

APPENDIX 11

Project 12: MRSA ST398 in de varkensproductiepiramide

Projectleider

P. van der Wolf, GD

Projectteam

E.M. Broens, QVE-WUR en Cib-RIVM.
E.A.M. Graat, M.C.M. de Jong, QVE-WUR.
J. Lommerse, Maaike Meijerink en
laboratoriummedewerkers, GD.
X.W. Huijsdens, Cib-RIVM.
D.J. Mevius, CVI-WUR.

Samenwerking

Veehouders.

Samenvatting

Een nieuwe kloon van methicillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA ST398) is in 2005 voor het eerst beschreven in varkens en mensen in contact met varkens. Gezien de piramidevorm van de varkensproductieketen in Nederland kunnen pathogenen, inclusief MRSA, zich over een groot aantal bedrijven verspreiden via de handel in varkens. Het doel van deze studie was de rol van de MRSA-status van het aanleverende bedrijf op de MRSA-status van het afnemende bedrijf te kwantificeren. Hiervoor zijn gegevens geanalyseerd van monsters van 48 bedrijven die deel uitmaakten van 18 piramides. Op 34 bedrijven zijn naast monsters van de varkens ook gegevens over de toepassing van antibiotica verzameld. In 8 piramides testten alle bedrijven MRSA-positief, in 5 piramides testten alle bedrijven MRSA-negatief en in 5 piramides werden MRSA-positieve en -negatieve bedrijven gevonden. Er was een duidelijk associatie tussen de MRSA-status van het aanvoerende bedrijf en de MRSA-status van het afnemende bedrijf; 79% van de bedrijven met aanvoer van een positief bedrijf was positief ten opzichte van 23% met aanvoer van een negatief bedrijf (OR=10,8; $P=0,011$). Aanvoer van een MRSA-positief bedrijf verklaart daarmee 91% van de MRSA-positieve bedrijven met een positieve leverancier. Er werden zeven *spa*-types gevonden, die alle behoren tot ST398. De resultaten van deze studie pleiten voor een top-downstrategie bij toekomstige bestrijdingsprogramma's. Echter, aangezien 23% van de bedrijven met aanvoer van een negatief bedrijf positief zijn en daarnaast 46% van de bedrijven zonder aanvoer ook positief bevonden zijn, is onderzoek naar andere risicofactoren voor het voorkomen van MRSA noodzakelijk.

Summary

A distinct clone of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA ST398) was found in pigs and people in contact with pigs recently. In the Netherlands, the pig production chain is built like a pyramid, which enables pathogens, including MRSA, to spread along the pig production chain by the purchase of animals. The objective of this study was to quantify the role of the MRSA status of a farm on the MRSA status of the farm that purchases pigs of this farm. We collected samples on 48 farms which belonged to 18 pig production pyramids. On 34 farms we collected information on use of antibiotics as well. In 8 pyramids all the farms tested MRSA positive, in 5 pyramids all the farms tested MRSA negative. The remaining 5 pyramids had both MRSA positive and negative farms. There was a clear association between the MRSA status of the supplier and the purchaser of pigs (OR=10,8; $P=0.011$); 79% of farms with purchases of a MRSA positive supplier was MRSA positive, compared with 23% when purchases were from a negative supplier. A positive supplier accounts for 91% of the MRSA positive farms with a positive supplier. Seven different *spa*-types were found, all belonging to ST398. The results of this study support the choice for a top-down strategy in future control programs. However, 23% of farms that have a MRSA negative supplier is positive and besides that 46% of the farms at the top of the pig production pyramid without a supplier tested MRSA positive as well. So, more research on risk factors for the occurrence of MRSA is necessary.

Inleiding

In Nederland zijn in 2005 de eerste humane gevallen beschreven van MRSA die gerelateerd waren aan contact met varkens [1]. Het bleek te gaan om een specifieke kloon, die niet typeerbaar was met de in Nederland gebruikte standaardmethode (Pulsed Field Gel Electroforese) [2]. Ook in andere landen wordt deze kloon gevonden in varkens [3, 4]. Daarnaast blijkt deze kloon ook bij andere diersoorten gevonden te worden [5, 6]. Alle isolaten behoren tot hetzelfde Multi Locus Sequence Type (MLST), en daarom wordt veelal de term MRSA ST398 gehanteerd [7]. Gezien de opbouw van de varkensproductiepiramide in Nederland, waarbij fokbedrijven in de top van de varkenspiramide leveren aan verschillende vermeerderingsbedrijven die vervolgens weer aan verschillende vleesvarkensbedrijven leveren, kunnen pathogenen, inclusief MRSA, zich over een groot aantal bedrijven verspreiden via de handel in varkens. Resultaten uit een eerdere studie op varkensbedrijven suggereren

dat aankoop van gelten c.q. vleesbiggen van een MRSA-positief bedrijf een risicofactor zou kunnen zijn voor de introductie van MRSA op vermeerderings-, respectievelijk vleesvarkensbedrijven [8]. In deze studie van Van Duijkeren et al. is slechts bij een beperkt aantal bedrijven (n=6) naar de MRSA-status van het aanleverende bedrijf gekeken. Het doel van de hieronder beschreven studie was om de rol van de MRSA-status van het aanleverende bedrijf in de verspreiding van MRSA tussen varkensbedrijven te kwantificeren op basis van een groter aantal bedrijven.

Materiaal en methoden

Bedrijven die in het kader van de risicofactorenanalyse (project 8) waren bezocht, werden geselecteerd, waarna met behulp van het identificatie- en registratiesysteem aan- en afvoeradressen werden geïdentificeerd en benaderd voor medewerking. In totaal zijn er in 2007/2008 38 bedrijven bemonsterd voor dit project. Dit waren 11 fokbedrijven, 5 fok-/vermeerderingsbedrijven, 7 vermeerderingsbedrijven, 5 vermeerderings-/vleesvarkensbedrijven en 10 vleesvarkensbedrijven. De tijd tussen bemonstering van bedrijven binnen één piramide varieerde van een halve dag tot ruim 7 maanden. Er werden neusswabs (Medical Wire and Equipment, MW102, UK) uit één neusgat van 60-80 varkens verzameld. De monsters werden verspreid over het bedrijf en over de aanwezige leeftijdsgroepen verzameld. Met deze steekproefgrootte is het mogelijk om MRSA op een bedrijf aan te tonen als de binnenbedrijfsprevalentie minimaal 2-5% is [9]. Op 20 bedrijven werden, naast diermonsters, ook 5 omgevingsmonsters (Sodibox, s1 kit ringer solution, Frankrijk) genomen. Microbiologische analyse werd gedaan op individuele omgevingsmonsters en op 10-20 gepoolde diermonsters (4-6 swabs per pool). Elke pool bevatte swabs van varkens uit één afdeling en één leeftijdsgroep (zuigende biggen, gespeende biggen, opfok, vleesvarkens, zeugen). Het bacteriologisch onderzoek bestond uit twee achtereenvolgende selectieve ophopingsstappen, waarna gekweekt werd op een MRSA-selectieve plaat (MRSA screen, Oxoid, UK). Verdachte kolonies werden bevestigd met behulp van een multiplex PCR [10]. Isolaten werden verder getypeerd met behulp van *spa*-typering op het RIVM [11] en er werd een antibioticumgevoeligheidsbepaling gedaan van minstens 1 isolaat per bedrijf op het CVI. Isolaten werden getest op hun gevoeligheid voor erythromycine, clindamycine, rifampicine, fusidinezuur, gentamicine, amikacine, neomycine, ciprofloxacine, tetracycline, mupirocine en linezolid.

Voor de data-analyse werden ook 10 MRSA-positieve bedrijven uit de studie van Van Duijkeren et al. gebruikt [8]. Dit waren 2 fokbedrijven, 1 fok-/vermeerderingsbedrijf, 4 vermeerderingsbedrijven en 3 vleesvarkensbedrijven. In de studie van Van Duijkeren et al. werden neusswabs van beide neusgaten van 10 individuele varkens geanalyseerd. Met die steekproefgrootte is het mogelijk om MRSA op een

bedrijf aan te tonen als de binnenbedrijfsprevalentie minimaal 25% is [9]. Negatief geteste bedrijven kunnen dan vals-negatief zijn als minder dan 25% van de varkens op een bedrijf MRSA-positief is. Vandaar dat negatief geteste bedrijven uit deze studie werden uitgesloten. Met behulp van het identificatie- en registratiesysteem werden aan- en afvoeradressen van deze bedrijven geïdentificeerd en benaderd voor medewerking. De MRSA-isolaten werden bij het VMDC getest op hun gevoeligheid voor erythromycine, lincomycine, gentamicine, amikacine, ciprofloxacine, tetracycline en trimethoprim-sulfa. De 48 bedrijven maakten deel uit van 14 complete (40 bedrijven) en 4 incomplete (8 bedrijven) piramides. Van de incomplete piramides was er maximaal 1 bedrijf niet bemonsterd. Op 34 bedrijven zijn naast monsters van de varkens ook gegevens over antibioticumtoepassing verzameld (Tabel A11.1).

Een bedrijf werd als positief aangemerkt als minstens 1 van de monsters positief op MRSA werd getest. De associatie tussen de MRSA-status van bedrijven binnen een piramide en de associatie tussen standaardbehandeling met antibiotica en MRSA-status werden berekend met behulp van exacte logistische regressie in SAS, versie 9.1 [12]. *Spa*-typen en gevoeligheidspatronen werden vergeleken binnen een piramide.

Resultaten

In 8 piramides testten alle bedrijven MRSA-positief, in 5 piramides testten alle bedrijven MRSA-negatief en in 5 piramides werden MRSA-positieve en -negatieve bedrijven gevonden (Tabel A11.1). 79% (11/14) van de bedrijven met aanvoer van een MRSA-positief bedrijf was zelf ook positief, terwijl dit percentage bij bedrijven met aanvoer van een MRSA-negatief bedrijf lag op 23% (3/13). Dit betekent een 10,8 keer hoger risico op MRSA-positief zijn, wanneer het toeleverende bedrijf positief is in vergelijking met een negatief aanvoerbij bedrijf (OR=10,8; P=0,011; Tabel A11.2). De attributable fraction is 0,91. Dit houdt in dat 91% van de MRSA-positieve bedrijven met aanvoer van een MRSA-positief bedrijf verklaard wordt door die aanvoer.

Tabel A11.1 Aantal (positieve) bedrijven en monsters, MRSA-status, spa-typen, resistentiepatroon en standaardtoepassing van antibiotica per piramide

piramide id	bedrijf nummer	bedrijfs type	MRSA status	n pools pos (tot)	N stof pos (tot)	n ind pos (tot)	spa-type	resistentie-patroon	standaard-antibiotica	toegepaste antibiotica
negatieve piramides										
A	1	a	neg	0 (20)	-	-	-	-	-	-
	2	c	neg	0 (15)	-	-	-	-	-	-
	3	e	neg	0 (10)	0 (5)	-	-	-	nee	-
B	4	a	neg	0 (20)	-	-	-	-	-	-
	5	a	neg	0 (20)	-	-	-	-	-	-
	6	d	neg	0 (10)	0 (5)	-	-	-	ja	tetra, tmps
C	7	a	neg	0 (20)	-	-	-	-	-	-
	8	c	neg	0 (15)	-	-	-	-	-	-
	9	e	neg	0 (10)	0 (5)	-	-	-	nee	-
D	10	a	neg	0 (20)	-	-	-	-	-	-
	11	d	neg	0 (10)	0 (5)	-	-	-	ja	macro, pen, tmps
E	12	a	neg	0 (15)	-	-	-	-	nee	-
	13	d	neg	0 (20)	-	-	-	-	ja	tmps
	14	d	neg	0 (20)	-	-	-	-	nee	-
gemengde piramides										
F	15	a	pos	1 (20)	-	-	t108 (1)	ECIRANT (1)	-	-
	16	c	neg	0 (15)	-	-	-	-	-	-
	17	b	pos	14 (15)	-	-	t943 (13) t2503 (1)	ECIRT (13) ECIRT (1)	-	-
	18	e	pos	10 (10)	-	-	t108 (1) t011 (1)	ECIRT (1) ECIRNT (1)	-	-
	19	a	pos	2 (20)	-	-	t108 (2)	ECIRT (2)	-	-
	20	c	neg	0 (10)	0 (5)	-	-	-	ja	amino, pen, poly, tmps
	21	e	pos	2 (10)	-	-	t011 (2)	RFGAT (1) RGT (1)	nee	-
H*	22	c	neg	0 (10)	0 (5)	-	-	-	ja	pen
	23	e	pos	1 (10)	-	-	t011 (1)	RT (1)	-	-
I	24	a	pos	6 (10)	1 (5)	-	t011 (7)	GT (1)	ja	cefa, macro, poly
	25	c	pos	5 (10)	0 (5)	-	t108 (5)	ET (1)	ja	pen
	26	e	neg	0 (10)	0 (5)	-	-	-	nee	-
J	27	a	neg	0 (10)	0 (5)	-	-	-	nee	-
	28	d	pos	5 (10)	1 (5)	-	t108 (6)	GT (1)	ja	tmps
	29	c	neg	0 (10)	0 (5)	-	-	-	ja	tmps
	30	e	neg	0 (10)	0 (5)	-	-	-	nee	-

Vervolg Tabel A11.1 Aantal (positieve) bedrijven en monsters, MRSA-status, spa-typen, resistentiepatroon en standaardtoepassing van antibiotica per piramide

positieve piramides									
K	a	pos	4 (20)	-	t011 (3)	RT (1)	ja	pen, tm	tm
						ECIRFGNT (2)			
					t108 (1)	ECIRT (1)			
32	c	pos	-	-	1 (10)	ECIT (1)	nee	-	-
33	e	pos	-	-	3 (10)	ECIT (3)	ja	macro, tetra	
L*	b	pos	-	-	8 (10)	ECIT (8)	ja	tetra	
35	e	pos	-	-	2 (10)	ECIT (1)	ja	tetra	
					t108 (1)	ECIT (1)			
M*	c	pos	-	-	8 (10)	ECIT (7)	ja	pen	
					t899 (7)	ECIT (7)			
					t1939 (1)	ECIT(1)			
37	e	pos	-	-	2 (10)	T (2)	ja	tm	
N*	a	pos	-	-	2 (10)	ET (2)	ja	tm	
39	c	pos	-	-	3 (10)	ET (3)	ja	poly	
O*	a	pos	-	-	4 (10)	T (2)	ja	pen, tetra	
					t567 (4)	T (2)			
						CIT (2)			
41	c	pos	-	-	9 (10)	CIT (5)	ja	pen	
					t567 (9)	CIT (5)			
						T (4)			
P	b	pos	9 (10)	1 (5)	t011 (6)	ECICIT (1)	ja	macro, tetra, tm	
					t108 (4)				
43	e	pos	6 (10)	2 (5)	t108 (7)	ECICIT (1)	ja	pen	
					t011 (1)				
Q	b	pos	7 (10)	1 (5)	t011 (8)	ECIGAT (1)	ja	macro, pen, tetra, tm	
45	b	pos	6 (10)	0 (5)	t011 (6)	ECIT (1)	ja	amino, pen	
46	e	pos	10 (10)	3 (5)	t011 (13)	ECIGNT (1)	ja	pen, tetra	
R	b	pos	5 (10)	0 (5)	t011 (5)	NT (1)	ja	pen	
48	e	pos	9 (10)	1 (5)	t011 (10)	ECINT (1)		-	

*incomplete piramide (1 bedrijf ontbreekt)

a = fokbedrijf; b = fok-/vermeerderingsbedrijf; c = vermeerderings-/vleesvarkensbedrijf; d = vermeerderings-/vleesvarkensbedrijf; e = vleesvarkensbedrijf
 E = erythromycine, Cl = clindamycine/lincomycine, R = rifampicine, F = fusidinezuur, G = gentamicine, A = amikacine, N = neomycine, Ci = ciprofloxacin, T = tetracycline, M = mupirocine, L = linezolid amino=aminoglycosiden, cefa=cefalosporinen, macro=macroliden, pen=penicillinen, poly=polymixinen, tetra=tetracyclinen, tm=trimethoprim-sulfa

Tabel A11.2 Aantallen, frequentie, prevalentie en OR met het 95% betrouwbaarheidsinterval voor bedrijven met aanvoer van een MRSA-positief versus aanvoer van een MRSA-negatief bedrijf (totaal 27 bedrijven)

variabele	categorie	freq (n)	freq (%)	prev MRSA (%)	OR	95% btbhi	P-exact
status van aanvoer	positief	14	51,9	78,6	10,8	1,5 -110,1	0,011
	negatief	13	48,2	23,1	ref		

OR = odds ratio; btbhi = betrouwbaarheidsinterval

Zesenvijftig procent (27/48; 95% btbhi: 41-71%) van de bedrijven had minimaal één MRSA-positief monster. De aantallen en percentages per bedrijfstype staan in Tabel A11.3. Op bedrijven waar MRSA is gevonden, waren gemiddeld 42% van de individuele varkens (10 bedrijven), 56% van de poolmonsters (17 bedrijven) en 20% van de stofmonsters (10 bedrijven) positief. Op 3 van de 20 bedrijven waar naast poolmonsters ook omgevingsmonsters werden verzameld, waren de omgevingsmonsters negatief, terwijl het bedrijf als MRSA-positief geïdentificeerd werd op basis van één of meer positieve poolmonsters. Op de resterende 17 bedrijven was de bedrijfsuitslag op basis van pool- en stofmonsters in overeenstemming met elkaar. De Cohen's kappa, als maat voor de overeenkomst tussen resultaten voor pool- en stofmonsters waarbij overeenkomst volgens toeval is uitgesloten, was 0,70 (95% btbhi: 0,41-0,71). Deze overeenkomst kan als ruim voldoende worden geïdentificeerd.

Tabel A11.3. Totaal aantal bedrijven, aantal en percentage MRSA-positieve bedrijven per bedrijfstype

bedrijfstype	n totaal	n positief	% positief
fok	13	6	46
fok/vermeerdering	6	6	100
vermeerdering	11	5	45
vermeerdering/vleesvarkens	5	1	20
vleesvarkens	13	9	69
totaal	48	27	56

Van de in totaal 704 monsters (van één monster is geen uitslag bekend) werden er 154 MRSA-positief bevonden (22%; 95% btbhi: 19-25%). Van alle positieve isolaten (154) werd het *spa*-type bepaald. Er werden zeven *spa*-types gevonden, die allen behoren tot ST398. *Spa*-typen t011 en t108 werden het meest frequent en op verschillende bedrijven binnen meerdere piramides gevonden, respectievelijk in 42% en 28% van de isolaten en in respectievelijk 48% en 52% van alle bedrijven. Meer zeldzame *spa*-typen t567, t899, t943, t1939 en t2503 werden alleen gevonden op bedrijven binnen één piramide; *spa*-type t899 samen met t1939 en *spa*-type t943 samen met t2503 (Tabel A11.4). Op de 27 MRSA-positieve bedrijven werden per bedrijf 1 tot 4 verschillende *spa*-typen gevonden. Op 20 bedrijven werd 1 *spa*-type gevonden, op 6 bedrijven werden 2

verschillende *spa*-typen gevonden en op 1 bedrijf werden 4 verschillende *spa*-typen gevonden (Tabel A11.1).

Tabel A11.4. *Spa*-typen: aantal isolaten, totaal, per bedrijf en per piramide

<i>spa</i> -type	isolaten		bedrijven		piramides	
	n	%	n	%	n	%
t011	64	41,6	13	48,1	9	69,2
t108	45	28,2	14	51,9	8	61,5
t943	20	13,0	2	7,4	1	7,7
t567	13	8,4	2	7,4	1	7,7
t899	9	5,8	2	7,4	1	7,7
t2503	2	1,3	2	7,4	1	7,7
t1939	1	0,7	1	3,7	1	7,7

Van in totaal 86 isolaten is een antibioticumgevoeligheidsbepaling uitgevoerd. De resistentiepatronen zijn weergegeven in Tabel A11.1. In Tabel A11.5 zijn per *spa*-type en per antibioticum de frequentie van voorkomen van resistentie weergegeven. Alle geteste isolaten waren resistent tegen tetracycline en gevoelig voor mupirocine, linezolid en tms. Resistentie tegen erythromycine, clinda/lincomycine en rifampicine kwam regelmatig voor in meerdere *spa*-typen. In *spa*-type t011 werd tegen het hoogste aantal antibiotica- (n=9) resistentie gevonden. Multiresistentie in *spa*-type t011 werd in meerdere isolaten gevonden; bijvoorbeeld op bedrijf 31 werd in *spa*-type t011 tweemaal resistentie gevonden tegen 7 verschillende antibiotica. In piramide P werd op beide bedrijven resistentie gevonden tegen ciprofloxacine, eenmaal in *spa*-type t011 en eenmaal in *spa*-type t108; resistentie tegen ciprofloxacine werd in geen enkele andere piramide gevonden.

Op 74% (25/34) van de bedrijven waar gegevens met betrekking tot antibioticumtoepassing zijn verzameld, worden standaardbehandeling(en) met antibiotica toegepast (Tabel A11.1). Van de bedrijven die standaardbehandelingen met antibiotica toepassen is 76% MRSA-positief, terwijl 22% van de bedrijven die geen standaardbehandelingen toepassen MRSA-positief is (OR=10,2; P=0,015; Tabel A11.6). Dit betekent een 10,2 keer hoger risico op positief zijn, wanneer standaardbehandelingen met antibiotica worden toegepast in vergelijking met incidentele toepassing van

Tabel A11.5 Aantal geteste isolaten en percentage resistentie tegen verschillende antibiotica

spa-type antibioticum	t011		t108		t567		t899		t943		t1939		t2503		alle isolaten	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
erythromycine	15	60,0	26	96,2	13	0,0	9	77,8	20	100,0	1	100,0	2	100,0	86	74,4
clinda/lincomycine	15	60,0	26	73,1	13	53,9	9	77,8	20	100,0	1	100,0	2	100,0	86	75,6
rifampicine	14	50,0	8	62,5	0	-	0	-	20	100,0	0	-	2	100,0	44	77,3
fusidinezuur	14	21,4	8	0,0	0	-	0	-	20	0,0	0	-	2	0,0	44	6,8
gentamicine	15	46,7	26	3,9	13	0,0	9	0,0	20	0,0	1	0,0	2	0,0	86	9,3
amikacine	15	13,3	26	3,9	13	0,0	9	0,0	20	0,0	1	0,0	2	0,0	86	3,5
neomycine	14	42,9	8	12,5	0	-	0	-	20	0,0	0	-	2	0,0	44	15,9
ciprofloxacine	15	6,7	26	3,9	13	0,0	9	0,0	20	0,0	1	0,0	2	0,0	86	2,3
tetracycline	15	100,0	26	100,0	13	100,0	9	100,0	20	100,0	1	100,0	2	100,0	86	100,0
mupirocine	14	0,0	8	0,0	0	-	0	-	20	0,0	0	-	2	0,0	44	0,0
linezolid	14	0,0	8	0,0	0	-	0	-	20	0,0	0	-	2	0,0	44	0,0
tmgs	1	0,0	18	0,0	13	0,0	8	0,0	0	-	1	0,0	0	-	41	0,0

tmgs = trimethoprim-sulfa

Tabel A11.6 Aantallen, frequentie, prevalentie en OR met het 95% betrouwbaarheidsinterval voor bedrijven die standaard antibioticum toepassen versus bedrijven die dat niet doen (totaal 34 bedrijven)

variabele	categorie	freq (n)	freq (%)	prev MRSA (%)	OR	95% btbhi	P-exact
standaard	ja	25	73,5	76,0	10,2	1,4-126,1	0,015
antibiotica	nee	9	26,5	22,2	ref		

Tabel A11.7 Aantallen, frequentie, prevalentie en OR met het 95% betrouwbaarheidsinterval voor de risicofactoren positieve leverancier en standaardantibioticumtoepassing in een bivariate analyse (totaal 21 bedrijven met informatie over beide factoren)

variabele	categorie	freq (n)	freq (%)	prev MRSA (%)	OR	95% btbhi	P-exact
status	positief	11	52,4	81,8	10,2	1,1-156,8	0,042
aanvoer	negatief	10	47,6	20,0	ref		
standaard	ja	14	66,7	64,3	2,3	0,1-48,0	0,836
antibiotica	nee	7	33,3	29,6	ref		

antibiotica. Wanneer er echter gecorrigeerd wordt voor de status van het aanvoerende bedrijf, wordt het risico van standaardbehandelingen met antibiotica verlaagd naar een 2,3 keer verhoogd risico, dat niet langer significant is ($P=0,84$; Tabel A11.7). Het risico op positief zijn door een positieve leverancier wordt niet anders door te corrigeren voor toepassing van antibiotica, en blijft 10 keer zo hoog (Tabel A11.7).

Discussie

Er is een sterke en significante associatie gevonden tussen de MRSA-status van het aanleverende bedrijf en de MRSA-status van het ontvangende bedrijf. De resultaten uit deze studie onderschrijven daarmee de suggestie van Van Duijkeren et al. [8] dat aanvoer van varkens van een MRSA-positief bedrijf een risicofactor is voor het afnemende bedrijf, namelijk een circa tien keer verhoogd risico. Alhoewel in slechts een paar isolaten gevonden,

lijkt het erop dat de meer zeldzame *spa*-typen alleen in één piramide voorkomen. Dit zou er eveneens op kunnen duiden dat aanvoer van varkens een belangrijke rol kan spelen in de verspreiding van MRSA tussen bedrijven. Dit kan echter met de huidige data niet onderbouwd worden en zou dus op grotere schaal onderzocht moeten worden. Als dit zo zou zijn, zou het pleiten voor een top-downstrategie bij toekomstige bestrijdingsprogramma's. Echter, aangezien 46% van de bedrijven zonder aanvoer ook positief bevonden zijn en 23% van de bedrijven die aanvoeren van een negatief bedrijf ook positief zijn, is onderzoek naar andere risicofactoren voor voorkomen van MRSA noodzakelijk.

De meer zeldzame *spa*-typen komen alleen in één piramide voor. *Spa*-typen t011 en t108 worden in een groot aantal van de piramides gevonden en ook binnen piramides wordt op bijvoorbeeld het aanleverende bedrijf t011 gevonden en op het afnemende bedrijf t108. Op het

afnemende bedrijf zou MRSA binnengekomen kunnen zijn, onafhankelijk van de aanvoer van een MRSA-positief bedrijf. Echter, *spa*-type t011 en t108 kunnen door een enkele mutatie in elkaar overgaan; op het staphylococcal protein A (*spa*) wijken ze op slechts één repeat af.

In onze studie zijn, naast compleet MRSA-positieve en compleet MRSA-negatieve piramides, ook gemengde piramides gevonden. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat er soms weken tot maanden tijd zit tussen bemonstering van verschillende bedrijven binnen één piramide. In de tijd tussen bemonsteringen kan een status van een bedrijf veranderen. Dit geldt voor alle bedrijven, maar zou met name een verklaring kunnen zijn voor het vinden van piramides waarin positieve en negatieve bedrijven voorkomen. In de tussenliggende periode kan de MRSA-status van een bedrijf gewijzigd zijn. Daarnaast zijn 4 van de 8 positieve piramides niet compleet, omdat de veehouders geen medewerking wilden verlenen aan de studie.

De resultaten van de pool- en stofmonsters komen ruim voldoende overeen. De Cohen's kappa van 0,70 is in overeenstemming met de gevonden overeenkomst in andere studies [13]. Het nemen van stofmonsters is eenvoudig en goedkoop en het levert geen ongemak voor de varkens op. In de toekomst zou er voor gekozen kunnen worden om de bedrijfsstatus voor MRSA te monitoren met behulp van stofmonsters. Onderzoek moet uitwijzen hoeveel stofmonsters dan voldoende zijn voor een dergelijke monitoring.

Uit deze studie komt uit de univariate analyse de standaardtoepassing van antibiotica als risicofactor naar voren. Ook in de studie van Van Duijkeren et al. was dit het geval [8]. Bedrijven uit onze studie die standaardbehandelingen met antibiotica toepassen, hebben een tien keer groter risico om MRSA-positief te zijn dan bedrijven die geen standaardbehandelingen met antibiotica toepassen. Wanneer echter gecorrigeerd wordt voor het effect van aanvoer van een positieve leverancier, was dit risico veel lager en niet meer statistisch significant door het kleine aantal bedrijven wat overbleef voor de analyse. Bij de conclusies voor zowel de risicofactor aanvoer van MRSA-positieve bedrijven als de risicofactor standaard antibioticumtoepassing, moet er rekening worden gehouden met het feit dat het hier gaat om univariate c.q. bivariate analyses, met andere woorden er is niet gecorrigeerd voor andere factoren op het bedrijf die een positieve status zouden kunnen verklaren. Het effect van een MRSA-positieve leverancier bleef geldig na correctie voor standaard antibioticumtoepassing, maar vele andere factoren kunnen ten grondslag liggen aan het positief zijn van een bedrijf. Het beperkte aantal bedrijven en bedrijfsgegevens in deze studie laat een multivariate analyse naar risicofactoren niet toe. Voor een dergelijke analyse is een meer uitgebreide studie noodzakelijk. Van den Broek et al.[13] suggereren dat de mate van resistentie tegen bepaalde antibiotica afhankelijk is van het *spa*-type. Ook in onze database lijkt het erop

dat bepaalde *spa*-typen meer resistentie tegen bepaalde antibiotica laten zien dan andere *spa*-typen. Daarnaast vinden we resistentie tegen specifieke antibiotica in verschillende *spa*-typen in dezelfde piramide. Aangezien de meer zeldzame *spa*-typen slechts in kleine aantallen en in één piramide voorkomen, is het resistentiepatroon van deze *spa*-typen vaak gelijk. Het aantal isolaten per *spa*-type, waarop een gevoeligheidsbepaling is gedaan, en het aantal piramides zijn te beperkt om harde uitspraken te doen over resistentiepatronen binnen *spa*-typen c.q. piramides. Hiervoor is meer informatie nodig.

Aanbevelingen

Aangezien bedrijven zonder aanvoer en bedrijven met aanvoer van een MRSA-negatief bedrijf ook positief kunnen zijn, is in het LNV-MRSA-programma ook een risicofactorenanalyse op 200 varkensbedrijven opgenomen (LNV-MRSA-project 8). De resultaten daarvan worden gepresenteerd in de eindrapportage van dat project. Het risico van antibioticumtoepassing is daarin ook opgenomen.

Bij observationele studies in het veld is het lastig om het effect van een enkele factor te kunnen bepalen, aangezien talloze andere factoren tegelijkertijd spelen of variëren tijdens de studieperiode. In experimenteel onderzoek zal gemakkelijker het effect van een enkele factor of interventie maatregel getoetst kunnen worden. In hoeverre een mogelijke interventie, bijvoorbeeld restrictieve toepassing van antibiotica, leidt tot reductie van MRSA is een vraag die beantwoord dient te worden door gegevens uit observationele studies te combineren met experimenteel onderzoek. Kleinschalige experimenten zijn reeds gaande in Lelystad (uitvoerder: Els Broens (WUR/RIVM)).

Longitudinaal onderzoek op varkensbedrijven kan informatie opleveren over transmissieroutes, - snelheid en factoren van invloed daarop. Ook kan de MRSA-status van een bedrijf gedurende langere tijd gevolgd worden. Binnen twee Europese projecten, namelijk Pilgrim en Safeguard, wordt reeds op beperkte schaal longitudinaal onderzoek gedaan.

Resultaten uit dit onderzoek pleiten voor een top-downstrategie. Mogelijkheden voor het MRSA-vrij worden en blijven van (top)fokbedrijven vergen nader onderzoek.

Gerelateerde projecten

- Prevalentiestudie en risicofactorenanalyse voor MRSA op zeugenbedrijven (LNV MRSA-project 8)
- Transmissie MRSA slachthuis (LNV MRSA-project 13)
- Resistentieonderzoek MRSA-stamen (LNV MRSA-project 5)
- Typering MRSA-isolaten (LNV MRSA-project 7)
- Longitudinaal onderzoek naar MRSA-transmissie binnen varkensbedrijven (Safeguard en Pilgrim)
- Transmissie-experimenten voor MRSA in varkens (WUR)

Output

- Broens E.M., Graat E.A.M., van der Wolf P.J., van Duijkeren E., van Nes A., Wagenaar J.A., van der Giessen A.W. en de Jong M.C.M., Can MRSA be transmitted through the pig production chain? - posterpresentatie op WIAS Science Day – maart 2008, Wageningen, Nederland
 - Broens E.M., Graat E.A.M., van der Wolf P.J., van Duijkeren E., van Nes A., Wagenaar J.A., van der Giessen A.W. en de Jong M.C.M., Can MRSA be transmitted through the pig production chain? - lezing op en abstract in Proceedings van 20th IPVS congres – juni 2008, Durban, South Africa
 - Broens E.M., Graat E.A.M., van der Wolf P.J., van Duijkeren E., van Nes A., Wagenaar J.A., van der Giessen A.W. en de Jong M.C.M., MRSA ST398 in the pig production chain: What is the role of the supplier of pigs? – posterpresentatie op en abstract in Proceedings van ASM conferentie ‘Methicillin resistant staphylococci in animals’ – september 2009, Londen, UK
 - Broens E.M., Graat E.A.M., van der Wolf P.J., van Duijkeren E., van Nes A., Wagenaar J.A., van der Giessen A.W. en de Jong M.C.M., MRSA ST398 in the pig production chain: What is the role of the supplier of pigs? posterpresentatie op en paper in Proceedings van Safepork 2009 – september 2009, Quebec, Canada
 - wetenschappelijke publicatie in een double refereed tijdschrift (in progress)
- foodborne pathogens, June 2008, Copenhagen, Denmark.
7. Huijsdens, X.W., et al., Community-acquired MRSA and pig-farming. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2006. 5: p. 26.
 8. Van Duijkeren, E., et al., Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Veterinary Microbiology*, 2008. 126(4): p. 383-9.
 9. Thrusfield, M., et al., WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record*, 2001. 148(18): p. 567-72.
 10. De Neeling, A.J., et al., High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary Microbiology*, 2007. 122(3-4): p. 366-72.
 11. Harmsen, D., et al., Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003. 41(12): p. 5442-8.
 12. SAS Institute Inc, SAS/STAT User’s Guide, V. 9.1, SAS Institute Inc. 2004: Cary, North Carolina.
 13. Van den Broek, I.V.F., et al., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms. *Epidemiology and Infection*, 2009. 137(5): p. 700-8.

Literatuur

1. Voss, A., et al., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases*, 2005. 11(12): p. 1965-6.
2. Bens, C.C., A. Voss, and C.H. Klaassen, Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *Journal of Clinical Microbiol*, 2006. 44(5): p. 1875-6.
3. Khanna, T., et al., Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Veterinary Microbiology*, 2008. 128(3-4): p. 298-303.
4. Smith, T.C., et al., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS ONE*, 2008. 4(1): p. e4258.
5. Van den Eede, A., et al., High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. *Veterinary Microbiology*, 2009. 133(1-2): p.138-44.
6. Graveland, H., et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in veal calf farmers and veal calves in The Netherlands, Proceedings of the 1st American Society of Microbiology on Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria and

APPENDIX 12

Project 13: MRSA-transmissie tijdens transport en in het slachthuis

Projectleider

P. van der Wolf, GD

Projectteam

E.M. Broens, QVE-WUR en Cib-RIVM.
E.A.M. Graat, M.C.M. de Jong, QVE-WUR.
Lab Bacteriologie en PCR, GD.
X.W. Huijsdens, Cib-RIVM.
D.J. Mevius, CVI-WUR.

Samenwerking

Derk Oorborg en kwaliteitsmedewerkers, VION.
Veehouders.
Varkenstransporteurs.

Samenvatting

Een nieuwe kloon van methicillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA ST398) is in 2005 voor het eerst beschreven in varkens en mensen in contact met varkens. In Nederland werd een discrepantie gevonden tussen het percentage positieve bedrijven voor MRSA gemeten op varkensslachthuizen (81%) en gemeten op varkensbedrijven (respectievelijk 39% en 56%). Dit zou verklaard kunnen worden door de transmissie van MRSA tijdens transport van varkens naar het slachthuis of tijdens het verblijf in de wachtruimten van het slachthuis. Voor *Salmonella* Typhimurium is reeds beschreven dat varkens binnen het tijdsbestek van dit traject positief kunnen worden. Het doel van deze studie was om uit te zoeken of MRSA-negatieve varkens MRSA op kunnen lopen tijdens het traject van bedrijf naar steektafel.

Hiertoe werden 117 slachtvarkens, afkomstig van 4 MRSA-negatieve bedrijven, geselecteerd. Van deze varkens werden neusswabs genomen bij het opladen op het bedrijf, bij het uitladen op het slachthuis en op de steektafel. Ook werden veegmonsters genomen van de vrachtwagen en van de wachtruimte waarin de varkens verbleven. Alle monsters werden individueel onderzocht, verdachte isolaten werden met een multiplex PCR geconfirmeerd. Van positieve isolaten werden het *spa*-type en de antibioticumgevoeligheid bepaald.

Alle onderzochte varkens (n=117) waren MRSA-negatief bij opladen op het bedrijf. De tijd tussen op- en uitladen varieerde tussen 2 en 5 uur. Na transport waren varkens van 2 bedrijven nog negatief en van 2 bedrijven MRSA-positief, respectievelijk 17% en 26% van de onderzochte varkens. In beide vrachtwagens waarin deze varkens vervoerd waren, testte ook 1 veegmonster MRSA-positief. Varkens die vervoerd werden in een gecontamineerde vrachtwagen hadden een hoger risico om MRSA-positief te zijn na transport (21% positief) dan

varkens die vervoerd werden in een niet-gecontamineerde vrachtwagen (0% positief; OR=21,7). Vervolgens verbleven de varkens 1,75 tot 11,5 uur in de wachtruimte voordat ze geslacht werden. In 3 van de 4 wachtruimten waren de veegmonsters MRSA-positief. Op de steektafel werden ten slotte in alle koppels MRSA-positieve varkens gevonden, variërend van 7% tot 100% van de varkens per koppel. Varkens die in een gecontamineerde wachtruimte hadden gestaan, hadden een verhoogd risico om zelf ook MRSA-positief te zijn (78%) ten opzichte van varkens die in een niet-gecontamineerde omgeving stonden (7%; OR=48,0). Ook als varkens die positief waren bij aankomst werden uitgesloten, was dit risico sterk verhoogd (43% versus 7%; OR=10,3).

De resultaten laten zien dat varkens MRSA-positief kunnen worden binnen enkele uren als de varkens in een gecontamineerde omgeving verblijven. Voor de introductie van MRSA in de voedselketen lijkt het bijebrengen van varkens van verschillende bedrijven op de vrachtwagen dan wel in het slachthuis een belangrijke rol te spelen. Verder onderzoek is noodzakelijk om de exacte transmissieroutes en eventuele beheersmaatregelen op te helderen. Het gezondheidsrisico voor varkenstransporteurs, slachthuispersoneel en consumenten van varkensvlees moet nog verder uitgezocht worden.

Summary

A distinct clone of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA ST398) was found in pigs and people in contact with pigs. The discrepancy between prevalences for farms positive for MRSA ST398 found on Dutch slaughterhouses (81%) and on Dutch pig farms (39 and 56%) might be explained by the transmission of MRSA ST398 during transport from pigs to slaughterhouses and during resting time in slaughterhouses. This has been described for *Salmonella* Typhimurium earlier. The objective of this study was to evaluate the possibility of negative tested pigs becoming MRSA ST398 positive within the period between loading at the farm and stunning.

Slaughter pigs (n=117) from 4 MRSA negative farms were selected. A nasal swab was taken from the pigs just before loading for transport, at arrival at the slaughterhouse and just after stunning. Additionally, environmental wipes were taken from the transport lorry and the lairage. Microbiological analysis was done on individual samples. Confirmation of MRSA suspected colonies was done by multiplex PCR. *Spa*-types and antimicrobial susceptibilities were determined.

On all farms, all pigs (n=117) tested negative at the moment of loading before transport. Time between

loading on the farm and arrival on the slaughterhouse varied between 2 and 5 hours. After transport, pigs from 2 farms still were negative, in the other farm batches MRSA-positive pigs were found, respectively 17% and 26%. For each of these 2 batches, 1 out of 5 environmental wipes taken from the lorry was positive as well. Pigs that stayed in contaminated lorries had a higher risk of being MRSA positive after transport (21% positive) than pigs that stayed in lorries that tested negative for MRSA (0%; OR=21.7). Subsequently, the pigs spent from 1.75 to 11.5 hours in the lairages before entering the slaughter process. After this period, in 3 out of 4 lairages, MRSA was found in 1 to 4 environmental wipes. Finally, in all slaughter batches MRSA was found in 7% to 100% of the tested pigs. Pigs that stayed in a contaminated lairage had a higher risk of being MRSA positive (78%) than pigs that stayed in lairages that tested negative for MRSA (7%; OR=48.0). When pigs positive after arrival in the slaughterhouse were excluded, this risk was still significant (43% positive vs. 7%; OR=10.3). These results demonstrate that pigs can get MRSA-positive within several hours when placed in a contaminated environment. For introduction of MRSA in the food production chain, bringing together pigs from various farms on transport lorries and in lairage facilities seems to be an important risk factor. Further research is needed to elucidate the route of transmission and factors affecting it. The possible health hazard for lorry drivers, slaughterhouse personnel and consumers of pork needs further investigation.

Inleiding

In Nederland zijn in 2005 de eerste humane gevallen beschreven van MRSA die gerelateerd waren aan contact met varkens [1]. Het bleek te gaan om een specifieke kloon, die niet typeerbaar bleek met de in Nederland gebruikte standaardmethode (Pulsed Field Gel Electroforese) [2]. Ook in andere landen wordt deze kloon gevonden in varkens [3]. Daarnaast blijkt deze kloon ook bij andere diersoorten gevonden te worden [4, 5]. Alle isolaten behoren tot hetzelfde Multi Locus Sequence Type (MLST), en daarom wordt veelal de term MRSA ST398 gehanteerd [6].

Een studie in Nederlandse varkensslachthuizen vond op de steektafel 44 van de 54 slachtbatches positief voor MRSA [7]. Iedere slachtbatch was afkomstig van één varkensbedrijf en men zou dus kunnen zeggen dat de prevalentie van positieve bedrijven bij deze studie op 81% lag. Twee Nederlandse studies waarbij levende varkens op het bedrijf werden bemonsterd vonden respectievelijk 39% en 56% van de bedrijven positief [8, 9]. Het verschil in gevonden prevalentie zou verklaard kunnen worden door een verschil in studieopzet, maar er zou ook transmissie van MRSA kunnen plaatsvinden tijdens transport of in de stallen van het slachthuis. Voor *Salmonella* Typhimurium is aangetoond dat varkens *Salmonella*-positief kunnen worden na een verblijf van enkele uren in een gecontamineerde omgeving [10, 11].

Om uit te zoeken of dit ook het geval is voor MRSA werden MRSA-negatieve varkens gevolgd tijdens transport en verblijf in het slachthuis.

Materiaal en methoden

Tussen juli 2008 en april 2009 werden 4 vermeerderings-/ vleesvarkensbedrijven geselecteerd, die MRSA-negatief getest waren in de lopende risicofactorenanalyse (LNV MRSA-project 8). De bedrijfsgrootte varieerde van 160 tot 380 zeugen. De 4 bedrijven leverden varkens aan 3 verschillende grote commerciële varkensslachthuizen in Nederland. Op de bedrijven werden van 27-30 slachtvarkens neusswabs (Medical Wire and Equipment, MW102, UK) afgenomen bij het opladen op het bedrijf, bij het uitladen op het slachthuis en op de steektafel. Direct na het verblijf van de varkens werden van de compartimenten van de vrachtwagen en de wachtruimten waarin de varkens hadden gezeten, 3-5 omgevingsmonsters (Sodibox, s1 kit ringer solution, Frankrijk) genomen.

In Tabel A12.1 zijn details van de bedrijven en de varkens weergegeven. Op alle bedrijven werden de varkens op een lege, gereinigde vrachtwagen geladen. De tijd tussen opladen tot aankomst op het slachthuis varieerde van 2 tot 5 uur. Bij de koppels van bedrijf A, B en C werden onderweg naar het slachthuis, varkens afkomstig van andere bedrijven bijgeladen op de vrachtwagen. Varkens afkomstig van één bedrijf werden op de vrachtwagen en in de wachtruimte van het slachthuis bij elkaar gehouden in een afgescheiden ruimte en niet gemengd met varkens van andere koppels. Op de vrachtwagen was direct contact met varkens (bedrijf A, B en C) van andere bedrijven door de halfopen afscheiding in de vrachtwagen mogelijk. In de wachtruimten van slachthuizen I en III was dit eveneens het geval. Varkens van bedrijf A werden als eerste koppel in een schone en gereinigde wachtruimte geplaatst. Gedurende hun verblijf werden varkens van andere bedrijven toegevoegd. De koppels van bedrijf B, C en D werden in de wachtruimte geplaatst waar al varkens van andere bedrijven aanwezig waren. De tijd tussen aankomst op het slachthuis tot de steektafel varieerde van 1,75 tot 11,5 uur. Op alle individuele neusswabs en omgevingsmonsters werd bij de GD bacteriologisch onderzoek gedaan. Het bacteriologisch onderzoek bestond uit twee achtereenvolgende selectieve ophopingsstappen, waarna gekweekt werd op een MRSA-selectieve plaat (MRSA screen, Oxoid, UK). Verdachte isolaten werden geconfirmeerd met behulp van een multiplex PCR [7]. Positieve isolaten werden voor *spa*-typering naar het RIVM gestuurd en op minstens 1 isolaat per bedrijf werd een antibioticumgevoeligheidsbepaling gedaan bij het CVI [12].

Om associaties tussen de MRSA-status van de omgevingsmonsters en de MRSA-status van de varkens in die omgeving te berekenen, werd univariate exacte logistische regressie uitgevoerd met behulp van SAS, versie 9.1 [13].

Tabel A12.1 Bedrijfsgegevens en resultaten van bemonstering voor en na transport naar het slachthuis en op de steektafel

	Bedrijf A	Bedrijf B	Bedrijf C	Bedrijf D	Totaal
bedrijfs grootte (# zeugen)	160	160	320	380	
monsterdatum	16/07/2008	27/02/2009	11/03/2009	08/04/2009	-
koppelgrootte afgevoerde varkens	60	65	27	63	
# bemonsterde varkens	30	30	27	30	117
geslacht van de varkens	♀/♂	♂	♂	♀	
id slachthuis	I	II	III	III	-
koppels bijgeladen	ja	ja	ja	nee	-
# uren tussen op- en uitladen	5	5	4	2	-
# uren tussen uitladen en slachten	9	1,75	11,5	2	-
totale tijd tussen opladen en slachten	14	6,75	15,5	4	-
# varkens gelijktijdig aanwezig in wachtruimte	1000	500	800	500	
soort hokafscheiding in wachtruimte	open	dicht	open	open	-
# varkens MRSA-positief bij opladen	0	0	0	0	0
# varkens MRSA-positief bij uitladen	0	0	7	5	12
# varkens MRSA-positief op steektafel	2	13	27	28	70
% MRSA-positieve varkens op steektafel	6,7	43,3	100	93,3	59,8
# monsters MRSA-positief uit vrachtwagen (totaal)	0 (3)	0 (5)	1 (5)	1 (5)	2 (18)
# monsters MRSA-positief uit wachtruimte (totaal)	0 (3)	4 (5)	1 (5)	1 (5)	6 (18)

Resultaten

Alle onderzochte varkens (n=117) waren MRSA-negatief bij opladen op het bedrijf. Na transport naar het slachthuis was 10% (12/117) van alle varkens MRSA-positief. Deze varkens waren afkomstig van bedrijf C en D, met respectievelijk 26% (7/27) en 17% (5/30) positieve varkens. In beide vrachtwagens die de varkens van bedrijf C en D vervoerden, werd ook in 1 van de 5 veegmonsters MRSA gevonden. De onderzochte varkens afkomstig van bedrijf A en B waren alle MRSA-negatief bij aankomst op het slachthuis. Ook in veegmonsters afkomstig uit de vrachtwagens waarin deze varkens vervoerd waren, werd geen MRSA aangetoond (Tabel A12.1). Op de steektafel was 60% (70/117) van de varkens MRSA-positief. In alle koppels werd MRSA gevonden. De prevalentie binnen een koppel varieerde van 7% tot 100% positieve varkens. In slachthuis II en III (2x) werd ook MRSA in veegmonsters van de wachtruimte gevonden (Tabel A12.1).

Varkens die in een gecontamineerde vrachtwagen vervoerd werden, hadden een groter risico om MRSA-positief te testen na transport (21% positief), dan varkens die in een niet-gecontamineerde vrachtwagen vervoerd werden (0%; OR=21,7; 95% btbhi 3,4-∞; P=,0002). Voor de wachtruimte van het slachthuis gold hetzelfde, alleen was het risico hier nog groter, respectievelijk 78 en 7% positief (OR=48,0; 95% btbhi 10,6-452,2; P<,0001). In de berekening van de laatste odds ratio werden ook varkens geïnculdeerd die al positief waren na transport (afkomstig van bedrijf C en D). Vandaar dat het berekende risico van een gecontamineerde wachtruimte zeer waarschijnlijk een overschatting is van de werkelijkheid. Immers, de MRSA-positieve varkens kunnen ook bijgedragen hebben aan transmissie binnen de wachtruimte. Een betere schatting van het risico van verblijf in een gecontamineerde wachtruimte kan gemaakt worden door alleen de varkens van bedrijf A en B mee te nemen in de berekening,

Tabel A12.2 Associatie tussen MRSA-status van omgeving en varkens die hierin verblijven

variabele	categorie	varkens n	% %	% MRSA- positief	OR	95% btbhi	P-exact
vrachtwagen	positief	57	48,7	21,1	21,7	3,4-∞	0,0002
	negatief	60	51,3	0	ref	-	-
wachtruimte (alle varkens)	positief	87	74,4	78,2	48,0	10,6-452,2	<0,0001
	negatief	30	25,6	6,7	ref	-	-
wachtruimte (varkens negatief na aankomst)	positief	30	50,0	43,3	10,3	2,0-105,0	0,0021
	negatief	30	50,0	6,7	ref	-	-

OR=odds ratio; btbhi=betrouwbaarheidsinterval

Tabel A12.3 *Spa*-type en resistentiepatroon van de positieve MRSA-isolaten per bedrijf

bedrijf	<i>spa</i> -type in varkens (n)		<i>spa</i> -type in omgeving (n)		resistentiepatroon
	bij uitladen	op steektafel	vrachtwagen	slachthuis	
A		t1457 (2)	-	-	ECIT (2)
B		t108 (6)	-	t011 (3)	T (1) ^a
		t011 (6)		t108 (1)	
		t2330 (1)			
C	t108 (4)	t108 (8)	t108 (1)	t011 (1)	ECIT (1) ^b
	t011 (3)	t011 (18)			
		t2123 (1)			
D	t1457(5)	t108(3)	t1457(1)	t011(1)	? ¹
		t011(22)			
		t1457 (3)			

E=erythromycine; Cl=clindamycine; T=tetracycline

^a van isolaat met *spa*-type t108 geïsoleerd uit varken op steektafel

^b van isolaat met *spa*-type t108 geïsoleerd uit varken bij uitladen

¹ NB. resistentiepatronen van bedrijf D nog niet volledig bekend ten tijde van opstellen eindrapportage

aangezien deze alle negatief waren na transport. Deze varkens hadden een lager, maar eveneens een verhoogd risico om MRSA-positief te testen na verblijf in een gecontamineerde wachtruimte (43% positief), dan na een verblijf in een niet-gecontamineerde wachtruimte (7% positief; OR=10,3; 95% btbhi 2,0-105,0; $P=,0021$). Details van de berekeningen staan in Tabel A12.2.

In Tabel A12.3 zijn de gevonden *spa*-typen en resistentiepatronen weergegeven. Er zijn 3 verschillende *spa*-typen gevonden, die alle eerder gevonden zijn in varkens en tot het ST398 type horen. *Spa*-type t011 en t108 kwamen het meest frequent voor, respectievelijk in 59% en 37% van de isolaten waarvan nu een *spa*-typering bekend is. De geteste isolaten ($n=5$) waren alle resistent tegen tetracycline en gevoelig voor rifampicine, fusidinezuur, gentamicine, amikacine, neomycine, ciprofloxacine, mupirocine en linezolid.

Discussie

Resultaten laten zien dat MRSA-negatieve varkens in de beperkte tijd tussen opladen en slachten MRSA-positief kunnen worden. Binnen een tijdsbestek van twee uur kan al besmetting optreden. Voor *Salmonella* Typhimurium was al eerder aangetoond dat varkens binnen enkele uren besmet gevonden worden. Hetzelfde lijkt nu te gelden voor MRSA. Het verschil in gevonden prevalenties door De Neeling et al. [7] op varkensslachthuizen en door Van Duijkeren et al. [8] en Van den Broek et al. [9] op varkensbedrijven zou hiermee verklaard kunnen worden. De verandering van MRSA-status van individuele varkens zou op drie manieren veroorzaakt kunnen worden: (1) verblijf in een gecontamineerde omgeving, i.e. vrachtwagen en/of wachtruimte, (2) uitscheiding van MRSA door latente dragers als gevolg van stress door transport en mengen van varkens, en (3) transmissie

van MRSA tussen varkens afkomstig van verschillende bedrijven.

Humaan wordt direct contact tussen patiënten, eventueel via gezondheidszorgpersoneel, als belangrijkste transmissieroute voor MRSA gezien [14, 15], maar transmissie via apparatuur, via een gecontamineerde omgeving en via de lucht is ook meermalen beschreven [16, 17]. Uit onze resultaten blijkt dat een gecontamineerde omgeving een risicofactor is voor varkens om MRSA-positief te worden. Echter, we hebben veegmonsters genomen van de vrachtwagen en de wachtruimte kort na of tijdens het verblijf van de varkens hierin. Er is geen informatie over de MRSA-status van de vrachtwagen en de wachtruimte voordat de varkens erin geplaatst werden. In een deel van onze veegmonsters hebben we MRSA gevonden, maar er kunnen geen conclusies worden getrokken over hoe en wanneer de omgeving gecontamineerd is geraakt en welke rol deze exact gespeeld heeft in de transmissie van MRSA. Ook de gevonden *spa*-typen geven geen uitsluitel. *Spa*-typen t011 en t108 worden in Nederland het meest frequent gevonden in relatie met varkens en verschillen slechts één repeat van elkaar op het staphylococcal protein A (*spa*). De oorzaak van het tijdens transport en/of in de wachtruimte positief worden, kan dus door een gecontamineerde vrachtwagen en/of wachtruimte zijn, maar ook via de varkens van andere koppels waarmee (in)direct contact was. Van deze koppels is geen MRSA-status bekend, Er kan dan ook geen oordeel geveld worden over het effect van reiniging- en desinfectieprotocollen die in Nederland toegepast worden voor vrachtwagens en slachthuizen. Nader onderzoek naar de exacte transmissieroutes en het effect van gehanteerde reiniging- en desinfectieprotocollen is noodzakelijk om tot effectieve beheersmaatregelen te komen.

Humaan wordt onderscheid gemaakt tussen

intermitterende en persisterende MRSA-dragers, maar er is geen biologische of fysiologische verklaring voor dit verschil. Ook is geen informatie bekend over latent MRSA-dragerschap en de mogelijkheid van reactivatie onder invloed van stress [15, 18, 19]. Aangezien latent dragerschap en reactivatie wel wordt beschreven voor andere organismen, bijvoorbeeld *Herpesviridae* [20], kan niet uitgesloten worden dat dit ook een rol heeft gespeeld bij de door ons geteste varkens. Studies in een experimentele setting zouden kunnen bijdragen om MRSA-kolonisatie en -replicatie in varkens nader te onderzoeken.

In Nederland worden tijdens de rit naar het slachthuis varkens van verschillende bedrijven bij elkaar op dezelfde vrachtwagen vervoerd. Ook in het slachthuis worden grote hoeveelheden varkens afkomstig van verschillende bedrijven bijeengebracht. Om direct contact zo veel mogelijk te beperken worden koppels doorgaans niet gemengd, maar (in)direct contact is mogelijk via halfopen hokafscheidings-, se- en excreta en via de lucht. Aangezien het aantal MRSA-positieve vleesvarkensbedrijven in Nederland aanzienlijk is [9, 21], is de kans vrij groot dat varkens van MRSA-positieve bedrijven samen met varkens van MRSA-negatieve bedrijven vervoerd worden en vervolgens verblijven in de slachthuizen. Transmissie van MRSA tussen varkens zou dan ook een voor de hand liggende verklaring kunnen zijn voor onze bevindingen. De prevalenties uit Tabel A11.2 laten zien dat grof gezegd de helft (43,3%) van het totale aantal MRSA-positieve varkens op de steektafel (78,8%) veroorzaakt wordt door een gecontamineerde omgeving. De andere helft zou dan verklaard kunnen worden door transmissie van MRSA tussen varkens binnen de eigen koppel of vanuit nabijgelegen koppels. De exacte transmissieroutes tussen varkens zijn nog niet bekend, maar zouden met behulp van transmissie-experimenten nader bestudeerd kunnen worden.

De bevindingen hebben indirect ook maatschappelijke consequenties. Het bewijs dat MRSA-negatieve varkens binnen enkele uren MRSA-positief kunnen worden als ze blootgesteld worden aan een gecontamineerde omgeving, naast de gegevens uit een eerdere publicatie dat varkenshouders een verhoogd risico hebben op MRSA-dragerschap [9], impliceert dat er eveneens een verhoogd risico zou kunnen zijn voor slachthuismedewerkers en varkenstransporteurs. Daarnaast kan de verspreiding tussen koppels een risico opleveren voor de contaminatie van varkensvlees. De Boer et al. [22] hebben aangetoond dat varkensvlees gecontamineerd kan zijn met MRSA. Het risico voor mensen die varkensvlees eten wordt vooralsnog als verwaarloosbaar geschat, maar verder onderzoek moet deze inschatting rechtvaardigen. Ondanks het feit dat deze studie op een zeer beperkt aantal bedrijven is uitgevoerd, zijn de conclusies duidelijk. MRSA-negatieve varkens kunnen binnen enkele uren MRSA-positief worden. Dit brengt mogelijk gezondheidsrisico's met zich mee voor mensen werkzaam in het varkenstransport en in de varkensslachthuizen. Om

kritieke onderdelen en eventuele beheersmaatregelen aan te kunnen wijzen is nader onderzoek noodzakelijk.

Aanbevelingen

Onderzoek naar transmissieroutes, - snelheid en factoren van invloed daarop kan het best in eerste instantie onder experimentele omstandigheden uitgevoerd worden. Kleinschalige experimenten zijn reeds gaande in Lelystad. Longitudinaal onderzoek op varkensbedrijven kan daarnaast ook informatie opleveren over transmissieroutes en -snelheid binnen bedrijven en factoren van invloed daarop. Binnen twee Europese projecten, namelijk Pilgrim en Safeguard, is inmiddels op beperkte schaal longitudinaal onderzoek van start gegaan. Onderzoek naar MRSA-kolonisatie en -replicatie in het dier moet opheldering verschaffen over eventuele competitie tussen methicillinegevoelige en methicillineresistente *Staphylococcus aureus*-stammen, de gastheer-pathogeeninteractie en factoren van invloed op intermitterende en persisterende kolonisatie dan wel infectie. Het experimentele varkensmodel kan dan eveneens informatie verschaffen over de humane situatie. Onderzoek naar het effect van reiniging- en desinfectieprotocollen op MRSA lijkt eveneens zinvol.

Gerelateerde projecten

- Prevalentiestudie en risicofactorenanalyse voor MRSA op zeugenbedrijven (LNV MRSA-project 8)
- MRSA in de varkensproductieketen (LNV MRSA-project 12)
- Resistentieonderzoek MRSA-stammen (LNV MRSA-project 5)
- Typering MRSA-isolaten (LNV MRSA-project 7)
- Onderzoek naar de MRSA-besmetting van slachthuispersoneel en slachthuisomgeving (VWA project uitgevoerd door RIVM)
- Longitudinaal onderzoek naar MRSA-transmissie binnen varkensbedrijven (Safeguard en Pilgrim)
- Transmissie-experimenten voor MRSA in varkens (WUR)

Output

- Broens E.M., Graat E.A.M., van der Wolf P.J., van de Giessen A.W., de Jong M.C.M., Transmission of MRSA ST398 during transport of pigs from farm to slaughterhouse and during time spent in lairages at the slaughterhouse - lezing op en abstract in Proceedings van ASM conferentie 'Methicillin resistant Staphylococci in animals' – september 2009, Londen, UK
- Broens E.M., Graat E.A.M., van der Wolf P.J., van de Giessen A.W., de Jong M.C.M., Transmission of MRSA ST398 during transport of pigs from farm to slaughterhouse and during time spent in lairages at the slaughterhouse - lezing op en paper in Proceedings van Safepork 2009 – september 2009, Quebec, Canada
- wetenschappelijke publicatie in een double refereed tijdschrift (in progress)

Referenties

1. Voss, A., et al., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases*, 2005. 11(12): p. 1965-6.
2. Bens, C.C., A. Voss, and C.H. Klaassen, Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006. 44(5): p. 1875-6.
3. Khanna, T., et al., Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Veterinary Microbiology*, 2008. 128(3-4): p. 298-303.
4. Van den Eede, A., et al., High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. *Veterinary Microbiology*, 2008.
5. Graveland, H., et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in veal calf farmers and veal calves in The Netherlands. *Proceedings of the 1st American Society of Microbiology on Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria and foodborne pathogens*, June 2008, Copenhagen, Denmark.
6. Huijsdens, X.W., et al., Community-acquired MRSA and pig-farming. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2006. 5: p. 26.
7. De Neeling, A.J., et al., High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary Microbiology*, 2007. 122(3-4): p. 366-72.
8. Van Duijkeren, E., et al., Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Veterinary Microbiology*, 2008. 126(4): p. 383-9.
9. Van den Broek, I.V.F., et al., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms. *Epidemiology and Infection*, 2009. 137(5): p. 700-8.
10. Hurd, H.S., et al., Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment. *American Journal of Veterinary Research*, 2001. 62(8): p. 1194-7.
11. Boughton, C., et al., Rapid infection of pigs following exposure to environments contaminated with different levels of *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2007. 4(1): p. 33-40.
12. Harmsen, D., et al., Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003. 41(12): p. 5442-8.
13. SAS institute Inc., *SAS/STAT User's Guide*, V. 9.1, SAS Institute Inc., 2004: Cary, North Carolina.
14. Albrich, W.C. and S. Harbarth, Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA? *Lancet Infectious Diseases*, 2008. 8(5): p. 289-301.
15. Williams, V.R., et al., The role of colonization pressure in nosocomial transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *American Journal of Infection Control*, 2008.
16. Boyce, J.M., Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *Journal of Hospital Infections*, 2007. 65 Suppl 2: p. 50-4.
17. Kniehl, E., A. Becker, and D.H. Forster, Bed, bath and beyond: pitfalls in prompt eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrier status in healthcare workers. *Journal of Hospital Infections*, 2005. 59(3): p. 180-7.
18. Van Belkum, A., Staphylococcal colonization and infection: homeostasis versus disbalance of human (innate) immunity and bacterial virulence. *Current Opinion on Infectious Diseases*, 2006. 19(4): p. 339-44.
19. Scanvic, A., et al., Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage. *Clinical Infectious Diseases*, 2001. 32(10): p. 1393-8.
20. Steiner, I., P.G. Kennedy, and A.R. Pachner, The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurology*, 2007. 6(11): p. 1015-28.
21. Broens, E.M., et al. Prevalence study and risk factor analysis of NT-MRSA in pigs in The Netherlands. *Proceedings of the 1st American Society of Microbiology on Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria and foodborne pathogens*, June 2008, Copenhagen, Denmark.
22. De Boer, E., et al., Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, 2008.