



Veegerelateerde MRSA:

epidemiologie in dierlijke  
productieketens, transmissie naar de  
mens en karakterisatie van de kloon



**Veegerelateerde MRSA:  
epidemiologie in dierlijke productieketens,  
transmissie naar de mens en  
karakterisatie van de kloon**



Universiteit Utrecht



**rivm**



Universitair Medisch Centrum  
Utrecht



voedsel en waren autoriteit

## Colofon

Dit rapport is gepubliceerd door het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Het rapport beschrijft de resultaten van het onderzoeksprogramma MRSA. Dit programma is uitgevoerd door een consortium van kennisinstellingen onder leiding van het Centrum Infectieziektebestrijding van het RIVM en de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht in opdracht van de Directie Kennis en Innovatie van het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. De humane onderzoekscomponenten van dit programma zijn gefinancierd door de Directie Publieke Gezondheid van het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport. Het onderzoeksprogramma werd uitgevoerd onder begeleiding van de Begeleidingscommissie MRSA en stond onder supervisie van een interdepartementale stuurgroep. De digitale versie van het rapport is beschikbaar op de websites van het Centrum Infectieziektebestrijding van het RIVM ([www.rivm.nl/cib/mrsa](http://www.rivm.nl/cib/mrsa)) en LNV ([www.minlnv.nl](http://www.minlnv.nl)) (zie onder publicaties)).

De voorgestelde citatie is: ‘Wagenaar JA en van de Giessen AW. Veegerelateerde MRSA: epidemiologie in dierlijke productieketens, transmissie naar de mens en karakterisatie van de kloon. RIVM-rapport 330224001, 2009.

### Editors

Prof.dr. J.A. Wagenaar, FD  
Dr.ir. A.W. van de Giessen, Cib-RIVM

### Consortium

Consortium-partijen en personen die aan dit rapport hebben bijgedragen:

*Centrum Infectieziektebestrijding van het RIVM:*

- Prof.dr. R.A. Coutinho (programmaleider)
- Dr.ir. A.W. van de Giessen (programmacoördinator)
- Ing. T. Bosch
- Dr. I.V.F. van den Broek
- Drs. B.A.G.L. van Cleef
- Ing. W.D.C. Dam-Deisz
- Dr.ir. P.L. Geenen
- A.P.J. Haenen
- Ing. P.D. Hengeveld
- Dr. X.W. Huijsdens
- Dr.ir. M.N. Mulders
- Dr. A.J. de Neeling
- W.J.G. Ransz

*Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht*

- Prof.dr. J.A. Wagenaar (penvoerder)
- Ing. M.J. Broekhuizen-Stins
- Dr. E. van Duijkeren
- Drs. H. Graveland
- M.J. Gilbert MSc.
- Prof.dr. D.J.J. Heederik
- Prof.dr. J.A.P. Heesterbeek

- Dr. A. van Nes
- Ing. A.H.W. Schoormans
- I.J. Oosting-van Schothorst  
*Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR*
- R. Baaiman
- Drs. C.M. Dierikx
- H.M. Japing
- Prof.dr. D.J. Mevius
- K.T. Veldman

*Erasmus Universitair Medisch centrum*

- Prof.dr.dr. A. van Belkum
- Prof.dr. H.A. Verbrugh (voorzitter SOM)
- Ing. C. de Vogel
- Dr. W. van Wamel

*Gezondheidsdienst voor Dieren*

- Dr. T.J.G.M. Lam
- J. Lommerse
- M. Meijerink
- Dr. R.G.M. Olde Riekerink
- Dr. A. Rothkamp
- Ing. O. Sampimon
- Dr.ir. W. Swart
- Dr. P. van der Wolf

*Universitair Medisch Centrum Utrecht*

- Dr. C.H.E. Boel
- Prof.dr.dr. M.J.M. Bonten
- Dr. A.C. Fluit
- Dr. R.J.L. Willems

*Voedsel en Waren Autoriteit*

- Ir. E. de Boer
- Dr.ir. A.E. Heuvelink
- Drs. R.A.A. van Oosterom
- Drs. E.S. Poldervaart
- Ing. B. Wit
- J.T.M. Zwartkruis-Nahuis

Daarnaast werden onderdelen van het onderzoeksprogramma uitgevoerd door:

*Leerstoelgroep Quantitatieve Veterinaire Epidemiologie van Wageningen UR*

- Drs. E.M. Broens
- Dr.ir. E.A.M. Graat
- prof.dr.ir. M.C.M. de Jong  
*Amphia Ziekenhuis te Breda*
- Prof.dr. J.A.J.W. Kluytmans  
*Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis te Nijmegen*
- Prof.dr. A. Voss

### Leden van de Begeleidingscommissie MRSA

Ing. L.R. Arntz, Directie Voedsel, Dier en Consument, LNV  
Ir. H. Bekman, Productschappen Vee, Vlees en Eieren  
J.A. Brok, Nederlandse Vakbond Pluimveehouders  
Dr.ir. A.W. van de Giessen, Cib-RIVM  
J. Geurts, Nederlandse Vakbond Varkenshouders  
Drs. S. Groot, Land- en Tuinbouw Organisatie Noord

Drs. S.J. de Groot, Koninklijke Nederlandse Maatschappij  
voor Diergeneeskunde

A.L. ten Have-Mellema, Land- en Tuinbouw Organisatie  
Nederland

Dr. S. Korver, Centrale Organisatie voor de Vleessector

Dr. B.H. ter Kuile, Bureau Risicobeoordeling, VWA

Drs. J. Lambers, Directie Kennis en Innovatie, LNV

Drs. P.H.A. Mölder, Denkvit

Drs. R.A.A. van Oosterom, Bureau

Risicobeoordeling, VWA

Drs. A. Ottevanger, Directie Voeding,

Gezondheidsbescherming en Preventie, VWS

Drs. M.E. Siemelink, Directie Voesel, Dier en Consument,

LNV

Ing. A.E. Spiekers, Nederlandse Organisatie van

Pluimveehouders

Dr. P.C. Vesseur, Vereniging van de Nederlandse

Pluimveeverwerkende Industrie

Prof.dr. J.A. Wagenaar, FD

Ing. C.J.G. Wever, Directie Kennis en Innovatie, LNV

W.E.M. Zwanenburg, Nederlandse Vakbond

Varkenshouders

**Leden van de stuurgroep**

Dr. J.A. Hoekstra, MSc, Directeur Kennis en Innovatie,  
LNV.

Mr. A. Oppers, Directeur Voesel, Dier en Consument,  
LNV.

Drs. A.M.P. van Bolhuis, Directeur Voeding,  
Gezondheidsbescherming en Preventie, VWS.



## Voorwoord

Antibiotica zijn onmisbaar bij de bestrijding van bacteriële infecties bij mens en dier. De voortgaande ontwikkeling van antibioticumresistentie vormt dan ook een bedreiging voor zowel de humane als de dierlijke gezondheidszorg, een problematiek die ons allen aangaat. Multi-resistente bacteriën, zoals MRSA, kunnen bij mensen ernstige infecties veroorzaken die moeilijker behandelbaar zijn en vormen vooral een bedreiging voor kwetsbare personen in ziekenhuizen en verpleeghuizen. Om de bedreiging van MRSA-infecties het hoofd te bieden, wordt in Nederlandse ziekenhuizen sinds eind jaren tachtig van de vorige eeuw een zogenaamd ‘search and destroy’-beleid gevoerd. Dit wil zeggen dat personen die tot een risicogroep behoren bij ziekenhuisopname worden gescreend op MRSA en dat MRSA-dragers in strikte isolatie worden verpleegd en worden behandeld voor hun dragerschap. Als gevolg van dit beleid en een restrictief gebruik van antibiotica in de humane sector, komt MRSA in Nederlandse ziekenhuizen relatief weinig voor en steekt ons land gunstig af in vergelijking met de meeste andere Europese landen. In dit licht bezien is de opkomst – sinds 2003 - van een nieuw type MRSA afkomstig uit het dierlijke reservoir een zorgelijke ontwikkeling en een bedreiging voor de gunstige MRSA-situatie die wij in Nederland kennen. Om beter inzicht te krijgen in het veegerelateerde MRSA-probleem heeft het interdepartementale Platform Antibioticaresistentie het initiatief genomen tot het vaststellen van de onderzoeksprioriteiten via de SWAB en VANTURES. Vervolgens heeft het ministerie van LNV opdracht gegeven tot uitvoering van het onderzoeksprogramma MRSA en heeft het ministerie van VWS de financiering van de humane onderzoekscomponenten op zich genomen. Het RIVM werd gevraagd een consortium te

vormen van veterinaire en medische kennisinstellingen, waarmee zowel opdrachtverlening als consortium een uniek karakter kreeg. Tussentijdse resultaten van het onderzoeksprogramma hebben er inmiddels toe geleid dat naast personen in contact met levende varkens, ook personen in contact met levende vleeskalveren door de Werkgroep Infectiepreventie (WIP) zijn opgenomen als risicogroep in de MRSA-richtlijn voor ziekenhuizen. Het eindresultaat van het onderzoeksprogramma ligt nu voor u. De resultaten geven inzicht in het vóórkomen van veegerelateerde MRSA bij intensief gehouden landbouwhuisdieren en hun producten en bij mensen die met deze dieren in contact staan. Tevens is meer inzicht verkregen in de eigenschappen van deze MRSA-kloon en zijn risicofactoren geïdentificeerd die kunnen worden aangewend als handvat voor het terugdringen van MRSA-besmetting bij dier en mens. Meer in zijn algemeenheid is beperking en selectief gebruik van antibiotica in de veehouderij noodzakelijk om de voortgaande resistentie-ontwikkeling een halt toe te roepen. Het recentelijk door het ministerie van LNV en de diersectoren ondertekende convenant inzake antibioticumgebruik is een eerste stap in de goede richting.



Prof.dr. R.A. Coutinho



Prof.dr. J.A. Wagenaar

## Lijst van afkortingen

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	MPN	most probable number
AMS	Anderson Microbial Sampler	MRSA	meticilline-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
BI	betrouwbaarheidsinterval	MSSA	meticilline-sensitieve <i>Staphylococcus aureus</i>
BO	bacteriologisch onderzoek	NMC	National Mastitis Council.
BuR	Bureau Risicobeoordeling	NT-MRSA	(met PFGE) niet-typeerbare MRSA
CA-MRSA	community-acquired MRSA	OR	odds ratio
CBS	Centraal Bureau voor de Statistiek	PCR	polymerase chain reaction
CC398	Clonal Complex 398	PFGE	Pulsed Field Gel Electroforese
CFU	colony forming units	PVL	Panton-Valentine leukocidine
Cib	Centrum Infectieziektebestrijding	PVV	Productschap Vee en Vlees.
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute	qPCR	quantitative PCR
COROP	Coördinatie Commissie Regionaal OnderzoeksProgramma	QVE	Quantitatieve Veterinaire Epidemiologie
CVI	Centraal Veterinair Instituut	RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
CWZ	Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis	SCCmec	staphylococcal cassette chromosome mec
EFSA	European Food Safety Authority	Se	sensitiviteit
Erasmus MC	Erasmus Medisch Centrum	Sma	<i>Serratia marcescens</i>
EU	Europese Unie	SOM	Surveillance en Onderzoek MRSA
FD	Faculteit Diergeneeskunde	Sp	specificiteit
FP7	Zevende Kaderprogramma	<i>Spa</i>	<i>Staphylococcus</i> protein A gene
GD	Gezondheidsdienst voor Dieren	ST398	(multi-locus) sequence type 398
GSP	Gesamt Staub Probennehmer	SWAB	Stichting Werkgroep Antibiotica Beleid
HA-MRSA	hospital-acquired MRSA	UMC	Universitair Medisch Centrum
IRAS	Institute for Risk Assessment Sciences	UMCU	Universitair Medisch Centrum Utrecht
ISO	International Organization for Standardization	UU	Universiteit Utrecht
LA-MRSA	livestock-associated MRSA	VANTURES	(werkgroep) Veterinary Antibiotic Usage and Resistance Surveillance
LIS	Laboratorium voor Infectieziekten en Screening	WIP	Stichting Werkgroep Infectiepreventie
LNV	(ministerie van) Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit	WUR	Wageningen University and Research Centre
<i>mecA</i>	(gen dat bepalend is voor meticilline-resistentie in <i>Stafylococcus aureus</i> )	VWA	Voedsel en Waren Autoriteit
METC	Medische Ethische Toetsingscommissie	VWS	(ministerie van) Volksgezondheid, Welzijn en Sport
MIC	minimale inhiberende concentratie		
MLST	multi-locus sequence typing		



## Inhoud

Voorwoord	7
Summary	11
Samenvatting	13
1. Inleiding	15
1.1 Achtergrond	15
1.2 Totstandkoming van het MRSA-onderzoeksprogramma	16
1.3 Doelstelling en samenstelling van het MRSA-onderzoeksprogramma	16
2. Resultaten	17
2.1 Harmonisatie diagnostiek	17
2.2 Varkenshouderijen en -slachterijen	17
2.3 Kalverhouderijen	18
2.4 Pluimveeslachterijen	19
2.5 Melkvee	19
2.6 Stof als indicator van bedrijfsstatus en als vector voor transmissie	19
2.7 Voorkomen van MRSA in voedingsmiddelen	20
2.8 MRSA-types bij dier, product en mens	20
2.9 Antimicrobiële gevoeligheid van de MRSA-isolaten	20
2.10 Genetische karakterisatie van MRSA ST398	20
3. Discussie	21
4. Conclusies	23
5. Aanbevelingen	25
Appendices	
Appendix 1.	Rapportage project 2: communicatie en voorlichting belanghebbenden 27
Appendix 2.	Rapportage project 4: harmonisatie en optimalisering van de detectie van MRSA 28
Appendix 3.	Rapportage project 5: antimicrobiële gevoeligheid van de MRSA-isolaten 31
Appendix 4.	Rapportage project 6: karakterisatie van MRSA ST398: het varkens-gerelateerde type 36
Appendix 5.	Rapportage project 7: typering van de MRSA-isolaten 40
Appendix 6.	Rapportage project 8: prevalentieschatting en risicofactorenanalyse MRSA bij varkens 49
Appendix 7.	Rapportage project 9A: MRSA in de vleeskalverhouderij 69
Appendix 8.	Rapportage project 9B: Leegstandstudie: spreiding en dynamiek van MRSA-dragerschap bij vleeskalverhouders 96
Appendix 9.	Rapportage project 10: pilot - meest sensitieve lichaamslocatie voor MRSA-detectie bij melkvee 98
Appendix 10.	Rapportage project 11: onderzoek naar MRSA bij pluimvee en transmissie naar de mens op pluimveeslachterijen 105
Appendix 11.	Rapportage project 12: MRSA ST398 in de varkensproductiepiramide 116
Appendix 12.	Rapportage project 13: MRSA-transmissie tijdens transport en in het slachthuis 124
Appendix 13.	Rapportage project 14: MRSA in stof: indicator voor bedrijfsstatus 130
Appendix 14.	Rapportage project 15: MRSA in dierlijke producten 137



## Summary

In 2005, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was found in Dutch livestock farming and among people in contact with contaminated animals. This observation posed a problem for the health care sector since hospitals apply a “*search and destroy*” policy to ensure that the prevalence of MRSA remains low. As such, a research program aimed at gaining insight on the following issues was initiated:

- occurrence and spread of MRSA in production animals (pigs, veal calves, poultry and dairy cattle),
- risk factors for contamination in pigs and veal calves;
- occurrence of MRSA in raw meat for retail;
- transmission of MRSA from animals to humans (livestock farmers and family members, as well as slaughterhouse workers).

The study was conducted by a consortium of human and veterinary health research institutes and medical centers in the Netherlands.

Among **pig farms**, 68.3% of 202 farms tested positive for MRSA. A risk factor analysis conducted on the 171 sow farms indicated that the prevalence of MRSA was higher on large farms (>500 sows) compared to small farms (<250 sows). Additionally, the prevalence of MRSA increased over time (from 30% in early 2007 to 75% in late 2008). Other factors, such as the presence of finishing pigs, the purchase of gilts, the farm hygiene score or the antibiotic use were not statistically significant, but were all associated with farm size. The prevalence of MRSA among people living or working on pig farms was 14%. Large differences were observed between people with no pig contact (2%) and those with intensive pig contact (29%). Within the pig production pyramid, there is evidence of a clear association between the MRSA status of the supplier and the MRSA status of the purchaser. For those farms whose supplier was found to be MRSA-positive, 79% were also positive for MRSA contamination. In contrast, only 23% of farms whose supplier was MRSA-negative, were positive for MRSA. The findings of a study on pig transport indicated that MRSA-negative animals can become MRSA-positive within a few hours of being placed in a contaminated environment, such as a contaminated transport lorry or lairage.

When considering **veal farming**, 27.5% of the calves were found to be positive and MRSA was found to be present in 88% of veal farms examined. Significant positive associations were found between the presence of MRSA in calves and the age of the animals, the number of calves per section, the presence of other farm animals, the use of pest control for rats and mice and the use of antibiotics. However, the presence of MRSA in calves was negatively associated with the number of animal buildings

on a farm, cleaning and disinfection of buildings. The prevalence of MRSA among people living or working on veal farms was 16%. Large differences in prevalence were recorded between the veal farmers themselves (33%) and their family members (8%). This observation indicates that contact with animals (and their environment) is a key factor for MRSA spread to humans. A clear and positive association was also found between the number of hours per week worked on the veal farm and the likelihood of MRSA contamination. During periods without animal contact (empty farm between cycles or holidays), the prevalence of MRSA decreased by 16% in veal farmers and 32% in family members.

**Dust** from animal buildings appears to be a reasonable indicator of the MRSA status of a pig or veal farm.

Out of the 40 broiler flocks that were examined in **poultry slaughterhouses**, 35% tested positive for MRSA and 6.9% were found to be MRSA throat carriers. The prevalence of MRSA among poultry slaughterhouse workers was 5.6%. Employees in contact with live poultry are at significantly higher risk of MRSA carriage compared to those who only have contact with dead poultry or have other tasks.

Although no prevalence study was conducted in **dairy cattle**, it was determined that taking a swab sample from the area of skin between the udder and thigh is the best method to determine the presence of MRSA in these animals.

MRSA was isolated from 11.9% of the **raw meat** samples taken from retail businesses. The MRSA colony count was always less than 10 colony forming units per gram meat. Based on the combined findings of this project, as well as the epidemiological information available, the Office for Risk Assessment of the Food and Consumer Product Safety Authority (VWA) concluded that foods play no or a negligible role in the spread of MRSA in the general population.

**Typing** of MRSA strains showed that the great majority of isolates derived from farm animals and meat were of sequence type (ST) 398, which belongs to clonal complex (CC) 398. This clone is predominantly found in livestock farming in the Netherlands, as well as in other countries. With respect to the poultry isolates, 20% of the samples were of type ST9, which is not related to type ST398. Incidentally, sequence types associated with occurrence in humans were found in pig and veal calf farms.

As expected, nearly all isolates were resistant to tetracycline, which is characteristic for MRSA ST398. In

meat products and poultry, tetracycline-sensitive variants were also found. However, these isolates were usually resistant to fluoroquinolones and almost none belonged to ST398. **Resistance** against mupirocin, fusidic acid and rifampicin, which are commonly used for antibiotic therapy in humans, was rarely or not found. Vancomycin resistance was not detected.

**Genetic characterization** of MRSA ST398 indicated that there are three separate phylogenetic lineages which have evolved independently from one another. Some of the known virulence factors of *S. aureus*, such as Panton-Valentine Leucocidin (PVL) and exotoxins, have not been found in ST398.

**In conclusion**, MRSA spreads throughout the Dutch intensive livestock farming sectors. A similar spread has been observed across other countries in the world. The MRSA clone that is most frequently observed is ST398 – a type that spreads easily within animal populations. In

livestock farming an increased risk of MRSA carriage has currently been established in those working with pigs or veal calves.

In order to justify future **interventions**, a further identification of relevant risk factors is required and planned. This will be done using longitudinal intervention studies in the pig and veal farming sectors, some of which have already begun. The aim of these interventions will be to reduce the prevalence and load of MRSA in animals and humans.

At present, the major public health **risk** with respect to MRSA is the potential for further evolution of ST398 into a variant that is more virulent and more adapted to human hosts. We should point out, however, that there is no evidence for this at present.

## Samenvatting

In 2005 werd duidelijk dat meticilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) voorkomt in de Nederlandse veehouderij en dat mensen in contact met besmette dieren ook besmet kunnen raken. Dit vormt een probleem voor de gezondheidszorg aangezien in Nederlandse ziekenhuizen een ‘*search and destroy*’-beleid wordt gevoerd om de prevalentie van MRSA laag te houden. Daarom werd een onderzoeksprogramma gestart met als doel meer inzicht te verkrijgen in het voorkomen en de verspreiding van MRSA in productiedieren (varkens, vleeskalveren, pluimvee en melkvee), de risicofactoren voor besmetting (varkens en vleeskalveren), het voorkomen in onverhit vlees en de overdracht van MRSA naar de mens (veehouders en gezinsleden, slachthuismedewerkers). Het onderzoek is uitgevoerd door een consortium van kennisinstellingen in het humane en veterinaire domein.

In de **varkenshouderij** werd op 68,3% van de 202 onderzochte bedrijven MRSA aangetoond. Uit een risicofactorenanalyse op 171 zeugenbedrijven bleek dat grote bedrijven (> 500 zeugen) vaker MRSA-positief waren dan kleine bedrijven (< 250 zeugen) en dat er een toename was in de tijd: van 30% begin 2007 tot 75% eind 2008. Andere factoren, zoals de aanwezigheid van vleesvarkens, de aanvoer van gelten, de hygiënescore en de toepassing van antibiotica, bleken niet statistisch significant maar waren wel geassocieerd met de bedrijfsgrootte. De MRSA-prevalentie bij personen woonachtig en/of werkzaam op varkensbedrijven was 14%, met grote verschillen tussen personen die geen contact hadden met varkens (2%) en personen die intensief contact hadden met varkens (29%). Binnen de varkensproductiepiramide bleek er een duidelijke associatie te zijn tussen de MRSA-status van het aanleverende bedrijf en de MRSA-status van het afnemende bedrijf; 79% van de bedrijven met aanvoer van een MRSA-positief bedrijf was zelf ook MRSA-positief ten opzichte van 23% van de bedrijven met aanvoer van een MRSA-negatief bedrijf. In een studie naar transmissie van MRSA tijdens transport en in het slachthuis bleek dat MRSA-negatieve varkens binnen enkele uren MRSA-positief kunnen worden als de varkens verblijven in een gecontamineerde vrachtwagen of wachtruimte.

In de **vleeskalverhouderij** bleek 27,5% van de kalveren positief en werd MRSA gevonden op 88% van de vleeskalverbedrijven. Er werden significante positieve associaties gevonden tussen de aanwezigheid van MRSA bij kalveren en de leeftijd van de dieren, het aantal kalveren per hok, de aanwezigheid van andere landbouwhuisdieren, toepassing van ratten- en muizenbestrijding en antibioticum-gebruik. Significante negatieve associaties werden gevonden voor het aantal

stallen op het bedrijf en het reinigen en desinfecteren van de stallen. De prevalentie bij personen woonachtig en/of werkzaam op vleeskalverbedrijven was 16%, met grote verschillen in prevalentie tussen kalverhouders (33%) en gezinsleden (8%), wat aangeeft dat contact met dieren (en hun omgeving) een belangrijke factor is voor MRSA-besmetting. Ook was er een duidelijke associatie tussen het aantal werkuren per week op de kalverhouderij en het besmet zijn met MRSA. In perioden van afwezigheid van diercontact (bij leegstand van het bedrijf of tijdens vakantie) daalt de prevalentie bij vleeskalverhouders met 16% en bij gezinsleden met 32%.

**Stof** dat verzameld is in stallen blijkt een redelijke indicator te zijn van de MRSA-status van een varkens- of vleeskalverbedrijf.

Van de 40 onderzochte koppels vleeskuikens op **pluimveeslachterijen** werd 35% positief bevonden voor MRSA. Van de onderzochte vleeskuikens bleek 6,9% MRSA te dragen in de keel. De prevalentie van MRSA bij medewerkers van de pluimveeslachterijen was 5,6%. Medewerkers die contact hebben met levend pluimvee hebben een significant hoger risico van MRSA-dragerschap dan medewerkers die uitsluitend contact hebben met dood pluimvee of die andere werkzaamheden uitvoeren.

Bij **melkvee** is geen prevalentiestudie uitgevoerd, maar wel is vastgesteld dat een veegmonster van de huid tussen uier en schenkel de beste matrix is om het voorkomen van MRSA bij melkvee te bepalen.

MRSA werd geïsoleerd uit 11,9% van de onderzochte onverhitte **vleesmonsters** die genomen waren in de detailhandel. Het MRSA-kiemgetal was in alle gevallen kleiner dan 10 kve/g vlees. Op basis van de bevindingen in dit project en epidemiologische gegevens is door het Bureau Risicobeoordeling (BuR) van de VWA geconcludeerd dat levensmiddelen geen of een verwaarloosbare rol spelen bij de verspreiding van MRSA onder de bevolking.

Uit de **typering** van de stammen blijkt dat het overgrote deel van de isolaten afkomstig uit landbouwhuisdieren en van vlees sequence type (ST) 398 betreft, dat behoort tot klonaal complex (CC) 398. Dit is de kloon die, ook internationaal, gerelateerd is aan de veehouderij. Van de isolaten uit pluimvee behoorde 20% tot ST9, een type dat niet verwant is aan ST398. Incidenteel zijn er in de verschillende sectoren ook andere typen gevonden die geassocieerd zijn met voorkomen bij de mens.

Bijna alle isolaten waren, zoals verwacht, resistent tegen tetracycline, wat kenmerkend is voor MRSA ST398. In vleesproducten en pluimvee werden ook tetracycline-gevoelige varianten gevonden die veelal resistent waren tegen fluoroquinolonen. Deze stammen behoorden vrijwel geen van alle tot ST398. **Resistentie** tegen de in de humane geneeskunde belangrijke antibiotica mupirocine, fusidinezuur en rifampicine werd slechts zelden of niet gezien. Vancomycine-resistentie werd niet aangetoond.

Uit de **genetische karakterisatie** van MRSA ST398 bleek dat er drie aparte fylogenetische lijnen voorkomen die onafhankelijk van elkaar zijn ontstaan. Bekende virulentiefactoren van *S. aureus* zoals PVL (Panton-Valentine Leucocidine) en exotoxines zijn niet aangetoond in ST398.

**Concluderend** kan worden gesteld dat MRSA wijdverspreid voorkomt in de Nederlandse intensieve veehouderij en dat Nederland hierin niet uniek is. De

MRSA- kloon die op dit moment het probleem bepaalt is ST398, een type dat zich goed kan verspreiden in dierpopulaties. Een verhoogd risico van MRSA-dragerschap is op dit moment in de veehouderij vastgesteld bij een specifieke groep mensen: personen werkzaam met varkens of vleeskalveren.

Ter onderbouwing van **interventies** zal een nadere identificatie van risicofactoren plaatsvinden in (reeds lopende) longitudinale studies in de varkens- en vleeskalverhouderij. In deze studies worden waar mogelijk interventies toegepast op bedrijven. Het doel van deze interventies is het terugdringen van de MRSA-prevalentie en/of de kwantiteit van MRSA.

Het **risico** voor de volksgezondheid schuilt op dit moment in het feit dat ST398 zou kunnen veranderen in een meer virulente en/of aan de mens geadapteerde variant. Daar zijn op dit moment overigens geen aanwijzingen voor.

# 1. Inleiding

## 1.1 Achtergrond

Meticilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) is ook bekend onder de naam ‘ziekenhuisbacterie’. Karakteristiek voor deze *S. aureus* is dat deze ongevoelig is voor een bepaalde groep antimicrobiële middelen, de zogenaamde bèta-lactam-antibiotica. Hiertoe behoren de penicillinen en de cefalosporinen, antibiotica die frequent gebruikt worden in de humane en veterinaire geneeskunde. Meticilline-resistentie in stafylokokken is bekend sinds eind jaren 50 van de vorige eeuw, kort nadat meticilline op de markt was gekomen. De resistentie werd belangrijk in de jaren 60 toen MRSA voornamelijk in ziekenhuizen tot problemen ging leiden. Hier heeft MRSA de naam ‘ziekenhuisbacterie’ aan te danken. Dat MRSA een probleem is in gezondheidszorginstellingen is niet verwonderlijk: mensen die hier verblijven worden vaak met antibiotica behandeld, wat de kolonisatie en verspreiding van MRSA bevordert. Daarnaast hebben mensen in zorginstellingen vaak wonden of infusen waardoor de MRSA ook gemakkelijk tot klinische (lokale of invasief gegeneraliseerde) problemen kan leiden (infecties). MRSA-besmettingen zijn moeilijker behandelbaar dan MSSA (meticilline-sensitieve *Staphylococcus aureus*)-besmettingen, doordat veel antibiotica niet effectief zijn. De sterftetekans ligt tweemaal zo hoog. Bovendien blijken MRSA-infecties niet de plaats in te nemen van MSSA-infecties maar erbij te komen, dus geen substitutie van ziekteverwekker maar additie waardoor in landen waar MRSA endemisch is geworden de ziektelast door deze bacteriesoort verdubbeld is. Kortom: MRSA is een bedreiging voor de gezondheidszorg en het is belangrijk deze *S. aureus*-variant te beheersen.

In Nederland wordt MRSA in ziekenhuizen beheerst door een zogenaamd ‘search and destroy’-beleid. Dit betekent dat ziekenhuizen patiënten die tot een risicogroep behoren (bijvoorbeeld patiënten die gerepatrieerd worden uit een buitenlands ziekenhuis) screenen op MRSA. Indien een patiënt positief wordt bevonden volgt geïsoleerde verpleging en decontaminatie, vrijmaken van MRSA. Pas wanneer er geen MRSA meer bij de patiënt kan worden aangetoond, kan de quarantaine (isolatie en strikte hygiënische verpleging) opgeheven worden. Deze aanpak, in combinatie met een zeer terughoudend beleid in gebruik van antibiotica in Nederland, heeft geleid tot een zeer lage prevalentie van MRSA in ziekenhuizen; er is geen sprake van een endemie. In vergelijking met andere Europese landen steekt Nederland, samen met slechts enkele andere landen, zeer gunstig af met deze lage MRSA-prevalentie. De adviezen voor de aanpak van MRSA in ziekenhuizen worden gegeven door de Werkgroep Infectiepreventie (WIP).

Sinds de jaren 80 van de vorige eeuw vindt er een toename plaats van MRSA-besmettingen buiten het ziekenhuis. Deze besmettingen komen onverwacht en zonder bekende risicofactor voor bij mensen in de algemene bevolking. Veelvuldig antibioticagebruik speelt wel een rol. Dit kan leiden tot uitbraken in situaties waarbij mensen intensief lichamelijk contact hebben (onder meer sport met intensief contact). Op grond van voorkomen wordt onderscheid gemaakt tussen HA-MRSA (hospital-acquired MRSA) en CA-MRSA (community-acquired MRSA). Het verschil tussen HA-MRSA en CA-MRSA kon aanvankelijk worden gemaakt op grond van fenotypische en moleculaire kenmerken, maar dit verschil wordt steeds minder duidelijk.

In 2005 werd voor het eerst melding gemaakt van personen die besmet geraakt waren met MRSA door contact met varkens. Het betrof het dochtertje van een varkenshouder, de zoon van een dierenarts, en een varkenshouder. In follow-up onderzoek bleek 23% van een groep van varkenshouders MRSA-drager te zijn. Op grond van deze gegevens werd een pilot study uitgevoerd waarbij varkens in negen slachthuizen werden gescreend op de aanwezigheid van MRSA. Hierbij werd MRSA aangetoond in 39% van de varkens en in 81% van de slachtbatches. Daarnaast bleek dat de stammen die gevonden werden behoorden tot een specifieke kloon die met de tot dan toe door het RIVM gebruikte standaard-genotyperingsmethode (Pulsed Field Gel Electroforese met SmaI) niet typeerbaar bleken. Daarom werd de naam niet-typeerbare MRSA (NT-MRSA) geïntroduceerd. Inmiddels is gebleken dat alle NT-MRSA stammen die met Multi Locus Sequence Typing (MLST) zijn getypeerd tot het klonaal complex 398 (Clonal Complex - CC398) behoren, en vrijwel altijd tot een kloon met Sequentie Type (ST) 398. Vanwege het voorkomen van deze kloon in varkens werd aanvankelijk ook de term varkens-MRSA gebruikt. Met het inzicht dat de kloon ook voorkomt in andere productiedieren, wordt nu de term veegerelateerde MRSA gebruikt. Internationaal wordt nu livestock-associated MRSA (LA-MRSA) gebruikt om deze specifieke kloon aan te duiden. Recentelijk is er echter in China en Maleisië een andere MRSA-kloon (ST9) gevonden die een brede verspreiding lijkt te hebben onder varkens. LA-MRSA beperkt zich dus niet tot een specifieke kloon.

De brede verspreiding van LA-MRSA in de varkenshouderij en de besmetting van mensen die met levende varkens in contact kwamen, hebben in juli 2006 geleid tot aanpassing van de MRSA-richtlijn voor ziekenhuizen door de Werkgroep Infectie Preventie (WIP), zodat mensen in contact met levende varkens worden gescreend op MRSA bij ziekenhuisopname of

polikliniekbezoek. Op grond van de resultaten van dit MRSA-onderzoeksprogramma zijn hier in november 2007 mensen in contact met levende vleeskalveren aan toegevoegd.

## 1.2 Totstandkoming van het MRSA-onderzoeksprogramma

Naar aanleiding van de bevindingen van NT-MRSA bij varkens werd in 2005 een werkgroep varkens-MRSA opgericht. Deze werkgroep heeft in juni 2006 op verzoek van het Platform Antibioticumresistentie en onder regie van VANTURES en SWAB onderzoeksvragen opgesteld en deze vragen geprioriteerd. Nog in dezelfde maand zijn deze onderzoeksvragen door het interdepartementale Platform Antibioticumresistentie goedgekeurd en in juli 2006 zijn deze vragen aangeboden aan het clusterbestuur Voedselkwaliteit van LNV. Deze vragen hebben gediend als basis voor een offerteverzoek – in november 2006 - van de Directie Kennis van LNV aan het Centrum Infectieziektebestrijding (Cib) van het RIVM voor een onderzoeksprogramma op het gebied van MRSA. Daarbij is het Cib gevraagd een consortium van kennisinstellingen te vormen<sup>1</sup>.

In december 2006 is door de Directie Kennis van LNV aan het RIVM/Cib – als hoofdaannemer - opdracht verleend voor de uitvoering van het onderzoeksprogramma MRSA op basis van een offerte op hoofdlijnen welke door de leden van het consortium MRSA was opgesteld. Vervolgens werden begin 2007

op verzoek van LNV meer gedetailleerde projectplannen uitgewerkt. In de eerste fase van het programma vond de wetenschappelijke coördinatie van het onderzoek plaats binnen de werkgroep Surveillance en Onderzoek MRSA (SOM). In verschillende projecten is het onderzoek bij dieren gecombineerd met onderzoek naar MRSA-dragerschap bij mensen in contact met deze dieren. Het ministerie van VWS heeft de kosten van de humane onderzoekscomponenten op zich genomen.

## 1.3 Doelstelling en samenstelling van het MRSA onderzoeksprogramma

De doelstelling van het programma was om meer inzicht te verkrijgen in het vóórkomen en de verspreiding van MRSA in productiedieren (varkens, vleeskalveren, pluimvee en melkvee), de risicofactoren voor besmetting (varkens en vleeskalveren), het voorkomen in onverhit vlees en de overdracht van MRSA naar de mens (veehouders en gezinsleden, slachthuismedewerkers). De resultaten moeten handvatten geven voor interventie maatregelen.

Het onderzoeksprogramma was opgebouwd uit een vijftiental projecten. Deze waren opgesplitst in zeven horizontale projecten met overkoepelende activiteiten voor de acht verticale projecten (zie Tabel 1).

Tabel 1

Projectnummer	Titel project
1	Programmaleiding en -coördinatie
2	Communicatie en voorlichting belanghebbenden
3	Centrale internet database structuur*
4	Harmonisatie en optimalisatie detectie MRSA
5	Resistentie-onderzoek MRSA-stammen
6	Karakterisatie van MRSA ST398: de varkensgerelateerde kloon
7	Typering MRSA-isolaten
8	Prevalentieschatting en risicofactorenanalyse MRSA bij varkens (en transmissie naar de mens)
9	Prevalentie dieren en risicofactoren vleeskalverbedrijven (en transmissie naar de mens)
10	Prevalentieonderzoek bij rundvee en transmissie naar de mens op runderslachterijen**
11	Prevalentieonderzoek bij pluimvee en transmissie naar de mens op pluimveeslachterijen
12	Ketenonderzoek MRSA bij varkens
13	MRSA-transmissie bij varkens (tijdens transport en in het slachthuis)
14	MRSA in stof: indicator voor bedrijfsstatus
15	MRSA in dierlijke producten

\*: het project 'centrale database' is gedurende het programma niet als apart project blijven bestaan

\*\* : dit project is beperkt tot een pilotonderzoek naar de meest geschikte matrix voor MRSA-detectie bij melkvee

1 Zie de colofon voor de samenstelling van het consortium



## 2. Resultaten

### 2.1 Harmonisatie diagnostiek

De diagnostiek voor de verschillende projecten werd uitgevoerd in verschillende instituten waarbij voor dier- of omgevingsmonsters bij de start van het project drie verschillende MRSA isolatiemethoden in gebruik waren. In project 4 is een vergelijking gemaakt van kweekmedia waaruit bleek dat twee al in gebruik zijnde methoden vergelijkbare resultaten gaven. Een derde methode, afgeleid uit de humane diagnostiek, bleek minder geschikt voor monsters afkomstig van dieren en is daarom niet gebruikt in het project. Bij de verschillende laboratoria waar de diagnostiek is uitgevoerd werd één van beide goed presterende methoden gebruikt waardoor de resultaten binnen het programma vergelijkbaar zijn.

Overigens blijven er continue ontwikkelingen in de diagnostiek en is het van belang voor de toekomst alert te blijven op gevoeliger methoden en op methoden die een kortere doorlooptijd hebben dan de huidige drie tot vier dagen. Verder dient opgemerkt te worden dat een negatieve kweekuitslag geen garantie is voor afwezigheid van de bacterie. Het is altijd mogelijk dat een besmetting zich onder de detectiegrens van de gebruikte methode bevindt, met andere woorden, de hoeveelheid bacteriën in een monster kan te laag zijn om met de betreffende kweekmethode aangetoond te worden. De sensitiviteit (gevoeligheid, indicatie voor vals-negatieve uitslagen) van de gebruikte diagnostiek is niet bekend, maar het is niet te verwachten dat deze 100% is. Indicatief voor de beperkingen in sensitiviteit van de gebruikte methode zijn de resultaten van een vergelijkend onderzoek tussen twee laboratoria in project 8. Van de 100% positieve monsters (= resultaten van beide laboratoria opgeteld) vindt het ene laboratorium 78,8% en het andere laboratorium 91,8%. Er zullen dus positieve dieren/koppels worden gemist met de huidige methodiek. Voor het doel van dit programma heeft dit echter geen grote gevolgen. Als in de toekomst diagnostiek zou worden uitgevoerd als onderdeel van bijvoorbeeld een certificeringsprogramma, dan is kennis van de sensitiviteit van groot belang. De specificiteit van de diagnostiek (omgekeerd gerelateerd aan kans op vals-positieve uitslagen) is hoog omdat de MRSA-bacterie daadwerkelijk wordt geïsoleerd en gekarakteriseerd.

### 2.2 Varkenshouderijen en -slachterijen

#### *Prevalentieschatting en risicofactorenanalyse bij varkens*

Het project gericht op de prevalentie en risicofactoren in de varkenshouderij werd onderverdeeld in twee studies: een prevalentie- en risicofactorenstudie voor varkenshouders en hun gezinsleden (50 bedrijven), en een

prevalentie- en risicofactorenstudie voor varkensbedrijven (202 bedrijven). Deze tweede studie was deels verweven met de EU-baseline survey naar MRSA bij varkensfok- en vermeerderingsbedrijven. Binnen het varkensproject zijn varkens (60 per bedrijf, in de analyse gepoold tot 10 monsters) en stof (5 monsters per bedrijf, individueel geanalyseerd) bemonsterd op 202 varkensbedrijven waarvan 171 bedrijven met zeugen en 31 bedrijven zonder zeugen. De analyse van de enquêtegegevens voor de identificatie van risicofactoren heeft plaatsgevonden met de gegevens van 171 zeugenbedrijven.

Van de bedrijven zonder zeugen had 71% positieve dier- en/of stofmonsters. Op bedrijven met zeugen was dit 67,8%. Van de isolaten behoorde 98% tot ST398. Als risicofactoren zijn geïdentificeerd: bedrijfsgrootte (aantal zeugen) en verloop in de tijd (maand). Van de kleine bedrijven (<250 zeugen) was 40% MRSA-positief terwijl van de grote bedrijven (>500 zeugen) 80% MRSA-positief was. Het percentage positieve bedrijven nam toe over de tijd: van 30% (begin 2007) tot 75% (eind 2008). Andere factoren, zoals de aanwezigheid van vleesvarkens, de aanvoer van gelten en de hygiënescore, bleken niet statistisch significant maar waren wel geassocieerd met de bedrijfsgrootte. De toepassing van antibiotica was eveneens geassocieerd met de bedrijfsgrootte. Bedrijven die antibiotica preventief toepassen (ter voorkoming van ziekte, vaak op vaste momenten) zijn gemiddeld groter dan bedrijven die antibiotica curatief toepassen (ter behandeling van ziekte) en veel groter dan bedrijven die geen antibioticum toepassen. De factor bedrijfsgrootte is hiermee een verzameling van allerlei (risico)factoren waardoor grotere bedrijven vaker MRSA-positief zijn.

#### *Prevalentieschatting en risicofactorenanalyse bij varkenshouders*

De analyse van de humane gegevens was gebaseerd op 232 personen. De MRSA-prevalentie bij personen woonachtig en/of werkzaam op varkensbedrijven was 14%, met grote verschillen tussen personen die geen contact hadden met varkens (2%) en personen die intensief contact hadden met varkens (29%). Dit is vele malen hoger dan de nationale achtergrondprevalentie (0,03%). Daarmee bevestigt dit onderzoek dat mensen die werken met varkens een verhoogd risico hebben om MRSA-positief te zijn. Aangezien de MRSA-positieve personen alleen zijn gevonden op MRSA-positieve bedrijven is de meest waarschijnlijke transmissieroute van MRSA die van varkens naar mensen. De mate van contact tussen personen en varkens en de aanwezigheid van zeugen bleken belangrijke risicofactoren. Zeugenhouders hebben over het algemeen meer en intensiever contact met hun varkens, wat een verklaring zou kunnen zijn voor de hogere prevalentie op bedrijven met zeugen. Dat slechts

2% van de personen die geen contact hadden met varkens MRSA-positief bleek te zijn, wijst erop dat de mate van transmissie van MRSA tussen personen laag is.

#### **Transmissie in de varkensproductiepiramide**

Om na te gaan wat de rol is van aanleverende bedrijven in de varkensproductieketen bij MRSA-besmetting van afnemende bedrijven, zijn gegevens geanalyseerd van monsters van 48 bedrijven die deel uitmaakten van 18 ketens. Op 34 bedrijven zijn naast monsters van de varkens ook bedrijfsgegevens verzameld. In 8 ketens testten alle bedrijven MRSA-positief, in 5 ketens testten alle bedrijven MRSA-negatief en in 5 ketens werden MRSA-positieve en -negatieve bedrijven gevonden. Er was een duidelijke associatie tussen de MRSA-status van het aanleverende bedrijf en de MRSA-status van het afnemende bedrijf: 79% van de bedrijven met aanvoer van een MRSA-positief bedrijf was positief tegenover 23% met aanvoer van een MRSA-negatief bedrijf (OR=10,8;  $P=0,011$ ). Van de MRSA-positieve bedrijven wordt 91% toegeschreven aan het feit dat deze bedrijven een MRSA-positieve leverancier hadden.

De resultaten geven aan dat voor beheersing van MRSA een top-downstrategie een belangrijk deel zou moeten uitmaken van de aanpak. Echter, aangezien 23% van de bedrijven met aanvoer van een MRSA-negatief bedrijf toch MRSA-positief is, en daarnaast 46% van de bedrijven zonder aanvoer ook MRSA-positief is bevonden, is onderzoek naar andere risicofactoren voor het voorkomen van MRSA noodzakelijk.

#### **Transmissie tijdens transport en in het slachthuis**

Bij de beheersing van MRSA is het van belang kennis te hebben van de besmetting van dieren op diverse plaatsen in de keten. Niet alleen op de bedrijven in de primaire sector, maar ook tijdens transport naar slachthuis en in de wachtruimte. Daartoe is in dit project aan de hand van 117 slachtvarkens afkomstig van 4 MRSA-negatieve bedrijven, nagegaan of MRSA-negatieve varkens MRSA-besmetting op kunnen lopen tijdens het traject van bedrijf naar steektafel. Aan de hand van neusswabs van deze varkens bij het opladen op het bedrijf, bij het uitladen op het slachthuis en op de steektafel, en met behulp van veegmonsters van de vrachtwagen en van de wachtruimte waarin de varkens verbleven, is bepaald of er transmissie van MRSA plaatsvindt. Alle onderzochte varkens ( $n=117$ ) waren MRSA-negatief bij opladen op het bedrijf. De tijd tussen op- en uitladen varieerde van 2 tot 5 uur. Na transport waren varkens van 2 van de 4 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 binnen enkele uren MRSA-positief kunnen worden in een gecontamineerde omgeving. De gegevens uit deze studie zijn van belang voor de interpretatie van gegevens van de MRSA-status in de keten.

## **2.3 Kalverhouderijen**

#### **Prevalentieschatting bij kalveren en risicofactorenanalyse**

Binnen het kalverproject zijn 102 bedrijven (blankvlees- en rosé vleesbedrijven) bezocht en zijn monsters genomen van een selectie van de dieren ( $\sqrt{n}$  met een maximum van 25) en 5 stofmonsters. Alle monsters zijn individueel geanalyseerd waardoor een schatting gemaakt kon worden van de binnenbedrijfsprevalentie. Er is bij 27,5% van de kalveren MRSA gevonden. MRSA werd gevonden op 88% van de vleeskalverbedrijven. Bij alle bezochte bedrijven is een enquête afgenomen op basis waarvan risicofactoren geïdentificeerd zijn. Er werden significante positieve associaties gevonden tussen de aanwezigheid van MRSA bij kalveren en de leeftijd van de dieren, het aantal kalveren per hok, de aanwezigheid van andere landbouwhuisdieren, toepassing van ratten- en muizenbestrijding en antibioticumgebruik. Significante negatieve associaties (OR's < 1) werden gevonden voor het aantal stallen op het bedrijf en reinigen en desinfecteren van de stallen.

In vergelijking met de varkenshouderij komt er een grotere diversiteit voor aan *spa*-typen in de vleeskalverhouderij, veelal behorend tot CC398. De verklaring hiervoor is waarschijnlijk dat de kalversector geen gesloten sector is en er dieren van vele verschillende bedrijven uit diverse Europese landen bijeengebracht worden. Dit in tegenstelling tot de varkenshouderij waarbij veel gesloten bedrijven voorkomen of slechts aanvoer plaatsvindt van een beperkt aantal bedrijven.

#### **Prevalentieschatting bij vleeskalverhouders en risicofactorenanalyse**

In totaal namen 390 mensen deel aan de studie. Deze groep bestond uit kalverhouders, gezinsleden en medewerkers. De prevalentie van MRSA in deze groep was 16%.

Grote verschillen in prevalentie werden gevonden tussen kalverhouders (33%) en gezinsleden (8%), wat aangeeft dat contact met dieren (en hun omgeving) een belangrijke factor is voor MRSA-besmetting. MRSA-dragerschap komt significant vaker voor bij mannen, personen van hogere leeftijd, personen die meer uren per week werken op de kalverhouderij en bij personen die meer MRSA-positieve kalveren op het bedrijf hebben. Ook hier geeft het verband tussen aantal werkuren per week en MRSA-besmetting aan dat direct contact met dieren en hun omgeving een directe invloed heeft op de MRSA-besmetting.

Parallel aan het MRSA-programma is door het kalverhouderij-projectteam een studie uitgevoerd om de persistentie van het dragerschap bij kalverhouders tijdens een periode van verminderde (of afwezigheid van) blootstelling (de zogenaamde Leegstandstudie) te bepalen. De prevalentie van MRSA-dragerschap blijkt sterk te variëren over de tijd. Vergeleken met de perioden van hoge blootstelling daalt de prevalentie in de perioden van lage blootstelling bij vleeskalverhouders met 16% en bij gezinsleden met 32%. Dit effect is sterker bij mensen die een vakantie genoten (afwezigheid van het bedrijf) dan bij de mensen die tijdens de leegstandperiode op het bedrijf aanwezig bleven. De afname in MRSA-prevalentie lijkt voornamelijk verklaard te worden door de afname in blootstelling als gevolg van de afname van intensiteit van het diercontact in de laag blootgestelde periode.

## 2.4 Pluimveeslachterijen

### *Prevalentieschatting bij pluimvee en in de slachthuisomgeving*

Onderzoek werd uitgevoerd op een zestal grote pluimveeslachterijen, in nauwe samenwerking met de Vereniging van de Nederlandse Pluimveeverwerkende Industrie (NEPLUVI). Koppels vleeskuikens werden onderzocht door het nemen van veegmonsters van de aanvoercontainers en keelwabmonsters van kuikens aan de slachtlijn. In totaal werd 35% van de 40 onderzochte koppels MRSA-positief bevonden op basis van ten minste één MRSA-positieve aanvoercontainer of één positief vleeskuiken. Van de onderzochte vleeskuikens bleek 6,9% MRSA te dragen in de keel. Er werd een toename geconstateerd in het percentage MRSA-positieve omgevingsmonsters gedurende de werkdag. Opmerkelijk is dat naast de isolatie van *spa*-typen behorend tot het veegerelateerde MLST-klonaal complex CC398, *spa*-type t1430 frequent werd geïsoleerd. Dit *spa*-type behoort namelijk tot MLST-type ST9. De onderzoeksresultaten geven aan dat ook binnen de pluimveehouderij MRSA voorkomt.

### *Prevalentieschatting bij slachthuismedewerkers en risicofactorenanalyse*

De overall prevalentie van MRSA bij slachthuismedewerkers was 5,6% (26 van de

466 bemonsterde personen positief), hetgeen duidt op een verhoogd risico van MRSA-dragerschap voor medewerkers van een vleeskuikenslachterij. Dit risico is significant hoger voor medewerkers die contact hebben met levend pluimvee dan voor medewerkers die uitsluitend contact hebben met dood pluimvee of die andere werkzaamheden uitvoeren (MRSA-prevalenties respectievelijk 13,6% en 1,9%). Met name het hangen van de vleeskuikens aan de slachtlijn is geassocieerd met een verhoogd risico van MRSA-dragerschap. Daarnaast hebben medewerkers van een slachterij met conventionele elektrische verdooving een significant hoger risico van MRSA-dragerschap dan medewerkers van een slachterij met CO<sub>2</sub>-verdooving.

## 2.5 Melkvee

Bij melkvee is geen prevalentiestudie uitgevoerd omdat eerst de juiste matrix voor monsternamen geïdentificeerd moest worden. Hierbij bleek dat een veegmonster van de huid tussen uier en schenkel een goede matrix was. Om de prevalentie te schatten zal een onderzoek uitgevoerd moeten worden op basis van de voorgestelde matrix.

Er zijn in het melkvee-project geen gegevens verzameld over humane besmettingen veroorzaakt door contact met MRSA-positieve dieren.

## 2.6 Stof als indicator van bedrijfsstatus en als vector voor transmissie

Naar analogie met de situatie bij de mens is het te verwachten dat stofdeeltjes beladen met MRSA een rol zullen spelen bij de overdracht van MRSA tussen dieren en van dier naar de mens. Het doel van dit project was om de hoeveelheid MRSA in stof te bepalen en na te gaan of stofbemonsteringen een betrouwbare indicatie geven van de bedrijfsstatus.

Stofmonsters op bedrijven lijken een redelijke indicator te zijn van de status van het vleeskalverbedrijf. Incidenteel zijn hierop uitzonderingen (stof MRSA-positief en dieren MRSA-negatief en vice versa). Er zijn verschillende meettechnieken gebruikt om de hoeveelheid MRSA in de lucht te kwantificeren. Via kweek bleek dit 8 tot 800 CFU MRSA per m<sup>3</sup> lucht te zijn. Met moleculaire methoden (qPCR) lijkt de hoeveelheid MRSA in de lucht echter 10-100 maal zo hoog te liggen. Dit verschil wordt mogelijk veroorzaakt door de aanwezigheid van DNA van dode MRSA-bacteriën op stofdeeltjes, of doordat tijdens de luchtbemonsteringen de MRSA-bacteriën gedood worden. Ter vergelijking: eerdere studies op varkensbedrijven toonden aan dat het totaal aantal bacteriën rond 10<sup>5</sup> per m<sup>3</sup> lucht was en de Gram-negatieve bacteriën rond 8.10<sup>3</sup> per m<sup>3</sup> lucht. De ontwikkelde kwantitatieve methoden kunnen in de toekomst gebruikt worden als in MRSA-

beheersingsprogramma's kwantitatieve bepalingen benodigd zijn. De relatie tussen de hoeveelheid MRSA in de lucht en de overdracht naar de mens wordt op dit moment bepaald in een Senter-project (Bactopath).

## 2.7 Voorkomen van MRSA in voedingsmiddelen

Monsters onverhit rundvlees, kalfsvlees, varkensvlees, lams- en schapenvlees, kip, kalkoen, overig gevogelte en wild werden gedurende een jaar genomen in de detailhandel. MRSA werd geïsoleerd uit 11,9% van de onderzochte vleesmonsters. De prevalentiecijfers voor de verschillende vleessoorten waren: rundvlees (10,6%), kalfsvlees (15,2%), lams- en schapenvlees (6,2%), varkensvlees (10,7%), kip (16,0%), kalkoen (35,3%), overig gevogelte (3,4%) en wild (2,2%). Bij tellingen van MRSA in 75 MRSA-positieve monsters bleek het MRSA-kiemgetal in alle gevallen kleiner dan 10 kve/g vlees (directe tellingen negatief, MRSA alleen na ophoping geïsoleerd). De uit de verschillende vleessoorten geïsoleerde MRSA-stammen behoorden grotendeels (85%) tot *spa*-typen die gerelateerd zijn aan het veegerelateerde MLST-type ST398, terwijl in pluimveevlees het veegerelateerde type ST9 is aangetroffen. Een niet te verwaarlozen gedeelte (13%) van de stammen waarop *spa*-typering is uitgevoerd, behoorde tot *spa*-typen die tot nu toe niet veegerelateerd zijn en mogelijk van humane herkomst zijn.

Op basis van de bevindingen in dit project en epidemiologische gegevens, is door het Bureau Risicobeoordeling (BuR) van de VWA geconcludeerd dat levensmiddelen geen of een verwaarloosbare rol spelen bij de verspreiding van MRSA onder de bevolking.

## 2.8 MRSA-types bij dier, product en mens

Uit de typering van de stammen blijkt dat het overgrote deel van de isolaten afkomstig uit landbouwhuisdieren en van vlees sequence type (ST) 398 betreft, dat behoort tot klonaal complex (CC) 398. Dit is de kloon die, ook internationaal, gerelateerd is aan de veehouderij. Er zijn echter ook andere ST's gevonden die volgens gegevens uit andere onderzoeken meer geassocieerd zijn met voorkomen bij de mens ('humane MRSA-types'). Deze zijn slechts tweemaal aangetroffen in de varkenshouderij. Binnen de kalverhouderij is dit op vier bedrijven het geval. Van de isolaten uit pluimvee was 20% *spa*-type 1430 dat behoort tot ST9. We zien dit ook terug in de vleesmonsters, waarbij in de pluimveemonsters ook dit andere type is aangetoond.

Voor alle niet-humane *spa*-typen waarvan het MLST-type niet bekend was, is van ten minste één isolaat een MLST-typering uitgevoerd.

## 2.9 Antimicrobiële gevoeligheid van de MRSA-isolaten

Vanuit alle projecten is van een representatieve set van isolaten een gevoeligheidsbepaling uitgevoerd. Bijna alle isolaten waren, zoals verwacht, resistent tegen tetracycline, wat kenmerkend is voor MRSA ST398. In vleesproducten en pluimvee werden ook tetracycline-gevoelige varianten gevonden; deze konden vrijwel allemaal geassocieerd worden met een bepaald *spa*-type dat niet behoort tot ST398. Deze niet-ST398-isolaten waren ook veelal resistent tegen fluoroquinolonen (ciprofloxacine). Er was ook veel resistentie tegen erythromycine en clindamycine (> 60%), gentamicine en neomycine (variërend van 10 – 57%; deze resistentie komt relatief meer voor in vleeskalveren) en ciprofloxacine (10 – 45%). Resistentie tegen trimethoprim/sulfa (TMP/S) kwam weinig voor, ondanks het feit dat dit middel veel therapeutisch gebruikt wordt in de dierhouderij. Resistentie tegen TMP/S treedt echter pas op als stammen een combinatie van resistentiegenen hebben. Resistentie tegen de in de humane geneeskunde belangrijke antibiotica mupirocine, fusidinezuur en rifampicine werd slechts zelden of niet gezien. Vancomycine-resistentie werd niet aangetoond.

De gegevens uit deze studie zijn van belang voor het signaleren van trends en het geven van een therapeutisch advies.

## 2.10 Genetische karakterisatie van MRSA ST398

Om meer kennis te verkrijgen van de genetische achtergrond van MRSA ST398 zijn stammen geanalyseerd met behulp van microarray, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) en DNA-sequencing-technieken. Uit de resultaten blijkt dat er ten minste twee op gen-niveau verschillende varianten van ST398 voorkomen. *Spa*-sequencing van 70 ST398-stammen liet zien dat drie aparte fylogenetische lijnen aangetoond kunnen worden. Deze lijnen zijn onafhankelijk van elkaar ontstaan, dat wil zeggen dat op ten minste drie onafhankelijk momenten MRSA-varianten zijn ontstaan uit tevoren gevoelige stammen van type ST 398. Op basis van de genomsequentie blijken er duidelijke verschillen te zijn tussen ST398 en andere stafylokokken, hetgeen ook volgde uit de AFLP-analyse. Er zijn met name aanzienlijke verschillen met humane *S. aureus* genotypen. AFLP-onderzoek toonde aan dat ook meticilline-gevoelige ST398 bij mensen kunnen circuleren, al is het in lage frequentie. Bekende virulentiefactoren van *S. aureus* zoals PVL (Panton-Valentine Leucocidine) en exotoxines zijn niet aangetoond in ST398.

### 3. Discussie

Uit de resultaten van het MRSA-programma blijkt dat LA-MRSA wijd verspreid voorkomt in intensief gehouden vleesproducerende dieren in Nederland. Dit is gebaseerd op prevalentieschattingen bij varkens en vleeskalveren op de primaire bedrijven en bij vleeskuikens die werden aangevoerd op de slachterij. Bij extensief gehouden productiedieren is nog geen onderzoek uitgevoerd.

Het is onbekend wanneer de introductie van de kloon in de veehouderij heeft plaatsgevonden. Het RIVM heeft ST398 in 2003 voor het eerst in de humane MRSA-surveillance aangetroffen. Het is aannemelijk dat ST398 voor die tijd niet op grote schaal aanwezig was in de dierpopulaties. Een tweede indicatie voor recente introductie is dat in het varkensprevalentieproject een duidelijk trend is gezien van toename in prevalentie over de tijd en dat er dus gemeten is ten tijde van spreiding van de kloon. Hoewel de kloon voor het eerst in Nederland is beschreven, kan de kloon elders in een dierpopulatie ontstaan of geïntroduceerd zijn en via diertransport in Nederland binnengekomen zijn. Binnen welke diersector de verspreiding is gestart is onbekend. Genetische vergelijking van stammen suggereert dat er meerdere varianten onafhankelijk van elkaar zijn ontstaan die echter wel allemaal behoren tot ST398.

LA-MRSA ST398 is inmiddels beschreven in diverse Europese landen (onder meer in België, Duitsland, Denemarken) en in de VS en Canada. Het is duidelijk niet een exclusief Nederlands probleem. In 2008 is, parallel aan de EU-baseline survey naar *Salmonella* in fok- en vermeerderingsvarkens, een baseline survey naar MRSA uitgevoerd. De analyse van deze gegevens vindt nu plaats bij de EFSA en zal in 2010 gepubliceerd worden. Dan zal blijken hoe op dat moment de verspreiding binnen Europa was. Hierbij dient opgemerkt te worden dat in de EU baseline survey met een minder gevoelige methode is getest, waardoor sprake is van een sterke onderschatting van prevalenties.

Het probleem van MRSA in de veehouderijsector beperkt zich op dit moment tot specifieke groepen: mensen die werken met varkens of vleeskalveren. Zij hebben een duidelijk verhoogd risico op MRSA-dragerschap. Bovendien is op de primaire bedrijven gebleken dat hoe intensiever en langer het diercontact is, hoe groter het risico is. Als de blootstelling weggenomen wordt is er een sterke reductie van dragerschap. Hoewel stammen behorend tot ST398, zowel MSSA als MRSA, in staat zijn klinische infecties bij de mens te veroorzaken, is de kans dat ST398 tot gezondheidsproblemen zal leiden niet groot. Tot nu toe zijn er geen aanwijzingen dat ST398-stammen een afwijkend ziekteverwekkend vermogen hebben in vergelijking met andere MRSA-stammen.

Dragerschap van *S. aureus* houdt een risico in voor infecties met de eigen stam (auto-infectie of endogene infectie). Met name bij verwondingen van huid of slijmvliezen is de kans op *S. aureus*-infectie bij dragers 5-10 maal groter dan bij niet-dragers. Bij opname in het ziekenhuis is *S. aureus*-dragerschap een risicofactor voor het ontstaan van een ziekenhuisinfectie, bijvoorbeeld een wondinfectie na een operatie. Er zijn gevallen beschreven van infecties met ST398 binnen en buiten het ziekenhuis. Er zijn echter niet op grote schaal klinische problemen gesignaleerd bij veehouders na de (veronderstelde recente) introductie van MRSA ST398 in die groep. Naast het risico voor de individuele drager is er het risico voor introductie en verspreiding van MRSA in het ziekenhuis. Hoewel er een kleine uitbraak met ST398 is beschreven, geeft een inventariserende studie van het UMCU aan dat de kans op verspreiding van ST398 in vergelijking met 'humane MRSA' gering is. Omdat MRSA ST398 in vergelijking met HA-MRSA, niet efficiënt van mens op mens over blijkt te gaan, wordt de MRSA-richtlijn van de WIP in sommige ziekenhuizen minder strikt gehanteerd dan direct na de aanpassing van de richtlijn, met name als het gaat om polikliniekbezoek. Het spreekt voor zich dat voor individuele personen het dragerschap met ST398 erg vervelend is (stigma) in verband met de infectiepreventiemaatregelen in de ziekenhuizen.

Het is duidelijk dat het probleem van LA-MRSA door verschillende landen verschillend wordt ervaren: landen die een hoge prevalentie hebben van humane MRSA in ziekenhuizen zien de LA-MRSA minder als een bedreiging dan landen die een lage prevalentie van humane MRSA hebben in ziekenhuizen door het handhaven van een strikt 'search and destroy'-beleid. Nederland behoort wereldwijd tot de landen met een van de laagste MRSA-prevalenties en dit is de reden dat beheersing van MRSA ST398 in Nederland als een (kostbaar) aspect van de gezondheidszorg wordt gezien.

Op slachthuisniveau is de prevalentie van vleeskuikenkoppels 35% en slachthuismedewerkers hebben een verhoogd risico om MRSA-positief te worden, met name personen in contact met levend pluimvee. Dit komt overeen met de resultaten van een separate studie waaruit bleek dat medewerkers van varkensslachterijen in contact met levende varkens eveneens een verhoogd risico van MRSA-dragerschap hebben. In hoeverre pluimveehouders toegevoegd moeten worden aan de risicogroepen is vooralsnog onduidelijk: tot op heden is het aantal MRSA-positieve pluimveehouders dat in de screening is gevonden beperkt. Hier kunnen verschillende redenen aan ten grondslag liggen: omdat er geen beleid is om pluimveehouders gericht te screenen zal dit op toeval berusten en kunnen besmettingen enige

tijd onder de oppervlakte blijven. Ook is het aantal pluimveehouders beduidend kleiner dan bijvoorbeeld het aantal varkenshouders. Vervolgonderzoek op pluimveebedrijven naar de prevalentie van MRSA bij dieren en medewerkers en naar risicofactoren zal hier uitsluitel over moeten geven. Overigens is in België MRSA ook op pluimveebedrijven aangetoond, waarbij het dan alleen ST398 betrof, in tegenstelling tot de Nederlandse studie waarin ook frequent ST9 is aangetoond in pluimveeslachthuizen.

De reden dat juist ST398 zo'n brede verspreiding heeft in met name varkens en vleeskalveren is onduidelijk, maar kan onder meer samenhangen met factoren die de gastheerspecificiteit bepalen. In Azië is een ander type (ST9) door verschillende groepen gerapporteerd in de varkenspopulatie (China en Maleisië). ST9 (als MSSA) is bekend als kolonisor van varkens en de mens.

In een door het Productschap Zuivel gefinancierd onderzoek naar de prevalentie van MRSA bij melkvee (op basis van melkmonsters) is een bedrijfsprevalentie van 2% gevonden (1-3 MRSA-positieve dieren per bedrijf). Een prevalentiestudie in andere matrices is bij volwassen runderen nog niet uitgevoerd. Op basis van bevindingen in het matricesonderzoek dat in het kader van het MRSA-convenant is uitgevoerd, is echter niet te verwachten dat deze prevalentie veel hoger is dan die in melk. Bij de positief bevonden rundveebedrijven lijkt er een associatie te zijn met intensief gehouden varkens op dezelfde bedrijven. Er is hier mogelijk sprake van een overloop vanuit het varkensreservoir. Eenzelfde situatie wordt in de paardenhouderij gesignaleerd, waarbij ST398 geregeld bij paarden aangetroffen wordt terwijl bij paarden 'van nature' een ander ST (ST8) voorkomt.

Naast het directe contact met dieren is er een blootstelling via besmet onverhit vlees, maar de aantallen bacteriën zijn daarbij zeer laag. Het Bureau Risicobeoordeling van de VWA heeft geconcludeerd dat levensmiddelen geen of een verwaarloosbare rol spelen bij de verspreiding van MRSA onder de bevolking. Dit geldt voor LA-MRSA CC398 in zijn huidige vorm. De EFSA heeft in haar *scientific opinion* echter ook al aangegeven dat er een potentieel risico is als CC398 meer virulent wordt of de eigenschap verwerft om gemakkelijker te gaan spreiden binnen de humane populatie. Daarnaast worden in verschillende mate ook 'humane' MRSA's gevonden in de diersectoren en in vleesproducten. Het feit dat deze 'humane' typen als zodanig gedefinieerd zijn, geeft aan dat deze, waarschijnlijk los van het dierreservoir, in mensen voorkomen. Een gedegen inschatting van het risico van het voorkomen van deze typen is nodig, waarbij onder meer persistentie van dragerschap, mate van mens-mensoverdracht, virulentie en risico van voedselbesmetting in de risicobeoordeling meegenomen moeten worden.

Voor twee sectoren (zeugenhouderij en vleeskalverhouderij) is een risicofactorenanalyse uitgevoerd. Bij de zeugenhouderij blijkt bedrijfsgrootte een belangrijke factor: grotere zeugenbedrijven zijn vaker MRSA-positief dan kleine zeugenbedrijven. Bedrijfsgrootte is geassocieerd met meerdere factoren zoals onder andere de toepassing van antibiotica, de aanvoer van gelten en het bedrijfstype (fokbedrijven of vermeerderingsbedrijven). Bedrijven die antibiotica preventief gebruiken (ter voorkoming van ziekte, vaak op vaste momenten) zijn gemiddeld groter dan bedrijven die antibiotica curatief (ter behandeling van ziekte) toepassen en veel groter dan bedrijven die geen antibiotica gebruiken. De factor 'bedrijfsgrootte' is hiermee een verzameling van allerlei (risico)factoren, inclusief antibioticumgebruik, waardoor grotere bedrijven vaker MRSA-positief zijn.

Bij de vleeskalverhouderij zijn, naast bedrijfsfactoren, koppelbehandelingen met antibiotica positief gecorreleerd met het voorkomen van MRSA. Uitgevoerde reiniging en desinfectie in de leegstand zijn geassocieerd met een lagere MRSA-prevalentie. Het identificeren van risicofactoren in een dwarsdoorsnedestudie kan echter alleen aangeven dat er een significante associatie is tussen bepaalde bedrijfsfactoren en MRSA-prevalentie. Voor zowel de varkenssector als de vleeskalversector moet echter het verband tussen factoren en MRSA-prevalentie bevestigd worden in een longitudinale studie. In de pluimveehouderij heeft nog geen risicofactorenanalyse plaatsgevonden. Resultaten uit deze longitudinale studies moeten mede de strategie bepalen voor de aanpak en beheersing van het MRSA-probleem.

De resultaten van het onderzoeksprogramma geven duidelijke aanknopingspunten voor de beheersing van MRSA: kritische beschouwing van antibioticumgebruik en van dierstromen binnen productieketens, en gedegen reiniging en desinfectie. Om de effectiviteit van beheersing via deze factoren te bepalen is longitudinaal onderzoek noodzakelijk.

## 4. Conclusies

Concluderend kan worden gesteld dat MRSA wijdverspreid voorkomt in de Nederlandse intensieve veehouderij en dat Nederland hierin niet uniek is. De MRSA-kloon die op dit moment het MRSA-probleem bepaalt is ST398, een type dat zich goed kan verspreiden en handhaven in dierpopulaties. Een verhoogd risico van MRSA-dragerschap is op dit moment in de veehouderij vastgesteld bij een specifieke groep mensen, namelijk personen werkzaam met varkens of vleeskalveren. Het risico van dragerschap neemt toe bij langer en intensiever contact met de dieren. Ook medewerkers van vleeskuikenslachterijen hebben een verhoogd risico, met name personen in contact met levend pluimvee. Analyse van risicofactoren op vleeskalverhouderijen geeft aan dat gebruik van antibiotica en enkele andere bedrijfsfactoren risicofactoren zijn. Op zeugenbedrijven kwam antibioticumgebruik er niet significant uit omdat dit geassocieerd was met bedrijfsgrootte en het is dan ook onduidelijk hoeveel deze factor bijdraagt aan de MRSA-besmetting op bedrijven. Verdere identificatie van risicofactoren zal plaatsvinden in longitudinale studies in de varkens- en vleeskalverhouderij die op dit moment worden uitgevoerd. In deze studies worden waar mogelijk interventies toegepast op bedrijven. Het doel van deze interventies is het terugdringen van de prevalentie en/of de kwantiteit van MRSA. Het risico voor de volksgezondheid schuilt op dit moment in het feit dat ST398 zou kunnen veranderen in een meer virulente en/of aan de mens geadapteerde variant. Daar zijn op dit moment overigens geen aanwijzingen voor.





## 5. Aanbevelingen

### *Detectie, typering, karakterisering*

- Nieuwe detectiemethoden moeten worden geëvalueerd. Deze moeten niet alleen gericht zijn op ST398, maar een breed diagnostisch spectrum hebben. De sensitiviteit van de analysemethoden moet worden bepaald.
- In aanvulling op diagnostiek in dierlijke matrices en omgevingsmonsters is het van belang om een goede indicatie te krijgen van de hoeveelheid levensvatbare MRSA in luchtmonsters. Bepaling van MRSA in luchtmonsters is van belang voor het vaststellen van effectiviteit van interventie maatregelen.
- Het is van belang om LA-MRSA op te nemen in surveillance-programma's zodat trends in prevalentie (en mogelijk virulentie) bij dier, voedingsmiddelen en de mens gevolgd kunnen worden en daarmee ook het effect van maatregelen gemeten kan worden.

### *Gastheerspecificiteit, virulentie*

- Onderzoek is noodzakelijk om meer inzicht te krijgen in de gastheerspecificiteit van MRSA en MSSA en hun interactie.
- Onderzoek naar de specifieke immuniteit van dieren tegen MRSA-kolonisatie kan inzicht geven of immuniteit preventief zou kunnen werken.
- Er is nader onderzoek noodzakelijk naar het ziekteverwekkend vermogen van ST398 bij de mens.

### *Varkenshouderij*

- Op bedrijfsniveau is onderzoek noodzakelijk naar de prevalentie en de verspreiding van MRSA binnen een bedrijf, om te komen tot effectieve interventie maatregelen. Longitudinaal onderzoek op varkensbedrijven kan informatie opleveren over transmissieroutes en - 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.
- In experimenteel onderzoek zal gemakkelijker het effect van een enkele factor of interventie maatregel getoetst kunnen worden.
- Resultaten uit dit onderzoek pleiten voor een top-downstrategie. Mogelijkheden voor het MRSA-vrij worden en blijven van (top)fokbedrijven vergen nader onderzoek.

### *Vleeskalverhouderij*

- Inzicht in de dynamiek van spreiding en overdracht van MRSA bij zowel mensen als dieren is van groot belang voor optimale ontwikkeling van richtlijnen en het formuleren van aanbevelingen. Dit kan alleen worden vastgesteld met behulp van longitudinaal

onderzoek, waarbij herhalingsmetingen worden uitgevoerd.

- Gebaseerd op de onderzoeksresultaten lijkt het raadzaam om het antibioticumgebruik van de kalveren te beperken en de hygiëne van de stallen te waarborgen. Parallel aan het doorvoeren van deze maatregelen zullen deze associaties in een longitudinaal onderzoek bevestigd worden, al of niet aangevuld met gecontroleerde andere interventies. Daarnaast suggereren deze resultaten dat het risico van MRSA wordt verkleind door de dieren in niet al te grote groepen te huisvesten en waar mogelijk over meerdere stallen te verdelen.

### *Vleeskuikenhouderij*

- De onderzoeksresultaten van het pluimveeproject tonen aan dat met name slachthuismedewerkers in contact met levend pluimvee een verhoogd risico hebben van MRSA-dragerschap. Aangezien in de vleeskuikenhouderij een grotere groep mensen - waaronder vleeskuikenhouders, gezinsleden en werknemers - contact heeft met levend pluimvee, is vervolgonderzoek in deze sector noodzakelijk. Dergelijk onderzoek kan tevens inzicht opleveren in risicofactoren voor besmetting van pluimvee en kan daarmee handvatten verstrekken voor interventie.

### *Melkvee*

- Er dient een prevalentieschatting van MRSA bij melkvee uitgevoerd te worden op basis van huidveegmonsters.

### *Producten van dierlijke oorsprong*

- De relatieve bijdrage aan de besmetting van producten via dragerschap bij verwerkers van producten, moet nader worden onderzocht.

### *Overig*

- Onderzoek naar de effectiviteit van persoonlijke beschermingsmiddelen voor de mens (mondkapjes et cetera) is noodzakelijk.
- Onderzoek naar het effect van reinigings- en desinfectieprotocollen op MRSA is noodzakelijk.



---

## APPENDIX 1

### Project 2: communicatie en voorlichting belanghebbenden

#### Projectleider

W.J.G. Ransz, Landelijke Coördinatie  
Infectieziektebestrijding, Cib-RIVM.

#### Samenwerking

Binnen dit project is samengewerkt met de Directie  
Communicatie van het ministerie van LNV.  
Bovendien is het communicatieplan besproken in de  
Begeleidingscommissie en hebben alle consortiumleden  
input kunnen leveren.

#### Samenvatting

Het doel van het communicatietraject is een zorgvuldige  
coördinatie van de informatievoorziening inzake het  
MRSA-onderzoek, voor zover het dit onderzoeks-  
programma betreft, aan alle belanghebbenden in  
het veterinaire en humane veld en aan de pers. Het  
gemeenschappelijke belang van alle betrokken partijen  
is om te komen tot een goed en volledig beeld van  
de MRSA-problematiek in Nederland en daar op een  
verantwoorde en haalbare wijze het beleid gericht  
op beheersing en preventie op af te stemmen. Het  
ministerie van LNV wil met het financieren van  
dit onderzoeksprogramma laten zien dat zij haar  
verantwoordelijkheid hiervoor neemt.

Direct betrokkenen moeten weten wat er binnen het  
onderzoek gebeurt. Het communicatieproject was erop  
gericht om de resultaten van het onderzoeksprogramma en  
de boodschap over de MRSA-problematiek op een open  
en voor de doelgroepen geschikte manier te presenteren.  
Daarbij is speciale aandacht geschonken aan de tijdigheid  
en volgorde van informatievoorziening.

#### Resultaten

In maart 2007 organiseerde het ministerie van  
LNV een startbijeenkomst als kick-off van het  
onderzoeksprogramma. Het Cib-RIVM en de FD hebben  
actief bijdragen geleverd aan de startbijeenkomst. De  
bijeenkomst was bedoeld voor alle betrokken partijen en  
belangstellenden.

In een communicatieplan is omschreven hoe  
de informatievoorziening vanuit en binnen het  
onderzoeksprogramma verloopt. Vooral de volgorde van  
informatievoorziening was daarbij van belang.  
Eind 2009 zal een afsluitend symposium plaatsvinden.  
Tijdens die dag worden de resultaten van het  
onderzoeksprogramma gepresenteerd waarbij veterinaire  
en humane aspecten in hun samenhang aan de orde  
komen.

## APPENDIX 2

### Project 4: harmonisatie en optimalisering van de detectie van MRSA

#### Projectleider

E. van Duijkeren, Departement Infectieziekten en Immunologie, FD.

#### Projectteam

H. Graveland, I.J. Oosting-van Schothorst en D.J.J. Heederik: IRAS.

A.H.W. Schoormans en M.J. Broekhuizen-Stins: Departement Infectieziekten en Immunologie, FD.

A. van Nes: Departement Landbouwhuisdieren, FD.

J.A. Wagenaar: Departement Infectieziekten en Immunologie, FD en CVI-WUR.

#### Samenwerking

In eerste instantie is er een inventarisatie gemaakt van alle methoden die door de leden van de SOM worden gebruikt voor de kweek van MRSA. Hieruit zijn drie methoden gekozen voor dit onderzoek.

#### Samenvatting

Sinds de opkomst van MRSA bij landbouwhuisdieren worden veel dieren onderzocht op MRSA-dragerschap. Er worden verschillende kweekmethoden gebruikt, maar tot nu toe is er geen vergelijkend onderzoek gedaan om vast te stellen welke methode de beste is voor het 'screenen' van monsters van landbouwhuisdieren. De doelstelling van dit onderzoek was om drie veelgebruikte kweekmethoden met elkaar te vergelijken. Neusswabs afkomstig van varkens (n=70) en kalveren (n=100) werden met alle drie methoden onderzocht. Bij methode 1 en 2 wordt een voorophoping met een hoge zoutconcentratie (6,5%) gevolgd door een selectieve ophoping met de antibiotica oxacilline + aztreonam (methode 1) of ceftizoxime + aztreonam (methode 2). Bij methode 3 wordt alleen de selectieve ophoping met 4% zout en ceftizoxime + aztreonam gebruikt. Na de selectieve voorophoping worden alle buizen afgeënt op drie verschillende chromogene agars. Met de methoden 1 en 2 (met hoge zoutvoorophoping) werden zowel voor monsters afkomstig van varkens als voor monsters afkomstig van kalveren significant meer MRSA-positieve monsters gevonden. Er was geen significant verschil tussen de methoden 1 en 2. Bij neusmonsters van varkens werden meer MRSA-positieve monsters gevonden met chromogene agars MRSA Screen (Oxoid) of MRSA Select (Bio-Rad) in vergelijking met MSRA ID (bioMérieux), terwijl er bij de monsters afkomstig van kalveren geen verschil werd gevonden tussen de verschillende chromogene agars. Samenvattend concluderen wij dat methode 1 en 2, beide met een voorophoping met een hoge zoutconcentratie, beter voldoen en deze twee methoden worden voor toekomstige

studies naar MRSA in neusmonsters van varkens en kalveren aanbevolen. De beste chromogene agar is afhankelijk van het type monster.

#### Summary

Since the emergence of MRSA in livestock, screening of animals for the detection of MRSA is widely practiced. Different procedures are published for animal samples but a systematic comparison of methods has not been performed. The objective of this study was to compare three available commonly used procedures and three chromogenic agars for detecting MRSA in nasal swabs from pigs (n=70) and veal calves (n=100). Procedures 1 and 2 used a pre-enrichment comprising Mueller Hinton broth with 6.5% NaCl followed by selective enrichment with oxacillin + aztreonam (procedure 1) and ceftizoxime + aztreonam (procedure 2), respectively. Procedure 3 used a selective enrichment broth only, containing 4% NaCl, ceftizoxime + aztreonam. After selective enrichment, media were streaked on to three different chromogenic agars. Significantly more MRSA-positive samples were found for pig as well as for veal calf samples with procedures 1 and 2. No significant differences were found between procedures 1 and 2. For nasal swabs from pigs significantly more MRSA-positive samples were found when MRSA Screen (Oxoid) or MRSA Select (Bio-Rad) agars were used compared to MSRA ID (bioMérieux). For calf samples no significant differences between the different agars were found. In conclusion, the results of this study show that procedures 1 and 2, both using additional high salt pre-enrichment are superior and should be recommended for MRSA detection in nasal swabs from pigs and veal calves. The preferred choice of chromogenic agar depends on the sample matrix.

#### Inleiding

In de humane geneeskunde is uit onderzoek gebleken dat de verschillende methoden, die gebruikt worden voor de kweek van MRSA, invloed hebben op de uitkomst (Brown et al., 2005). Voor monsters afkomstig van dieren is weinig bekend over de optimale kweektechniek. In de neus van dieren is meer storende flora aanwezig dan in de neus van mensen. Voorophoping met een hoge zoutconcentratie kan deze storende flora remmen in de groei. Omdat bij landbouwhuisdieren een specifieke MRSA-kloon ST398 een grote rol speelt en de beste kweektechniek mede afhankelijk is van de meest voorkomende MRSA-soort, hebben wij onderzocht welke van de drie veelgebruikte kweektechnieken de beste is voor neusmonsters afkomstig van varkens en kalveren.

### Materiaal en methoden

Neusswabs afkomstig van 70 varkens en 100 kalveren werden met drie methoden onderzocht. Bij methode 1 en 2 wordt een voorophoping met een hoge zoutconcentratie (6,5%) gevolgd door een selectieve ophoping met de antibiotica oxacilline + aztreonam (methode 1) of ceftizoxime + aztreonam (methode 2). Bij methode 3 wordt alleen de selectieve ophoping met 4% zout en ceftizoxime + aztreonam gebruikt. Na de selectieve voorophoping worden alle buizen afgeënt op drie verschillende chromogene agars: MRSA Screen (Oxoid), MRSA Select (Bio-Rad) en MSRA ID (bioMérieux).

### Resultaten

Met de methoden 1 en 2 (met hoge zoutvoorophoping) werden zowel voor monsters afkomstig van varkens (Tabel A2.1) als voor monsters afkomstig van kalveren (Tabel A2.2) significant meer MRSA-positieve monsters gevonden. Er was geen significant verschil tussen de methoden 1 en 2. Bij neusmonsters van varkens werden meer MRSA-positieve monsters gevonden met de chromogene agars MRSA Screen (Oxoid) of MRSA Select (Bio-Rad) in vergelijking met MSRA ID (bioMérieux), terwijl er bij de monsters afkomstig van kalveren geen verschil werd gevonden tussen de verschillende chromogene agars.

### Discussie

Onze resultaten laten zien dat voorophoping met 6,5% zout een hoger aantal MRSA-positieve neusmonsters van

varkens en kalveren gaf dan een vergelijkbare methode zonder deze voorophoping. Dit komt overeen met twee onderzoeken uit de humane geneeskunde: voorophoping met zout gaf ook in monsters van mensen een grotere opbrengst van MRSA (Gardam et al., 2001; Safdar et al., 2003). De hoge zoutconcentratie remt de groei van contaminanten en de meeste stafylokokken kunnen groeien bij hoge zoutconcentraties. Er zijn echter ook MRSA-soorten die niet groeien bij hoge zoutconcentraties (Jones et al., 1997). De MRST ST398, de meest voorkomende MRSA bij landbouwhuisdieren in Europa, Canada en de Verenigde Staten, blijkt echter goed bestand tegen deze hoge zoutconcentratie. Bij methode 3 wordt 4% zout gecombineerd met de antibiotica ceftizoxime + aztreonam. Mogelijk is 4% zout onvoldoende om de groei van contaminanten te remmen. Ook kan het zijn dat een zoutconcentratie van 4% in combinatie met de twee antibiotica in dezelfde stap remmend werkt op de groei van MRSA ST398. In ieder geval lijkt methode 3 ongeschikt voor screening van varkens en kalveren op MRSA.

### Aanbevelingen

Wij stellen vast dat methode 1 en 2, beide met een voorophoping met een hoge zoutconcentratie, gevoeliger zijn dan een methode zonder een dergelijke voorophoping. Methode 1 en 2 worden voor toekomstige studies naar MRSA in neusmonsters van varkens en kalveren aanbevolen.

Tabel A2.1 MRSA-positieve monsters met de drie verschillende kweekmethoden bij monsters afkomstig van varkens

varkens (n = 70)			
	MRSA Screen (Oxoid)	MRSASelect™ (Bio-Rad)	MRSA ID* (bioMérieux)
methode 1	46 (66%)	40 (57%)	36 (51%)
methode 2	44 (63%)	46 (66%)	32 (46%)
methode 3*	32 (46%)	27 (39%)	21 (30%)

\*P < 0,005

Tabel A2.2 MRSA-positieve monsters met de drie verschillende kweekmethoden bij monsters afkomstig van vleeskalveren

Kalveren (n = 100)			
	MRSA Screen (Oxoid)	MRSA Select™ (Bio-Rad)	MRSA ID (bioMérieux)
methode 1	21 (21%)	22 (22%)	23 (23%)
methode 2	29 (29%)	27 (27%)	31 (31%)
methode 3*	15 (15%)	14 (14%)	12 (12%)

\* P < 0,005

### Gerelateerde projecten

Dit project is gerelateerd aan alle andere projecten waarbij MRSA gekweekt wordt, omdat de techniek die daarbij wordt toegepast van grote invloed is op het resultaat. Indien men de resultaten van MRSA-prevalentiestudies met elkaar wil vergelijken, dan kan dat alleen als dezelfde kweekmethode is gebruikt.

### Output

Graveland H, van Duijkeren E, van Nes A, Schoormans A, Broekhuizen-Stins M, Schothorst IO, Heederik D, Wagenaar JA. 2009. Evaluation of isolation procedures and chromogenic agar media for the detection of MRSA in nasal swabs from pigs and veal calves. *Vet Microbiol.* 139:121-125.

Broekhuizen-Stins, M., Graveland H., van Duijkeren E., van Nes A., Schoormans, A., Oosting-van Schothorst I., Heederik D., Wagenaar J.A. 2009 Evaluation of MRSA screening procedures and chromogenic agar medium in nasal swabs from pigs and veal calves. P098 *Antonie van Leeuwenhoek 95 supplement 1*; abstract of the NVVM meeting 20-22 April 2009; Papendal, Arnhem.

Marian Broekhuizen-Stins, Haitske Graveland , Engeline van Duijkeren, Arie van Nes, Anky Schoormans, Isabella Oosting -van Schothorst, Dick Heederik, Jaap A. Wagenaar. Evaluation of MRSA screening Procedures and Chromogenic Agar Medium in Nasal Swabs from Pigs and Veal Calves. Symposium Stichting Food Industry Micro Methods: Wraak van de Microben. Wageningen, 18 december 2008.

### Literatuur

D.F. Brown, D.I. Edwards, P.M. Hawkey, D. Morrison, G.L. Ridgway, K.J. Towner and M.W. Wren, Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *J. Antimicrob. Chemother.* 56 (2005), pp. 1000–1018.

M. Gardam, J. Brunton, B. Willey, A. McGeer, D. Low and J. Conly, A blinded comparison of three laboratory protocols for the identification of patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 22 (2001), pp. 152–156.

E.M. Jones, K.E. Bowker, R. Cooke, R.J. Marshall, D.S. Reeves and A.P. MacGowan, Salt tolerance of EMRSA-16 and its effect on the sensitivity of screening cultures, *J. Hosp. Infect.* 35 (1997), pp. 59–62.

N. Safdar, L. Narans, B. Gordon and D.G. Maki, Comparison of culture screening methods for detection of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a prospective study comparing 32 methods, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003), pp. 3163–3166.

## APPENDIX 3

### Project 5: antimicrobiële gevoeligheid van de MRSA-isolaten

#### Projectleider

D.J. Mevius, Divisie Bacteriologie en TSE's, Afdeling Kwaliteit, Antimicrobiële Resistentie en Zoönosen, CVI-WUR.

#### Projectteam

D.J. Mevius, K.T. Veldman, C.M. Dierikx, H.M. Japing en R. Baaiman: Divisie Bacteriologie en TSE's, Afdeling Kwaliteit, Antimicrobiële Resistentie en Zoönosen, CVI-WUR.

#### Samenwerking

P. van der Wolf en A. Rothkamp: GD.  
A.W. van de Giessen: CIB-RIVM.  
E. de Boer en B. Wit: VWA, Regio Oost, Zutphen.  
H. Graveland, D.J.J. Heederik en J.A. Wagenaar: FD.

#### Samenvatting

In dit project werd onderzoek gedaan naar het voorkomen van resistentie in diergerelateerde MRSA geïsoleerd uit Nederlandse landbouwhuisdieren. Stammen voor dit onderzoek werden aangeleverd door het RIVM, de GD, de FD en de VWA.

Bijna alle isolaten waren zoals verwacht resistent tegen tetracycline, wat typisch is voor MRSA ST398 uit dieren. In vleesproducten en pluimvee werden ook tetracyclinegevoelige varianten gevonden. De overige resistentie die vaak voorkwam was resistentie tegen erythromycine en clindamycine (> 60%), gentamicine en neomycine (variërend van 10 – 57%) en ciprofloxacine (10 – 45%). Resistentie tegen trimethopim/sulfa kwam weinig voor en resistentie tegen de in de humane geneeskunde belangrijke antibiotica mupirocine, fusidinezuur en rifampicine werd slechts zelden of niet gezien. Vancomycineresistentie werd niet aangetoond. Deze studie heeft heel gedetailleerd het voorkomen van en trends in resistentie in diergerelateerde MRSA aangetoond, wat van belang is voor de kennis over de verspreiding van deze organismen en ook voor het therapeutisch advies. De MRSA's in deze studie zijn veelal multiresistent tegen: bèta-lactam-antibiotica, de macroliden, lincosamiden, de aminoglycosiden gentamicine en neomycine en ciprofloxacine.

Zowel uit dier-, als uit volksgezondheidsbelang verdient het aanbeveling om voor deze potentieel zoönotische organismen deze surveillance te continueren en zelfs uit te breiden naar andere diersoorten zoals paarden, gezelschapsdieren en melkkoeien waar deze MRSA ook in is beschreven.

#### Summary

In the project the occurrence of resistance was studied in animal associated MRSA strains isolated from Dutch food-producing animals by the National Institute for Public Health and the Environment, the Animal Health Service, the Faculty of Veterinary Medicine and the Food and Consumer Product Safety Authority.

Almost all isolates were tetracycline resistant, which is typical for the MRSA ST398 clone in animals. In meat products and poultry also tetracycline susceptible variants were observed. Other frequently observed resistance was resistance against erythromycin and clindamycin (> 60%), gentamicin and neomycin (varying from 10 – 57%) and ciprofloxacin (10 – 45%). Resistance against trimethopim/sulpha was rare and resistance against the for human health care important antibiotics mupirocin, fusidic acid and rifampin was detected seldom if ever. Vancomycin resistance was not detected.

This study has demonstrated in detail the occurrence and trends in resistance in animal related MRSA in the Netherlands. This is of great importance for the knowledge of the epidemiology of the organisms and the therapeutic advice in case of infection.

The MRSA's in this study are generally multi drug resistant to beta-lactam antibiotics, the macrolides, lincosamides, aminoglycosides gentamicin and neomycin and ciprofloxacin.

Both from animal-, and human health perspective it is advisable to continue this resistance surveillance for these potentially zoonotic organisms and even expand it to other animal species from which MRSA are isolated like horses, companion animals and dairy cattle.

#### Inleiding

De Meticilline Resistente Staphylococcus Aureus (MRSA) dankt zijn naam aan de aanwezigheid van het mecA-gen. Door dit mecA-gen is het aangrijpingspunt van de beta-lactam-antibiotica veranderd waardoor deze niet of minder goed werken. Tot de beta-lactam-antibiotica behoren penicilline, ampicilline, amoxicilline en de combinatie daarvan met clavulaanzuur, de zogenaamde semisynthetische penicillines zoals meticilline en oxacilline, maar ook alle cefalosporinen. MRSA is dus alleen al door het mecA-gen resistent tegen een groot aantal voor de therapie belangrijke middelen. Daarnaast is MRSA ook vaak resistent tegen andere antibiotica, zoals bijvoorbeeld ciprofloxacine, tetracycline, macroliden, gentamicine of clindamycine (Renders, Janssen et al., 2007; Van Loo, et al., 2007). Vancomycine-resistente varianten komen uiterst zelden voor en zijn in Nederland nog niet gevonden.

Dit voorkomen van overige resistenties bepaalt de mate van multiresistentie van MRSA en ook de te verwachten problemen bij een eventuele therapie indien een infectie plaatsvindt. De mate van multiresistentie wordt vooral bepaald door het antibioticumgebruik op plekken waar MRSA zich ophoudt, zoals bijvoorbeeld in ziekenhuizen, en, in het geval van de diergebonden MRSA vooral de dierhouderij.

In de verschillende diersectoren zijn er verschillen in mate en wijze van antibioticumgebruik, wat gereflecteerd wordt in de resistentiepatronen van bacterie-isolaten uit die diersoorten (Mevius et al., 2008). Er worden binnen de diergerelateerde-MRSA's al verschillen in resistentiepatronen waargenomen (Renders et al., 2007). Het in kaart brengen van het voorkomen van en trends in resistentie is van groot belang voor het therapeutisch advies.

Het doel van dit project is om voor alle uit dieren (eventueel ook uit mensen) geïsoleerde MRSA's met een standaardpanel antibiotica het voorkomen van resistentie te bepalen.

### Materiaal en methoden

MRSA-stammen die werden geïsoleerd uit varkens, kalveren, dierlijke producten, overige monsters en pluimvee in het kader van het MRSA-onderzoeksprogramma werden naar het CVI gestuurd (zie Tabel A3.1). Daar werden ze opgeslagen en bewaard bij

-80°C. Ze zijn met de internationale referentiemethode (ISO-standaard 20776-1:2006 = bouillon-dilutiemethode) onderzocht op het voorkomen van resistentie tegen een panel antibiotica (zie Tabel A3.2). Met deze methode werden minimale inhiberende concentraties (MIC-waarden) van de antibiotica bepaald. Op basis van internationaal afgesproken interpretatiecriteria werden vervolgens resistentiepercentages bepaald.

De keuze voor de antibiotica is enerzijds bepaald door de voor de humane therapie belangrijke antibioticaklassen, anderzijds heeft het een epidemiologisch doel, te weten: een relatie leggen tussen gebruik in dieren en voorkomen van resistentie naast het *MecA*-gen.

Een steekproef van 64 isolaten werd ook onderzocht op het voorkomen van vancomycine-resistentie door ze te enten op platen met 6 mg/L vancomycine conform CLSI-richtlijnen.

### Resultaten

In totaal zijn voor 1290 MRSA-monstersisolaten door het CVI de MIC-waarden bepaald voor de twaalf soorten antibiotica in het panel. Tabel A3.2 geeft de frequentieverdelingen van alle bepaalde MIC-waarden weer die per antibioticum zijn bepaald, het breekpunt (afkapwaarde) voor de resistente populatie en de berekende resistentiepercentages.

Resistentie tegen tetracycline kwam het meest frequent voor (97%), met in afnemende percentages daarna

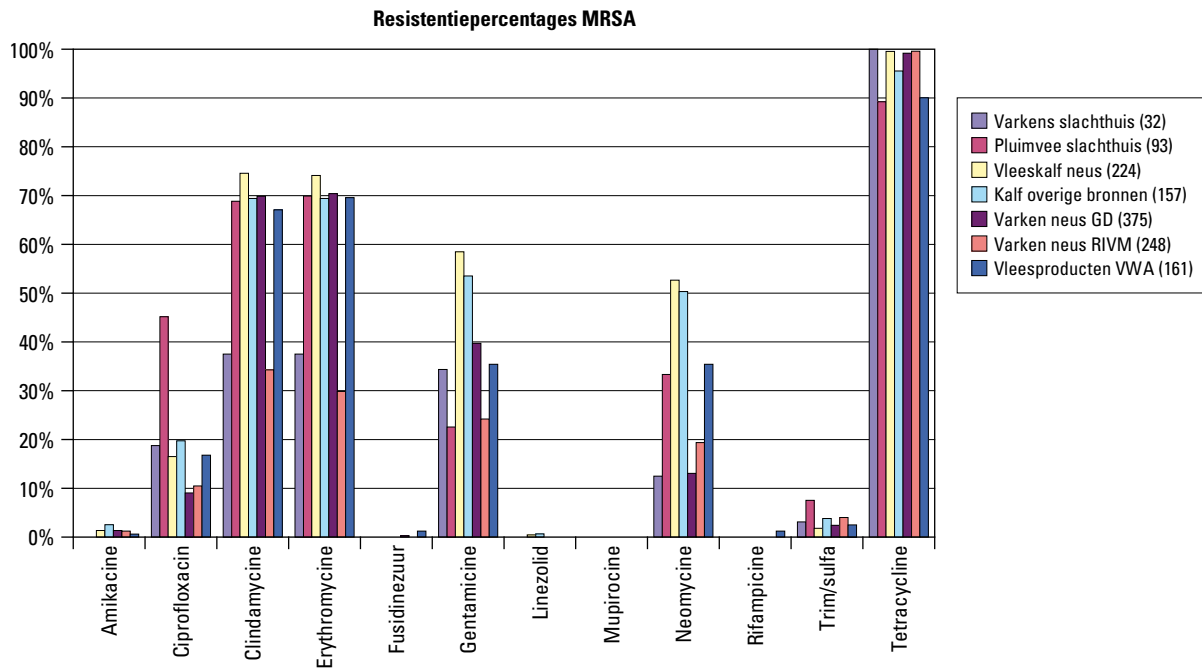
Tabel A3.1 Aantallen diergerelateerde MRSA-isolaten per diersoort en bron die door het CVI zijn onderzocht op het voorkomen van resistentie

Diersoort	Instituut	Aantal	Opmerkingen
Varken neus	RIVM	248	Bedrijven
Varken neus	RIVM	32	Slachthuismonsters
Varken neus	GD	375	Bedrijven
Vleeskalf neus	FD	224	Bedrijven
Vleeskalf overig	FD	157	Mensen, huisdieren, stofmonsters
Vleesproducten	VWA	161	
Pluimvee keel	RIVM	93	Slachthuismonsters
Totaal		1290	

Tabel A3.2 Frequentieverdeling van de MIC-waarden (mg/L) bepaald voor twaalf verschillende antibiotica voor 1290 diergerelateerde MRSA isolaten uit Nederland

Breekpunt	Totaal N = 1290	MIC (mg/L) frequentieverdeling (%)												R%			
		0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128		256		
R > 16	Amikacine				0.2	2.1	26.7	35.7	24.4	9.7	1.2						1.2%
R > 1	Ciprofloxacine				77.4	6.9	6.9	0.6	1.4	3.7	1.8	1.1	0.2				15.7%
R ≥ 4	Clindamycine		34.2	2.6	0.6		0.1	0.9	1.2	0.6	59.8						62.6%
R ≥ 8	Erythromycine		9.5	27.1	1.2							62.1					62.2%
R ≥ 8	Fusidinezuur		64.4	33.1	1.9	0.1	0.3	0.2									0.2%
R > 1	Gentamicine			49.6	10.6	2.1	0.9	0.5	1.1	6.7	18.1	10.3					39.8%
R > 4	Linezolid				1.4	45.5	52.9	0.2									0.2%
R > 4	Mupirocine			97.4	1.9	0.7											0.0%
R ≥ 8	Neomycine			29.5	25.1	11.9	3.5	10.7	9.9	6.4	2.1	0.8					29.9%
R ≥ 4	Rifampicine			98.7	0.9	0.2											0.2%
R > 4/76	Trim/sulfa		34.7	5.0	21.9	27.5	7.8	2.2	0.2	0.1	0.7						3.2%
R ≥ 16	Tetracycline				2.0	0.7		0.2		0.3	2.2	20.8	73.8				97.1%





Figuur A3.1 Resistentiepercentages voor twaalf antibiotica voor diergerelateerde MRSA-isolaten uit zeven verschillende Nederlandse bronnen

resistentie tegen erythromycine en clindamycine, de aminoglycosiden neomycine en gentamicine en ciprofloxacine.

Figuur A3.1 geeft de resistentiepercentages per bron weer. Opvallend is dat de pluimveemonsters en die uit de vleesproducten niet allen tetracycline-resistent zijn. Ciprofloxacine-resistentie is het hoogst in pluimveemonsters. Ook opvallend is dat resistentie tegen erythromycine en clindamycine in MRSA's door het RIVM geïsoleerd uit varkens op slachthuizen of bedrijven duidelijk lager ligt dan de MRSA's door de GD uit varkens geïsoleerd. Voor neomycine en gentamicine geldt dat de resistentiepercentages beduidend hoger liggen in kalverisolaten. Resistentie tegen het in dieren veelgebruikte trimethoprim/sulfa komt alleen in lage percentages voor en resistentie tegen de humaan belangrijke antibiotica rifampicine, linezolid en fusidinezuur komt niet of nauwelijks voor. Geen van de onderzochte isolaten was resistent tegen vancomycine.

## Discussie

Het doel van deze studie was om de voorkomende resistenties in MRSA geïsoleerd uit Nederlandse voedselproducerende dieren vast te stellen. Dit uit oogpunt van eventuele risico's voor dier- of volksgezondheid indien de stammen multiresistent zijn of steeds nieuwe resistenties verwerven. Dit mede in verband met de potentiële zoönotische aspecten van dit type MRSA in dieren (Van Loo et al., 2007; Witte et al., 2007; Ruhlmann et al., 2008; Springer et al., 2009).

Dat de isolaten in deze studie bijna altijd **tetracyclineresistent** waren was verwacht omdat eerdere publicaties al hadden aangegeven dat de dierlijke MRSA-variant tetracyclineresistent is op basis van de aanwezigheid van het tetM-gen (Witte et al., 2007). Het is dus des te opvallender dat ongeveer 10% van de isolaten uit vleesproducten en pluimvee gevoelig waren voor dit antibioticum. Van de isolaten van de VWA komt dit doordat die 10% behoorde tot andere MLST-typen dan 398 (De Boer et al., 2008). Voor de pluimvee-isolaten is dat onbekend.

Veelvoorkomende andere resistenties zijn zij die tegen de macroliden (**erythromycine** 62,2%) en lincosamiden (**clindamycine** 62,6%). Ook dit was niet onbekend, maar de frequentie van voorkomen rond de 70% is erg hoog en veel hoger dan een eerdere rapportage in varkens (De Neeling et al., 2007). Dit is van belang omdat bij de aanvang van deze problematiek aan ziekenhuizen was geadviseerd om clindamycine als standaardtherapie in te zetten als er verdenking bestond op een infectie door diergerelateerde MRSA. Renders et al. hebben dit advies al tegengesproken, wat door onze studie wordt bevestigd door het hoge percentage clindamycineresistentie (Renders et al., 2007). De gevonden verschillen in hoogte van resistentie tussen isolaten van RIVM en GD kunnen niet direct worden verklaard, maar berusten waarschijnlijk op toeval.

Resistentie tegen **ciprofloxacine** komt relatief vaak voor, het meest in isolaten uit pluimvee. Het mechanisme van deze resistentie is een puntmutatie in het chromosoom, die vooral onder invloed van gebruik van deze klasse

antibiotica wordt uitgeselecteerd. Kalveren en pluimvee zijn bij uitstek de dieren waarin de quinolonen worden gebruikt. In de eerste studie van het RIVM naar het voorkomen van MRSA in varkens waren alle gevonden isolaten nog gevoelig voor dit antibioticum (De Neeling et al., 2007).

Resistentie tegen **gentamicine** en **neomycine** komt het meest voor in kalveren. Ook deze resistenties zijn eerder en ook in andere landen beschreven (Strommenger et al., 2006; De Neeling et al., 2007; Renders et al., 2007; Witte et al., 2007).

Resistentie tegen **trimethoprim/sulfa** komt slechts zelden voor. Dit is enerzijds opvallend omdat deze antibioticumcombinatie in landbouwhuisdieren veel wordt gebruikt. Het kan mogelijk worden verklaard omdat dit een complex resistentiemechanisme is van twee genen die beide aanwezig moeten zijn. Zowel een resistentiegen tegen trimethoprim als een tegen sulfonamiden. Beide genen zijn in *S. aureus* niet vaak beschreven (Kadlec en Schwarz, 2009).

Heel belangrijk is het dat we geen resistentie tegen de humaan voor de behandeling en decontaminatie zeer belangrijke, antibiotica **mupirocine**, **fusidinezuur** en **linezolid** hebben gevonden. Enkele isolaten hadden MIC-waarden net boven het breekpunt, waarvan het niet waarschijnlijk is dat dit echte verkregen resistentie betrof op basis van een specifiek gen. Het is niet uit te sluiten dat het gebruikte breekpunt niet volledig adequaat stammen met wild-type gevoeligheid onderscheidt van stammen met een resistentie-gen.

Deze studie heeft heel gedetailleerd het voorkomen van en trends in resistentie in diergerelateerde MRSA aangetoond, wat van belang is voor de kennis over de verspreiding van deze organismen en ook voor het therapeutisch advies. De MRSA's in deze studie zijn veelal multiresistent tegen beta-lactam-antibiotica, de macroliden, lincosamiden, de aminoglycosiden gentamicine en neomycine (en kanamycine, maar dat is hier niet getest), en ciprofloxacine.

### Aanbevelingen

De gegevens van dit onderzoek laten zien dat het heel belangrijk is om een resistentie-surveillance uit te voeren van organismen die een zoönotisch potentieel hebben. Doordat ze zeer veel voorkomen in de intensieve veehouderij waar veel antibiotica worden gebruikt, is het verkrijgen van meer resistenties en toename van resistentie te verwachten.

Het is dan ook van belang om deze surveillance te continueren en zelf uit te bouwen naar ander diersoorten waar deze MRSA-variant in wordt gevonden zoals paarden, gezelschapsdieren, melkkoeien.

### Gerelateerde projecten

Nationaal resistentie-surveillanceprogramma van CVI in samenwerking RIVM, VWA

## Output

### Publicaties

Mevius, D., N. Bondt, et al. (2008). Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in The Netherlands in 2006/2007, Appendix 1.

Mevius, D. and H. Verbrugh (2006). Research priorities of the MRSA problem in the Dutch animal husbandry. *Tijdschr Diergeneeskd* 131(24): 930-3.

Van Belkum, A., D. C. Melles, et al. (2008). Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. *Emerg Infect Dis* 14(3): 479-83.

Wagenaar, J., E. van Duijkeren, et al. (2007). Questions and answers about MRSA in farm animals. *Tijdschr Diergeneeskd* 132(14-15): 558-60.

Wagenaar, J. A., H. Yue, et al. (2009). Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Vet Microbiol.*

### Posterpresentaties

Haitske Graveland, Jaap A. Wagenaar, Marian Broekhuizen-Stins, Isabella Oosting-Schothorst, Anky Schoormans, Engeline van Duijkeren, Xander Huijsdens, Dik Mevius, Dick Heederik Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Veal Calf Farmers and Veal Calves in The Netherlands. ASM Conference on Antimicrobial Resistance in zoonotic bacteria and food-borne pathogens, 15 – 18 juni, Kopenhagen, DK

Dik Mevius, Cindy Dierikx, Denice Verheijen, Kees Veldman, Ben Wit, Peter van der Wolf, Haitske Graveland, Xander Huijsdens, Arjen van der Giessen On behalf of the Dutch working group SOM. Resistance and virulence determinants in MRSA strains isolated in 2007 from pigs, veal calves, and food products in the Netherlands. MedVetNet general Scientific Meeting 11 – 14 juni 2008, St Malo, FR

Dik Mevius, Cindy Dierikx, Denice Verheijen, Kees Veldman, Ben Wit, Peter van der Wolf, Haitske Graveland, Xander Huijsdens, Arjen van der Giessen On behalf of the Dutch working group SOM. Resistance and virulence determinants in MRSA strains isolated in 2007 from pigs, veal calves, and food products in The Netherlands. ASM Conference on Antimicrobial Resistance in zoonotic bacteria and food-borne pathogens, 15 – 18 juni, Kopenhagen, DK

### Voordrachten

Dik Mevius. Antibiotic resistance, recent developments. Safefood ERA meeting, Ede the Netherlands (Dir Kennis) 11 Januari 2008

Dik Mevius. MRSA in animals the Netherlands. Invited speaker by the Norwegian National Veterinary Institute, October 2008

### Literatuur

De Boer, E., J. T. Zwartkruis-Nahuis, et al. (2008).

Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol*.

De Neeling, A. J., M. J. van den Broek, et al. (2007). High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol* 122(3-4): 366-72.

Kadlec, K. and S. Schwarz (2009). Identification of a novel trimethoprim resistance gene, *dfrK*, in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene *tet(L)*. *Antimicrob Agents Chemother* 53(2): 776-8.

Mevius, D., N. Bondt, et al. (2008). Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2006/2007.

Renders, N. H., M. H. Janssen, et al. (2007). Clindamycin is unsuitable for the empirical treatment of infections due to pig-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Ned Tijdschr Geneeskd* 151(41): 2277-80.

Ruhmann, C. H., H. J. Kolmos, et al. (2008). Pigs as an infection source for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in humans. *Ugeskr Laeger* 170(43): 3436.

Springer, B., U. Orendi, et al. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new zoonotic agent? *Wien Klin Wochenschr* 121(3-4): 86-90.

Strommenger, B., C. Kehrenberg, et al. (2006). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. *J Antimicrob Chemother* 57(3): 461-5.

van Loo, I., X. Huijsdens, et al. (2007). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 13(12): 1834-9.

Witte, W., B. Strommenger, et al. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 13(2): 255-8.

## Appendix 4

### Project 6: karakterisatie van MRSA ST398: het varkensgerelateerde type

#### Projectleider

M.J.M. Bonten, Medische Microbiologie, UMC Utrecht.

#### Projectteam

R.J.L. Willems, A.C. Fluit en C.H.E. Boel: Medische Microbiologie, UMC Utrecht.

A. van Belkum, W. van Wamel en C. de Vogel: Afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten, Erasmus MC.

#### Samenwerking

Dr. J. Lindsay, Kings College, Londen, UK.

Dr. H. de Neeling, CIB-RIVM.

Dr. Vasanthakumari Neela, Universiti Putra Malaysia, Selangor, Malaysia.

#### Samenvatting

Het ontstaan en de verspreiding van varkensgerelateerde MRSA ST398 is onbegrepen. De genetische achtergrond van ST398 bepaalt het potentieel van micro-organismen om zich te verspreiden en ziekte te veroorzaken. Daarom is inzicht nodig in de genoomsamenstelling en variatie van ST398-isolaten. Dit is met behulp van microarray, AFLP en DNA-sequencingstechnieken onderzocht. Uit de resultaten blijkt dat er ten minste twee op genniveau verschillende varianten van ST398 voorkomen. Spa-sequencing van 70 ST398-stammen liet zien dat drie aparte phylogenetische lijnen aangetoond kunnen worden. Deze varianten zijn onafhankelijk van elkaar ontstaan. Op basis van de genomsequentie blijken er duidelijke verschillen te zijn tussen ST398 en andere stafylokokken, hetgeen ook volgde uit de AFLP-analyse. Er zijn met name aanzienlijke verschillen met humane *S. aureus*-genotypen. AFLP-onderzoek toonde aan dat ook meticillinegevoelige ST398 bij mensen kunnen circuleren, al is het in lage frequentie. Deze stammen kunnen significante infecties veroorzaken. Op basis van de AFLP-fingerprints hebben we diagnostische merkers in een ST398-specifieke PCR-test kunnen verwerken. Onderzoek aan varkensgerelateerde MRSA in Maleisië heeft laten zien dat er geografische variatie is in het type MRSA dat bij varkens wordt aangetroffen. In Azië wordt ST9 MRSA, meer dan MRSA ST398, bij varkens en varkensboeren aangetroffen. Verder onderzoek is nodig om vast te stellen welke genen of genenclusters verantwoordelijk zijn voor gastheerspecificiteit van *Staphylococcus aureus*.

#### Summary

The origin and transmission of pig-related MRSA ST398 is not understood. The genetic background of micro-organisms determines their potential pathogenicity

and capacity for transmission. Therefore, insight into the genome composition of ST398 and its variation is necessary. This was studied using microarrays, AFLP methods and whole genome sequencing. From the results it could be concluded that at least two genetically distinct sub-types can be defined. Spa sequencing for 70 ST398 strains revealed three different lineages. These evolved independently. The whole genome sequencing analysis showed clear differences between ST398 and isolates from human sources, which was confirmed by AFLP. The same AFLP analysis revealed that methicillin susceptible versions of ST398 circulate among humans, albeit in low frequencies. These strains are capable of causing invasive infections. On the basis of the AFLP analysis we identified genetic markers for ST398 that could be translated in specific PCR tests for this MRSA genotype. Research on pig-related MRSA from Malaysia revealed that geographically different MRSA clones can be encountered among pigs and pig farmers. In the Malaysian setting ST9 rather than ST398 strains were identified. These differences may explain the host range of different staphylococcal genotypes. However, additional experiments are required to prove this hypothesis.

#### Inleiding

Het ontstaan en de verspreiding van varkensgerelateerde meticilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) is onbegrepen. Het betreft hier in het bijzonder MRSA die behoort tot sequence type 398 (ST398) (De Neeling et al., 2007). Op basis van PCR zijn er verschillende SCCmec-types aanwezig maar details ontbreken (Fluit, niet gepubliceerd). Deze data suggereren dat ST398-isolaten genetisch homogeen maar niet identiek zijn. Dit heeft mogelijk gevolgen voor de pathogeniciteit en het epidemisch vermogen van de verschillende subtypen. De vragen die beantwoord moeten worden zijn:

- Wat is het verschil tussen ST398 en andere genotypen (met name typen van humane herkomst)?
- Hoe homogeen is ST398?
- Zijn er genetische verschillen die het succes van ST398 kunnen verklaren?

#### Materiaal en methoden

##### Microarray-experimenten

De microarray-experimenten werden uitgevoerd op microarrays die bestonden uit DNA-fragmenten voor alle bekende genen van zeven *S. aureus*-genomen waarvan de DNA-sequentie volledig bekend was. Genomisch DNA van vier ST398-isolaten werd fluorescent gelabeld en gehydriseerd met de *S. aureus*-pangenoom microarray. De fluorescentie werd gemeten en de resultaten werden

met behulp van statistische programma's geanalyseerd.

#### *AFLP-analyses en spa-typering*

De AFLP-analyses werden uitgevoerd aan DNA geïsoleerd uit ST398-stammen van verschillende klinische en non-klinische bronnen uit zowel mensen als dieren. Met behulp van een eerder in Rotterdam gevalideerd protocol werden AFLP fingerprints gegenereerd die werden ingebed in onze AFLP-database. We scoorden 147 verschillende merkers. Tevens werd de aanwezigheid van de verschillende SCCmec-typen, het PVL toxine-gen en de sequentie van het proteïn A gen (spa) vastgesteld met behulp van eerder ontwikkelde protocollen.

#### *Sequencen van het ST398-genoom*

DNA van een ST398-isolaat werd geïsoleerd en gesequenced door middel van de 454 pyrosequencing technologie van Roche. De verkregen data werden met behulp van software gecombineerd tot grote fragmenten (contigs). Na analyse van de volgorde en oriëntatie van de contigs met behulp van Kodon werd met behulp van conventionele PCR en sequencing-technieken de sequentie van de ontbrekende DNA-fragmenten bepaald.

## Resultaten

### *Microarray experimenten*

Doelstelling was om meer inzicht te krijgen in de verschillen tussen ST398-isolaten en andere *Staphylococcus aureus*-stammen. Hoewel de microarray-resultaten technisch goed waren met uitstekende replica's, bleek de analyse van de resultaten een groot probleem. Voor een goede analyse is een referentie nodig voor elk gen dat aanwezig is op de microarray. Dit bleek achteraf niet het geval (ook niet uit gepubliceerde data voor deze microarray). Er was een referentie voor slechts een deel van de genen, waarbij een referentie ontbrak voor juist die genen die variabel aanwezig zijn tussen verschillende isolaten. Met name deze variabel aanwezige genen bepalen over het algemeen fenotypische verschillen tussen stammen en vormen onder andere de verklaring voor de verschillen in pathogeniciteit en epidemisch vermogen tussen stammen. Om betere resultaten te verkrijgen zijn er vier stammen getest op een Affimetrix microarray. Deze microarray laat betere resultaten zien, maar ook hier is het moeilijk vast te stellen welke genen exact verschillend zijn. Wel is duidelijk dat er ten minste twee verschillende SCCmec-elementen aanwezig zijn. Ook zijn er verschillende bacteriofagen geïntegreerd in het genoom van verschillende ST398-stammen. Deze bacteriofagen coderen vaak voor virulentiefactoren die bijdragen aan pathogeniciteit. Sequencen van het complete genoom zal noodzakelijk zijn om vast te stellen welke genen wel en niet aanwezig zijn in deze bacteriofagen. Verder zijn er verbeterde microarrays nodig. Inmiddels hebben we deze microarrays ontworpen met het Microarray Department van de Universiteit van Amsterdam.

Concluderend kan worden gezegd, dat duidelijk geworden

is dat er ten minste twee op genniveau verschillende varianten van ST398 voorkomen. Deze varianten zijn onafhankelijk van elkaar ontstaan. Er zijn echter aanzienlijke verschillen met stafylokokken-genotypen die van humane herkomst zijn.

### *AFLP analyse en spa-typering*

Op basis van de AFLP-analyses kon worden vastgesteld dat de ST398-stammen een echt separate groep van *S. aureus* in het algemeen en MRSA in het bijzonder vormden. Alle ST398-stammen clusterden separaat van de humane stammen. Ook bleek dat de meticillinegevoelige ST398 bloedvergiftiging konden veroorzaken. Er is dus geen reden om aan te nemen dat de ST398 MRSA dat niet ook kunnen. *Spa* sequencing in combinatie met pulsed field gel electroforese (PFGE) gaf aan dat significante genetische heterogeniteit onder de ST398-stammen kon worden aangetoond. Dit levert aanwijzingen voor de snelle evolutie die de initiële ST398 over de voorbije jaren blijkbaar al heeft ondergaan. De AFLP-afgeleide merkers hebben geleid tot de ontwikkeling van twee diagnostische PCR's die (tot op heden) een 100% specificiteit laten zien. *Spa* typering van een aantal varkensgerelateerde MRSA uit Maleisië liet zien dat daar regionaal andere MRSA-genotypes in varkens circuleren. Deze ST9 en ST1-clones kwamen bij dieren en verzorgers voor, gelukkig nog in beperkte frequenties (respectievelijk 1,4 en 5,5%).

### *ST398 genoom sequencing*

Het genoom van ST398-isolaat is compleet gesequenced. De resultaten laten aanzienlijke verschillen zien ten opzichte van andere stammen waarvan het complete genoom beschreven is. De belangrijkste verschillen zijn:

- Er is een nieuw type SCCmec aanwezig (dit type is ook in Taiwan gevonden en is SCCmec type VII genoemd).
- Er zijn twee resistentie mechanismen voor (oxy) tetracycline aanwezig.
- Er zijn genen aanwezig die coderen voor koperresistentie.
- Er zijn een aantal integrative conjugative elements aanwezig. Deze elementen worden verondersteld betrokken te zijn bij de overdracht van DNA en daarmee het verwerven van nieuwe virulentie- en resistentiegenen.
- Er is een uniek pathogenicity island aanwezig met varianten van genen die in andere *Staphylococcus aureus*-stammen interfereren met het innate immune system.
- De ST398-stam bezit verder twee nieuwe allotypes van vSa-elementen. Deze elementen zijn mobiel en coderen voor virulentiefactoren.
- Er ontbreken restrictie/modificatiesystemen in vergelijking met andere *S. aureus*-stammen. Omdat deze systemen de introductie van DNA van andere bacteriën en daardoor ook de opname van nieuwe virulentie- en resistentiegenen beperken, zou dit kunnen betekenen dat deze ST398 minder beperkt is in het opnemen van vreemd DNA. Een consequentie hiervan kan zijn dat

deze stam sneller evolutionaire ontwikkelingen kan doormaken waardoor het fenotype van deze stam, bijvoorbeeld pathogeniciteit, sneller kan veranderen.

- Verschillende bekende en veelvoorkomende virulentiefactoren zoals PVL (Panton Valentine Leukocidin) en exotoxinen komen niet voor.
- Concluderend kan gezegd worden dat op basis van de genomsequentie er duidelijke verschillen zijn tussen ST398 en andere stafylokokken-genomsequenties.

## Discussie

Ondanks de grote problemen met de analyse van de microarrays van King's College en de beperkte mogelijkheden om met Affymetrix microarrays te werken, laten de verkregen microarray-experimenten zien dat er aanzienlijke verschillen zijn tussen ST398 en andere stafylokokkenstammen, die van humane herkomst zijn. Dit is in lijn met de *spa*-types en AFLP-data, waar vergelijkbare genetische heterogeniteit kon worden aangetoond. Interessant genoeg is de genetische heterogeniteit tussen ST398-stammen en stammen die veelal bij mensen voorkomen zodanig groot dat diagnostische testen konden worden ontwikkeld. De algemene verschillen zijn voor één ST398-isolaat door middel van het sequencen van het complete genoom bevestigd en in detail vastgesteld. De gevonden verschillen verklaren de resistentie tegen (oxy)tetracycline dat als selectie selectiedruk voor ST398 in varkens gezien wordt (Van Duijkeren et al., 2008). De meeste *S. aureus*-stammen worden niet of zelden in varkens gevonden. Voor de in Maleisië aangetroffen ST1- en ST9-stammen geldt overigens dat die in de MRSA-vorm wel degelijk ook bij mensen zijn aangetroffen. Een mogelijke verklaring hiervoor is een verschil in virulentiefactoren tussen humane *S. aureus* en ST398 wat we middels whole genome sequencing hebben gevonden. Veel virulentiefactoren die zijn beschreven in humane *S. aureus*-stammen en die interfereren met het innate immuunsysteem zijn humaan specifiek en vertonen dus geen activiteit tegen het immuunsysteem van (andere) dieren laat zien (Rooijackers en Van Strijp, 2007). Welke genen of genenclusters daadwerkelijk een rol spelen bij gastheerspecificiteit moet nog verder worden onderzocht. Een andere belangrijke nieuwe bevinding is dat er ten minste twee keer een SCCmec-element opgenomen is door ST398-isolaten. Eén is het al langer bekende SCCmec-type IV dat ook in community-associated MRSA gevonden wordt, de ander is het hier nieuw beschreven SCCmec-type VII (Takano et al., 2008). Wij troffen ook SCCmec-types V en IVa inmiddels aan in ST398 MRSA van diverse oorsprong. Daarnaast bleek uit de microarray-experimenten dat in de verschillende ST398-stammen bacteriofagen op verschillende plaatsen in het genoom zijn geïntegreerd. De aanwezige variabiliteit in de vier geanalyseerde ST398-stammen en de afwezigheid van restrictie/modificatie systemen suggereert een potentieel grote mate van genetische diversiteit wat betreft geninhoud binnen ST398. Dat betekent dat het niet

uitgesloten is dat er nog andere genomische subtypen van ST398 bestaan of zullen ontstaan met andere SCCmec-elementen en virulentiegenen.

Concluderend kan worden gezegd dat de verschillen tussen ST398 en stammen van humane herkomst aanzienlijk zijn en dat er binnen ST398 genetische, duidelijk verschillende, genomische subtypen zijn.

## Aanbevelingen

1. Het sequencen van meer ST398-stammen. Hier wordt op dit moment door onze afdeling aan gewerkt.
2. Het kloneren en tot expressie brengen van relevante virulentiefactoren, de functie vaststellen en het gastheerbereik vaststellen. Dit is een zeer veelomvattend onderzoek en wordt voor een klein aantal virulentiefactoren van één stam uitgevoerd door onze afdeling. Om tot een goede evaluatie te komen van het potentieel van ST398 is een grotere inzet vereist.
3. De microarray-werkzaamheden uitbreiden om een beter inzicht te krijgen in de genetische diversiteit van ST398. Voor een deel gebeurt dit in het kader van CONTROL of COMMUNITY-acquired MRSA: Rationale and Development of counteractions (CONCORD) een FP7-project van de Europese Unie waarvan Dr. A.C. Fluit projectleider is.
4. Het uitvoeren van humane kolonisatiestudies met varkens (dier) geadapteerde stammen om gastheerspecificiteit nader te onderbouwen.
5. Het uitvoeren van serologisch onderzoek (multiplex Luminex aanpak) bij wel en niet met varkens of humane *S. aureus*-stammen gekoloniseerde of geïnfecteerde varkens. Dit levert mogelijk data over, wederom, gastheerspecificiteit en serologische markers daarvoor. Vraag is of verschillende vormen van immuniteit infectiepreventief zouden kunnen werken.

## Gerelateerde projecten

Dit project is voor een klein deel gerelateerd aan CONTROL of COMMUNITY-acquired MRSA: Rationale and Development of counteractions (CONCORD), een FP7-project van de Europese Unie waarvan Dr. A.C. Fluit projectleider is. Tevens is er beperkte overlap met 'Preventing community and nosocomial spread of infection with MRSA ST-398 – instruments for accelerated control and integrated risk management of antimicrobial resistance' (PILGRIM), een FP7-project waarin de Rotterdamse onderzoeksgroep participeert.

## Output

Maarten J Schijffelen, C H Edwin Boel, Jos A G van Strijp, Ad C Fluit . 2009. Whole Genome Analysis of a Pig-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Isolate from a Case of Human Endocarditis. BMC Genomics. Submitted. Accepted pending modification.

Neeltje Carpaij, Ad C. Fluit, Jodi A. Lindsay, Marc J.M. Bonten and Rob J.L. Willems. New methods to analyse microarray data that partially lack a reference signal. BMC Genomics. Submitted. Accepted pending modification.

C.H.E. Boel, M.J. Schijffelen, W. van Workum, G. te Meerman, and A.C. Fluit. 2008. Single feature polymorphisms using Affymetrix microarray analysis reveals substantial differences between pig-related ST398 MRSA isolates. Voorjaarsbijeenkomst Ned. Ver. Med. Microbiol. Ned. Tijdschr. Med. Microbiol. 16 (Suppl.): Abstract P46, pS98.

C. H. E. Boel, M. J. Schijffelen, W. van Workum, G. J. te Meerman, A. C. Fluit. 2008. Single feature polymorphisms using Affymetrix microarray analysis reveals substantial differences between pig-related ST398 MRSA isolates. 108th American Society for Microbiology General Meeting, Boston, MA. Abstract C-345.

M.J. Schijffelen, C.H.E. Boel, J.A.G. van Strijp, A.C. Fluit. 2009. Whole genome analysis shows substantial diversification between pig-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates. 13<sup>th</sup> International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal infections, Cairns, Australia. Abstract 423.

M.J. Schijffelen, C.H.E. Boel, J.A.G. van Strijp, A.C. Fluit. 2009. Whole genome analysis shows substantial diversification between pig-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates. Voorjaarsbijeenkomst Ned. Ver. Med. Microbiol. Antonie van Leeuwenhoek 95: 95, Suppl. 1, abstract O095, p.49-50.

A. van Belkum, D.C. Melles, J.K. Peters, W.B. van Leeuwen, E. van Duijkeren, X.W. Huijsdens, E. Spalburg, A.J. de Neeling, H.A. Verbrugh on behalf of SOM. 2008. Methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. Emerging Infectious Diseases 14, 479-483.

W.J.B. van Wamel, S. Hansenova, A.C. Fluit, H.A. Verbrugh, A.J. de Neeling, E. van Duijkeren, A. van Belkum. 2009. Short term micro-evolution of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, in press.

V. Neela, M.Z. Arif, M.N Shamsudin, A. van Belkum, L.Y. Khoon, E.G. Rad. Prevalence of ST-9 MRSA among pigs and pig handlers in Malaysia. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, in press.

## Literatuur

De Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen-Verheuevel MG, Dam-Deisz WD, Boshuizen HC, van de Giessen AW, van Duijkeren E, Huijsdens XW. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. VetMicrobiol. 2007;122:366-7

Rooijackers en SH, vVan Strijp JA. Bacterial complement evasion. Mol Immunol., 2007;44:23-32.

Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K, Isobe H, Dohmae S, Ozaki K, Takano M, Iwao Y, Shibuya M, Okubo T, Yabe S, Shi D, Reva I, Teng LJ, Yamamoto T. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother., 2008;52:837-45.

Van Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ, Jansen MD, Spalburg EC, de Neeling AJ, Allaart JG, van Nes A, Wagenaar JA, Fluit AC. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. Vet Microbiol. 2008 126:383-9.

## APPENDIX 5

### Project 7: typering van de MRSA-isolaten

#### Projectleider

X.W. Huijsdens, Laboratorium voor Infectieziekten en Screening, Cib-RIVM.

#### Projectteam

X.W. Huijsdens en T. Bosch: Cib-RIVM.

#### Samenwerking

Niet van toepassing.

#### Samenvatting

Project 7 had als doel om alle ingezonden MRSA-isolaten uit de verschillende deelprojecten te typeren. Typering is nodig om samen met epidemiologische gegevens een conclusie te kunnen trekken over bijvoorbeeld verspreiding en/of overdracht. De typering vond plaats door middel van een zogenaamde *Staphylococcus* proteïne A (*spa*) typering. Dit is een typering die gebaseerd is op de DNA-sequentie van het *spa*-gen. Het resultaat, een *spa*-type, werd teruggekoppeld naar de desbetreffende deelprojectleider. Voor project 7 zijn in totaal 2662 isolaten voor typering opgestuurd. In bijna alle gevallen kon direct het *spa*-type bepaald worden, echter bij 150 isolaten moest eerst nog een aparte DNA-isolatie uitgevoerd worden om tot een *spa*-type te komen. Aan de hand van het *spa*-type kan men meestal zien of het om een veegerelateerd type gaat. In 27 gevallen was echter nog een extra typering (MLST) nodig voor nadere analyse. *Spa*-type t011 en t108 werden het vaakst aangetroffen. Dit komt overeen met de meestgevonden veegerelateerde *spa*-typen bij mensen in Nederland. Uiteindelijk is voor alle ingestuurde isolaten een *spa*-type bepaald.

#### Summary

The goal of Project 7 was to type all MRSA isolates which were sent by the different projects within the LNV MRSA program. Typing, together with epidemiological data, is necessary to draw conclusions whether there is e.g. spread and/or transmission of MRSA. *Staphylococcus* proteïn A (*spa*) typing was chosen as the method of choice. *Spa* typing is based on the DNA sequence of the *spa* gene. The result of a *spa* typing, a *spa* type, was reported to the project leader. In total 2662 isolates were sent in for typing. In almost all cases the *spa* type could immediately be determined. However, in 150 cases DNA isolation was necessary to determine the *spa* type. Based on the *spa* type itself one can tell if the *spa* type is livestock-associated or not. In 27 cases another typing method (MLST) was used for further analysis. The two most prevalent *spa* types were t011 and t108. These two *spa* types are also the two most frequently found types among MRSA isolates

in the Dutch population. For all isolates a *spa* type was determined.

#### Inleiding

In het kader van epidemiologisch onderzoek, bron-contact onderzoek, monitoring- en nationale surveillance ('vinger aan de pols')-programma's worden bacteriën van diverse geslachten en soorten getypeerd. Deze bacteriën kunnen uit mens, dier of het milieu geïsoleerd zijn. De typeermethoden die gebruikt worden zijn zowel gebaseerd op fenotypische (serotypering, faagtypering, antibiogram) als ook op genotypische kenmerken (DNA). De methoden en resultaten worden zo veel mogelijk internationaal getoetst. Typering gebaseerd op DNA-sequentie heeft de voorkeur in verband met ondubbelzinnige en nauwkeurige resultaten. Tevens bieden op DNA-sequentie gebaseerde typeermethoden betere mogelijkheden voor het opstellen van (internationale) databases. Door middel van typering kan bijvoorbeeld worden vastgesteld of er sprake is van verspreiding of overdracht van dier op mens.

Sinds 1 januari 2008 wordt voor de nationale methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-surveillance de *Staphylococcus* proteïne A (*spa*) typering gebruikt. De techniek is gebaseerd op de DNA-sequentie van een bepaald gedeelte van het proteïne A-gen. Een belangrijk kenmerk van deze bepaling is het universele karakter van het typeerresultaat. Het resultaat van een *spa*-typering wordt weergegeven in een bepaald nummer, het zogenaamde *spa*-type. Het *spa*-type is afhankelijk van de gevonden DNA-sequentie en ligt internationaal vast. Hierdoor is vergelijking van MRSA-isolaten op nationaal en internationaal gebied mogelijk. Aan elk MRSA-isolaat kan door middel van *spa*-typering een *spa*-type toegekend worden. Op basis van de *spa*-typen van twee of meer isolaten kan men een uitspraak doen over een eventuele epidemiologische relatie.

In 2003 werden in Nederland voor het eerst MRSA-isolaten gevonden met een tot dan toe onbekend typeerresultaat. Na onderzoek bleken deze MRSA-isolaten een epidemiologische relatie te hebben met varkens (Voss et al., 2005; Huijsdens et al., 2006). Vervolgonderzoek in Nederland heeft uitgewezen dat het hier om een 'live-stock associated' (LA)-MRSA gaat (De Neeling et al., 2007; Van Loo et al., 2007; Van den Broek et al., 2008; De Boer et al., 2009). Typering van LA-MRSA-isolaten met verschillende typeermethoden heeft laten zien dat alle LA-MRSA tot een bepaalde groep MRSA behoren, de zogenaamde ST398 groep. Binnen de ST398-groep kunnen MRSA-isolaten verschillen van elkaar, onder andere in *spa*-type.

De *spa*-typering is gebruikt voor het typeren van de



MRSA-monsters binnen het LNV-programma. Meer informatie over de *spa*-typering is te vinden in een publicatie in het Journal of Clinical Microbiology (Harmsen et al., 2003). Indien een tot dan toe nog onbekend *spa*-type binnen de ST398-groep werd gevonden, werd het isolaat nader onderzocht met behulp van Multi-locus sequence typing (MLST, Enright et al., 2000). Hiermee kon worden bevestigd of de onbekende *spa*-typen tot de ST398-groep behoorden. MLST werd tevens ingezet voor elk *spa*-type dat niet tot de ST398-groep behoorde. Hiervoor werd één dierlijk monster per *spa*-type getest. Voor de humane monsters werd alleen een MLST uitgevoerd indien er twijfel was of het betreffende *spa*-type tot de ST398-groep behoorde.

### Materiaal en methoden

Alle isolaten zijn eerst reingestreekt op een bloedagarplaat. Dit werd gedaan om er zeker van te zijn dat er geen verontreiniging was. Vervolgens werd van elk monster een lysaat gemaakt en gebruikt in een PCR-reactie om te bevestigen of het isolaat daadwerkelijk een MRSA was. Hiervoor werd een multiplex PCR uitgevoerd voor de detectie van het *S. aureus*-specifieke DNA-fragment (Martineau et al., 1998), het *mecA*-gen (De Neeling et al., 1998) en de Pantone-Valentine Leucocidine (PVL)-genen (Lina et al., 1999). MRSA-isolaten met de PVL-genen produceren een toxine waardoor zij mogelijk meer virulent zijn. Na bevestiging van het MRSA-isolaat werd de *spa*-typering uitgevoerd volgens Harmsen et al. (Harmsen et al., 2003).

In een aantal gevallen kon er geen *spa*-type worden toegekend aan het MRSA-isolaat. Van deze isolaten werd het DNA geïsoleerd met behulp van een commerciële kit (DNeasy Kit, Qiagen) en vervolgens werd een *spa*-typering uitgevoerd.

MLST werd uitgevoerd volgens Enright et al. (Enright et al., 2000).

### Resultaten

Uit de verschillende deelprojecten binnen het LNV MRSA-onderzoeksprogramma zijn MRSA-isolaten aangeleverd voor *spa*-typering. In totaal zijn er 2662 isolaten binnengekomen (Tabel A5.1). Voor Project 15 moesten er een groot aantal DNA-isolaties uitgevoerd worden om het *spa*-type te kunnen bepalen; van alle andere monsters kon direct een typering met behulp van een lysaat ingezet worden. In totaal zijn er ook 27 MLST-typeringen uitgevoerd om te bepalen of de gevonden *spa*-typen tot de ST398-groep behoorden of ter controle omdat een afwijkend *spa*-type werd gevonden. In onderstaande tabellen is met een \* achter het *spa*-type aangegeven of het *spa*-type tot de ST398-groep behoorde. Indien dit niet zo was werd tevens voor de dierlijke monsters een MLST-typering uitgevoerd, aangegeven in de derde kolom. Voor de humane monsters werd alleen bij twijfel een MLST uitgevoerd. Het resultaat van een MLST wordt weergegeven in een sequence type (ST). Er werden een paar nieuwe sequence-typen gevonden. Dit staat in de tabel aangegeven als STnieuw. Hieraan moet nog een nieuw (internationaal) nummer toegekend worden. Voor alle 2662 isolaten is uiteindelijk een *spa*-type bepaald.

Tabel A5.1 Overzicht Project 7: typering van de MRSA-isolaten

Project nr.	Onderzoeksvraag	# typeringen uitgevoerd	# MLST	# DNA isolaties
8	Prevalentie varkenshouderijen	1113	2	
9	Prevalentie vleeskalverbedrijven	915	6	
10	Prevalentie melkvee	0		
11	Prevalentie pluimvee	93	3	
12	Ketenanalyse	97		
13	MRSA-transmissie bij varkens	91		
14	MRSA in stof	53		
15	MRSA in dierlijke producten	300	16	150
Totaal		2662	27	150

## Project 8

Voor Project 8 zijn er 1113 isolaten getypeerd. Project 8 is onverdeeld in een pilotstudie (248 monsters) en het vervolg daarop (863 monsters), 2 monsters vallen buiten de selectie.

In totaal zijn er 19 verschillende *spa*-typen gevonden, onverdeeld in 17 *spa*-typen behorend tot het LA-MRSA ST398-cluster (aangeduid met een \*), en 2 *spa*-typen die niet waren gerelateerd aan het ST398-cluster (zie Tabel A5.2).

Tabel A5.2 *Spa*-typering isolaten Project 8: prevalentie varkenshouderijen

<i>Spa</i> -type	isolaten (n)	MLST
t002	5	ST5
t011*	556	
t034*	4	
t108*	398	
t127	14	ST1
t567*	18	
t571*	11	
t588*	4	
t899*	20	
t943*	1	
t1184*	13	
t1451*	1	
t1456*	9	
t1457*	37	
t2011*	1	
t2330*	10	
t2346*	5	
t3479*	3	
t4119*	1	
<b>totaal</b>	<b>1111</b>	

In Project 8 zijn tevens 58 humane monsters geanalyseerd, zie Tabel A5.3. De typering hiervan is niet meegenomen in de totaal berekening van het aantal typering binnen het LNV MRSA-project.

Tabel A5.3 *Spa*-typering humane isolaten Project 8

<i>Spa</i> -type	isolaten (n)
t011*	28
t108*	16
t567*	8
t588*	1
t899*	2
t2330*	2
t2741*	1
<b>Totaal</b>	<b>58</b>

## Project 9

Voor Project 9 zijn er 915 isolaten getypeerd, onderverdeeld als volgt:

661	humanaan
209	kalf
17	overig dier
20	overig (controles en dergelijke)
8	geen <i>S. aureus</i>

In totaal zijn er 44 verschillende *spa*-typen gevonden, onverdeeld in 14 *spa*-typen behorend tot het LA-MRSA ST398-cluster en 30 non-ST398. Voor de analyse zijn de 20 'overig' monsters en de monsters die geen *S. aureus* waren buiten beschouwing gelaten. Tevens zijn er binnen Project 9 ook een groot aantal humane MSSA-isolaten getypeerd.

De humane isolaten (n = 661) zijn onderverdeeld in MRSA (n=556) en MSSA (n=105). In totaal zijn er 39 verschillende *spa*-typen gevonden. Twaalf *spa*-typen behoorden tot het ST398-cluster (aangeduid met een \*) en 27 *spa*-typen waren niet gerelateerd aan het ST398-cluster (zie Tabel A5.4).

Tabel A5.4 *Spa*-typering humane isolaten Project 9: prevalentie vleeskalverbedrijven

<b>MRSA <i>Spa</i>-type</b>	<b>isolaten (n)</b>	<b><i>Spa</i>-type</b>	<b>MSSA isolaten (n)</b>	<b>MLST</b>
t002	9	t002	7	
t005	1			
t011*	372	t011*	3	
t012	2	t012	5	
t015	1			
t019	1	t019	3	
t024	1	t024	1	
t026	1	t026	4	
t034*	51	t034*	38	
t064	2			
t078	1			
t084	1	t084	6	
t091	5	t091	2	
t097	2	t097	2	
t108*	11	t108*	1	
t159	1	t159	1	
t166	1			
t171	1	t171	3	
t186	1	t186	1	
		t318	2	
t328	1	t328	2	
t385	1			
t408	2	t408	3	
		t567*	1	
t588*	1			
t797	2	t797	8	ST30
		t803	2	
t899*	49			
t1236	1			
		t1239	4	ST30
t1457*	9			
t1580*	1			
		t1636	1	
t1928*	1	t1928*	2	
t2013	1	t2013	2	
t2383*	1			
t2510*	1			
t3423*	16			
t4601	4	t4601	1	
<b>totaal</b>	<b>556</b>	<b>totaal</b>	<b>105</b>	

Voor de kalfisolaten (n = 209) zijn 12 verschillende *spa*-typen gevonden. Acht *spa*-typen behoorden tot het ST398-cluster (aangeduid met een \*) en 4 *spa*-typen waren niet gerelateerd aan het ST398-cluster (zie Tabel A5.5).

Tabel A5.5 *Spa*-typering kalfisolaten Project 9: prevalentie vleeskalverbedrijven

<i>Spa</i> -type	isolaten (n)	MLST
t011*	169	
t034*	18	
t108*	7	
t421	2	ST239
t899*	3	
t1197*	1	
t1236	2	ST97
t1451*	2	
t1457*	1	
t1685	1	ST1159
t2383*	2	
t3856	1	STnieuw
Totaal	209	

### Project 11

Voor Project 11 zijn er 93 isolaten getypeerd. In totaal zijn er vijf verschillende *spa*-typen gevonden. Vier *spa*-typen behoorden tot het ST398-cluster (aangeduid met een \*) en een *spa*-type was niet gerelateerd aan het ST398-cluster (zie Tabel A5.6).

Tabel A5.6 *Spa*-typering isolaten Project 11: prevalentie pluimvee

<i>Spa</i> -type	isolaten (n)	MLST
t011*	44	
t034*	15	
t108*	5	
t1430	28	ST9
t1456*	1	
Totaal	93	

In Project 11 zijn tevens 26 humane monsters geanalyseerd, zie Tabel A5.7. De typering hiervan is niet meegenomen in de totale berekening van het aantal typering binnen het LNV MRSA-project.

Tabel A5.7 *Spa*-typering humane isolaten Project 11

<i>Spa</i> -type	isolaten (n)	MLST
t011*	15	
t034*	3	
t238	1	ST1454
t1430	4	
t1456*	1	
t4652*	2	ST1453
Totaal	26	

### Project 12

Voor Project 12 zijn er 97 isolaten getypeerd. In totaal zijn er vijf verschillende *spa*-typen gevonden; alle gevonden *spa*-typen behoren tot het ST398-cluster (zie Tabel A5.8).

Tabel A5.8 *Spa*-typering isolaten Project 12: ketenanalyse

<i>Spa</i> -type	isolaten (n)
t011*	45
t108*	18
t943*	20
t1457*	12
t2503*	2
Totaal	97

### Project 13

Voor Project 13 zijn er 91 isolaten getypeerd. In totaal zijn er vijf verschillende *spa*-typen gevonden; alle gevonden *spa*-typen behoren tot het ST398-cluster (zie Tabel A5.9).

Tabel A5.9 *Spa*-typering isolaten Project 13: MRSA-transmissie bij varkens

<i>Spa</i> -type	isolaten (n)
t011*	55
t108*	23
t1457*	11
t2123*	1
t2330*	1
Totaal	91

## Project 14

Voor Project 14 zijn er 53 isolaten getypeerd. Twee monsters vielen buiten de selectie en zijn niet meegenomen in de analyse.

In totaal zijn er zes verschillende *spa*-typen gevonden; alle gevonden *spa*-typen behoren tot het ST398-cluster (zie Tabel A5.10).

Tabel A5.10 *Spa*-typering isolaten Project 14: MRSA in stof

<i>Spa</i> -type	isolaten (n)
t011*	40
t034*	5
t108*	3
t899*	1
t1457*	1
t1580*	1
Totaal	51

Tabel A5.11 *Spa*-typering isolaten Project 15: MRSA in dierlijke producten

MLST/ <i>spa</i> -type	beef	veal	pork	lamb and mutton			chicken	turkey	fowl	game	total
					(NL+EU)	import biological					
<b>ST398</b>											
t011	18	30	20	11	51		1	3	27	2	163
t034	2	2	1	1	6			1	10		23
t108	3	2	8	1	2		1				17
t567		3	1								4
t779					1						1
t899			1		1	1	1	1	1	1	6
t1255					1						1
t1451	1		1								2
t1456					2						2
t1457				1							1
t2970	1										1
t3015					1						1
t3119					1						1
t4208					1						1
total	25	37	32	14	67		2	6	38	3	224
<b>STnon398</b>											
t002	3	1			2			3		2	11
t003									1	1	2
t019				1							1
t026	1		1								2
t044		1									1
t050	1										1
t127	4										4
t283	1										1
t311										1	1
t426					1						1
t437	3										3
t688				2							2
t919	1										1
t1430					5						5
t2802	3										3
t3935				1							1
total	42	39	33	18	75		2	6	41	4	264
% ST398	60%	95%	97%	78%	89%		100%	100%	93%	75%	85%

## Project 15

Voor Project 15 zijn er 300 isolaten getypeerd, inclusief controlemonsters, herhalingen en dergelijke. Resultaten van de *spa*-typeringen van de vleesisolaten zijn gepubliceerd in het International Journal of Food Microbiology (De Boer et al., 2009) (Tabel A5.11). Voor dit project zijn een groot aantal DNA-isolaties uitgevoerd omdat niet altijd direct op het lysaat een *spa*-type verkregen kon worden. Tevens werd zestien keer een MLST-typering uitgevoerd voor de isolaten die een niet vee-gerelateerd *spa*-type hadden. De resultaten hiervan staan in Tabel A5.12.

Voor elk project zijn alle uitslagen van de *spa*-typering gerapporteerd naar de desbetreffende deelprojectleider (Tabel A5.13).

Tabel A5.12 MLST-resultaten isolaten Project 15: MRSA in dierlijke producten

<i>Spa</i> -type	MLST
t002	ST5
t003	ST225
t019	ST30
t026	ST47
t044	STnieuw
t050	ST45
t127	ST1
t283	ST5
t311	ST5
t426	STnieuw
t437	ST338
t688	ST5
t919	ST8
t1430	ST9
t2802	STnieuw
t3935	ST22

Tabel A5.13 Totaaloverzicht per project van *spa*-typen die tot het ST398-cluster behoren

project <i>Spa</i>	8	9	11	12	13	14	15
t011	556	544	43	45	55	40	163
t034	4	107	15			5	23
t108	398	19	5	18	23	3	17
t567	18	1					4
t571	11						
t588	4	1					
t779							1
t899	20	52				1	6
t943	1			20			
t1184	13						
t1197		1					
t1255							1
t1451	1	2					2
t1456	9		1				2
t1457	37	10		12	11	1	1
t1580		1				1	
t1928		3					
t2011	1						
t2123					1		
t2330	10				1		
t2346	5						
t2383		3					
t2503				2			
t2510		1					
t2970							1
t3015							1
t3119							1
t3423		16					
t3479	3						
t4119	1						
t4208						1	

## Discussie

In deelproject 7 is voor alle ingezonden *S. aureus*-isolaten de *spa*-typering uitgevoerd. Het resultaat, een *spa*-type, is teruggekoppeld naar de inzender. Een aantal keer moest er eerst een DNA-isolatie uitgevoerd worden voordat er een *spa*-type aan het isolaat toegekend kon worden. Het *spa*-type, in combinatie met epidemiologische gegevens, stelt de deelprojectleiders in staat om conclusies te trekken uit de behaalde resultaten. Informatie over de verschillende *spa*-typen werd verkregen uit de nationale MRSA-surveillance en uit de resultaten van de MLST-typeringen. Zodoende kan met grote zekerheid worden bepaald of de gevonden *spa*-typen in het LNV-project tot het veegerelateerde ST398-cluster gerekend konden worden. Indien van een dierlijk monster een *spa*-type werd gevonden dat niet tot de ST398-groep behoorde werd een MLST uitgevoerd voor nadere analyse. Dit is met name in Project 15 het geval. Voor Project 9 werden een aantal *spa*-typen gevonden waarvan we niet zeker wisten of dit nu werkelijk veegerelateerde *spa*-typen waren. Er werden onder andere *spa*-typen gevonden die niet eerder in andere deelprojecten gevonden waren, zoals bijvoorbeeld *spa*-type t2510 en t3423. MLST-typering bracht hierin uitkomst.

Alle gevonden *spa*-typen binnen het LNV MRSA-project die in de tabellen met een \* zijn aangegeven zijn nauw verwant aan elkaar. Dit houdt in dat de DNA-sequentie van het proteïne A-gen heel erg op elkaar lijkt. Elke kleine wijziging in het DNA zorgt ervoor dat de *spa*-typering als uitslag een ander *spa*-type geeft. In praktijk betekent dit echter dat ze heel erg op elkaar lijken of van elkaar kunnen afstammen. Vanwege de verwantschap van de *spa*-typen worden ze daarom ook wel binnen één groep geplaatst, namelijk de veegerelateerde ST398-groep. Het vinden van verschillende *spa*-typen binnen bijvoorbeeld een bedrijf kan dus inhouden dat de gevonden *spa*-typen op dat bedrijf ontstaan zijn doordat het DNA van de MRSA een wijziging heeft ondergaan, zeker indien het om een gesloten bedrijf gaat. Indien het om een open bedrijf zou gaan kunnen de verschillende *spa*-typen ook geïntroduceerd zijn door bijvoorbeeld verschillende batches van varkens. Het trekken van conclusies dient daarom samen te gaan met de verkregen epidemiologische data.

In totaal zijn er 2662 isolaten getypeerd. In elk deelproject werden *spa*-typen t011 en t108 gevonden. Deze twee typen zijn ook de meest voorkomende *spa*-typen in Nederland (Haenen et al., 2009). Het merendeel van de MRSA-isolaten blijkt tot het ST398-cluster te behoren. Hierbinnen zijn in totaal 31 *spa*-typen gevonden. In Project 8 blijken slechts twee *spa*-typen gevonden te zijn die niet tot het ST398-cluster behoren, namelijk t002 en t127. *Spa*-type t002 is veelvoorkomend *spa*-type bij mensen. Het *spa*-type t127 is al eerder in verband gebracht met dieren, namelijk in koeien (Juhász-Kaszanyitzky et al., 2007) en paarden (Cuny et al., 2008).

Project 9 vertoonde de grootste diversiteit aan *spa*-typen. Veel *spa*-typen werden echter sporadisch gevonden

en behoorden niet tot het ST398-cluster. Bij zowel de humane als de kalvermonsters is *spa*-type t011 het meestvoorkomend. Opvallend is de hoge frequentie van *spa*-type t034 in vergelijking tot *spa*-type t108. Slechts 7 van de 209 kalvermonsters heeft *spa*-type t108.

In Project 11 zijn zes verschillende *spa*-typen gevonden. Twee daarvan behoorden niet tot het ST398, namelijk t002 en t1430. *Spa*-type t1430 is al eerder gevonden bij kippen. In vijf kippenvleesmonsters werd dit type aangetoond, zie onder andere deelproject 15: MRSA in dierlijke producten (De Boer et al., 2008). Het lijkt erop dat *spa*-type t140 (ST9) misschien een veegerelateerd *spa*-type is dat buiten de bekende ST398-groep valt. Nader onderzoek is nodig om dit verder te analyseren.

De monsters afgenomen voor Project 12, 13 en 14 vertoonden alle *spa*-typen behorend tot het ST398-cluster. Opvallend was dat *spa*-type t943 relatief veel werd gevonden in Project 12. Dit *spa*-type werd al eerder bij varkens (De Neeling et al., 2007) en een varkenshouder gevonden (Voss et al., 2005).

Project 15 is inmiddels gepubliceerd (De Boer et al., 2008). Voor dit project is een groot aantal MLST-typeringen uitgevoerd omdat er veel *spa*-typen werden gevonden die niet tot de ST398-groep behoorden. Veel MRSA-monsters die binnen Project 15 vielen konden niet direct op het lysaat getypeerd worden; er moest een DNA-isolatie aan te pas komen. De reden hiervoor is nog onduidelijk, maar gaf verder geen problemen meer.

## Aanbevelingen

*Spa*-typering is een zeer bruikbare methode voor de typering van MRSA-isolaten. Er kan snel een resultaat behaald worden, er is sprake van een hoge reproduceerbaarheid en internationale vergelijkbaarheid is mogelijk. Veel LA-MRSA-isolaten hebben als typeerresultaat *spa*-type t011 of t108. Dit kan ervoor zorgen dat het moeilijker wordt om te bepalen of er daadwerkelijk verspreiding of overdracht heeft plaatsgevonden. Recent is de PFGE typeermethode aangepast (Bosch et al., 2009). Deze typering kan in specifieke gevallen toegepast worden om tot een eenduidige conclusie te komen.

## Gerelateerde projecten

Dit onderzoek betreft Project 7 van het LNV-programma MRSA en is gerelateerd aan de volgende projecten binnen dat programma:

- Project 8: prevalentie varkenshouderijen
- Project 9: prevalentie vleeskalverbedrijven
- Project 11: prevalentie pluimvee
- Project 12: ketenanalyse
- Project 13: MRSA-transmissie bij varkens
- Project 14: MRSA in stof
- Project 15: MRSA in dierlijke producten

## Output

Geen. Alle resultaten werden teruggekoppeld naar de desbetreffende deelprojectleiders.

## Literatuur

Boer de E., Zwartkruis-Nahuis J.T., Wit B., Huijsdens X.W., de Neeling A.J., Bosch T., van Oosterom R.A., Vila A., Heuvelink A.E., 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *J. Food Micro.* 134, 52-56.

Bosch, T., Neeling de, A.J., Schouls, L.M. van der Zwaluw K.W., Kluytmans, J.A.J.W., Grundmann, H., Huijsdens, X.W., 2009. PFGE diversity within the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineage ST398. Submitted for publication.

Broek van den, I.V.F., van Cleef, B.A.G.L., Haenen, A., Broens, E.M., van der Wolf, P.J., van den Broek, M.J.M., Huijsdens, X.W., Kluytmans, J.A.J.W., van de Giessen, A.W., Tiemersma, E.W., 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working at pig farms in the Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 137, 700-708.

Cuny, C., Strommenger, B., Witte, W., Stanek, C., 2008. Clusters of infections in horses with MRSA ST1, ST254 and ST398 in a veterinary hospital. *Micr. Drug Res.* 14, 307-310.

Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G., 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1008-1015.

Haenen, A., Huijsdens, X.W., Pluister, G.N., van Luit, M., Bosch, T. van Santen-Verheuevel, M.G., Spalburg, E., Heck, M.E.O.C., van de Sande-Bruinsma, N., Geenen, P.L., Mulders, M.N., Neeling, A.J., 2009. Surveillance van MRSA in Nederland gedurende 2007: stijgende trend van aan vee gerelateerde MRSA. *Infectieziekten Bulletin*, 20, 138-145.

Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothganger, J., Claus, H., Turnwald, D., Vogel, U., 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5442-5448.

Huijsdens, X.W., van Dijke, B.J., Spalburg, E., van Santen-Verheuevel, M.G., Heck, M.E., Pluister, G.N., Voss, A., Wannet, W.J., de Neeling, A.J., 2006. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5, 26.

Juhász-Kaszanyitzky, E., Jánosi, S., Somogyi, P., Dán, A., van der Graaf-van Bloois, L., van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A., 2007. MRSA Transmission between Cows and Humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 630-632.

Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al., 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1128-1132.

Loo van, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E., de Neeling, A., van de Sande-Bruinsma, N., Beaujean, D., 2007. Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* of Animal Origin in Humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1834-1839.

Martineau, F., Picard, F.J., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 618-623.

Neeling de, A.J., van Leeuwen, W.J., Schouls, L.M., Schot, C.S., van Veen Rutgers, A., Beunders, A.J., Buiting, A.G., Hol, C., Ligetvoet, E.E., Petit, P.L., Sabbe, L.J., van Griethuysen, A.J., van Embden, J.D., 1998. Resistance of staphylococci in The Netherlands: surveillance by an electronic network during 1989-1995. *J. Antimicrob. Chemother.* 41, 93-101.

Neeling de, A.J., van den Broek, M.J., Spalburg, E.C., van Santen-Verheuevel, M.G., Dam-Deisz, W.D., Boshuizen, H.C., van de Giessen, A.W., van Duijkeren, E., Huijsdens, X.W., 2007. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet. Microbiol.* 122, 366-372.

Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., Wulf, M., 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1965-1966.



## APPENDIX 6

### Project 8: prevalentieschatting en risicofactorenanalyse MRSA bij varkens

#### Projectleider

P. van der Wolf, GD

#### Projectteam

E.M. Broens, QVE-WUR en Cib-RIVM.  
 E.A.M. Graat, QVE-WUR.  
 M.C.M. de Jong, QVE-WUR  
 M. Meijerink en laboratoriummedewerkers GD.  
 I.V.F. van de Broek, B.A.G.L. van Cleef, X.W. Huijsdens  
 en laboratoriummedewerkers Cib-RIVM.  
 D.J. Mevius, CVI-WUR.  
 R.A.A. van Oosterom en buitendienstmedewerkers VWA.

#### Samenwerking

Veehouders.  
 GD-projectteam 'EU baseline studie'

#### Samenvatting

Een nieuwe kloon van meticilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA ST398) is in 2005 voor het eerst beschreven in varkens en mensen in contact met varkens. Verschillende studies rapporteren prevalenties van MRSA-positieve bedrijven en hebben risicofactoren voor mensen werkzaam op varkenshouderijen geïdentificeerd. Over risicofactoren voor varkensbedrijven om MRSA-positief te worden is echter nog weinig bekend. Het doel van deze studie was om een betrouwbare nationale prevalentie voor MRSA-positieve varkensbedrijven en voor personen woonachtig en/of werkzaam op die bedrijven te bepalen en om risicofactoren te identificeren en te kwantificeren. Gedurende 2007 en 2008 is een studie uitgevoerd op 202 varkensbedrijven, 171 bedrijven met zeugen en 31 bedrijven zonder zeugen. Op deze bedrijven werden random 60 varkens bemonsterd met behulp van een neusswab, gepooled tot 10 monsters. Daarnaast werden 5 stofmonsters genomen verspreid over het bedrijf. Op de eerste 50 bedrijven werden ook de personen woonachtig en/of werkzaam op het bedrijf en de monsternemers bemonsterd (neusswab). Met behulp van een enquête werd informatie over bedrijfskenmerken (onder andere bedrijfsvoering, hygiëne, stalinrichting, toepassing van antibiotica) en voor de personen over hun activiteiten op het bedrijf verzameld. Microbiologische analyse werd gedaan op individuele humane monsters, individuele omgevingsmonsters en op gepoolde varkensmonsters (6 swabs per pool). Statistische analyse om risicofactoren te identificeren werd voor varkensbedrijven uitgevoerd op gegevens van 171 zeugenbedrijven en voor personen op gegevens van 232 personen. De prevalentie van MRSA-positieve personen was 14,2%;

er werden alleen MRSA-positieve personen gevonden op MRSA-positieve bedrijven. Op MRSA-positieve bedrijven nam de prevalentie van MRSA-positieve personen toe van 3% bij personen die geen contact hadden met varkens naar 49% bij personen die intensief contact hadden met varkens. Op bedrijven met zeugen was de MRSA-prevalentie onder personen hoger dan op bedrijven zonder zeugen. Monsternemers waren in 92% van de gevallen alleen kort na het bedrijfsbezoek MRSA-positief; slechts 1 monsternemer was gedurende een langere tijd MRSA-positief.

De prevalentie van MRSA-positieve varkensbedrijven in Nederland was 68,3%; van de bedrijven zonder zeugen (n=31) was 71,0% positief en van bedrijven met zeugen (n=171) was dat 67,8%. Op MRSA-positieve zeugenbedrijven was gemiddeld 63,3% van de pools en 33,8% van de stofmonsters MRSA-positief. In totaal zijn 18 verschillende *spa*-typen geïdentificeerd, waarvan t011 en t108 het meest frequent. Achtennegentig procent van de MRSA-isolaten behoorde tot ST398. Alle ST398-isolaten waren gevoelig voor mupirocin en linezolid en resistent tegen tetracycline. Resistentie tegen andere antibiotica varieerde binnen en tussen de verschillende *spa*-typen. In het statistische eindmodel voor risicofactoren voor varkensbedrijven bleven slechts twee factoren over: bedrijfsgrootte (aantal zeugen) en verloop in de tijd (maand). De prevalentie nam toe met de bedrijfsgrootte: kleine bedrijven (< 250 zeugen) waren in circa 40% van de gevallen MRSA-positief, oplopend tot meer dan 80% op grotere bedrijven (> 500 zeugen). Daarnaast nam het percentage positieve bedrijven toe in de tijd: van circa 30% in begin 2007 tot circa 75% eind 2008. Andere risicofactoren, zoals de aanwezigheid van vleesvarkens, de aanvoer van gelten of de hygiënescore, vielen uit het statistische model, maar waren alle geassocieerd met bedrijfsgrootte. De toepassing van antibiotica was niet significant geassocieerd met een hogere prevalentie, maar was wel geassocieerd met de bedrijfsgrootte. Bedrijven die preventief antibioticum toepassen in koppels zijn gemiddeld groter (486 zeugen) dan bedrijven die antibiotica curatief toepassen (415 zeugen) en veel groter dan bedrijven die geen antibioticum toepassen (355 zeugen).

Concluderend kan gezegd worden dat MRSA op een groot aantal zeugenbedrijven in Nederland voorkomt en dat de prevalentie in de tijd stijgt. Grote bedrijven hebben een verhoogd risico, wat verklaard kan worden door de bedrijfsgrootte zelf en door factoren die geassocieerd zijn met de bedrijfsgrootte, zoals de toepassing van antibiotica (verdeeld in preventief, curatief of geen), de aanvoer van gelten (ja of nee) en de ongediertebestrijding

(professioneel uitbesteed of zelf). De factor bedrijfsgrootte is hiermee een verzameling van allerlei (risico)factoren waardoor grotere bedrijven vaker MRSA-positief zijn, maar er kan niet worden aangeduid hoeveel deze factoren afzonderlijk bijdragen aan de kans op positief zijn. Personen die intensief contact hebben met MRSA-positieve varkens hebben een sterk verhoogd risico om MRSA-positief te zijn.

### Summary

In 2005 a distinct clone of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA ST398) was found in pigs and people in contact with pigs. Several studies report prevalences of MRSA-positive farms and identified risk factors for people working with pigs. Little is known on risk factors associated with MRSA on pig farms. The objective of this study was to estimate a reliable prevalence for MRSA-positive farms and for people working and/or living on these farms and to identify and quantify risk factors.

During 2007 and 2008 a study on 202 pig farms, 171 farms with sows and 31 farms without sows, was performed. On these farms a nasal swab was taken from 60, randomly selected, pigs. Additionally, 5 environmental samples were taken. On the first 50 farms, the people working and/or living on the farms and the sample takers were sampled (nasal swab) as well. Information was gathered on farm characteristics (e.g. management, hygiene and antimicrobial use) and for people on their activities at the farm. Microbiological analysis was done on individual human samples, individual environmental samples and pooled pig samples (6 swabs per pool). Statistical analysis to identify risk factors was done on data from 171 sow-farms and on data from 232 persons. The prevalence of MRSA-positive persons was 14.2%; MRSA-positive persons were only found on MRSA-positive farms. The human prevalence on MRSA-positive farms increased from 3% in people with no contact with pigs to 49% in people with intensive contact with pigs. The human prevalence was higher on farms with sows than on farms without sows. Sample takers were in 92% short-term carriers of MRSA; only 1 sample taker was MRSA-positive during a longer period.

The overall prevalence of MRSA-positive farms was 68.3%; for farms without sows the prevalence was 71.0% and for sow-farms the prevalence was 67.8%. On MRSA-positive sow-farms, on average 63.3% of the pools and 33.8% of the environmental samples was MRSA-positive. In total, 18 different *spa* types were identified, t011 and t108 being the most frequent ones. Ninety-eight percent of the MRSA-isolates belonged to ST398. All ST398-isolates were sensitive to mupirocin and linezolid and resistant to tetracycline. Resistance to other antimicrobials varied between and within *spa*-types.

In the final statistical model for risk factors for pig farms only two factors were associated with MRSA on a farm: herd size (number of sows) and time (months). The prevalence of MRSA-positive farms increased when the

number of sows on a farm increased: approximately 40% of the small herds (< 250 sows) was MRSA-positive versus > 80% of the larger herds (> 500 sows). The prevalence of MRSA-positive farms increased in time as well: from approximately 30% at the beginning of 2007 to approximately 75% at the end of 2008. Other risk factors, e.g. presence of finishing pigs, purchase of gilts or hygiene, dropped out of the statistical model but were associated with herd size. Antimicrobial use and MRSA on a farm were not significant associated, though antimicrobial use was associated with herd size. Farms that apply antimicrobials as group medication have more sows (486 sows) than farms that use antimicrobials just in case of disease (415 sows) and much more sows than farms that use no antimicrobials at all (355 sows). In conclusion, MRSA is present on a large number of Dutch sow-farms and the prevalence increases in time. Large herds have a higher risk, which can be explained by herd size itself and by the factors that are associated with herd size, e.g. antimicrobial use, the purchase of gilts and rodent control. Herd size is a reservoir of several risk factors, which makes that larger farms are more often MRSA-positive. Persons who have intensive contact with MRSA-positive pigs have a higher risk of being MRSA-positive.

### 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 [3-5]. Daarnaast blijkt deze kloon ook bij andere diersoorten en in vlees gevonden te worden [6-8]. Alle isolaten behoren tot hetzelfde Multi Locus Sequence Type (MLST), en daarom wordt veelal de term MRSA ST398 gehanteerd [9].

Verschillende studies rapporteren prevalenties van MRSA-positieve bedrijven, variërend van 23 tot 56%, en hebben risicofactoren voor mensen werkzaam op varkenshouderijen geïdentificeerd [10, 11]. Deze studies waren echter van beperkte omvang voor een betrouwbare prevalentieschatting. Om transmissie van varkens naar mensen te beperken, is bestrijding op varkensbedrijven een belangrijke factor. Over risicofactoren voor varkensbedrijven om MRSA-positief te worden is echter nog weinig bekend. De aankoop van dieren van MRSA-positieve bedrijven lijkt een belangrijke risicofactor te zijn [10, 12] en de toepassing van antibiotica wordt vaak gesuggereerd als risicofactor [10, 13] maar gegevens om deze suggesties te kwantificeren ontbreken tot nu toe. Het doel van deze studie is om een betrouwbare nationale prevalentie voor MRSA-positieve varkensbedrijven en voor personen woonachtig en/of werkzaam op die bedrijven te bepalen en om risicofactoren te identificeren en te kwantificeren.

## Materiaal en methoden

### Opzet van de studie

Gedurende 2007 en 2008 is een studie uitgevoerd. In 2007 werden 50 varkensbedrijven random geselecteerd van een lijst van alle geregistreerde varkensbedrijven in Nederland. De coördinatie en monsteranalyse vond plaats bij het RIVM, de monstername werd gedaan door VWA-medewerkers. Op deze bedrijven werden random 60 varkens bemonsterd met behulp van een neusswab (Medical Wire and Equipment, MW102, UK). Met deze steekproefgrootte is het mogelijk om MRSA op een bedrijf aan te tonen als de binnenbedrijfsprevalentie minimaal 5% is. Daarnaast werden vijf stofmonsters (Sodibox, s1 kit ringer solution, Frankrijk) genomen verspreid over het bedrijf. Met behulp van een enquête werd informatie over onder andere bedrijfsvoering, hygiëne, stalrichting en de toepassing van antibiotica verzameld. Per bemonsterde leeftijdsgroep werd informatie verzameld over de toegepaste antibiotica, de toedieningswijze en de reden van behandeling, waarbij een opsplitsing werd gemaakt in (1) 'standaard' (= preventief toegepaste medicatie op vaste momenten (bijvoorbeeld rondom ingrepen en verplaatsingen), vaak voorgeschreven voor een gehele groep), (2) 'incidenteel' (= incidentele, curatieve toepassing van antibiotica voorgeschreven aan individuele dieren en/of een gehele groep) en (3) 'geen antibiotica'. Op deze 50 bedrijven werden ook monsters genomen van de mensen woonachtig en werkzaam op het bedrijf. Varkenshouders, gezinsleden en medewerkers werden bemonsterd met behulp van een neusswab en kregen een vragenlijst over hun activiteiten in het bedrijf en andere gedragsfactoren.<sup>1</sup> De monsternemers van de VWA namen vlak voor, direct na en de dag na het bedrijfsbezoek bij zichzelf een neusswab. Over de humane data is in 2009 een wetenschappelijk artikel verschenen [11].

In 2008 is de coördinatie, monstername en monsteranalyse overgedragen aan de GD. Drie beweegredenen hebben ertoe geleid dat in 2008 alleen zeugenbedrijven werden geselecteerd voor de studie, namelijk: (1) uit voorlopige gegevens van de ketenstudie (project 12 LNV-programma) bleek dat aankoop van dieren een belangrijke risicofactor is voor vleesvarkensbedrijven om MRSA-positief te zijn, (2) de bedrijfsstructuur van bedrijven met en zonder zeugen is zodanig verschillend dat een analyse op een set gegevens afkomstig van beide soorten bedrijven moeilijk zou worden en afzonderlijke analyse zou leiden tot te kleine datasets om betrouwbare uitspraken te kunnen doen, en (3) er kon een koppeling gemaakt worden met de EU-baselinestudie naar *Salmonella* en MRSA op zeugenbedrijven.

In 2008 zijn in totaal 152 zeugenbedrijven bezocht van een random selectie van een lijst van alle geregistreerde varkensbedrijven in Nederland. Monstername op de

bedrijven was identiek aan die in 2007; er zijn op deze bedrijven geen humane monsters verzameld. In 2007 en 2008 zijn in totaal 202 varkensbedrijven bemonsterd. Volgens indeling van de Verordening Varkensleveringen 2006 (PVV) zijn deze onder te verdelen in 80 A-bedrijven, 91 B-bedrijven, 2 C-bedrijven en 29 D-bedrijven. De 171 bemonsterde zeugenbedrijven (categorie A en B) vertegenwoordigen 5,2% (171/3289<sup>2</sup>) van het totaal aantal zeugenbedrijven in Nederland. Voor A-bedrijven ligt het aandeel in deze studie hoger dan voor B-bedrijven, respectievelijk 18% (80/449) en 3% (91/2840). De verdeling van de 171 bedrijven over de provincies van Nederland was conform de verdeling van alle varkensbedrijven over de provincies en is weergegeven in Tabel A6.4. Het gemiddeld aantal zeugen per bedrijf was 431 (mediaan = 320; Q1-Q3=220-500; range 24-2100).

Om de resultaten van de microbiologische analyse van het laboratorium van het RIVM en dat van de GD met elkaar te vergelijken, werden 8 MRSA-positieve bedrijven uit de studie in 2009 opnieuw benaderd en bemonsterd. Hiertoe werden op ieder van deze bedrijven bij 60 dieren 2 neusswabs tegelijk afgenomen en werden 2 maal 5 stofmonsters genomen van aangrenzende oppervlakten. Ieder monster kreeg een volgnummer met erachter een A of een B en werd respectievelijk naar het laboratorium van het RIVM (A) of de GD (B) vervoerd. Daar werden de swabs in pools van 6 en de stofmonsters individueel onderzocht. De gebruikte kweekmethode was in beide laboratoria identiek (hieronder beschreven).

### Microbiologische analyse

Microbiologische analyse werd gedaan op individuele neusswabs van personen, individuele omgevingsmonsters en op gepoolde diermonsters (6 swabs per pool). Elke pool bevatte swabs van dieren uit één afdeling en één leeftijdsgroep (kraambiggen, speenbiggen, 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 [13]. Isolaten werden verder getypeerd met behulp van *spa*-typering op het RIVM [14]. Van de dier- en omgevingsmonsters werd een antibioticumgevoeligheidsbepaling gedaan van minstens 1 isolaat per bedrijf<sup>3</sup> op het CVI. Isolaten werden getest op hun gevoeligheid voor erythromycine, clindamycine, rifampicine, fusidinezuur, gentamicine, amikacine, neomycine, ciprofloxacine, tetracycline, mupirocin en linezolid. De humane isolaten werden op hun

<sup>2</sup> gebaseerd op gegevens van de GD, 4e kwartaal 2008

<sup>3</sup> Bij aanvang van de studie werd van alle MRSA-isolaten een antibioticumgevoeligheidsbepaling gedaan, maar halverwege de studie is dit aantal, vanwege budgettaire redenen, teruggebracht naar 1 isolaat per bedrijf.

<sup>1</sup> de vragenlijst is in te zien op de websites van Cib ([www.rivm.nl/cib/mrsa](http://www.rivm.nl/cib/mrsa)) en LNV ([www.minlnv.nl](http://www.minlnv.nl) (zie onder publicaties))

gevoeligheid voor 21 verschillende antibiotica getest met het VITEK systeem (bioMérieux SA, Craponne, France). In de rapportage zijn uitslagen van spa-typeringen van veterinaire monsters van twee bedrijven (13 isolaten) en de gegevens van de antibioticumgevoeligheid van veterinaire isolaten van 13 bedrijven (1 isolaat per bedrijf) niet meegenomen, omdat deze nog niet bekend waren ten tijde van de statistische analyse.

### Statistische analyse

#### *Humaan*

In totaal werden 232 personen afkomstig van 50 bedrijven bemonsterd (50 varkenshouders, 171 gezinsleden en 11 medewerkers). Informatie uit de ingevulde vragenlijst en uit de bedrijfsenquête werd gebruikt om variabelen te definiëren voor de statistische analyse.

De associatie tussen uitslagen en *spa*-typen van humane en veterinaire monsters werd getest met behulp van een chi-kwadraattoets. Potentiële risicofactoren voor MRSA in personen werden geïdentificeerd met behulp van een univariate logistische regressieanalyse in SAS, versie 9.1 (Proc Logistic) [15, 16]. De sterkte van de associatie tussen een variabele en de aanwezigheid van MRSA in personen is weergegeven in Odds Ratios [17]. Alle variabelen met een P-waarde  $< 0,2$  (gebaseerd op  $-2$  log likelihood) werden meegenomen in het multivariate model, waarbij een voorwaartse eliminatieprocedure werd toegepast. Vervolgens werden interacties tussen overgebleven variabelen getest. Omdat humane monsters afkomstig van één bedrijf meer op elkaar lijken dan humane monsters afkomstig van verschillende bedrijven is in de analyse een random bedrijfseffect meegenomen om hiervoor te corrigeren.

#### *Veterinair*

Een bedrijf werd als positief aangemerkt als minstens 1 van de stof- of poolmonsters positief op MRSA werd getest. Informatie uit de bedrijfsenquête werd gebruikt om variabelen te definiëren voor de statistische analyse (Tabel A6.1 en A6.2). Gezien de aandacht voor antibioticumtoepassing als risicofactor voor aanwezigheid van MRSA, is deze variabele op verschillende manieren geclassificeerd en meegenomen in de analyse (Tabel A6.3). In model a werd 'geen toepassing van antibiotica' vergeleken met 'wel toepassing van antibiotica'. In model b werd de toepassing van antibiotica gesplitst in 'incidentele toepassing' en 'standaardtoepassing'. Onder 'incidentele toepassing' werd hier verstaan, de curatieve toepassing van antibiotica bij een deel van de dieren. Terwijl met 'standaardtoepassing' preventief toegepaste groepsmedicatie bedoeld werd. In model c-e werden de 'risico-antibiotica' apart geanalyseerd. Tetracyclinen en bèta-lactam-antibiotica werden als risico-antibiotica gedefinieerd, aangezien MRSA ST398 100% resistent is tegen deze beide groepen antibiotica. Aangezien de gegevens over doseringen en duur van de behandeling op veel bedrijven onvolledig waren, was een analyse gebaseerd op dagdoseringen niet mogelijk.

Analyse werd uitgevoerd op 171 zeugenbedrijven; de 31 bedrijven zonder zeugen zijn niet meegenomen, gezien de afwijkende bedrijfsstructuur en daardoor ook mogelijk andere risicofactoren. Vervolgens is analyse gedaan op poolniveau, waarbij 1699 poolmonsters afkomstig van 170 zeugenbedrijven (op 1 bedrijf ontbraken de herkomstgegevens van de pool- en stofmonsters en op 1 bedrijf mist 1 monster). Deze analyse maakt het mogelijk om bepaalde variabelen die alleen van toepassing zijn op bepaalde leeftijdsgroepen specifiek te analyseren voor die betreffende leeftijdsgroep.

Potentiële risicofactoren voor MRSA op bedrijfs- en poolniveau werden geïdentificeerd met behulp van een univariate logistische regressie analyse in SAS, versie 9.1 (Proc Logistic) [15, 16]. De sterkte van de associatie tussen een variabele en de aanwezigheid van MRSA is weergegeven in Odds Ratios [17]. Alle variabelen met een P-waarde  $< 0,25$  (gebaseerd op  $-2$  log likelihood) werden meegenomen in het multivariate model. De variabelen 'bedrijfsomvang' (per zeug) en 'verloop in de tijd' (per maand) zijn variabelen op een continue schaal. Van de variabelen is de lineariteit van de logits beoordeeld, waarna beide als continue variabelen meegenomen zijn in het multivariate model [16]. Vervolgens werd in dit multivariate model een achterwaartse eliminatieprocedure uitgevoerd volgens de methode beschreven door Hosmer en Lemeshow [16]. Daarbij wordt telkens de minst significante variabele uit het model verwijderd, tot er enkel variabelen overblijven met een P-waarde  $< 0,05$  of variabelen die confounders zijn. Vervolgens werden interacties tussen overgebleven variabelen getest. Omdat poolmonsters afkomstig van één bedrijf meer op elkaar lijken dan poolmonsters afkomstig van verschillende bedrijven is in de analyse een random bedrijfseffect meegenomen om hiervoor te corrigeren (Proc Glimmix, SAS, versie 9.1).

Tabel A6.1 Variabelen van bedrijfsgegevens afgeleid van de enquête, met het aantal bedrijven en de bedrijfs- en poolprevalentie voor MRSA per categorie (n=171 bedrijven; n=1699 poolmonsters)

Variabele	frequentie (n)	bedrijfsprevalentie (%)	poolprevalentie (%)
periode (2007-1; 2007-2; 2008-1; 2008-2) <sup>1</sup>	16;5;91;59	37,5;40,0;71,4;72,9	25,6; 25,0; 44,4; 46,5
seizoen (lente, zomer, herfst, winter)	71; 42; 32; 26	74,7; 64,3; 75,0; 46,2	48,2; 45,7; 43,4; 23,6
varkensdichtheid regio ( $\leq 17$ ; $> 17$ varkens/ha)	88; 83	60,2; 75,9	39,9; 46,2
bedrijfstype (A;B)	<b>80; 91</b>	<b>76,3; 60,4</b>	<b>51,1; 35,8</b>
<b>aanvoer van gelten (ja; nee)</b>	<b>98; 73</b>	<b>66,3; 69,9</b>	<b>38,5; 48,9</b>
<b>aantal zeugen (&lt;250; 250-600; &gt; 600)<sup>1</sup></b>	<b>59; 79; 33</b>	<b>49,2; 73,4; 87,9</b>	<b>24,3; 48,2; 63,6</b>
<b>aanwezigheid van vleesvarkens (&lt;100; &gt; 100)</b>	<b>108; 63</b>	<b>71,3; 61,9</b>	<b>44,8; 39,8</b>
<b>aanwezigheid van andere dieren (ja;nee)</b>	<b>136;35</b>	<b>64,7; 80,0</b>	<b>38,9; 58,9</b>
melkvee (gem. 56.7, range 1-160, mediaan 40)	18;153	38,9; 71,2	
vleesvee (gem. 19.1, range 1-60, mediaan 6.5)	9; 162	100,0; 66,1	
pluimvee (gem. 1988.7, range, 1-50000, mediaan 8)	26; 145	71,0; 71,2	
schapen (gem. 31.2, range 2-200, mediaan 15)	25; 146	68,0; 67,8	
geiten (gem. 5.1, range 1-30, mediaan 2)	10; 161	90,0; 66,5	
paarden (gem. 5.4, range 1-80, mediaan 3)	44; 127	68,2; 67,7	
honden/katten (gem. 2.4, range 1-11, mediaan 2)	109; 62	65,1; 72,6	
<b>hygiëne score (laag; gemiddeld; hoog)<sup>2</sup></b>	<b>30; 98; 43</b>	<b>53,3; 69,4; 74,4</b>	<b>33,3; 42,6; 50,6</b>
reiniging en desinfectie (desinfectie; inweken; schoonspuiten; geen) <sup>4</sup>	90; 11; 61; 9	71,1; 63,6; 65,6; 55,6	44,9; 44,7; 39,5; 28,1
gebruik van desinfectiemiddelen (ja; nee) <sup>3</sup>	90; 80	71,1; 63,8	44,0; 41,4
ongediertebestrijding (zelf; professioneel)	100; 71	65,0; 71,8	40,4; 46,5
<b>vliegenbestrijding (ja; nee)</b>	<b>146; 25</b>	<b>71,2; 48,0</b>	<b>46,4; 22,8</b>
aparte stallen voor leeftijdsgroepen (ja; nee) <sup>3</sup>	115; 56	67,8; 67,9	41,2; 44,8
aparte kleding voor leeftijdsgroepen (ja; nee) <sup>3</sup>	23; 148	69,6; 67,6	47,8; 42,2
apart gereedschap voor leeftijdsgroepen (ja; nee) <sup>3</sup>	78; 93	73,1; 63,4	47,5; 39,1
huisvesting zeugen (ind; kleine groepen; grote groepen)	113; 33; 25	68,1; 66,7; 68,0	39,1; 47,1; 35,6 <sup>5</sup>
wassen kraamzeugen (ja; nee)	122; 49	69,7; 63,3	41,2; 30,6 <sup>5</sup>
overleggen van pasgeboren biggen (<24 hr; > 24 hr; beiden) <sup>4</sup>	96; 56; 19	66,7; 69,6; 68,4	51,8; 54,7; 58,3 <sup>5</sup>
groeps grootte gespeende biggen (1-15; >15; geen gespeende biggen)	110; 59; 2	63,6; 76,3; 50,0	48,0; 63,9; <sup>-5</sup>
groeps grootte vleesvarkens ( $\leq 10$ ; $> 10$ ; geen vleesvarkens)	120; 22; 29	70,8; 59,1; 62,1	28,6; 37,9 <sup>5</sup>
<b>vlotterton in drinkwatersysteem (ja; nee)<sup>3</sup></b>	<b>78; 93</b>	<b>60,3; 74,2</b>	<b>47,9; 37,1</b>
voersysteem vleesvarkens (brij; droogvoer; trog; geen vleesvarkens)	46; 58; 20; 29	71,7; 63,8; 70,0; 62,1	47,9; 37,4; 57,0; 34,1 <sup>5</sup>
voeren van bijproducten aan vleesvarkens (ja; nee; geen vleesvarkens)	35; 107; 29	68,6; 69,2; 62,1	53,7; 41,8; 34,1 <sup>5</sup>
aanzuren water bij vleesvarkens (ja; nee; geen vleesvarkens)	16; 126; 29	75,0; 68,3; 62,1	56,; 43,2; 34,1 <sup>5</sup>

**dikgedrukte variabelen hadden een P-waarde < 0,25 in de univariate analyse op bedrijfs- en poolniveau**

**cursief weergegeven variabelen hadden een P-waarde < 0,25 in de univariate analyse op poolniveau**

<sup>1</sup> variabelen zijn als continue variabele meegenomen in het multivariate model (zie Figuur 2 en 3)

<sup>2</sup> variabele is hier in 3 klassen ingedeeld: laag ( $\leq 3$  hygiënemaatregelen), gemiddeld (4 of 5 hygiënemaatregelen) of hoog ( $\geq 6$  hygiënemaatregelen); gescoorde hygiënemaatregelen: gebruik van douche, gebruik van water en zeep, aparte in- en uitgang hygiënesluis, gebruik desinfectiebak, gebruik hygiënesluis door veehouder zelf, aparte kleding en gereedschap per leeftijdsgroep

<sup>3</sup> variabelen zijn hier voor alle leeftijdsgroepen gezamenlijk gepresenteerd; analyse van effect per leeftijdsgroep is ook uitgevoerd

<sup>4</sup> er waren geen bedrijven die pasgeboren biggen niet overleggen

<sup>5</sup> prevalenties zijn gebaseerd op pools van de betreffende leeftijdsgroep

Tabel A6.2 Aantal pools, poolprevalentie voor MRSA en antibioticumtoepassing per leeftijdsgroep (totaal 1699 poolmonsters, afkomstig van 170 bedrijven)

leeftijdsgroep	frequentie (n)	poolprevalentie (%)	std abtoepassing (%)	std risico-ab (%)
zeugen	737	38,3	29,3	15,3
kraambiggen	322	53,4	65,5	56,2
speenbiggen	382	52,9	53,7	29,3
opfok	147	23,8	8,8	3,4
vleesvarkens	111	38,7	21,6	6,3

std = preventief toegepaste medicatie, vaak voorgeschreven voor een gehele groep/afdeling; ab=antibiotica; risico-ab = bèta-lactam antibiotica en/of tetracyclinen

Tabel A6.3 Verschillende indelingen van antibioticumtoepassing zoals gebruikt in de multivariate statistische analyse op poolniveau

model	klassen (n)	indeling van antibioticumtoepassing	poolprevalentie
a	2	wel; geen ab	45,5; 32,6
b	3	std ; inc ; geen ab	51,0; 40,5; 32,6
c	5	std risico-ab ; inc risico-ab; std overig; inc overig; geen ab	55,5; 42,3; 39,5; 34,4; 32,6
d	3	std risico-ab; overig ab; geen ab	55,5; 41,3; 32,6
e	3	risico-ab; overig ab; geen ab	46,9; 37,2; 36,2

std = preventief toegepaste medicatie, vaak voorgeschreven voor een gehele groep/afdeling) ; inc = incidentele, curatieve toepassing van antibiotica; ab = antibiotica; risico-ab = bèta-lactam antibiotica en/of tetracyclinen

Tabel A6.4 Aantal bedrijven, gemiddelde bedrijfsgrootte, bedrijfs- en poolprevalentie voor MRSA, het totaal aantal isolaten en het aantal en percentage van meestvoorkomende en overige spa-typen per provincie

provincie <sup>1</sup>	aantal bedrijven	gemiddelde bedrijfsgrootte	bedrijfsprevalentie (%)	poolprevalentie (%)	totaal aantal isolaten	t011		t108		t1457		overige spa-typen	
						n	%	n	%	n	%	n	%
Drenthe	4	342	0,0	0,0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
Flevoland	2	350	0,0	0,0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
Friesland	2	345	100,0	50,0	11	6	54,6	0	-	0	-	5	45,4
Gelderland	30	447	76,7	52,0	202	82	40,6	92	45,5	2	1,0	26	12,9
Groningen	4	245	25,0	15,0	8	0	-	0	-	8	100,0	0	-
Limburg	24	580	79,2	48,8	150	117	78,0	28	18,7	0	-	5	3,3
Noord-Brabant	63	428	73,0	44,7	345	139	40,3	162	47,0	1	0,3	43	12,4
Noord-Holland	1	220	0,0	0,0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
Overijssel	28	384	60,7	38,9	134	79	58,9	26	19,4	25	18,7	4	3,0
Utrecht	12	388	66,7	45,8	74	62	83,8	7	9,5	0	-	5	6,7
Zeeland	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zuid-Holland	1	100	0,0	0,0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
Totaal	171	431 <sup>2</sup>	67,8	43,0	924	485	52,5	315	34,1	36	3,9	88	9,5

<sup>1</sup> in de analyse zijn de provincies niet als variabele meegenomen, de regio-indeling naar varkensdichtheid had de voorkeur

<sup>2</sup> mediaan = 320; Q1-Q3=220-500; range 24-2100

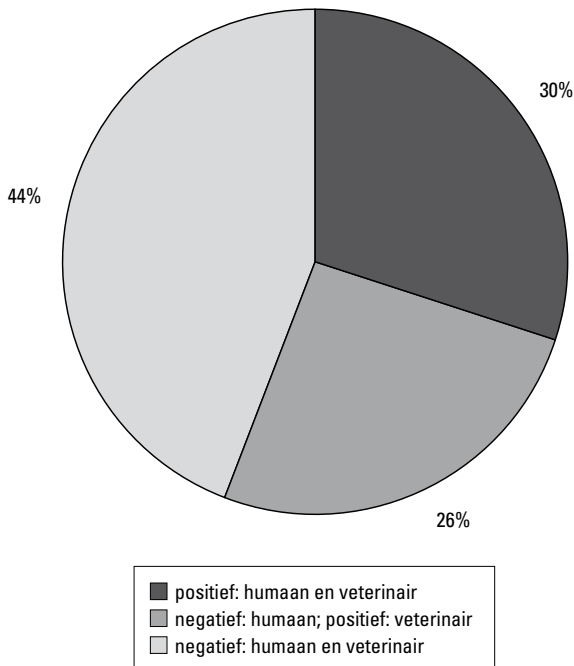
## Resultaten

### Beschrijvende statistiek

#### Prevalenties

##### Humaan

MRSA werd gevonden in 14% (33/232) van de bemonsterde personen en alleen op bedrijven waar ook MRSA werd gevonden in stof- en/of poolmonsters (Figuur A6.1).



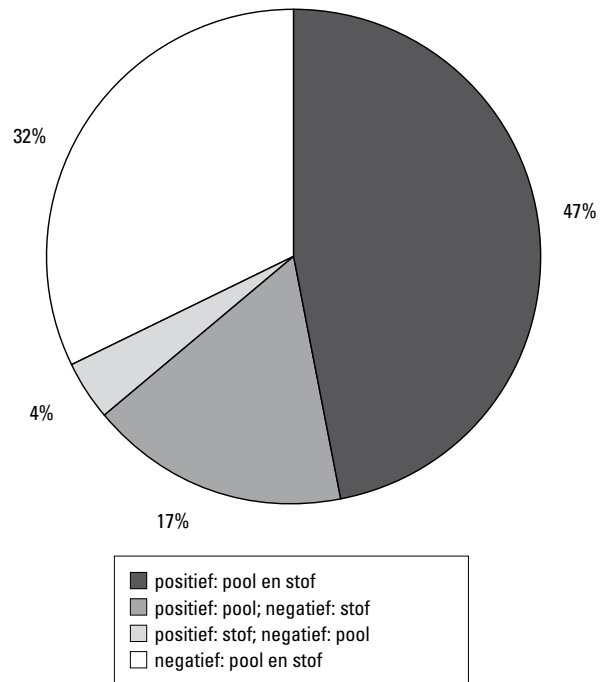
Figuur A6.1 Prevalentie van MRSA in humane en/of veterinaire monsters per varkensbedrijf (totaal 50 bedrijven)

Dertien van de 32 monsternemers van de VWA testten MRSA-positief op één of meerdere momenten. Tien monsternemers testten MRSA-positief direct na het bedrijfsbezoek en negatief de volgende dag. Drie monsternemers waren de volgende dag nog steeds MRSA-positief, waarvan twee negatief testten op een later moment. De derde was ook al MRSA-positief voor het bedrijfsbezoek met een *spa*-type dat niet correspondeerde met de gevonden *spa*-typen op de door hem bezochte bedrijven.

##### Veterinair

##### Totaal aantal bedrijven (n=202)

Van het totaal aantal bedrijven waren 138 bedrijven MRSA-positief (68,3%; 95% btbhi: 61,4-74,7%; Figuur A6.2). Per positief bedrijf was gemiddeld 61,8% (mediaan 70; Q1-Q3 40-80) van de poolmonsters en 37,5% (mediaan 40; Q1-Q3 20-60) van de stofmonsters positief. Van de positieve bedrijven was 69,6% positief op basis van pool- en stofmonsters, 24,6% op basis van alleen poolmonsters en 5,8% op basis van alleen stofmonsters.



Figuur A6.2 Bedrijfsuitslag voor MRSA van 202 varkensbedrijven gebaseerd op pool- en/of stofmonsters

##### Bedrijven zonder zeugen (n=31)

Van de bedrijven zonder zeugen (29 vleesvarkens- en 2 opfokbedrijven) waren 22 bedrijven MRSA-positief (71%; 95% btbhi: 52,0-85,8%). Per positief bedrijf was gemiddeld 53,6% (mediaan 55; Q1-Q3 20-90) van de poolmonsters en 57,3% (mediaan 60; Q1-Q3 20-100) van de stofmonsters positief. Van de positieve bedrijven was 68,2% positief op basis van pool- en stofmonsters, 13,6% op basis van alleen poolmonsters en 18,2% op basis van alleen stofmonsters.

##### Zeugenbedrijven (n=171)

Van de zeugenbedrijven waren 116 bedrijven MRSA-positief (67,8%; 95% btbhi: 60,3-74,8%). Per positief bedrijf was gemiddeld 63,3% (mediaan 70%. Q1-Q3=50-80%) van de poolmonsters en 33,8% (mediaan 20%. Q1-Q3=20-80%) van de stofmonsters positief. Van de positieve bedrijven was 69,8% positief op basis van pool- en stofmonsters, 26,7% op basis van alleen poolmonsters en 3,5% op basis van alleen stofmonsters. A-bedrijven (n=80) waren vaker MRSA-positief (76,3%) dan b-bedrijven (n=91; 60,4% MRSA-positief). Bedrijven die naast zeugen meer dan 100 vleesvarkens hadden (n=63) waren minder vaak MRSA-positief (61,9%) dan bedrijven die naast zeugen minder dan 100 vleesvarkens hadden (n=108; 71,3% MRSA-positief) (Tabel A6.1).

##### Spa-typering

##### Humaan

Van alle 33 positieve isolaten is een *spa*-typering bekend. Er werden 7 verschillende *spa*-typen gevonden, alle

behorend tot ST398. *Spa*-typen t011 (15), t567 (7) en t108 (5) werden het meest frequent gevonden. Andere *spa*-typen waren t899 (2), t2330 (2), t2741 (1) en t588 (1). In 30/33 personen kwam het *spa*-type overeen met de *spa*-typen die gevonden werden in omgevings- en/of poolmonsters afkomstig van het bedrijf. De overige drie personen droegen *spa*-typen bij zich die niet op het bedrijf werden geïsoleerd. Dit betrof twee medewerkers van één bedrijf waar naast varkens ook schapen en paarden werden gehuisvest en een gezinslid, ouder van een kind dat in het verleden MRSA-positief was getest (*spa*-type onbekend).

*Veterinair*

Van totaal 924 monsters, afkomstig van 114 MRSA-positieve zeugenbedrijven, is een *spa*-typering bekend. Er zijn 18 verschillende *spa*-typen gevonden, waarvan 16 typen (88,9%) behoren tot ST398 (Tabel A6.5). De andere 2 *spa*-typen, t002 (ST5) en t127 (ST1), werden respectievelijk op 1 en 2 bedrijven gevonden, als enige type op die bedrijven. *Spa*-typen t011 en t108 kwamen het meest frequent voor, respectievelijk 52,5% en 34,1%. Op 83 bedrijven (73% van de MRSA-positieve bedrijven) werd slechts 1 *spa*-type gevonden, op 23 bedrijven (20%) werden 2 *spa*-typen gevonden en op 8 bedrijven (7%) kwamen 3 *spa*-typen tegelijkertijd voor.

*Spa*-type t011 had de hoogste prevalentie in de provincies Limburg (78,0%), Friesland (54,6%), Overijssel (59,9%) en Utrecht (83,8%), terwijl *spa*-type t108 het meest voorkwam in Gelderland (45,5%) en Noord-Brabant (47,0%). In de provincies Gelderland, Limburg, Noord-Brabant en Utrecht bestond meer dan 85% van de isolaten uit de *spa*-types t011 en t108. *Spa*-type t1457 lijkt hoofdzakelijk voor te komen in Groningen (100%) en Overijssel (18,7%) (Tabel A6.4).

**Antibioticumresistentie**

*Humaan*

Alle humane isolaten waren resistent tegen tetracycline en gevoelig voor vancomycine, linezolid, mupirocin, teicoplanin, nitrofurantoin en rifampicine. Resistentie tegen fusidinezuur, ciprofloxacine, gentamicine, tobramycine, cotrimoxazole, erythromycine en clindamycine varieerde. Resistentie tegen cotrimoxazole, erythromycine en clindamycine kwamen het meest frequent voor (48%).

*Veterinair*

Van 344 isolaten, afkomstig van 103 zeugenbedrijven, is een antibioticumgevoeligheidsbepaling bekend. Op een bedrijf werden 1-15 isolaten getest (mediaan = 1; Q1-Q3 = 1-5). Alle isolaten (incl. ST1 en ST5) waren gevoelig

Tabel A6.5 *Spa*-type, repeat volgorde, MLST-type, frequentie van voorkomen (aantal en %) en het aantal bedrijven waar dit type gevonden werd

<i>spa</i> -type	repeat volgorde <sup>1</sup>	ST-type <sup>1</sup>	frequentie		bedrijven
			n	%	n
t002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-17	ST-5	5	0,5	1
t011	08-16-02-25-34-24-25	ST-398	485	52,5	69
t034	08-16-02-25-02-25-34-24-25	ST-398	3	0,3	1
t108	08-16-02-25-24-25	ST-398	315	34,1	50
t1184	08-16-02-25-25	ST-398	12	1,3	4
t127	07-23-21-16-34-33-13	ST-1	16	1,7	2
t1451	08-16-02-25-34-25	ST-398	1	0,1	1
t1456	08-16-02-25	ST-398	8	0,9	2
t1457	08-16-02-25-34-02-25-34-24-25	ST-398	36	3,9	9
t2011	08-16-16-02-25-34-24-25	ST-398	1	0,1	1
t2330	08-16-02-25-34-24-25-25	ST-398	9	1,0	1
t2346	08-16-02-25-34-24-24-25	ST-398	4	0,4	1
t3479	08-16-02-25-24-24-25	ST-398	3	0,3	1
t4119	09-02-25-24-25	ST-398	1	0,1	1
t567	08-02-25-24-25	ST398	11	1,2	2
t571	08-16-02-25-02-25-34-25	ST-398	4	0,4	1
t588	08-16-02-24-25	ST-398	4	0,4	1
t899	07-16-23-02-34	ST-398	6	0,6	3

dikgedrukte *spa*-typen behoren niet tot ST398

<sup>1</sup> afkomstig van [www.spaserver.ridom.de](http://www.spaserver.ridom.de)



Tabel A6.6 Aantal geteste MRSA-isolaten per spa-type en de prevalentie van voorkomen van resistentie tegen de geteste antibiotica

spa-type	t002 <sup>1</sup>	t011	t034	t108	t1184	t127 <sup>1</sup>	t1456	t1457	t2330	t2346	t567	t571	t588	totaal
aantal isolaten	5	202	1	94	3	1	1	15	1	4	11	1	4	344
Antibioticum														
Amikacine	0,0	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0	2,3
Ciprofloxacine	100,0	4,0	0,0	5,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	5,2
Clindamycine	40,0	59,9	100,0	58,5	66,7	100,0	100,0	33,3	100,0	100,0	9,1	0,0	100,0	57,6
Erythromycine	40,0	59,9	100,0	61,7	66,7	100,0	100,0	33,3	100,0	100,0	9,1	0,0	100,0	58,4
Fusidinezuur	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Gentamicine	60,0	66,3	0,0	4,3	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	42,4
Linezolid	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Mupirocin	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Neomycine	100,0	35,6	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	22,7
Rifampicine	0,0	0,0	0,0	10,6	33,3	0,0	0,0	26,7	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	5,5
Tetracycline	40,0	100	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,1

<sup>1</sup> geen ST398

voor mupirocin en linezolid; de ST398-isolaten en t127 (ST1) waren resistent tegen tetracycline. Resistentie tegen clindamycine en erythromycine werd in respectievelijk 57,6% en 58,4% van de isolaten gezien en komt ook bij bijna alle spa-typen voor. Resistentie tegen gentamicine (42,4%) en neomycine (22,7%) komt eveneens regelmatig voor. In spa-type t011 kwam resistentie tegen gentamicine (66,3%) en neomycine (35,6%) vaker voor dan in spa-type t108 (respectievelijk 4,3 en 1,1%) (Tabel A6.6).

### Risicofactorenanalyse

#### Humaan

In de univariate analyse kwam de mate van contact met varkens op een MRSA-positief bedrijf als belangrijke risicofactor naar voren (Tabel A6.7). In personen met intensief contact met varkens was de prevalentie 28,6%, terwijl deze 1,8% was in personen die geen contact hadden met varkens. Op MRSA-positieve bedrijven

was de prevalentie voor personen met intensief contact 49,1% en voor personen zonder contact 2,9%. Als op het bedrijf zeugen aanwezig waren was de MRSA-prevalentie onder personen op dat bedrijf hoger dan als er alleen vleesvarkens aanwezig waren op het bedrijf.

Aangezien op MRSA-negatieve bedrijven geen MRSA-positieve personen werden gevonden, werden in de multivariate analyse alleen gegevens van personen afkomstig van een MRSA-positief bedrijf meegenomen (n=139, afkomstig van 28 bedrijven). Na multivariate analyse bleven alleen de mate van contact met varkens en de aanwezigheid van zeugen en vleesvarkens over als verklarende variabelen (Tabel A6.8). Personen die dagelijks werkzaam waren in de varkenshouderij hadden een 40 maal hoger risico om MRSA-positief te zijn dan personen die niet in contact kwamen met varkens. En als er zeugen en vleesvarkens aanwezig waren op het bedrijf was het risico op MRSA-positief zijn 9 maal hoger dan als er alleen vleesvarkens aanwezig waren op het bedrijf.

Tabel A6.7 MRSA-prevalentie van personen woonachtig en/of werkzaam op varkensbedrijven (univariate logistische regressie)

	personen van alle bedrijven		personen van MRSA-positieve bedrijven	
	totaal	% MRSA	totaal	% MRSA
totaal	232	14,2%	139	23,7%
intensief contact met varkens <sup>1</sup>	98	28,6%	57	49,1%
minimaal contact met varkens <sup>2</sup>	25	12,0%	14	21,4%
geen contact met varkens	109	1,8%	68	2,9%
zeugen en vleesvarkens aanwezig	58	25,9%	32	46,9%
alleen zeugen aanwezig	40	12,5%	9	55,6%
alleen vleesvarkens aanwezig	129	10,1%	98	13,3%
alleen opfokvarkens aanwezig	5	0,0%	0	0,0%

#### dikgedrukte variabelen hadden een P-waarde < 0,05

<sup>1</sup> intensief contact = personen dagelijks werkzaam in de varkenshouderij

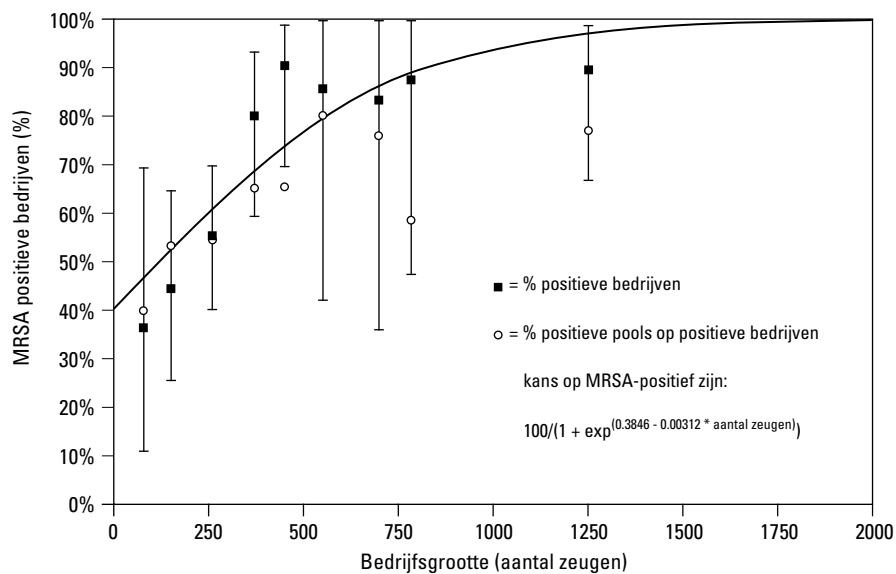
<sup>2</sup> minimaal contact = personen niet werkzaam in de veehouderij, maar minimaal 1x per week contact met varkens

Tabel A6.8 Variabelen en hun effect in het multivariate eindmodel voor MRSA-positieve personen op MRSA-positieve varkensbedrijven

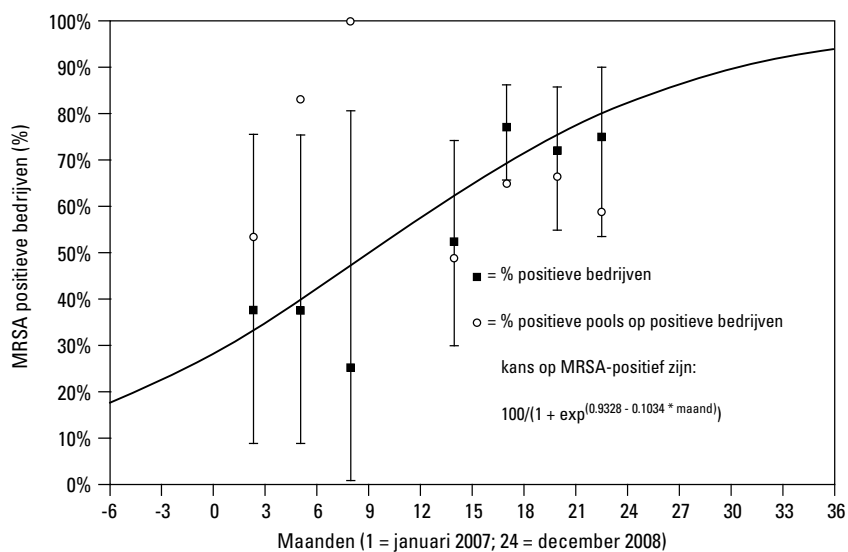
	OR	95% btbhi	P-waarde
intensief contact met varkens <sup>1</sup>	39,9	7,6-208,8	<0,0001
minimaal contact met varkens <sup>2</sup>	9,4	1,2-73,5	0,03
geen contact met varkens	ref	ref	
zeugen en vleesvarkens aanwezig	8,8	2,6-29,9	0,001
alleen zeugen aanwezig	3,5	0,8-16,6	0,11
alleen vleesvarkens aanwezig	ref	ref	

<sup>1</sup>intensief contact = personen dagelijks werkzaam in de varkenshouderij

<sup>2</sup>minimaal contact = personen niet werkzaam in de veehouderij, maar minimaal 1x per week contact met varkens



Figuur A6.3. Percentage MRSA-positieve bedrijven en het percentage positieve pools op positieve bedrijven gerelateerd aan de bedrijfsgrootte (aantal zeugen)



Figuur A6.4. Het verloop van het percentage MRSA-positieve bedrijven en het percentage positieve pools op positieve bedrijven in de tijd (onderzoekperiode in maanden; start onderzoek in maand 1)

Tabel A6.9 Variabelen en hun effect in het multivariate eindmodel voor het risico MRSA-positief zijn van een bedrijf (n=171)

variabele	categorie	OR	95% btbhi	P-waarde
aantal zeugen per 100	continu	1,32	1,11-1,57	0,0016
tijdsverloop per maand	continu	1,09	1,02-1,16	0,0146

### Veterinair

#### Bedrijfsniveau

Uit de univariate analyse op bedrijfsniveau (n=171) bleven tien variabelen over voor de multivariate analyse (Tabel A6.1). Aangezien niet in beide jaren in alle seizoenen gemeten is, seizoen verstrengeld was met bedrijfsgrootte (Tabel A6.11) en 'verloop in de tijd' als variabele zeer significant was in de univariate analyse, is gekozen voor 'verloop in de tijd' in het multivariate model en is seizoen niet meegenomen in het startmodel. Na verwijdering van telkens de minst significante variabele uit het model bleven uiteindelijk de bedrijfsgrootte (per 100 zeugen) en het verloop in de tijd (per maand) als verklarende variabelen over (Tabel A6.9). Er was geen significante interactie aanwezig tussen beide variabelen. De prevalentie nam significant ( $P < 0,0001$ ) toe met de bedrijfsgrootte: bedrijven met minder dan 250 zeugen zijn in circa 40% van de gevallen MRSA-positief, oplopend tot meer dan 80% op bedrijven groter dan 500 zeugen. Ook het percentage positieve pools per bedrijf laat een stijgende lijn zien bij toename van het aantal zeugen: van circa 50% op bedrijven met minder dan 250 zeugen, oplopend tot circa 75% op bedrijven groter dan 500 zeugen (Figuur A6.3). Daarnaast nam het percentage positieve bedrijven toe in de tijd: van circa 30% in het eerste kwartaal van 2007 tot circa 75% in het laatste kwartaal van 2008. Het percentage positieve pools op een positief bedrijf nam niet toe in de tijd, maar bleef nagenoeg gelijk op ongeveer 60-65% (Figuur A6.4).

#### Poolniveau (n=1699)

Naast de tien variabelen die ook in het model op bedrijfsniveau zijn meegenomen, bleven 'aanvoer van gelten ja/nee', 'antibioticumtoepassing' en 'leeftijdsgroep' op basis van de univariate analyse over naast de variabelen 'bedrijfsgrootte' en 'verloop in de tijd' voor het multivariate model op poolniveau (Tabel A6.1-3). Seizoen is om dezelfde reden als in de analyse op bedrijfsniveau niet meegenomen in de analyse op poolniveau. Antibioticumtoepassing is op vijf verschillende manieren in klassen ingedeeld (Tabel A6.3) en multivariate analyse is vijf keer uitgevoerd voor met iedere classificatie een afzonderlijk model (model a-e). Na verwijdering van telkens de minst significante variabele uit het model bleven uiteindelijk bedrijfsgrootte (aantal zeugen; OR weergegeven per 100 zeugen), het verloop in de tijd en de leeftijdsgroep over als verklarende variabelen met een P-waarde  $< 0,05$  (Tabel A6.10a-e). Evenals in de analyse op bedrijfsniveau neemt het risico op positief zijn toe in de tijd en met de bedrijfsgrootte. Daarnaast zijn poolmonsters van zeugen in 38,3% van de gevallen

positief. Poolmonsters van opfokdieren zijn minder vaak positief (23,8%), die van vleesvarkens in gelijke mate (38,7%). Poolmonsters van speen- en kraambiggen zijn daarentegen vaker positief (respectievelijk 52,9 en 53,4%).

Gezien de aandacht voor antibioticumtoepassing is deze variabele, ondanks een P-waarde  $> 0,05$ , in alle eindmodellen opgenomen (Tabel A6.10a-e). Het weglaten van de variabele antibioticumtoepassing had geen enkel effect op de schattingen van de andere variabelen in het eindmodel. Poolmonsters van dieren die met antibioticum behandeld worden zijn vaker positief (45,5%) dan poolmonsters van dieren die niet met antibiotica behandeld worden (32,6%) (Tabel A6.10a). Bij de opsplitsing van antibioticumtoepassing in standaard (preventief) en incidenteel (alleen curatief), blijken poolmonsters van varkens die standaardbehandelingen krijgen vaker positief (51,0%) dan die van varkens die incidenteel behandeld worden (40,5%) (Tabel A6.10b). In de categorieën waar risico-antibiotica (bèta-lactam-antibiotica en tetracyclinen) toegepast worden, zijn telkens de meeste poolmonsters MRSA-positief in vergelijking met de categorieën waarin geen antibiotica of andere (niet-risico)-antibiotica worden toegepast (Tabel A6.10c-e). Het percentage dieren en de klasse van antibioticumtoepassing varieert tussen de verschillende leeftijdsgroepen. Het toepassen van standaardbehandelingen, met name van de risico-antibiotica, bij kraam- en speenbiggen is significant hoger dan in de andere drie leeftijdsgroepen ( $P < 0,0001$ ; Tabel A6.2). Ondanks een P-waarde  $< 0,0001$  in de univariate analyse (en dus ongecorrigeerd voor ander factoren), was de variabele 'antibioticumtoepassing' niet significant in de vijf multivariate eindmodellen. Er was geen significante interactie aanwezig tussen de variabelen in de verschillende eindmodellen. De resultaten van de modellen bij logistische regressie met en zonder random bedrijfseffect, om te corrigeren voor de afhankelijkheid van poolmonsters van één bedrijf, waren nauwelijks verschillend van elkaar. In de tabellen A6.10a-e zijn daarom alleen de resultaten van de modellen met random bedrijfseffect opgenomen.

Tabel A6.10a Variabelen en hun effect in eindmodel a voor MRSA-positief zijn op poolmonsterniveau, gecorrigeerd voor bedrijfseffect (n=1699)

variabele	categorie	frequentie		prevalentie	OR	95% btbhi	P-waarde	P-overall
		n	%					
aantal zeugen per 100	continu				1,30	1,17-1,45	< 0,0001	
tijdsverloop per maand	continu				1,10	1,01-1,19	0,0244	
leeftijdsgroep	opfok	147	8,7	23,8	0,23	0,13-0,41	< 0,0001	< 0,0001
	vleesvarkens	111	6,5	38,7	1,84	0,94-3,60	0,0735	
	speenbiggen	382	22,5	52,9	4,60	3,10-6,81	< 0,0001	
	kraambiggen	322	19,0	53,4	3,65	2,44-5,45	< 0,0001	
	zeugen	737	43,4	38,3	ref	ref	ref	
antibioticumtoepassing	ja	1395	82,1	45,5	1,68	0,98-2,88	0,0614	
	nee	304	17,9	32,6	ref	ref	ref	

Tabel A6.10b Variabelen en hun effect in eindmodel b voor MRSA-positief zijn op poolmonsterniveau, gecorrigeerd voor bedrijfseffect (n=1699)

variabele	categorie	frequentie		prevalentie	OR	95% btbhi	P-waarde	P-overall
		n	%					
aantal zeugen per 100	continu				1,31	1,17-1,46	< 0,0001	
tijdsverloop per maand	continu				1,10	1,01-1,19	0,0245	
leeftijdsgroep	opfok	147	8,7	23,8	0,23	0,13-0,41	< 0,0001	< 0,0001
	vleesvarkens	111	6,5	38,7	1,82	0,93-3,56	0,0809	
	speenbiggen	382	22,5	52,9	4,77	3,17-7,17	< 0,0001	
	kraambiggen	322	19,0	53,4	3,86	2,50-5,97	< 0,0001	
	zeugen	737	43,4	38,3	ref	ref	ref	
antibioticumtoepassing	standaard	669	39,4	51,0	1,80	1,01-3,21	0,0473	0,1396
	incidenteel	726	42,7	40,5	1,56	0,87-2,79	0,1392	
	nee	304	17,9	32,6	ref	ref	ref	

Tabel A6.10c Variabelen en hun effect in eindmodel c voor MRSA-positief zijn op poolmonsterniveau, gecorrigeerd voor bedrijfseffect (n=1699)

variabele	categorie	frequentie		prevalentie	OR	95% btbhi	P-waarde	P-overall
		n	%					
aantal zeugen per 100	continu				1,31	1,17-1,46	< 0,0001	
tijdsverloop per maand	continu				1,10	1,01-1,19	0,0236	
leeftijdsgroep	opfok	147	8,7	23,8	0,23	0,13-0,40	< 0,0001	
	vleesvarkens	111	6,5	38,7	1,74	0,88-3,43	0,1090	
	speenbiggen	382	22,5	52,9	4,77	3,19-7,14	< 0,0001	
	kraambiggen	322	19,0	53,4	4,02	2,55-6,32	< 0,0001	
	zeugen	737	43,4	38,3	ref	ref	ref	
antibioticumtoepassing	risico-std	418	24,6	55,5	2,16	0,92-5,12	0,0790	0,2745
	risico-inc	778	45,8	42,3	2,09	0,86-5,11	0,1042	
	overig-std	109	6,4	39,5	1,70	0,94-3,10	0,0814	
	overig-inc	90	5,3	34,4	1,40	0,75-2,61	0,2938	
	nee	304	17,9	32,6	ref	ref	ref	

Tabel A6.10d Variabelen en hun effect in eindmodel d voor MRSA-positief zijn op poolmonsterniveau, gecorrigeerd voor bedrijfseffect (n=1699)

variabele	categorie	frequentie		prevalentie	OR	95% btbhi	P-waarde	P-overall
		n	%					
aantal zeugen per 100	continu				1,31	1,17-1,46	< 0,0001	
tijdsverloop per maand	continu				1,10	1,01-1,19	0,0241	
leeftijdsgroep	opfok	147	8,7	23,8	0,23	0,13-0,41	< 0,0001	< 0,0001
	vleesvarkens	111	6,5	38,7	1,79	0,91-3,51	0,0921	
	speenbiggen	382	22,5	52,9	4,79	3,21-7,16	< 0,0001	
	kraambiggen	322	19,0	53,4	4,06	2,59-6,37	< 0,0001	
	zeugen	737	43,4	38,3	ref	ref	ref	
antibioticumtoepassing	risico-std	418	24,6	55,5	1,43	0,77-2,66	0,2542	0,1016
	overig	977	57,5	41,3	1,83	1,04-3,22	0,0370	
	nee	304	17,9	32,6	ref	ref	ref	

Tabel A6.10e Variabelen en hun effect in eindmodel e voor MRSA-positief zijn op poolmonsterniveau, gecorrigeerd voor bedrijfseffect (n=1699)

variabele	categorie	frequentie		prevalentie	OR	95% btbhi	P-waarde	P-overall
		n	%					
aantal zeugen per 100	continu				1,31	1,17-1,46	< 0,0001	
tijdsverloop per maand	continu				1,10	1,01-1,19	0,0233	
leeftijdsgroep	opfok	147	8,7	23,8	0,23	0,13-0,40	< 0,0001	< 0,0001
	vleesvarkens	111	6,5	38,7	1,77	0,90-3,47	0,0982	
	speenbiggen	382	22,5	52,9	4,62	3,11-6,85	< 0,0001	
	kraambiggen	322	19,0	53,4	3,68	2,46-5,51	< 0,0001	
	zeugen	737	43,4	38,3	ref	ref	ref	
antibioticumtoepassing	risico	1196	70,4	46,9	1,57	0,89-2,74	0,1168	0,1068
	overig	199	11,7	37,2	2,09	1,04-4,17	0,0376	
	nee	304	17,9	32,6	ref	ref	ref	

standaard = preventief toegepaste medicatie, vaak voorgeschreven voor een gehele groep/afdeling; incidenteel = incidentele, curatieve toepassing van antibiotica; risico-std = standaardtoepassing van bèta-lactam antibiotica en/of tetracyclinen; risico-inc = incidentele toepassing van bèta-lactam antibiotica en/of tetracyclinen; overig-std = standaardtoepassing van antibiotica anders dan bèta-lactam antibiotica en/of tetracyclinen; overig-inc = incidentele toepassing van antibiotica anders dan bèta-lactam antibiotica en/of tetracyclinen; risico = toepassing van bèta-lactam antibiotica en/of tetracyclinen; overig = toepassing van antibiotica anders dan bèta-lactam antibiotica en/of tetracyclinen

### Effect van bedrijfsgrootte

Uit de multivariate analyse op bedrijfsniveau vallen veel verklarende variabelen, die geselecteerd waren op basis van de univariate analyse, weg. Dit zijn het bedrijfstype (A of B), de varkensdichtheid van de regio, de aanwezigheid van vleesvarkens en andere dieren op het bedrijf, de hygiënescore, het wel/niet bestrijden van vliegen en het wel/niet hebben van een vlotterton in het drinkwatersysteem. Voor de multivariate analyse op poolniveau geldt hetzelfde; naast de hierboven genoemde variabelen valt bovendien ook de variabele ‘aanvoer van gelten’ weg. Uiteindelijk zijn de variabelen die wegvallen in de multivariate analyse ieder voor zich niet voldoende geassocieerd met MRSA-positief zijn, ondanks een P-waarde < 0,05 in de univariate analyse. Alle variatie

binnen deze weggevallen variabelen wordt weggenomen door de variabele bedrijfsgrootte (uitgedrukt in aantal zeugen). Tabel A6.11 laat de relaties zien tussen een aantal van die variabelen en de gemiddelde bedrijfsgrootte. Daaruit blijkt dat al die variabelen geassocieerd waren met het aantal zeugen op een bedrijf. Bedrijven van type A zijn gemiddeld groter (570 zeugen) dan bedrijven van type B (310 zeugen). Bedrijven die gelten aanvoeren zijn eveneens gemiddeld groter (511 zeugen) dan bedrijven die geen gelten aanvoeren (373 zeugen). Bedrijven die ongediertebestrijding uitbesteden aan professionals zijn gemiddeld groter (560 zeugen) dan bedrijven die dit zelf doen (312 zeugen) en bedrijven die vliegen bestrijden zijn eveneens groter (457 zeugen) dan bedrijven die dit niet doen (288 zeugen). Bedrijven die meer dan vijf

hygiënemaatregelen toepassen zijn gemiddeld groter (535 zeugen) dan bedrijven met een gemiddelde of lagere hygiënescore (respectievelijk 419 en 323 zeugen), en ook antibioticum wordt vaker toegepast op gemiddeld grotere bedrijven (449 zeugen) dan op kleinere bedrijven (355 zeugen). Bedrijven die standaard risico-antibiotica toepassen zijn gemiddeld groter (508 zeugen) dan bedrijven die andere antibiotica en/of risico-antibiotica incidenteel toepassen (424 zeugen) en wederom veel groter dan bedrijven die geen antibiotica toepassen (355 zeugen). Bedrijven waar naast zeugen ook vleesvarkens en/of andere dieren aanwezig zijn, zijn gemiddeld kleiner dan bedrijven waar deze dieren ontbreken. Bedrijven in de varkensdichte gebieden zijn gemiddeld groter (465

zeugen) dan bedrijven in de varkensluwe gebieden (401 zeugen). Dit is ook terug te vinden in Tabel A6.4 waar de gemiddelde bedrijfsgrootte per provincie is weergegeven.

### Vergelijking laboratoria en monsters

#### Vergelijking laboratoria RIVM en GD

Resultaten van de acht bedrijven, bemonsterd in het kader van de laboratoriumvergelijking, laten zien dat alle bedrijven minimaal 1 MRSA-positief monster hadden bij beide laboratoria. Alle positieve monsters werden bevestigd met PCR en waren dus ook werkelijk positief. De prevalentie van MRSA-positieve bedrijven was dan ook voor beide laboratoria 100%. Het RIVM vond 72,5% (58/80) van de poolmonsters en 50,0% (20/40) van de stofmonsters MRSA-positief. De GD vond 57,5% (46/80) van de poolmonsters en 52,5% (21/40) van de stofmonsters MRSA-positief (Tabel A6.12). De Cohen's kappa, als maat voor de overeenkomst tussen resultaten van pool- en stofmonsters, voor alle monsters was 0,57 (95% btbhi: 0,42-0,72). De Cohen's kappa voor alleen de poolmonsters was 0,63 (95% btbhi: 0,46-0,79), terwijl die voor de stofmonsters 0,45 (95% btbhi: 0,17-0,73) was. Als de som van de resultaten van beide laboratoria als gouden standaard wordt gedefinieerd, dan is de relatieve sensitiviteit van het GD-laboratorium 78,8% (95% btbhi: 70,1-87,5) en die van het RIVM-laboratorium 91,8% (95% btbhi: 85,9-97,6).

Tabel A6.11 Gemiddelde bedrijfsgrootte per categorie van relevante variabelen

variabele	categorie	gemiddelde bedrijfsgrootte
bedrijfstype	A	570 <sup>a</sup>
	B	310 <sup>b</sup>
seizoen	lente	386 <sup>a</sup>
	zomer	488 <sup>b</sup>
	herfst	442 <sup>ab</sup>
	winter	452 <sup>ab</sup>
ongediertebestrijding	zelf	312 <sup>a</sup>
	professioneel	560 <sup>b</sup>
aanvoer van gelten	ja	511 <sup>a</sup>
	nee	373 <sup>b</sup>
vliegenbestrijding	ja	457 <sup>a</sup>
	nee	288 <sup>b</sup>
aanwezigheid andere dieren	ja	401 <sup>a</sup>
	nee	554 <sup>b</sup>
aanwezigheid vleesvarkens	ja	355 <sup>a</sup>
	nee	476 <sup>b</sup>
vlotterton	ja	345 <sup>a</sup>
	nee	503 <sup>b</sup>
dichtheid	>17 varkens/ha	465 <sup>a</sup>
	≤17 varkens/ha	401 <sup>b</sup>
hygiënescore	laag	323 <sup>a</sup>
	gemiddeld	419 <sup>b</sup>
	hoog	535 <sup>c</sup>
antibioticumtoepassing (model a)	ja	449 <sup>a</sup>
	nee	355 <sup>b</sup>
antibioticumtoepassing (model b)	std	486 <sup>a</sup>
	inc	415 <sup>b</sup>
	nee	355 <sup>c</sup>
antibioticumtoepassing (model c)	risico-std	508 <sup>b</sup>
	risico-inc	434 <sup>a</sup>
	overig-std	419 <sup>abd</sup>
	overig-inc	346 <sup>ad</sup>
	nee	355 <sup>cd</sup>
antibioticumtoepassing (model d)	risico-std	508 <sup>a</sup>
	overig	424 <sup>b</sup>
	nee	355 <sup>c</sup>
antibioticumtoepassing (model e)	risico	460 <sup>a</sup>
	overig	386 <sup>b</sup>
	nee	355 <sup>b</sup>

<sup>abcd</sup> verschillend superscript binnen één variabele betekent dat de waarden significant verschillend zijn (P<0,05; generalized linear regression, Proc GLM, SAS, versie 9.1)

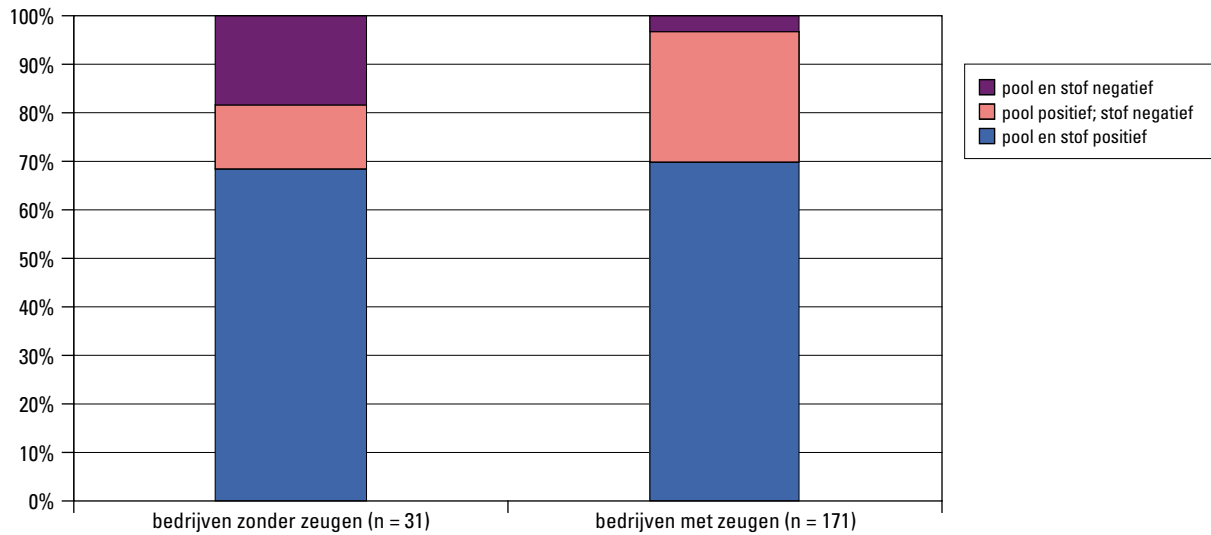
Tabel A6.12 Aantal en percentage positieve pools, stofmonsters en bedrijven voor het laboratorium van RIVM en GD.

laboratorium	Aantal positief				bedrijf	
	pool		stof			
	n	%	N	%	n	%
RIVM	58	72,5	20	50,0	8	100,0
GD	46	57,5	21	52,5	8	100,0

#### Overeenkomst tussen pool- en stofmonsters

Ongeveer 70% van de MRSA-positieve bedrijven was positief op basis van minimaal één positief poolmonster en minimaal één positief stofmonster. Dit percentage was voor bedrijven zonder zeugen (n=31) en bedrijven met zeugen (n=171) nagenoeg gelijk (respectievelijk 68,2 en 69,8%). De overige positieve bedrijven waren positief op basis van pool- of stofmonsters. Voor bedrijven zonder zeugen was 13,6% positief op basis van alleen poolmonsters en 18,2% op basis van alleen stofmonsters. Voor bedrijven met zeugen was 26,7% positief op basis van alleen poolmonsters en 3,5% op basis van alleen stofmonsters (Figuur A6.5).

De Cohen's kappa, als maat voor de overeenkomst tussen resultaten van pool- en stofmonsters, was 0,53 (95% btbhi: 0,23-0,83) voor bedrijven zonder zeugen en 0,59 (95% btbhi: 0,48-0,71) voor bedrijven met zeugen.



Figuur A6.5 Percentage van MRSA-positieve bedrijven gebaseerd op pool- en/of stofmonsters

### Discussie

Het doel van deze studie was om een betrouwbare nationale prevalentie voor MRSA-positieve varkensbedrijven en voor personen woonachtig en/of werkzaam op die bedrijven te bepalen en om risicofactoren te identificeren en te kwantificeren. De prevalentie van MRSA-positieve zeugenbedrijven is geschat op 67,8% en de belangrijkste risicofactoren die geassocieerd waren met positief-zijn, waren terug te voeren tot bedrijfsgrootte en verloop in de tijd. De prevalentie voor MRSA bij personen woonachtig en/of werkzaam op die bedrijven is geschat op 14,2% en de belangrijkste risicofactoren die geassocieerd waren met positief zijn, waren terug te voeren tot de mate van contact met MRSA-positieve varkens en de aanwezigheid van zeugen en vleesvarkens op het bedrijf.

De prevalentie van MRSA-positieve personen woonachtig en/of werkzaam op varkenshouderijen was 14,2%; er werden alleen MRSA-positieve personen gevonden op MRSA-positieve bedrijven. Op MRSA-positieve bedrijven nam de prevalentie van MRSA-positieve personen toe van 3% bij personen die geen contact hadden met varkens naar 49% bij personen die intensief contact hadden met varkens. Deze prevalentie is vele malen hoger dan de nationale achtergrondprevalentie (0,03%) en daarmee bevestigt dit onderzoek dat mensen die werken met varkens een verhoogd risico hebben om MRSA-positief te zijn [18]. Aangezien er alleen MRSA-positieve personen zijn gevonden op MRSA-positieve bedrijven is de meest waarschijnlijke transmissieroute van MRSA die van varkens naar mensen. De mate van contact tussen personen en varkens en de aanwezigheid van zeugen bleken belangrijke risicofactoren. Zeugenhouders hebben over het algemeen meer en intensiever contact met hun varkens, wat een verklaring zou kunnen zijn voor de hogere prevalentie op bedrijven met zeugen. Dat slechts 2% van de personen die geen contact hadden met varkens,

MRSA-positief bleek te zijn, zou kunnen betekenen dat de mate van transmissie van MRSA tussen personen laag is. De nationale prevalentie van MRSA-positieve zeugenbedrijven van 67,8% is hoger dan eerder gepubliceerde prevalenties [10, 11] aangeven. In deze publicaties zijn niet alleen zeugenbedrijven bemonsterd, maar ook vleesvarkensbedrijven en in de studie van Van Duijkeren [10] werden 10 dieren per bedrijf bemonsterd in plaats van 60 varkens, zoals in onze studie en in de studie van Van der Broek [11]. Met een steekproefgrootte van 10 dieren per bedrijf, kan MRSA aangetoond worden als de binnenbedrijfsprevalentie minimaal 25% is. Met een steekproefgrootte van 60 dieren kan MRSA aangetoond worden als de binnenbedrijfsprevalentie minimaal 5% is. Deze verschillen in opzet zouden een verklaring voor het verschil in prevalentie kunnen verklaren.

In onze studie was het aandeel A-bedrijven hoger (18%) dan het aandeel B-bedrijven (3%). Aangezien de prevalentie onder A-bedrijven hoger was (76,3%) dan die van B-bedrijven (60,4%), is de door ons geschatte prevalentie van MRSA-positieve zeugenbedrijven een overschatting van circa 5%. Daarbij moet wel gezegd worden dat A-bedrijven gemiddeld groter (570 zeugen) waren dan B-bedrijven (310 zeugen) wat het verschil in prevalentie tussen beide bedrijfstypen deels zou kunnen verklaren.

Aangezien in onze studie de neusswabs in pools van 6 swabs zijn onderzocht, is het niet mogelijk een gemiddelde binnenbedrijfsprevalentie uit te rekenen. Als een pool positief is, kan het zijn dat er 1 tot 6 dieren uit de pool MRSA bij zich droegen. De gemiddelde prevalentie van positieve monsters per positief bedrijf (63,3%) geeft wel aan dat als MRSA op een bedrijf voorkomt, dit vaak in meerdere pools, en dus leeftijdsgroepen, gevonden werd. Onderzoek naar de prevalentie onder individuele varkens op een bedrijf en longitudinaal onderzoek kunnen meer inzicht verschaffen in de binnenbedrijfsprevalentie

en de verspreiding tussen varkens binnen een bedrijf. De prevalentie van MRSA-positieve bedrijven neemt sinds de start van het onderzoek iedere maand toe en bij extrapolatie van de schatting zullen binnen enkele jaren nagenoeg alle zeugenbedrijven in Nederland MRSA-positief zijn. Het percentage positieve poolmonsters per bedrijf bleef daarentegen gelijk gedurende de studieperiode. De stijging van het percentage MRSA-positieve bedrijven in de tijd kan niet verklaard worden door de overstap van het RIVM naar de GD. Bij vergelijking van de laboratoria waren alle acht bedrijven MRSA-positief bij beide laboratoria. Voor de analyse op bedrijfsniveau zal de overstap naar een ander laboratorium dus geen effect gehad hebben. Het totale aantal positieve poolmonsters, en daarmee de relatieve sensitiviteit, lag bij het laboratorium van het RIVM hoger dan bij het laboratorium van de GD, wat het nog minder plausibel maakt dat de stijging van het percentage MRSA-positieve bedrijven in de tijd verklaard kan worden door de overstap van het RIVM naar de GD. Het grotere aantal positieve pools per bedrijf dat gevonden werd bij het RIVM vergeleken met de GD, zou consequenties kunnen hebben voor de analyse op poolniveau. Echter, in deze analyse werd gecorrigeerd voor bedrijfseffect en bovendien was het verschil in aantal positieve pools per bedrijf gemiddeld slechts 1,5 pool. De meest waarschijnlijke verklaring voor de stijging van het aantal MRSA-positieve zeugenbedrijven in de tijd is dat MRSA zich binnen Nederland verspreidt tussen varkensbedrijven. Van de 18 verschillende *spa*-typen die werden gevonden in deze studie, behoorden 16 *spa*-typen tot ST398. De mate van genetische verwantschap tussen de verschillende *spa*-typen binnen ST398 is groot; vaak is er in de repeatvolgorde slechts 1 of 2 repeats verschil, wat verklaard zou kunnen worden door mutatie. Onze typering beperkt zich echter tot het staphylococcal protein A (*spa*), dat een zeer klein stukje is van het gehele organisme. Het voorkomen van verschillende *spa*-typen zou ook verklaard kunnen worden door insleep van MRSA vanuit verschillende bronnen. Nader onderzoek naar de moleculaire evolutie van MRSA ST398 moet de oorsprong en genetische verwantschap tussen de verschillende *spa*-typen uitwijzen. *Spa*-typen t011 en t108 werden het meest frequent geïsoleerd. Dit is in overeenstemming met andere studies naar MRSA in de Nederlandse varkenshouderij [10, 11, 13]. *Spa*-type t1457 lijkt te clusteren in het noordoosten van Nederland. Alle 8 isolaten uit de provincie Groningen en 25 isolaten uit Overijssel waren van dit type. Interessant zou zijn om de relatie tussen de bedrijven waar dit type wordt gevonden nader uit te zoeken. *Spa*-typen t002 en t127 behoren niet tot ST398, maar respectievelijk tot ST5 en ST1. *Spa*-type t002 wordt humaan in verschillende landen gevonden en is eerder in Canada ook in varkens aangetoond [4, 19]. In Nederland werd dit type gevonden in MSSA-isolaten uit ratten die gevangen waren genomen op varkensbedrijven [20]. *Spa*-type t127 is eerder beschreven als MRSA in paarden [21] en als MSSA in koeien en ratten [22, 23]. Ook in

isolaten afkomstig van Nederlandse varkensbedrijven werden MSSA-isolaten met *spa*-type t127 gevonden [24]. Het aantonen van andere ST-typen in de varkenshouderij in onze studie, maar bijvoorbeeld ook in China [25], benadrukt dat onderzoek naar de moleculaire evolutie van MRSA in de varkenshouderij noodzakelijk is. Een bepaling van de gevoeligheid voor bepaalde antibiotica is slechts op een beperkte selectie van de isolaten gedaan. Hierdoor is een analyse op de ontwikkeling van resistentie voor bepaalde antibiotica in de tijd onmogelijk. Conclusies over bepaalde resistentiepatronen binnen een *spa*-type moeten omzichtig gebracht worden, omdat van sommige *spa*-typen van slechts 1 isolaat een resistentiepatroon bekend is. Alle ST398-isolaten waren gevoelig voor mupirocin en linezolid en resistent tegen tetracycline. Dit laatste werd ook in andere studies naar MRSA ST398 gevonden en wordt in verband gebracht met grootschalige toepassing van tetracyclinen in de varkenshouderij [3, 10, 26]. Bij de toepassing van tetracyclinen zullen resistente micro-organismen, waaronder MRSA ST398, overleven en proportioneel toenemen, aangezien gevoelige micro-organismen worden afgedood. In de eindmodellen c, d en e van de multivariate analyse op poolniveau zien we dat de MRSA-prevalentie van poolmonsters hoger is als er risico-antibiotica, waaronder tetracyclinen, worden toegepast in vergelijking met categorieën waar andere of geen antibiotica worden toegepast. Dit verschil is echter niet significant.

De bedrijfsgrootte is een belangrijke risicofactor die in de eindmodellen op bedrijfs- en poolniveau als significante variabele overblijft. Als het aantal zeugen met 100 toeneemt op een bedrijf neemt het risico op MRSA 1,3 keer toe. Ook voor andere infectieziekten, bijvoorbeeld influenza bij varkens en tuberculose bij runderen, is het effect van bedrijfsgrootte beschreven [27, 28]. Lang niet altijd is hiervoor een eenvoudige, biologische verklaring aan te wijzen. Op grote bedrijven wijken het management en bepaalde bedrijfskenmerken af van die op kleine bedrijven [29]. Dit maakt dat het effect van bedrijfsgrootte op de prevalentie vaak verstrengeld is met effecten van andere factoren die ieder op zich onvoldoende geassocieerd zijn met het vóórkomen van de infectieziekte. In onze analyse zien we dat een aantal variabelen wegvallen in de multivariate analyse en dat alle variatie binnen deze variabelen wordt weggenomen door de variabele bedrijfsgrootte.

Uit onze studie blijkt dat bedrijven die gelten aanvoeren zijn gemiddeld groter zijn dan bedrijven die geen gelten aanvoeren. Aanvoer van varkens van een MRSA-positief bedrijf is een belangrijke risicofactor om MRSA-positief te zijn [12]. Bedrijven die gelten aanvoeren hebben dan ook een groter risico op insleep van MRSA dan gesloten bedrijven. Echter in onze risicofactorenstudie is de MRSA-status van het aanvoerende bedrijf onbekend. In onze studie zien we dat gemiddeld grotere bedrijven ongediertebestrijding vaker uitbesteden aan professionals. Deze professionals zouden kunnen bijdragen aan de



verspreiding van MRSA tussen en binnen bedrijven. De grote bedrijven compenseren dit deels door meer hygiënemaatregelen te nemen, maar kennelijk is dat onvoldoende om MRSA te voorkomen. Daarnaast kan MRSA ook via ongedierte en vliegen binnenkomen of verspreid worden op een bedrijf [19, 30, 31]. Uit onze analyse blijkt dat bedrijven die ongediertebestrijding professioneel uitbesteden en/of bedrijven die aan vliegenbestrijding doen gemiddeld groter zijn dan bedrijven die dat respectievelijk zelf of niet doen. Dit pleit in eerste instantie tegen insleep of verspreiding via ongedierte en/of vliegen, maar als je stelt dat bedrijven pas aan professionele ongediertebestrijding en/of vliegenbestrijding doen als er ook sprake is van overlast, dan zou insleep of verspreiding via ongedierte en/of vliegen op de grotere bedrijven ook een grotere rol kunnen spelen. De exacte rol van vliegen en ongedierte in de transmissie van MRSA tussen, maar ook binnen bedrijven is onbekend.

Naast een mogelijk verhoogd risico op insleep op grote bedrijven, blijft een infectie vaak ook langer aanwezig op grote bedrijven. Dat komt omdat transmissie van een infectieus agens onder andere afhankelijk is van het aantal infectieuze en gevoelige dieren en de mate van contact tussen de dieren [32]. Het aantal gevoelige dieren en het aantal (in)directe contacten tussen dieren neemt over het algemeen toe met het aantal dieren op een bedrijf, waardoor de kans op uitdoven van een infectie op een groot bedrijf kleiner is dan op een klein bedrijf [29]. De toename van het percentage positieve pools op positieve bedrijven met de bedrijfsgrootte zou eveneens verklaard kunnen worden met de toename van het aantal gevoelige dieren en het aantal (in)directe contacten op grotere bedrijven. De transmissieroute en –snelheid tussen varkens binnen een bedrijf kunnen met behulp van longitudinaal onderzoek nader bestudeerd worden. Verder zien we ook dat bedrijven die antibiotica toepassen gemiddeld groter zijn dan bedrijven die dat niet doen. Verschillende publicaties op humaan gebied laten een associatie zien tussen de toepassing van verschillende antibiotica en het voorkomen van MRSA [33–35]. Ook in de veehouderij zijn er suggesties in die richting gedaan, maar nog niet bevestigd [10, 13, 36]. Veehouders in onze studie waren bereid om informatie over antibioticumtoepassing te verschaffen, maar het bleek lastig om exact de middelen, toedieningswijze, leeftijdsgroepen, doseringen en duur van de behandeling te achterhalen op alle bedrijven. Om middelen en bedrijven netjes met elkaar te vergelijken zou antibioticumtoepassing in dagdoseringen uitgedrukt moeten worden [37]. Dat was met de door ons verzamelde informatie niet mogelijk. Wel hebben we de toepassing van antibiotica op verschillende manieren geïnclassificeerd om te kijken naar het verschil in effect van incidenteel (= incidentele, curatieve toepassing van antibiotica), en standaard (= preventief toegepaste medicatie, vaak voorgeschreven voor een gehele groep/afdeling) toepassing van antibiotica, waarbij extra aandacht is

besteed aan de toepassing van antibiotica die selecteren voor MRSA ST398, omdat deze resistent is tegen deze antibiotica (bèta-lactam-antibiotica en/of tetracyclinen). In de univariate analyse leek antibioticumtoepassing een risicofactor, maar in de multivariate analyse was antibioticumtoepassing niet significant; in alle modellen is de MRSA-prevalentie in de pools het hoogst in de klasse die de meest risicovolle antibioticum standaard toepast en het laagst in de klasse die geen antibiotica toepast. In de eindmodellen op poolniveau zien we daarnaast dat de variabele ‘leeftijdsgroep’ overblijft. Kraam- en speenbiggen hebben een verhoogd risico, en opfokdieren een verlaagd risico op MRSA in vergelijking met zeugen. Het risico voor vleesvarkens wijkt niet af van dat van zeugen. De toepassing van standaardbehandelingen, met name van de risico-antibiotica, bij kraam- en speenbiggen is significant hoger dan in de andere drie leeftijdsgroepen. Dit zou een verklaring kunnen zijn voor het verhoogde risico op MRSA in kraam- en speenbiggen. Daarnaast zijn kraam- en speenbiggen over het algemeen het meest gevoelig voor infectieziekten. Dit zou ook voor MRSA het geval kunnen zijn, maar nader onderzoek is nodig om dit vast te stellen.

De overeenkomst tussen resultaten van pool- en stofmonsters was redelijk, wat aangeeft dat als MRSA op een bedrijf voorkomt, deze niet alleen in de varkens zit, maar ook regelmatig in het stof voorkomt. Op bedrijven zonder zeugen werd 18,2% van de bedrijven als positief geïnclassificeerd op basis van alleen positieve stofmonsters, terwijl dit bij bedrijven met zeugen slechts 3,5% was. Dit verschil zou verklaard kunnen worden door de relatief lage poolprevalentie bij vleesvarkens en opfokdieren, terwijl op bedrijven met zeugen ook altijd kraam- en speenbiggen bemonsterd zijn die juist een relatief hoge poolprevalentie hebben. Maar het aantal bedrijven zonder zeugen is te beperkt om hier een betrouwbaar oordeel over te geven. De aanwezigheid van MRSA in stof zou kunnen betekenen dat voor transmissie van MRSA tussen varkens, maar ook tussen varkens en mensen, geen direct contact noodzakelijk is. In hoeverre stof bijdraagt aan de transmissie tussen varkens binnen een bedrijf, maar ook tussen bedrijven, moet nader onderzoek uitwijzen. Het nemen van stofmonsters is eenvoudig en goedkoop en het levert geen ongemak voor de dieren op. In de toekomst zou er voor gekozen kunnen worden om de bedrijfsstatus voor MRSA te monitoren met behulp van stofmonsters. De bepaling van het aantal benodigde stofmonsters hiervoor vergt nog nadere studie, maar zal wellicht meer zijn dan de vijf monsters die in deze studie gebruikt zijn. Concluderend kan gezegd worden dat MRSA op een groot aantal zeugenbedrijven in Nederland voorkomt en dat de prevalentie in de tijd stijgt. Grote bedrijven hebben een verhoogd risico, wat verklaard kan worden door de bedrijfsgrootte zelf en daarnaast door factoren die geassocieerd zijn met de bedrijfsgrootte, zoals de toepassing van antibiotica (verdeeld in standaard, incidenteel of geen), de aanvoer van gelten (ja of nee) en ongediertebestrijding (professioneel uitbested of zelf).

De factor bedrijfsgrootte is hiermee een verzameling van allerlei (risico)factoren, waardoor grotere bedrijven vaker MRSA-positief zijn, maar er kan niet worden aangeduid hoeveel deze factoren bijdragen aan de kans op positief zijn. Personen die intensief contact hebben met MRSA-positieve varkens hebben een sterk verhoogd risico om MRSA-positief te zijn.

### Aanbevelingen

Onderzoek naar de binnenbedrijfsprevalentie en de verspreiding van MRSA binnen een bedrijf is noodzakelijk om tot effectieve interventie maatregelen op bedrijfsniveau te komen. 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 makkelijker het effect van een enkele factor of interventie maatregel getoetst kunnen worden. In hoeverre een mogelijke interventie, bijvoorbeeld restrictieve toepassing van antibiotica of de strikte scheiding van leeftijdsgroepen, leidt tot reductie van MRSA, is een vraag die beantwoord dient te worden door gegevens uit longitudinaal onderzoek in het veld te combineren met gegevens uit experimenteel onderzoek. Kleinschalige experimenten zijn reeds gaande in Lelystad (uitvoerder: Els Broens (WUR/RIVM)).

Onderzoek naar de rol van stof in de transmissie van MRSA tussen varkens en mensen, tussen varkens binnen een bedrijf, maar ook tussen bedrijven is van belang om het effect van persoonlijke beschermingsmiddelen (mondkapjes et cetera) en luchtwassers in te kunnen schatten. Dit onderzoek zou aan kunnen sluiten bij LNV MRSA-project 14 (MRSA in stof: indicator voor bedrijfsstatus).

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 zeer beperkte schaal longitudinaal onderzoek gedaan.

Onderzoek naar de moleculaire evolutie en epidemiologie zou kunnen uitwijzen wat de oorsprong van MRSA in de varkenshouderij is en hoe dit zich ontwikkelt in de tijd. In vitro onderzoek naar de overdracht van SCCmec en andere virulentiefactoren van andere micro-organismen naar *Staphylococcus aureus* kan hiertoe eveneens bijdragen.

Meer gedetailleerd onderzoek/navraag naar de clustering van *spa*-type t1457 in het noordoosten van Nederland kan meer epidemiologische informatie opleveren.

### Gerelateerde projecten

- MRSA in de varkensproductieketen (LNV MRSA-project 12)
- MRSA-transmissie slachthuis (LNV MRSA-project 13)
- Resistentieonderzoek MRSA-stammen (LNV MRSA-

project 5)

- Typering MRSA-isolaten (LNV MRSA-project 7)
- EU baseline survey on the prevalence of MRSA in breeding pigs
- Longitudinaal onderzoek naar MRSA-transmissie binnen varkensbedrijven (Safeguard en Pilgrim)
- Transmissie-experimenten voor MRSA in varkens (WUR)

### Output

- 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.
- Broens E.M., Graat E.A.M., van der Wolf P.J., van den Broek I.V.F., Tiemersma E.W., van der Giessen A.W., de Jong M.C.M., MRSA in pigs: a new threat to human health!? - posterpresentatie op WIAS Science Day – maart 2008, Wageningen, Nederland.
- Broens E.M., Graat E.A.M., van der Wolf P.J., van den Broek I.V.F., Tiemersma E.W., van der Giessen A.W., de Jong M.C.M., MRSA in pigs: a new threat to human health!? - posterpresentatie op en abstract in Proceedings van 1st ASM conference on Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria and foodborne pathogens – juni 2008, Kopenhagen, Denemarken.
- wetenschappelijke publicatie in een double refereed tijdschrift (in progress).

### 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 Microbiology*, 2006. 44(5): p. 1875-6.
3. Guardabassi, L., M. Stegger, and R. Skov, Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 in Danish slaughter pigs. *Veterinary Microbiology*, 2007. 122(3-4): p. 384-6.
4. Khanna, T., et al., Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Veterinary Microbiology*, 2008. 128(3-4): p. 298-303.
5. 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.
6. Graveland, H., et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in veal calf farmers and veal calves in The Netherlands, 2008. *Proceedings of the 1st American Society of Microbiology on Antimicrobial resistance in zoonotic*

- bacteria and foodborne pathogens. Copenhagen, Denmark.
7. Nemati, M., et al., Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008. 52(10): p. 3817-9.
  8. De Boer, E., et al., Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, 2008.
  9. Huijsdens, X.W., et al., Community-acquired MRSA and pig-farming. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2006. 5: p. 26.
  10. 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.
  11. 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.
  12. Broens, E.M., et al. Transmission of NT-MRSA in the pig production chain in The Netherlands, 2008. *Proceedings of 20th International Pig Veterinary Society Congress*. Durban, South Africa.
  13. De Neeling, A.J., et al., High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary Microbiology*, 2007. 122(3-4): p. 366-72.
  14. 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.
  15. SAS Institute Inc., S.I., SAS/STAT User's Guide, V. 9.1, SAS Institute Inc. 2004: Cary, North Carolina.
  16. Hosmer, D. and S. Lemeshow, *Applied Logistic Regression*, John Wiley and sons. 1989, New York.
  17. Noordhuizen, J.P.T.M., et al., *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology*. 1997: Wageningen Pers.
  18. Wertheim H. et al., Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search and destroy and restrictive antibiotic use. *Journal of Hospital Infection*, 2004. 56(4): p. 321-5.
  19. Fenner, L., et al., Distribution of *spa* types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates during a 6 year period at a low-prevalence University Hospital. *Journal of Medical Microbiology*, 2008. 57(Pt 5): p. 612-6.
  20. Van de Giessen, A.W., et al., Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rats living on pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 2009 (in press).
  21. Cuny, C., et al., Clusters of infections in horses with MRSA ST1, ST254, and ST398 in a veterinary hospital. *Microbial Drug Resistance*, 2008. 14(4): p. 307-10.
  22. Broens, E.M., et al. Prevalence study and risk factor analysis of NT-MRSA in pigs in The Netherlands, 2008. *Proceedings of the 1st American Society of Microbiology on Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria and foodborne pathogens*. Copenhagen, Denmark.
  23. Juhasz-Kaszanyitzky, E., et al., MRSA transmission between cows and humans. *Emerging Infectious Diseases*, 2007. 13(4): p. 630-2.
  24. Broens, E.M., et al. Genetic comparison of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Dutch pig farms, 2008. *Proceedings of the 1st American Society of Microbiology on Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria and foodborne pathogens*. Copenhagen, Denmark.
  25. Wagenaar, J.A., et al., Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Veterinary Microbiology*, 2009.
  26. Witte, W., et al., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 2007. 13(2): p. 255-8.
  27. Poljak, Z., et al., Prevalence of and risk factors for influenza in southern Ontario swine herds in 2001 and 2003. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2008. 72(1): p. 7-17.
  28. Kaneene, J.B., et al., Environmental and farm management factors associated with tuberculosis on cattle farms in northeastern Michigan. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2002. 221(6): p. 837-42.
  29. Gardner, I.A., P. Willeberg, and J. Mousing, Empirical and theoretical evidence for herd size as a risk factor for swine diseases. *Animal Health Research Reviews*, 2002. 3(1): p. 43-55.
  30. Graham, J.P., et al., Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. *Science of the Total Environment*, 2009. 407(8): p. 2701-10.
  31. Meerburg, B.G., et al., Presence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in wild small mammals on organic farms. *Applied Environmental Microbiology*, 2006. 72(1): p. 960-2.
  32. Grassly, N.C. and C. Fraser, Mathematical models of infectious disease transmission. *Nature Reviews Microbiology*, 2008. 6(6): p. 477-87.
  33. Beam, J.W. and B. Buckley, Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Prevalence and Risk Factors. *Journal of Athletic Training*, 2006. 41(3): p. 337-40.
  34. Dancer, S.J., The effect of antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrobials and Chemotherapy*, 2008. 61(2): p. 246-53.

35. Muller, A., et al., Effect of individual- and group-level antibiotic exposure on MRSA isolation: a multilevel analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006. 58(4): p. 878-81.
36. Broens, E.M., et al., Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from food production animals to humans: a review. *CAB reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 2008. 3(95): p. published online.
37. Bondt, N., L.F. Puister-Jansen, and R.H.M. Bergevoet, Antibioticagebruik op melkvee-, varkens- en pluimveebedrijven in Nederland. 2009, LEI Wageningen UR: Den Haag.

## APPENDIX 7

### Project 9A: MRSA in de vleeskalverhouderij

#### Projectleiders

J.A. Wagenaar, Departement Infectieziekten en Immunologie, FD en CVI-WUR.  
D.J.J. Heederik, IRAS en Julius Centrum voor Gezondheidswetenschappen en Eerstelijns Geneeskunde, UMC Utrecht.

#### Projectteam

H. Graveland, IRAS.  
J.A.P. Heesterbeek, Departement Landbouwhuisdieren, FD.

#### Voorwoord

Voor u ligt het rapport van het dwarsdoorsnede-onderzoek naar MRSA in de vleeskalverhouderij. Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) met aanvullende financiering vanuit de betrokken sector. Het onderzoek in de vleeskalversector is uitgevoerd door het Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS), een interfacultair onderzoeksinstituut dat onder andere verbonden is met de faculteiten Diergeneeskunde en Geneeskunde van de Universiteit Utrecht samen met het Departement Infectieziekten en Immunologie van de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht. Voor enkele deelanalyses is samengewerkt met het departement Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren van de faculteit Diergeneeskunde. Het onderzoek is in nauw overleg met de kalversector opgezet en uitgevoerd. Het is gekoppeld aan het onderzoek in het kader van het Masterplan Rationeel Gebruik Antibiotica van de Nederlandse Kalversector, onder de operationele aansturing van een 'task force', waarin kalverhouders, dierenartsen en integraties vertegenwoordigd zijn. In deze task force zijn onderzoeksvoorstellen, tussentijdse en uiteindelijke resultaten alsook voorlichting besproken alvorens tot uitvoering over te gaan.

In dit rapport wordt de prevalentie van MRSA onder zowel mensen als dieren weergegeven. Ook worden enkele determinanten van dragerschap vastgesteld. Van dit verslag wordt naast de voorliggende versie ook een voor alle geïnteresseerde kalverhouders samenvattend rapport uitgegeven. Hierin zijn de aanleiding tot het onderzoek, de belangrijkste samenvattende conclusies en de aanbevelingen opgenomen.

Een bijzonder woord van dank gaat uit naar alle kalverhouders die door het invullen van de vragenlijsten, het afnemen van de neusswab en het onderzoek op het bedrijf hebben bijgedragen aan de resultaten van dit onderzoek. Hartelijk dank!

De onderzoekers

#### Samenvatting

##### *Inleiding*

MRSA (Methicilline Resistente *Staphylococcus aureus*) werd voorheen in Nederland vrijwel uitsluitend in ziekenhuizen aangetroffen en komt onder de algemene bevolking zeer weinig voor (< 1%), voornamelijk door het nationale 'search and destroy'-beleid in combinatie met het restrictieve antibioticabeleid in de gezondheidszorg. Vanaf 1995 worden echter MRSA-typen aangetroffen die buiten de ziekenhuizen circuleren. Recentelijk is een (aanvankelijk) niet typeerbare MRSA-variant (NT-MRSA) aangetroffen die geassocieerd werd met varkenshouderijen. Kort daarna bleek echter dat zowel contact met varkens als contact met vleeskalveren tot een grotere kans op dragerschap van NT-MRSA kan leiden dan bij afwezigheid van deze contacten. Het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) heeft in 2006 een aantal onderzoeksinstituten gevraagd om onderzoek te doen naar het voorkomen van MRSA bij dieren en de mogelijke kans op overdracht van deze bacterie naar mensen. Het onderzoek in de vleeskalversector is opgezet in nauw overleg met vertegenwoordigers uit de sectoren en wordt uitgevoerd door het Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS) en de departementen Infectieziekten en Immunologie, en Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren, alle van de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht.

##### *Doel van het onderzoek*

De doelstelling van dit onderzoek is om de prevalentie vast te stellen van MRSA-dragerschap onder vleeskalveren en onder mensen die in nauw contact met deze dieren zijn. Tevens richt dit onderzoek zich erop om risicofactoren te kwantificeren die met MRSA-dragerschap in de vleeskalverhouderij samenhangen.

##### *Opzet van het onderzoek*

De prevalentie en risicofactoren van MRSA-dragerschap bij zowel mensen als vleeskalveren zijn onderzocht met behulp van een dwarsdoorsnede onderzoek. Op 102 vleeskalverhouderijen, zowel blankvlees- als rosévvleesbedrijven, is eenmalig een onderzoek uitgevoerd bij zowel mens als dier. Het onderzoek bestond uit het afnemen van een vragenlijst en het afnemen van een neusswab van de deelnemende mensen en van een selectie van de aanwezige kalveren en overige dieren op het bedrijf. Daarnaast werden van ieder bedrijf vijf stofmonsters uit de stallen genomen. Het onderzoek is uitgevoerd in de periode van mei 2007 – maart 2008.

## Resultaten

### *Risicofactoren van MRSA-dragerschap bij kalveren*

In totaal hebben 102 kalverhouderijen meegedaan aan de studie (respons 80%). Van 2151 kalveren is een neusswab afgenomen. Hiervan waren 1309 blanke vleeskalveren en 842 rosé-vleeskalveren. In totaal werd bij 27,5% van de kalveren MRSA gevonden. Er werd MRSA gevonden op 88% van de deelnemende bedrijven (in een of meerdere kalveren en/of in een of meerdere stofmonsters). De aanwezigheid van MRSA op bedrijfsniveau was voor zowel blankvlees- als rosévleesbedrijven vergelijkbaar. De prevalentie van MRSA blijkt echter onder blanke vleeskalveren hoger dan die van rosé-vleeskalveren. Er worden significant verhoogde Odds Ratio's (OR's) gevonden voor de associaties tussen de aanwezigheid van MRSA bij kalveren met de leeftijd van de dieren, het aantal kalveren per hok, de aanwezigheid van andere landbouwhuisdieren, toepassing van ratten- en muizenbestrijding en antibioticumgebruik. Significante negatieve associaties (OR's < 1) worden gevonden voor het aantal stallen op het bedrijf en het reinigen en desinfecteren van de stallen.

### *Risicofactoren van MRSA-dragerschap mensen*

In totaal namen 390 mensen deel aan de studie. De MRSA-prevalentie over de totale populatie is 15,9%. Opvallend is dat grote verschillen in prevalentie waarneembaar zijn tussen de kalverhouders en medewerkers enerzijds en gezinsleden anderzijds. MRSA-dragerschap komt significant vaker voor bij mannen, personen van hogere leeftijd, personen die meer uren per week werken op de kalverhouderij en bij personen die meer MRSA-positieve kalveren op het bedrijf hebben.

### *Spa-typing en MIC-bepaling*

Van 208 MRSA-positieve kalveren en van 62 MRSA-positieve mensen werd het *spa*-type bepaald. Hoofdzakelijk werden diergerelateerde *spa*-typen gevonden, met name *spa*-type t011. Op 76% van de MRSA-positieve bedrijven (61/80) kwam slechts een *spa*-type voor onder de kalveren. Op 15% van de MRSA-positieve bedrijven (12/80) kwamen twee verschillende *spa*-typen voor en op 9% van de bedrijven (7/80) zelfs drie verschillende typen.

Ook de antibioticaresistentie werd onderzocht. Alle onderzochte isolaten bleken tetracyclineresistent. Tevens bleek het merendeel van de onderzochte isolaten erythromycine- (73%) en clindamycine-(72%) resistent. De resistentiepatronen van de humane isolaten kwamen sterk overeen met die van de isolaten uit de kalveren.

### *Discussie en conclusie*

MRSA komt voor op een zeer groot deel van de kalverhouderijen. Het voorkomen van MRSA onder de kalveren hangt samen met het antibioticumgebruik en specifieke bedrijfskenmerken. In vergelijking met algemene populatiesteekproeven hebben mensen die werkzaam of woonachtig zijn op een kalverhouderij

een verhoogde kans om MRSA-drager te zijn. De kans op MRSA-dragerschap hangt sterk samen met de duur van de werkzaamheden in de kalverstallen en het aantal MRSA-positieve dieren op het bedrijf. Het sterke verband met het aantal uren dat men werkzaam is in de stallen/contact heeft met dieren doet de vraag rijzen of naast dragerschap ook blootstelling aan MRSA via inhalatie van stof en depositie in de neus, dat met name bij langer verblijf in de stal kan optreden, tot positieve uitslagen heeft geleid. Hoewel het erop lijkt dat diergerelateerde MRSA niet goed spreidt tussen mensen onderling, is vervolgonderzoek naar de dynamiek van spreading en overdracht zeer belangrijk om dit met zekerheid vast te stellen. Inzicht in deze factoren is voor zowel mensen als dieren van groot belang voor optimale ontwikkeling van richtlijnen en het formuleren van aanbevelingen. Dit kan alleen worden vastgesteld met behulp van een longitudinaal onderzoek, waarbij herhalingsmetingen worden uitgevoerd.

## Summary

### *Background*

The prevalence of MRSA in clinical human isolates is below one percent in the Netherlands, which is very low compared to other European countries. A recent study showed that veal calf farming may be a possible risk factor for MRSA colonization in humans. To explore the spread of MRSA in veal calf production, we conducted a study among 102 farms. MRSA prevalence was determined and risk factors associated with MRSA colonization were identified in calves and people in close contact with calves.

### *Methods*

102 veal calf farms were randomly selected and visited from March 2007 – February 2008. Participating farmers were asked to fill in a questionnaire (n=390) to identify potential risk factors. This questionnaire contained items on contact with calves and activities on the farms, hygiene practices and potential MRSA history. A nasal swab was taken from each participant. Furthermore, nasal swabs were taken of calves (n=2151). Swabs were analysed for MRSA by selective enrichment containing aztreonam and ceftizoxime and culturing (Oxoid-MRSA screen). Suspected colonies were confirmed as MRSA by using slide coagulase test and PCR for presence of the *mecA*-gene. *Spa* types of the isolates were identified. Data were analyzed using logistic regression analysis.

### *Results*

MRSA prevalence was 32% in calve farmers and 8% in family members. The prevalence of MRSA-positive farms was 88% (90/102) whereas the average MRSA-prevalence in calves was 28% (458/2151). MRSA carriers kept more often MRSA positive animals than non-carriers (Odds Ratio (OR) 2.1, (95% confidence interval 1.5 -2.9)). Human carrier ship was also strongly associated

with intensity of animal contact. Carriership in calves was positively associated with use of antibiotics (OR 1.4 (1.0 -1.8)) while farm hygiene was associated with a lower prevalence of MRSA carriership in calves (OR 0.5 (0.5-0.6)). Different *spa*-types were found including t011, t034, t108 and t1197. All MRSA strains were resistant to tetracycline, but additional resistances to erythromycin, clindamycin and gentamicin was also found. All MRSA isolates were negative for the PVL toxin genes.

### Conclusions

This is the first study showing direct associations between animal and human carriership of MRSA, which seems partly explained by antimicrobial use in animals and hygiene practices. These observations implicate prudent use of antibiotics.

Exploring direct associations is essential for design and implementation of infection control strategies.

## Inleiding

### Aanleiding van het onderzoek

MRSA (Methicilline Resistente *Staphylococcus aureus*) is bekend als de ziekenhuisbacterie. Vanwege resistentie tegen een groot aantal antibiotica zijn infecties met MRSA moeilijk behandelbaar. Onder gewone omstandigheden vormt MRSA geen bedreiging voor de mens. In ziekenhuizen en verpleeghuizen waar mensen verblijven met verminderde weerstand (wonden, infusen) en waar relatief veel mensen met antibiotica behandeld worden, vormt MRSA een bedreiging. In Nederland komt de bacterie onder de algemene bevolking relatief weinig voor (< 1%). De lage prevalentie in Nederland kan voornamelijk verklaard worden door het nationale 'search and destroy'-beleid in combinatie met het restrictieve antibioticabeleid in de (humane) gezondheidszorg. Het lage antibioticagebruik voorkomt mogelijk de selectie van resistente micro-organismen waaronder *S. aureus*. Nederland is samen met Scandinavische landen uniek in de lage MRSA-prevalentie in gezondheidsinstellingen<sup>1</sup>. Dat is ook de reden waarom mensen die in een buitenlands ziekenhuis verpleegd zijn een grote kans hebben met MRSA besmet te worden. Aanvankelijk werd MRSA nagenoeg alleen in ziekenhuizen aangetroffen, vandaar de naam ziekenhuisbacterie.

Sinds 1995 worden er in Nederland echter MRSA-infecties waargenomen die niet gerelateerd kunnen worden aan patiënten met de bekende risicofactoren zoals verblijf in een buitenlands ziekenhuis<sup>2-5</sup>. Het betreft MRSA-typen die buiten het ziekenhuismilieu circuleren (zogenaamde 'community acquired MRSA'). Het is mogelijk dat het huidige 'search and destroy'-beleid niet toereikend is, met als consequentie dat uitbraken kunnen volgen. Recentelijk is gebleken dat een derde specifiek type voorkomt: de (aanvankelijk) niet typeerbare MRSA (NT-MRSA). Deze werd aanvankelijk alleen geassocieerd met varkenshouderij. Kort daarna bleek echter dat

mensen die in contact komen met levende varkens en vleeskalveren een grotere kans hebben op het positief zijn voor NT-MRSA dan mensen die dat contact niet hebben<sup>6</sup>. Sindsdien wordt (afhankelijk van het ziekenhuis) degene die intensief contact heeft met varkens en vleeskalveren bij opname in een ziekenhuis afgezonderd totdat gebleken is dat men negatief test op MRSA.

Het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) heeft in 2006 onderzoeksinstituten gevraagd om onderzoek te doen naar het voorkomen van MRSA bij dieren en de mogelijke kans op overdracht van deze bacterie naar mensen. Het onderzoek in de vleeskalversector is opgezet in nauw overleg met vertegenwoordigers uit de sectoren en wordt uitgevoerd door het Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS), een onderzoeksinstituut dat onder andere verbonden is met de faculteiten Diergeneeskunde en Geneeskunde van de Universiteit van Utrecht, de departementen Infectieziekten en Immunologie, en Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren van de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht.

### Doelstellingen

De doelstelling van dit onderzoek is om de prevalentie van MRSA-dragerschap onder vleeskalveren en onder mensen die in nauw contact met deze dieren zijn vast te stellen. Tevens richt dit onderzoek zich erop om risicofactoren die met MRSA dragerschap in de vleeskalverhouderij samenhangen te kwantificeren.

### Onderzoeksvragen

- Wat is de prevalentie van MRSA onder vleeskalveren in Nederland?
- Wat is de prevalentie van MRSA onder kalverhouders, gezinsleden en medewerkers?
- Wat is de prevalentie van MRSA van de op het bedrijf aanwezig andere (huis)dieren?
- Is er een samenhang tussen de prevalentie van MRSA bij dieren en mensen?
- Wat zijn de determinanten van het voorkomen van MRSA? Is er een verband tussen het voorkomen van MRSA en specifieke bedrijfskenmerken?

## Materiaal en methoden

### Toestemming METC

Het onderzoek dat onder kalverhouders wordt uitgevoerd is voorgelegd en positief beoordeeld door de Medische Ethische Toetsingscommissie (METC) van het Universitair Medisch Centrum van Utrecht. Deze onafhankelijke commissie, bestaande uit artsen, apothekers en juristen, beoordelen ieder onderzoek/studieprotocol op haar wetenschappelijke waarde, het respect voor de positie en veiligheid van de patiënt/proefpersoon en de praktische uitvoerbaarheid.

### **Opzet**

De prevalentie en risicofactoren van MRSA-dragerschap bij zowel mensen als vleeskalveren is onderzocht met behulp van een dwarsdoorsnedeonderzoek. Op 102 vleeskalverhouderijen, zowel blankvlees- als rosé vleesbedrijven, is eenmalig een onderzoek uitgevoerd bij zowel mens als dier. Het onderzoek bestond uit het afnemen van een vragenlijst en het afnemen van een neusswab van de deelnemende mensen en van een selectie van de aanwezige kalveren en overige dieren op het bedrijf. Daarnaast werden van ieder bedrijf vijf stofmonsters uit de stallen genomen. Het onderzoek is uitgevoerd in de periode van mei 2007 – maart 2008.

### **Studiepopulatie**

De vleeskalverhouderijen zijn willekeurig geselecteerd. Bij de selectie is wel gekeken naar ongeveer gelijke verdeling tussen blankvlees- en rosé vleesbedrijven. Tevens is gekeken naar een zo groot mogelijke variatie in bedrijfs grootte, leeftijd en herkomst van de aanwezige kalveren. De deelnemende bedrijven waren gelegen in de provincies Friesland, Groningen, Drenthe, Overijssel, Gelderland, Utrecht, Zuid-Holland, Noord-Brabant en Limburg. Aan alle bedrijven is om deelname aan het onderzoek gevraagd door het toezenden van een brief en een informatiebrochure. Voor de toestemming van het afnemen van neusswabs van kalveren van een integratie werd de desbetreffende integratie benaderd.

### **Vragenlijsten**

Voorafgaand aan het bedrijfsbezoek zijn er voor de kalverhouder, gezinsleden en eventuele medewerkers persoonlijke vragenlijsten toegestuurd (zie Bijlage 1). De vragenlijsten werden tijdens het bedrijfsbezoek weer meegenomen door de onderzoeker. Er is gevraagd naar specifieke werkzaamheden op het bedrijf zoals het voeren van de kalveren, sorteren en (diergeneeskundige) verzorging. Tevens is er gevraagd of de deelnemer contact heeft met kalveren en eventuele andere dieren op het bedrijf. Overige vragen hadden betrekking op andere bewoners, mogelijke andere risicofactoren voor MRSA (buitenlands ziekenhuis), luchtwegklachten/allergie, hygiëne en rookgewoonten. In de analyse van dit onderzoek is met deze mogelijke versturende variabelen indien nodig rekening gehouden. Tijdens het bedrijfsbezoek is tevens samen met de kalverhouder een bedrijfschecklist ingevuld (Bijlage 2). Hierin is gevraagd naar specifieke bedrijfskenmerken zoals aantal kalveren, huisvesting van de kalveren, voer en drinksystemen, ventilatie van de stallen, aanwezigheid van andere dieren op het bedrijf, hygiëne en antibioticumgebruik.

### **Neusswabs**

Naast het invullen van de persoonlijke vragenlijsten en de bedrijfschecklist werd van iedere deelnemer een neusswab afgenomen. Met een wattenstaafje (swab) werd er in beide neusgaten over de slijmvliezen van het voorste gedeelte

van de neus gestreken.

Op dezelfde wijze werden bij  $\sqrt{n}$  kalveren per bedrijf, met een minimum van 10 en een maximum van 25 kalveren per bedrijf een neusswab afgenomen. Ditzelfde werd gedaan bij een selectie van de aanwezig andere dieren op het bedrijf.

### **Stofmonsters**

Van ieder bedrijf werden vijf stofmonsters uit de stallen genomen. Dit werd gedaan om te inventariseren of in de toekomst in plaats van neusswabs van de kalveren een stofmonster toereikend is voor het vaststellen van de aanwezigheid van MRSA op een bedrijf. De stofmonsters werden verdeeld over het aantal aanwezige stallen genomen. Indien een bedrijf slechts over een stal beschikte werden alle vijf de stofmonsters uit deze stal genomen. Met een (steriel verpakt) vochtig veegdoekje (Sodibox, Raisio Diagnostics) werd over een met stof bedekte plaats in de stal geveegd, meestal de afscheidingsmuur/hek tussen twee hokken.

### **MRSA bepaling**

De neusswabs en stofmonsters werden alle direct na het bedrijfsbezoek in het laboratorium onderzocht op de aanwezigheid van de MRSA-bacterie. De monsters werden hiervoor via een standaardprotocol ingezet. Vervolgens werd de aanwezigheid van de bacterie met behulp van aanvullende microbiologische en moleculaire onderzoekstechnieken vastgesteld. Het vaststellen van de aanwezigheid van de bacterie neemt circa vijf dagen in beslag.

Het vaststellen van het *spa*-type is uitgevoerd bij het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) in Bilthoven. Met het *spa*-type wordt bepaald van welke stam de desbetreffende bacterie afkomstig is. Antibioticaresistentiepatronen zijn bepaald bij het Centraal Veterinair Instituut (CVI) te Lelystad. Hierbij is een minimumremmende concentratie bepaald. Dit is de minimale remmende concentratie (MIC) die onder gedefinieerde in-vitro-omstandigheden de groei van de bacterie verhindert binnen een gedefinieerde tijdsduur.

### **Gegevensverwerking**

De analyses werden uitgevoerd met het statistische verwerkingsprogramma SAS. Bij de beoordeling van associaties tussen verschillende variabelen is een p-waarde van 0,05 aangehouden (tweezijdig) als statistisch significant. Onderzoek naar determinanten van het voorkomen van MRSA is onderzocht met logistische regressieanalyse. Associaties met een aantal continue onafhankelijke variabelen (werkuren, antibiotiumgebruik en leeftijd van kalveren) zijn geanalyseerd middels gegeneraliseerde additieve modellen (smoothing). De associaties worden gepresenteerd als Odds Ratio's (ORs). Een OR geeft de kans weer dat de aanwezigheid van MRSA wordt waargenomen bij een hoogblootgesteld mens/dier ten opzichte van een laag/niet-blootgesteld mens/dier. Een OR van bijvoorbeeld 2, betekent dat



de kans op MRSA-dragerschap 2 maal zo groot is ten opzichte van een persoon/dier die laag/niet is blootgesteld aan de desbetreffende determinant (risicofactor). Een OR lager dan 1 betekent dat de hoogblootgestelde een kleinere kans heeft op MRSA als gevolg van blootstelling aan desbetreffende determinant.

## Resultaten

### Respons

Van de 127 benaderde kalverhouderijen gaven in totaal 102 bedrijven toestemming om deel te nemen aan het onderzoek. Dit resulteerde in een responspercentage van ruim 80%. Reden om niet deel te nemen aan dit onderzoek waren divers (geen tijd, recent betrokken bij andere onderzoeken, verbouwing van stal). Van deze 102 bedrijven werd op 2 bedrijven alleen toestemming gegeven om swabs van de kalveren te nemen en stofmonsters uit de kalverstallen. In totaal namen 390 mensen deel aan de studie en werd van 2151 kalveren een neusswab afgenomen.

### Bedrijfskenmerken

In Tabel A7.1 staan de belangrijkste kenmerken van de deelnemende kalverhouderijen. In totaal waren er 51 bedrijven waar enkel blanke vleeskalveren werden gehouden en 43 bedrijven met enkel rosé-vleeskalveren. Op 8 bedrijven werden zowel blanke als rosé kalveren gehouden. Naast de onderverdeling in blankvlees- en rosévleesbedrijven kan er onderscheid gemaakt worden in bedrijven met starters (n=3). De kalveren van deze bedrijven verlaten na circa 12 weken het bedrijf. Daarnaast zijn er bedrijven die de kalveren pas *vanaf* circa 12 weken op het bedrijf hebben, de afmestbedrijven (n=17). Een totaal overzicht van alle kenmerken van de deelnemende bedrijven is weergegeven in Bijlage 3.

### Kalveren

In totaal is bij 2151 kalveren een neusswab afgenomen. Hiervan waren 1309 kalveren blanke vleeskalveren en 842 rosé vleeskalveren. Het merendeel van de onderzochte kalveren was stier (92,6%). De gemiddelde leeftijd van de dieren was 17,8 weken, variërend van 2 tot 52 weken.

Kalveren afkomstig uit de blankvleesbedrijven waren maximaal 29 weken oud, terwijl de rosé kalveren een maximale leeftijd hadden van 52 weken. Dit verschil komt tot stand doordat de kalveren uit de verschillende sectoren op verschillende leeftijden slachtrijp zijn.

Daarnaast werden verschillen tussen blanke vleeskalveren en rosé vleeskalveren onder andere waargenomen in het antibioticagebruik. Dit verschil tussen de sectoren kan vertekend zijn door afmestbedrijven, waar de kalveren pas vanaf circa 12 weken op het bedrijf komen. Informatie over het antibioticagebruik in de eerste 13 weken is moeilijk te achterhalen, terwijl in deze tijd het gebruik doorgaans het hoogst is. Indien de afmestbedrijven buiten beschouwing worden gelaten dan blijken de verschillen tussen de sectoren kleiner: het percentage kalveren behandeld met een startkuur is respectievelijk 97,3% en 81,2%. Echter, dit verschil is nog statistisch significant. Over het algemeen hadden de blanke vleeskalveren meer behandelingen met antibioticum ondergaan dan de rosé vleeskalveren. Naast het antibioticumgebruik verschilden de sectoren in type voer en drinksysteem van de kalveren. Een overzicht van de belangrijkste kenmerken van de onderzochte kalveren is weergegeven in Tabel A7.2. Bijlage 4 toont het volledige overzicht van de kenmerken van de populatie bestudeerde kalveren.

### Risicofactoren van MRSA-dragerschap bij kalveren

In Tabel A7.3 is de prevalentie van MRSA-dragerschap bij de bestudeerde populatie vleeskalveren weergegeven. In totaal werd bij 27,5% van de kalveren MRSA gevonden. Bij de blanke vleeskalveren werd vaker MRSA gevonden dan bij de rosé vleeskalveren, 31,3% versus 21,6%. Over het algemeen zien we bij zowel de blanke vleeskalveren als de rosé vleeskalveren een toename in prevalentie van MRSA met een toename in leeftijd. Echter bij de blanke vleeskalveren wordt een sterkere stijging van de prevalentie waargenomen bij kalveren tussen de 7 en 12 weken oud, welke niet waargenomen wordt bij de rosé vleeskalveren. Dit verband wordt tevens weergegeven in Figuur A7.1. Een totaaloverzicht van de prevalentie van MRSA-dragerschap bij kalveren is weergegeven in Bijlage 5. Er lijken verschillen te zijn in prevalentie van MRSA tussen kalveren afkomstig uit verschillende

Tabel A7.1: Kenmerken van de bestudeerde kalverhouderijen (n=102).

Algemene kenmerken	Totaal	Blank	Rosé	Blank+Rosé
Aantal bedrijven	102 (100%)	51 (50%)	43 (42,2%)	8 (7,8%)
Starters	3	-	3	-
Afmest bedrijven	19	1	17	1
Gesloten bedrijven	80	50	23	7
Gemiddeld aantal kalveren	565 (25-2200)	735 (90-2200)	324 (25-1700)	799 (260-1300)
Aantal stallen	2,2 (1-6)	2,0 (1-5)	2,3 (1-6)	3,1 (1-5)
All in all out	41/102 (40,2%)	32/51 (62,7%)	7/43 (16,3%)	2/8 (25,0%)

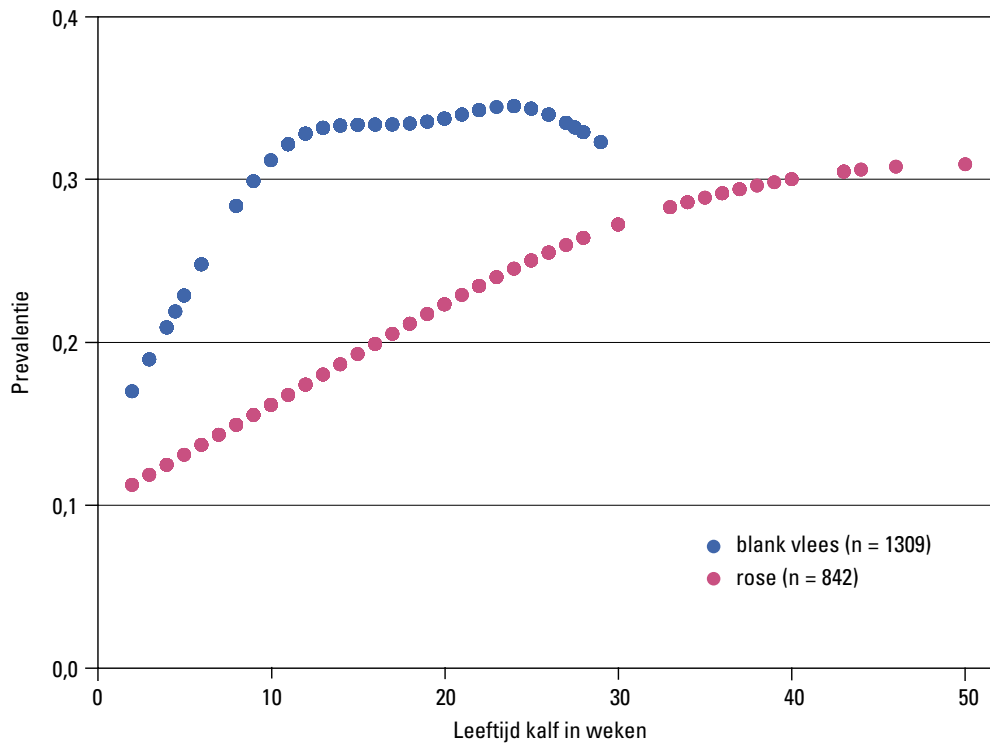
Tabel A7.2: Kenmerken van de onderzochte populatie kalveren (n=2151)

	<b>Totaal (blank+rosé)</b>	<b>Blank</b>	<b>Rosé</b>
<b>Soort</b>	2151	1309 (60,8%)	842 (39,2%)
<b>Leeftijd</b>			
Gemiddelde leeftijd in weken	17,8 (2-52)	15,9 (2-29)	20,8 (2-52)
Aantal kalveren =<6 weken	301/2151 (14,0%)	220/1309 (16,8%)	81/842 (9,6%)
Aantal kalveren 7-12 weken	458/2151 (21,3%)	270/1309 (20,6%)	188/842 (22,3%)
Aantal kalveren >12 weken	1392/2151 (64,7%)	819/1309 (62,6%)	573/842 (68,1%)
<b>Geslacht</b>			
Stier	1992/2151 (92,6%)	1166/1309 (89,1%)	826/842 (98,1%)
Vaars	159/2151 (7,4%)	143/1309 (10,9%)	16/842 (1,9%)
<b>Gemiddeld aantal kalveren per hok</b>	9,2 (1-85)	8,6 (1-85)	9,9 (1-77)
<b>Land van herkomst</b>			
Nederland	1257/2151 (58,4%)	936/1309 (71,5%)	321/842 (38,1%)
Anders	894/2151 (41,6%)	373/1309 (28,5%)	521/842 (64,9%)
<b>Antibioticagebruik*</b>			
Startkuur	1776/2151 (82,6%)	1274/1309 (97,3%)	502/842 (59,6%)
Gemiddeld aantal behandeldagen startkuur	8,6 (3-21)	9,0 (5-21)	7,5 (3-14)
<b>Koppelbehandeling</b>			
<b>Gemiddeld aantal koppelbehandelingen</b>	<b>1581/2151 (73,5%)</b>	<b>1184/1309 (90,5%)</b>	<b>397/842 (47,2%)</b>
Gemiddeld aantal koppelbehandelingen	2,1 (1-7)	2,5 (1-7)	1,7 (1-6)
Gemiddeld aantal behandeldagen	12,8 (2-50)	13,9 (2-50)	9,4 (3-30)
Gemiddeld percentage individuele behandelingen huidige koppel kalveren (n=1617)	17,5 (0-100)	18,9 (0-50)	15,5 (0-100)

**\* Informatie antibioticagebruik weergegeven per koppel**

landen. Zo lijken kalveren afkomstig uit landen als België (59,1%), Italië (58,3%) en Frankrijk (37,8%) een fors hogere prevalentie te hebben vergeleken met de andere landen. De interpretatie hiervan vereist niettemin enige voorzichtigheid. De kalveren zijn immers niet allemaal op dezelfde leeftijd (bijvoorbeeld bij binnenkomst op het bedrijf) onderzocht. Hierdoor is het onduidelijk of het land van herkomst in alle gevallen ook daadwerkelijk de belangrijkste determinant van MRSA is. Andere factoren kunnen hierbij zeker een rol hebben gespeeld. Hoewel er verschillen in kenmerken tussen de blanke en rosé kalveren worden waargenomen is in de analyse gerekend met de totale populatie kalveren (n=2151). Wanneer de analyses apart berekend worden voor de blanke en rosé kalveren worden namelijk over het algemeen zeer vergelijkbare verbanden gevonden. Dit is weergegeven in Bijlage 6. Wel is in de totale analyse de variabele soort (blank of rosé kalf) betrokken, om zo voor

de verschillen in sector te kunnen corrigeren. Correctie voor variabelen is noodzakelijk omdat deze variabelen mogelijk een deel van de oorzaak van het effect kunnen verklaren. Iedere variabele afzonderlijk wordt hierbij dus gecorrigeerd voor het effect wat de andere variabelen veroorzaken. Hierdoor is het mogelijk het specifiek effect van de desbetreffende determinant te berekenen. Er worden significant verhoogde OR's gevonden voor de associaties tussen de aanwezigheid van MRSA bij kalveren met de leeftijd van de dieren, het aantal kalveren per hok, de aanwezigheid van andere landbouwhuisdieren, toepassing van ratten- en muizenbestrijding en antibioticumgebruik. Significante negatieve associaties (OR's < 1) worden gevonden voor het aantal stallen op het bedrijf en het reinigen en desinfecteren van de stallen. Ook het verschil in prevalentie tussen de blanke en rosé kalveren is significant. De OR's voor deze associaties zijn weergegeven in Tabel A7.4. In weergegeven analyses is



Figuur A7.1 Verband tussen leeftijd van kalveren (blank en rosé) en prevalentie MRSA-dragerschap

geen rekening gehouden met de clustering van data binnen de bedrijven. Omdat dieren in een bedrijf de omgeving delen, zijn waarnemingen binnen een bedrijf gecorreleerd. Wanneer een analyse wordt uitgevoerd waarbij hiervoor wordt gecorrigeerd (een zogenaamde multi-level analyse) worden zeer vergelijkbare associaties gevonden. Echter, correctie voor de correlatie binnen een bedrijf leidt tot wat grotere standaardfouten van regressiecoëfficiënten. En door de daarmee gepaard gaande vergroting van het

betrouwbaarheidsinterval blijken een aantal verbanden (aantal stallen, aantal kalveren per hok, aanwezigheid van landbouwhuisdieren, desinfectie en het verschil tussen MRSA-prevalentie tussen blanke en rosé kalveren) niet meer statistisch significant. De gevonden associaties met de leeftijd van de kalveren, reinigen, ratten- en muizenbestrijding, aantal kalveren op het bedrijf en antibioticumgebruik blijven wel significant aanwezig. Als variabele voor het antibioticumgebruik van de

Tabel A7.3: Prevalenties (%) van MRSA-dragerschap bij vleeskalveren (n=2151)

	Totaal	Blank	Rosé
<b>MRSA-dragerschap</b>	27,5% (592/2151)	31,3% (410/1309)	21,6% (182/842)
<b>Leeftijd van kalf</b>			
<=6 weken	12,3% (37/301)	14,1% (31/220)	7,4% (6/81)
7-<=12 weken	35,6% (163/458)	50,0% (135/270)	14,9% (28/188)
>=13 weken	28,2% (392/1392)	29,8% (244/819)	25,8% (148/573)
<b>Geslacht</b>			
Vaars	28,3% (45/159)	26,5% (38/143)	43,8% (7/16)
Stier	27,5% (547/1992)	31,9% (372/1166)	21,2% (175/826)
<b>Antibioticumgebruik</b>			
Opzet met startkuur	28,0% (498/1776)	31,4% (400/1274)	19,5% (98/502)
Opzet zonder startkuur	25,1% (94/375)	28,5% (10/35)	24,7% (84/340)
Koppelbehandeling	30,0% (475/1581)	32,9% (390/1184)	21,4% (85/397)
Geen koppelbehandeling	20,5% (117/570)	16,0% (20/125)	21,8% (97/445)

kalveren in de analyses is gekozen voor het al dan niet behandeld zijn met een koppelbehandeling. Doordat de kalveren gedurende de mestperiode vaak met verschillende specifieke soorten antibiotica behandeld worden, is het niet mogelijk het effect van specifieke antibioticasoorten in de analyses te onderscheiden. Op zich kunnen wel verbanden met individuele antibiotica worden bekeken. Maar in dat geval is de associatie niet gecorrigeerd voor het gebruik van andere specifieke antibiotica. Een interpretatie van de gevonden associaties is daardoor niet makkelijk te geven. Normaal gesproken kan voor het gebruik van andere middelen worden gecorrigeerd. Maar omdat correlaties tussen de verschillende middelen zeer hoog zijn is dit niet mogelijk. Daarom is het in het algemeen niet mogelijk gecorrigeerde associaties voor individuele middelen te verkrijgen. Een andere complicatie is dat, doordat het overgrote deel van de kalveren met een of meerdere antibiotica is behandeld, het tevens lastig is een juiste referentiegroep te definiëren. Idealitair bestaat een referentiegroep uit dieren die geheel geen antibioticumbehandeling hebben ondergaan. In dit specifieke geval is dit of niet mogelijk, of deze groep is zeer gering waardoor OR's een groot betrouwbaarheidsinterval krijgen. Ondanks deze beperkingen worden voor de meeste associaties met specifieke antibiotica (Bijlage 6) (ongecorrigeerde OR's) positieve associaties gevonden. Dit geldt voor zowel de startkuur als de koppelbehandeling. Opvallend is hierbij het zeer sterke verband met de startkuur aminoglycoside (neomycine), OR 7,2 (4,2 - 12,3). Het omvangrijke betrouwbaarheidsinterval laat zien dat deze associatie gebaseerd is op een kleine groep dieren. Wanneer naar het effect van aminoglycosidebehandeling als koppelbehandeling gekeken wordt is dit effect

Tabel A7.4: Gecorrigeerde Odds Ratio's voor het verband tussen MRSA-dragerschap en risicofactoren bij vleeskalveren (n=2151)

Determinant	MRSA-dragerschap OR (95% betrouwbaarheidsinterval)
Soort (blank referentie)	0,7 (0,5-0,9)*
Leeftijd van kalveren (in weken) <sup>1</sup>	1,3 (1,2-1,4)*
Aantal kalveren op bedrijf <sup>2</sup>	1,1 (1,0-1,1)*
Aantal stallen <sup>3</sup>	0,8 (0,7-0,9)*
Aantal kalveren per hok <sup>4</sup>	1,1 (1,0-1,1)*
Aanwezigheid (andere) landbouwhuisdieren	1,9 (1,5 - 2,4)*
Reinigen stallen	0,5 (0,3 - 0,6)*
Desinfectie stallen	0,6 (0,4 - 0,9)*
Ratten- en muizenbestrijding	19,8 (7,0 – 56,8)*
Koppelbehandeling	1,4 (1,0-1,8)*

\* P <0,05, <sup>1</sup> Toename per 10 weken leeftijd, <sup>2</sup> Toename per 100 kalveren, <sup>3</sup> Toename per stal, <sup>4</sup> Toename per 5 kalveren/hok

geringer; OR 1,9 (1,1-3,4). Er wordt er een negatieve associatie gevonden met het voorkomen van MRSA bij de kalveren en een startkuur met trimethoprim/sulfa terwijl dit een positieve associatie geeft bij toediening als koppelbehandeling.

Figuur A7.2 geeft de associatie weer tussen de leeftijd van de kalveren, behandeld met en zonder koppelbehandelingen met antibioticum, en de aanwezigheid van MRSA. In de totale populatie (middelste lijn) wordt een toename in prevalentie van MRSA met een toename in leeftijd waargenomen. Deze associatie wordt versterkt wanneer de kalveren met een of meerdere antibioticakuren behandeld zijn. Wanneer geen koppelbehandelingen hebben plaatsgevonden is het verband tussen leeftijd en MRSA-dragerschap minder sterk.

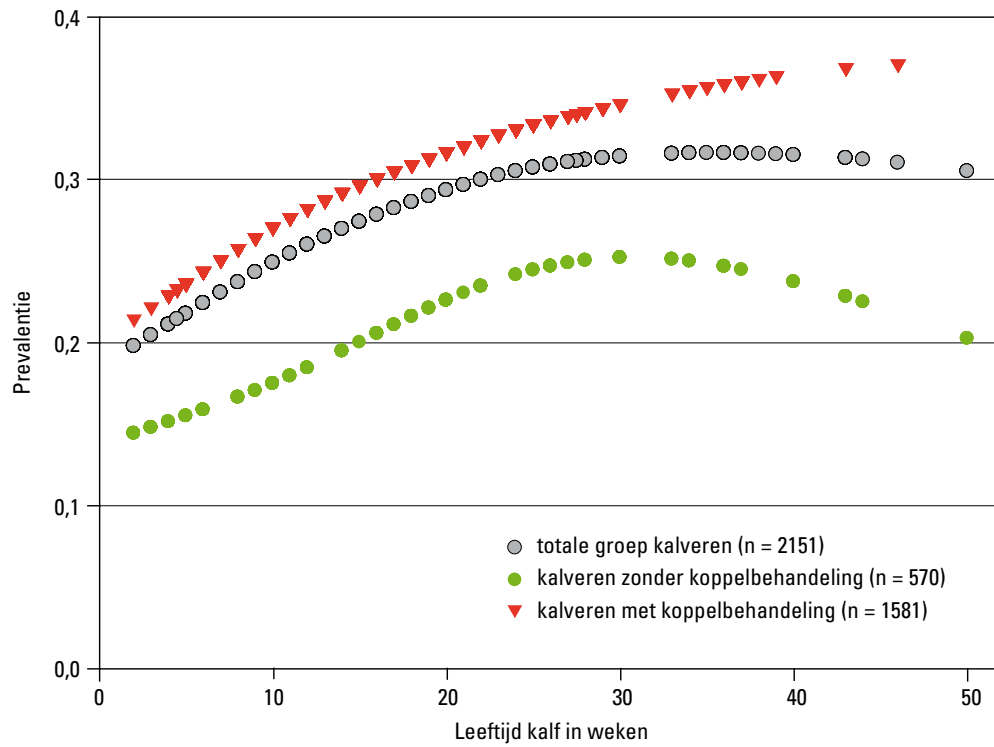
#### Risicofactoren voor MRSA-dragerschap bij mensen

In totaal namen 390 mensen deel aan het onderzoek. De totale populatie bestond uit 97 kalverhouders, 79 partners en 164 kinderen van de kalverhouders, 16 ouders van de kalverhouders en 27 werknemers. Een overzicht van de kenmerken van de onderzochte mensen is weergegeven in Tabel A7.5. Het volledige overzicht van alle kenmerken is weergegeven in Bijlage 7.

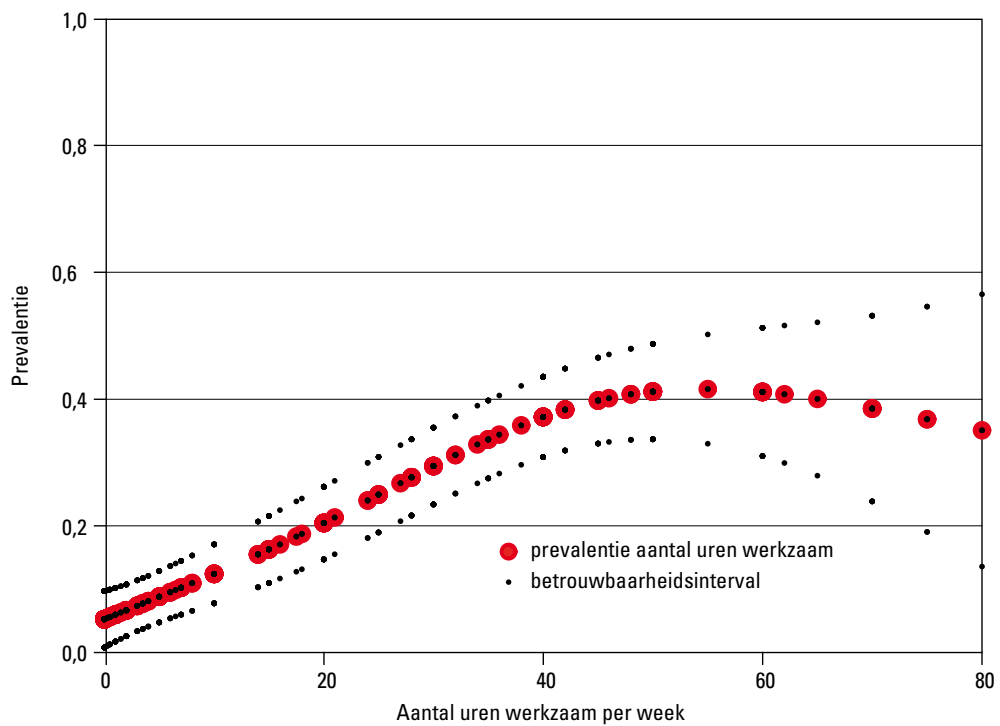
In Tabel A7.6 staat de prevalentie voor MRSA-dragerschap weergegeven voor de mensen werkzaam/ woonachtig op een vleeskalverhouderij. De MRSA-prevalentie over de totale populatie is 15,9%. Opvallend is dat er grote verschillen in prevalentie waarneembaar zijn tussen de kalverhouders en medewerkers enerzijds en gezinsleden anderzijds. De MRSA-prevalentie neemt toe naarmate de betreffende persoon meer uren per

Tabel A7.5: Kenmerken van de bestudeerde populatie, kalverhouders, gezinsleden en medewerkers woonachtig of werkzaam op een kalverhouderij (n=390).

Kenmerk	Aantal/n (%)
<b>Algemeen</b>	
Totaal aantal deelnemers	390
Geslacht (% mannen)	213 (54,6%)
Gemiddelde leeftijd (range)	32 (0-85)
Roken	55 (14,1%)
<b>Relatie tot kalverhouder</b>	
Kalverhouder (eigenaar)	97 (24,9%)
Partner van kalverhouder	79 (20,3%)
Kind van kalverhouder	164 (42,1%)
Vader/moeder van kalverhouder	16 (4,1%)
Werknemer van kalverhouder	27 (6,9%)
Anders	7 (1,8%)
<b>Werkzaamheden op bedrijf</b>	
Gemiddeld aantal uren per week werkzaam in kalverhouderij (range)	15 (0-80)



Figuur A7.2: Verband tussen leeftijd van kalveren, antibioticumgebruik en MRSA-dragerschap.



Figuur A7.3 Associatie van prevalentie van MRSA-dragerschap bij mensen en het aantal uren werkzaam/week op kalverhouderij.

Tabel A7.6: Prevalenties (%) van MRSA-dragerschap bij mensen (n=390)

Kenmerken	Prevalentie
<b>Algemeen</b>	
Mannen	23,5% (50/213)
Vrouwen	6,8% (12/177)
Roken	10,9% (6/55)
Niet-roken	16,8% (56/334)
<b>Relatie tot kalverhouder</b>	
Kalverhouder (eigenaar)	33,0 % (32/97)
Partner van kalverhouder	10,1% (8/79)
Kind van kalverhouder	4,9% (8/164)
Vader/moeder van kalverhouder	31,3% (5/16)
Werknemer van kalverhouder	29,6% (8/27)
Anders	
<b>Uren werkzaam per week op bedrijf</b>	
< 20 uur per week	6,8% (17/250)
Tussen 20-40 uur per week	23,2% (13/56)
> 40 uur per week	41,7% (30/72)
<b>MRSA</b>	
MRSA-dragerschap	15,9% (62/390)

Tabel A7.7 Gecorrigeerde Odds Ratio's en 95% betrouwbaarheidsintervallen van het verband tussen MRSA-dragerschap en determinanten bij mensen.

Determinant	MRSA-dragerschap OR (95% betrouwbaarheids-interval)
Geslacht ( referentie)	2,7 (1,3-6,0)*
Leeftijd <sup>1</sup>	1,3 (1,1 -1,5)*
Aantal uren per week werkzaam in kalverhouderij <sup>2</sup>	12,0 (3,3-43,7)*
Roken	0,5 (0,2-1,4)
Percentage positieve kalveren op het bedrijf <sup>3</sup>	2,1 (1,5- 2,9)*

\* P <0,05, \*\* P 0,10- 0,05, <sup>1</sup>Toename OR per 10 jaar, <sup>2</sup> Verschil tussen 0 en 80 uur per week werken in kalverhouderij  
<sup>3</sup> Verschil tussen 0 en 28% MRSA positieve kalveren op het bedrijf

week werkzaam is op de kalverhouderij. Dit is tevens weergegeven in Figuur A7.3. Een gedetailleerd overzicht van prevalentiecijfers is weergegeven in Bijlage 8. In Tabel A7.7 staan OR's voor de verschillende determinanten van MRSA-dragerschap bij mensen weergegeven. Significante verhoogde OR's worden gevonden voor geslacht, leeftijd, aantal uren/week werkzaam op de kalverhouderij en percentage MRSA-

positieve kalveren op het bedrijf. In Bijlage 9 staat een overzicht van alle (ongecorrigeerde) analyses. Ook met specifieke taken als het voeren, sorteren en verzorgen van de dieren worden positieve associaties gevonden. Omdat dergelijke taken sterk gecorreleerd zijn is het niet mogelijk alle taken in de gecorrigeerde analyses te verwerken. Om deze reden is er voor gekozen het aantal uren dat desbetreffende persoon op de kalverhouderij werkzaam is in de analyses te betrekken.

### Stof

Om te inventariseren of met behulp van stofmonsters eveneens de bedrijfsstatus MRSA vastgesteld kan worden, zijn van ieder bedrijf vijf stofmonsters uit de kalverstallen genomen. In totaal werden 500 stofmonsters genomen. Op 80 bedrijven werd MRSA aangetroffen in een of meerdere stofmonsters. Eveneens werden op 80 bedrijven bij een of meerdere kalveren MRSA gevonden. De desbetreffende bedrijven kwamen echter niet geheel overeen. Op 6 bedrijven werden MRSA-positieve kalveren gevonden, terwijl er geen MRSA in het stalstof werd aangetroffen. Op 10 bedrijven werd MRSA in het stalstof aangetroffen terwijl alle onderzochte kalveren MRSA-negatief bleken te zijn. Opmerkelijk was dat van de 10 bedrijven waarbij enkel MRSA in het stalstof werd aangetroffen, slechts 1 een all in out-systeem hanteerde. Overige kenmerken, zoals leeftijd van de kalveren (4-27 weken), blank- versus rosébedrijf (6 rosé, 2 blank en 2 zowel blank als rosé) varieerde tussen de bedrijven.

### Andere dieren

In totaal werden van 303 andere dieren dan kalveren neusswabs afgenomen. Tabel A7.8 toont een overzicht van deze dieren. Er werden MRSA-positieve varkens, koeien, geiten, paarden, katten en honden gevonden. Er werden alleen MRSA-positieve dieren gevonden op bedrijven waar ook MRSA werd aangetroffen bij de kalveren en/of in het stalstof. Desalniettemin lijkt de aanwezigheid van MRSA-positieve andere dieren op een bedrijf geen risico te zijn voor MRSA-dragerschap bij de kalveren.

Tabel A7.8 MRSA-dragerschap bij andere dieren (n=303) dan kalveren afkomstig van de deelnemende kalverhouderijen.

Diersoort	Aantal MRSA-positief (%)
Varkens (n=54)	25 (46%)
Koeien (melkvee) (n=51)	5 (10%)
Jongvee (n=11)	1 (8%)
Geiten (n=14)	1 (7%)
Paarden (n=36)	2 (6%)
Katten (n=35)	1 (3%)
Honden (n=90)	2 (2%)
Schape (n=9)	0 (0%)
Alpaca/lama/hert (n=3)	0 (0%)

**Tabel A7.9 Spa-typeringen van een selectie van de positieve isolaten afkomstig van kalveren en mensen.**

<b>Spa-type</b>	<b>Kalveren (n= 208) n (%)</b>	<b>Humaan (n=62) n (%)</b>
t002*	-	1 (1,6%)
t011	166 (79,8%)	50 (80,1%)
t015*	-	1 (1,6%)
t034	17 (8,2%)	-
t084*	-	1 (1,6%)
t108	7 (3,4%)	2 (3,2%)
t166*	-	1 (1,6%)
t421*	2 (1,0%)	-
t899	5 (2,4%)	3 (4,8%)
t1197	1 (0,5%)	-
t1236	2 (1,0%)	-
t1451	1 (0,5%)	-
t1457	1 (0,5%)	1 (1,6%)
t1580	1 (0,5%)	-
t1685*	1 (0,5%)	-
t2383	2 (1,0%)	1 (1,6%)
t3856	1 (0,5%)	-
Onbekend type	1 (0,5%)	1 (1,6%)

\* Niet diergerelateerde *spa*-typen

### **Spa-typering**

Van drie MRSA-kalverisolaten per bedrijf (indien aanwezig) en tevens alle MRSA-isolaten van de mensen werden *spa*-typeringen uitgevoerd. In totaal werden van 208 MRSA-positieve kalveren en van 62 MRSA-positieve mensen het *spa*-type bepaald. Een overzicht van de gevonden *spa*-typen van zowel de kalveren als de mensen is weergegeven in Tabel A7.9. Er werden hoofdzakelijk diergerelateerde *spa*-typen gevonden. Daarnaast werden zowel bij kalveren als bij de mensen enkele niet diergerelateerde *spa*-typen gevonden. De herkomst van de niet-diergerelateerde *spa*-typen zoals gevonden bij de mensen, was niet te herleiden tot eventuele blootstelling aan bekende risicofactoren zoals bezoek en of ziekenhuisopname in buitenland of een beroep in de zorg. Het diergerelateerde *spa*-type t011 werd het meest frequent gevonden (80%). Op 76% van de MRSA-positieve bedrijven (77/102) kwam slechts een *spa*-type voor onder de kalveren. Op 15% van de MRSA-positieve bedrijven (15/102) kwamen twee verschillende *spa*-typen voor en op 9% van de bedrijven (9/102) zelfs drie verschillende typen.

### **MIC – bepaling**

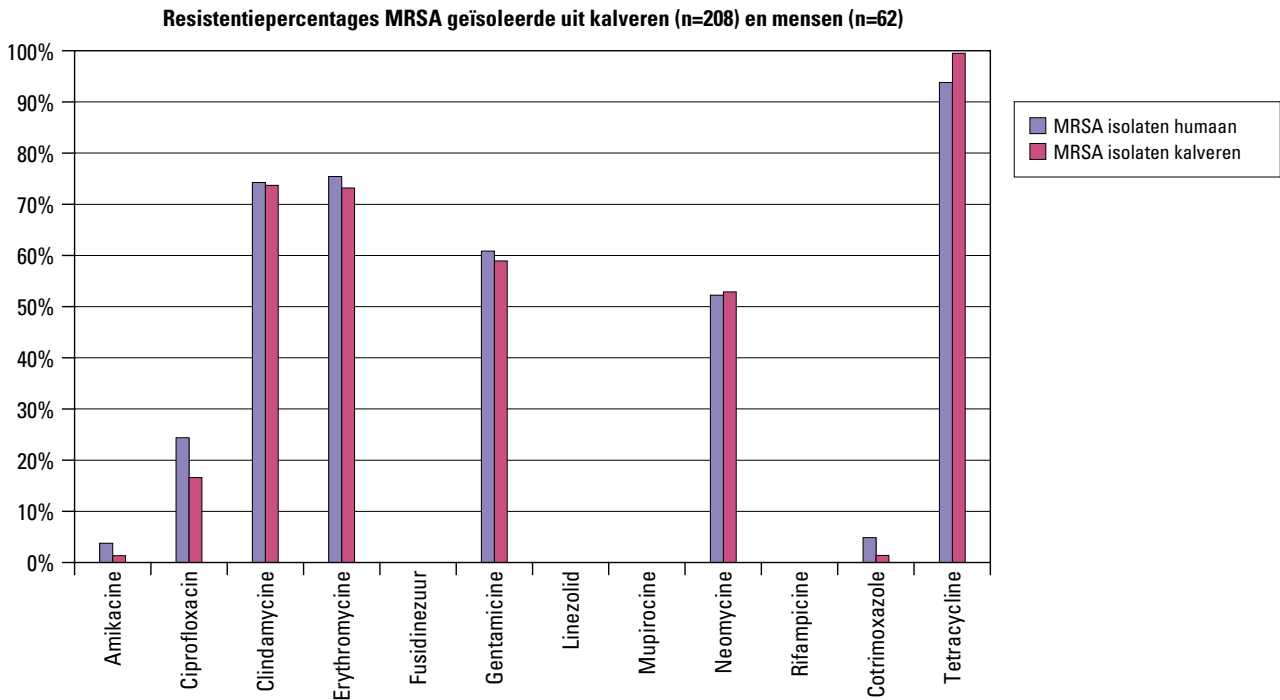
Van alle isolaten waarvan het *spa*-type bepaald is zijn ook de resistentiepatronen bepaald. MIC-bepalingen werden uitgevoerd bij het CVI te Lelystad.

Alle isolaten van de kalveren zijn tetracyclineresistent. Verder is het merendeel van de onderzochte isolaten erythromycine- (73%) en clindamycine- (72%) resistent. Tevens komt er bij 60% van de isolaten gentamicineresistentie voor. De resistentiepatronen van de humane isolaten komen sterk overeen met die van de isolaten uit de kalveren. Een overzicht van de antibioticaresistentie van de onderzochte isolaten wordt weergegeven in Figuur A7.4.

### **Discussie**

#### **Risicofactoren MRSA-dragerschap bij vleeskalveren**

Op het merendeel van de onderzochte bedrijven (88%) is de MRSA-bacterie aangetroffen. De prevalentie onder de kalveren is 28%, waarbij een significant verschil in prevalentie MRSA tussen de blanke vleeskalveren (31%) en rosé vleeskalveren (22%) gevonden wordt. Een aantal duidelijk aanwijsbare determinanten zijn vastgesteld, waaronder de leeftijd van de kalveren, het aantal kalveren op het bedrijf, het aantal kalveren per hok, de aanwezigheid van andere landbouwhuisdieren op het bedrijf, hygiëne en het antibioticumgebruik. Hoewel dit onderzoek veel inzicht geeft in de MRSA-problematiek in de kalverhouderij, zijn voor het voorstellen van interventies gegevens nodig omtrent de dynamiek en overdracht van MRSA bij kalveren. Dergelijke data kunnen alleen in een longitudinaal



**Figuur A7.4: Resistentiepercentages van de positieve isolaten afkomstig van kalveren en mensen**

onderzoek verzameld worden. Informatie verkregen uit longitudinaal onderzoek bij vleeskalveren is zeer waardevol voor de sector, maar kan tevens een directe bijdrage leveren om het risico voor MRSA bij mensen in nauw contact met deze dieren te beperken.

**Risicofactoren MRSA-dragerschap bij mensen**

De gemiddelde prevalentie van MRSA-dragerschap onder mensen die woonachtig of werkzaam zijn op een kalverhouderij is 15,9%. Er worden grote verschillen tussen de kalverhouder/medewerkers (33%) en gezinsleden (8%) aangetoond. Een aantal zeer opvallende waarnemingen suggereert dat de term ‘dragerschap’ goed gedefinieerd moet worden en onderscheiden moet worden van positieve MRSA-bevindingen door expositie. Met expositie wordt in dit verband bedoeld dat met MRSA besmet stof wordt aangetoond in de neus, terwijl mogelijk geen sprake is van kolonisatie van de neusslijmvliezen met MRSA. Ten eerste wordt er een zeer sterke associatie gevonden tussen MRSA-dragerschap bij mensen en het aantal uren dat desbetreffende persoon werkzaam is op de kalverhouderij. Mensen met intensief contact (langdurig werkzaam in de stal) met de kalveren hebben een sterk verhoogde prevalentie. Onder de mensen die korter in de stal werkzaam zijn, komt dragerschap veel minder vaak voor. Het sterke verband met het aantal uren dat men werkzaam is in de stallen/ contact heeft met dieren doet de vraag rijzen of naast dragerschap ook blootstelling aan MRSA via inhalatie van stof en depositie in de neus, dat met name bij langer verblijf in de stal kan optreden, tot positieve uitslagen heeft geleid. Een tweede observatie

is dat de kans op dragerschap van de kalverhouder sterk samenhangt met de prevalentie onder de dieren. Het lijkt onwaarschijnlijk dat de prevalentie onder dieren constant is; deze zal eerder variëren over de tijd. Deze correlatie zou dan ook op wisselingen in dragerschap bij de kalverhouder kunnen wijzen. Naast bovengenoemde waarnemingen is geconstateerd dat veldwerkers die de bedrijfsbezoeken aflegden nooit langer dan een dag na het bezoek de bacterie in de neus hadden nadat ze een MRSA-positief bedrijf hadden bezocht. In totaal zijn van deze veldwerkers meer dan 55 dagen observaties beschikbaar.

**MRSA in stof: indicator voor bedrijfstatus**

Over het algemeen komen de resultaten van de stofmonsters goed overeen met de resultaten van de neusswabs van de kalveren. De resultaten van de stofmonsters kunnen een indicatie geven of de bacterie op het bedrijf aanwezig is of niet. Het is echter onduidelijk of het stof dat verzameld wordt afkomstig is van het huidige koppel kalveren, of dat dit stof al gedurende langere tijd in de stal aanwezig is en daarmee wellicht van een andere groep dieren afkomstig. We vinden immers ook MRSA-negatieve dieren op bedrijven waar het stof MRSA-positief is. Wanneer we informatie willen over de *huidige* bedrijfsstatus en daarmee de *huidige* groep aanwezige kalveren, strekt het dan ook tot aanbeveling om niet alleen stofmonsters af te nemen, maar eveneens neusswabs van de kalveren.

**Spa-typering en MIC-bepaling**

Van slechts drie MRSA-kalverisolaten per bedrijf is het



*spa*-type en MIC bepaald. De eerste resultaten laten een grotere variatie in stammen zien in vergelijking met de eerder onderzochte isolaten van varkens<sup>2</sup>. Ook komen de MIC-waarden van de kalverisolaten niet geheel overeen met die van de varkens. Vermoedelijk komt dit door een verschil in antibioticumgebruik (soort) tussen de verschillende sectoren. Omdat slechts drie isolaten per bedrijf onderzocht zijn geven de gevonden resultaten een minimale variatie in *spa*-typen weer. Het is mogelijk dat meer typen MRSA op een bedrijf aanwezig zijn dan tot nu toe aangetoond is.

### Aanbevelingen

Inzicht in de dynamiek van spreiding en overdracht van MRSA voor zowel mensen als dieren is van groot belang voor optimale ontwikkeling van richtlijnen en het formuleren van aanbevelingen. Dit kan alleen worden vastgesteld met behulp van een longitudinaal onderzoek, waarbij herhalingsmetingen worden uitgevoerd. Bij mensen is het daarom verstandig om eventuele variatie in dragerschapstatus vast te stellen, bijvoorbeeld op momenten dat weinig contact bestaat met kalveren en juist onder de groepen met beperkt contact met de dieren. Tevens zou er gekeken kunnen worden naar veranderingen in dragerschap tijdens de vakantie of een periode met leegstand van het bedrijf.

Zoals duidelijk wordt uit de resultaten van dit onderzoek is er een sterke associatie tussen het risico van MRSA bij de kalveren en het risico voor MRSA bij de mensen die hier nauw in contact mee zijn. Herhalingsmetingen bij de kalveren kunnen om deze reden eveneens nuttig informatie opleveren. Tevens kan dit type onderzoek meer inzicht geven in de bron van MRSA (zoals het land van herkomst van het kalf) en kunnen interventies ingepast worden, met name op het gebied van antibioticumbeleid en hygiëne.

### Conclusie

MRSA komt voor op een zeer groot deel van de kalverhouderijen. Het voorkomen van MRSA onder de kalveren hangt samen met het antibioticumgebruik en specifieke houderijcondities zoals het aantal dieren op het bedrijf en in de hokken, en het aantal stallen. Hygiënemaatregelen zoals het reinigen al dan niet in combinatie met het desinfecteren van de stallen, lijken voor een afname te zorgen van de aanwezigheid van MRSA. Gebaseerd op deze waarnemingen lijkt het raadzaam om het antibioticumgebruik van de kalveren te beperken en de hygiëne van de stallen te waarborgen. Daartoe moeten echter deze associaties eerst in longitudinaal onderzoek bevestigd worden, al of niet aangevuld met gecontroleerde interventies. Daarnaast suggereren deze resultaten dat het risico op MRSA wordt verkleind door de dieren in niet al te grote groepen te huisvesten en waar mogelijk over meerdere stallen te verdelen.

Gezien het in groten getale voorkomen van MRSA op kalverhouderijen is het dan ook niet verwonderlijk dat in vergelijking met de 'standaard' Nederlandse

bevolking, mensen die werkzaam of woonachtig zijn op een kalverhouderij een verhoogde kans hebben om MRSA bij zich te hebben. De kans op MRSA-dragerschap bij mensen hangt sterk samen met de duur van de werkzaamheden in de kalverstallen en het aantal MRSA-positieve dieren op het bedrijf. Hoewel het er op lijkt dat diergerelateerde MRSA niet goed spreidt tussen mensen onderling, is vervolgonderzoek naar de dynamiek van spreiding en overdracht zeer belangrijk om dit met zekerheid vast te stellen. Pas dan kunnen richtlijnen optimaal onderbouwd en ontwikkeld worden.

### Output

H. Graveland, J.A. Wagenaar, M.J. Broekhuizen-Stins, I. Oosting-Schothorst, A.H. Schoormans, E. van Duijkeren, X. Huijsdens, D. Mevius and D. Heederik, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in veal calf farmers and veal calves in the Netherlands, ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens Copenhagen, Denmark (2008), pp. 62–63.

H. Graveland, J.A. Wagenaar, H. Heesterbeek, E. van Duijkeren, D. Mevius and D. Heederik, Livestock associated MRSA in humans: Evidence for a direct association with animal antimicrobial usage and farm hygiene, submitted (2009).

### Literatuur

1. Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg Infect Dis* 2004;10(9):1627-34.
2. De Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, et al. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol* 2007;122(3-4):366-72.
3. Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, et al. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006;5:26.
4. Van Duijkeren E, Wolfhagen MJ, Box AT, Heck ME, Wannet WJ, Fluit AC. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2004;10(12):2235-7.
5. Wulf M. Prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* in Dutch veterinarians and veterinary students. *Emerg Infect Dis*. 2006 Dec;12(12):1939-41.
6. Van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 2007;13(12):1834-9.

## Bijlagen

### **Bijlage 1 Vragenlijst voor kalverhouder/ gezinsleden/medewerkers**

(in te zien op de websites van CIB ([www.rivm.nl/cib/mrsa](http://www.rivm.nl/cib/mrsa))  
en LNV ([www.minlnv.nl](http://www.minlnv.nl) (zie onder publicaties))

### **Bijlage 2 Bedrijfschecklist**

(in te zien op de websites van CIB ([www.rivm.nl/cib/mrsa](http://www.rivm.nl/cib/mrsa))  
en LNV ([www.minlnv.nl](http://www.minlnv.nl) (zie onder publicaties))

### Bijlage 3 Algemene bedrijfskenmerken

	Totaal	Blank	Rosé	Blank+Rosé
<b>Algemene kenmerken</b>				
Aantal bedrijven	102	51 (50%)	43 (42,2%)	8 (7,8%)
Starters tot 12 weken op bedrijf	3	-	3	-
Starters vanaf 12 weken op bedrijf	19	1	17	1
Groepshuisvesting met automaatvoeding	3	2	-	1
Gemiddeld aantal kalveren	565 (25-2200)	735 (90-2200)	324 (25-1700)	799 (260-1300)
Aantal stallen	2,2 (1-6)	2,0 (1-5)	2,3 (1-6)	3,1 (1-5)
Bedrijf heeft meerdere locaties	18/102 (17,6%)	8/51 (15,7%)	8/43 (18,6%)	2/8 (25,0%)
Bedrijf van integratie	44/102 (43,1%)	37/51 (72,5%)	3/43 (7,0%)	4/8 (50%)
All in all out	41/102 (40,2%)	32/51 (62,7%)	7/43 (16,3%)	2/8 (25,0%)
<b>Aanwezigheid andere dieren</b>				
Andere landbouwhuisdieren	73/102 (71,5%)	35/51 (68,3%)	32/43 (74,4%)	6/8 (75,0%)
Kleine huisdieren	82/102 (80,4%)	42/51 (82,4%)	34/43 (79,1%)	6/8 (75,0%)
<b>Verwarming in de stal</b>				
Geen	43/102 (42,2%)	10/51 (19,6%)	30/43 (69,7%)	3/8 (37,5%)
Centrale verwarming	4/102 (3,9%)	2/51 (3,9%)	1/43 (2,3%)	1/8 (12,5%)
Vloer verwarming	6/102 (5,9%)	2/51 (3,9%)	3/43 (6,9%)	1/8 (12,5%)
Gasstralers/kapjes	36/102 (35,3%)	25/51 (49,0%)	8/43 (16,6%)	3/8 (37,5%)
Hete lucht kanon	24/102 (23,5%)	18/51 (35,3%)	3/43 (6,9%)	3/8 (37,5%)
<b>Reinigen</b>				
Nooit	19/102 (18,6%)	5/51 (9,8%)	14/43 (32,6%)	-
Zelden	19/102 (18,6%)	8/51 (15,7%)	10/43 (23,3%)	1/8 (12,5%)
X per jaar	8/102 (7,8%)	1/51 (2,0%)	6/43 (13,9%)	1/8 (12,5%)
Meestal na iedere ronde	12/102 (11,8%)	3/51 (5,9%)	9/43 (20,9%)	-
Na iedere ronde	44/102 (43,1%)	34/51 (66,7%)	4/43 (9,3%)	6/8 (75,0%)
Reinigen babybox	31/88 (35,2%)	21/50 (42,0%)	7/30 (23,3%)	3/8 (37,5%)
<b>Desinfectie</b>				
Nooit	79/102 (77,5%)	38/51 (74,5%)	34/43 (79,1%)	7/8 (87,5%)
Zelden	9/102 (8,8%)	6/51 (11,8%)	2/43 (4,7%)	1/8 (12,5%)
# per jaar	1/102 (1,0%)	-	1/43 (2,3%)	-
Meestal na iedere ronde	9/102 (8,8%)	5/51 (9,8%)	4/43 (9,3%)	-
Na iedere ronde	4/102 (3,9%)	2/51 (3,92%)	2/43 (4,7%)	-
Desinfectie babybox	15/102 (16,3%)	10/50 (20,0%)	4/34 (11,8%)	1/8 (12,5%)
<b>Hygiëne</b>				
Omkleedruimte	63/102 (61,8%)	33/51 (64,7%)	23/43 (53,5%)	7/8 (87,5%)
Water, zeep en handdoek aanwezig	63/102 (61,8%)	37/51 (74,0%)	20/43 (46,5%)	6/8 (75,0%)
Ontsmettingsbak in gebruik	15/102 (14,7%)	10/51 (19,6%)	2/43 (4,7%)	3/8 (37,5%)
<b>Ratten- en muizenbestrijding</b>				
Niet	4/102 (3,9%)	3/51 (5,9%)	1/43 (2,3%)	-
Ja, professioneel uitbesteed	22/102 (21,6%)	14/51 (27,5%)	7/43 (16,3%)	1/8 (12,5%)
Ja, kalverhouder doet dit zelf; op indicatie	28/102 (27,5%)	11/51 (21,6%)	13/43 (30,2%)	4/8 (50,0%)
Ja, kalverhouder doet dit zelf; met vaste regelmaat	41/102 (40,2%)	20/51 (39,2%)	18/43 (41,9%)	3/8 (37,5%)
Ja, met natuurlijke vijanden	7/102 (6,9%)	3/51 (5,9%)	4/43 (9,3%)	-

	<b>Totaal</b>	<b>Blank</b>	<b>Rosé</b>	<b>Blank+Rosé</b>
<b>Vliegenbestrijding</b>				
Niet	45/101 (44,5%)	20/50 (40,0%)	23/43 (53,5%)	2/8 (25,0%)
Lokstof	43/101 (42,1%)	23/50 (22,7%)	15/43 (38,9%)	5/8 (62,5%)
Madendood	15/101 (14,8%)	7/50 (14,0%)	7/43 (16,3%)	1/8 (12,5%)
Lamp	10/101 (9,9%)	4/50 (8,0%)	4/43 (9,3%)	2/8 (25,0%)
Lint	2/101 (2,0%)	-	2/43 (4,7%)	-
<b>Sorteren</b>				
Niet sorteren	19/101 (18,8%)	2/51 (3,9%)	17/42 (40,5%)	-
Eens per maand	22/101 (21,8%)	7/51 (13,7%)	14/42 (33,3%)	1/8 (12,5%)
1x per 2 weken	14/101 (13,9%)	11/51 (21,6%)	2/42 (4,8%)	1/8 (12,5%)
1x per week	37/101 (36,6%)	27/51 (52,9%)	5/42 (11,9%)	5/8 (62,5%)
Om de dag	1/101 (1,0%)	-	-	1/8 (12,5%)
Iedere dag	8/101 (7,9%)	4/51 (7,8%)	4/42 (9,5%)	-
<b>Voer kalveren</b>				
Melk	82/102 (80,4%)	50/51 (98,0%)	24/43 (55,8%)	8/8 (100%)
Snijmaïs	86/102 (87,5%)	36/51 (70,6%)	43/43 (100%)	7/8 (87,5%)
Brok	71/102 (69,6%)	25/51 (49,0%)	40/43 (93,0%)	6/8 (75,0%)
Gerst/granen	19/102 (18,6%)	14/51 (27,5%)	5/43 (11,6%)	0/8 (0,0%)
Stro	43/102 (25,0%)	25/51 (49,0%)	16/43 (37,2%)	2/43 (25,0%)
Anders	29/102 (28,4%)	5/51 (9,8%)	23/43 (53,5%)	1/8 (12,5%)
<b>Voersysteem</b>				
Melk uit menger	7/81 (2,0%)	1/50 (2,0%)	6/23 (26,1)	0/8 (0,0%)
Melk met slang en voerpistool	56/81 (69,1%)	39/50 (78,0%)	3/23 (13,0%)	0/0 (0,0%)
(Drink)Automatisch	14/81 (17,3%)	9/50 (18,0%)	3/23 (13,0%)	2/8 (25,0%)
Melk anders	4/81 (5,0%)	1/50 (2,0%)	3/23 (13,0%)	0/8 (0,0%)
Ruwvoer met de hand	43/102 (42,2%)	24/51 (47,1%)	14/43 (32,6%)	5/8 (62,5%)
Ruwvoer voermengwagen	58/102 (56,9%)	26/51 (51,0%)	29/43 (67,4%)	3/8 (37,5%)
Ruwvoer automatisch	1/102 (0,1%)	1/51 (2,0%)	0/43 (0,0%)	0/8 (0,0%)
<b>MRSA</b>				
MRSA aanwezig (in kalveren en/of stof)	90/102 (88,2%)	44/51 (86,2%)	38/43 (88,4%)	8/8 (100%)
MRSA in kalveren	80/102 (78,4%)	42/51 (82,4%)	32/43 (74,4%)	6/8 (75,0%)
MRSA in stof	80/98 (81,6%)	40/50 (80,0%)	33/41 (80,5%)	7/7 (100,0%)

**Bijlage 4 Algemene kenmerken populatie kalveren**

	<b>Totaal (blank+rosé)</b>	<b>Blank</b>	<b>Rosé</b>
<b>Soort</b>	2151	1309 (60,8%)	842 (39,2%)
<b>Leeftijd</b>			
Gemiddelde leeftijd in weken	17,8 (2-104)	15,9 (2-29)	20,8 (2-104)
Aantal kalveren =<6 weken	301/2151 (14,0%)	220/1309 (16,8%)	81/842 (9,6%)
Aantal kalveren 7-12 weken	458/2151 (21,3%)	270/1309 (20,6%)	188/842 (22,3%)
Aantal kalveren >12 weken	1392/5151 (28,2%)	819/1309 (62,6%)	573/842 (68,1%)
<b>Geslacht</b>			
Stier	1992/2151 (92,6%)	1166/1309 (89,1%)	826/842 (98,1%)
Vaars	159/2151 (7,4%)	143/1309 (10,9%)	16/842 (1,9%)
<b>Gemiddeld aantal kalveren per hok</b>	9,2 (1-85)	8,6 (1-85)	9,9 (1-77)
<b>Land van herkomst</b>			
Nederland	1257/2151 (58,4%)	936/1309 (71,5%)	321/842 (38,1%)
Duitsland	272/2151 (12,7%)	117/1309 (8,9%)	155/842 (18,4%)
Polen	73/2151 (3,4%)	45/1309 (3,4%)	28/842 (3,3%)
UK	145/2151 (6,7%)	40/1309 (3,1%)	105/842 (12,5%)
België	66/2151 (3,1%)	20/1309 1,5%)	46/842 (5,5%)
Ierland	97/2151 (4,5%)	70/1309 (5,4%)	27/842 (3,2%)
Denemarken	18/2151 (0,8%)	5/1309 (0,4%)	13/842 (1,5%)
Litouwen	59/2151 (2,7%)	31/1309 (2,4%)	28/842 (3,3%)
Italië	12/2151 (0,6%)	-	12/842 (1,4%)
Frankrijk	37/2151 (1,7%)	32/1309 (2,4%)	5/842 (0,6%)
Tsjechië	23/2151 (1,1%)	4/1309 (0,3%)	19/842 (2,3%)
Letland	46/2151 (2,1%)	9/1309 (0,7%)	37/842 (4,4%)
Estland	20/2151 (0,9%)	-	20/842 (2,4%)
Anders	26/2151 (1,2%)	-	26/842 (3,1%)
<b>Voersysteem</b>			
Emmer	261/2151 (12,1%)	177/1309 (13,5%)	84/842 (9,9%)
Voergoot	601/2151 (27,9%)	54/1309 (4,1%)	547/842 (65,0%)
Trog	1228/2151 (57,1%)	1017/1309 (77,7%)	211/842 (25,1%)
Anders	61/2151 (2,8%)	61/1309 (4,7%)	-
<b>Drinksysteem</b>			
Nippel	691/2151 (32,1%)	371/1309 (28,3%)	320/842 (38,0%)
Drinkbak	718/2151 (33,4%)	227/1309 (17,3%)	491/842 (58,3%)
Trog	547/2151 (25,4%)	520/1309 (39,7%)	37/842 (3,21%)
Anders	195/2151 (9,1%)	191/1309 (14,6%)	4/842 (0,5%)
<b>Antibioticagebruik</b>			
Startkuur			
Startkuur	1776/2151 (82,6%)	1274/1309 (97,3%)	502/842 (56,6%)
Gemiddeld aantal behandeldagen startkuur	8,6 (3-21)	9,0 (5-21)	7,5 (3-14)
Startkuur tetracycline	1586/1776 (89,3%)	1226/1274 (96,2%)	360/502 (71,7%)
Startkuur polymixine	1601/1776 (90,0%)	1214/1274 (95,3%)	387/502 (77,1%)

	<b>Totaal (blank+rosé)</b>	<b>Blank</b>	<b>Rosé</b>
Startkuur trimethoprimsulfa	133/1776 (7,5%)	25/1274 (2,0%)	108/502 (21,5%)
Startkuur aminoglycoside	78/1776 (4,4%)	72/1274 (5,6%)	6/502 (1,2%)
Startkuur macrolide	38/1776 (2,1%)	-	38/502 (7,5%)
<b>Koppelbehandelingen</b>			
Koppelbehandeling	1581/2151 (73,5%)	1184/1309 (90,5%)	397/842 (47,2%)
Gemiddeld aantal koppelbehandelingen	2,1 (1-7)	2,5 (1-7)	1,7 (1-6)
Gemiddeld aantal behandeldagen	12,8 (2-50)	13,9 (2-50)	9,4 (3-30)
Koppelbehandeling tetracycline	1366/1581 (86,4%)	1015/1184 (85,7%)	351/397 (88,4%)
Koppelbehandeling polymixine	69/1581 (4,3%)	44/1184 (3,7%)	25/397 (6,3%)
Koppelbehandeling quinolonen	167/1581 (10,6%)	134/1184 (11,3%)	33/397 (8,3%)
Koppelbehandeling macroliden	783/1581 (49,5%)	726/1184 (61,3%)	57/397 (14,4%)
Koppelbehandeling trimethoprimsulfa	530/1581 (33,5%)	434/1184 (36,7%)	96/397 (24,2%)
penicilline (β-lactam)	257/1581 (16,3%)	229/1184 (19,3%)	28/397 (7,1%)
Koppelbehandeling aminoglycoside	63/1581 (3,9%)	38/1184 (3,2%)	25/397 (6,3%)
<b>Gemiddeld percentage individuele behandelingen huidige koppel kalveren (n=1617)</b>	<b>17,5 (0-100)</b>	<b>18,9 (0-50)</b>	<b>15,5 (0-100)</b>

**Bijlage 5 Prevalentie MRSA-dragerschap bij kalveren**

	<b>Totaal</b>	<b>Blank</b>	<b>Rosé</b>
<b>MRSA-dragerschap</b>	27,5% (592/2151)	31,3% (410/1309)	21,6% (182/842)
<b>Leeftijd van kalf in weken</b>			
<=6 weken	12,3% (37/301)	14,1% (31/220)	7,4% (6/81)
7-<=12 weken	35,6% (163/458)	50,0% (135/270)	14,9% (28/188)
>=13 weken	28,2% (392/1392)	29,8% (244/819)	25,8% (148/573)
<b>Geslacht</b>			
Vaars	28,3% (45/159)	26,5% (38/143)	43,8% (7/16)
Stier	27,5% (547/1992)	31,9% (372/1166)	21,2% (175/826)
<b>Land van herkomst</b>			
Nederland	29,4% (369/1257)	32,7% (306/936)	19,6% (63/321)
Duitsland	25,4% (69/272)	26,5% (31/117)	24,5% (38/155)
Polen	16,4% (12/73)	3,4% (9/45)	10,7% (3/28)
UK	24,1% (35/145)	17,5% (7/40)	26,7% (28/105)
België	59,1% (39/66)	85,0% (17/20)	47,8% (22/46)
Ierland	15,5% (15/97)	21,4% (15/70)	0% (0/27)
Denemarken	5,6% (1/18)	0% (0/5)	7,7% (1/13)
Litouwen	25,4% (15/59)	25,8% (8/31)	25,0% (7/28)
Italië	58,3% (7/12)	-	58,3% (7/12)
Frankrijk	37,8% (14/37)	34,4% (11/32)	60,0% (3/5)
Tsjechië	4,4% (1/23)	0% (0/4)	5,3% (1/19)
Letland	17,4% (8/46)	66,7% (6/9)	5,4% (2/37)
Estland	25,0% (5/20)	-	25,0% (5/20)
Anders	7,7% (2/26)	-	7,7% (2/26)
<b>Voersysteem</b>			
Emmer	15,3% (40/261)	15,3% (27/177)	15,5% (13/84)
Voergoot	25,5% (153/601)	35,2% (19/54)	24,5% (134/547)
Trog	29,6% (363/1228)	32,3% (328/1017)	16,6% (35/211)
Anders	59,1% (36/61)	59,1% (36/61)	-
<b>Drinksysteem</b>			
Nippel	26,3% (182/691)	26,4% (98/371)	26,3% (84/320)
Drinkbak	24,0% (172/718)	34,4% (78/227)	19,1% (94/491)
Trog	35,7% (195/547)	36,7% (191/520)	14,8% (4/27)
Anders	22,1% (43/195)	22,5% (43/191)	0% (0/4)
<b>Antibioticumgebruik*</b>			
Startkuur	28,0% (498/1776)	31,4% (400/1274)	19,5% (98/502)
Geen startkuur	25,1% (94/375)	28,5% (10/35)	24,7% (84/340)
Startkuur tetracycline	28,0% (445/1586)	30,8% (377/1226)	18,9% (68/360)
Startkuur polymixine	27,1% (434/1601)	29,7% (360/1214)	19,1% (74/387)
Startkuur trimethoprimsulfa	11,3% (15/133)	4,0% (1/25)	13,0% (14/108)
Startkuur aminoglycoside	70,5% (55/78)	70,8% (51/72)	66,7% (4/6)
Startkuur macrolide	0% (0/38)	-	0% (0/38)

	<b>Totaal</b>	<b>Blank</b>	<b>Rosé</b>
<b>Koppelbehandelingen</b>	30,0% (475/1581)	32,9% (390/1184)	21,4% (85/397)
Geen koppelbehandeling	20,5% (117/570)	16,0% (20/125)	21,8% (97/445)
Koppelbehandeling tetracycline	29,7% (405/1366)	32,7% (332/1184)	20,8% (73/351)
Koppelbehandeling polymixine	23,2% (16/69)	11,4% (5/44)	44,0% (11/45)
Koppelbehandeling quinolonen	26,4% (44/167)	24,6% (33/134)	33,3% (11/33)
Koppelbehandeling macroliden	33,3% (261/783)	35,5% (258/726)	5,3% (3/57)
Koppelbehandeling trimethoprimsulfa	29,3% (155/530)	32,9% (143/434)	12,5% (12/96)
penicilline ( $\beta$ -lactam)	30,0% (77/257)	28,8% (66/229)	39,3% (11/28)
Koppelbehandeling aminoglycoside	33,3% (21/63)	31,6% (12/38)	36,0% (9/25)

\* Informatie over antibioticagebruik weergegeven per koppel



**Bijlage 6 Ruwe (ongecorrigeerde) Odds Ratio's kalveren**

	<b>Totaal</b>	<b>Blank</b>	<b>Rosé</b>
Geslacht (♀ referentie)	0,95 (0,7-1,4)	1,29 (0,876-1,914)	0,35 (0,1-0,9)*
Leeftijd in weken <sup>o</sup>	1,14 (1,0-1,2)*	1,24 (1,1-1,3)*	1,23 (1,1-1,4)*
Aantal kalveren in het hok <sup>^</sup>	1,06 (1,0-1,1)*	1,09 (1,0-1,1)*	0,97 (0,9-1,1)
<b>Categorie Bedrijf</b>			
Volledig blank (referentie)	1	-	-
Volledig rosé	0,59 (0,5-0,7)*	-	-
Gecombineerd	1,06 (0,8-1,5)	-	-
<b>Afmestbedrijven (referentie)</b>			
Starters	0,67 (0,3-1,4)	-	-
Standaard blank/rosé	1,15 (0,9-1,5)	-	-
All in all out	1,26 (1,0-1,5)*	0,82 (0,6-1,0)	2,1 (1,4-3,2)*
Aantal stallen	0,95 (0,9-1,0)	0,90 (0,8-0,9)*	1,09 (0,9-1,2)
Bedrijf met meerdere locaties	1,00 (0,8-1,3)	1,08 (0,8-1,4)	0,93 (0,6-1,4)
Kleine huisdieren	1,41 (1,1-1,8)*	1,63 (1,2-2,3)*	1,01(0,7-1,5)
Andere landbouwhuisdieren	1,19 (0,9-1,5)**	1,35 (1,1-1,7)*	0,97(0,7-1,4)
Percentage positief stof <sup>s</sup>	1,41 (1,3-1,5)*	1,38 (1,3-1,5)*	1,43 (1,3-1,6)*
Percentage positieve kalveren <sup>f</sup>	5,19 (4,5-6,0)*	4,97 (4,2-5,9)*	5,99 (4,4-8,1)*
<b>Land van herkomst</b>			
Nederland (referentie)	1	1	1
Duitsland	0,82 (0,6-1,1)	0,74 (0,5-1,1)	1,33 (0,8-2,1)
Polen	0,47 (0,3-0,8)	0,51 (0,2-1,1)**	0,49 (0,1-1,7)
UK	0,77 (0,5-1,1)	0,44 (0,1-0,9)*	1,49 (0,9-2,5)
België	3,48 (2,1-5,8)*	11,67 (3,4-40,1)*	3,75 (1,9-7,1)*
Ierland	0,44(0,3-0,7)*	0,56 (0,3-1,0)**	<0,01 (<0,001->999,9)
Denemarken	0,14 (0,0-1,1)*	<0,01 (<0,001->999,9)	0,34 (0,0-2,7)
Litouwen	0,82 (0,5-1,5)	0,72 (0,3-1,6)	1,37 (0,6-3,4)
Italië	3,37 (1,1-10,7)*	-	5,73 (1,8-18,7)*
Frankrijk	1,46 (0,7-2,9)	1,08 (0,5-2,3)	6,14 (1,0-37,5)*
Tsjechië	0,11 (0,0-0,8)*	<0,01 (<0,001->999,9)	0,23 (0,0-1,7)
Letland	0,51 (0,2-1,1)*	4,12 (1,0-16,6)*	0,23 (0,1-0,9)*
Estland	0,80 (0,2-2,2)	-	1,37 (0,5-3,9)
Anders	0,20 (0,0-0,9)*	-	0,34 (0,1-1,5)
<b>Voersysteem</b>			
Emmer (referentie)	1	1	1
Voergoot	1,89 (1,3-2,8)*	3,02 (1,5-6,0)*	1,77 (0,9-3,3)**
Trog	2,32 (1,6-3,3)*	2,65 (1,7-4,1)*	1,09 (0,5-2,2)
Anders	7,96 (4,3-14,7)*	8,00 (4,2-15,4)*	-

	Totaal	Blank	Rosé
<b>Drinksysteem</b>			
Nippel (referentie)	1	1	1
Drinkbak	0,88 (0,7-1,1)	3,02 (1,5-6,1)*	0,67 (0,5-0,9)*
Trog	1,55 (1,2-1,9)*	2,64 (1,7-4,1)*	0,49 (0,2-1,4)
Anders	0,79 (0,5-1,2)	8,00 (4,2-15,4)*	<0,01 (<0,001->999,9)
<b>Hygiëne</b>			
Reinigen stallen	0,64 (0,5-0,8)*	0,64 (0,4-1)*	0,4 (0,3-0,6)*
Desinfectie stallen	0,56 (0,4-0,8)*	0,77 (0,5-1,1)	0,27 (0,1-0,5)*
Ratten- en muizen- bestrijding	7,84 (2,9-21,5)*	30,77 (4,3-222,3)*	1,48 (0,4-5,1)
Vliegenbestrijding			
<b>Sorteren van kalveren &lt;&gt;</b>	1,48 (1,2-1,8)*	1,29 (1-1,6)*	1,29 (0,9-1,8)
Antibioticumgebruik startkuur			
Startkuur	1,16 (0,9-1,5)	1,14 (0,5-2,4)	0,74 (0,5-1,0)**
Aantal behandel-dagen startkuur <sup>@</sup>	1,4 (1,3-1,4)*	0,91 (0,6-1,3)	1,03 (0,9-1,0)
Startkuur tetracycline	1,17 (0,9-1,5)	1,11 (0,5-2,3)	0,71 (0,5-1,0)**
Startkuur polymixine	1,11 (0,9-1,4)	1,03 (0,9-1,0)	0,72 (0,5-1,0)**
Startkuur trimethoprimsulfa	0,38 (0,2-0,6)*	0,80 (0,6-0,9)*	0,89 (0,8-0,9)*
Startkuur aminoglycoside	7,15 (4,2-12,3)*	6,07 (2,5-14,8)*	6,09 (1,1-33,9)*
<b>Koppelbehandelingen</b>			
Koppelbehandeling	1,66 (1,3-2,1)*	2,58 (1,6-4,2)*	0,98 (0,7-1,4)
Aantal behandel-dagen koppelbehandelingen <sup>@</sup>	1,10 (1,1-1,1)*	1,00 (0,9-1,0)	1,01 (0,9-1,0)
Koppelbehandeling tetracycline	1,63 (1,3-2,1)*	2,55 (1,6-4,2)*	0,94 (0,7-1,3)
Koppelbehandeling polymixine	1,17 (0,6-2,1)	0,67 (0,2-1,9)	2,82 (1,2-6,4)*
Koppelbehandeling quinolonen	1,39 (0,9-2,1)	1,72 (0,9-3,2)**	1,79 (0,8-3,8)
Koppelbehandeling macroliden	1,94 (1,5-2,5)*	2,89 (1,8-4,8)	0,20 (0,1-0,1)*
Koppelbehandeling trimethoprimsulfa	1,6 (1,2-2,1)*	2,58 (1,5-4,3)*	0,51 (0,3-0,9)*
penicilline (β-lactam)	1,66( 1,2-2,3)*	2,13 (1,2-3,7)*	2,32 (1,1 -5,1)*
Koppelbehandeling aminoglycoside	1,94 (1,1-3,4)*	2,42 (1,0-5,6)*	2,02 (0,9-4,7)
<b>Individuele behandelingen met antibiotica<sup>%</sup></b>			
Percentage kalveren individueel behandeld van huidige koppel	1 (1,0-1,0)	1,01 (0,9-1,0)	1,00 (0,9-1,0)

\* P < 0.05, %Toename per 10 weken leeftijd, ^Toename per 5 kalveren/hok, <sup>§</sup>Toename per 20%, <sup>#</sup>Toename per 28%, <sup>∞</sup> Weinig (<1x/2weken) t.o.v Veel (>1x/2 weken) sorteren, <sup>@</sup>Toename per 10 behandel-dagen.

## Bijlage 7 Algemene kenmerken humaan

<b>Algemeen</b>	
Totaal aantal deelnemers	390
Geslacht (% mannen)	213/390 (54,6%)
Gemiddelde leeftijd	32 (0-85)
Niet woonachtig op bedrijf	68/390 (17,4%)
Roken	55/389 (14,1%)
Afgelopen jaar voor minimaal 1 week in buitenland geweest	101/389 (26,0%)
<b>Relatie tot kalverhouder</b>	
Kalverhouder (eigenaar)	97/390 (24,9%)
Partner van kalverhouder	79/390 (20,3%)
Kind van kalverhouder	164/390 (42,1%)
Vader/moeder van kalverhouder	16/390 (4,1%)
Werknemer van kalverhouder	27/390 (6,9%)
Anders	7/390 (1,8%)
<b>Contact met dieren</b>	
Contact met kalveren van bedrijf	276/390 (70,7%)
Contact met andere dieren dan kalveren van bedrijf	44/390 (11,0%)
Contact met kalveren van andere bedrijven	44/380 (11,6%)
Contact met andere dieren dan kalveren van andere bedrijven	103/389 (26,5%)
<b>Werkzaamheden op bedrijf</b>	
Gemiddeld aantal uren per week werkzaam in kalverhouderij	15,01 (0-80)
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>voeren</b> van kalveren (leeftijd 1-6 weken)	1,27 (0-10)
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>voeren</b> van kalveren (leeftijd 7-20 weken)	1,14 (0-8)
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>voeren</b> van kalveren (leeftijd >20 weken)	0,99 (0-8)
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>sorteren</b> van kalveren (leeftijd 1-6 weken)	0,18 (0-5)
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>sorteren</b> van kalveren (leeftijd 7-20 weken)	0,25 (0-4)
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>sorteren</b> van kalveren (leeftijd >20 weken)	0,17 (0-5)
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>dier(geneeskundige)verzorging</b> van kalveren (leeftijd 1-6 weken)	0,29 (0-5)
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>dier(geneeskundige)verzorging</b> van kalveren (leeftijd 7-20 weken)	0,22 (0-5)
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>dier(geneeskundige)verzorging</b> van kalveren (leeftijd >20 weken)	0,16 (0-4,5)

<b>Algemeen</b>	
<b>Gebruik mondkapjes</b>	
Gebruik mondkapje tijdens werkzaamheden in stal	16/348 (4,6%)
Gebruik mondkapje tijdens koppelmedicatie	24/348 (7,9%)
<b>Huidaandoeningen/diabetes</b>	
Psoriasis	6/390 (1,5%)
Eczeem	52/389 (13,4%)
Impetigo	14/390 (3,6%)
Ontstoken huid	19/390 (4,9%)
Ontstoken wond	11/390 (2,8%)
Steenpuist	10/390 (2,6%)
Diabetes	7/390 (1,8%)
<b>Luchtwegklachten/allergie</b>	
Problemen met ademhaling	39/389 (11,0%)
Dagelijks hoesten	27/389 (6,9%)
Piepen op de borst	44/389 (11,3%)
Astma/bronchitis	18/389 (5,4%)
Allergie	58/389 (14,9%)
<b>MRSA</b>	
Al eerder een besmetting gehad met MRSA	7/389 (1,8%)
MRSA-dragerschap	62/390 (15,9%)

## Bijlage 8 Prevalenties MRSA-dragerschap humaan

<b>Algemeen</b>	
Mannen	23,5% (50/213)
Vrouwen	6,8% (12/177)
Niet woonachtig op bedrijf	27,9% (19/68)
Roken	
Afgelopen jaar voor minimaal 1 week in buitenland geweest	19,8% (20/101)
<b>Relatie tot kalverhouder</b>	
Kalverhouder (eigenaar)	33,0 % (32/97)
Partner van kalverhouder	10,1% (8/79)
Kind van kalverhouder	4,9% (8/164)
Vader/moeder van kalverhouder	31,3% (5/16)
Werknemer van kalverhouder	29,6% (8/27)
Anders	
<b>Contact met dieren</b>	
Contact met kalveren van bedrijf	19,3% (55/276)
Contact met andere dieren dan kalveren van bedrijf	11,2% (44/390)
Contact met kalveren van andere bedrijven	27,3% (12/44)
Contact met andere dieren dan kalveren van andere bedrijven	16,5% (17/103)
<b>Uren werkzaam per week op bedrijf</b>	
< 20 uur per week	6,8% (17/250)
Tussen 20-40 uur per week	23,2% (13/56)
> 40 uur per week	41,7% (30/72)
<b>Gebruik mondkapjes</b>	
Gebruik mondkapje tijdens werkzaamheden in stal	4,6% (7/16)
Gebruik mondkapje tijdens koppelmedicatie	6,9% (11/24)
<b>Huidaandoeningen/diabetes</b>	
Psoriasis	16,7% (1/6)
Eczeem	7,8% (4/52)
Impetigo	0 % (0/14)
Ontstoken huid	26,3% (5/19)
Ontstoken wond	9,1% (1/11)
Steenpuist	10,0% (1/10)
Diabetes	14,3% (1/7)
<b>Luchtwegklachten/allergie</b>	
Problemen met ademhaling	10,0% (4/39)
Dagelijks hoesten	11,1% (3/27)
Piepen op de borst	11,4% (5/44)
Astma/bronchitis	0 % (0/18)
Allergie	12,1% (7/58)
<b>MRSA</b>	
Al eerder een besmetting gehad met MRSA	57,1% (4/7)
MRSA-dragerschap	15,9% (62/390)

## Bijlage 9 Ruwe (ongecorrigeerde) Odds Ratio's humaan

<b>Algemeen</b>	
Geslacht (♀ referentie)	4,22 (2,2-8,2)*
Leeftijd <sup>®</sup>	1,03 (1-1)*
Niet woonachtig op bedrijf (referentie = mensen woonachtig op bedrijf)	2,52 (1,4-4,7)*
Roken	0,61 (0,2-1,5)
Afgelopen jaar voor minimaal 1 week in buitenland geweest	1,45 (0,8-2,6)
<b>Relatie tot kalverhouder</b>	
Kalverhouder (eigenaar) (referentie)	1
Partner van kalverhouder	0,23 (0,1-0,5)*
Kind van kalverhouder	0,10 (0-0,2)*
Vader/moeder van kalverhouder	0,92 (0,3-2,9)
Werknemer van kalverhouder	0,86 (0,3-2,2)
Anders	0,34 (0-2,9)
<b>Contact met dieren</b>	
Contact met kalveren van bedrijf	3,8 (1,7-8,6)*
Contact met andere dieren dan kalveren van bedrijf	0,68 (0,3-1,4)
Contact met kalveren van andere bedrijven	2,2 (1,1-4,6)*
Contact met andere dieren dan kalveren van andere bedrijven	1,09 (0,6-2)
<b>Werkzaamheden op bedrijf<sup>®</sup></b>	
Gemiddeld aantal uren per week werkzaam in kalverhouderij	1,05 (1,0 -1,1)*
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>voeren</b> van kalveren (leeftijd 1-6 weken)	1,48 (1,3-1,7)*
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>voeren</b> van kalveren (leeftijd 7-20 weken)	1,58 (1,4-1,8)*
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>voeren</b> van kalveren (leeftijd >20 weken)	1,43 (1,2-1,6)*
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>sorteren</b> van kalveren (leeftijd 1-6 weken)	1,79 (1,2-2,6)*
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>sorteren</b> van kalveren (leeftijd 7-20 weken)	2,15 (1,5-3,1)*
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>sorteren</b> van kalveren (leeftijd >20 weken)	1,55 (1-2,4)*
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>dier(geneeskundige) verzorging</b> van kalveren (leeftijd 1-6 weken)	1,92 (1,4-2,6)*
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>dier(geneeskundige) verzorging</b> van kalveren (leeftijd 7-20 weken)	2,15 (1,5-3,1)*
Gemiddeld aantal uren per dag besteed aan <b>dier(geneeskundige) verzorging</b> van kalveren (leeftijd >20 weken)	1,55 (1-2,4)*
<b>Gebruik mondkapjes</b>	
Gebruik mondkapje tijdens werkzaamheden in stal	3,79 (1,4-10)*
Gebruik mondkapje tijdens koppelmedicatie	1,94 (1,2-3,1)*

<b>Algemeen</b>	
<b>Huidaandoeningen/diabetes</b>	
Psoriasis	1,06 (0,1-9,2)
Eczeem	0,40 (0,1-1,2)**
Impetigo	<0,01 (<0,001->999,9)
Ontstoken huid	1,97 (0,7-5,7)
Ontstoken wond	0,52 (0,1-4,1)
Steenpuist	0,58 (0,1-4,7)
Diabetes	0,88 (0,1-7,4)
<b>Luchtwegklachten/allergie</b>	
Problemen met ademhaling	0,8 (0,4-1,7)
Dagelijks hoesten	0,64 (0,2-2,2)
Piepen op de borst	0,65 (0,2-1,7)
Astma/bronchitis	<0,01 (<0,001->999,9)
Allergie	0,69 (0,3-1,6)
<b>MRSA</b>	
Percentage positieve kalveren op bedrijf	1,73 (1,3-2,3)*
Percentage positieve stofdoeken van bedrijf	1,24 (1,0-1,5)*

\* P < 0.05, %Toename per 10 jaar leeftijd, @Toename per uur werken aan desbetreffende taak, §Toename per 20%, #Toename per 28%.

## APPENDIX 8

### Project 9B: Leegstandstudie: spreiding en dynamiek van MRSA-dragerschap bij vleeskalverhouders

#### Projectleider

D.J.J. Heederik, IRAS en Julius Centrum voor Gezondheidswetenschappen en Eerstelijns Geneeskunde, UMC Utrecht.

#### Project team

H. Graveland, IRAS.  
J.A. Wagenaar, Departement Infectieziekten en Immunologie, FD en CVI-WUR.

#### Samenwerking

Overleg Kalversector en Productschappen Vee, Vlees en Eieren

#### Inleiding

##### *Achtergrond en aanleiding onderzoek*

De resultaten van de dwarsdoorsnede-studie naar MRSA in de kalverhouderij (project 9 LNV-programma) suggeren dat NT-MRSA niet goed lijkt te spreiden van dier naar mens en tussen mensen onderling. Alleen agrariërs en familieleden met intensief contact met dieren hebben een verhoogde prevalentie. Onder familieleden met extensief contact komt dragerschap veel minder vaak voor. In de nu beschikbare gegevens van alle bezochte kalverbedrijven is ook een sterke associatie gevonden tussen het aantal uren dat contact met dieren bestaat en de kans op dragerschap. Het sterke verband met het aantal uren dan men contact heeft met dieren doet de vraag rijzen of naast dragerschap ook blootstelling aan MRSA via inhalatie van stof en depositie in de neus, dat met name bij langer verblijf in de stal kan optreden, tot positieve uitslagen heeft geleid. Daarnaast hangt de kans op dragerschap van de kalverhouder sterk samen met de prevalentie onder de dieren op het eigen bedrijf. Het is onwaarschijnlijk dat de prevalentie onder dieren over de tijd een constante is. Het is waarschijnlijker dat de prevalentie varieert over de tijd en per mestcyclus. De correlatie tussen dragerschap bij de kalverhouder en de dieren zou dan ook op sterke wisselingen in dragerschap bij de kalverhouder kunnen wijzen.

Een andere aanwijzing voor de beperkte overdracht van NT-MRSA van dier naar mens is de observatie dat veldwerkers die ten tijde van het onderzoek de neusswabs van de kalveren namen, nooit langer dan een tot hoogstens enkele dagen positief op MRSA testten nadat ze een MRSA-positief bedrijf hadden bezocht.

Omdat directe observaties over de dynamiek van spreiding en overdracht ontbreken is een vervolgonderzoek

uitgevoerd. Om eventuele variatie in dragerschapstatus vast te stellen, bijvoorbeeld op momenten dat weinig/ geen contact bestaat met kalveren en op momenten met intensief diercontact, zijn herhaalde metingen uitgevoerd. Vakantieperioden of perioden waarin er geen kalveren op het bedrijf aanwezig waren (leegstandperiode) zijn in de studie betrokken. Omdat dit onderzoek niet is gefinancierd uit het LNV-programma maakt het hier formeel geen deel van uit. Omdat de typering van de isolaten wel deel uitmaakte van het LNV-programma en de resultaten belangrijke gegevens bevatten, is deze zogenaamde leegstandstudie opgenomen als Project 9B.

##### *Doelstellingen*

De doelstelling van dit onderzoek is om inzicht te krijgen in de variatie van dragerschap bij vleeskalverhouders en hun gezinsleden en medewerkers. Tevens wordt onderzocht welke determinanten een rol spelen bij MRSA-dragerschap.

##### *Materiaal en methoden*

De studiepopulatie bestond uit 155 kalverhouders en gezinsleden, wonend en/of werkend op een vleeskalverhouderij (n=51) in Nederland. Deelnemers met beroepsmatig contact met andere dieren dan kalveren waren uitgesloten van deelname. Gedurende een periode van circa 2 maanden zijn tussen juni en december 2008 herhaaldelijk neus- en keelwabs afgenomen. Perioden met (hoogblootgesteld) en zonder (laagblootgesteld) diercontact zijn in deze periode betrokken. In hoogblootgestelde perioden waren er kalveren op het desbetreffende bedrijf aanwezig. Bij laagblootgestelde perioden was de deelnemer of op vakantie of waren er geen vleeskalveren op het bedrijf aanwezig: een leegstandperiode.

Zowel 's ochtends, voordat er diercontact had plaatsgevonden, als 's avonds, na diercontact/ werkzaamheden op het bedrijf, zijn de neus- en een keelwabs afgenomen. Dit werd wekelijks gedaan in hoogblootgestelde perioden en twee wekelijks in laagblootgestelde perioden. Gemiddeld werd er op tien dagen gemeten waarbij telkens vier swabs afgenomen werden. De swabs werden per post naar het laboratorium gestuurd, waar ze onderzocht werden op de aanwezigheid van MRSA. Op drie momenten werden de swabs ook onderzocht op de aanwezigheid van MSSA. Risicofactoren en inzicht in de duur van blootstelling gedurende de studieperiode werden onderzocht door middel van vragenlijsten. Hierin werden onder



andere vragen gesteld over de duur van specifieke werkzaamheden op het bedrijf, hygiëne en mogelijke eerdere MRSA-besmettingen. Tevens werden algemene vragen gesteld over onder andere leeftijd, geslacht en rookgewoonten.

Van een selectie van de MRSA-positieve swabs (n=481) en van de MSSA- positieve swabs (n=105) werd het spa-type bepaald.

### **Resultaten en conclusie**

De prevalentie van MRSA-dragerschap blijkt sterk te variëren over de tijd. Vergeleken met de perioden van hoge blootstelling, daalt de prevalentie in de perioden van lage blootstelling bij vleeskalverhouders met 16% en bij gezinsleden met 32%. Dit effect is sterker bij mensen die een vakantie genoten (afwezigheid van het bedrijf) dan bij de mensen die tijdens de leegstandperiode op het bedrijf aanwezig bleven. De afname in MRSA-prevalentie lijkt voornamelijk verklaard te worden door de afname in blootstelling; de afname van intensiteit van het diercontact in de laagblootgestelde periode.

Ook de variatie in spa-typen was groot. Er werden 26 verschillende spa-typen geïdentificeerd.

De resultaten van dit onderzoek bieden aanknopingspunten voor wijziging van de huidige protocollen van het 'search and destroy'-beleid.

## APPENDIX 9

### Project 10: pilot - meest sensitieve lichaamslocatie voor MRSA-detectie bij melkvee

#### Projectleider

R.G.M. Olde Riekerink, GD.

#### Projectteam

A. Rothkamp, O. Sampimon, W. Swart en T.J.G.M. Lam: GD.

#### Samenwerking

Er is samengewerkt met 24 melkveehouders.

#### Samenvatting

**Doel:** Vaststellen welke monstermethode het meest oplevert en derhalve de meest sensitieve matrix is voor de detectie van MRSA bij rundvee (uitgevoerd op MRSA-positieve bedrijven).

**Materiaal en methode:** In totaal werden 24 koeien met een MRSA-historie in de melk en 24 koeien zonder een MRSA-historie in dezelfde bedrijven onderzocht. De onderzochte lichaamslocaties in iedere koe waren: melk, feces, neusswab en huidoppervlakte. Alle op basis van fenotypische eigenschappen als *Staphylococcus aureus* geïdentificeerde isolaten werden met behulp van de duplex PCR op het voorkomen van het mecA-gen (meticillineresistentie) en het Sa442 DNA-fragment (*S. aureus*-identificatie) getest. Een Bayesiaanse analyse werd gebruikt voor de statistische analyse.

**Resultaten:** In totaal werd uit de 48 geteste koeien (24 koeien mét en 24 koeien zonder MRSA-historie) 34 keer MRSA geïsoleerd, waarvan 10 keer (29%) van koeien zonder MRSA-historie. Met behulp van Bayesiaanse analyse leek bij enkelvoudige monstername de huid de meest sensitieve monsterlocatie om MRSA aan te tonen, gevolgd door melk. Met behulp van mest werd MRSA het minst aangetoond.

**Conclusies:** De meeste MRSA-positieve koeien worden opgespoord door middel van een huidveegmonster, genomen met behulp van een steriel vochtig doekje tussen uier en schenkel. Huidveegmonsters lijken daarmee de meest geschikte matrix te vormen voor prevalentieonderzoek van MRSA bij rundvee. Gebruik van melkmonsters is een alternatieve methode en geeft in combinatie met celgetalgegevens (subklinische mastitis, veroorzaakt door MRSA, aan. Uierinfecties lijken onafhankelijk te zijn van infecties in andere orgaan-systemen. Het tegelijkertijd monstere van huid en melk leverde een hogere Se op dan enkelvoudige monsters.

**Nota bene:** Opgemerkt dient te worden dat dit een pilotonderzoek betreft en dat de resultaten, vanwege het

kleine aantal koeien en het lage percentage positieve monsters niet significant van elkaar verschillen en nadere bevestiging behoeven.

#### Summary

**Aim:** Determine which sampling method brings most positive results, and thus is the most sensitive matrix for detection of MRSA in cattle.

**Materials and methods:** A total of 24 cows of which in the past MRSA was cultured from milk and 24 cows from the same herds without that background, were studied. Matrices studied were: milk, faeces, nasal swab and skin surface. All isolates that were identified as *Staphylococcus aureus* based on their phenotypical characteristics, were tested on the presence of the mecA gene (methicillin resistance) and the Sa442 DNA fragment (*S. aureus*-identification) with a duplex PCR. A Bayesian analysis was used for statistical analysis.

**Results:** MRSA was cultured 34 times from 48 tested cows (24 with and 24 without previous positive MRSA samples). Ten (29%) of those came from cows without previously positive MRSA milk samples. Based on the Bayesian analysis, sweeping samples from the skin seemed to be the most sensitive method to find MRSA based on single samples, followed by milk. The lowest number of positive samples was found in faeces.

**Conclusions:** Most MRSA positive cows were found with 'skin sweeping samples', collected using a sterile wet cloth between the udder and the leg. Skin sweeping samples seem to be the most appropriate matrix for studying prevalence of MRSA in cattle. Using milksamples is an alternative approach and gives, when combined with somatic cell count data, information on (sub)clinical mastitis caused by MRSA. Intramammary infections seem to be independent from infections in other organ systems. Sampling skin and milk at the same time increases sensitivity, when compared to single samples.

**Note:** It has to be realized that this is a pilot study and that, due to the small number of cows and the small number of MRSA positive samples, results were not significantly different and need to be confirmed in further studies.

#### Inleiding

Infecties met meticillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) in uiers van melkkoeien worden al een groot aantal jaren vastgesteld. Zo werden in 1975 in België 68 isolaten uit mastitismelk afkomstig van 20 melkveebedrijven beschreven (Devriese en Hommez, 1975). Daarnaast is MRSA-dragerschap beschreven bij

paarden, varkens, pluimvee, honden en katten (Tomlin et al., 1999; Van Duijkeren et al., 2004). Wereldwijd wordt de zorg geuit dat huisdieren een belangrijke bron van MRSA-besmettingen voor mensen kunnen vormen (Wulf en Voss, 2008).

Op een melkveebedrijf in Hongarije zijn zowel bij de medewerkers als bij de koeien dezelfde MRSA genotypes gevonden wat duidt op mogelijke transmissie tussen koeien en mensen (Juhász-Kaszanyitzky et al., 2007). Transmissie van MRSA tussen dieren en mensen is voor andere diersoorten ook enkele malen beschreven (Van Loo et al., 2007).

In deel 10 van het projectplan MRSA van het MRSA-consortium is een prevalentieonderzoek naar MRSA bij rundvee voorgesteld, dat uitgevoerd zou worden bij dieren aangeboden voor de slacht. Onduidelijk is echter welk monstermateriaal daarvoor verzameld moet worden. Tot nu toe zijn bij de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD) bij melkvee voornamelijk melkmonsters onderzocht om na te gaan of MRSA in melk voorkomt en in welke mate. Langs deze weg is de prevalentie van MRSA in melk vastgesteld, maar is geen uitspraak te doen over de prevalentie van MRSA bij melkvee in algemene zin. Om na te gaan wat de prevalentie van MRSA bij melkvee is, dient nagegaan te worden welke monsters (locaties in/op de koe) het best gebruikt kunnen worden voor het aantonen van MRSA. Het doel van deze studie is het vaststellen welke monstermethode de meeste positieve monsters oplevert en derhalve de meest sensitieve lichaamslocatie is voor de detectie van MRSA bij melkvee.

## Materiaal en methoden

### Bedrijfs- en koeselectie

In totaal werden 11 bedrijven geselecteerd waar 1 tot 5 koeien liepen waar in voorgaande maanden MRSA uit melkmonsters was geïsoleerd (koeien met MRSA-historie). Naast iedere MRSA-positieve koe werd een willekeurige koe gekozen ('de volgende aan het voerhek') zonder MRSA-historie. In totaal werden 24 koeien met een MRSA-historie in de melk en 24 koeien zonder een MRSA-historie onderzocht. De onderzochte lichaamslocaties in iedere koe:

- **melk**
  - Vier kwartieren op aseptische wijze bemonsterd en volgens routine bacteriologisch onderzocht (GD BO celgetal): van kwartieren met een celgetal >200.000 cellen/mL werd bacteriologisch onderzoek ingezet.
  - Van vijf koeien met een MRSA-historie werd geen melkmonster genomen omdat de betreffende koe droogstond op het moment van monsternamen (Appendix 2).
- **feces**
  - Rectaal genomen, waarbij voor elk dier een schone rectale handschoen werd gebruikt.
- **neuswab** linker- en rechterneusgat
  - Van het linker- en het rechterneusgat werd

een monster genomen met ruim met neusslijm bevochtigde steriele wattenstaafjes die vervolgens per koe gepoold werden.

### - **huidmonster**

- Voor het huidmonster werd per dier één vochtig stofdoekje minimaal vijf keer stevig over de huid tussen de uier en de binnenkant van de achterbenen gewreven, zowel links als rechts. Hierbij werd per dier een paar nieuwe schone handschoenen gedragen.

### Laboratorium diagnostiek

#### Melkmonsters

De melkmonsters werden na aankomst in het laboratorium bevroren bij -20°C gedurende minstens 12 uur om later verwerkt te worden. De ingevroren monsters werden in het laboratorium bij kamertemperatuur ontdooid. Van ieder kwartiermonster werd het celgetal bepaald door middel van een Fossomatic 6000M (Foss Electric, Hillerød, Denemarken). Conform internationale standaards (Schukken et al., 2003) werden kwartiermonsters met een celgetal van 200.000 cellen/mL of meer geselecteerd als verdacht van subklinische mastitis. Deze monsters werden ingezet en de geïsoleerde bacteriën werden geïdentificeerd volgens de NMC-richtlijnen (Hogan et al., 1999). Tien  $\mu$ l werd op 1/8 bloed agar (6% schapenbloed) en 1/8 Edwardsplaat (beide BioTrading) geënt en gedurende  $2 \times 21 \pm 3$  uur bij 37°C geïncubeerd. *Staphylococcus aureus* werd geïdentificeerd aan hand van de hemolyse en de vrije coagulase-reactie bij niet-typische hemolyse.

#### Detectie van MRSA in de neuswabs, huidmonsters en fecesmonsters

De monsters (neuswabs, huidmonster en feces) zijn op de volgende manier ingezet in Mueller Hinton Bouillon met 6,5% NaCl (MHB<sup>+</sup>): iedere gepoolde neuswab in 5 mL MHB<sup>+</sup>, de stofdoekjes (huidmonster) in 100 mL MHB<sup>+</sup> en 25 g feces in 225 mL MHB<sup>+</sup>. Na een incubatietijd van  $18 \pm 2$  uur bij 37 °C werd 1 mL van de gehomogeniseerde suspensie overgebracht in 9mL PRMB (Phenol Red Mannitol Broth met 5mg/L ceftizoxime en 75 mg/L azetreonam, bioMerieux). Vervolgens werd 10  $\mu$ L van de PRMB-suspensie uitgestreken op een Brilliance™ MRSA-agarplaat (Oxoid) en bij 37 °C  $18 \pm 2$  uur geïncubeerd. MRSA-verdachte kolonies werden overgeënt op een schapenbloedagarplaat en door middel van PCR als MRSA bevestigd.

#### MecA-gen detectie

Alle *S. aureus*-isolaten werden met behulp van de duplex PCR op het voorkomen van het mecA-gen (meticillineresistentie) en het Sa442 DNA-fragment (*S. aureus*-identificatie) getest (Martineau et al., 1998, De Neeling et al., 1998).

#### Statistische analyse

Een Bayesiaanse analyse werd gebruikt voor de resultaten

van deze pilotstudie omdat gewerkt werd met twee populaties dieren (met en zonder MRSA-historie), onbekende sensitiviteit (Se) en specificiteit (Sp) van testen en vanwege de lage aantallen positieve uitslagen. De Se en Sp van de MRSA-kweek van verschillende soorten monsters werd bepaald uitgaande van de volgende priors: Se: bèta(7,7) 95% BI 25-75%; Sp: bèta(112,2) 95% BI 77-99%; prevalentie [populatie zonder MRSA-historie]: bèta(2,7) 95% BI 3-53%; prevalentie [populatie met MRSA-historie]: bèta(21,2) 95% BI 95-100%. Priors in Bayesiaanse statistiek zijn de van tevoren verwachte distributies waartegen de gegevens uit de proef worden getoetst. De geschatte Se van de testen ligt tussen 25 en 75%, de geschatte Sp is voor alle testen hoog (Bijlage 1). Alle monsterplaatsen kregen dezelfde prior voor Se en Sp. De testeigenschappen van de MRSA-kweek van elk van de verschillende soorten monsters zijn in alle zes combinaties van testen bepaald, te weten: melk-huid, melk-neus, melk-feces, huid-neus, huid-feces en neus-feces. Iedere combinatie is doorgerekend met het model van Branscum et al. (2005) waarbij testen gecorreleerd mogen zijn. Vervolgens is een combinatie doorgerekend waarbij de gegevens van huid- en melkmonsters samengevoegd zijn. De uitkomsten voor elk van de monsterplaatsen zijn ten slotte gemiddeld, leidend tot een gemiddelde Se voor elk van de verschillende monsters.

## Resultaten

In totaal werd uit de 48 geteste koeien (24 koeien met en 24 koeien zonder MRSA-historie) 34 keer MRSA geïsoleerd, waarvan 10 keer van koeien zonder MRSA-historie (Bijlage 2). Uit de melk werd 10 maal MRSA geïsoleerd uit kwartiermonsters van 9 koeien, alle met een MRSA-historie (Tabel A9.1). Er werden geen grote verschillen aangetoond in het percentage neus-, huid- en

fecesmonsters tussen de dieren met en zonder MRSA-historie.

Hoewel de verschillen niet significant waren, lijkt op basis van de Bayesiaanse analyse de huid de meest sensitieve monsterlocatie om MRSA aan te tonen, gevolgd door melk. Met behulp van mest werden de minste koeien met MRSA geïdentificeerd (Tabel A9.2). Specificiteit was voor alle monsterlocaties gelijk en hoog, gemiddeld 98,1% (96,0%-99,8%). De combinatie huid en melk leverde een grotere sensitiviteit op dan enkelvoudige monsters, namelijk 69%. Deze combinatie is significant verschillend van neus- en mestmonsters.

## Discussie

Het blijkt dat in de onderzochte monsters de meeste MRSA op de huid gevonden worden (Tabel A9.1). Om zo veel mogelijk MRSA op te sporen bij rundvee lijkt de huid dus de meest geschikte monsterlocatie. Om de testeigenschappen per monsterlocatie te kunnen evalueren is gekozen voor een Bayesiaanse analyse. Deze methode is het meest geschikt voor statistische analyse van datasets voor testeigenschappen waarbij geen gouden standaard aanwezig is. De gevonden gemiddelden liggen relatief dicht bij elkaar en hebben ruime credibility-intervallen. Het is in dit soort modellen weinig zinvol om extra gegevens zoals bijvoorbeeld bedrijfseffecten toe te voegen, omdat de statistische vrijheidsgraden te beperkt zijn.

De Bayesiaanse analyse bevestigt de indruk uit de ruwe data dat de huid de meest sensitieve lichaamslocatie voor de isolatie van MRSA bij rundvee lijkt, gevolgd door melkmonsters. Isolatie van MRSA uit feces lijkt het minst sensitief. Specificiteit was voor alle locaties gelijk. Huidveegmonsters lijken daarmee de meest geschikte methode om MRSA-positieve (melk)koeien op te sporen.

Tabel A9.1 Overzicht van proportie koeien waarvan op een van de vier locaties MRSA geïsoleerd werd (n=48).

Locatie	MRSA historie (n = 24)	Geen MRSA historie (n = 24)	Totaal (n = 48)
Melk	9 (47%) <sup>1</sup>	0 (0%)	9 (21%)
Neus	4 (17%)	2 (8%)	6 (13%)
Huid	8 (33%)	7 (29%)	15 (31%)
Feces	1 (4%)	2 (8%)	3 (6%)

<sup>1</sup>5 koeien stonden droog op moment van monstername.

Tabel A9.2 Gemiddelde sensitiviteit en specificiteit van verschillende monsters om MRSA aan te tonen op basis van Bayesiaanse analyse.

Monster	Gemiddelde Se [95% CI] <sup>1</sup>	Gemiddelde Sp [95% CI]
Huid	49,9% [33,2%; 67,7%]	97,7% [93,5%; 99,7%]
Melk	45,0% [26,7%; 65,1%]	98,7% [96,1%; 99,8%]
Neus	31,8% [17,0%; 49,4%]	98,0% [94,8%; 99,7%]
Mest	23,6% [10,9%; 39,9%]	98,2% [95,1%; 99,8%]
Huid+melk	68,9% [50,7%; 87,9%]	96,1% [90,8%; 99,1%]

<sup>1</sup>CI = Bayesiaans credibility-interval

Een bijkomend praktisch voordeel van het nemen van huidveegmonsters is dat deze methode relatief eenvoudig uitvoerbaar is. De koeien tolereren het nemen van het monster tussen de uier en schenkel veel beter dan andere methodes en de monsterverzameling hoeft bovendien niet tijdens het melken uitgevoerd te worden. Daarnaast is ook het monsteren bij droogstaande en nog niet lacterende koeien met deze methode mogelijk.

Melk heeft na huid de hoogste Se om MRSA aan te tonen bij melkvee. Hierbij dienen we ons echter te realiseren dat de dieren die positief waren in de melk, allemaal een MRSA-historie in melk hadden waardoor een bias ontstaat: de dieren met een positieve MRSA-historie waren gevonden door ofwel een klinische mastitis ofwel een verhoogd celgetal. Klinische mastitis of een verhoogd celgetal is een goede indicator voor de aanwezigheid van een infectie in het kwartier (Schukken et al., 2003). Vergelijking van dieren met en zonder MRSA in melk laat zien dat in beide groepen evenveel positieve neus-, mest- of huidmonsters voorkomen. Op basis van dit onderzoek lijkt dus dat het voorkomen van MRSA in de uier niet gerelateerd is aan het voorkomen van MRSA in andere orgaansystemen.

Uit monsters uit neus en feces kan blijken dit onderzoek ook MRSA geïsoleerd worden. Ondanks de lage aantallen monsters, blijkt de gevonden Se echter vrij goed. De testkarakteristieken lijken bij het gebruik van huidveegmonsters echter het beste. Het aantonen van MRSA op de huid van koeien levert direct de vraag op of het dier dan daadwerkelijk geïnfecteerd is, een drager is of dat de huid gecontamineerd is met MRSA-bevattend stof. *Dragerschap*, gedefiniëerd volgens [www.mrsa-net.eu](http://www.mrsa-net.eu), betekent dat de huid gekoloniseerd is, hetgeen in ons onderzoek noch uit te sluiten, noch te bevestigen is. Bij huidcontaminatie door MRSA-bevattend stof is sprake van een bedrijfsgebonden effect en is de bevinding wellicht vergelijkbaar met die welke gedaan zou worden als stofmonsters uit de omgeving genomen worden. Het is niet uit te sluiten dat op bedrijven zonder een MRSA-historie in de melk, ook minder MRSA-positieve huidmonsters gevonden zouden zijn. Om dat vast te stellen is nader onderzoek nodig.

Op basis van deze pilotstudie lijkt de gemeten prevalentie van MRSA op melkveebedrijven afhankelijk te zijn van de gekozen lichaamslocatie voor monsternamen. Het is dan ook eigenlijk niet mogelijk om van 'de' prevalentie van MRSA bij melkvee te spreken. Uierinfecties dienen - uiteraard - in de melk vastgesteld te worden, en lijken los te staan van andere orgaansystemen. Omdat de huid in gelijke mate positief was bij koeien met en koeien zonder MRSA-historie in de melk, lijken MRSA-uierinfecties een andere epidemiologie binnen bedrijven te hebben dan in andere organen. Op basis van deze pilot lijken huidveegmonsters de meest sensitieve lichaamslocatie voor MRSA-detectie bij melkvee. Bovendien worden door het nemen van meerdere monsters tegelijk, zoals huid en melk, logischerwijs meer MRSA-positieve dieren gevonden.

## Conclusies

De meeste MRSA-positieve melkkoeien werden opgespoord door middel van een huidveegmonster, genomen door met behulp van een steriel vochtig doekje beiderzijds tussen uier en schenkel minstens vijf maal op en neer te wrijven. Mest lijkt de minst sensitieve methode te zijn. Huidmonsters lijken de meest geschikte enkelvoudige matrix te vormen voor prevalentieonderzoek van MRSA bij melkvee.

Gebruik van melkmonsters is een alternatieve methode en geeft informatie over uierinfecties met MRSA weer. Uierinfecties lijken onafhankelijk te zijn van het voorkomen van MRSA in andere orgaansystemen. Het tegelijkertijd monsteren van huid en melk leverde de hoogste Se op.

### *Nota bene*

Opgemerkt dient te worden dat dit een pilotonderzoek betreft en dat de resultaten, vanwege het kleine aantal koeien en lage percentage MRSA-positieve monsters niet significant van elkaar verschillen en nadere bevestiging behoeven.

## Aanbevelingen

- Voor prevalentiebepaling van MRSA bij rundvee middels enkelvoudige monsternamen kan vooralsnog het beste uitgegaan worden van huidveegmonsters.
- Om het voorkomen van MRSA in het melk vast te stellen, moet onderzoek in melk zelf uitgevoerd worden. Gegevens afkomstig uit andere matrices lijken geen informatie te geven over het voorkomen van MRSA in melk.
- Om een totaal van MRSA bij rundvee in beeld te brengen kunnen verschillende matrices gecombineerd worden.
- Ter bevestiging van de hypothese dat MRSA in de uier van de koe een ander epidemiologisch verspreidingspatroon vertoont dan MRSA in andere organen van de koe, kan stamtypering van toegevoegde waarde zijn.
- Bovengenoemde conclusies en aanbevelingen dienen in grotere aantallen dieren bevestigd te worden om deze uitspraken voldoende robuust te laten zijn.

## Gerelateerde projecten

Dit project maakt deel uit van project 10 van het LNV-programma MRSA.

## Output

Er zijn nog geen wetenschappelijke publicaties, vakpublicaties, abstracts of lezingen over de bevindingen uit dit project naar buiten gebracht. De intentie bestaat om op korte termijn een abstract in te sturen naar het vijfde I.D.F. mastitiscongres in maart 2010 voor een posterpresentatie en aansluitend een 'short communication' te schrijven voor een nader te bepalen wetenschappelijk tijdschrift.

## Literatuur

Branscum, A. J., I. A. Gardner, en W. O. Johnson. 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Prev. Vet. Med.* 68:145-163.

De Neeling, A. J., W. J. van Leeuwen, L. M. Schouls, C. S. Schot, A. van Veen-Rutgers, A. J. Beunders, A. G. Buiting, C. Hol, E. E. Ligtvoet, P. L. Petit, L. J. Sabbe, A. J. van Griethuysen, en J. D. van Embden. 1998. Resistance of staphylococci in The Netherlands: surveillance by an electronic network during 1989-1995. *J. Antimicrob. Chemother.* 41:93-101

Devriese, L. A., en J. Hommez. 1975. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Res. Vet. Sci.* 19:23-27.

Hogan, J. S., R. N. González, R. J. Harmon, S. C. Nickerson, S. P. Oliver, J. W. Pankey, en K. L. Smith. 1999. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*.

Juhász-Kaszanyitzky, E., S. Jánosi, P. Somogyi, A. Dán, L. Van der Graaf-van Bloois, E. Van Duijkeren, en J. A. Wagenaar. 2007. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13:630-632.

Martineau, F., F. J. Picard, P. H. Roy, M. Ouellette, en M. G. Bergeron. 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 36:618-623.

Schukken, Y. H., D. J. Wilson, F. Welcome, L. Garrison-Tikofsky, en R. N. González. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.* 34:579-596.

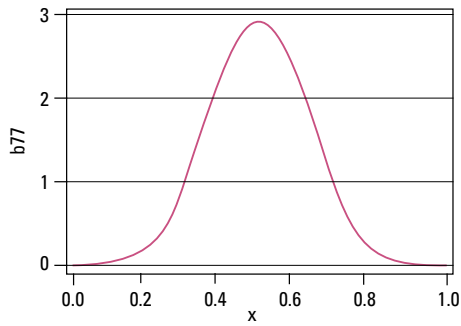
Tomlin, J., M. J. Peard, D. H. Lloyd, S. Howell, F. Hartmann, H. A. Jackson, en P. Muir. 1999. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in 11 dogs. *Vet. Rec.* 144:60-64.

Van Duijkeren, E., A. T. Box, M. E. Heck, W. J. Wannet, en A. C. Fluit. 2004. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Vet. Microbiol.* 103:91-97.

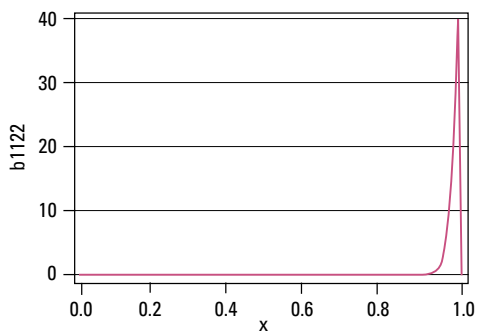
Van Loo, I., X. Huijsdens, E. Tiemersma, A. de Neeling, N. Sande-Bruinsma, D. Beaujean, A. Voss, en J. Kluytmans. 2007. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13:1834-1839.

Wulf, M., en A. Voss. 2008. MRSA in livestock animals-an epidemic waiting to happen? *Clin. Microbiol. Infect.* 14:519-521.

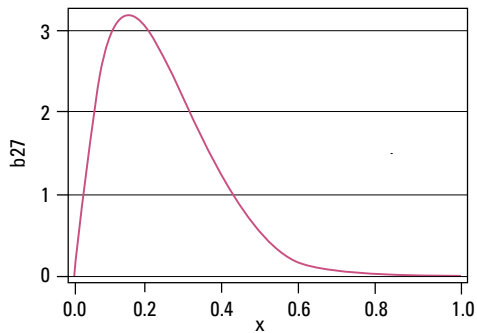
**Bijlage 1 Bèta distributions**



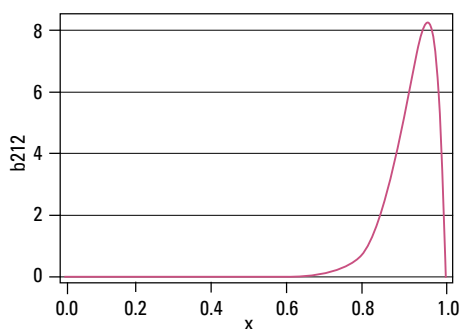
Bèta(7,7); prior voor alle Se



Bèta(112,2); prior voor alle Sp



Bèta(2,7); prior voor prevalentie in populatie zonder MRSA-historie



Bèta(21,2); prior voor prevalentie in populatie met MRSA-historie

**Bijlage 2 Overzicht van alle resultaten**

Koe nr.	MRSA-Historie	Bedrijf	Datum monster	Kwartiercelgetal				Melk	Neus	Mest	Huid
				RV	LV	RA	LA				
1	+	1	24-4-2009					Droog	-	-	-
2	-	1	24-4-2009	329	263	345	466	-	-	-	-
3	+	2	16-4-2009	x <sup>1</sup>	41	x	683	-	-	-	-
4	+	2	16-4-2009	2038	497	246	432	-	-	-	-
5	+	2	16-4-2009	35	1246	37	32	-	-	-	-
6	-	2	16-4-2009	55	76	43	65	-	-	-	-
7	-	2	16-4-2009	57	28	467	289	-	-	-	-
8	-	2	16-4-2009	41	66	52	52	-	-	-	-
9	+	3	23-4-2009	59	49	25	174	-	-	-	-
10	-	3	23-4-2009	16	42	19	19	-	-	-	-
11	+	4	23-4-2009	35	614	169	1557	-	-	-	-
12	-	4	23-4-2009	49	30	41	33	-	-	-	-
13	+	5	14-4-2009	305	23	1569 <sup>2</sup>	1370	+	-	-	-
14	+	5	14-4-2009	19	19	68	<b>1017</b>	+	-	-	+
15	+	5	14-4-2009	167	154	888	133	-	-	+	+
16	+	5	14-4-2009					Droog	-	-	-
17	-	5	14-4-2009	60	103	93	29		-	-	+
18	-	5	14-4-2009	14	16	12	22		-	-	+
19	-	5	14-4-2009	15	19	9	42		-	-	-
20	-	5	14-4-2009	16	31	8	9		-	+	-
21	+	6	16-4-2009					Droog	-	-	-
22	-	6	16-4-2009	26	106	60	54	-	-	-	-
23	+	7	15-4-2009	<b>6777</b>	246	148	200	+	-	-	+
24	-	7	15-4-2009	291	1106	3317	1861	-	-	-	+
25	+	8	15-4-2009	183	296	4421	198	-	-	-	-
26	-	8	15-4-2009	9	14	11	16	-	-	-	-
27	+	9	23-4-2009	1290	1834	<b>6337</b>	4177	+	-	-	-
28	+	9	23-4-2009					Droog	-	-	+
29	+	9	23-4-2009	1396	<b>4462</b>	<b>4888</b>	x	+	+	-	+
30	-	9	23-4-2009	317	567	1443	103	-	+	-	+
31	-	9	23-4-2009	96	117	89	19	-	-	-	+
32	-	9	23-4-2009	23	633	38	220	-	-	-	+
33	+	10	27-4-2009	24	10	<b>1897</b>	40	+	+	-	-
34	+	10	27-4-2009	158	<b>887</b>	171	301	+	-	-	+
35	+	10	27-4-2009	38	37	<b>3828</b>	33	+	+	-	+
36	+	10	27-4-2009					Droog	+	-	+
37	+	10	27-4-2009	272	533	3900	980	-	-	-	-
38	-	10	27-4-2009	1680	225	76	179	-	-	-	-
39	-	10	27-4-2009	9	351	16	10	-	-	-	-
40	-	10	27-4-2009	403	2	6	2	-	-	-	-
41	-	10	27-4-2009	15	18	20	16	-	+	-	-
42	-	10	27-4-2009	3	7	5	3	-	-	-	+
43	+	11	15-4-2009	73	439	1925	130	-	-	-	-
44	+	11	15-4-2009	90	111	<b>273</b>	<b>332</b>	+	-	-	-
45	+	11	15-4-2009	71	428	169	334	-	-	-	-
46	-	11	15-4-2009	21	15	21	22	-	-	+	-
47	-	11	15-4-2009	47	70	77	58	-	-	-	-
48	-	11	15-4-2009	959	34	1317	66	-	-	-	-

<sup>1</sup>x: Celgetal niet te beoordelen

<sup>2</sup>Vetgedrukt: MRSA gekweekt



## APPENDIX 10

### Project 11: onderzoek naar MRSA bij pluimvee en transmissie naar de mens op pluimveeslachterijen

#### Projectleider

A.W. van de Giessen, Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie, CIB-RIVM.

#### Projectteam

A.W. van de Giessen, M.N. Mulders, A.P.J. Haenen, P.L. Geenen, T. Bosch, X.W. Huijsdens, P.D. Hengeveld en W.D.C. Dam-Deisz: CIB-RIVM.  
E.S. Poldervaart, VWA, Regio Oost, Zutphen.  
A. Voss, UMC Sint Radboud en CWZ, Nijmegen.  
D.J. Mevius, CVI-WUR.

#### Samenwerking

Dit onderzoek werd uitgevoerd in nauwe samenwerking met de Vereniging van de Nederlandse Pluimveeverwerkende Industrie (NEPLUVI).

#### Samenvatting

In de periode van november 2008 tot en met juli 2009 werd onderzoek uitgevoerd op een zestal grote pluimveeslachterijen in Nederland naar het vóórkomen van MRSA bij slachthuismedewerkers, bij Nederlandse (koppels) vleeskuikens en in de verschillende slachthuiscompartimenten. De overall prevalentie van MRSA bij slachthuismedewerkers was 5,6% (26 van de 466 bemonsterde personen MRSA-positief), hetgeen duidt op een verhoogd risico van MRSA-dragerschap voor medewerkers van een vleeskuikenslachterij. Dit risico is significant hoger voor medewerkers die contact hebben met levend pluimvee dan voor medewerkers die uitsluitend contact hebben met dood pluimvee of die andere werkzaamheden uitvoeren (MRSA-prevalenties respectievelijk 13,6% en 1,9%). Met name het hangen van de vleeskuikens aan de slachtlijn is geassocieerd met een verhoogd risico van MRSA-dragerschap. Daarnaast hebben medewerkers van een slachterij met conventionele elektrische verdoving een significant hoger risico van MRSA-dragerschap dan medewerkers van een slachterij met CO<sub>2</sub>-verdoving. Koppels vleeskuikens werden onderzocht door het nemen van veegmonsters van de aanvoercontainers en keelwabmonsters van kuikens aan de slachtlijn. In totaal werden 35% van de 40 onderzochte koppels MRSA-positief bevonden op basis van ten minste één MRSA-positieve aanvoercontainer of één MRSA-positief vleeskuiken. Van de onderzochte vleeskuikens bleek 6,9% MRSA te dragen in de keel. Verder werden per slachterij 40 veegmonsters genomen in de verschillende compartimenten van de slachterij (aanvoer, vuile slachterij, panklaar, koeling, uitsnijderij),

waarvan 20 vóór het begin van de werkzaamheden en 20 aan het einde van de werkdag. Er werd een toename geconstateerd in het percentage MRSA-positieve omgevingsmonsters gedurende de werkdag. In totaal werden er zeven verschillende *spa*-typen gevonden, waarvan er vijf gerelateerd zijn aan het 'veegerelateerde' MLST-klonaal complex 398 (CC398). Opmerkelijk is de frequente isolatie van *spa*-type t1430 aangezien dit *spa*-type gerelateerd is aan MLST-type ST9. Het merendeel van de MRSA-isolaten van de slachthuismedewerkers betrof een MRSA-*spa*-type dat ook bij het pluimvee en/of in de slachthuisomgeving werd aangetroffen. Ook de resistentiepatronen van de MRSA-isolaten van medewerkers, pluimvee en slachthuiscompartimenten kwamen in grote lijnen met elkaar overeen.

#### Summary

In the period November 2008 till July 2009, a study was conducted in six large poultry slaughterhouses in the Netherlands to estimate the risk of MRSA carriage among personnel, the prevalence of MRSA in Dutch flocks of broilers and the degree of contamination in the different compartments of the slaughterhouse. The overall prevalence of MRSA among slaughterhouse personnel was 5.6% (26 persons positive out of 466 persons sampled), indicating an increased risk of MRSA carriage for personnel working on a broiler slaughterhouse. This risk is significantly higher for personnel having contact with live animals than for personnel having contact with carcasses only or personnel performing other duties (MRSA prevalence 13.6% and 1.9%, respectively). Especially, hanging broilers on the slaughterline was associated with an increased risk of MRSA carriage. Furthermore, personnel of a slaughterhouse using conventional electric stunning have a significantly higher risk of MRSA carriage than personnel of a slaughterhouse using CO<sub>2</sub>-stunning. Broiler flocks were examined by taking swab samples from the transport containers as well as pharyngeal swabs from the broilers at the slaughterline. In total, 35% of the 40 flocks examined were found MRSA positive based on at least one MRSA positive container or one MRSA positive animal. Of the broilers examined, 6.9% carried MRSA in their throat. Furthermore, per slaughterhouse 40 environmental samples were taken from the different slaughterhouse compartments (delivery area, dirty area, processing area, cooling area, cutting area), 20 at the beginning and 20 at the end of the working day. An increase in the percentage of MRSA positive environmental samples

during the working day was observed. In total, seven different *spa* types were found, five of them concerning the livestock-associated MLST clonal complex 398 (CC398). Remarkable is the frequent isolation of *spa*-type t1430 since this *spa*-type is related to MLST type ST9. The majority of the MRSA isolates from slaughterhouse personnel concerned MRSA *spa* types that were also found in the broiler flocks or in the slaughterhouse environment. Also, resistance patterns of the MRSA isolates from humans, poultry and the environment corresponded fairly well.

## Inleiding

Meticilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) is wereldwijd een belangrijke oorzaak van ziekenhuisinfecties. In 2003 is een nieuw MRSA-type (ST398) opgedoken in Nederlandse ziekenhuizen (Voss et al., 2005; Huijsdens et al., 2006) en sindsdien is het aantal naar het RIVM ingezonden isolaten van dit type alleen maar toegenomen (SWAB, 2008). Patiëntcontroleonderzoek heeft uitgewezen dat humane besmettingen met dit MRSA-type verband houden met het hebben van contact met varkens of runderen (Van Loo et al., 2007). Bij onderzoek in varkensslachterijen is dit zogenaamde ‘veegerelateerde’ MRSA-type aangetoond bij 39% van de 540 onderzochte varkens (De Neeling et al., 2007). In vervolgonderzoek op varkenshouderijen is MRSA-ST398 aangetroffen op 56% van de 50 onderzochte bedrijven en bij 29% van de personen werkzaam in de varkensstallen (Van den Broek et al., 2009; zie tevens LNV-project 8). Soortgelijke bevindingen zijn eveneens gevonden voor vleeskalverbedrijven (Graveland et al., 2008; zie tevens LNV-project 9). Naar aanleiding van deze bevindingen worden personen die contact hebben met levende varkens of vleeskalveren bij ziekenhuisopname of polibezoek gescreend op MRSA en zo nodig behandeld totdat ze vrij van MRSA zijn ([www.WIP.nl](http://www.WIP.nl)).

Tot op heden zijn onderzoeksgegevens over het voorkomen van MRSA bij pluimvee schaars. In een Koreaans onderzoek in 2001 werd MRSA geïsoleerd uit drie van de 296 onderzochte monsters van pluimvee: eenmaal uit een monster pluimveevlees en tweemaal uit een gewricht van een kip met arthritis (Lee, 2003). Lage prevalenties van MRSA in pluimveevlees zijn eveneens gerapporteerd in Japan (Kitai et al., 2005), Jordanië (Quddoumi et al., 2006) en Spanje (Lopez et al., 2008). De eerste bevinding van MRSA in de pluimveehouderij in Nederland dateert van 2006. Daarbij werd MRSA aangetoond bij een patiënt woonachtig op een pluimveebedrijf. Naar aanleiding hiervan werd onderzoek uitgevoerd op drie pluimveebedrijven, waarbij vijf van de zes onderzochte volwassen bewoners MRSA-positief bleken te zijn, maar geen van de drie onderzochte kinderen. Tevens werd hierbij MRSA gedetecteerd in de pluimveemest van een van de zestien pluimveestallen (Leenders, 2007). Alle isolaten uit dit onderzoek bleken

niet-typeerbaar te zijn met standaard Pulsed-Field Gel Electroforese, hetgeen overeenkomt met MRSA-ST398. In de periode juni 2007 tot en met mei 2008 werd door de VWA onderzoek uitgevoerd naar het voorkomen van MRSA in monsters onverhit vlees afkomstig uit de detailhandel. Daarbij werd MRSA aangetoond in 24,8% van de monsters kip (het betrof hier met name verse kipproducten met huid) afkomstig uit Nederland of andere EU-lidstaten. Het merendeel van de isolaten betrof MRSA-ST398 (De Boer et al., 2009; zie tevens LNV-project 15). In recent Belgisch onderzoek werden 10 (12%) van de 81 onderzochte *S. aureus*-isolaten, afkomstig van vleeskuikens bemonsterd in 2006, geïdentificeerd als MRSA-ST398 (Nemati et al., 2008). In een ander Belgisch onderzoek, in 2007, werd MRSA gedetecteerd in twee van de veertien onderzochte vleeskuikenbedrijven maar in geen enkele van de tien onderzochte leghennenbedrijven (Persoons et al., 2009). Het huidige onderzoek op pluimveeslachterijen werd uitgevoerd om inzicht te verkrijgen in:

- het vóórkomen van MRSA bij Nederlandse (koppels) vleeskuikens;
- de mate van MRSA-besmetting in verschillende slachthuiscompartimenten aan het begin en het einde van de dag;
- het risico van MRSA-dragerschap bij slachthuismedewerkers;
- de transmissie van MRSA naar de mens op pluimveeslachterijen.

## Materiaal en methoden

### *Selectie van en gegevensverzameling bij slachterijen*

In de periode van november 2008 tot en met juli 2009 werd onderzoek uitgevoerd op een zestal grote pluimveeslachterijen in Nederland. De bedrijven werden geselecteerd door NEPLUVI teneinde een steekproef te verkrijgen die zo veel mogelijk representatief is voor de Nederlandse pluimveeslachterijen. Gegevens van de slachterijen, zoals het aantal medewerkers, de slachthuiscapaciteit en gegevens over het productieproces en de hygiënemaatregelen, werden verzameld middels een vragenlijst.

### *Monsternamen en dataverzameling bij slachthuismedewerkers*

In overleg met de directie van de geselecteerde bedrijven werden alle slachthuismedewerkers, evenals chauffeurs en VWA-medewerkers, vantevoren benaderd en hen werd verzocht deel te nemen aan het onderzoek en een vragenlijst in te vullen. Door de deelnemers werd een toestemmingsverklaring ondertekend. De vragenlijst bevatte onder andere vragen met betrekking tot leeftijd, geslacht, etnische afkomst, antibioticumgebruik, werkzaamheden op de slachterij, contact met levende dieren en contact met mensen die in de zorg werken of in de veehouderij. De medewerkers werden verdeeld in drie categorieën afhankelijk van hun werkzaamheden:

(1) medewerkers in contact met levend pluimvee, (2) medewerkers die uitsluitend contact hebben met dood pluimvee of pluimveevlees, en (3) medewerkers die andere werkzaamheden uitvoeren, zoals technische of administratieve taken. Bij alle deelnemers werd door een medewerker van het RIVM een neusswabmonster afgenomen door middel van een wattenstaafje (Venturi Transystem, Copan innovation, Brescia, Italië). Tevens werden monsters afgenomen bij de RIVM-monsternemers, aan het begin van hun activiteiten, direct na afloop en op de volgende dag. De neusswabmonsters werden getransporteerd naar het CWZ voor microbiologisch onderzoek.

#### *Monstername bij pluimvee*

Op de zes geselecteerde slachterijen werden in totaal veertig koppels (dat wil zeggen slachtbatches) vleeskuikens bemonsterd door medewerkers van de VWA; op twee bedrijven werden elk tien koppels bemonsterd en op vier bedrijven telkens vijf koppels. De monsternames vonden deels plaats op dezelfde dag als de monstername bij de medewerkers en in de slachthuiscompartimenten en deels op andere dagen, afhankelijk van de aanvoer van koppels vleeskuikens. Er zijn uitsluitend Nederlandse koppels bemonsterd. Per koppel werden tien kuikens bemonsterd door middel van een keelwab (Greiner Bio-One B.V., artikel nr. 420161) direct na verdoving. Bij drie slachterijen betrof dit een elektrische verdoving via een waterbad; bij drie andere bedrijven betrof dit een CO<sub>2</sub>-verdoving. Daarnaast werden bij dertig van de veertig koppels nog eens per koppel vijf veegmonsters genomen van de binnenzijde van vijf aanvoercontainers door middel van steriel verpakte veegdoekjes (Sodibox, Raisio Diagnostics B.V. Nieuwerkerk aan den IJssel). De keelwabmonsters en de veegmonsters werden getransporteerd naar het RIVM voor microbiologisch onderzoek.

#### *Monstername in slachthuiscompartimenten*

Op de dag van monstername bij de medewerkers werden tevens omgevingmonsters genomen door medewerkers van de VWA. Per slachterij werden veertig veegmonsters genomen in de verschillende compartimenten van de slachterij (aanvoer, vuile slachterij, panklaar, koeling, uitsnijderij) door middel van Sodibox-veegdoekjes. Daarvan werden er twintig vóór het begin van de werkzaamheden en twintig aan het einde van de werkdag genomen, op dezelfde plaatsen. De veegmonsters werden getransporteerd naar het RIVM voor microbiologisch onderzoek.

#### *Microbiologisch onderzoek*

Monsters van medewerkers werden bij het CWZ onderzocht op de aanwezigheid van MRSA. Hiertoe werden de neusswabs overgebracht in Mueller Hinton-medium (BD, Franklin Lakes, USA) met 6,5% NaCl en 18-24 uur geïncubeerd bij 35°C. Vervolgens werd 10 µl van de cultuur uitgestreken op MRSA-ID-

agarplaten (bioMérieux, La Balme Les Grottes, France), waarna incubatie van de agarplaten onder dezelfde omstandigheden plaatsvond. Vervolgens werden geselecteerde verdachte kolonies getest met behulp van de cefoxitin-disc-diffusie-methode (National Committee for Clinical Laboratory Standards 2005). Cefoxitin-resistente kolonies werden reïngeweekt op Columbia-agarplaten met 5% schapenbloed, waarna bevestiging van *S. aureus* plaatsvond door middel van een latex-agglutinatie-test (Staphaurex Plus; Murex Diagnostics Ltd., Dartford, Engeland).

Monsters van pluimvee en omgevingsmonsters werden bij het RIVM onderzocht op de aanwezigheid van MRSA. Daartoe werden de keelwabs en de veegmonsters overgebracht in respectievelijk 10 ml en 100 ml Mueller Hinton-medium (BBL, 211443) met 6,5% NaCl en 18 uur geïncubeerd bij 37°C. Vervolgens werd 1 ml van de verkregen cultuur overgeënt in 9 ml Phenolred Mannitol Broth met 5 mg/L ceftizoxime en 75 mg/L aztreonam (bioMérieux, NL020). Na 18 uur selectieve ophoping bij 37°C werd 10 µl van de cultuur uitgestreken op Columbia-schapenbloedagar (OXOID, PB5008A) en op Brilliance MRSA agar (OXOID, PO5196A), waarna incubatie van de agarplaten onder dezelfde omstandigheden plaatsvond. Verdachte kolonies werden reïngeweekt op Columbia-schapenbloedagar en Brilliance MRSA-agar, waarna bevestiging plaatsvond middels een multiplex-PCR-methode voor detectie van het *S. aureus*-specifieke DNA-fragment (Martineau et al., 1998), het *mecA*-gen (De Neeling et al., 1998) en de Pantón-Valentine Leucocidine (PVL)-genen (Lina et al., 1999). De isolaten werden opgestuurd naar het CVI voor kwantitatieve gevoeligheidsbepalingen met een standaard panel antibiotica (zie tevens LNV-project 5, resistentieonderzoek).

Alle MRSA-isolaten uit dit onderzoek werden bij het RIVM getypeerd door middel van *spa*-typering (Harmsen et al., 2003; zie tevens LNV-project 7, typing). Enkele isolaten van minder bekende *spa*-typen werden tevens getypeerd door middel van Multi-Locus Sequence Typing (MLST) (Enright et al., 2000).

#### *Statistische analyses*

De via de vragenlijsten verzamelde gegevens werden overgebracht in een computerdatabase en geanalyseerd door middel van het statistische softwarepakket SAS versie 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). De prevalentieschattingen bij pluimvee werden uitgevoerd volgens de methode van Thrusfield (1995). De geografische verdeling van de herkomstlocaties van de bemonsterde koppels werd vergeleken met actuele gegevens over het aantal vleeskuikenbedrijven per COROP-gebied in Nederland afkomstig van het Centraal Bureau voor de Statistiek (CBS). Middels een gegeneraliseerd lineair model werd getest of de kans op monstername per bedrijf in de verschillende COROP-gebieden significant verschilde.

## Resultaten

### Slachterijen

De slachtcapaciteit van de zes participerende bedrijven varieerde tussen de 85.000 en 175.000 kuikens per dag. Het slachtproces van pluimvee is grotendeels geautomatiseerd en verloopt daardoor in de pluimveeslachterijen in grote lijnen op gelijke wijze. Wel was er verschil in de wijze van verdoving: bij drie van de slachterijen werd gebruikgemaakt van CO<sub>2</sub>-verdoving en bij de andere drie van elektrische verdoving in een waterbad. Bij de eerste werkwijze werden de dieren verdoofd alvorens handmatig aan de slachtlijn te worden gehangen; bij de tweede werkwijze werden de dieren eerst aan de slachtlijn gehangen en daarna verdoofd.

### Medewerkers

In totaal waren er 1006 medewerkers op de zes slachterijen werkzaam, waarvan er 466 deelnamen aan het onderzoek. De resultaten van het microbiologisch onderzoek bij de medewerkers worden weergegeven in Tabel A10.1. De overall prevalentie van MRSA bij slachthuismedewerkers was 5,6% (26 van de 466 personen), waarbij de hoogste prevalentie werd vastgesteld bij personen die contact hebben met levend pluimvee, namelijk 13,6% (19 van de 140 personen). Bij medewerkers die uitsluitend contact hebben met dood pluimvee of pluimveevlees was de prevalentie 1,8% (4 van de 222 personen) en van de overige medewerkers, waaronder technisch en administratief personeel, was 2,1% MRSA-positief (2 van de 95 personen). Negen personen hebben niet aangegeven welke werkzaamheden zij verrichten; daarvan was er één MRSA-positief. Verder werd één van de vijf RIVM-monsternemers MRSA-positief bevonden direct na afloop van de monsternamen op een van de slachterijen, maar bleek de volgende dag weer MRSA-negatief te zijn.

De relatie tussen MRSA-dragerschap bij slachthuismedewerkers en de verzamelde gegevens van de slachterijen en de medewerkers werd eerst geanalyseerd door middel van een multilevel univariate logistische regressieanalyse, waarbij rekening werd gehouden met eventuele clustering van data binnen slachterijen. In deze analyse werden de volgende significante risicofactoren geïdentificeerd: 'contact met levend pluimvee' ( $p = 0,010$ ), 'hangen van de vleeskuikens aan de slachtlijn' ( $p = 0,005$ ), 'medewerker niet van Nederlandse afkomst' ( $p = 0,013$ ), 'contact met dieren in privé-omstandigheden' ( $p = 0,018$ ) en 'werken op een bedrijf met conventionele elektrische verdoving' ( $p = 0,021$ ). Tevens werd in deze univariate analyse een positieve associatie gevonden tussen MRSA-dragerschap en het aantal werkuren per week ( $p = 0,027$ ). In de daaropvolgende multivariate regressieanalyse werden echter slechts twee onafhankelijke significante risicofactoren voor MRSA-dragerschap geïdentificeerd, namelijk 'contact met levend pluimvee' ( $p = 0,015$ , odds ratio (95%-betrouwbaarheidsinterval) = 5,1 (1,6-16,2)) en 'werken op een bedrijf met conventionele

elektrische verdoving ( $p = 0,042$  odds ratio (95%-betrouwbaarheidsinterval) = 4,1 (1,1-15,5)).

### Pluimvee

In totaal werden er 405 vleeskuikens en 151 aanvoercontainers van 40 koppels vleeskuikens bemonsterd. Figuur A10.1 toont de geografische verdeling van de herkomstlocaties van de bemonsterde koppels in relatie tot het totaal aantal vleeskuikenbedrijven per COROP-gebied in Nederland. Er was geen significant verschil tussen beide verdelingen. De resultaten van het microbiologisch onderzoek worden weergegeven in Tabel A10.2. MRSA werd aangetoond in 13 (8,6%) van de 151 aanvoercontainers en bij 28 van de 405 vleeskuikens. Het aantal MRSA-positieve dieren per groep van 10 onderzochte kuikens per koppel varieerde van 0 tot 10 (Figuur A10.2). Het verschil in besmettingsgraad tussen koppels was statistisch significant ( $p < 0,0001$ ), hetgeen betekent dat er correlatie was tussen de vleeskuikens binnen de koppels. Na correctie voor deze correlatie (Generalized Estimating Equations (Liang en Zeger, 1986)) was het percentage MRSA-positieve vleeskuikens 6,9 % met een 95%-betrouwbaarheidsinterval van 3,0%-14,9%. Een koppel werd als positief beschouwd als ten minste één van de vleeskuikens of één van de aanvoercontainers positief was. Door combinatie van deze resultaten werden derhalve 14 van de 40 bemonsterde koppels MRSA-positief bevonden, hetgeen een prevalentieschatting oplevert van 35% (95%-betrouwbaarheidsinterval: 20%-50%). In Figuur A10.1 zijn de herkomstlocaties van de positieve koppels grofweg aangeduid.

### Omgeving

De microbiologische resultaten van de monsters uit de slachthuiscompartimenten worden weergegeven in Tabel A10.3. Aan het begin van de monsternamedag waren in totaal 10 (8,3%) van de 120 omgevingsmonsters MRSA-positief; aan het einde van de werkdag betrof dit 42 (35,0%) van de 120 monsters. Bij 3 van de 6 slachterijen bleef de aanvoerhal MRSA-negatief gedurende de monsternamedag, terwijl op twee slachterijen de aanvoerhal al MRSA-positief was bij aanvang van de werkdag. De vuile slachterij (waar de vleeskuikens verdoofd en aan de slachtlijn gehangen worden) was bij aanvang reeds MRSA-positief bij twee slachterijen en aan het einde van de werkdag bij alle zes de slachterijen. Hetzelfde geldt voor de panklaarafdeling (na de ontvedering worden de karkassen hier verder verwerkt): aan het begin van de werkdag was slechts 4,8% van de omgevingsmonsters positief, aan het einde van de dag was dit percentage toegenomen tot 38,1%. De koeling was bij alle slachterijen MRSA-negatief bij aanvang; aan het einde van de werkdag werd bij 4 van de 6 slachterijen MRSA in de koeling aangetroffen. Ditzelfde resultaat werd gevonden voor de uitsnijderij. In totaal werd bij 5 van de 6 slachterijen een toename in besmettingspercentage geconstateerd gedurende de werkdag; bij aanvang waren twee slachterijen nog

Tabel A10.1 Voorkomen van MRSA bij personen werkzaam op pluimveeslachterijen.

Functiegroep	Slachthuis 1		Slachthuis 2 (C02)		Slachthuis 3		Slachthuis 4		Slachthuis 5 (C02)		Slachthuis 6 (C02)		Totaal	
	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)
Contact levende dieren <sup>1</sup>	42	10 (24)	28	0 (0)	15	2 (13)	24	4 (17)	20	3 (15)	11	0 (0)	140	19 (14)
Contact dode dieren <sup>2</sup>	29	1 (3)	85	2 (2)	27	0 (0)	29	1 (3)	41	0 (0)	11	0 (0)	222	4 (2)
Overig <sup>3</sup>	12	0 (0)	30	0 (0)	21	2 (10)	7	0 (0)	20	0 (0)	5	0 (0)	95	2 (2)
Niet ingevuld	4	1 (25)	1	0 (0)	1	0 (0)	2	0 (0)	0	0 (0)	1	0 (0)	9	1 (11)
Totaal	87	12 (14)	144	2 (1)	64	4 (6)	62	5 (8)	81	3 (4)	28	0 (0)	466	26 (6)

<sup>1</sup>Contact levende dieren: chauffeurs levende dieren, medewerkers aanvoerhal, aanhangen, verdoven/aansnijden/verbloeden, dierenarts, dierenarts-assistent

<sup>2</sup>Contact dode dieren: kwaliteitsmedewerkers, bedrijfskeurders, medewerkers broeien/plukken, panklaarafdeling, delen, verpakken

<sup>3</sup>Overig: medewerkers kantoor/administratie, technische dienst, kantine, expeditie, containerswasser, koelcel

Tabel A10.2 Voorkomen van MRSA bij vleeskuikens op pluimveeslachterijen<sup>1</sup>.

Vleeskuikens	Slachthuis 1		Slachthuis 2		Slachthuis 3		Slachthuis 4		Slachthuis 5		Slachthuis 6		Totaal	
	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)	Aantal bemonsterd	MRSA+ (%)
Vleeskuikens	54	7 (13)	100	7 (7)	50	12 (24)	50	0 (0)	101	2 (2)	50	0 (0)	405	28 (7)
Aanvoercontainers	NB <sup>2</sup>		25 <sup>3</sup>	4 (16)	25	5 (20)	25	0 (0)	51	3 (6)	25	1 (4)	151	13 (9)
Koppels <sup>4</sup>	5	2 (40)	10	5 (50)	5	4 (80)	5	0 (0)	10	2 (20)	5	1 (20)	40	14 (35)

<sup>1</sup>De monstername bij de vleeskuikens en de aanvoercontainers heeft niet altijd op dezelfde dag plaatsgevonden als de monstername in de compartimenten en bij de medewerkers.

<sup>2</sup>NB: niet bemonsterd

<sup>3</sup>Bij 5 van 10 koppels zijn geen aanvoercontainers bemonsterd

<sup>4</sup>Een koppel is positief bevonden indien ten minste een van de monsters van de vleeskuikens of aanvoercontainers positief is bevonden.

Tabel A10.3 Voorkomen van MRSA in compartimenten van pluimveeslachterijen.

Compartiment	Aantal monsters <sup>1</sup>	Slachthuis 1		Slachthuis 2		Slachthuis 3		Slachthuis 4		Slachthuis 5		Slachthuis 6		Totaal		
		MRSA+		MRSA+		MRSA+		MRSA+		MRSA+		MRSA+		N <sub>totaal</sub> <sup>2</sup>	MRSA+ (% positief)	
		Begin	Eind	Begin	Eind	Begin	Eind	Begin	Eind	Begin	Eind	Begin	Eind		Begin	Eind
Aanvoer	3	3	1	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	18	4 (22)	4 (22)
Vuile hal	6	0	1	0	1	2	2	0	1	0	4	2	3	36	4 (11)	12 (33)
Panklaar	7	0	1	0	3	0	3	0	2	1	5	1	2	42	2 (5)	16 (38)
Koeling	2	0	0	0	1	0	2	0	2	0	0	0	1	12	0 (0)	6 (50)
Uitsnijderij	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	12	0 (0)	4 (33)
Totaal (% positief)	20	3 (15)	3 (15)	0 (0)	7 (35)	3 (15)	10 (50)	0 (0)	5 (25)	1 (5)	10 (50)	3 (15)	7 (35)	120	10 (8)	42 (35)

<sup>1</sup> Aantal monsters genomen per compartiment per slachterij, zowel aan het begin als aan het eind van de slachtdag

<sup>2</sup> N<sub>totaal</sub>: totaal aantal monsters genomen per compartiment, zowel aan het begin als aan het eind van de slachtdag

Tabel A10.4. Resultaten **Spa-typing** van de MRSA-isolaten van vleeskuikens/containers, compartimenten en medewerkers\*.

Spa-type	Slachthuis 1		Slachthuis 2		Slachthuis 3		Slachthuis 4		Slachthuis 5		Slachthuis 6		Totaal			
	Vleeskuikens/containers	Medewerkers	Vleeskuikens/containers	Medewerkers	Vleeskuikens/containers	Medewerkers	Vleeskuikens/containers	Medewerkers	Vleeskuikens/containers	Medewerkers	Vleeskuikens/containers	Medewerkers	Vleeskuikens/containers	Medewerkers		
															Compartimenten	Compartimenten
t011	6	3	8	1	0	3	1	1	3	1	0	0	28	16	15	
t034	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	1	9	1	14	3	
t108	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	4	1	0	
t238	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
t1430	1	3	2	5	1	9	0	0	0	7	1	0	0	8	20	4
t1456	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
t4652	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Totaal	7	6	12	11	7	13	4	5	5	11	3	10	41	52	26	26

\* De monstername bij de vleeskuikens en de aanvoercontainers heeft niet altijd op dezelfde dag plaatsgevonden als de monstername in de compartimenten en bij de medewerkers.

negatief, aan het einde van de werkdag werd bij alle slachterijen MRSA aangetoond in 15%-50% van de omgevingsmonsters. Bij aanvang van de werkdag werd MRSA vooral gevonden in de compartimenten aan het begin van het slachtproces, met name de aanvoerhal en de vuile slachterij; aan het einde van de werkdag werd MRSA-besmetting door de gehele slachtlijn heen aangetoond.

#### Karakterisering van isolaten

In totaal werden 119 MRSA-isolaten verkregen, welke geen van alle de PVL-virulentiegenen bezaten. De resultaten van de *spa*-typering van de isolaten zijn weergegeven in Tabel A10.4. Bij slachthuismedewerkers werden zes verschillende *spa*-typen aangetroffen. Het meest frequent geïsoleerde *spa*-type was t011 (n=15). De andere gevonden *spa*-typen waren t034 (n=3), t238 (n=1), t1430 (n=4), t1456 (n=1) en t4652 (n=2). De MRSA-isolaten van de vleeskuikens en de aanvoercontainers betroffen hoofdzakelijk *spa*-type t011 (n=28); daarnaast werd ook t034 (n=1), t108 (n=4) en t1430 (n=8) aangetroffen. In koppels waarvan zowel de monsters van de containers als van de kuikens MRSA-positief waren, werden dezelfde *spa*-typen in beide type monsters gevonden. In drie koppels werd een mix aangetroffen van *spa*-typen t011 en t1430. In de monsters uit de slachthuiscompartimenten werd *spa*-type t1430 het meest frequent (n=20) aangetroffen en daarnaast ook t011 (n=16), t034 (n=14), t108 (n=1) en t1456 (n=1). Vier van de zeven *spa*-typen zijn gerelateerd aan het 'veegerelateerde' MLST-type ST398. Van de overige *spa*-typen werd één isolaat getypeerd met MLST. Een isolaat van *spa*-type t4652 betrof ST1453, welk type behoort tot MLST-klonaal complex 398 (CC398), een isolaat van *spa*-type t1430 betrof ST9 en het enkele isolaat van *spa*-type t238 betrof ST1454.

De resultaten van de gevoeligheidsbepalingen van de MRSA-isolaten worden weergegeven in Tabel A10.5. Bij de MRSA-isolaten van zowel de medewerkers als het pluimvee en de omgeving werden hoge resistentiepercentages aangetoond tegen ciprofloxacine (30%-54%), clindamycine (54%-96%), erythromycine (56%-96%) en tetracycline (86%-96%). Ook resistentie tegen gentamicine (10%-39%) en neomycine (31%-37%) werd frequent gevonden. Daarnaast werden bij de isolaten van pluimvee en de omgeving lage percentages resistentie tegen cotrimoxazole aangetroffen (respectievelijk 2% en 12%). Cotrimoxazole-resistentie werd alleen aangetroffen bij MRSA-isolaten van *spa*-type t1430 en gentamicine-resistentie alleen bij de *spa*-typen t011 en t1456. In totaal vertoonde 48% van de isolaten resistentie tegen meer dan drie van de geteste antibiotica. Geen van de isolaten vertoonde resistentie tegen de in de humane geneeskunde belangrijke antibiotica linezolid, fusidinezuur, mupirocine en rifampicine, met uitzondering van één humaan isolaat van *spa*-type t011 dat resistent was tegen fusidinezuur.

#### Discussie

De in dit onderzoek geschatte prevalentie van MRSA onder slachthuismedewerkers (5,6%) is significant hoger dan de prevalentie van MRSA in de algemene Nederlandse bevolking welke ongeveer 0,1% bedraagt (SWAB, 2008). Er is dan ook sprake van een verhoogd risico van MRSA-dragerschap voor medewerkers van een vleeskuikenslachterij. Dit risico is significant hoger voor medewerkers die contact hebben met levend pluimvee dan voor medewerkers die uitsluitend contact hebben met dood pluimvee of die andere werkzaamheden uitvoeren (MRSA-prevalenties respectievelijk 13,6% en 1,9%). Met name het hangen van de vleeskuikens aan de slachtlijn is geassocieerd met een verhoogd risico van MRSA-dragerschap (univariate p-waarde = 0,005). In recent

Tabel A10.5 Resultaten gevoeligheidsbepalingen van de MRSA-isolaten van vleeskuikens/containers, compartimenten en medewerkers.

Antibioticum	Vleeskuikens/ containers	Compartimenten	Resistentie-percentages	
				Medewerkers
Amikacine	0%	0%		0%
Ciprofloxacine	34%	54%		30%
Clindamycine	54%	81%		96%
Cotrimoxazole	2%	12%		0%
Erythromycine	56%	81%		96%
Fusidinezuur	0%	0%		4%
Gentamicine	39%	10%		19%
Linezolid	0%	0%		0%
Mupirocine	0%	0%		0%
Neomycine	37%	31%		NB*
Rifampicine	0%	0%		0%
Tetracycline	90%	86%		96%

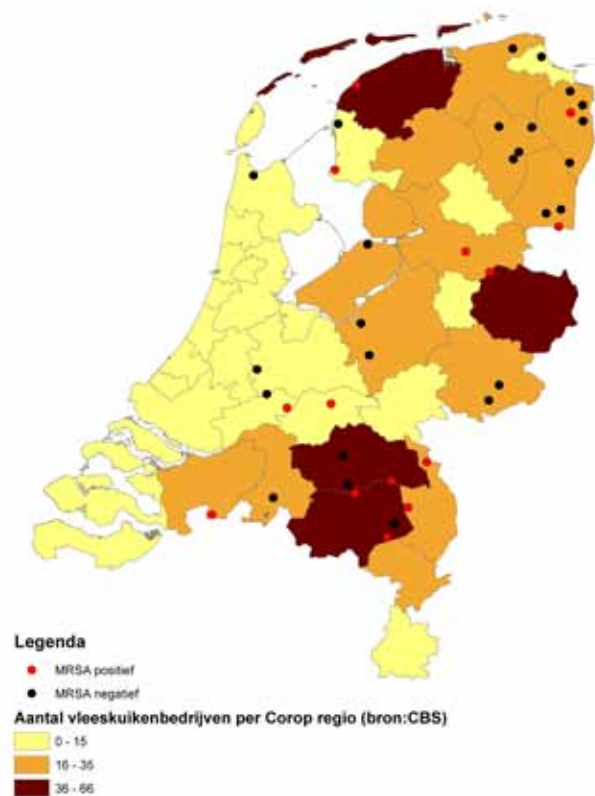
\*NB: niet bepaald

onderzoek op Nederlandse varkensslachterijen, waarbij gebruikgemaakt werd van een identieke onderzoeksopzet, werd de MRSA-prevalentie onder slachthuismedewerkers die contact hebben met levende varkens eveneens geschat op 15%, terwijl bij medewerkers die werkzaam zijn in andere compartimenten van de slachterij geen MRSA werd aangetoond (Van Cleef et al., 2009).

Opmerkelijk is dat medewerkers van een slachterij met conventionele elektrische verdoving op basis van de onderzoeksresultaten een significant hoger risico van MRSA-dragerschap hebben dan medewerkers van een slachterij met CO<sub>2</sub>-verdoving. Dit is mogelijk verklaarbaar door het stof dat verspreid wordt door het fladderen met de vleugels van kuikens die aan de slachtlijn worden gehangen bij slachterijen met elektrische verdoving. Bij slachterijen met CO<sub>2</sub>-verdoving worden de dieren eerst verdoofd alvorens handmatig aan de slachtlijn te worden gehangen. Stof is al eerder aangemerkt als vehikel van MRSA-transmissie van dier naar mens (Van den Broek et al., 2008).

In dit onderzoek werd 35% van de 40 onderzochte koppels vleeskuikens MRSA-positief bevonden op basis van ten minste één MRSA-positieve aanvoercontainer of één positief vleeskuiken. De correlatie tussen de resultaten van de aanvoercontainers en die van de vleeskuikens bleek daarbij laag te zijn. Aangezien niet kan worden uitgesloten dat de in de aanvoercontainers aangetroffen MRSA-besmetting niet afkomstig was van de betreffende koppels vleeskuikens maar reeds daarin aanwezig was vanwege onvoldoende reiniging en desinfectie van de containers, kan hierbij sprake zijn van overschatting van de koppelprevalentie. Anderzijds zijn bij de eerste 10 koppels geen aanvoercontainers onderzocht, hetgeen mogelijk heeft geleid tot een onderschatting van de koppelprevalentie. De koppels waren afkomstig van 40 verschillende vleeskuikenbedrijven en de bedrijven waarvan de MRSA-positieve koppels afkomstig waren, liggen zowel in het zuiden, als in het oosten en het noorden van Nederland (Figuur A10.1). Van de onderzochte vleeskuikens bleek 6,9% MRSA te dragen in de keel. Ter vergelijking: in onderzoek op varkensslachterijen, uitgevoerd van november 2005 tot en met januari 2006, werd MRSA aangetoond bij 39% van de 540 onderzochte vleesvarkens en in 80% van de onderzochte slachtbatches (De Neeling et al., 2007). MRSA lijkt in Nederland derhalve minder wijd verspreid te zijn onder vleeskuikens dan onder vleesvarkens. De MRSA-besmetting van slachthuiscompartimenten was bij aanvang van de werkdag relatief gering, met name in de ‘schone’ compartimenten (panklaar, koeling en uitsnijderij), hetgeen duidt op een effectieve reiniging en desinfectie. Er werd echter een toename in het percentage MRSA-positieve omgevingsmonsters gedurende de werkdag geconstateerd. Hieruit blijkt dat de MRSA-besmetting zich gedurende de werkdag verspreidt door de slachterij middels het slachtproces.

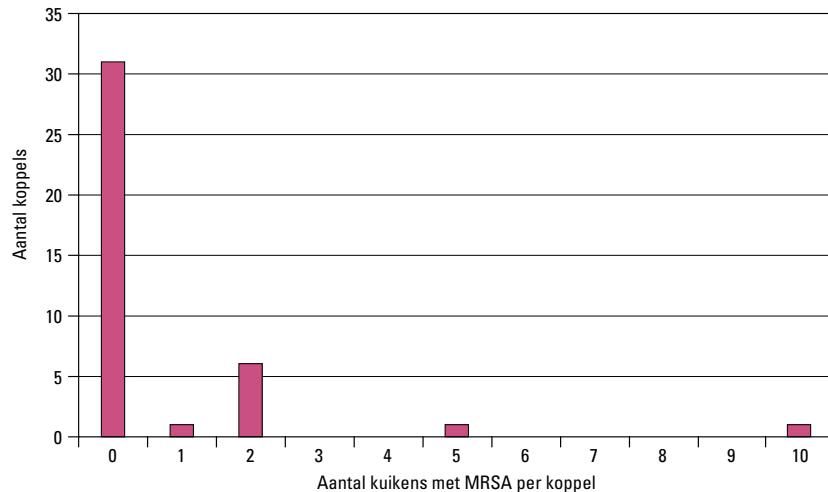
Het merendeel van de MRSA-isolaten van de slachthuismedewerkers betrof een MRSA-*spa*-type dat



Figuur A10.1 Geografische verdeling van de herkomst van de bemonsterde koppels in relatie tot de verdeling van het totaal aantal vleeskuikenbedrijven over Nederland.

ook bij het pluimvee en/of in de slachthuisomgeving werd aangetroffen. Hierbij moet opgemerkt worden dat in diverse gevallen op de monsternamedag ook Duitse koppels vleeskuikens werden geslacht die mogelijk eveneens MRSA op de slachterijen hebben geïntroduceerd. De gevonden overlap in *spa*-typen vormt een nadere aanwijzing dat transmissie van MRSA plaatsvindt van pluimvee naar de mens, direct of indirect via de slachthuisomgeving. Het meest frequent geïsoleerde *spa*-type (t011) is tevens één van de meest voorkomende types bij varkens (Van den Broek, 2009; zie tevens LNV-project 8) en vleeskalveren (Graveland et al., 2008; zie tevens LNV-project 9) en is het meest voorkomende ‘veegerelateerde’ MRSA-*spa*-type bij de mens in Nederland (Haenen et al., 2009). Dit type werd eveneens geïsoleerd uit Belgisch pluimvee (Nemati et al., 2008). Opmerkelijk is de frequente isolatie van *spa*-type t1430 uit monsters van zowel medewerkers als pluimvee en de omgeving, aangezien dit *spa*-type niet tot klonaal complex 398 (CC398) behoort maar gerelateerd is aan MLST-type ST9. Ditzelfde *spa*-type werd recentelijk door de VWA geïsoleerd uit 6,7% van de monsters kip afkomstig uit Nederland of de EU (De Boer et al., 2009; zie tevens project 15). Ook werd dit type recentelijk aangetroffen in kipmonsters in Duits onderzoek (Fetsch et al., 2009). Deze bevindingen vormen mogelijk een aanwijzing dat *spa*-type t1430 een specifiek





Figuur A10.2. Aantal koppels (Y-as) met het aantal MRSA-positieve kuikens per koppel (X-as).

pluimveegerelateerd MRSA-type is.

Ook de resistentiepatronen van de MRSA-isolaten van medewerkers, pluimvee en slachthuiscompartimenten kwamen in grote lijnen met elkaar overeen. Het resistentiepatroon van de pluimvee-isolaten is tevens vergelijkbaar met het resistentiepatroon van MRSA-isolaten uit Belgisch pluimvee (Nemati et al., 2008; Persoons et al., 2009). In tegenstelling tot beide Belgische onderzoeken werd in dit onderzoek echter een hoog percentage ciprofloxacine-resistentie bij de pluimvee-isolaten aangetroffen. Dit hoge resistentiepercentage is mogelijk verklaarbaar door het regelmatige gebruik van (fluoro-)quinolonen (met name flumequine en enrofloxacin) bij pluimvee. Het in dit onderzoek gevonden resistentiepatroon bij pluimvee-isolaten komt tevens in grote lijnen overeen met het resistentiepatroon van MRSA-isolaten van Nederlandse vleesvarkens, hoewel de varkens-isolaten alle gevoelig waren voor ciprofloxacine (De Neeling et al., 2007).

In dit onderzoek werden geen monsters genomen van eindproducten. De bevindingen van het onderzoek bij pluimvee en in de slachthuiscompartimenten liggen echter wel op een lijn met de resultaten van het door de VWA uitgevoerde onderzoek in de detailhandel waarin een hoge MRSA-prevalentie werd gevonden bij monsters kip (met name kipproducten met huid) afkomstig uit Nederland of de EU (De Boer et al., 2009; zie tevens project 15). De besmettingsniveaus (aantallen bacteriën) bleken in dat onderzoek echter zeer laag te zijn. Op basis van deze bevinding en epidemiologische gegevens is door het Bureau Risicobeoordeling (BuR) van de VWA geconcludeerd dat levensmiddelen geen of een verwaarloosbare rol spelen bij de verspreiding van MRSA onder de bevolking (Bureau Risicobeoordeling, 2008). Naar aanleiding van eerdere bevindingen van hoge percentages MRSA-dragerschap bij personen die werken op een varkenshouderij (Van den Broek et al., 2008;

zie tevens LNV-project 8) of een vleeskalverhouderij (Graveland et al., 2008; zie tevens LNV-project 9) worden personen die contact hebben met levende varkens of vleeskalveren bij ziekenhuisopname gescreend op MRSA en verpleegd in isolatie totdat dragerschap is uitgesloten. De mate van MRSA-dragerschap bij vleeskuikenhouders is tot dusverre onbekend, maar gelet op de uitkomsten van dit onderzoek mag een verhoogde prevalentie onder deze beroepsgroep verwacht worden.

### Aanbevelingen

Deze onderzoeksresultaten tonen aan dat slachthuismedewerkers die contact hebben met levend pluimvee een verhoogd risico hebben van MRSA-dragerschap. Aangezien in de vleeskuikenhoudery een grotere groep mensen - waaronder vleeskuikenhouders, gezinsleden en werknemers - contact heeft met levend pluimvee, is vervolgonderzoek in deze sector noodzakelijk. Dergelijk onderzoek kan tevens inzicht opleveren in risicofactoren voor besmetting van pluimvee en daarmee handvatten verstrekken voor interventie.

### Gerelateerde projecten

Dit onderzoek betreft project 11 van het LNV-programma MRSA en is gerelateerd aan de volgende projecten binnen dat programma:

- project 5: resistentieonderzoek MRSA-stammen.
- project 7: typering MRSA-isolaten.

### Output

M.N. Mulders, A.P.J. Haenen, P.L. Geenen, E.S. Poldervaart, T. Bosch, X.W. Huijsdens, P.C. Vesseur, P.D. Hengeveld, W.D.C. Dam-Deisz, D. Mevius, A. Voss, A.W. van de Giessen. Prevalence of MRSA in Dutch broiler slaughterhouses. Abstract ASM-ESCMID Conference on Methicillin-resistant Staphylococci in Animals, September 22 - 25, 2009, London, England.

## Dankwoord

De volgende mensen worden bedankt voor hun bijdrage aan het onderzoek:

- de directies en medewerkers van de participerende slachterijen;
- het bestuur van NEPLUVI;
- Brigitte van Cleef (RIVM) voor ontwikkeling van de monsternamen-protocollen;
- Suzanne Lamers (CWZ) voor het onderzoek van de humane monsters;
- Han de Neeling en Emile Spalburg (beiden RIVM) voor de gevoeligheidsbepalingen bij de humane MRSA-isolaten;
- Jan van de Kassteele, Hendrik Boshuizen, Jan Muilwijk en Katsuhima Takumi (allen RIVM) voor de statistische ondersteuning.

## Literatuur

Bureau Risicobeoordeling, 2008. Advies van de directeur Bureau Risicobeoordeling aan de minister van LNV en de minister van VWS inzake MRSA op levensmiddelen van dierlijke oorsprong. Voedsel en Waren Autoriteit ([www.VWA.nl](http://www.VWA.nl)).

De Boer, E., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M., Wit, B., Huijsdens, X.W., de Neeling, A.J., Bosch, T., van Oosterom, R.A.A., Vila, A., and Heuvelink, A.E., 2008. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.007.

De Neeling, A.J., van Leeuwen, W.J., Schouls, L.M., Schot, C.S., van Veen Rutgers, A., Beunders, A.J., et al., 1998. Resistance of staphylococci in the Netherlands: surveillance by an electronic network during 1989-1995. *J. Antimicrob. Chemother.* 41, 93-101.

De Neeling, A.J., van den Broek, M.J., Spalburg, E.C., van Santen-Verheuevel, M.G., Dam-Deisz, W.D., Boshuizen, H.C., van de Giessen, A.W., van Duijkeren, E., Huijsdens, X.W., 2007. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet. Microbiol.* 122, 366-372.

Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G., 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 38, 1008-1015.

Fetsch, A., Tenhagen, B.-A., Guerra, B., Hertwig, S., Hammerl, J.-A., Kaesbohrer, A.M., Braeunig, J., Appel, B. Potential emergence of a non ST398 clone in livestock animals and food. In: Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment, 1-3 June 2009, Tours, France. pp. 108.

Graveland, H., Wagenaar, J.A., Broekhuizen-Stins, M., Oosting-Schothorst, I., Schoormans A., van Duijkeren, E., Huijsdens, X., Mevius D., Heederik, D., 2008. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in veal calf farmers and veal calves in the Netherlands. In: Proceedings of the American Society for Microbiology Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens, 15-18 June 2008, Copenhagen, Denmark. pp. 62-63.

Haenen, A., Huijsdens, X.W., Pluister, G.N., van Luit, M., Bosch, T. van Santen-Verheuevel, M.G., Spalburg, E., et al., 2009. Surveillance van MRSA in Nederland gedurende 2007: stijgende trend van aan vee gerelateerde MRSA. *Infectieziekten Bulletin*, 20, 138-145.

Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, Turnwald D, Vogel, U., 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol.* 41, 5442-5448.

Huijsdens, X.W., van Dijke, B.J., Spalburg, E., van Santen-Verheuevel, M.G., Heck, M.E., Pluister, G.N., Voss, A., Wannet, W.J., de Neeling, A.J., 2006. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5, 26.

Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Uji, T. and Kitagawa, H., 2005. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. *J Vet Med Sci* 67 (1), 107-110.

Lee, J.H., 2003. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol* 69(11), 6489-6494.

Liang, K.Y., Zeger, S.L., 1986. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 73, 13-22.  
Leenders, A., Janssen, M., Renders, N., Pelk, M., 2007. Varkens-MRSA op een pluimveebedrijf? *Infectieziekten Bulletin* 18, 43-44.

Lina, G., Piemont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., et al., 1999. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1128-1132.

Lopez, M., Lozano, C., Perez, V., Martinez, S., del Campo, C., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Torres, C., 2008. Deteccion de *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina en alimentos de origen animal. Congreso Nacional de la Sociedad

---

Espanola de Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica (SEIMC), Madrid, Spain.

Martineau, F., Picard, F.J., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 36: 618-623.

Nemati, M., Hermans, K., Lipinska, U., Denis, O., Deplano, A., Struelens, M., Devriese, L.A., Pasmans, F. and Haesebrouck, F., 2008. Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. Antimicrob. Agents Chemother. 52(10), 3817-3819.

Persoons, D., Van Hoorebeke, S., Hermans, K., Butaye, P., de Kruif, A., Haesebrouck, F., Dewulf, J., 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry. Emerg. Infect. Dis. 15, 452-453.

Quddoumi, S., Bdour, S., Mahasneh, A., 2006. Isolation and characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from livestock and poultry meats. Annals of Microbiology 56, 155-161.

SWAB. NethMap 2008. Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands. 2008. Thrusfield, M. Veterinary epidemiology. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 1995: 483.

Van den Broek, I.V.F., van Cleef, B.A.G.L., Haenen, A. Broens, E.M., van der Wolf, P.J., van den Broek, M.J.M., Huijsdens, X.W., Kluytmans, J.A.J.W., van de Giessen, A.W., Tiemersma, E.W., 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working at pig farms in The Netherlands. Epidemiol. Infect. 137, 700-708.

Van Cleef, B.A.G.L., Broens, E.M., Voss, A., Huijsdens, X.W., Zuchner, L., van Benthem, B.H.B., Kluytmans, J.A.J.W., Mulders, M.N., van de Giessen, A.W., 2009. High prevalence of MRSA in slaughterhouse workers in contact with live pigs. ASM-ESCMID Conference on Methicillin-resistant Staphylococci in Animals, September 22 - 25, 2009, London, England.

Van Loo, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E., de Neeling, A., van de Sande-Bruinsma, N., Beaujean, D., 2007. Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* of Animal Origin in Humans. Emerg. Infect. Dis. 13, 1834-1839.

Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., Wulf, M., 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. Emerg. Infect. Dis. 11, 1965-1966.

## 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, Maaïke 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 duidelijke 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 aanvoerbedrijf (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
<b>negatieve piramides</b>										
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	-
<b>gemengde piramides</b>										
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) t943 (7) t2503 (1)	ECIRT (1) ECIRNT (1) ECIRT (7) ECIRT (1)	-	-
G	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	31	a	pos	4 (20)	-	t011 (3)	RT (1) ECIRFGNT (2)	ja	pen, tmpps
	32	c	pos	-	-	t108 (1)	ECIRT (1)	nee	-
	33	e	pos	-	1 (10)	t108 (1)	ECIT (1)	ja	macro, tetra
L*	34	b	pos	-	3 (10)	t108 (3)	ECIT (3)	ja	tetra
	35	e	pos	-	8 (10)	t108 (8)	ECIT (8)	ja	tetra
	36	c	pos	-	2 (10)	t011 (1)	ECIT (1)	ja	tetra
M*	37	e	pos	-	8 (10)	t108 (1)	ECIT (1)	ja	pen
	38	a	pos	-	8 (10)	t899 (7)	ECIT (7)	ja	pen
	39	c	pos	-	2 (10)	t1939 (1)	ECIT (1)	ja	tmpps
O*	40	a	pos	-	2 (10)	t899 (2)	T (2)	ja	tmpps
	41	c	pos	-	2 (10)	t108 (2)	ET (2)	ja	tmpps
	42	b	pos	-	3 (10)	t108 (3)	ET (3)	ja	poly
	43	e	pos	-	4 (10)	t567 (4)	T (2)	ja	pen, tetra
	44	c	pos	-	9 (10)	t567 (9)	CIT (2) CIT (5) T (4)	ja	pen
	45	b	pos	9 (10)	1 (5)	t011 (6)	ECICIT (1)	ja	macro, tetra, tmpps
	46	e	pos	6 (10)	2 (5)	t108 (4)	ECICIT (1)	ja	pen
	47	b	pos	7 (10)	1 (5)	t011 (8)	ECIGAT (1)	ja	macro, pen, tetra, tmpps
	48	e	pos	6 (10)	0 (5)	t011 (6)	ECIT (1)	ja	amino, pen
	49	e	pos	10 (10)	3 (5)	t011 (13)	ECIGNT (1)	ja	pen, tetra
	50	b	pos	5 (10)	0 (5)	t011 (5)	NT (1)	ja	pen
	51	e	pos	9 (10)	1 (5)	t011 (10)	ECINT (1)	-	-

\*incomplete piramide (1 bedrijf ontbreekt)

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

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 tmgs. 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
tmpr	1	0,0	18	0,0	13	0,0	8	0,0	0	-	1	0,0	0	-	41	0,0

tmpr = 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 kappi 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 congress – 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 Oorburg en kwaliteitsmedewerkers, VION.  
Veehouders.  
Varkenstranseurteurs.

#### 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 bijeenbrengen 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 varkenstranseurteurs, 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 geïncludeerd 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	varkens %	% 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) <sup>a</sup>
		t011 (6)		t108 (1)	
		t2330 (1)			
C	t108 (4)	t108 (8)	t108 (1)	t011 (1)	ECIT (1) <sup>b</sup>
	t011 (3)	t011 (18)			
		t2123 (1)			
D	t1457(5)	t108(3)	t1457(1)	t011(1)	? <sup>1</sup>
		t011(22)			
		t1457 (3)			

E=erythromycine; Cl=clindamycine; T=tetracycline

<sup>a</sup> van isolaat met *spa*-type t108 geïsoleerd uit varken op steektafel

<sup>b</sup> van isolaat met *spa*-type t108 geïsoleerd uit varken bij uitladen

<sup>1</sup> 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 hokafscheidingen, 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 voornamelijk 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 Infect 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. Kniehler, 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.

## APPENDIX 13

### Project 14: MRSA in stof: indicator voor bedrijfsstatus

#### Projectleider

D.J.J. Heederik: IRAS en Julius Centrum voor Gezondheidswetenschappen en Eerstelijns Geneeskunde, UMC Utrecht.

#### Projectteam

H. Graveland en M.J. Gilbert: IRAS.  
A. van Nes: Departement Landbouwhuisdieren, FD.  
J.A. Wagenaar: Departement Infectieziekten en Immunologie, FD en CVI-WUR.

#### Samenwerking

Overleg Kalversector en Productschappen Vee, Vlees en Eieren.

#### Samenvatting

##### Inleiding

Sinds 1995 worden er in Nederland MRSA-infecties waargenomen die niet gerelateerd kunnen worden aan patiënten met de bekende risicofactoren zoals verblijf in een buitenlands ziekenhuis. Dit type MRSA wordt in verband gebracht met de varkens- en kalverhouderij. Het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) heeft in 2006 onderzoeksinstituten gevraagd om onderzoek te doen naar het voorkomen van MRSA bij dieren en de mogelijke kans op overdracht van deze bacterie naar mensen. Het onderzoek naar MRSA in stof en lucht is uitgevoerd door het Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS), een onderzoeksinstituut dat onder andere verbonden is met de faculteiten Diergeneeskunde en Geneeskunde van de Universiteit van Utrecht, de departementen Infectieziekten en Immunologie, en Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren van de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht.

Verschillende studies tonen aan dat transmissie van bacteriën plaats kan vinden via bio-aerosolen in de lucht. Op deze manier kan luchtgerelateerde transmissie eveneens een rol spelen bij de transmissie van zoönotische bacteriën als MRSA. Tot op heden zijn slechts enkele studies gedaan naar MRSA in stof en lucht. Deze studies zijn voornamelijk uitgevoerd in ziekenhuizen waarbij aanwijzingen worden gevonden dat MRSA recirculeert in lucht, met name na het opmaken van de bedden. In de landbouw- en veehouderij is hiernaar nog nauwelijks onderzoek verricht. Kwantificering van de concentratie MRSA in stof en in de lucht in varkens- en kalverstallen is nodig om de mogelijke rol van luchtgerelateerde transmissie van MRSA in kaart te brengen.

##### Doel van het onderzoek

De doelstelling van dit onderzoek is om inzicht te krijgen in de mogelijke transmissieroutes van MRSA via het milieu. Hierbij wordt zowel het stof als de lucht in de stallen onderzocht. Omgevingsmetingen kunnen wellicht in de toekomst als indicator voor de bedrijfsstatus gebruikt worden.

##### Opzet van het onderzoek

Op 102 kalverhouderijen en 20 pluimveehouderijen zijn 5 veegmonsters afgenomen. De stofdoeken zijn alle geanalyseerd op de aanwezigheid van MRSA in het stalstof. Daarnaast zijn er met behulp van verschillende meettechnieken (Plaatmethode, Anderson Microbial Sampler, BioSampler en Gilair5 Air Sampler met GSP-kop) metingen verricht aan MRSA in varkens- en kalverstallen. Door meetproblemen is geen keuze voor een specifieke methode mogelijk gebleken en daarom zijn daarna op één MRSA-positieve varkenshouderij gedurende meerdere sessies metingen uitgevoerd met verschillende meettechnieken. In dit bedrijf zijn in een aantal gevallen op drie verschillende locaties in de stallen van dit bedrijf methoden parallel toegepast.

##### Resultaten

###### Stof

Op 80 van de 102 onderzochte kalverhouderijen werd MRSA aangetroffen in een of meerdere stofmonsters. Eveneens werden op 80 bedrijven bij een of meerder kalveren MRSA gevonden. De desbetreffende bedrijven kwamen echter niet geheel overeen. Op 6 bedrijven werden positieve kalveren gevonden, terwijl er geen MRSA in het stalstof werd aangetroffen. Op 10 bedrijven werd MRSA in het stalstof aangetroffen terwijl alle onderzochte kalveren MRSA-negatief bleken te zijn. In de 100 monsters afkomstig van de 20 pluimveehouderijen werd geen MRSA gevonden.

###### Lucht

In de lucht werd MRSA aangetoond met behulp van de sedimentatieplaatmethode, Anderson Microbial Sampler (AMS) en Gilair5 Air Sampler. Metingen met de BioSampler hebben geen MRSA aan kunnen tonen. Op de selectieve agarplaten werden tussen de 3 en 75 CFU MRSA geteld, met een gemiddeld aantal van 36 CFU MRSA. Dit komt neer op circa 500 tot 13000 CFU MRSA per m<sup>2</sup> met een gemiddelde van 6350 CFU MRSA per m<sup>2</sup>. De metingen met de AMS laten grote variaties in CFU/m<sup>3</sup> zien. Concentraties variëren tussen de 0 en 1,6 · 10<sup>4</sup> MRSA-kiemen per m<sup>3</sup> lucht in varkensstallen. Niveaus in

kalverhouderijen zijn een grootteorde (factor 10) lager. Bij de bemeten bedrijven is ook in de buitenlucht gemeten, op 25 meter afstand. Incidenteel werd MRSA in de lucht vastgesteld, de concentratie was laag, in de regel <100 kiemen per m<sup>3</sup>.

Met behulp van de Gilair5 Air Sampler werden gemiddeld met behulp van kweek methoden 10 tot 1000 CFU MRSA per filter gevonden, 8 tot 800 CFU MRSA per m<sup>3</sup> lucht. De hoeveelheid MRSA op de filters van de Gilair5 Air Sampler zijn tevens met een experimentele selectieve ST398 kwantitatieve PCR-methode (qPCR) getest. De niveaus gevonden met qPCR liggen gemiddeld een factor 10 tot 100 hoger dan de hoeveelheid MRSA, gevonden met actieve luchtmetingen gevolgd door kweek ten opzichte van een ijkreeks van gecoloniseerde MRSA. Dit lijkt er op te wijzen dat actieve luchtmeting op deze manier de levensvatbaarheid van MRSA vermindert.

### **Discussie en conclusie**

Zowel in stof als in lucht in varkens- en kalverstallen is MRSA gevonden. Deze bevindingen tonen aan dat zowel lucht als stof potentiële transmissieroutes kunnen zijn voor MRSA.

De toegepaste technieken om MRSA in de lucht te meten blijken niet alle toereikend voor een betrouwbare meting. Vermoedelijk vanwege negatieve invloeden van het monstername-apparaat op de bacteriën. Door de lagere luchtsnelheden in de Gilair5 Air Sampler met GSP-kop lijken deze metingen minder invloed te hebben op de levensvatbaarheid van MRSA. Deze methode in combinatie met glasvezelfilters heeft dan ook de voorkeur voor kwantitatieve metingen aan MRSA in de lucht. Ook de sedimentatie met de selectieve-agarplaatmethode is een betrouwbare, goedkope en snelle manier om MRSA in lucht aan te tonen. Een belangrijk nadeel aan deze methode is dat deze semikwantitatief is. Vervolgonderzoek is nodig om metingen aan MRSA in lucht verder te ontwikkelen en kwantificering al dan niet met behulp van qPCR te optimaliseren.

## **Summary**

### **Background**

Studies have shown that a transmission pathway for bacteria is airborne transport via bio-aerosols. Airborne transmission may be a route by which agents of zoonotic bacteria may establish a new ecological niche. However, few studies about air sampling of MRSA have been reported. In a hospital setting studies suggest that MRSA was recirculated in the air, especially after movements such as making beds. In agricultural settings, very little research has been done on air sampling of MRSA. However, in swine facilities, concentrations of total antibiotic resistant bacteria in air are higher inside the facility than outside. Quantification of airborne MRSA in swine and other animal facility environments is needed to determine the possible role of airborne MRSA transmission.

## **Methods**

Dust samples were taken (n=5/farm) on 102 veal farms and 20 poultry farms in the Netherlands to define the MRSA status. To develop an optimal protocol for air sampling different methods were tested. In pig and veal calf farms measurements were done using the Anderson Microbial Sampler and BioSampler. Because of difficulties with sampling, more additional measurements were done on one MRSA positive pig farm using the Gilair5 Air Sampler and plate methods. Quantification of MRSA load was performed using culturing and an additional experimental ST398 specific quantitative PCR (qPCR).

## **Results**

### **Dust**

On 80 of the 102 veal farms MRSA was found in one or more dust samples. In addition, on 80 veal farms MRSA was found in the calves. However, results for dust samples and animals on these farms were not entirely consistent. No MRSA was found in dust from poultry farms.

### **Air Sampling**

Air sampling using the sedimentation plate method, Anderson Microbial Sampler (AMS) and Gilair5 Air Sampler resulted in MRSA positive samples. No MRSA was found using the Biosampler. Using the sedimentation plate method between 3 and 75 CFU MRSA were counted per plate, with an average of 36 CFU MRSA. This equates to 500 to 13,000 CFU MRSA per m<sup>2</sup> with an average of 6350 CFU of MRSA per m<sup>2</sup>. A large variation in MRSA load was found using the AMS. Concentrations vary between 0 and  $1.6 \cdot 10^4$  MRSA germs per m<sup>3</sup> air in pig farms. Levels in calf farms were one order of magnitude (factor 10) lower.

Using the Gilair5 Air Sampler in combination with culturing, on average 10 to 1000 CFU MRSA per filter were found, which resulted in 8 to 800 CFU MRSA per m<sup>3</sup> air. The amount of MRSA on the filters of the Gilair5 sampler was also tested using a selective ST398 qPCR. The levels found with qPCR are on average 10 to 100 times higher than the amount of MRSA found with active air sampling followed by culture. This seems to indicate that active air measurement in this way reduces the viability of MRSA.

## **Conclusions**

MRSA was found, in dust samples and air measurements, in pig and veal calf farms. These findings show that both air and dust are potential transmission routes for MRSA. The techniques used for MRSA air sampling seemed not all adequate for a reliable results. Due to negative influences on the bacteria caused by the specific properties of materials used, methods such as the AMS and BioSampler are unsuitable for measurements in air. Measurements with the Gilair5 Air Sampler had less impact on the viability of MRSA due to the lower air

velocities in this sampler. Therefore we recommend this method in combination with glass fiber filters for quantitative measurements of MRSA in air. Besides the sedimentation of MRSA on the selective agar is also a reliable, cheap and quick way to measure MRSA. However this method is semi quantitative, which is a major drawback. Further research is needed to optimize protocols for air sampling of MRSA and to quantify MRSA load in livestock environment.

## Inleiding

### *Aanleiding van het onderzoek*

MRSA (Meticilline Resistente *Staphylococcus aureus*) is bekend als de ziekenhuisbacterie. Vanwege resistentie tegen een groot aantal antibiotica zijn infecties met MRSA moeilijk behandelbaar. In Nederland komt de bacterie onder de algemene bevolking relatief weinig voor (<1%). De lage prevalentie in Nederland kan voornamelijk verklaard worden door het nationale 'search and destroy'-beleid in combinatie met het restrictieve antibioticabeleid in de (humane) gezondheidszorg. Sinds 1995 worden er in Nederland MRSA-infecties waargenomen die niet gerelateerd kunnen worden aan patiënten met de bekende risicofactoren zoals verblijf in een buitenlands ziekenhuis (1-3). Het betreft MRSA-typen die buiten het ziekenhuismilieu circuleren (zogenaamde *community acquired MRSA*). Recentelijk is gebleken dat een derde specifiek type voorkomt: de (aanvankelijk) niet typeerbare MRSA (NT-MRSA). Deze werd aanvankelijk alleen geassocieerd met varkenshouderij. Kort daarna bleek echter dat mensen die in contact komen met levende varkens en vleeskalveren een grotere kans hebben op het positief zijn voor NT-MRSA dan mensen die dat contact niet hebben (4). Sindsdien wordt (afhankelijk van het ziekenhuis) degene die intensief contact heeft met varkens en vleeskalveren bij opname in een ziekenhuis afgezonderd totdat gebleken is dat men negatief test op MRSA.

Het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) heeft in 2006 onderzoeksinstituten gevraagd om onderzoek te doen naar het voorkomen van MRSA bij dieren en de mogelijke kans op overdracht van deze bacterie naar mensen. Het onderzoek naar MRSA in stof wordt uitgevoerd door het Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS), een onderzoeksinstituut dat onder andere verbonden is met de faculteiten Diergeneeskunde en Geneeskunde van de Universiteit van Utrecht, de departementen Infectieziekten en Immunologie, en Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren van de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht.

### *Achtergrond*

Verschillende studies tonen aan dat transmissie van bacteriën plaats kan vinden via bioaerosolen in de lucht (5-8). Op deze manier kan luchtgerelateerde transmissie eveneens een rol spelen bij de transmissie van zoönotische bacteriën als MRSA. Tot op heden zijn slechts enkele

studies gedaan naar MRSA in stof en lucht. Deze studies zijn voornamelijk uitgevoerd in ziekenhuizen waarbij aanwijzingen worden gevonden dat MRSA recirculeert in lucht, met name na het opmaken van de bedden (9). In de landbouw en veehouderij is hiernaar nog nauwelijks onderzoek verricht. Wel tonen enkele onderzoeken aan dat de concentraties van antibioticaresistente organismen in het algemeen in varkensstallen hoger is dan erbuiten. Binnen een afstand van 150 m benedenwinds van een varkensstal zijn in buitenlandse studies hogere concentraties resistente micro-organismen gevonden dan bovenwinds (6, 8). Kwantificering van de concentratie MRSA in stof en in de lucht in varkens- en kalverstallen is nodig om de mogelijke rol van luchtgerelateerde transmissie van MRSA in kaart te brengen.

### *Doelstellingen*

De doelstelling van dit onderzoek is om inzicht te krijgen in de mogelijke transmissieroutes van MRSA via het milieu. Hierbij wordt zowel het stof als de lucht in de stallen onderzocht. Omgevingsmetingen kunnen wellicht in de toekomst als indicator voor de bedrijfsstatus gebruikt worden.

### *Onderzoeksvragen*

- Is MRSA detecteerbaar in stof uit varkens- en/of kalverstallen en op pluimveehouderijen?
- Is MRSA detecteerbaar in lucht binnen en buiten de varkens- en/of kalverstallen en pluimveehouderijen?
- Zijn stof en lucht potentiële transmissieroutes van MRSA in de veehouderij?
- Kunnen metingen aan MRSA in stof en lucht een indicatie geven voor de bedrijfsstatus?

## Materiaal en methoden

### *Opzet*

Metingen in stof zijn verricht op 102 vleeskalverhouderijen (deelproject 9, LNV-programma MRSA) en tevens op 20 pluimveehouderijen. Op alle bedrijven zijn 5 stofmonster genomen. Alle monsters zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van MRSA. Omdat op de kalverhouderijen ook dieren onderzocht zijn, konden deze uitslagen vergeleken worden met de uitslagen van de neusswabs van de kalveren van desbetreffend bedrijf. Op de pluimveehouderijen zijn geen dieren onderzocht. Voor de metingen aan MRSA in de lucht zijn in eerste instantie enkele series metingen verricht op MRSA-positieve varkenshouderijen (n=4) en kalverhouderijen (n=2), die tot doel hadden de methodiek te testen en te optimaliseren tot een definitief meetprotocol. Hierbij zijn metingen verricht met onder andere de Anderson Microbial Sampler (AMS) en BioSampler. Zowel in als buiten de stal zijn metingen verricht. Door middel van kweek en per-techniek is getracht aantallen CFU MRSA in de lucht te kwantificeren. Door meetproblemen is geen keuze voor een specifieke methode mogelijk gebleken en daarom zijn op een MRSA-positieve varkenshouderij

gedurende meerdere sessies metingen uitgevoerd met verschillende hieronder beschreven meettechnieken. In dit bedrijf zijn in een aantal gevallen op drie verschillende locaties in de stallen van dit bedrijf methoden parallel toegepast.

### **Stofdoeken**

Van ieder bedrijf werden vijf stofmonsters uit de stallen genomen. Dit werd onder andere gedaan om te inventariseren of in de toekomst in plaats van neusswabs van dieren een stofmonster toereikend is voor het vaststellen van de aanwezigheid van MRSA op een bedrijf. De stofmonsters werden verdeeld over het aantal aanwezige stallen genomen. Indien een bedrijf slechts over één stal beschikte werden alle vijf de stofmonsters uit deze stal genomen. Met een (steriel verpakt) vochtig veegdoekje (Sodibox, Raisio Diagnostics) werd over een met stof bedekte plaats in de stal geveegd, meestal de afscheidingsmuur/hek tussen twee hokken. De stofmonsters werden geanalyseerd op de aanwezigheid van MRSA. Hiervoor is een standaardprotocol ingezet. Vervolgens werd de aanwezigheid van de bacterie met behulp van aanvullende microbiologische en moleculaire onderzoekstechnieken vastgesteld. Het vaststellen van de aanwezigheid van de bacterie neemt circa vijf dagen in beslag.

### **Meting van luchtbelasting MRSA**

De luchtbelasting is met verschillende technieken in kaart gebracht; het gaat om meetmethoden die met verschillende luchtsnelheden en volgens verschillende principes deeltjes invangen. Hiervoor is gekozen omdat bekend is dat micro-organismen soms niet goed overleven tijdens de monsternamen door hoge luchtsnelheden, bounce op filters of tegen wanden van het monsternamenapparaat, of uitdroging op filters na lange monsternamenperioden, alle factoren die de overleving negatief kunnen beïnvloeden. De verschillende gebruikte methoden zijn hieronder in het kort beschreven.

### **Sedimentatie in combinatie met gebruik van selectieve platen**

Dit is een zeer klassiek, semi-kwantitatieve maar snelle manier om MRSA in de lucht aan te tonen. Een MRSA-selectieve agarplaat (Brilliance MRSA agar, Oxoid) is gedurende 6 uur blootgesteld aan de lucht in de stallen. Na incubatie overnacht bij 37°C is het aantal CFU geteld. Op deze selectieve platen groeien alleen antibioticaresistente micro-organismen. MRSA-kolonies kleuren blauw op deze agarplaten en kunnen derhalve gemakkelijk geteld worden. Omdat bij deze methode geen volume wordt aangezogen, kunnen resultaten niet als concentratie worden uitgedrukt maar per plaat of oppervlakte-eenheid.

### **Anderson Microbial Sampler**

De Andersen Sampler is een zogenaamde impactor met stages waar voedingsbodems in geplaatst kunnen worden. De Anderson Sampler is een ouder ontwerp meetapparaat

dat niet volgens de huidige standaard meet, maar nog veel gebruikt wordt voor microbiologisch onderzoek van de lucht. De oorspronkelijke sampler heeft 6 of 8 stages. Iedere stage heeft kleine gaatjes met afnemende diameter. Hierdoor neemt bij gelijkblijvend doorgezogen volume de snelheid in de gaatjes toe en door deze verschillende stages worden deeltjes naar grootte gescheiden. In deze studie is de versie met twee stages gebruikt. Hiermee worden inhaleerbare > 8 µm-deeltjes op de bovenste voedingsbodem opgevangen en de kleinere deeltjes van < 8 µm op de onderste voedingsbodem. Het voordeel van dit apparaat is dat voedingsbodems, ook selectieve media, direct in het apparaat kunnen worden geplaatst. De bovendetectiegrens ligt relatief laag zodat erg hoge concentraties niet kunnen worden gemeten of alleen bij zeer korte meetduur. Hoewel de meetduur kan worden verkort om de bovendetectiegrens te verlagen, is een meetduur korter dan een minuut onbetrouwbaar en geeft geen goed beeld van de heersende concentratie in de lucht. Voor deze methode wordt er 28,3 L/min (kubieke voet) lucht actief door de sampler geleid.

De metingen in de stallen zijn uitgevoerd met twee verschillende voedingsbodems. Een niet-selectieve TSA-plaat en een MRSA-selectieve plaat (MRSA Screen, Oxoid). Metingen zijn verricht in de stal met een duur van 2, 5, en 10 minuten. Buiten de stallen is op een afstand van 25 meter (benedenwinds) gemeten met een duur van 3, 5, 15 en 30 minuten. Na incubatie overnacht van de voedingsbodems bij 37°C worden de kolonies op de platen geteld en indien morfologisch verdacht, bevestigd met PCR.

### **BioSampler**

De BioSampler is een zogenaamde impinger en vangt de lucht en deeltjes op in een vloeistof. De vloeistof kan worden uitgeplaat in een verdunningsreeks waardoor geen probleem bestaat met een bovendetectiegrens. De BioSampler werd vooraf in het lab gevuld met 20 ml steriele PBS met 0,01% Tween 80 (20 µL) en 0,005% antifoam A (10 µL). In het veld wordt er 12,5 L/min aan lucht door de sampler geleid. Tijdens de metingen werd de BioSampler op een standaard geplaatst circa 1,50 m boven de grond. Metingen met de BioSampler zijn



A



B

Figuur A13.1 Anderson Microbial Sampler (A) en BioSampler (B)

uitgevoerd in de stallen met een duur van 30 minuten. Buiten de stallen is met de BioSampler niet gemeten. De metingen met de BioSampler zijn op twee verschillende manieren geanalyseerd. Als eerste zijn er van de vloeistof verdunningsreeksen gemaakt, die vervolgens op MRSA-selectieve platen zijn uitgestreken. Als tweede is er een kweek gemaakt van een deel van de vloeistof. Hiervoor is hetzelfde protocol gebruikt als voor de stofmonsters.

#### **Inhaleerbaar stof meting GSP-kop**

Met deze methode kan MRSA in de lucht kwantitatief aangetoond worden door middel van actieve luchtaanzuiging, gevolgd door kwantitatieve kweek of kwantitatieve PCR (qPCR). De opstelling bestaat uit een Gilair5 Air Sampler (Gilian), bevestigd aan een GSP-kop op 1,5 meter boven de grond. De GSP-kop kan met verschillende filtermembranen geladen worden. Er zijn twee soorten filtermembranen getest: gelatinefilters (Sartorius) en glasvezelfilters (Whatman GFA), beide met een diameter van 37 mm. Lucht werd met 3,5 L/min aangezogen gedurende 6 uur. Bij deze aanzuigingsnelheid worden door deze monsternemer deeltjes volgens de inhaleerbaarstofcurve bemonsterd. Inhaleerbaar stof is de fractie deeltjes die het ademhalingsorgaan van de mens kunnen penetreren. Grotere deeltjes worden niet ingeademd. Na monsternamen zijn stofbelaste filters geanalyseerd volgens de 'most probable number'-(MPN) kweekmethode en MRSA-specifieke qPCR (zie onder). Via de MPN-methode kan met verdunningen een nauwkeurige schatting gemaakt worden van het aantal levensvatbare MRSA-kiemen in een monster, terwijl met qPCR MRSA-DNA wordt aangetoond, ongeacht de levensvatbaarheid en via een ijklijn kan dit weer worden uitgedrukt in een aantal kiemen per m<sup>3</sup> lucht. Echter of de aangetoonde MRSA ook werkelijk in levende vorm aanwezig is moet middels validatiestudies worden aangetoond. Het principe van de MPN-methode is dat een monster stapsgewijs verdund wordt tot er geen MRSA-kiemen meer aanwezig zijn, waardoor de hoeveelheid MRSA in het originele monster bepaald kan worden. De aanwezigheid van MRSA wordt via kweek volgens standaardprotocol bepaald.

#### **MRSA ST398 specifieke kwantitatieve real-time PCR (qPCR)**

Buiten het bestek van dit project is een MRSA ST398 specifieke real-time PCR (qPCR) ontwikkeld. Deze qPCR is momenteel beschikbaar, maar wordt nog geoptimaliseerd en is op dit moment nog experimenteel. Om te kunnen bepalen wat het risico is van MRSA-besmetting, is het van belang om te kunnen kwantificeren hoeveel MRSA aanwezig is in omgevingsmonsters. Om dit te kunnen monitoren is deze kwantitatieve real-time PCR opgezet. Met deze methode kan direct de exacte hoeveelheid MRSA in omgevingsmonsters bepaald worden. Met kweek duurt dit vijf dagen. Van belang is dat de real-time PCR in een monster tegelijk *S. aureus* en het *MecA*-gen detecteert, omdat

in de monsters ook coagulase-negatieve stafylokokken aanwezig kunnen zijn die een *MecA*-gen bevatten. Daarnaast moet de real-time assay in staat zijn om alle SCC*mec*-typen (voornamelijk SCC*mec*-typen IV en V) aan te tonen die voorkomen in MRSA-stammen, aanwezig in de dierhouderij. Kolonisatie van varkens is primair geassocieerd met MRSA MLST Sequence Type (ST) 398, die behoren tot SCC*mec* type IV en V, maar recent zijn ook MRSA-stammen met een ander MLST ST en SCC*mec*-type beschreven.

Er zijn geen commerciële testen beschikbaar die garanderen dat ze alle SCC*mec*-typen detecteren. In deze studie is gekozen voor primers die beschreven zijn door Huletsky et al., (10); deze assay maakt gebruik van 1 specifieke oligo gericht tegen het OrfX en 4 oligo's gericht tegen 4 verschillende SCC*mec*-sequenties. Daarnaast is een primer set toegevoegd, welke een specifieke sequentie van MRSA ST398-stammen amplificeert. Dit fragment is geïdentificeerd met behulp van high-throughput AFLP (11) en door Van Wamel ontwikkeld voor PCR-detectie van ST398 (submitted). De DNA-sequentie van deze sequentie is verkregen uit de genomanalyse van ST398 via een ander onderdeel van het MRSA-onderzoeksprogramma. Op basis van deze sequentie is een probe ontwikkeld. De MRSA qPCR assay is uitgevoerd met FAM-gelabelde probes op de LightCycler 1.5 (Roche).

De analytische gevoeligheid voor detectie van gekweekte MRSA ST398, is bepaald met 1tienvoudige verdunningsreeksen van MRSA CFU's (in viervoud). De detectiegrens werd vastgesteld op 4 CFU equivalent/ml. Met chromosomaal DNA ligt de grens tussen 5 en 50 fg/ul.

## **Resultaten**

#### **Stofdoeken**

Om te inventariseren of met behulp van stofmonsters eveneens de bedrijfsstatus MRSA vastgesteld kan worden, zijn van ieder bedrijf 5 stofmonsters uit de kalverstallen genomen. In totaal werden 500 stofmonsters genomen. Op 80 bedrijven werd MRSA aangetroffen in een of meerdere stofmonsters. Eveneens werden op 80 bedrijven bij een of meerdere kalveren MRSA gevonden. Desbetreffende bedrijven kwamen echter niet geheel overeen. Op 6 bedrijven werden MRSA-positieve kalveren gevonden, terwijl er geen MRSA in het stalstof werd aangetroffen. Op 10 bedrijven werd MRSA in het stalstof aangetroffen terwijl alle onderzochte kalveren MRSA-negatief bleken te zijn. In de 100 monsters afkomstig van de 20 pluimveehouderijen werd geen MRSA gevonden.

#### **Selectieve platen**

Op de selectieve agarplaten werden tussen de 3 en 75 CFU MRSA geteld, met een gemiddeld aantal van 36 CFU MRSA. Dit komt neer op 529 tot 13224 CFU MRSA per m<sup>2</sup> met een gemiddelde van 6347 CFU MRSA per m<sup>2</sup>.

*Anderson Microbial Sampler*

De metingen in de bedrijven laten zien dat MRSA aantoonbaar is in de lucht in de stallen. Gevonden concentraties variëren tussen de 0 en  $1,6 \cdot 10^4$  MRSA-kiemen per  $m^3$  lucht in varkensstallen. Echter, deze vastgestelde concentraties zijn gebaseerd op slechts enkele detecteerbare kiemen op de plaat. Door het hoge doorgezogen volume resulteert dit door vermenigvuldigingen tot deze hoge kientallen uitgedrukt per  $m^3$  lucht. De variatie over de dag is beperkt, maar er blijken wel significante verschillen in gevonden concentratie voor te komen tussen bedrijven. Er is geen duidelijk inzicht in de oorzaken van de verschillen tussen de bedrijven. Niveaus in kalverhouderijen zijn een grootteorde (factor 10) lager. Bij de bemeten bedrijven is ook in de buitenlucht gemeten, op 25 meter afstand. Incidenteel werd MRSA in de lucht vastgesteld, de concentratie was laag, in de regel  $<100$  kiemen per  $m^3$ .

*BioSampler*

Met de BioSampler werden zowel met behulp van de verdunningsreeks als met de kweekmethode geen MRSA-kolonies gevonden.

*GSP-kop met Gilair5 Air Sampler*

Ook met de actieve luchtmetingen met de Gilair5 Air Sampler kon de aanwezigheid van MRSA in de lucht van varkensstallen worden aangetoond.

Met de MPN-kweekmethode werden gemiddeld 10 tot 1000 CFU MRSA per filter gevonden, 8 tot 800 CFU MRSA per  $m^3$  lucht. Er zijn te weinig resultaten van de qPCR (methode nog in ontwikkeling), maar de aantallen liggen op 1200 tot 3600 CFU MRSA per filter, omgerekend 1000 tot 2900 CFU MRSA per  $m^3$  lucht. De hoeveelheid MRSA verschilt per methode van bemonstering. Het is moeilijk de verschillende methoden direct te vergelijken, maar de hoeveelheid MRSA gevonden met de selectieve agarplaten en met actieve luchtmetingen gevolgd door qPCR, is vaak een factor 10 tot 100 hoger dan de hoeveelheid MRSA gevonden met actieve luchtmetingen gevolgd door kweek volgens MPN. Dit lijkt er op te wijzen dat actieve luchtmeting op deze manier de levensvatbaarheid van MRSA vermindert.

**Discussie***Stof*

De stofdoeken lijken goed te correleren met de metingen bij de kalveren op desbetreffend bedrijf. Echter, niet op alle bedrijven werd MRSA in het stof en in de kalveren aangetoond. Deze observatie laat zien dat zowel metingen in alleen stof als metingen in alleen dieren de bedrijfstatus mogelijk kunnen onderschatten.

MRSA werd niet aangetoond in de stofmonsters afkomstig uit de pluimveehouderij. Het is mogelijk dat in vergelijking met de varkens- en kalverhouderij MRSA in veel mindere mate voorkomt op pluimveehouderijen. Gezien het feit dat er geen MRSA-positieve

pluimveehouderijen zijn gevonden, zijn er geen luchtmetingen verricht op pluimveebedrijven.

*Luchtmetingen*

MRSA is meetbaar in lucht binnen de stallen. Het kwantificeren van aantallen CFU MRSA per  $m^3$  lucht blijkt echter moeilijk. Sedimentatie met de selectieve agarplaatmethode is een snelle en arbeidsextensieve methode om MRSA-verspreiding door de lucht aan te tonen. Omdat er geen gedefinieerd luchtvolume wordt gemeten is dit een semikwantitatieve methode om een indicatie te krijgen van de hoeveelheid MRSA in de lucht. Deze metingen kunnen ook met niet-selectieve agars gedaan worden. In omgevingen met veel microbiële stoorflora (zoals varkens- en kalverstallen) is het gebruik van een MRSA-specifieke agar echter aan te raden om te voorkomen dat de MRSA overgroeit raakt.

De Anderson Microbial Sampler laat een grote variatie aan CFU in de lucht zien. Zowel binnen als tussen de bedrijven zijn grote verschillen waarneembaar en het absolute aantal kiemen op de plaat is beperkt. Dit is opvallend en duidt op hoge sterfte van micro-organismen omdat de sedimentatiemetingen met de open plaat grote aantallen kiemen laten zien. Er is geen duidelijk inzicht in de oorzaken van deze verschillen. Mogelijk heeft de hoge snelheid in de Anderson Sampler, maar ook in de andere apparaten zoals de BioSampler, een negatieve invloed op de levensvatbaarheid van de bacterie waardoor lage concentraties levensvatbare bacteriën gemeten worden. Doordat bij de BioSampler gebruikgemaakt kan worden van verdunningsreeksen heeft deze methode geen problemen met een bovendetiegrens. Wel kunnen hele lage concentraties moeilijk detecteerbaar zijn. In combinatie met de mogelijke effecten van hoge snelheid in de sampler op de MRSA-bacterie lijkt deze methode niet geschikt voor metingen van MRSA in lucht. Luchtmetingen met de Gilair5 Air Sampler met GSP-kop kunnen in combinatie met glasvezelfilter en gelatinefilter toegepast worden om MRSA in de lucht aan te tonen. Omdat er een gedefinieerd luchtvolume wordt aangezogen, kan de hoeveelheid MRSA in de lucht met behulp van de MPN-methode en/of qPCR op een kwantitatieve manier bepaald worden. De levensvatbaarheid van de MRSA-kiemen lijkt echter negatief beïnvloed te worden tijdens de luchtmeting.

**Aanbevelingen en conclusie**

Zowel in stof als in lucht in varkens- en kalverstallen is MRSA gevonden. Deze bevindingen tonen aan dat zowel lucht als stof potentiële transmissieroutes kunnen zijn voor MRSA.

De toegepaste technieken om MRSA in de lucht te meten blijken niet alle toereikend voor een betrouwbare meting. Vanwege de negatieve invloeden op de bacteriën, veroorzaakt door de specifieke eigenschappen van de Anderson en BioSampler, lijken deze methoden ongeschikt voor metingen aan MRSA in lucht in de

veehouderij. Door de lagere luchtsnelheden in de Gilair5 Air Sampler met GSP-kop lijken deze metingen minder invloed te hebben op de levensvatbaarheid van MRSA. Deze methode in combinatie met glasvezelfilters heeft dan ook de voorkeur voor kwantitatieve metingen aan MRSA in de lucht. Ook de sedimentatie met de selectieve-garplaatmethode is een betrouwbare, goedkope en snelle manier om MRSA in lucht aan te tonen. Een belangrijk nadeel aan deze methode is dat deze semikwantitatief is. Het gezondheidsrisico van MRSA wordt voornamelijk bepaald door levende (infectieuze) kiemen. Om deze reden is het van groot belang om een goede indicatie te krijgen van de hoeveelheid levende MRSA. Een kwantitatieve luchtmetingsmethode zonder of met een lage MRSA-afdoening is hiervoor onontbeerlijk. Vervolgonderzoek is noodzakelijk om de methode van luchtmetingen te optimaliseren waarbij het effect op de levensvatbaarheid duidelijk in kaart moet worden gebracht. Tevens dient de kwantificering van aantallen CFU/m<sup>3</sup> MRSA in lucht al dan niet met behulp van qPCR verder te worden ontwikkeld. Inzicht in de precieze MRSA load in de lucht is zeer waardevol omdat dit aanknopingspunten kan bieden voor vervolgonderzoek. Hierbij kan gedacht worden aan het meten van de effecten van interventies welke een stap kunnen zijn naar beheersing van MRSA in de veehouderij.

### Gerelateerde projecten

Geen.

### Output

Geen.

### Literatuur

- De Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen-Verheuevel MG, Dam-Deisz WD, Boshuizen HC, et al. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol.* 2007 Jun 21;122(3-4):366-72.
- Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuevel MG, Heck ME, Pluister GN, et al. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006;5:26.
- Van Duijkeren E, Box AT, Heck ME, Wannet WJ, Fluit AC. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Vet Microbiol.* 2004 Oct 5;103(1-2):91-7.
- Van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, de Neeling A, van de Sande-Bruinsma N, Beaujean D, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis.* 2007 Dec;13(12):1834-9.
- Gandara A, Mota LC, Flores C, Perez HR, Green CF, Gibbs SG. Isolation of *Staphylococcus aureus* and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* from residential indoor bioaerosols. *Environ Health Perspect.* 2006 Dec;114(12):1859-64.
- Gibbs SG, Green CF, Tarwater PM, Mota LC, Mena KD, Scarpino PV. Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confined or concentrated animal feeding operation. *Environ Health Perspect.* 2006 Jul;114(7):1032-7.
- Gibbs SG, Green CF, Tarwater PM, Scarpino PV. Airborne antibiotic resistant and nonresistant bacteria and fungi recovered from two swine herd confined animal feeding operations. *J Occup Environ Hyg.* 2004 Nov;1(11):699-706.
- Green CF, Gibbs SG, Tarwater PM, Mota LC, Scarpino PV. Bacterial plume emanating from the air surrounding swine confinement operations. *J Occup Environ Hyg.* 2006 Jan;3(1):9-15.
- Shiomori T, Miyamoto H, Makishima K, Yoshida M, Fujiyoshi T, Udaka T, et al. Evaluation of bedmaking-related airborne and surface methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination. *J Hosp Infect.* 2002 Jan;50(1):30-5.
- Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, Gagnon F, Truchon K, Bastien M, Picard FJ, van Belkum A, Ouellette M, Roy PH, Bergeron MG. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2004 May;42(5):1875-84.
- Melles DC, van Leeuwen WB, Snijders SV, Horst-Kreft D, Peeters JK, Verbrugh HA, van Belkum A. Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods.* 2007 May;69(2):371-5. Epub 2007 Feb 3.



## APPENDIX 14

### Project 15: MRSA in dierlijke producten

#### Projectleider

E. de Boer: VWA, Regio Oost, Zutphen.

#### Projectteam

E. de Boer, J.T.M. Zwartkruis-Nahuis, B. Wit, R.A.A. van Oosterom en A.E. Heuvelink: VWA.

X.W. Huijsdens, T. Bosch en A.J. de Neeling: Cib-RIVM.

#### Samenwerking

Ontwikkeling van de analysemethode, monsternamen en uitvoering van de monsteranalyse vond plaats bij VWA regio Oost. Subtypering van MRSA-isolaten werd uitgevoerd door RIVM-LIS.

#### Samenvatting

Doel van het onderzoek was de bepaling van de prevalentie van MRSA in monsters onverhit vlees, zoals aangeboden aan de consument. Monsters onverhit rundvlees, kalfsvlees, varkensvlees, lams- en schapenvlees, kip, kalkoen, overig gevogelte en wild werden gedurende een jaar genomen in de detailhandel. De monsters werden onderzocht op de aanwezigheid van MRSA met behulp van een detectiemethode bestaande uit voorophoping in Mueller-Hinton Bouillon + 6,5% NaCl, gevolgd door selectieve ophoping in Phenolred Mannitol Bouillon + ceftizoxim/aztreonam en isolatie op MRSA-ID agar. MRSA werd geïsoleerd uit 264 (11,9%) van 2217 onderzochte vleesmonsters. De prevalentiecijfers voor de verschillende vleessoorten waren: rundvlees (10,6%), kalfsvlees (15,2%), lams- en schapenvlees (6,2%), varkensvlees (10,7%), kip (16,0%), kalkoen (35,3%), overig gevogelte (3,4%) en wild (2,2%). Bij tellingen van MRSA in 75 MRSA-positieve monsters bleek het MRSA-kiemgetal in alle gevallen kleiner dan 10 kve/g vlees. De uit de verschillende vleessoorten geïsoleerde MRSA-stammen behoorden grotendeels (87%) tot *spa*-typen van non-typable (NT)-MRSA, met name multilocus sequence type ST398, zoals die recent in Nederland ook bij varkens en andere landbouwhuisdieren werden gevonden. Ook ST9 gevonden in pluimveemonsters blijkt een LA-MRSA. Een niet te verwaarlozen gedeelte (13%) van de stammen waarop *spa*-typering is uitgevoerd, behoorde tot *spa*-typen die tot nu toe niet diergerelateerd lijken en mogelijk van humane herkomst zijn. Vervolgonderzoek is noodzakelijk om de transmissieroutes van MRSA in relatie tot vlees en andere voedingsmiddelen op te helderen en daarmee de mogelijkheden tot interventie in de ketens na te gaan. Momenteel zijn er geen aanwijzingen dat de aanwezigheid van MRSA op eindproducten een belangrijk risico voor de volksgezondheid oplevert. Uitvoering van een

uitgebreidere risicobeoordeling is echter noodzakelijk om hierover meer zekerheid te verkrijgen.

#### Summary

The aim of this study was to estimate the prevalence of MRSA in raw meat samples from the retail trade. Samples of raw beef, pork, veal, lamb/mutton, chicken, turkey, fowl and game were collected from the retail trade.

A detection method including a two-step enrichment in Mueller-Hinton broth + 6.5% NaCl and phenol red mannitol broth containing ceftizoxime and aztreonam, followed by isolation on MRSA ID agar (bioMérieux) was evaluated and subsequently applied for the detection of MRSA in samples of raw meats.

MRSA strains were isolated from 264 (11.9%) of 2217 samples analyzed. Isolation percentages for the meat species were: beef (10.6%), veal (15.2%), lamb and mutton (6.2%), pork (10.7%), chicken (16.0%), turkey (35.3%), fowl (3.4%) and game (2.2%). The majority (85%) of the isolated strains belonged to *spa*-types of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) non-typeable (NT)-MRSA, corresponding to the multilocus sequence type ST398, a type also recently isolated in the Netherlands from pigs. However, a smaller part of these strains were found to be of other STs, possibly of human origin.

Further studies are needed to elucidate transmission routes of MRSA in relation to meat and other foods and to provide the tools for preventing the spread of MRSA. At present the high prevalence of MRSA in meat has not been shown to contribute significantly to the dissemination of MRSA to humans and the possible health hazard for consumers of the presence of MRSA in foods should be further elucidated.

#### Inleiding

*Staphylococcus aureus* is vaak aanwezig in de neus, op de huid of in de keel van gezonde mensen en dieren. *S. aureus* kan klinische infecties van uiteenlopende aard veroorzaken, zoals pneumonie, wondinfecties en bacteremie. Door de productie van enterotoxinen in voedingsmiddelen kan dit organisme tevens voedselvergiftigingen veroorzaken. *Staphylococcus*-isolaten zijn regelmatig resistent voor bèta-lactam-antibiotica en de aanwezigheid van het *mecA*-gen op het chromosoom van een *S. aureus*-stam zorgt ervoor dat deze een Meticilline Resistente *Staphylococcus Aureus* (MRSA) is.

MRSA is een belangrijke en toenemende veroorzaker van ziekenhuisinfecties (Tiemersma et al., 2004) en in Nederland is er een strikt 'search and destroy'-beleid in

de humane gezondheidszorg, waardoor de prevalentie van MRSA bij de mens in Nederland erg laag is. Naast ziekenhuisinfecties door MRSA worden infecties door ‘community acquired’ (CA) MRSA in toenemende mate waargenomen (Witte et al., 2004).

Recent zijn MRSA-stammen gevonden bij varkens en varkenshouders en bij diverse andere landbouwhuisdieren (De Neeling et al., 2007; Huijsdens et al., 2006; Lee, 2006). Deze MRSA-isolaten bleken meestal niet typeerbaar met Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) en worden daarom wel NT-MRSA (‘non-typable’ MRSA) genoemd. Vlees kan in de verschillende stadia van het verwerkingsproces besmet worden met MRSA. Tijdens het slachtproces kan besmetting van karkassen en vlees optreden door MRSA van het slachtdier, vanuit de slachtomgeving of door bij het slachtproces betrokken personen. Vlees kan bij verdere verwerking eveneens worden gecontamineerd met MRSA vanuit het milieu, door medewerkers en door kruiscontaminatie. Onafhankelijk van de relatieve bijdrage van de verschillende transmissieroutes is in dit deelproject van het brede LNV-MRSA-programma, de prevalentie van MRSA in monsters vlees, wild en gevogelte afkomstig uit de detailhandel bepaald als indicatie voor de blootstelling van consumenten aan MRSA via deze producten.

## Materiaal en methoden

### Monsters

In totaal 2217 monsters van onverhit vlees werden genomen in de detailhandel (supermarkten, slaggers, poeliers, et cetera), verspreid over het hele land. De bemonstering vond plaats in de periode juni 2007 t/m mei 2008.

De volgende vleessoorten werden bemonsterd:

Varkensvlees:	varkensgehakt, -poulet, -nasivlees, satévlees, lappen
Rundvlees:	rundergehakt, -tartaar, -poulet, -soepvlees, gehakte biefstuk
Kalfsvlees:	kalfsgehakt, -poulet, kalflapjes/-schnittzels
Lams- en schapenvlees:	lamsgehakt, lams-/schapenpoulet, saté of -kebabvlees, lappen
Kip:	rauwe, niet gemarineerde kip (delen); tevens diepgevroren filets (import)
Kalkoen:	rauwe, niet gemarineerde kalkoen (delen)
Overig gevogelte:	eend, fazant, parelhoen, patrijs, duif et cetera
Wild:	haas, konijn, zwijn, ree, hert et cetera

Onder ‘vlees’ wordt verstaan: vers vlees, gehakt vlees en vleesbereidingen overeenkomstig de definities in de regelgeving.

### Microbiologisch onderzoek

De monsters werden gekoeld vervoerd, na aankomst op het laboratorium gekoeld bewaard (0-2°C) en binnen 48 uur na bemonstering in onderzoek genomen.

De monsters werden onderzocht op de aanwezigheid van MRSA met behulp van een detectiemethode bestaande uit voorophoping van 25 g monster in Mueller-Hinton Bouillon + 6,5% NaCl, gevolgd door selectieve ophoping in Phenolred Mannitol Bouillon + ceftizoxim/aztreonam. Isolatie vond plaats op MRSA-ID-agar (bioMérieux). Met de Staphylect Plus latex agglutinatie-test werden de clumping factor, Protein A van *S. aureus* en bepaalde polysacchariden die gevonden zijn bij meticillineresistente *S. aureus* gedetecteerd. Bevestiging vond plaats met behulp van een PCR-reactie, waarbij in-vitroamplificatie van een specifiek DNA-fragment, in dit geval het *S. aureus*-gen en het *mecA*-gen, werd uitgevoerd.

Bij gebruik van deze methode bleek de detectielimiet voor MRSA in gehakt in de range 12-15 kve/25 g te liggen. De geïsoleerde MRSA-stammen werden getypeerd bij het RIVM door middel van *spa*-typering.

Van totaal 75 monsters verdeeld over de vleessoorten, die bij toepassing van de detectiemethode positief voor MRSA bleken te zijn, werd na gekoelde bewaring gedurende maximaal 1 week, een telling van MRSA ingezet door 1 ml van een 1:10 suspensie van het monster (20-25 g) uit te spatelen over een drietal MRSA-ID-platen.

## Resultaten

De resultaten van het prevalentieonderzoek in 2217 monsters zijn samengevat in Tabel A14.1. In de laatste kolom van deze tabel is het percentage van de stammen met *spa*-typen behorend tot het multilocus sequence type (ST) 398 weergegeven.

Van 75 monsters vlees, waarbij eerder MRSA was gedetecteerd, werd een kwantitatieve bepaling van MRSA uitgevoerd, waarbij in alle monsters een MRSA-kiemgetal van <10 kve/g werd gevonden.

Een gedetailleerd overzicht van de typeringsresultaten is te vinden in De Boer et al. (2009).

## Discussie

De resultaten van dit onderzoek laten zien dat MRSA in zeer lage aantallen (< 10 kve/g) algemeen voorkomt in vlees van diverse landbouwhuisdieren en in vlees van wild en gevogelte. De hoogste prevalenties werden gevonden bij kalkoen- en kipvlees. Op roodvlees werd de hoogste prevalentie vastgesteld bij kalfsvlees.

De in dit onderzoek gevonden prevalenties van MRSA liggen duidelijk hoger dan die gevonden in andere gepubliceerde onderzoeken met betrekking tot MRSA in voedingsmiddelen (Kitai et al., 2005; Normanno et al., 2007; Van Loo et al., 2007). Een belangrijke verklaring hiervoor is in ieder geval de gebruikte methodiek.

In de eerder gepubliceerde onderzoeken werden uit voedingsmiddelen geïsoleerde *S. aureus*-isolaten getest op de aanwezigheid van het *mecA*-gen, terwijl in het hier beschreven onderzoek specifiek MRSA in de producten

Tabel A14.1 MRSA in vlees

vleessoort	n	aantal (%) positief	% ST398
rund	395	42 (10,6)	60
kalf	257	39 (15,2)	95
varken	309	33 (10,7)	97
lam/schaap	324	20 (6,2)	78
kip	totaal	520	83 (16,0)
	NL + andere EU landen	302	75 (24,8)
	Import uit derde landen	162	2 (1,2)
	'biologisch'	56	6 (10,7)
kalkoen	116	41 (35,3)	93
overig gevogelte	118	4 (3,4)	75
wild	178	4 (2,2)	0
<b>Totaal</b>	<b>2217</b>	<b>264 (11,9)</b>	<b>85</b>

werd aangetoond.

De MRSA-positieve monsters waren voor het overgrote deel van Nederlandse herkomst. Het besmettingspercentage van vlees uit andere EU-lidstaten lag echter in dezelfde orde van grootte. Voor een deel van de monsters bestond onzekerheid over de precieze herkomst of was het aantal monsters binnen een categorie te beperkt, zodat geen statistisch verantwoorde conclusies kunnen worden getrokken. Opfok, slacht en uitsnijden vinden daarbij niet altijd plaats in dezelfde EU-lidstaat. Kipproducten, geïmporteerd als diepgevroren filets uit Zuid-Amerika bleken slechts incidenteel besmet met MRSA. Het is nog niet duidelijk of dit een diepvrieseffect is of dat de MRSA-besmetting van kipvlees in bijvoorbeeld Zuid-Amerika, in het algemeen lager is dan in Nederland of dat kiemreducerende maatregelen hieraan hebben bijgedragen.

De relatief lage prevalentie van MRSA in vlees van 'biologisch'-gefoekte kippen, overig gevogelte en wild ten opzichte van de hoge besmettingspercentages gevonden bij vlees van kalkoenen, regulier gefoekte kippen en kalveren, kunnen een verband indiceren tussen het gebruik van antibiotica bij de opfok en de verspreiding van MRSA bij landbouwhuisdieren.

De uit de verschillende vleessoorten geïsoleerde MRSA-stammen behoorden grotendeels (85%) tot *spa*-typen van NT-MRSA zoals die recent in Nederland ook bij, onder andere, varkens werden gevonden (De Neeling et al., 2007). In pluimveeproducten komt een ander diergerelateerd type voor: ST9.

Een niet te verwaarlozen gedeelte (13%) van de stammen waarop *spa*-typering is uitgevoerd, behoorde tot *spa*-typen die tot nu toe niet diergerelateerd lijken en mogelijk van humane herkomst zijn. Een nadere analyse van de gevonden typen en de bijbehorende resistentiepatronen, in relatie tot het soort vlees en de herkomst, zal nog worden uitgevoerd.

Hoewel recent onderzoek naar MRSA bij dieren zich in Nederland vooral heeft gericht op varkens (De Neeling et al., 2007; Huijsdens et al., 2006; Van Duijkeren et al., 2008) maken de resultaten van dit productonderzoek duidelijk dat het niet om een specifieke varkensproblematiek gaat, maar dat andere (landbouwhuis)dieren eveneens een mogelijk significante bron van MRSA kunnen vormen.

De aanwezigheid van MRSA op vlees kan, bij onvoldoende hygiënische behandeling van het vlees, leiden tot transmissie van MRSA naar de mens, met mogelijk kolonisering van neusholte, huid en darmen. Ondanks de hoge prevalentie van MRSA op rauw vlees zijn er tot nu toe geen aanwijzingen dat dit geleid heeft tot belangrijke verspreiding bij de mens. Een mogelijke verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat de aantallen MRSA gevonden op vlees zeer laag zijn. Eveneens door deze lage aantallen en het gegeven dat *S. aureus* competitief de mindere is van aanwezige bederfflora, is de kans klein dat MRSA in vlees uit zal groeien tot hoge aantallen.

Enkele gevallen zijn beschreven waarbij mensen ziek werden na de consumptie van met MRSA besmet voedsel (Jones et al., 2002; Kluytmans et al., 1995). Bij deze gevallen waren de MRSA-stammen vermoedelijk afkomstig van voedselbereiders. Bij onjuist bewaren en bereiden kunnen, ook bij overigens gezonde personen, voedselvergiftigingen optreden. Maatregelen om de MRSA-besmetting van voedingsmiddelen en vervolgens uitgroei van deze organismen te voorkomen, zijn dan ook niet anders dan de maatregelen die voor *S. aureus* in het algemeen en andere pathogenen gelden.

Momenteel wordt verondersteld dat de aanwezigheid van MRSA op eindproducten geen belangrijk risico voor de volksgezondheid oplevert (BuR, 2008; EFSA, 2009). Uitvoering van een uitgebreidere risicoschatting is echter van belang om hierover meer zekerheid te verkrijgen.

## Aanbevelingen

Doel van het onderzoek was in de eerste plaats het bepalen van de besmettingsgraad van dierlijke producten als indicatie voor de blootstelling van consumenten aan MRSA via deze producten. De relatieve bijdrage aan de besmetting van producten door bijvoorbeeld bezoedeling van karkassen, vanuit de omgeving of via dragerschap bij verwerkers van producten, moet nader worden onderzocht om vast te stellen op welke plaatsen in de ketens effectief kan worden geïntervenieerd. Een vergelijking van de typeringsresultaten en resistentiepatronen van MRSA-bacteriën in de diverse schakels van ketens kan hieraan een bijdrage leveren.

Momenteel zijn er geen aanwijzingen dat de aanwezigheid van MRSA op eindproducten een belangrijk risico voor de volksgezondheid oplevert. Uitvoering van een uitgebreidere risicobeoordeling hieromtrent is echter noodzakelijk om hierover meer zekerheid te verkrijgen.

## Gerelateerde projecten

Bij de uitvoering van dit deelproject werd niet met andere (deel)projecten op het gebied van MRSA samengewerkt.

## Output

De Boer, E. J.T.M. Zwartkruis-Nahuis, B. Wit, A.E. Heuvelink. Prevalentie MRSA in vlees, jaar 2007. Factsheet VWA, januari 2008 ([www.vwa.nl](http://www.vwa.nl)).

De Boer, E., J.T.M. Zwartkruis-Nahuis, B. Wit, X.W. Huijsdens, A.J. de Neeling, T. Bosch, R.A.A. van Oosterom, A. Vila and A.E. Heuvelink (2009). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.007.

De Boer, E. A. Zwartkruis, B. Wit, X. Huijsdens, H. de Neeling and A. Heuvelink. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in raw meat. Lezing tijdens Food Micro 2008, 1-4 September 2008, Aberdeen, Scotland.

## Literatuur

1. Bureau Risicobeoordeling VWA. 2008. Advies van de directeur Bureau Risicobeoordeling aan de minister van LNV en de minister van VWS inzake MRSA op levensmiddelen van dierlijke oorsprong. Voedsel en Waren Autoriteit ([www.vwa.nl](http://www.vwa.nl)).
2. De Neeling, A.J., van den Broek, M.J.M., Spalburg, E.C., van Santen-Verheuvél, M.G., Dam-Deisz, W.D.C., Boshuizen, H.C., van de Giessen, A.W., van Duijkeren, E., Huijsdens, X.W. 2007. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary Microbiology* 122, 366-372.
3. European Food Safety Authority. 2009. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *The EFSA Journal* 993, 1-73.
4. Huijsdens, X.W., van Dijke, B.J., Spalburg, E., van Santen-Verheuvél, M.G., Heck, M.E.O.C., Pluister, G.N., Voss, A., Wannet, W.J.B., de Neeling, A.J. 2006. Community-acquired MRSA and pig farming. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 5, 26.
5. Jones, T.F., Kellum, M.E., Porter, S.S., Bell, M., Schaffner, W. 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Disease* 8, 82-84.
6. Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Uji, T., Kitagawa, H. 2005. Characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. *Journal of Veterinary Medicine* 67, 107-110.
7. Kluytmans, J., van Leeuwen, W., Goessens, W., Hollis, R., Meser, S., Herwald, L., Bruining, H., Heck, M., Rost, J., van Leeuwen, N., van Belkum, A., Verbrugh, H. 1995. Food-initiated outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by phenol- and genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 1121-1128.
8. Lee, J.H. 2006. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. *Veterinary Microbiology* 113, 137-141.
9. Normanno, G., Corrente, M., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Parisi, A., Greco, G., Bellacicco, A.L., Virgilio, S., Celano, G.V. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 117, 219-222.
10. Tiemersma, E.W., Bronzwaer, S.L., Lyytikäinen, O., Degener, J.E., Schrijnemakers, P., Bruinsma, N., Monen, J., Witte, W., Grundman, H. 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerging Infectious Disease* 10, 627-1634.
11. 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. 2008. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Veterinary Microbiology* 126, 383-389.
12. Van Loo, I.H.M., Diederén, B.M.W., Savelkoul, P.H.M., Woudenberg, J.H.C., Roosendaal, R., van Belkum, A., Lemmens-den Toom, N., Verhulst, C., van Keulen, P.H.J., Kluytmans, J.A.J.W. 2007. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. *Emerging Infectious Disease* 13, 1753-1755.
13. Witte, W., Cuny, C., Strommenger, B., Bräulke, C., Heuck, D. 2004. Emergence of community-acquired MRSA in Germany. *European Surveillance* 9, 16-18.



