogaland
- 6 ulike spatyper (t1535 n=4, t843 n=3, t1048 n=1, t10765 n=1, t11000 n=1, t6902 n=1)
  - CC 130
- Ingen stor andel av MRSA foreløpig

# LA-MRSA: Konsekvens smittevern

- Utfordrer retningslinjer for screening
  - Danmark endret screeningregime 2012 (Sundhetsstyrelsen)
  - Nederland inkludert kontakt med svin/kveg som risikofaktor for MRSA fra 2006 (Infection Prevention Working Party)
- Norge: Tiltak ved besøk i utenlandske svinebesetninger
  - Anbefalinger for karantene, MRSA screening, hygiene, bruk av personlig beskyttelsesutstyr





# LA-MRSA:Konsekvens diagnostikk

- CC 398: Ingen forskjell
  - *mecA* og *nuc/spa/SA* 442 positive
    - Kan detekteres og/ eller konfirmeres med kommersielle PCR
  - *mecA* PCR positiv
  - Cefoxitin R
  - Agglutinerer PBP2a
  - Ingen kjente problemer med kromogene medier
- *mecC*: Forskjell
  - kommersiell PCR finner ikke *orfX-SCCmec XI* med mindre tilpasset/oppdatert
  - *mecA* PCR vil være negativ
    - Egen *mecC* PCR kreves
  - Agglutinerer ikke PBP2a test
  - Cefoxitin R
  - Forskjell kromagarer
    - Sjekk vekst før screening
  - OBS falsk cefoxitin S på MH fra Biomerieux?

Laurent F, Skov R, Pichon B et al. CMI2012;18:s3-323.  
Skov R et al. J Antimicrob Chemother 2013

# Konklusjon diagnostikk

- *S.aureus* med nedsatt følsomhet for cefoxitin med lappediffusjon der *mecA* og eller PBP2a er negativ:
  - Undersøk med PCR mot *mecC*
    - Repeter identifikasjon og lappediffusjon
      - Vurder cefoxitin MIC og oxacillin MIC (men kan være sensitive)
      - Vurder kromagar
- Ikke screen kun med PCR.
  - Mister SCC*mecXI*/*mecC* om ikke oppdatert
  - Nye *mec*/SCC*mec* varianter vil ikke påvises
    - Andre resistensmekanismer mistes (PBP4)

# Formidling av svar LA-MRSA

- Kontakt rekvirent/ smittevernlege
  - Ta rede på:
    - Arbeid
      - Dyreproduksjon
      - Slakteri
      - Veterinær
      - Helsepersonell
- Kontakt med dyrebesetninger direkte/ indirekte
  - Bosted
  - Familie/nære kontakter
- Reiseanamnese

Behov for kontakt med mattilsyn,  
veterinær, FHI?

# Oppsummering LA-MRSA

- Til nå gunstig situasjon i Norge
  - Utbrudd 2012 med mange involverte
    - Tidsnok å snu eller utvikling som i Danmark?
    - Vil det bli behov for endret screeningregime?
      - Konsekvenser for "search and destroy" politikk
- Internasjonalt fokus på resistensutvikling og spredning fra dyreproduksjon viktig
  - Mer informasjon om smitterisiko og spredning