

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

Veistelt isoleeritud *Escherichia coli* antibiootikumiresistentsus Eestis

Projektijuht: dots. Piret Kalmus, PhD

Projekti põhitäitjad: Birgit Aasmäe, MSc., Liidia Häkkinen, DVM

Tartu, 2016

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

Projekti juht: Piret Kalmus

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

Projekti algus: 01.10.2015

Tulemuste esitamise tähtpäev: 01.06.2016

Projekti põhieesmärk ja hüpoteesid: välja selgitada kliiniliselt tervete veiste roojaproovidest isoleeritud *E. coli* antibiootikumiresistentus ja laiendatud beetalaktamaase tootvate (ESBL/AmpC) tüvede esinemus.

Töö hüpoteesid: 1) kliiniliselt tervetelt veistelt isoleeritud ESBL *E. coli* levimus on alla 5%. 2) patoloogilisest materjalist isoleeritud *E. coli* resistentsus kinoloonide ja tsefalosporiinide suhtes on alla 5%.

Projektitulemuste lühikokkuvõte:

Uurimistöö käigus koguti kliiniliselt tervetelt veistelt 325 roojaproovi 65st farmist. Laiendatud spektriga beetalaktamaase (ESBL/ AmpC) tootvate *Escherichia (E.) coli* esinemus oli 9,5% (n= 31) ning ESBL tootvaid tüved pärinesid 16 st farmist. Kliiniliselt tervetelt vasikatelt isoleeritud *E. coli* tüved (n=45) oli uuritud antibiootikumide suhtes oluliselt tundlikumad võrreldes kõhulahtisusega vasikatelt pärinevate *E. coli* tüvedega (n=191). Kliinilisest materjalist pärinevad *E. coli* tüvedest olid 29,3% (n=63) fluorokinoloonide suhtes resistentsed ning ESBL tootvaid mikroobitüvesid tuvastati 3,6% juhtudest.

(tulemused, soovitusel, kuni 600 tähekohta)

Projektitulemuste lühikokkuvõte inglise keeles:

In total, 325 fecal samples from 65 dairy farm were collected from clinically healthy cows. The occurrence of ESBL/AmpC producing *E. coli* was 9.5%(n=63) and ESBL-positive strains originated from 16 dairy farms. *E.coli* isolated from clinically healthy (n=45) dairy calves was significantly susceptible ($p<0,01$) to investigated antimicrobials compared to *E. coli* isolated in case of calf diarrhoea (n=191). The resistance against fluoroquinolones was 29,3% (n=63) and ESBL positive *E. coli* strains were found in 3,6% of cases.

(tulemused, soovitusel, kuni 600 tähekohta)

Kogu projektiperioodi finantsaruanne, koos kulude selgitusega:

Kululiik	Periood 01.10.- 31.12.2015	Periood 01.01.-01.06. 2016	KOKKU	Selgitus
Personalikulud, puhkusetasu (netosumma)	548,55	751,52	1300,07	Põhitäitja töötasu
töövõtulepingu alusel makstud tasud	165,79	457,34	623,13	Laborispetsialisti töötasu
palga ja töötasuga seotud maksud	455,66	741,14	1196,8	Sotsiaalmaks, tulumaks jt. seadusega ettenähtud maksud
transpordikulu				
lähetuskulud				
hoonete, maa, vahendite, teadusaparatuuri, instrumentide, seadmete, inventari ostmise, liisimise, kaasajastamise, paigalduse kulud				
teadusaparatuuri, instrumentide, seadmete, inventari hoolduskulud				
lepingulise teadustegevuse, välistest allikatest ostetud, litsentsitud teadmiste ja patentide kulud				
ostetud tööde (analüüside) kulud	7319	13187	21100	Proovimaterjali hankimise ja proovide analüüsiga seonduvad kulud

muud tegevuskulud				
tarkvaralitsentsid, juurdepääsumaksud				
erialaspetsiifilise tarkvara kulud				
üldkulud ²	292,50	487,50	780	
käibemaks				
KOKKU	9375,5	15624,5	25000	

Projektis esitatud eesmärkide saavutamine (sh kasutatud metoodika):

Uurimistöö käigus täideti kõik projektis püstitatud eesmärgid. Lisaks püstitati projekti jooksul üks lisaeesmärk, mis samuti täideti. Lisaeesmärgiks oli hinnata, kas veiste ja vasikate antibiootikumiravi viiakse läbi vastavalt EMÜ poolt välja antud ravisoovitustele.

Käesoleva projekti eesmärgiks oli välja selgitada kliiniliselt tervete veiste roojaproovidest isoleeritud *E. coli* antibiootikumiresistentsus ja laiendatud spektriga beetalaktamaase tootvate (ESBL) *E.coli* levimus. Käesoleva uurimistöö üks hüpotees oli, et kliiniliselt tervetelt veistelt isoleeritud ESBL- positiivse *E. coli* levimus on alla 5%. Uurimistöö käigus koguti 65st piimaveisefarmist kokku 325 roojaproovi.

Roojaproovid külvati Mc Conkey +tsefotaksiimi (1 µg) selektiivsöötmele. Agaril väljakasvanud kolmanda põlvkonna tsefalosporiinidele resistentsete mikroobitüvede ESBL/ AmpC tootmine kinnitati kvantitatiivse mikrodilutsiooni meetodiga EUVSEC2 (Sensititre, TREK), millega kinnitati ESBL ja/või AmpC olemasolu. Resistentse piirmääradeks kasutati EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) epidemioloogilisi piirnorme (EUCAST ECOFF).

Kliiniliselt tervete vasikate roojaproovid (koondproov viie kliiniliselt terve vasika roojast) koguti 48st piimaveisefarmist üle Eesti, kus farmide suurus oli 140-1550 lüpsilehma. *E. coli* isoleeriti vastavalt akrediteeritud metoodikale, kus eelnevalt transportsöötmes olev materjal külvati otse eosinmetüleensinise (EMB) selektiivsöötmele. *E. coli* kinnitati veriagaril kultiveeritud puhaskultuurist biokeemiliste testide abil. Antibiootikumitundlikkus määrati diskdifusiooni meetodil. Hindamisel kasutati EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) epidemioloogilisi (EUCAST ECOFF) ja CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) kliinilisi piirnorme. Diskdifusioonil tsefalosporiinide suhtes resistentset tüved uuriti edasi kaksikdiski sünergia testiga ning mikrodilutsioonil.

Uurimistöö teiseks hüpoteesiks oli, et patoloogilisest materjalist (vasikate kõhulahtisus) isoleeritud *E. coli* resistentus kinoloonide ja tsefalosporiinide suhtes on alla 5%. Lisaks sooviti teada, kas kliiniliselt tervetelt vasikatelt pärinev *E. coli* on antibiootikumide suhtes

tundlikum võrreldes kliiniliselt haigetelt vasikatelt isoleeritud *E. coli*'ga. Uurimistöö käigus koguti roojaproovid 191lt kõhulahtisust põdevalt alla ühekuuselt vasikalt 49st piimaveisefarmidest üle Eesti. *E. coli* isoleerimine ja antibiootikumitundlikkuse määramise uurimismetoodika sarnanes eelmisel lõigus kirjeldatule.

Farmikülastuste käigus koguti kirjaliku intervjuu vormis informatsioon antibiootikumiravi määramise ning erinevate haiguste raviks enim kasutatavate toimeainete kohta. Uurimisküsimuse püstitus oli, kas uurimisalustes piimafarmides kasutatakse antibiootikume Eestis välja antud antimikroobse ravi soovitude järgi.

Uuringu tulemused

1. ESBL/AmpC esinemus kliiniliselt tervete veiste roojaproovides.

Kliiniliselt tervetelt veistelt koguti roojaproovid 65st farmist. Igast farmist võeti viis proovi. Kokku leiti ESBL-positiivseid proove 16st farmist (24,6%). Kõik viis proovi osutusid ESBL-positiivseteks ühes farmis, neljas farmis oli positiivseid proove neli ning kahes farmis olid viiest proovist positiivseid proove kolm. Ülejäänud üheksast ESBL-positiivsest farmist leiti viiest proovist üks ESBL-positiivne roojaproov.

Kliiniliselt tervetelt täiskasvanud veiste roojaproovidest isoleeritud ESBL tootvate *E. coli* tüvede osakaal oli 10,4% (n=34) ning ja AmpC tootvaid mikroobitüvesid tuvastati neli (1,2%). Seega oli ESBL/AmpC levimus käesolevas uuringus suurem kui 5%. Karbapeneemidele resistentseid mikroobitüvesid ei tuvastatud.

2. Vasikatelt isoleeritud *E. coli* antibiootikumiresistentsus

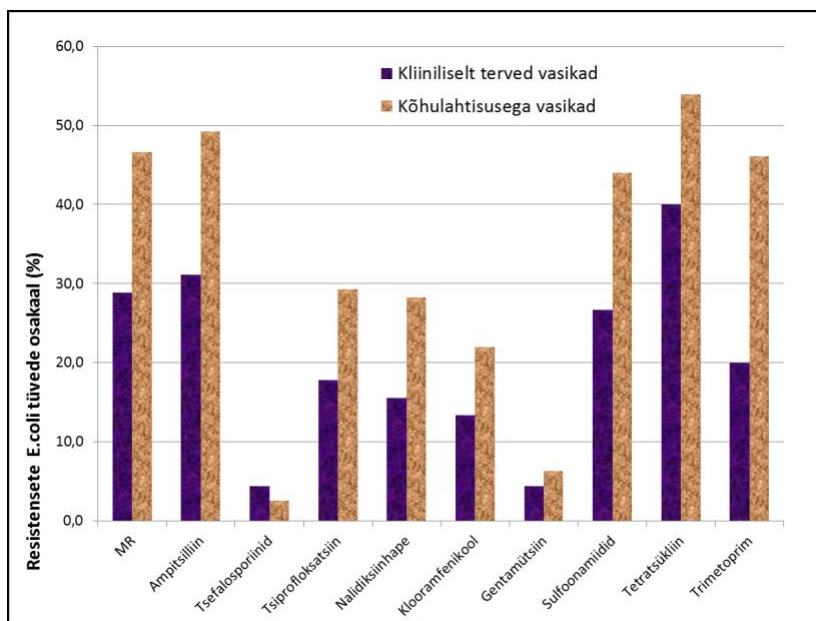
Kliinilisest materjalist ja tervetelt vasikatelt isoleeritud *E. coli* resistentsust uuritud antibiootikumide suhtes kirjeldab joonis 1.

Kliinilisest materjalist isoleeritud *E. coli* hulgas oli multiresistentseid (üheaegne resistentsus kolme ja enama antibiootikumi suhtes) mikroobitüvesid oluliselt ($p < 0,05$) rohkem (n = 89; 48%) võrreldes tervetelt vasikatelt pärineva *E. coli*'ga (n = 13; 28,8%).

Alla ühekuuste, kliiniliselt tervete vasikate rooja koondproovide (n = 45) analüüsil selgus, et fluorokinoloonide (tsiprofloksatsiin, nalidiksiinhape) suhtes resistentsete *E. coli* tüvede osakaal oli 15,6% (n = 7) ja keskmiselt tundlike *E. coli* tüvesid oli 44,4% (n = 20).

Kõhulahtisust põdevatelt vasikatelt isoleeritud *E. coli* resistentsus kinoloonide suhtes oli 29,3% (n = 63). Resistentsus on arenemas (diskdifusioonil mikroob keskmiselt tundlik antibiootikumi suhtes) 28,2% (n = 54) tüvedel. Seega võib väita, et alla ühekuuste vasikatelt isoleeritud *E. coli* omab väga kõrget resistentsust fluorokinoloonide suhtes. ESBL tootvaid *E. coli* tüvesid tuvastati 1,5% (n=3) juhtudest. Kliiniliselt tervetelt vasikatelt pärinev *E. coli* oli oluliselt tundlikum ($p < 0,01$) fluorokinoloonide suhtes võrreldes haigetelt vasikatelt isoleeritud *E. coli*'ga.

Joonis 1. Kliiniliselt tervete (n=45) ja kõhulahtisust põdevate (n=191) vasikate roojaproovidest isoleeritud *E. coli* resistentsus antibiootikumide suhtes

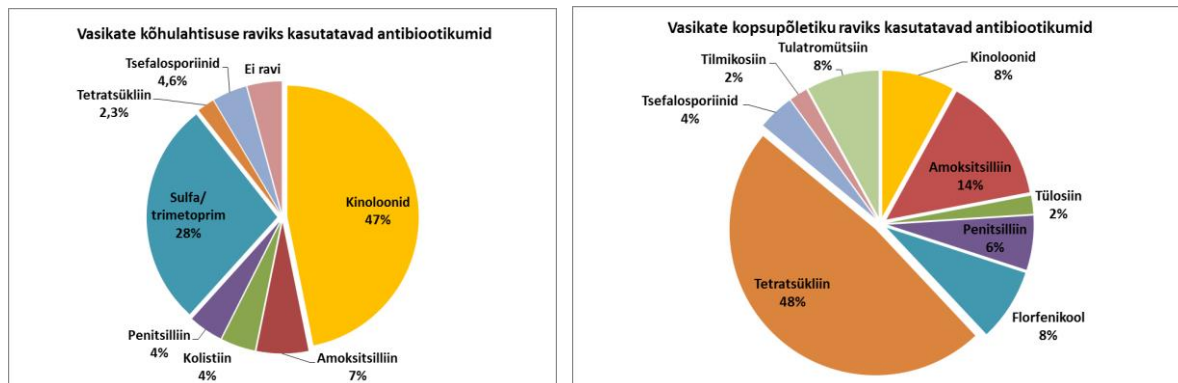


3. Antibiootikumide kasutamine veiste ja vasikate haiguste ravis

Veiste haiguste raviks kasutatakse kokku ühteteist erinevat toimeainet. Kliiniliste mastiitide süsteemseks raviks kasutati enim fluorokinoloone (44,4% vastanutest), millele järgnes penitsilliinide kasutamine. Intramammaselt kasutati kõige rohkem kloksatsilliini ja ampitsilliini sisaldavaid ravimeid. Sõrahaiguste süsteemseks antibakteriaalseks raviks kasutati kõige rohkem 3.-4.põlvkonna tsefalosporiine sisaldavaid ravimeid (68,8% vastanutest). Laialdane reservantibiootikumide nagu fluorokinoloonide ja 3.-4. põlvkonna tsefalosporiinide kasutamine veiste haiguste ravis võib esile kutsuda resistentsete mikroobide arengu.

Küsitlustulemuste analüüsil selgus, et vasikate kõhulahtisuse raviks kasutati farmides seitset erinevat toimeainet ning kopsupõletiku raviks üheksat erinevat toimeainet (joonis 2). Vasikate kopsupõletiku vältimiseks kasutab preventiivselt kõikide vasikate antibakteriaalset ravi 39% küsitletud farmidest. Küsitluse põhjal tehtud analüüs näitas, et fluorokinoloonide, kui reservantibiootikumide kasutamine esmavalikuna on väga sage.

Joonis 2. Vasikate kõhulahtisuse ja kopsupõletiku raviks kasutatavad antibiootikumid



Kokkuvõtvalt võib väita, et kliiniliste mastiitide ravis järgitakse välja antud ravisoovitusi paremini võrreldes veiste sõrahaiguste ja vasikate haigustega. Uurimistulemuste põhjal võib oletada, et antibiootikumide laialdane kasutamine vasikate haiguste ravis suurendab resistentsete mikroobitüvede arenemist.

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

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

Lektor Birgit Aasmäe, põhitäitja. Projekti põhitäitja koordineeris proovide kogumist, viis läbi farmikülastusi ning analüüsis uurimistulemusi.

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

Projektiga seotud taristu kasutamine projekti elluviimisel:

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

Soovitused ja ettepanekud:

Tuginedes saadud uurimistulemustele näeme vajadust parandada nii loomaarstide kui loomaomanike teadlikkust antibiootikumide kasutamisest.

Nii lüpsilehmade mastiidi kui vaskikate haiguste ravimisel kasutatakse erinevaid toimeaineid liiga palju ja põhjendamatult, paljudel juhtudel puuduvad mikroobide antibiootikumitundlikkuse uuringud. Tarvis on läbi viia vastavasisulisi koolitusi nii loomaomanikele kui loomaarstidele.

Antibiootikumiresistentsust puudutavad edaspidised uuringud on vajalikud, et hinnata resistentsusgeenide ülekannet loomade, inimeste ja keskkonna vahendusel.

Informatsioon resistentsuse võimaliku leviku ja ohtlikkuse kohta tuleb viia kõigi loomade raviga kokku puutuvate inimesteni, samuti soovitused mõistliku, resistentsuse teket maksimaalselt vältiva antibiootikumiravi kohta. Selleks tuleb läbi viia vastavaid koolitusi ning välja anda trükiseid.

Muud olulised asjaolud:

Käesoleva rakendusuuringu põhjal on valmimas loomaarstiõppe lõputöö. Lisaks planeeritakse saadud andmete põhjal avaldada eelretsenseeritav teadusartikkel.

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

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