



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap

Förekomst av meticillinresistenta
Staphylococcus spp. i
djursjukhusmiljö

Camilla Gustafsson

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:32

SLU
Sveriges Lantbruksuniversitet

Förekomst av meticillinresistenta
Staphylococcus spp. i
djursjukhusmiljö

Camilla Gustafsson

*Handledare: Gunilla Trowald-Wigh, Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap*

Biträdande handledare: Lise-Lotte Fernström, Laboratorieassistent, SLU

Biträdande handledare: Annika Granström, Klinikveterinär

Universitetsdjursjukhuset Uppsala

*Biträdande handledare: Ulrika Grönlund Andersson, Enhet för djurhälsa och
antibiotikafrågor, SVA*

*Examinator: Märit Pringle, Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Kurskod: EX0234, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: Meticillin, resistens, Staphylococcus spp, djursjukhus, hygien, antibiotika

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>

ISSN 1652-8697

Examensarbete 2010:32

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Tack	1
Sammanfattning	2
Summary	2
Inledning	4
Bakgrund	4
Stafylokocker	4
Meticillinresistenta <i>S. aureus</i> (MRSA) hos människa i Sverige och i världen	5
MRSA hos djur	6
Meticillinresistenta <i>S. pseudintermedius</i> (MRSP)	7
Nosokomial smitta	7
Zoonotisk risk	8
Provtagning och odling från miljön	8
Syfte	9
Material och metod	10
Provtagning	10
Pilotstudier	10
Salthalt	10
Spädningsförsök	11
Diagnostik	11
Anrikning	11
Odling	11
Konfirmering	12
MRS-detektion	12
Polymerase Chain Reaction (PCR)	13
Kontaminering av miljöbakterier	14
Resultat	15
Pilotstudier	15
Salthalt	15
Spädningsförsök	15
Kontaminering miljöbakterier	15
Förekomst av stafylokocker i djursjukhusmiljö	15
Förekomst av meticillinresistenta stafylokocker i djursjukhusmiljö	16
Förekomst av specifika riskplatser	17
Diskussion	18
Provtagning och odling	18
Salthalt	19
Spädningsförsök	19
Förekomst av stafylokocker i djursjukhusmiljö	20
Förekomst av specifika riskplatser samt förslag till åtgärder	20
Slutsats	26
Begränsningar och felkällor	27
Provtagning och odling	27
Framtida studier	27
Litteraturförteckning	28

TACK

Först och främst vill jag tacka min helt fantastiska handledare, Gunilla Trowald-Wigh, för din alltid brinnande entusiasm. Det har varit ett stort nöje att genomföra den här studien tillsammans med dig och under den här tiden har du varit en fantastisk mentor.

Ett stort tack och en varm kram vill jag ge till Lise-Lotte Fernström. Jag kan inte ens börja beskriva vad jag hade gjort utan dig på laboratoriet. Din kunskap är enorm, för att inte tala om ditt underbara humör.

Ett tack också till Ulrika Grönlund Andersson för din fantastiska kompetens i området och för att du fick mig att känna mig viktig i London.

Jag vill också tacka Annika Granström och hygiengruppen på djursjukhuset för intresset för arbetet och för att ni lyssnat öppenjärtat till mina förslag.

Ett tack riktas också till alla på institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap för att ni välkomnat mig med humor, omtanke och öppna armar.

Sist men inte minst vill jag tacka alla fantastiska djursjukvårdare och veterinärer som stått ut med mig och alla mina konstiga provtagningar på djursjukhuset.

SAMMANFATTNING

Meticillinresistenta stafylokocker har blivit ett stort problem inom human- och djursjukvården. De orsakar vårdrelaterade infektioner med stort lidande och stora kostnader. En viktig fråga är hur stor roll miljön spelar i smittspridningen av dessa bakterier.

Syftet med studien var att ta fram en provtagnings- och odlingsmetod för att påvisa *Staphylococcus (S.) aureus* och *S. pseudintermedius* i miljöprover, att undersöka förekomsten av meticillinresistenta *S. aureus* (MRSA) och *S. pseudintermedius* (MRSP) i djursjukhusmiljö, att identifiera speciellt riskfyllda platser, föremål eller processer inom djursjukhuset som kan vara av betydelse vid smittspridning från miljön till patient samt att föreslå en åtgärdslista.

Femtiosex miljöprover togs från ett djursjukhus. Provtagningarna genomfördes framför allt som större samlingsprover och togs antingen från ytor som människans händer kommer i kontakt med (humana tagytor) eller från ytor som djur kommer i kontakt med (djurytor). Proverna togs med en bomullsduk (Sodibox) och odlades på nötblodagar och MAST-platta efter anrikning i Mueller-Hinton och Tryptone Soya Broth. I anrikningen tillsattes cefoxitin, aztreonam och 6,5% NaCl.

Av 56 prover förekom *S. pseudintermedius* i 12 och *S. aureus* i 22. Båda arterna kunde inte isoleras samtidigt från något prov. Av 12 *S. pseudintermedius* bar nio på *mecA*-genen och klassades som MRSP. Av 22 *S. aureus* bar tre på *mecA*-genen och klassades som MRSA.

Totalt sågs 12 platser som riskplatser för detta djursjukhus vid denna undersökning. För dessa skapades en åtgärdslista innehållande allt från ändring av städrutiner till placering av förbrukningsmaterial. Nya provtagningar kan visa andra riskplatser och förebyggande smittskyddsarbete måste hela tiden hållas aktivt.

SUMMARY

Methicillin-resistant staphylococci have in the past years become an extensive problem within human- as well as animal healthcare environments. They cause nosocomial infections with the result of great suffering and enormous costs. One important consideration is the role of the hospital environment in the spread of infection.

The aim of this study was to develop a method for sampling and culturing of *Staphylococcus (S.) aureus* and *S. pseudintermedius* from animal hospital environments, to examine the prevalence of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) and *S. pseudintermedius* (MRSP) in the animal hospital environment, to identify especially hazardous objects or processes for the spread of infection and to create a list of preventive measures.

Fifty-six samples were taken from the environment in an animal hospital. The samples were mostly larger collective samples and they were taken from either

surfaces that human hands come in contact with or surfaces that animals come in contact with. The swabs were collected with a swab kit (Sodibox) and were cultured on blood agar and mannitol salt agar after enrichment in Mueller-Hinton and Tryptone Soya Broth. The enrichment culture was supplemented with cefoxitin, aztreonam and 6,5 % NaCl.

Twelve of 56 samples were positive for *S. pseudintermedius* and 22 of 56 samples for *S. aureus*. None of the samples were positive for both species. Nine of the 12 *S. pseudintermedius* carried the *mecA*-gene and were classified as methicillin-resistant. Three of the 23 *S. aureus* carried the *mecA*-gene and were classified as methicillin-resistant.

A total of 12 places were considered as especially hazardous objects or processes in this study. For these a list of preventive measures was created, containing everything from a change in cleaning procedures to storage of supplies. New sampling may reveal other objects or processes as hazardous and disease controlling preventive work needs to be ongoing.

INLEDNING

Bakgrund

Bakterier som sprids i sjukhusmiljö är ett växande problem runt om i världen. En av de mest uppmärksammade bakterierna inom humansjukvården är meticillinresistenta *S. aureus* (MRSA). MRSA medför stort lidande och stora ekonomiska förluster genom att orsaka svårbehandlade infektioner. MRSA har de senaste åren även isolerats vid infektioner hos våra husdjur. Inom smådjursjukvården har meticillinresistenta *S. pseudintermedius* (MRSP) blivit ett motsvarande problem för våra husdjur (främst hund). En viktig fråga är hur stor roll djursjukhusmiljön spelar i smittspridningen av dessa bakterier. Om resistenta stafylokocker finns i djursjukhusmiljö och orsakar smittspridning till patienterna, så krävs mer kunskap om var i miljön riskerna finns och hur smittspridningen går till.

Stafylokocker

Från början kallades alla koagulaspositiva stafylokocker för *S. aureus*. År 1976 upptäckte Hájek att en grupp stafylokocker isolerade från hund, mink, häst och duva, visade tydliga olikheter med *S. aureus* gällande bland annat biokemiska egenskaper¹. Han föreslog då ett namnbyte på denna grupp till *S. intermedius*. Denna nya grupp, intermediusgruppen, delades år 2005 upp igen, denna gången på grund av att Devriese *et al.* beskrev ytterligare skillnader mellan isolat inom gruppen². Isolaten som testades då kom från olika djur, nämligen katt, hund, häst och papegoja. Isolaten i intermediusgruppen delades upp i tre nya grupper (*S. intermedius*, *S. pseudintermedius* och *S. delphini*). Isolaten som kom från hund gavs namnet *S. pseudintermedius* medan fågelns stafylokok fick behålla namnet *S. intermedius*.

Stafylokocker förekommer normalt på hud och slemhinnor hos djur och människor^{5,6}. De stafylokocker som har störst betydelse inom veterinärmedicinen är *S. aureus* och *S. pseudintermedius*^{3,4,9}. *S. aureus* kan dock anses vara människans stafylokok, eftersom den koloniserar upp till 40 % av vuxna människor, medan *S. pseudintermedius* hittas till största delen hos hund. Även om olika arter av stafylokocker är mer eller mindre värdjursanpassade kan man se en övergående kolonisation och även en infektion hos en annan djurart om det föreligger nära kontakt med det primära värdjuret⁵.

Alla stammar av stafylokocker som isolerats från människor och djur är potentiellt patogena och kan orsaka sjukdom. De är pyogena bakterier och orsakar oftast variga infektioner⁶. För utveckling av infektion krävs, i flertalet fall, en immunosuppression eller ett trauma för att bryta kroppens normala barriärer. Stafylokocker orsakar också matförgiftningar hos människa.

Hos friska individer sker dock oftast bara kolonisation av mer eller mindre persisterande natur. Kolonisationen förekommer då oftast i näsan hos människor⁷ och i nos⁸, mun/svalg eller perianalregion hos hund^{5,9,11} och katt¹⁰.

Både *S. aureus* och *S. pseudintermedius* är koagulaspositiva, vilket korreleras med deras patogenicitet^{1,2,6}. Enzymet koagulas omvandlar fibrinogen i plasma till

fibrin, vilket ger upphov till koagulation. Båda arterna hemolyserar erythrocyter. På nöt- eller fårblodagar bildas dubbelhemolys med hjälp av hemolysiner (toxiner) av typen alfa och beta. Alfatoxinet ger en klar genomskinlig smal hemolys närmast kolonin medan betatoxinet ger en bredare, ofullständig hemolys längre från kolonin. Hemolysinerna fungerar som toxiner *in vivo*. En annan patogenicitetsfaktor är enzymet DNas som bryter ner DNA. Både *S. aureus* och *S. pseudintermedius* har detta enzym. *S. aureus* är maltospositiv, dvs att den kan fermentera och utnyttja maltos. På ett maltosinnehållande medium sker ett pH-indikatoromslag från blått till gult under aeroba förhållanden. *S. pseudintermedius* fermenterar maltos endast svagt.

Genus *Staphylococcus* utmärks av en lång överlevnad i miljön⁶. Olika undersökningar har kunnat visa en överlevnad på flera veckor till flera månader^{12,14,34}. Stafylokocker är mycket resistenta mot uttorkning och desinfektion och är även extremt salttåliga. Dessa egenskaper ger stafylokocker ett övertag jämfört med ett flertal andra bakterier i miljön.

Meticillinresistenta S. aureus (MRSA) hos människa i Sverige och i världen

En känd egenskap hos stafylokocker är deras benägenhet att utveckla resistens mot olika sorters antibiotika^{16,23,26}. Många stafylokocker har sedan länge varit resistenta för penicilliner¹⁵. Denna resistens orsakas av att bakterien producerar ett enzym, penicillinasa, som har förmågan att bryta ner penicillin. Den meticillinresistens (meticillin är ett penicillinastabilt penicillin) som på senare år har börjat uppträda är inte orsakad av något enzym utan av en förändring i ett protein som kodas i bakteriens genom²⁴. Proteinet kallas PBP (penicillin binding protein) och genen som kodar för proteinet kallas *mecA*. Förändringen resulterar i att penicillinmolekylen inte längre kan binda till bakterien och förändringen orsakar resistens mot alla sorters betalaktamer och inte bara mot penicillin.

MRSA påträffades för första gången i England 1961¹⁸. Detta var strax efter att meticillin introducerades på marknaden. Sedan dess har prevalensen av MRSA ökat och MRSA är i dag ett endemiskt problem i flertalet länder^{19,21,22}. Idag är MRSA en viktig orsak till svårbehandlade vårdrelaterade infektioner, i framför allt hud och mjukdelar. Infektionerna ger både svårt lidande, hög dödlighet och stora ekonomiska förluster för sjukhus över hela världen. MRSA har, som övriga koagulaspositiva stafylokocker, ett flertal virulensfaktorer som ger dem möjligheten att också orsaka exempelvis sepsis och nekrotiserande pneumoni. Isolat av MRSA från senare utbrott har dock visat även andra virulensfaktorer som gör att de är mera patogena och därmed kan orsaka sjukdom hos människor utan närvaro av riskfaktorerna i en vårdmiljö. De utbrott av MRSA som på detta sätt börjat uppträda ute i samhället kallas samhällsförvärd MRSA²⁵.

I Europa varierar prevalensen av MRSA mellan <1 % i Skandinavien och Nederländerna till >40 % i södra och västra Europa^{20,28}. En ökning av prevalensen kan ses från år till år.

Även i Sverige har antalet rapporterade fall av MRSA ökat sedan år 2000 (det året anmäldes 315 fall)²⁹. År 2006 anmäldes 1057 fall av MRSA enligt smittskyddslagen. År 2007 gjordes 1129 anmälningar, dvs en ökning på 7 %, och 2008 steg siffran till 1307, dvs med ca 16 %. Siffrorna från 2009 (fram till november) tyder på en ökning även detta år. Statistiken visar alltså inte bara att en ökning sker från år till år, utan också att ökningen är större från år till år. Idag är

MRSA anmälningspliktig och klassad som allmänfarlig (sedan år 2000). Den är smittspårningspliktig enligt smittskyddslagen.

I Sverige har vi sedan slutet av 1990-talet haft några stora utbrott av MRSA. Dessa utbrott har haft en annorlunda epidemiologi, vilket innebär att utbroten inte enbart varit vård- eller sjukhusbundna utan istället samhällsförvärvade^{7,30}. Samma trend har även setts i övriga världen²⁵. Detta innebär att utbroten inte kunnat kopplas till primärfall med koppling till sjukhus eller andra vårdanläggningar. Trots ökningen kan vi (tillsammans med övriga nordiska länder och Nederländerna) fortfarande anse oss ha ett relativt gott resistensläge. European Antibiotic Resistance Surveillance System, EARSS, är ett europeiskt övervakningssystem för antibiotikaresistens²⁸. Hit skickas alla invasiva isolat av *S. aureus* konfirmerade hos patienter i medlemsländerna. År 2008 var 0,8 % av alla inskickade isolat från Sverige MRSA. Detta är betydligt lägre än för många andra länder. Från Grekland till exempel var 41% av alla inskickade isolat MRSA.

MRSA hos djur

Länge betraktades *S. aureus* som en strikt humanpatogen, men 1972 kom den första rapporten om MRSA på djur. Fallet gällde mjölkkor¹⁷. År 1994 kom det första fallet på hund³⁶ och 1996 beskrevs det på häst³⁵. Sedan 2000-talet har antalet fall på djur runt om i världen ökat^{10,31,32,33}. Rapporterna rör bland annat hund, katt, häst, fjäderfä och nöt. De första fallen av MRSA hos djur har troligen uppkommit genom att djur blivit smittade av människor^{33,37}. Denna slutsats har man dragit pga att de kloner som hittats hos djur har varit desamma som cirkulerat i humanpopulationen under många år. I dagens läge finns det dock andra riskfaktorer för smitta till djur än kontakt med smittad människa, exempelvis sjukhusvistelse, kirurgi (särskilt kirurgi under lång tid och med flera personer i operationsrummet), intravenösa katetrar och antibiotikabehandling^{11,38}. När MRSA har etablerat sig i en djurpopulation anses smitta kunna ske även från djur till människa^{32,40}. Det har förekommit ett ökat antal rapporter om MRSA hos grisar under senare år^{41,46}. Typen som hittas hos dessa grisar är den som kallas ST 398 (en typ helt skild från den hos övriga djurslag). Flertalet studier har hittat ett samband mellan kolonisation eller infektion med MRSA hos människa och nära kontakt med grisar^{42,44,45}. MRSA-infekterade människor som lever i nära kontakt med grisar har då nästan alltid denna ”grisklon” vilket tyder på att smittan har skett från grisarna till människorna. Sällskapsdjur med MRSA har oftast haft klinisk sjukdom, ffa sårinfektioner, medan produktionsdjuren oftast varit symptomfria bärare⁴⁷.

I Sverige har MRSA påvisats hos hund, katt och häst medan undersökningar i besättningar visat negativa resultat hos svenska produktionsdjur (fjäderfä 2003, gris 2006-2008 samt nötkreatur 2002, 2005 och 2008)⁴⁷. I Sverige inträffade det första fallet av MRSA hos en hund med sårinfektion hösten 2006⁴⁸. Fram till oktober 2009 har totalt 25 djur bekräftats positiva för MRSA, 13 hundar, 2 katter och 10 hästar. Sommaren 2008 skedde ett utbrott av MRSA på en hästklinik. Utbrottet involverade sju fall, varav de flesta var postkirurgiska infektioner. Innan detta utbrott hade endast ett fall på häst bekräftats i Sverige.

MRSA kan finnas hos djur och människor både som en asymtomatisk kolonisation och som en infektion^{9,10,50}. Infektion med MRSA har i Sverige yttrat sig främst som postkirurgiska infektioner, dvs infekterade operationssår, hos djur⁴⁷.

Meticillinresistenta *S. pseudintermedius* (MRSP)

Hos koagulaspositiva stafylokocker påvisades resistens mot penicilliner redan på 1940-talet²³. I diagnostiken av infektioner med *S. pseudintermedius* rapporterades tidigare isolaten som känsliga mot övriga betalaktamantibiotika⁵⁴, men denna situation har kommit att ändras. Fler och fler rapporter har visat en ökad prevalens av MRSP runt om i världen^{49,51,52} och detta har blivit ett allt större problem för hundhälsan. Under de tre senaste åren har det även i Sverige skett en kraftig ökning av MRSP infektioner hos hund⁴⁷. Det första fallet hittades i februari 2006⁵³. Isolatet kom då från en frisk hund i en undersökning där friska utställningshundar undersöktes avseende bla MRSP. År 2007 konfirmerades 77 fall och 2008 (sedan införandet av anmälningsplikt 1 januari) hittades 100 nya fall⁵⁵.

Problem med MRSP hos hund är oftast associerade till postoperativa infekterade sår men förekommer också vid urinvägs-, hud- och öroninfektioner⁵⁵. Infektion kan dock förekomma i alla organsystem och andra tillstånd kan exempelvis vara diskospondylit, bakteriemi, konjunktivit, valvulär endokardit och perikardit⁵. Ett fåtal studier har visat att *S. pseudintermedius* också kan kolonisera människor samt att kolonisationens karaktär då inte skiljer sig påvisbart mellan meticillinresistenta *S. pseudintermedius* och meticillinkänsliga *S. pseudintermedius* (MSSP)^{39,43,56}. Bett av koloniserade eller infekterade hundar har orsakat infektion med MRSP och MSSP hos människa⁵⁷. Kolonisation med MRSP hos människa är dock ovanligt.

Nosokomial smitta

Nosokomial infektion innefattar de infektioner som förvärfvas under sjukhusvistelse och vid all form av medicinsk vård⁵⁸.

Eftersom stafylokocker är en del av normalfloran på hud och slemhinnor hos både djur och människor, kontaminerar de också lätt miljön^{12,59}. Detta sker ffa via händer (människa) och nos, mun och päls (hundar). Människans händer anses vara en av de största vägarna för smittspridning inom sjukhusmiljö⁶⁰.

Både MRSA och MRSP kan, som tidigare nämnts, kolonisera för övrigt helt friska individer (se avsnitt om stafylokocker) och det är alltså omöjligt att veta i förväg om en patient som kommer till sjukhus/djursjukhus är bärare eller inte. Detta visades bland annat i en studie av Hanselman *et al.*⁸ där de provtog 193 hundar inkommande till djursjukhuset. Fyra av dessa hundar var positiva för MRSP och en hund bar på MRSA. Ingen av dessa hundar hade kliniska symtom på sjukdom vid provtagningen. Det finns även andra studier som visar bärarskap utan symtom^{9,52}. Vid ett djursjukhus måste man alltså betrakta alla inkommande djur som potentiella bärare av både MRSA och MRSP.

Längre sjukhusvistelser, för både människa och djur, ändrar kompositionen av patientens normala stafylokockflora⁵. Bärarprover från näsan visar då en högre förekomst av koagulaspositiva stafylokocker efter sjukhusvistelsen. Detta kan tyda på en nosokomial överföring av stafylokocker mellan patienter och från miljön.

När meticillinresistenta *S. aureus* väl etablerat sig på ett sjukhus kan det vara oerhört svårt att bli av med dem^{13,68,69}. Idag kan en del sjukhus runt om i världen anses ha en endemisk förekomst av bakterien. Prevalensen av MRSA skiljer sig mycket mellan olika länder men den skiljer sig också mycket mellan olika sjukhus inom samma land²⁰. Denna skillnad kan bero på flera saker. Utbrott av smitta inom ett sjukhus sker oftast med klonal expansion, vilket innebär att det är en och samma klon av bakterien som delar sig och sprids inom området. Förutsättningarna för denna spridning är olika för olika sjukhus, vilket kan vara en del av förklaringen till denna skillnad i prevalens. När det gäller förekomst av *S. pseudintermedius* i djursjukhusmiljö finns det, till dagens datum, däremot inga undersökningar gjorda.

Eftersom över hälften av alla infektioner med MRSP på djur är relaterade till kirurgiska ingrepp⁵⁵ är förhållandena före, under och efter operation viktiga faktorer i den nosokomiala smittspridningen. Detta gäller även för prevention av MRSA-infektioner. I en studie av Eugster *et al.*³⁸ undersöktes riskfaktorer för infektion vid kirurgi. Man studerade 1010 operationer, varav infektion utvecklades i ca 9 %. Riskfaktorer för infektion var långvarig kirurgi samt antalet personer i operationsrummet. Båda dessa faktorer kan kopplas till att smittämnet kan spridas med personalen.

Zoonotisk risk

Enligt EU:s definition är zoonoser alla typer av sjukdomar och/eller infektioner som på ett naturligt sätt direkt eller indirekt kan överföras mellan djur och människor⁶¹. Detta innebär att infektioner hos människor som kan överföras till djur också definieras som zoonoser.

Både *S. aureus* och *S. pseudintermedius* är opportunistiska patogener som kan kolonisera och infektera både människor och djur, vilket är visat i flertalet studier^{33,39}. Ingen studie har dock än så länge kunnat visa med säkerhet om infektionerna har uppstått genom smitta från människan till djuret eller tvärt om. *S. aureus* sprids med största sannolikhet först från människa till djur (se avsnitt MRSA hos djur). Men med den ökande prevalensen runt om i världen är det troligt att det nu förekommer smitta från båda håll. Vi har nu även börjat se de första fallen av MRSP infektioner hos människa, även om de är få (se avsnitt om MRSP).

Provtagning och odling från miljön

I en amerikansk studie som undersökte förekomst av *S. aureus* i hemmiljö visades en förekomst i 97 % av hemmen⁵⁹. I några hem var alla provtagningsställen (32 platser i varje hem) positiva. Detta är dock inte oväntat då stafylokocker är den vanligaste hud- och slemhinnebakterien hos både djur och människor. Prevalensen av MRSA i miljön i denna studie var 26 %. Dock var antalet positiva provtagningsställen i hemmet inte många, bara mellan ett till fem. Nästan alla positiva provtagningsställen var handkontaktytor. Studien ger vägledning om att vid en provtagning i miljön så kommer man att hitta stafylokocker i nästan alla prover och att den lilla andelen MRSA man hittar kommer vara från handkontaktytor. Ingen studie har fram till idag gjorts på förekomst av *S. pseudintermedius* i miljön.

Syfte

Projektet hade fyra huvudsakliga syften:

- att ta fram en provtagnings- och odlingsmetod för att påvisa meticillinresistenta stafylokocker i miljön, dvs att undersöka om det går att använda samma provtagnings- och odlingsmetod för både *S. aureus* och *S. pseudintermedius*.
- att undersöka förekomsten av meticillinresistenta *S. aureus* och *S. pseudintermedius* i djursjukhusmiljö.
- att identifiera speciellt riskfyllda platser, föremål eller processer inom djursjukhuset som kan vara av betydelse vid smittspridning från miljön till patient.
- att föreslå rekommendationer om åtgärder.

MATERIAL OCH METOD

Provtagning

Fyrtiosex provtagningsställen undersöktes för förekomst *S. pseudintermedius* och *S. aureus*. Av dessa ställen provtogs tio stycken två gånger (totalt 56 prover). Provtagningsställena omfattade ffa större samlingsprover inkluderande allt från handtag och lysknappar till burar, golv och behandlingsbord i samma prov (se bilaga 1).

Proverna delades dessutom upp i humana tagytor (32 prover) dvs att ett prov omfattade enbart ytor som människor kommer i kontakt med (handtag, lysknappar mm) och djurytor (24 prover), dvs ytor som djur kommer i kontakt med (golv, behandlingsbord mm). Avsikten med det var att undersöka i vilken av dessa grupper av föremål de främsta riskerna för smittspridning ligger samt att kontrollera teorin om att smittspridning sker till stor del med människans händer, se avsnitt om nosokomial smitta. En del av proverna innehöll dock föremål från båda kategorierna då man var intresserad av att undersöka förekomsten av bakterierna i ett rum som helhet (operation, dermatologirum mm). Proverna togs vid 8 olika tillfällen för att få ett rimligt antal prover i taget.

Proverna togs med ett provtagningskit kallat Sodibox (www.fooddiagnostics.dk, varunamn 4031E). Detta är ett kit som tidigare är använt vid miljöprovtagningar, exempelvis vid provtagning för *Listeria monocytogenes* på grisar⁶² och vid miljöprovtagning för *Mycoplasma hyosynoviae* i uppfödningisulatorer för kyckling⁶³. Sodibox är en provtagningsduk som är fuktad med buffrad peptonlösning med 10 % tillsats av ett neutraliserande ämne (lecitin, Tween 80, L-histidin och natriumtiosulfat), vilket tar bort effekten av ev desinfektionsmedel i provet. Vid provtagningen användes sterila handskar för att inte kontaminera proverna. Provtagningsduken gnuggades hårt på/mot platsen/föremålet som skulle provtas. Hela duken stoppades, efter provtagningen, i en steril stomacherpåse och därefter tillsattes lämpligt odlingsmedium.

Pilotstudier

För att ta fram ett optimalt odlingsschema i syfte att undersöka både *S. pseudintermedius* och *S. aureus* i samma prov, testades olika salthalter samt olika spädningar av tillsatta *S. pseudintermedius* för att kontrollera överlevnaden i hög salthalt och överlevnad i konkurrerande bakterieflora.

Salthalt

En egenskap man utnyttjar när man vill leta efter stafylokocker i miljöprover är deras höga salttolerans. *S. aureus* har påvisats salttålig i flera studier^{66,67}. Likaså har *S. intermedius*¹, som också odlats i höga salthalter i flera studier^{3,43,53}. Man kan förmoda att även *S. pseudintermedius* har denna egenskap, men detta är dock inte visat och för att inte riskera att förlora eventuella MRSP (pga för hög salthalt) i odlingen utfördes en pilotstudie avseende detta. Sju prover ingick i studien. Förutom anrikningen i olika salthalter odlades de enligt samma framtagna odlingsförfarande (se diagnostik) som övriga prover. Alla proverna odlades dels i Mueller-Hinton-buljong (MH) innehållande 6,5 % NaCl och dels i MH innehållande 4 % NaCl.

Spädningsförsök

I de första preverna som analyserades hittades inga *S. pseudintermedius*. För att undersöka om bakterien klarade konkurrensen med andra miljöbakterier gjordes ett försök där olika spädnings av bakterien tillsattes till prover tagna med Sodibox. Åtta prover togs från två olika platser (en övernattningsbur och golvet i en isoleringsrum). Från vardera ställe togs fyra prover. Proverna odlades i MH (Becton, Dickinson & Company, Le Pont de Claix, Frankrike) med tillsats av 6,5 % NaCl samt med tillsats av olika spädnings av MRSP 240 CFU/ml, 24 CFU/ml och 2,4 CFU/ml. Två prover (ett från vardera ställe) odlades utan tillsats. Proverna odlades annars i enlighet med övriga prover (se diagnostik).

Diagnostik

Då det inte finns några studier gjorda med avsikt att odla fram *S. pseudintermedius* från miljöprover och inte heller några studier där man tittat på både *S. pseudintermedius* och *S. aureus* i samma miljöprov togs den här provtagningsmetoden fram genom en kompromiss mellan de scheman som upprättats för miljöprovtagningen av MRSA på hästkliniken, SLU (2008) (metod enligt SVA, se bilaga 2) och för *S. pseudintermedius* avseende patientprover¹¹ (se bilaga 3). Dessa två odlingsscheman samt resultaten av de egna pilotstudierna användes vid upprättandet av odlingsschema för *S. pseudintermedius* och *S. aureus* i samma miljöprov.

Anrikning

Till den sterila stomacherpåsen innehållande provtagningsduken tillsattes 100 ml MH (Becton, Dickinson & Company, Le Pont de Claix, Frankrike) med tillsats av 6,5 % NaCl. Påsen stomacherades i 1 minut och inkuberades sedan i 37 °C i 24 timmar.

Därefter överfördes 1 ml av buljongen till ett rör med 9 ml Tryptone Soya Broth (TSB) (Oxoid Ltd, Basingstoke, England) med tillsats av 1 mg/L cefoxitin (Enheten för vaccin och laboratorieprodukter, SVA, Uppsala), 50 mg/L aztreonam (Enheten för vaccin och laboratorieprodukter, SVA, Uppsala) och 4 % NaCl. Detta inkuberades i 37 °C i 48 timmar. Den låga koncentrationen av betalaktamantibiotikan valdes efter rekommendation från SVA där denna koncentration använts vid odling av *S. pseudintermedius*.

Odling

Av den inkuberade buljongen togs 10 µl och ströks ut dels på en nötblodagarplatta (Oxoid Ltd, Basingstoke, England) och dels på en mannitolsaltagarplatta med litiumklorid (MAST) (Mast Group Ltd, Merseyside, England). De två plattorna inkuberades i 37 °C i 48 timmar. Avläsning skedde efter 24 och 48 timmar.

Misstänkta kolonier på blodplattan, ffa med dubbelhemolys, renodlades på ytterligare nötblodagarplattor. Fem misstänkta kolonier från blod- och MAST-plattan (rosa och gula) plockades och renströks på ytterligare nötblodagarplattor.

Konfirmering

Misstänkta kolonier verifierades som *S. pseudintermedius* och *S. aureus* med biokemiska tester (se tabell 1). Fyra tester ingick i denna typning: koagulas, maltos, trehalos och DNas (Enheten för vaccin och laboratorieprodukter, SVA, Uppsala).

Tabell 1. Resultat av biokemiska tester för *S. aureus* och *S. pseudintermedius*

Biokemisk test	<i>S. aureus</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
Koagulas	+	+
DNas	+	+
Maltos	+	-
Trehalos	+	+

MRS-detektion

Resistensmönstret undersöktes hos konfirmerade *S. pseudintermedius* och *S. aureus* med hjälp av en VetMICTM-platta (Enheten för vaccin och laboratorieprodukter, SVA, Uppsala, Sverige. Artikelnummer: 395119). Plattan består av tre delar med brunnar innehållande stigande koncentration av tre olika antibiotika. Till brunnarna sätts en lösning med bakterien man vill testa och genom avläsning av den lägsta koncentration som totalt hämmar synlig tillväxt får den ett MIC-värde (Minimum Inhibitory Concentration). Ju högre MIC-värde desto mindre känslig är bakterien. Brytpunkter för *S. pseudintermedius* är satta av Enheten för djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA. Till ett rör med 4 ml fysiologisk koksaltlösning sätts 1 µl renkultur av det isolat man vill undersöka. Detta blandas på en vortex. Av blandningen förs 10 µl över till 2 ml Brain Heart Infusion-buljong (BHI) (Becton, Dickinson & Company. Le Pont de Claix, Frankrike) och blandas. Bakteriernas spädning i den nya lösningen kontrolleras genom utstryk på nötblodagarplattor. Femtio µl av lösningen tillsätts till varje brunn och inkuberas i 35 °C i 24 timmar.

Isolat med MIC-värde över ett visst gränsvärde (Tabell 2) bedömdes som misstänkta MRSA eller MRSP.

Tabell 2. Gränsvärden (mg/l) för att misstänka meticillinresistens hos stafylokocker

Gränsvärden för stafylokocker			
	Antimikrobiell MRS detektion	Antimikrobiell sann MIC	Antimikrobiell MRS detektion
Art	Oxacillin + 2 % NaCl	Oxacillin utan NaCl	Cefoxitin
<i>S. aureus</i>	>2	>0,5	>4
<i>S. pseudintermedius</i>	>0,5	>0,25	>1

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Misstänkta MRSA och MRSP valdes ut för undersökning med PCR med avseende på tre olika gener: *mecA*-genen⁷⁵, vilken orsakar meticillinresistensen, 16S rRNA-genen⁷⁴ med specifika primers för genus *Staphylococcus* samt *nuc*-genen⁷⁴, som kan användas för att särskilja arterna *S. aureus* och *S. pseudintermedius*. (Tabell 3 och 4). DNA extraherades enligt Capurro *et al* 2008⁷⁶.

Tabell 3. PCR-protokoll för *nuc*-genen och 16S rRNA-genen

Mastermix (µl)	1
10 x PCR buffert II ^a	2,5
MgCl ₂ (25mM) ^b	2,0
dNTPmix (10mM) ^b	1,5
primer SInuc1 (10pmol/µl) ^c	0,4
primer SInuc2 (10pmol/µl) ^c	0,4
primer SANuc1 (10pmol/µl) ^c	0,4
primer SANuc2 (10pmol/µl) ^c	0,4
primer 16S1 (10pmol/µl) ^c	0,3
primer 16S2 (10pmol/µl) ^c	0,3
AmpliTaq Gold (5U/µl) ^b	0,3
H ₂ O	14,0
Summa	22,5

Tabell 4. PCR-protokoll för *mecA*-genen

Mastermix (µl)	1
10 x PCR buffert II ^a	2,5
MgCl ₂ (25mM) ^b	2,0
dNTPmix (10mM) ^b	1,5
forward primer (10pmol/µl) ^c	0,4
reverse primer (10pmol/µl) ^c	0,4
AmpliTaq Gold (5U/µl) ^b	0,3
H ₂ O	15,4
Summa	22,5

^a 100 mM TrisHCl, 8,3 pH, 500 mM KCl (Applied Biosystems California, USA)

^b Applied Biosystems California, USA

^c Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Tyskland

Till varje PCR tillsattes 2,5 µl templat varefter PCR:en utfördes enligt följande program:

94 °C i 4 min

(94 °C i 30 sek, 55 °C i 30 sek, 72 °C i 30 sek) x 30 cykler

72 °C i 7 min

4 °C ∞

Närvaro av PCR produkter detekterades med gelelektrofores

Kontaminering av miljöbakterier

Efter att 25 prover odlats visade det sig att många prover var oanvändbara då det förekom en kraftig överväxt av miljöbakterier, exempelvis olika bacillusarter. Även om hemolys kunde urskiljas på plattan var hemolyserande kolonier i flertalet fall inte möjliga att isolera. För att trycka ner växten av svärmande bakterier (ex proteus) kan man använda sig av en tuss fuktad med 95 % etanol (personlig kommunikation Lise-Lotte Fernström) vid odlingen. Denna tejpas fast i locket på petriskålen med nötblodagar och plattan stryks och inkuberas sedan som vanligt. Resterande 31 prover odlades förutom på vanlig nötblodplatta och MAST-platta även med denna metod. (Tabell 5).

RESULTAT

Pilotstudier

Salthalt

Av 53 isolerade stafylokocker (20 *S. aureus* och 33 *S. pseudintermedius*) var 39 isolerade från salthalt 6,5 %, dvs 66 %.

Arton av 20 *S. aureus* isolerades från salthalt 6,5 %, dvs 90 % och 21 av 33 *S. pseudintermedius* isolerades från salthalt 6,5 %, dvs 64 %.

Spädningsförsök

Resistenta *S. pseudintermedius* kunde odlas fram från spädningen med 240 CFU/ml och 24 CFU/ml men inte från övriga prover.

Kontaminering miljöbakterier

Tabell 5. Andel användbara plattor vid odling med och utan tuss fuktad med 95 % etanol

	Typ av platta	
	Nötblodagar utan tuss fuktad med 95 % etanol	Nötblodagar med tuss fuktad med 95 % etanol
Antal användbara totalt	22	30
Antal överväxta som ändå kunde räddas	5	0
Antal plattor positiva för stafylokocker (av de användbara)	13	13
Antal plattor positiva för <i>S. pseudintermedius</i> (av de användbara)	4	1
Antal plattor positiva för <i>S. aureus</i> (av de användbara)	8	12

Man kunde tydligt se mindre överväxt av kontaminanter när man använde tuss fuktad med 95 % etanol än när man inte gjorde det. Däremot kunde man se att även hemolyserande kolonier växte sämre och hade svagare hemolys. Därför beslutades att alla resterande prover skulle odlas dels med en tuss indränkt med 95 % etanol och dels utan för att inte riskera att förlora någon viktig koloni.

Förekomst av stafylokocker i djursjukhusmiljö

Resultaten av provtagningarna kan ses i tabell 6. Av 56 provtagningar förekom *S. pseudintermedius* i 12 och *S. aureus* i 22. I inget prov kunde båda arterna isoleras från samma prov. Tio platser provtogs två gånger (alla var negativa första gången). Vid andra provtagningen hittades *S. aureus* i fem av dem. *S. pseudintermedius* hittades i ett av dessa prover vid andra provtagningen. Av 56

prover togs 32 från humana tagytor och 24 från djurytor. Från de humana tagytorna isolerades *S. aureus* i högre utsträckning än *S. pseudintermedius* medan det från djurytorna var jämnare fördelat.

Tabell 6. Resultat av miljöprovtagningarna

Provtagningar	<i>S. aureus</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativa
Totalt 56	22	12	22
Humana tagytor 32	14	5	13
Djurytor 24	8	7	9

Förekomst av meticillinresistenta stafylokker i djursjukhusmiljö

Av 12 *S. pseudintermedius* isolat hade nio MIC över gränsvärdet för oxacillin och cefoxitin samt var positiva i PCR för *mecA*-genen, dvs de klassas som MRSP.

Av 22 *S. aureus* isolat hade tre MIC över gränsvärdet för oxacillin och cefoxitin samt var positiva i PCR för *mecA*-genen, dvs de klassas som MRSA. En av dessa tre isolerades vid andra provtagningen.

Alla stafylokker som hade MIC över gränsvärdet var också positiva i PCR för *mecA*-genen.

De isolat av MRSA som isolerades skickades till SVA för fullständig resistensbestämning och till Smittskyddsinstitutet, Stockholm, Sverige för typning. Alla tre isolaten var känsliga för klindamycin, tetracyklin, fusidin och gentamicin (brytpunkter enligt www.eucast.org) samt tillhörde spatypen t002. Detta är en typ som tillhör de vanligaste vid kolonisation/infektion hos människa⁷, men inte hos djur⁴⁸.

Förekomst av specifika riskplatser

De platser som visade förekomst av MRSA och MRSP åskådliggörs i tabell 7.

Tabell 7. Provtagningsplatser positiva för MRSA och MRSP

Provtagningsplats	Specifikt	MRSA	MRSP
Förhall/groventré	Golv		+
Väntrum	Mattor		+
Väntrum	Golv Stols- och bordsben		+
Akutmottagning	Humana tagytor		+
Akutmottagning	Golv	+	
Jouoperation	Humana tagytor	+	
Ortopedoperation	Humana tagytor	+	
Vågar	2 st		+
Infektionsavd.	Humana tagytor		+
Stallkorridor	Humana tagytor		+
Dermatologirum	Humana tagytor		+
Tangentbord	Ca 20 st		+

Cirka 45 % av de positiva platserna för MRSP är humana handtagytor. För de positiva platserna för MRSA är motsvarande siffra ca 65 %.

DISKUSSION

I den här studien hittades både MRSP och MRSA i djursjukhusmiljön, både på humana tagytor och djurytor. Resultaten visar att golvet kan vara viktigt som smittspridningskälla. En och samma provtagningsplats kan vara negativt vid ett tillfälle och positivt vid ett senare tillfälle. Inget prov var positivt för båda arterna samtidigt och det var få av de detekterade MRSA och MRSP som uppvisade den typiska dubbelhemolysen på första blodplattan.

Provtagning och odling

Att fem platser vid första provtagningen var negativa för *S. aureus* men vid andra provtagningen var positiva kan bero på flera saker:

1. *S. aureus* fanns inte på platsen första gången, men hade kontaminerat platsen till andra provtagningen.
2. Provtagningarna skedde i olika omgångar, vilket innebär att personalstyrkan inte bestod av samma personal vid de olika tillfällena.
3. *S. aureus* fanns på platsen vid första provtagningen men provtagningsduken kom inte i kontakt med just den punkten.
4. Kolonierna fanns på en av de plattona som blev överväxta med miljöbakterier och fick slängas.
5. *S. aureus* fanns på plattan (blod eller MAST) men valdes inte för renstrykning. Från nötblodplattor med många hemolyserande kolonier plockades inte alla. De fem mest typiska kolonierna valdes ut för renstrykning. Endast fem kolonier plockades även från MAST-plattorna.
6. Andra provtagningen skedde med mer vana än första. Provplatserna gnuggades hårdare.

Både *S. aureus* och *S. pseudintermedius* kan bilda kolonier med tydlig dubbelhemolys på blodagar^{1,2,6}. Endast tre av de framodlade *S. aureus* har dock uppvisat denna tydliga dubbelhemolys och ingen av de tre har varit MRSA. En av dessa kolonier uppvisade dock dubbelhemolysen efter första renstrykningen. Alla kolonier av *S. aureus* har uppvisat hemolys, men den har varit svag i vissa fall och kraftig i andra fall. Endast två av de framodlade *S. pseudintermedius*-isolaten uppvisade inte dubbelhemolys på första plattan, men dessa två uppvisade dock dubbelhemolysen efter första renstrykningen. Detta betyder att man inte kan använda förekomst av tydlig dubbelhemolys som ett kriterie för selektion av kolonier vid odling av *S. aureus*. Även *S. pseudintermedius* kan växa utan tydlig dubbelhemolys, vilket innebär att man bör gå vidare även med kolonier som inte uppvisar denna tydliga dubbelhemolys.

Endast ett prov var positivt för både *S. pseudintermedius* och *S. aureus*. Enligt flertalet prevalensstudier är det ovanligt att man hittar olika stafylokockarter på samma provtagningsplats^{4,8,9,10}. Detta är dock prover tagna på patienter och inte i miljön så någon slutsats från detta går det inte att dra. Med tanke på att 63 % av alla odlingar i denna studie varit positiva för antingen *S. pseudintermedius* eller *S. aureus* så är det ett observandum att inte fler prover var positiva för båda arterna. Kan det vara så att den ena arten trycker undan den andra i anrikningen eller på plattan? Är det så att *S. aureus* är den starkare arten? *S. aureus* har isolerats på fler

ställen än *S. pseudintermedius*. Förväntat är ju dock att man i miljön på ett djursjukhus skulle finna att hundens stafylokock dominerar.

Att undersöka större områden i ett prov minskar risken att missa positiva platser. Detta är annars en risk när man väljer ut specifika punkter och inte har möjlighet att undersöka ett obegränsat antal. Dock är det samtidigt en ökad risk att få med fler kontaminanter i provet om man använder den metoden. Det som avgör i slutändan är den ekonomiska frågan. Fler prover är dyrare.

Salthalt

I pilotstudien med salthalt var det fler stafylokocker som isolerades med den högre salthalten än med den lägre. Anledningen till det var att flertalet prover odlade med 4 % hade kraftig överväxt av miljöbakterier. Det hade även prover odlade i 6,5 %, men inte i lika stor utsträckning. Kanske kunde odling ha skett i ännu högre salthalt för att trycka undan kontaminanter ännu mer. I en studie av Zwenson (2007) odlades proverna i 10 % NaCl med goda resultat avseende isoleringen av *S. pseudintermedius*. I föreliggande studie isolerades 64 % av *S. pseudintermedius* med 6,5 % salthalt, vilket tyder på att de klarar denna nivå alldeles utmärkt.

I samband med att Hájek (1976) visade att *S. intermedius* var en egen grupp, visade han även att *S. intermedius* tillhörde de salttåliga bakterierna¹. Av hans isolat klarade 100 % av att växa på 12,5 % NaCl, medan 85 % klarade nivåer upp till 15 % NaCl. I en annan studie⁶⁵ visades dock att ca en tredjedel av MRSA-stammarna hämmades i tillväxt av en NaCl-koncentration på över 2,5 %. Det kan vara så att man, i föreliggande studie, skulle få högre antal positiva prover vid odling i lägre salthalt, men eftersom den ursprungliga, reella förekomsten av stafylokocker i proverna inte är känd så kan man ej uttala sig om det. Troligt är också att fler kontaminanter också skulle växa och konkurrera ut stafylokockerna (som också skedde i ovanstående studie). Det skulle vara av stort intresse att studera salttåligheten hos både *S. aureus* och *S. pseudintermedius* tagna från miljöprover. Ett sådant försök skulle kunna undersöka salthalter upp mot 15-20 %.

Spädningsförsök

Ett försök gjordes där prover i anrikningsbuljong med salthalt 6,5 % tillsattes olika spädningskoncentrationer av MRSP. Detta gjordes för att undersöka vilken koncentration av bakterier som krävs för att få ett positivt provresultat. Eftersom framodling kunde ske enbart från koncentrationerna 240 CFU/ml och 24 CFU/ml men inte från den lägsta så kan det innebära att 2,4 CFU/ml är en för låg koncentration i ett prov för att man ska kunna hitta dem. Det kan också innebära att de få kolonier som fanns har blivit undantryckta av eventuella miljöbakterier. Det kan också vara så att även 240 CFU/ml och 24 CFU/ml är för låga koncentrationer men att de positiva resultaten uppstod pga att det faktiskt fanns en högre förekomst på själva provtagningsplatsen från början. Framtida studier bör använda sig av absoluta koncentrationer för att på ett korrekt sätt kunna se hur många bakterier det krävs på en yta för att man ska kunna hitta dem i miljöprover med den här odlingsmetoden.

Förekomst av stafylokocker i djursjukhusmiljö

Resultat från denna studie visar att det förekommer stafylokocker i djursjukhusmiljö. Man kan dock inte säga med säkerhet att de platser som i den här studien visade sig vara positiva är de platser som hela tiden är positiva och att de platser som odlades negativa hela tiden är negativa. Det var ju tio platser som vid första provtagningen var negativa varav sex var positiva vid andra provtagningen.

Som sagts ovan så är det inte motiverat att ta ett enda prov och med det antingen fria eller fälla en plats som smittfri eller smittförande. Med den här typen av provtagning kan man dock få en guidning om hur miljön ser ut på ett djursjukhus och om det förekommer smittrisker på kritiska platser eller föremål, exempelvis på operationsavdelningen. Provtagning kan därmed användas till exempel både före och efter saneringar och för att förebygga smittspridning och kontrollera åtgärders effekt^{13,69}.

Stafylokocker förekommer i miljön genom att människor och djur kontaminerar den på olika sätt, exempelvis genom händer och päls. Marshall *et al.*⁶⁹ utförde 1998 en studie där de mätte hur snabbt *S. aureus* kontaminerade en kirurgisk avdelning efter att den hade öppnats. De fann att det inte tog mer än en vecka innan arten fanns i miljön och under de efterföljande veckorna blev det fler och fler positiva platser. Meticillinresistenta *S. aureus* och *S. pseudintermedius* har samma egenskaper som meticillinkänsliga förutom när det gäller överlevnaden i närvaro av antibiotikum, dvs de har samma förutsättningar att förekomma på och spridas via miljöytor. På de platser där meticillinkänsliga stafylokocker isolerats är det lika troligt att meticillinresistenta skulle kunna förekomma, dvs isoleringen av stafylokocker från en viss yta innebär bara att den ytan vid något tillfälle kontaminerats av människor eller djur. Alla ytor som visats positiva för stafylokocker kan alltså räknas som potentiella riskplatser.

Att det isolerades *S. pseudintermedius* från platser som räknas till strikt humana tagytor tyder på att icke rengjorda händer fört smittämnet från ett djur till dessa ytor. Det är bland annat detta som skapar risken för smittspridning mellan patienter⁵⁹. Att det isolerats mer *S. aureus* än *S. pseudintermedius* tyder ju också på att en stor del av spridning av stafylokocker till miljön sker med människans händer. Fyndet av en för människan vanlig MRSA-typ (t002) i miljön visar samma sak.

Förekomst av specifika riskplatser samt förslag till åtgärder

Nedan beskrivna platser är de som i denna provtagningen visade sig positiva för MRSP eller MRSA och som därmed tas upp som riskplatser för det här djursjukhuset vid tiden för provtagningen.

Mattor

I denna studie hittades MRSP på entrémattorna. En matta förser bakterier med alla de förutsättningar de behöver för en god tillväxt, nämligen näring och fukt. I de fall mattor används exempelvis innanför ytterdörrar kommer de dels att

härbärgera tillförda bakterier som kan dela sig och bli fler och dels sprida dem till alla som går på dem. Även om tanken med mattan (att hindra smuts från skor och tassar) är god så blir dess verkliga funktion att effektivt sprida smittsamma bakterier till alla djursjukhusets besökare. Även andra textilier har denna förmåga. Alla lösa föremål gjorda av textilier ska tas bort. Detta inkluderar alla mattor, långa gardiner, tygmöbler, prydnadssaker mm. Dessa föremål samlar lätt på sig bakterieinnehållande dammpartiklar, hudflagor, kvalster mm som sedan lätt smittar patienter som kommer i kontakt med dem (direkt eller indirekt)⁶⁹. Föremålen är dessutom ofta av sådan karaktär att de inte rutinmässigt och tillräckligt ofta städas och tvättas för att upprätthålla en bra hygienisk standard.

Golv

Sju olika golv provtogs i denna studie. Ett av dem var positivt för MRSA (akutmottagningens) och två var positiva för MRSP (väntrum och förenré).

Inom humansjukvården diskuterar man om golvet är av betydelse för smittspridning eller inte. Många anser att det inte är det och att främsta fokus på smittskydd bör ligga på handhygien^{60,70}. Golvet har där oftast ingen direktkontakt med patienterna. Studier har dock genomförts där man studerat golvet betydelse som reservoar för smitta, vilken skulle kunna spridas från golv till andra ytor via exempelvis luftdrag genom rörelse och aktivitet¹². Åsikterna om golvet betydelse går dock isär. Vissa menar att en högre koncentration av patogena bakterier på golvet också leder till en ökad koncentration i övriga omgivningen och då även på exempelvis tagytor⁷³. De menar också att patienter och personal i högre utsträckning än vad man tidigare beaktat är i kontakt med golvet, exempelvis genom att man tappar föremål och plockar upp dem eller att man sätter på sig skor och skoskydd och att golvet indirekta smittspridning till patienter är omfattande.

Inom humanvården pågår det också en livlig diskussion angående om det är motiverat att använda desinfektionsmedel vid golvstädning. Våtmopning av golv kan göras med olika rengöringsmedel eller med tillsats av desinfektionsmedel. Oavsett vilket man använder så blir golvet aldrig helt bakteriefritt, men i en undersökning har man visat att en lägre förekomst av potentiellt patogena bakterier på golvet (vilket man får när man använder desinfektionsmedel) även ger en lägre förekomst av dessa bakterier i den omgivande miljön och att det därför är motiverat att använda desinfektionsmedel vid städning av golv⁷³.

Moppen i sig själv (torr eller våt) kan med fel hantering ha en väldig bakteriespridande förmåga^{12,27}. Ayliffe *et al.* visade att vid städning med enbart rengöringsmedel i vatten så hade den del av golvet som städades sist i ett rum högre förekomst av bakterier än den som städades först¹². Städade man med desinfektionsmedel i vatten hade alla delar av golvet låg förekomst av bakterier. De visade också att vatten med tillsats av rengöringsmedel blir mer kontaminerat än vatten med desinfektionsmedel (34,000 CFU/ml med rengöringsmedel jämfört med 20 CFU/ml för desinfektionsmedel). Med dessa resultat kan man hävda att det därför är bättre att städa golven med desinfektionsmedel än med bara rengöringsmedel.

Även om man anser att golvet inte är en källa till smittspridning inom humansjukvården så kan situationen inte jämföras med den på ett djursjukhus. Patienterna på ett djursjukhus har i allra högsta grad kroppslig kontakt med golvet och utsätts under hela den tiden för smitt- och infektionsrisk. Detta blir allvarligast för riskgrupper såsom immunosupprimerade patienter, patienter med

hudproblem, patienter under antibiotikabehandling och patienter som antingen ska opereras eller som har opererats. Även personalen på ett djursjukhus har kontakt med golvet i mycket högre utsträckning än personalen på ett humansjukhus. Det handlar exempelvis om situationer som bandage- och droppbyte i burar eller temptagning.

Vågar

På två av klinikens vågar hittades MRSP. Detta är en punktyta som i princip alla djur på ett djursjukhus får kontakt med. Förutsättningen för att hålla den smittfri är att, som med alla andra patientnära föremål, desinficera den mellan varje patient. För att detta ska vara möjligt måste vågen vara gjord av ett material som är lätt att rengöra. Eftersom de flesta djur (ffa hundar) som kommer till ett djursjukhus är nervösa och rädda så måste dock vågens material även vara halkfritt. Halkfria underlag kan i många fall utgöras av räfflor eller andra strukturmaterial, vilka inte är lämpliga till föremål som ska kunna desinficeras. Om vågen blivit förorenad med organiskt material måste den mekaniskt rengöras innan desinfektion. Man kan också tänka sig att använda engångsmaterial som skydd. Detta ska då bytas mellan varje patient.

Ojämna golv

Ofta förekommer det olika former av golvgaller och hårdplastmattor i entréer med avsikten att de ska skrapa av smuts från skor och tassar innan man går in. Det är dock väldigt lätt att saker fastnar i dessa strukturer och de är extremt svåra att rengöra. Utanför ett djursjukhus, där hundar oftast rastas i all hast, finns det en tendens till att avföring inte plockas upp. Denna fastnar lätt på skor och skrapas av mot entréunderlaget. Smittförande material kan alltså ligga där länge och vara omöjligt att desinficera. MRSP kunde isoleras från just ett sådant golvgaller. Alla golv inne på djursjukhuset, oavsett om det är i entrén eller annanstans, ska vara lätta att rengöra och ska ej kunna ansamla smittförande material.

Akutmottagning golv

Som nämnts ovan kan det förekomma resistenta bakterier på golvet (i detta fall hittades MRSA på golvet), som då i vissa fall kan komma i direktkontakt med det akut sjuka djuret. Till en akutmottagning kommer oftast just väldigt sjuka individer. De tillhör oftast någon av de ovan nämnda riskgrupperna. Detta gör att akutmottagningen är extra känslig för smittspridning^{71,72,64}. När patienter kommer till akutmottagningen vill man ju också gärna hålla dem under uppsikt. Detta innebär att man ofta lägger dem tillfälligt på golvet där man befinner sig.

Vad gäller användandet av desinfektionsmedel vid städning av golvet gäller här samma resonemang som ovan. Väljer man trots allt att inte använda desinfektionsmedel till hela golvet kan man använda det vid punktstädning av kritiska golvytor, exempelvis om det finns ställen där man lägger patienter.

Akutmottagningens föremål

MRSP kunde isoleras från föremål och humana handtagytor på akutmottagningen. Det finns många faktorer som gör att akutmottagningen har en ökad risk att härbärgera stafylokocker. Oftast finns det inte tillräckligt med tid att desinficera föremål och ytor innan man behöver använda dem, vilket kräver att alla smittförebyggande åtgärder måste ske på rutin efter alla patienter och procedurer. På en akutmottagning finns dessutom ett behov av tillgång till ett väldigt stort sortiment av varor. Varorna måste även finnas lätt tillgängliga för alla som ska använda dem. Av denna anledning tenderar man att förvara dem på öppna hyllor där de lätt kan kontamineras (i denna studie hittades MRSP på just dessa platser på akutmottagningen) med bakterier och där de dessutom lätt återkontaminerar omgivning och patienten de används till³⁴.

Alla lösa föremål och allt förrådsmaterial ska förvaras i stängda skåp. MRSA som kontaminerar dessa föremål kan överleva flera veckor och sprida smitta till personal och patienter³⁴. Ingenting ska förvaras på öppna hyllor, vilka inte går att städa tillfredsställande. Alla föremål som används i kontakt med djur måste dessutom desinficeras direkt efter att de använts. Förekommer det att man placerar djur direkt på golvet för övervakning så måste rutin inarbetas för att minimera risken för smittspridning med patogener från golvet. Punktdesinfektion av ytan kan vara ett alternativ så länge det sker direkt innan man placerar djuret där. En förutsättning är också att personalen inte kan röra sig i det desinficerade området och att personalen inte heller sprider smitta via skor och kläder vid behandling av djuret.

Operation

I denna studie hittades resistenta stafylokocker på humana tagytor inne på operation, vilket visar att det är ytterst viktigt att punktdesinficera sådana ytor. Operations-salar och utrymmen i kontakt med sådana, är lokaler som är mycket kritiska när det gäller smittspridning av meticillinresistenta stafylokocker. Anledningen är att det oftast är just dessa patienter som blir infekterade (se avsnitt om MRSP). I en operationssal finns många ytor och mycket föremål som ska kunna hållas så sterila som möjligt. Det kräver att alla ytor i kontakt med luften måste kunna hållas fria, dvs ligger lösa föremål på hyllor och liknande är det omöjligt att städa på ett tillräckligt sätt. I denna studie hittades MRSA i två operationssalar varav den ena var en ortopedoperationssal. Provtagningsplatserna var humana tagytor vilket tyder på att det troligen rör sig om en eller flera person/er i personalen som bär på smittämnet.

Inom humansjukvården är det tillåtet att arbeta kliniskt även om man är bärare av MRSA. Man ska dock inte ha patientkontakt om man har sår eller liknande då man anser att det enbart är dessa personer som utgör en smittrisk och inte de som enbart är koloniserade⁶⁴. Meticillinkänsliga *S. aureus* hittades både i en av operationssalarna samt i förberedelserummen till de två operationssalarna. Som nämnts tidigare är förekomsten av stafylokocker på ytor ett tecken på kontamination samt en indikation på att även meticillinresistenta stafylokocker kan placeras där och överleva.

Det är viktigt att alla ytor går att rengöra och desinficera, vilket innebär att inga lösa föremål kan förvaras på hyllor och liknande.

Eftersom akutmottagningen har så nära kontakt med akutoperationssalen så måste man säkerställa att inga personer rör sig där igenom. Ett krav för det är att det

finns en tydligt utmarkerad spärr som personalen respekterar. En bra spärr ska göra att det blir komplicerat att gå ”fel” väg. Lokalens utformning gör också att det blir mycket närmare att ta vägen genom akutoperation för att komma till medicinförråd och liknande, vilket ytterligare visar att spärren måste vara tydlig. På väg in till en operationssal är det viktigt att åtgärda de smittämnen man har på bland annat skor. Eftersom situationen är sådan att akutoperation har samma golv som akutmottagningen kan man tänka sig att också samma patogener förekommer på båda golven. Att ha den tydliga spärren en bit utanför operation (som en sluss) kan vara en idé. Dessutom kan man tänka sig att städa operationsgolven med desinfektionsmedel.

Infektionsavdelning

Inne på infektionsavdelningen togs ett stort samlingsprov där flera rena föremål ingick. Föremålen klassades som djurkontaktföremål, men de var smittrenade enligt gällande protokoll. MRSP hittades i detta prov.

På en infektionsavdelning kan man förvänta sig ett högt bakterietryck. Bakterierna ska dock inte förekomma på fel ställen. Även i isoleringsavdelningen finns individer som är nedsatta och svaga varför det är extra viktigt med god hygien i denna avdelning.

Stallavdelning

I stallavdelningen provtogs alla humana tagytor i ett samlingsprov. Exempelvis provtogs handtag, radioapparat, markeringspennor mm. MRSP kunde isoleras i detta prov. Stallavdelningar innebär en ökad risk för smittspridning då det sker en långvarig indirekt kontakt mellan djur. Flera djur i samma rum är en riskfaktor. Lokaler med oplanerade flöden leder också till att många djur tvingas röra sig på samma golvytor. En riskfaktor för indirekt smittspridning via otvättade händer är att många patienter i stallavdelningarna inte ses av personalen som smittförande och att man därför inte följer strikt handhygien. En annan riskfaktor är smittspridning via kläderna. Att arbeta på stallavdelningen innebär mycket nära kontakt med djuren vid exempelvis bandagebyten och temperaturtagning. Eftersom det frekvent sker spolning och tvättning av burar mm föreligger också en stor risk att arbetskläderna blir blöta. Vid arbete som kan leda till att arbetskläderna blir blöta ska förkläde användas. Vid nedsmutsning av kläderna ska de bytas. Oerfaren personal kan också utgöra en risk för smittspridning, då hygienrutiner inte är inarbetade. Stallavdelningen blir ofta första station för nyanställd personal och praktikanter.

Personalhundar ska inte hållas i samma avdelning som sjuka patienter. Dessa kan fungera som symptomfria smittbärare och återkontaminera avdelningen. Dessutom riskerar de att få infektioner. Rent material som ska användas till patienter (exempelvis fallar) ska förvaras i stängda skåp och ytor ska vara lätta att rengöra.

Dermatologiavdelning

Provet från dermatologirummet innefattade humana tagytor och var positivt för MRSP. Dermatologipatienter och därmed miljön på avdelningen innebär risk för selektion för resistenta bakterier, ffa för den höga frekvensen av antibiotikabehandling⁴⁸. Djur som kommer hit har ofta en bruten hudbarriär och

stafylokocker kan enkelt få fäste och orsaka infektion. Dermatologiavdelningen är också en av de få platser som generellt kan anses vara en riskplats, även för andra djurkliniker och djursjukhus. Noggrann rengöring och desinfektion krävs av kontaktytor i ett sådant här rum. Dessutom ska lösa föremål hållas i stängda skåp.

Tangentbord

I denna studie var tangentborden positiva för MRSP. Tangentbord används av många olika personer under en dag och kan således fungera som en fantastisk källa till smittspridning. Eftersom det är fingrarna som blir kontaminerade så får man inte glömma att det även finns en risk för smitta till människa. Av de två bakteriearter som diskuteras här är smitta med MRSA till människa det troligaste. Vi har nu även börjat se de första fallen av MRSP infektioner hos människa⁵⁷ och även om de är få är det alltså inte otroligt att vi i framtiden även kommer att se smitta av denna patogen mellan djur och människor. Att skydda tangentborden från kontamination kan göras med någon form av skyddsplast. Skyddsplasten kan vara av engångsmaterial eller av material som tål desinfektion. Basal handhygien innebär också att händerna ska desinficeras före och efter kontakt med rena föremål.

SLUTSATS

Eftersom dagens problem med meticillinresistenta bakterier (samt andra nya patogener i sjukvårdsmiljö) troligtvis bara är början på ett mycket större problem, så måste vi redan nu börja planera vårt smittskyddsarbete noggrant på djursjukhus och kliniker.

I dagens läge kan vi inte skilja mellan smittförande och icke smittförande patienter när de stiger innanför dörren. Vi måste börja betrakta alla patienter som potentiella bärare och därmed också införa rutiner och policys som minskar risken för smittspridning mellan patienter.

För ett djursjukhus handlar det inte bara om att sätta upp flaskor med handdesinfektion och sedan tro att allt ska lösa sig. Smittskydd och vårdhygien är en oerhört komplex fråga och för att alla delar av problemet ska kunna hanteras så krävs att det finns någon eller några som är ansvariga för området. Delområden för de ansvariga att betänka kan vara allt från basala hygienrutiner och hur man får personal att följa dem till utbildning och fortbildning av personal och utvärdering av nya rutiner, processer och förbrukningsartiklar.

BEGRÄNSNINGAR OCH FELKÄLLOR

Provtagning och odling

1. När projektet startades var dubbelhemolysen ett kriterie för urval av kolonier på blodplattan. Allt eftersom projektet löpte visade det sig att även kolonier med svagare hemolys kunde vara av intresse. Detta gjorde att de första proverna blev hårdare selekterade än de senare.
2. Att så många prover blev kontaminerade kan innebära att flertalet kolonier har missats.
3. Att ta stora samlingsprover kan innebära att man även får med fler kontaminanter i provet. Vid vidare provtagning borde man väga för- och nackdelarna med att ta stora respektive mindre prover.

FRAMTIDA STUDIER

1. Det skulle vara intressant att göra en utvidgad studie för att vidare undersöka eventuella riskplatser i djursjukhusmiljö och om man kan se samma riskplatser inom olika djursjukhus.
2. Eftersom golvet betydelse för smittspridning är en av de faktorer som skiljer human- och djursjukvård är det viktigt att studier som undersöker golvet betydelse för smittspridning sker i djursjukhusmiljö och inte i humansjukhusmiljö.

LITTERATURFÖRTECKNING

- 1 Hájek, V. (1976) *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *International Journal of Systematic Bacteriology* 26, 401-408.
- 2 Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M. *et al.* (2005) *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 55, 1569-1573.
- 3 Raus, J & Love, D.N. (1983) Characterization of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus* isolated from veterinary clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 18, 789-792.
- 4 Morris, D., Rook, K.A., Shofer, F.S. *et al.* (2006) Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). *European Society of Veterinary Dermatology* 17, 332-337
- 5 Cox, H.U. (2006) Infectious diseases of the dog and cat. 3. ed. Canada. Kap 36, 316-320. Elsevier. (ISBN-10: 1-4160-3600-8) Green C.E. (editor)
- 6 Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E. *et al.* (2002) Veterinary microbiology and microbial disease. 1. ed. Oxford. Blackwell publishing. (ISBN: 0-632-05525-1) 43-47.
- 7 Smittskyddsinstitutet, Stockholm. Sjukdomsinformation om meticillinresistenta gula stafylokocker (MRSA). Uppdaterad 2008-12-12. Tillgänglig: <http://www.smittskyddsinstitutet.se> [2009-09-25]
- 8 Hanselman, B.A., Kruth, S. & Weese, J.S. (2008) Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. *Veterinary Microbiology* 126, 277-281.
- 9 Griffeth, G.C., Morris, D.O., Abraham, J.M. *et al.* (2008) Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Veterinary Dermatology* 19, 142-149.
- 10 Abraham, J.M., Morris, D.O., Griffeth, G.C. *et al.* (2007) Surveillance of healthy cats and cats with inflammatory skin disease for colonization of the skin by methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* ssp. *schleiferi*. *Veterinary Dermatology* 18, 252-259.
- 11 Reimegård, E. (2008) Bärarskap av meticillinresistenta *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) hos svenska hundar. ISSN: 1652-8697. Examensarbete nr 2008:66. Sveriges LantbruksUniversitet.
- 12 Ayliffe, G.A.J., Collins, B.J., Lowbury, E.J.L. *et al.* (1967) Ward floors and other surfaces as reservoirs of hospital infection. *Journal of Hygiene* 65, 515-536.
- 13 Jeanes, A., Rao, G. & Otter, J.A. (2005) Eradication of persistent methicillinresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using Hydrogen Peroxide Vapour (HPV) decontamination. *Journal of Hospital Infections* 61, 85-86.
- 14 Neely, A.N. & Maley, M.P. (2000) Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 724-726.
- 15 Stewart, G.T. & Holt, R.J. (1963) Evolution of natural resistance to the newer penicillins. *British Medical Journal* 1, 308-312

- 16 Venezia, R.A., Domaracki, B.E., Evans, A.M. *et al.* (2001) Selection of high-level oxacillin resistance in heteroresistant *Staphylococcus aureus* by flouoroquinolone exposure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, 375-381.
- 17 Devriese, L., Van Damme, L.R. & Fameree, L. (1972) Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe B* 19, 598-605.
- 18 Jevons, M.P. (1961) Celebin-resistant Staphylococci. *British Medical Journal* 1, 124-125.
- 19 Klevens, R.M., Morrison, M.A., Nadle, J. *et al.* (2007) Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Journal of the American Medical Association* 298, 1763-1771
- 20 Tiemersma, E.W., Bronzwaer, S.L.A.M., Lyytikäinen, O. *et al.* (2004) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerging Infectious Diseases* 10, 1627-1634.
- 21 Ko, K.S., Lee, J.Y., Suh, J.Y. *et al.* (2005) Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in asian countries. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 421-426.
- 22 Kesah, C., Redjeb, S.B., Odugbemi, T.O. *et al.* (2003) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. *Clinical Microbiology and Infection* 9, 153-156.
- 23 Kirby, W.M.M. (1944) Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 99, 452-453.
- 24 Hartman, B.J. & Tomasz, A. (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 158, 513-516.
- 25 Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M. *et al.* (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359, 1819-1827.
- 26 Smith, T., Pearson, M.L., Wilcox, K.R. *et al.* (1999) Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The New England Journal of Medicine* 340, 493-501.
- 27 Oie, S. & Kamiya, A. (1996) Survival of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on naturally contaminated dry mops. *Journal of Hospital Infection* 34, 145-149.
- 28 The European Antimicrobial Resistance Surveillance System www.earss.rivm.nl
- 29 Smittskyddsinstitutet Stockholm (2008) Statistik för meticillinresistentä gula stafylokocker (MRSA). Tillgänglig: <http://www.smittskyddsinstitutet.se> [2009-09-05]
- 30 Smittskyddsinstitutet och Strama (Swedish Strategic Programme against Antibiotic Resistance). SWEDRES 2008. Tillgänglig: <http://www.smittskyddsinstitutet.se> [2009-08-15]
- 31 Pak, S.I., Han, H.R. & Shimizu, A. (1999) Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dogs in Korea. *Journal of Veterinary Medical Science* 61, 1013-1018.
- 32 Lee, J.H. (2003) Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6489-6494.

- 33 Seguin, J.C., Walker, R.D., Caron, J.P. *et al.* (1999) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1459-1463.
- 34 Dietze, B., Rath, A., Wendt, C. *et al.* (2001) Survival of MRSA on sterile goods packaging. *Journal of Hospital Infection* 49, 255-261.
- 35 Hartmann, F.A., Steven, M.S., Trostle, S. *et al.* (1997) Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a post-operative wound infection in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 211, 590-2.
- 36 Cefai, C., Ashurst, S. & Owens, C. (1994) Human carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* linked with pet dog. *Lancet* 20, 539-40
- 37 Statens Veterinärmedicinska Anstalt (2008). Svavet nr 2 zoonoser - en trendsparning Tillgänglig: <http://www.sva.se> [2009-08-15]
- 38 Eugster, S., Schawalder, P., Gaschen, F. *et al.* (2004) A prospective study of postoperative surgical site infections in dogs and cats. *Veterinary Surgery* 33, 542-550
- 39 Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y. *et al.* (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 1118-1125
- 40 Anderson, M.E.C., Lefebvre, S.L. & Weese, J.S. (2008) Evaluation of prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel attending an international equine veterinary conference. *Veterinary Microbiology* 129, 410-417.
- 41 de Neeling, A.J., van den Broek, M.J.M., Spalburg, E.C. *et al.* (2007) High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary Microbiology* 122, 366-372.
- 42 Denis, O., Suetens, C., Hallin, M. *et al.* (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. *Emerging Infectious Diseases* 15, 1098-1101
- 43 Guardabassi, L., Loeber, M.E. & Jacobson, A. (2004) Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Veterinary Microbiology* 98, 23-27
- 44 Huijsdens, X.W., van Dijke, B.J., Spalburg, Emile. *et al.* (2006) Community-acquired MRSA and pig-farming. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 5:26
- 45 Smith, T.C., Male, M.J., Harper, A.L. *et al.* (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS ONE* 4(1): e4258. doi:10.1371/journal.pone.0004258
- 46 Guardabassi, L., Stegger, M. & Skov, R. (2007) Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 in Danish slaughter pigs. *Veterinary Microbiology* 122, 384-386.
- 47 Statens Veterinärmedicinska Anstalt. MRSA hos djur. Senast uppdaterad 2009-09-30. Tillgänglig: [http:// www.sva.se](http://www.sva.se)
- 48 Ulrika Grönlund-Andersson (personlig kommunikation)
- 49 Kania, S.A., Williamson, N.L., Frank, L.A. *et al.* (2004) Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. *American Journal of Veterinary Research* 65, 1265- 1268.

- 50 Scanvic, A., Denic, L., Gaillon, S. *et al.* (2001) Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage. *Clinical Infectious Disease* 32, 1393-1398.
- 51 El Zubeir, I.E.M., Kanbar, T., Alber, J. *et al.* (2007) Phenotypic and genotypic characteristics of methicillin/oxacillin-resistant *Staphylococcus intermedius* isolated from clinical specimens during routine veterinary microbiological examinations. *Veterinary Microbiology* 121, 170-176
- 52 Vengust, M., Anderson, M.E.C., Rousseau, J. *et al.* (2006) Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. *Letters in Applied Microbiology* 43, 602-606
- 53 Zwenson, J. (2007) Antibiotikaresistens hos bakterier isolerade från friska hundar i Sverige. ISSN:1652-8697, examensarbete nr. 2007:20. Sveriges LantbruksUniversitet.
- 54 Holm, B.R., Petersson, U., Mörner, A. *et al.* (2002) Antimicrobial resistance in staphylococci from canine pyoderma: a prospective study of first-time and recurrent cases in Sweden. *The Veterinary Record* 151, 600-605.
- 55 Statens Veterinärmedicinska Anstalt (2008). SVARM Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. [online]. Tillgänglig: <http://www.sva.se> [2009-08-15]
- 56 Harvey, R.G., Marples, R.R., Noble, W.C. *et al.* (1994) Nasal carriage of *Staphylococcus intermedius* in humans in contact with dogs. *Microbial Ecology in Health and Disease* 7, 225-227
- 57 Talan, D., Staats, D., Staats, A. *et al.* (1989) *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine-inflicted human wound infections: Laboratory Characterization of a Newly Recognized Zoonotic Pathogen. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 78-81
- 58 Blood, D.C., Studdert, V.P. & Gay, C.C. (1988). Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary. 3. ed. Canada.
- 59 Scott, E., Duty, S. & Callahan, M. (2008) A pilot study to isolate *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* from environmental surfaces in the home. *American Journal of Infection Control* 36, 458-460
- 60 Centers for Disease Control and Prevention (2002). Guideline for hand hygiene in health-care settings. [online]. Recommendations and Reports 51. Nr RR-16. Tillgänglig: <http://www.cdc.gov> [2009-11-10]
- 61 Europaparlamentets och rådets direktiv 2003/99/EG (92/117 EEG) av den 17 november 2003 om övervakning av zoonoser och zoonotiska smittämnen, om ändring av rådets beslut 90/424/EEG och om upphävande av rådets direktiv 92/117/EEG. [online] Europeiska unionens officiella tidning. L 325/31. Tillgänglig: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:325:0031:0040:SV:PDF> [2009-11-01]
- 62 Beloeil, P.A., Chauvin, C., Toquin, M.T. *et al.* (2003) *Listeria monocytogenes* contamination of finishing pigs: an exploratory epidemiological survey in France. *Veterinary Research* 34, 737-748.
- 63 Marois, C., Picault, J.P., Kobisch, M. *et al.* (2005) Experimental evidence of indirect transmission of *Mycoplasma synoviae*. *Veterinary Research* 36, 759-769.
- 64 Socialstyrelsen (2007). Rekommendationer för handläggning av personal inom vård och omsorg avseende MRSA. [online]. Artikelnr 2007-130-5, Tillgänglig: <http://www.socialstyrelsen.se>. [2009-10-15]

- 65 Bruins, M.J., Juffer, P., Wolfhagen, M.J.H.M. *et al.* (2007) Salt tolerance of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 682-683.
- 66 Peterson, A.C., Black, J.J., Gunderson, M.F. *et al.* (1964) Influence of pH and salt on Staphylococcal growth in mixed populations. *Applied Microbiology* 12, 70-76.
- 67 Parfentjev, I.A. & Catelli, A.R. (1964) Tolerance of *Staphylococcus aureus* to sodium chloride. *Journal of Bacteriology* 88, 1-3
- 68 Blythe, D., Keenlyside, D., Dawson, S.J. *et al.* (1998) Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Hospital Infection* 38, 67-69.
- 69 Marshall, B., Sen, R.A., Chadwick, P.R. *et al.* (1998) Environmental contamination of a new general surgical ward. *Journal of Hospital Infection* 39, 242-243
- 70 Corcoran, G.D. (1997) Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the home environment. *Journal of Hospital Infection* 37, 74-75
- 71 Cepeda, J.A., Whitehouse, T., Cooper, B. *et al.* (2005) Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two centre study. *The Lancet* 365, 295-304
- 72 Girou, E., Pujade, G., Legrand, P. *et al.* (1998) Selective screening of carriers for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in high risk hospital areas with a high level of endemic MRSA. *Clinical Infectious Disease* 27, 543-550
- 73 Rutala, W.A. & Weber, D.J. (2004) The benefits of surface disinfection. *American Journal of Infection Control* 32, 226-231.
- 74 Baron, F., Cochet, M., Pellerini, J.L. *et al.* (2004) Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *Journal of Food Protection* 67, 2302-2305.
- 75 Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G. *et al.* (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2480-2482
- 76 Capurro, A., Artursson, K., Persson Waller, K. *et al.* (2008) Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and *tuf* gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 134, 327-333

Bilaga 1 - Provtagningsställen

Provtagningsplats totalt 46 st	Datum 1	Datum 2	Bakt 1	Bakt 2	S - R 1	S - R 2	PCR 1	PCR 2
1. Förhall	15/4	-	<i>S. pseud</i>	-	R	-	pos	-
2. Mattor väntrum	15/4	-	<i>S. pseud</i>	-	R	-	pos	-
3. Golv väntrum	15/4	-	<i>S. pseud</i>	-	R	-	pos	-
4. Vågar	15/4	-	<i>S. pseud</i>	-	R	-	pos	-
5. Tangentbord	15/4	-	<i>S. pseud</i>	-	R	-	pos	-
6. Försökshu.korr.	15/4	-	<i>S. aureus</i>	-	S	-	-	-
7. Telefoner	15/4	21/8	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	S	-	-	neg
8. Personalstall	3/8	21/8	neg	neg	-	-	-	-
9. Ortopedstall d	3/8	21/8	neg	<i>S.aureus</i>	-	*	-	-
10. Lunchrum stud	3/8	-	neg	-	-	-	-	-
11. Iso	3/8	21/8	neg	neg	-	-	-	-
12. Diskrum	3/8	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	neg	-
13. Lab	3/8	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	neg	-
14. Toaletter	3/8	-	<i>S. aureus</i>	-	*	-	-	-
15. Tvättrummet	3/8	-	<i>S. aureus</i>	-	*	-	-	-
16. Ortopedstall	3/8	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	neg	-
17. Beh.rum	5/8	22/8	neg	<i>S. pseud</i>	-	-	-	neg
18. Rena op	5/8	22/8	neg	neg	-	-	-	-
19. Jourop	5/8	22/8	neg	<i>S. aureus</i>	-	R	-	pos
20. Förb. rena op	5/8	22/8	neg	<i>S. aureus</i>	-	-	-	neg
21. Förb. polop	5/8	22/8	neg	<i>S. aureus</i>	-	-	-	neg
22. Tandoprurum	5/8	22/8	neg	neg	-	-	-	-
23. Infektionsavd	5/8	-	<i>S. pseud</i>	-	R	-	pos	-
24. Stallkorridor	5/8	-	<i>S. pseud</i>	-	R	-	pos	-
25. Akuttorg	5/8	-	<i>S. pseud</i>	-	R	-	pos	-
26. Försöks human	21/8	-	neg	-	-	-	-	-
27. Försöks. hund	21/8	-	<i>S. pseud</i>	-	-	-	neg	-
28. Derm human	31/8	-	<i>S. pseud</i>	-	R	-	pos	-
29. Isolering golv	21/8	-	neg	-	-	-	-	-
30. Diskrum rent	24/8	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	neg	-
31. Tvättrum rent	24/8	-	neg	-	-	-	-	-
32. Glasögon	31/8	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	neg	-
33. Rakapp dermat	31/8	-	neg	-	-	-	-	-
34. Rena polop	22/8	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	neg	-
35. Vattentrask	31/8	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	neg	-
36. Rena op golv	22/8	-	neg	-	-	-	-	-
37. Iso korridoren	21/8	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	neg	-
38. Inf handtag	21/8	-	<i>S. pseud</i>	-	-	-	neg	-
39. Uppvak	22/8	-	neg	-	-	-	-	-
40. Lunchrum vet	24/8	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	neg	-
41. Handtag op	22/8	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	neg	-
42. Ortoped op	22/8	-	<i>S. aureus</i>	-	R	-	pos	-
43. Akuttorg golv	22/8	-	<i>S. aureus</i>	-	R	-	pos	-
44. Inneskor	24/8	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	neg	-
45. Stall rena	21/8	-	neg	-	-	-	-	-
46. Ortopedstall h	21/8	-	neg	-	-	-	-	-

* = utgick ur studien på grund av förlorad hemolyserande förmåga efter frysning

- = ej genomfört

Bilaga 2 - Odlingsschema för S. aureus (enl. SVA)

1. Torkduken sätts till en stomacherpåse med 100 ml MH-buljong med 6,5 % NaCl. Buljong och torkduk mixas varefter påsen inkuberas aerobt i 37 °C i 16-20 h.
2. 1 ml av MH-buljongen inokuleras i 9 ml TSB med 3,5 mg/ml cefoxitin och 75 mg/L aztreonam. Inkuberas aerobt i 37 °C i 16-20 h.
3. 10 µl av TSB-blandningen sprids på, för MRSA, selektiv agar (Oxoid Chromogenic MRSA agar). Inkuberas aerobt i 37 °C i 24-48 h.
4. Baserat på morfologi väljs från selektivplattan upp till fem kolonier, bedömda som presumtiva MRSA, för renodling på nötblod.
5. Kolonier fortfarande bedömda som presumtiva MRSA verifieras med PCR, dels genom att påvisa *mecA*-genen och dels genom identifiering som *S. aureus* (*nuc*-genen).

Bilaga 3 - Odlingsschema för S. pseudintermedius (Reimegård (2008)¹¹)

1. Provtagningspinnen stryks på platta innehållande 4 % NaCl, 5 % fårblod och 6 µg oxacillin/ml i MH-agar. En cefoxitinlapp sätts i mitten av primärstryket. Plattorna inkuberas i 37 °C i 48 h.

Provtagningspinnen sätts i ett rör innehållande TSB, 4 % NaCl, 1 % Mannitol, 16 µg/ml fenolrött, 1µg/ml cefoxitin och 50 µg/ml aztreonam. Inkuberas i 37 °C i 48 h.

2. Misstänka kolonier i zonen av cefoxitinlappen plockas och sprids på nötblodagar för renodling. Inkuberas i 37 °C i 24 h.

10 µl av TSB-buljongen stryks ut på nötblodagar samt på MAST-plattor innehållande LiCl (hämmar enterokocker). Inkuberas i 37 °C i 48 h.

3. Misstänkta kolonier som strukits från MH-agarn verifieras som *S. pseudintermedius* genom biokemiska tester med trehalos, koagulas, DNAs och maltos.
4. Misstänkta kolonier utstrukna från TSB-buljongen samt misstänkta kolonier på MAST-plattan renstryks till nötblodplattor.
5. Misstänkta kolonier från blod typas med koagulas, trehalos, DNAs och maltos. Verifierade *S. pseudintermedius* sätts på Gr+ VetMICTM-platta och MRS-detektion. Stammar med resistens mot oxacillin och cefoxitin testas för latexagglutination. Positiva genomgår PCR för *mecA*- och *nuc*-genen

