



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

Selektion av resistent Escherichia coli vid låga antibiotikakoncentrationer i en gräsandmodell

Marie Nykvist

Uppsala

2013

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:27

Selektion av resistent Escherichia coli vid låga antibiotikakoncentrationer i en gräsandsmodell
Selection of resistant Escherichia coli at low concentrations of antibiotics in an in vivo mallard model

Marie Nykvist

Handledare: Shamam Muradrasoli, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Josef Järhult, Institutionen för medicinska vetenskaper, Uppsala Universitet

Examinator: Susanna Sternberg-Lewerin, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Kurskod: EX0751, Nivå A2E, 30hp

Nyckelord: antibiotikaresistens, ciprofloxacin, Escherichia coli, gräsand
Key words: antibiotic resistance, ciprofloxacin, Escherichia coli, gräsand

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:27

SAMMANFATTNING

Enligt en erkänd hypotes, *mutant selection window hypothesis*, uppstår och upprätthålls antibiotikaresistens hos bakterier endast då antibiotikakoncentrationerna ligger över *minimum inhibitory concentration* (MIC)-värdet för en känslig, omuterad population. Det här skulle innebära att de låga antibiotikakoncentrationer man finner i miljön inte borde bidra till att upprätthålla resistens. Redan subinhibitoriska antibiotikakoncentrationer har dock visat sig ha effekt på bakterier genom att t.ex. öka mutationsfrekvensen hos bakterier, selektera för resistenta mutanter och ge upphov till nya sådana. Syftet med den här studien var att undersöka om en selektion vid låga antibiotikakoncentrationer sker också *in vivo*. Som modelldjur användes gräsänder inhysta i försöksrum. Änderna inokulerades med en blandning av en ciprofloxacinkänslig respektive –resistent stam av *Escherichia coli* och utsattes sedan under ungefär två veckor för låga koncentrationer ciprofloxacin i sin vattenmiljö. Upprepade träckprov togs och proverna spreds på selektiva plattor varvid andelen ciprofloxacinresistenta kolonier av de ursprungligen inokulerade och i träcken utsöndrade bakterierna kunde bestämmas. Studien omfattade sju försöksomgångar med olika ciprofloxacin koncentration i varje försöksomgång; 0, 10, 20, 32, 100 ng/ml samt 1 och 10 µg/ml. I studien började det ske en selektion av ciprofloxacinresistenta bakterier vid ciprofloxacin koncentrationen någonstans mellan 10 och 20 ng/ml.

De koncentrationerna ligger över de man uppmätt i västerländska vattendrag, men under koncentrationer som uppmäts i Indien. Ciprofloxacin binder till sediment och jord och ackumuleras i växter. I vilt tillstånd utsätts alltså vattenfåglar som betar och söker föda i bottensediment, för högre koncentrationer än vad vattenkoncentrationerna indikerar. I studien användes stammar vars resistensmutationer uppkommit i labbmiljö och som innebar en kostnad för bakterierna. I en naturlig situation är det troligt att kostnaden skulle kompenseras för, vilket talar för att en selektion av resistenta bakterier skulle ske vid lägre koncentrationer än vad som iaktogs i det här försöket. Antibiotika i miljön kan tänkas selektera för resistenta bakterier.

SUMMARY

According to the mutant selection window hypothesis, antibiotic resistance in bacteria is selected for only when concentrations of antibiotics exceed the minimum inhibitory concentration (MIC) of a susceptible population. The low concentrations of antibiotics found in the environment would therefore not contribute to the occurrence of resistance. However, subinhibitory concentrations of antibiotics have been shown to exert an effect on bacteria by e.g. increasing the mutation rate, selecting for resistant mutants and promoting the rise of new resistant mutants.

In this study, the issue whether selection of resistant bacteria takes place at low concentrations of antibiotics also *in vivo*, was investigated using mallards as model animals. The mallards were inoculated by a mix of ciprofloxacin-resistant and – sensitive *Escherichia coli* and exposed to low concentrations of ciprofloxacin in their water for approximately 2 weeks. Several fecal samples were obtained over the period and spread onto selective plates in order to determine the fraction of ciprofloxacin resistant *E. coli* as a proportion of the total count of inoculated bacteria shedded in the fecal sample. Seven rounds were performed, each with different concentrations of ciprofloxacin; 0, 10, 20, 32, 100 ng/ml and 1 and 10 µg/ml. Selection of ciprofloxacin-resistant *E. coli* was observed at concentrations of 20 ng/ml and higher. These concentrations exceed those measured in waters in the industrialized parts of the world, but are lower than measured concentrations in India. Ciprofloxacin binds to particles and sediments and accumulates in plants. Free-living mallards graze and explore the sediments in aquatic environments and, hence, they are exposed to significantly higher concentrations of ciprofloxacin than suggested by the concentrations found in the water. The resistance mutations of the strains in this study were selected for *in vitro* in a laboratory setting and conferred a fitness cost to the bacteria. In a natural *in vivo*-setting, it is likely that the fitness cost would be compensated for and eliminated, which suggests that selection of resistant bacteria would occur at lower concentrations than was the case in this study. Environmental concentrations of antibiotics are thus at risk of selecting for resistant bacteria.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
Bakgrund	1
<i>Fitness</i> och kostnad	3
Fluorokinoloner	3
Antibiotika i miljön	5
Antibiotikaresistens i miljön	6
Antibiotikaresistens hos viltlevande fåglar	8
MATERIAL OCH METOD	9
Översikt	9
Änderna	9
Ciprofloxacinadministreringen	10
Inokulat och inokulering	10
Provtagning	11
Odlingsförfarande och analys av proverna	12
RESULTAT	13
Viable count	13
Provtagning före försöksstart	14
Provtagning under försöksomgångarna	14
Antal streptomycinresistenta <i>colony forming units</i> i proverna	14
Andel streptomycin- och ciprofloxacinresistenta <i>colony forming units</i> i proverna	16
Streptomycinesistenta bakterier i tarminnehållet vid obduktionen	18
Ändernas vikter	19
DISKUSSION	19
Antal streptomycinresistenta bakterier	19
Kolonisationslängd	20
Fraktion	21
Studien i ett större perspektiv	23
TACK	26
REFERENSER	26

INLEDNING

Få personer kan ha undgått den ökande uppmärksamheten kring antibiotikaresistens hos bakterier och de problem som följer i dess kölvatten. I flera decennier har antibiotika varit en ovärderlig hjälp i behandlingen mot bakteriella infektioner, men oron över hur framtiden kommer att se ut ökar i takt med att forskningen kring nya sorters antibiotika minskar samtidigt som resistensen mot de befintliga ökar, vilket leder till att man allt oftare får ta till sistahandspreparat så som vancomycin, fluorokinoloner och karbapenemer (Levy, 2004). I sjukhusmiljöer har resistent patogener ofta uppkommit bara ett fåtal år efter att ett nytt antibiotikum har börjat användas (Schmieder, 2012). World Economic Forum listar antibiotikaresistens som en av de största riskerna för mänskligheten (World Economic Forum, 2013).

Frågeställningen i det här examensarbetet är huruvida man kan se en selektion av ciprofloxacinresistenta *Escherichia coli* (*E. coli*) hos gräsänder som utsätts för låga koncentrationer av ciprofloxacin i sin vattenmiljö.

Bakgrund

En hypotes om hur antibiotikaresistens uppstår genom mutationer är den s.k. *mutant selection window* (MSW) *hypothesis*, enligt vilken resistent mutanter uppstår i en bakteriepopulation endast då antibiotikakoncentrationen är högre än den koncentration som till 99 % förhindrar tillväxt av den känsliga populationen. Den koncentrationen utgör selektionsfönstrets undre gräns. Den övre gränsen, alltså den koncentration som inte selekterar för resistent bakterier, är den antibiotikakoncentration där också de muterade, mest resistent bakteriernas tillväxt upphör, d.v.s. MIC-värdet (*minimum inhibitory concentration*) för de muterade bakterierna, här kallat *mutant prevention concentration* (MPC). En tillämpning av den här teorin blir att doseringsregimen för patienter under behandling borde eftersträva så höga antibiotikakoncentrationer på infektionsstället att inte heller de resistent mutanterna klarar av att föröka sig, d.v.s. att koncentrationen bör överstiga MPC. På det här sättet borde man undvika att resistens uppkommer. (Drlica, 2007)

Det innebär att koncentrationer lägre än selektionsfönstrets undre gräns inte borde ha betydelse för uppkomsten av resistens och att koncentrationer lägre än selektionsfönstrets undre gräns i miljön alltså inte skulle selektera för resistens.

Flera studier visar emellertid att bakterier påverkas redan då de utsätts för subinhibitoriska antibiotikakoncentrationer, det vill säga också då det sker en tillväxt hos den känsliga bakteriestammen. Det handlar t.ex. om att uttrycket av kolonisationsfaktorer, mutationsfrekvensen, den intrakromosomala rekombinationsfrekvensen, nedregleringen av virulensgener och den s.k. horisontella genöverföringen (med hjälp av mobila genetiska element så som plasmider och integroner) kan öka (Varhimo 2008; Henderson-Begg, 2006; López, 2007; Deneve, 2009; Lopez, 2009; Gillespie, 2005; Beaber, 2004; Functomc, 1993; Ohlsen 2003; Herold, 2005). Dessutom har en ny studie av Gullberg *et al* visat att nya resistent mutanterna faktiskt kan uppstå och att resistent mutanterna i en i övrigt känslig population har en fördel i form av snabbare tillväxthastighet redan vid ciprofloxackoncentrationer så låga som 100 pg/ml, vilket motsvarade 1/230 av MIC för den känsliga populationen. Tidigare har det föreslagits att den kostnad det innebär för mutanterna att bära resistens skulle medföra att de klarar sig sämre i situationer med lågt antibiotiketryck och att deras känsliga motsvarigheter skulle ha en tillväxtfördel under sådana förhållanden. (Gullberg, 2011)

En annan aspekt av antibiotika i låga koncentrationer är användandet av dessa som tillväxtbefrämjande tillsats i djurfoder i subterapeutiska koncentrationer. Verkningsmekanismerna är inte helt kända, men man tror att tunntarmens bakterieflora konkurrerar med djuret självt om näringsämnen och producerar toxiska substanser och att bakteriefloran hämmas av antibiotikatillsatserna. Andra teorier är att tillsatserna gör att tunntarmsepitelet förtunnas, vilket förbättrar upptaget av näringsämnen, liksom att substanserna hämmar påfrestningar från tarmkanalen på immunförsvaret (Jensen, 1998; Feighner, 1987; Krinke, 1996). Resultaten i flera studier indikerar att det finns ett samband mellan användandet av antibiotika i låga koncentrationer som fodertillsats och upp- och förekomst av resistens (Aarestrup, 2000; Bager, 1997; Mirzaagha, 2011). Efter att antibiotika som tillväxtbefrämjare förbjöds i Danmark, kunde man se en minskning av resistens mot de aktuella preparaten, något som också talar för att det finns ett samband (Aarestrup, 2001). Sverige förbjöd antibiotika som tillväxtbefrämjande tillsats i djurfoder år 1986 och sedan år 2006 gäller samma förbud i hela EU (Bengtsson, 2006; European Commission, 2003). I många andra länder så som USA, är det dessvärre fortfarande

tillåtet och vanligt förekommande. I USA handlar det t.ex. om tillsatser som ger koncentrationer på 5-10 µg/g svinfoder för virginiamycin, 40-100 µg/g för tylosin och 10-50 µg/g för oxytetracyklin (Jacela, 2009).

Fitness och kostnad

Med begreppet *fitness* hos bakterier avses en individs eller en genotyps förmåga att överleva och föröka sig (Andersson, 2010). Det är allmänt accepterat att det ofta innebär en kostnad (*fitness cost*) för bakterier att bära resistens mot antibiotika (Andersson, 2006 och 1999). Den här kostnaden uttrycks i t.ex. minskad tillväxt och virulens, och får genomslag först när bakterierna inte står under ett antibiotiketryck och de känsliga bakterierna således har en fördel. Det har föreslagits att antibiotikaresistens skulle kunna vara reversibel tack vare att en känslig population på grund av sin lägre *fitness cost* skulle konkurrera ut resistent mutant, om man upphörde med antibiotikaanvändningen. Dessvärre vet man numera att vissa resistensmutationer inte medför någon kostnad för bakterier, utan ibland rentav ger förbättrad *fitness* och att kostnader också kan kompenseras för genom mutationer. (Andersson, 2006)

Fluorokinoloner

Fluorokinoloner har använts i ungefär trettio år (Sayah, 2005). Inom veterinärmedicinen i Sverige uppgick år 2011 förskrivningen till 120 kg aktiv substans, att jämföras med siffran för bensylpenicillin och tetracykliner som låg på knappt 6700 kg respektive drygt 1000 kg (SVARM, 2012). Humanmedicinen förbrukade samma år drygt 3000 kg fluorokinoloner (SWEDRES, 2012). Siffrorna redovisar endast mängden aktiv substans som konsumerats och säger ingenting om antalet behandlingar. Förbrukningen har i Sverige minskat mer eller mindre gradvis inom de båda fälten under de senaste tio åren (SVARM 2012; SWEDRES, 2012).

Åtta länder av 28 i Europa rapporterade in en signifikant ökning av andelen fluorokinolonresistenta humana kliniska *E. coli*- isolat under tiden 2007-2010. Bara i två länder sjönk andelen resistent isolat signifikant. Av alla inrapporterade isolat var i medeltal 20,7% resistent. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2011)

Ciprofloxacin är en andra generationens fluorokinolon och var år 2010 det femte mest förskrivna antibiotikumet i USA (Drug Topics, 2011). Läkemedlet utövar en baktericid effekt på ett brett spektrum av bakterier, främst gramnegativa men också många grampositiva. Inom humanmedicinen används den flitigt i behandlingen mot bl.a. urinvägsinfektioner (Lindgren, 2003). Vanliga fluorokinoloner inom veterinärmedicin är enrofloxacin och marbofloxacin (Kemper, 2008).

Fluorokinoloners baktericida effekt består i att de förhindrar bakteriernas transkription och celledelning. Det sker genom att läkemedlet binder till och hämmar funktionen hos enzymerna topoisomeras IV och DNA-gyras, som tillhör gruppen topoisomeras II. (Drlica, 1997) Ciprofloxacinets effekt på *E. coli* beror i större utsträckning på att det hämmar DNA-gyras än topoisomeras IV, medan motsatt förhållande råder för grampositiva bakterier. (Hooper, 2000)

Resistens mot fluorokinoloner uppkommer på två olika sätt hos *E. coli*; dels genom kromosomala mutationer, dels plasmidmedierat. Den senare typen av resistens kan spridas genom horisontell genöverföring och upptäcktes så sent som 1998 hos *Klebsiella pneumoniae* (Martinez-Martinez, 1998; Hooper, 1999). Mekanismen är dock mycket mera sällsynt än kromosomala mutationer. I en koreansk studie bar t.ex. enbart 5 % av *E. coli*-isolaten från ett sjukhus på gener som kodade för plasmidmedierad kinolonresistens. De generna var dessutom intressant nog inte associerade med ciprofloxacinresistens. (Jacoby, 2003)

Utvecklingen av kromosomal resistens hos *E. coli* sker genom ackumulerade mutationer i flera gener. Dessa mutationer kan delas in i två olika klasser där den ena inbegriper gener som kodar för bakteriens DNA-gyras, så som *gyrA* och *gyrB*. Mutationer i dessa gener ger upphov till förändringar i enzymet och försämrar läkemedlets bindning till det. Den andra klassen omfattar mutationer som minskar läkemedelskoncentrationen i bakterien, genom att minska mängden transmembranella poriner som tillåter läkemedlet att komma in i cellen, eller genom att uppreglera uttrycket av effluxpumpar som för ut det ur cellen. (Hooper, 1999)

Det förekommer även korsresistens, där resistensutvecklingen mot ett sorts fluorokinolon också medierar resistens mot en annan (RAF, 2010). Man har t.ex. i

Storbritannien sett att ciprofloxacinresistensen hos humanpatogena *Salmonella* spp ökade efter att man tillåtit användandet av enrofloxacin i veterinärmedicinen (Threlfall, 1997).

Antibiotika i miljön

Den första rapporten om antibiotika i miljön publicerades 1983. Sedan dess har det utvecklats allt känsligare metoder för att detektera även mycket låga koncentrationer av dessa ämnen. (Segura, 2009)

Antibiotika hamnar i miljön på i huvudsak två sätt; dels genom att antibiotika som utsöndrats från behandlade patienter t.ex. på sjukhus och i privathushåll undgår nedbrytning i vattenreningsverk och följer med det reade vattnet ut i vattendrag och dels genom att det sker ett läckage från jordbruket, där antibiotika som administrerats i terapeutiskt, profylaktiskt eller tillväxtbefrämjande syfte utsöndras i träck och feaces och når miljön, t.ex. vid gödsling av åkermark.

Fluorokinoloner är tillsammans med sulfonamider den grupp av antibiotika som längst persisterar i miljön, inklusive vattenmiljön (Huang, 2001). Syntetiska antibakteriella läkemedel bryts oftast ned sämre än naturliga som exempelvis betalaktamer, som snabbt elimineras av miljöbakterier (Kümmerer, 2004). Fluorokinoloner är mycket stabila i höga temperaturer och mot nedbrytning i miljön m.h.a. hydrolys, men fotolyseras av UV-strålning. Nedbrytningen sker långsammare i jord än i vatten, och läkemedlen förflyttar sig snabbt från vatten till sediment och binder till det (Pico, 2007). De försvinner från avloppsvattnet främst genom att de adsorberar och binder till partiklar i slammet och är motståndskraftiga mot bionedbrytning (Lindberg 2007; Li, 2010; Golet, 2003). En studie visade att ciprofloxacin-koncentrationen i jord som gödslats med slam enbart minskade från 0,40 mg/kg torrs substans till 0,27 mg/kg på 13 månader (Golet, 2002). En avgörande faktor som bestämmer var fluorokinolonerna som nått vattenreningsverken tills sist hamnar, är alltså vad som sker med slammet (Golet, 2003).

För ciprofloxacin gäller att 45 % av en oral dos utsöndras oförändrad i urin och 25 % i faeces (RAF, 2010; Golet, 2003). I en studie på hur olika sorters antibiotika bryts ned, kunde man förutom att konstatera den låga bionedbrytningsgraden av ciprofloxacin,

också se att nedbrytningsprodukterna uppvisade antibakteriell aktivitet (Halling - Sørensen, 2003).

Merparten av forskningen på antibiotikaförekomst i miljö är gjord i höginkomstländer. Det finns begränsad kunskap om hur situationen ser ut i låginkomstländer (Segura, 2009). Ett problem som uppmärksammats på senare tid är de stora volymer av antibiotika som släpps ut från läkemedelsfabriker. Problemet råder speciellt i utvecklingsländer där vattenreningen är bristfällig. Ofta är det i dessa länder som läkemedelsföretagen låter producera de aktiva substanserna. I Indien har man t.ex. i vattendrag i anslutning till fabrikena uppmätt ciprofloxacinkoncentrationer som är högre än terapeutiska plasmakoncentrationer hos patienter under behandling. (Larsson, 2007)

Antibiotikaresistens i miljön

Det är ett faktum att det förekommer resistenta bakterier i vattenmiljön (Schwartz, 2003; Heuer, 2002; Zhang, 2009). Man har även sett i flera studier att resistensförekomsten är större hos bakterier i vattendrag nedströms vattenreningsverk än i vattendrag uppströms eller utan närhet till reningsverk (Goni-Urriza, 2000; Hamelin, 2007; Watkinson, 2007). En anledning till detta kan vara att bakterierna utsatts för resistensselekerande antibiotikakoncentrationer med ursprung i avloppsvatten. En annan anledning kan vara att avloppsvattnet bär med sig resistenta bakterier från t.ex. sjukhusmiljöer.

Bara uppskattningsvis en procent av de bakterier som finns allmänt i miljön kan odlas fram i labb med standardtekniker, vilket medfört att det fortfarande saknas kunskap om hur resistensmönstren ser ut i miljön (Heather, 2001). Man har också av tradition mest fokuserat på resistens hos humanpatogener, men på senare tid har forskningsfältet utvidgats till att omfatta även andra bakterier. Med hjälp av de modernare tekniker som detekterar resistensgener i t.ex. vatten- och jordprover har man, utan att behöva ta steget via odling, också kunnat få en bättre bild av hur antibiotikaresistens uppkommer, upprätthålls och sprids. Man använder termen ”antibiotic resistome” för att benämna den i miljön förekommande reservoar av gener som kan koda för antibiotikaresistens (Canton, 2009; Wright, 2010). Man har funnit att resistensgener är vanliga i miljön och har existerat också före människan började

användas sig av antibiotika (Song, 2005; Allen, 2009). Den här resistenspotentialen i miljön finns naturligt som svar på bakteriers egen och andra bakteriers och svampars antibiotikaproduktion.

Man har dock förstått att antibiotikaresistens uppkommer inte enbart som skydd mot antibiotika utan att fenomenet är mera komplext. Ett exempel är effluxpumpar som ger antibiotikaresistens men också pumpar ut andra substanser som är toxiska för bakterien, t.ex. desinfektionsmedel och tungmetaller (Poole, 2001; Martinez 2009a). Andra faktorer kan med andra ord selektera för resistens utan att resistens är det primära målet (Andersson, 2006). Antibiotika besitter något av en dubbelnatur i den bemärkelsen att det kan verka skadligt på bakterier, men samtidigt i låga koncentrationer ha en annan funktion, som att fungera som signalmolekyler i en bakteriepopulation och reglera metabolismen hos bakterierna (Martinez, 2009b). Dessa effekter hos molekylerna kan också vara en av förklaringarna till att antibiotikatillsatser i djurfoder i så låga doser att de inte borde vara effektiva mot subkliniska infektioner ändå främjar tillväxten hos djuren, ger mindre subkliniska sjukdomar och minskar dödligheten (Aminov, 2009).

Det råder osäkerhet kring huruvida antibiotika i miljön bidrar till att resistens uppkommer och upprätthålls. Vissa forskare menar att det saknas tillräcklig eller entydig forskning kring en mängd faktorer så som effekterna av subinhibitoriska koncentrationer och läkemedlens beteende i miljön för att dra den slutsatsen och att det snarare kan handla om redan resistent bakterier som sprider resistensgenerna vidare (Sarmah, 2006; Ohlsen, 2003; Kümmerer, 2004). Antibiotikakoncentrationerna i miljön har också ansetts vara för låga för att utöva ett selektionstryck med avseende på resistens (Summers, 2002). Andra forskare menar att antibiotika i miljön faktiskt verkar bidra till att öka resistensnivåerna (Wright, 2010; Segura, 2009; Hoa, 2011; Tello, 2012).

Om det förhåller sig så att antibiotika i miljön bidrar till att selektera för resistens hos miljöbakterier, kan dessa resistensmekanismer sedan spridas vidare till patogena bakterier genom horisontell genöverföring.

Antibiotikaresistens hos viltlevande fåglar

En tjeckisk studie visade att förekomsten av de vanligaste resistent *E. coli* - fenotyperna hos viltlevande måsar korrelerade väl med hur konsumtionsmönstren av antibiotika ser ut i Tjeckien, både veterinär- och humanmedicinskt (Dolejska, 2007). En annan studie visade hur resistensmönstret hos *E. coli* hos vilda kanadagäss varierade i enlighet med hur utsatta fåglarna var för avfall från lantbruket. Ingen resistens sågs hos bakterier isolerade från de fåglar som uppehöll sig i områden där de saknade kontakt med utödslingsprodukter från lantbruket, medan de som hade direktkontakt med utödslingsprodukter från svingårdar däremot hade signifikant högre resistensprevalens (Cole, 2005). En studie gjord i Frankrike visade höga generella nivåer av resistent *E. coli* hos måsar och många av stammarna hade likadana resistensmönster som man sett i kliniska, humana isolat, vilket indikerar att fåglarnas resistensnivåerna hos fåglarnas bakterier beror på att de vistats i områden med hög mänsklig aktivitet (Bonnedahl, 2009). I en portugisisk studie var nästan 19 % av *E. coli*-isolaten från måsar ciprofloxacinresistent (Radhouani, 2009).

Fåglar som måsar och änder uppehåller sig gärna kring vattendrag och utsätts där för både antibiotika och resistent bakterier. Fåglarna kan fungera som reservoarer för resistent bakterier som är patogena för människor och djur i människans närhet (Simões, 2010). När fåglarna migrerar kan de sedan sprida resistent patogener så som *E. coli*, *Salmonella* spp och *Campylobacter* spp, genom att deras träck förorenar åkermark och ytvatten, också långt ifrån den plats där de plockade upp resistensen. Man har hittat multiresistent *E. coli* hos arktiska fåglar, en indikation på att resistent gener eller bakterier kan spridas över stora områden och förekomma i miljöer även utan uppenbart selektionstryck p.g.a. antibiotikaanvändning. (Sjölund, 2008)

Det råder alltså osäkerhet kring hur och om resistens uppkommer och upprätthålls i vilda djur p.g.a. antibiotikakoncentrationer i miljön. Den mesta av forskningen på subinhibitoriska effekter är gjord *in vitro*. Det här examensarbetet baseras på ett *in vivo* -försök med syfte att studera om det sker en selektion av resistent bakterier i gräsänder som utsätts för låga antibiotikakoncentrationer i sin vattenmiljö.

MATERIAL OCH METOD

Översikt

Etikansökan är godkänd av Uppsala Djurförsöksetiska Nämnd, nr C125/12. Försöket bestod av sju försöksomgångar med fem änder i vardera och inleddes med att fåglarna inokulerades med en blandning av en ciprofloxacinresistent respektive – känslig stam av *E. coli*. Båda stammarna var streptomycinresistenta för att möjliggöra urskiljning från övriga tarmbakterier. Änderna utsattes sedan för ciprofloxacin i låga koncentrationer i sitt vatten i mellan 10 och 17 dagar. Det enda som i övrigt skiljde sig mellan försöksomgångarna var ciprofloxacin-koncentrationen i ändernas vatten samt det faktum att en and avlivades i ett tidigt skede och att försöksomgången således bara hade fyra änder.

Änderna provtogs kontinuerligt med bestämda tidsintervall och proverna hanterades sedan omgående på labb, för att bestämma hur stor del av de streptomycinresistenta bakterierna i träcken som var resistenta också mot ciprofloxacin vid provtagningsstillfället. Då alla änder varit negativa vid ett provtillfälle avslutades försöksomgången genom att änderna avlivades farmakologiskt med pentobarbital intravenöst i benet. I tre fall avlivades änderna trots att en fågel fortfarande utsöndrade streptomycinresistenta bakterier vid sista provtagningen. Som längst varade en försöksomgång i 17 dagar. En enkel obduktion gjordes också i samband med avlivningen där träck direkt från tunntarm, blindtarm och grovtarm provtogs och hanterades på samma sätt som de ordinära proverna. Detta för att undersöka om streptomycinresistenta bakterier kunde vara kvar i någon del av tarmen trots att proverna var negativa.

Änderna

Änderna var uppfödda i utomhushägn och var under hela försöket inhysta i Djurhuset på SVA. Samtliga fåglar var av hankön och mellan tre och sex månader gamla. Under själva försöket bodde fem stycken änder i ett försöksrum på ungefär 10 m², med tillgång till en 1 m² stor balja som var rummets enda vattenkälla. De hade fri tillgång till pellets och havre och fick spån och hö som underlag. I väntan på att tas in i försöket bodde de under likadana förhållanden, men med högre djurtäthet och större vattenvolymer. Innan änderna togs in i försöket vägdes de, liksom innan avlivning vid försöksomgångens slut.

Ciprofloxacinadministreringen

Ändernas enda vattenkälla i försöksrummet rymde 170 liter. Vattnet i den byttes ut varje dag och ciprofloxacin tillsattes. Innan varje byte togs vattenprover för att senare kunna analyseras med avseende på faktisk ciprofloxacin-koncentration.

De lägre doserna (till försöksomgångarna med koncentrationerna 10 – 100 ng/ml) framställdes genom att en lösning innehållande 0,1 M saltsyra i autoklaverat och destillerat vatten med ciprofloxacin-koncentrationen 10 mg/ml först bereddades och sterilfiltrerades. Önskad volym av denna lösning pipetterades därefter ned i ett 50 ml falconrör med ungefär 50 ml autoklaverat och destillerat vatten. De högre doserna (till försöksomgångarna med koncentrationerna 1 och 10 µg/ml) bereddades genom att (170 mg respektive 1,7 g) ciprofloxacin löstes upp i ett falconrör innehållande ca 50 ml destillerat och autoklaverat vatten med 0,1 M saltsyra. Rören förvarades i kylskåp tills de togs fram, ett för varje dag, och först blandades ut i ca fem liter vatten för att sedan blandas ut i baljan.

Inokulat och inokulering

Som ursprungsstam användes en stam av *E. coli* som isolerats från en viltlevande mås i Spanien (Linus Sandegren, Inst. för medicinsk biokemi och mikrobiologi, Uppsala Univ., pers. medd.). Stammen är i grunden ESBL-producerande och resistent mot ampicillin och cefotaxim. Med utgångspunkt i den här stammen togs sedan två isogena stammar fram, som i tillägg bar resistens mot streptomycin och den ena dessutom mot ciprofloxacin. Det här skedde genom att flera kulturer av den ursprungliga stammen odlades upp och spreds på plattor med 500 µg/ml streptomycin för att erhålla streptomycinresistenta mutanter. De enstaka kolonier som växte på dem renströks ytterligare en gång på streptomycinplattor. Den streptomycinmutant med bäst tillväxthastighet (testat med Bioscreen) valdes sedan ut. Med utgångspunkt i denna togs sedan den ciprofloxacinresistenta mutanten fram på samma sätt, genom att flera kulturer av streptomycinmutanten spreds på ciprofloxacinplattor.

MIC-värdet bestämdes med hjälp av Etest (AB bioMerieux, Solna, Sverige) för ciprofloxacin till 0,094-0,125 µg/ml hos den ciprofloxacinresistenta stammen och 0,016-0,023 µg/ml hos den känsliga. Fitnessen (d.v.s. tillväxthastigheten) hos den

ciprofloxacinkänsliga stammen i förhållande till vildtypen var 82 % och för den resistenta 79 %.

Stammarnas ny tillkomna resistensmutationer identifierades med hjälp av sekvensering. Streptomycinresistensen medierades av en mutation i *rpsL* (K43L) och ciprofloxacinresistensen av en mutation i *gyrA* (D87Y). Bägge mutationerna är vanligt förekommande. (Rotem, 2012; Hopkins, 2005)

Stammarna förvarades i frysmedium i frys i -80°C. Inför inokulering av änderna odlades de två stammarna upp på Luria agar (LA-) plattor innehållande cefotaxim (3 µg/ml). Stammarna ympades sedan ned i Luria broth (LB-) medium innehållande cefotaxim (5 µg/ml) och inkuberades över natten under skakning i 37°C. Övernattskulturerna koncentrerades därefter genom att centrifugeras ned till en pellet som sedan löstes upp i 2,5 ml LB-medium varefter lösningen späddes till 3,5 ml med ytterligare LB-medium. Därefter blandades de två kulturena (3,5 ml+3,5ml) ihop så att det slutliga inokulatet bestod av ungefär hälften av vardera den ciprofloxacinkänsliga och -resistenta stammen. För att undersöka mängden och andelen ciprofloxacinresistenta bakterier i det slutliga inokulatet, gjordes inför varje inokulering en s.k. *viable count*, där de två olika inokulaten späddes i en serie i fysiologisk koksaltlösning, spreds på LA-plattor utan antibiotika och inkuberades över natten, varefter kolonierna räknades. Inokulering gjordes med hjälp av en knappkanyl ned i matstrupen på änderna och varje and fick 1ml inokulat.

Provtagning

Den första provtagningen gjordes dag 0, d.v.s. strax innan inokuleringen, för att utesluta eventuell streptomycinresistens hos ändernas egna koliforma bakterier. Sedan upprepades provtagningarna dag 1, 3, 7, 10, 14 och 17, som längst. Försöksomgångarna avslutades senast dag 17 p.g.a. tidsplaneringen för studien. Provtagningen dag ett skedde 22-24 timmar efter inokuleringen. De övriga provtagningarna utfördes på avsedda dagar med mindre än tre timmars avvikelser från varandra. Vid provtagningstillfällena infångades och placerades varje and i en pappkartong och fick sitta där i ungefär tio minuter. Med hjälp av en steril tops togs prov från kartongen och placerades i ett 2 ml-rör med 0,5 ml medium bestående av PBS (phosphate buffered saline) med 10 % DMSO (dimetylsulfoxid). Vid två

tillfällen, då anden inte defekerade i kartongen, togs provet genom att föra in topsen 1-2 cm i andens kloak. Provet bestod med andra ord av träcken från topsen löst i 0,5 ml medium.

Vid ändernas ankomst till SVA provtogs de på ordinarie sätt för att undersöka förekomst av streptomycin- eller ciprofloxacinresistenta koliforma bakterier. Proverna spreds på EMBL-plattor (Eosin Methylene Blue Lactose agar) med 500 µg/ml streptomycin och EMBL-plattor med 0,04 µg/ml ciprofloxacin. Inför varje försöksomgång, strax innan inokuleringen, provtogs änderna ytterligare en gång för att säkerställa att de inte redan bar på några koliforma bakterier med streptomycinresistens. Proverna spreds på EMBL-plattor med 500 µg/ml streptomycin.

Vid proverna som togs i samband med obduktionerna var material och tillvägagångssätt desamma som vid ordinarie provtagningar, men proverna togs från mitt på tunntarmen, blindtarmen (den ena skänkeln) och grovtarmen. Det samlades också större mängder träck från redan nämnda tarmavsnitt och också duodenum och ileum, för att senare kunna analyseras med avseende på ciprofloxacin-koncentration i tarminnehållet. I försöksomgångarna med 0 och 10 ng/ml obducerades enbart två änder i varje, i övriga obducerades samtliga.

Odlingsförfarande och analys av proverna

På labbet pipetterades 0,5 ml av proverna (träck löst i 0,5 ml medium) och spreds med hjälp av glaskulor på EMBL-plattor med 500 µg/ml streptomycin. Plattorna inkuberades över natten och följande dag räknades kolonierna och flyttades sedan över med sterila tandpetare till ytterligare en EMBL-platta med 500 µg/ml streptomycin och en EMBL-platta med 0,06 µg/ml ciprofloxacin. Om den ursprungliga plattan hade färre än 48 st *colony forming units* (CFU) flyttades samtliga, om den hade fler flyttades 48 stycken. Kolonierna plockades ut randomiserat. På varje platta placerades också en kontroll av vardera den ciprofloxacinresistenta respektive –känsliga streptomycinresistenta stammen.

Följande dag lästes plattorna av och andelen (fraktionen) streptomycinresistenta koliformer som också var ciprofloxacinresistenta bestämdes. Vid enstaka tillfällen

förekom så riklig växt på plattorna att enskilda kolonier inte kunde plockas upp och flyttas. Då slammades en liten del av den matta som bildats på plattan upp i fysiologisk koksaltlösning och späddes i en serie, varefter utvalda spädningar spreds på streptomycinplattor. Från dessa kunde sedan kolonier plockas och flyttas på vanligt sätt.

RESULTAT

Viabla count

Resultaten från den *viabla count* som gjordes inför varje försöksomgång redovisas i tabell 1 och 2. Fraktionen, alltså andelen ciprofloxacinresistenta bakterier i det slutliga inokulatet, är uträknat som antalet ciprofloxacinresistenta CFU / (antalet ciprofloxacinresistenta + ciprofloxacin känsliga CFU).

För försöksomgången med ciprofloxacin koncentrationen 100 ng/ml saknas tyvärr data p.g.a. ett tekniskt missöde. Resultaten från de övriga koncentrationerna är dock samstämmiga och 100 ng/ml-försöket utfördes under precis samma omständigheter. Därför antas även värdena där vara i samma storleksordning.

Tabell 1. Andelen (fraktionen) ciprofloxacinresistenta bakterier i inokulatet i de olika försöksomgångarna

Försöksomgångens ciprofloxacin koncentration, ng/ml	Fraktion
0	0,46
10	0,46
20	0,48
32	0,51
100	Data saknas
10 ³	0,46
10 ⁴	0,49

Tabell 2. Antalet colony forming units (CFU) per milliliter i inokulatet i de olika försöksomgångarna

Försöksomgångens ciprofloxacin-koncentration, ng/ml	Antalet CFU/ml i inokulatet
0	2×10^{10}
10	2×10^{10}
20	$5,7 \times 10^{10}$
32	5×10^{10}
100	Data saknas
10^3	$6,3 \times 10^{10}$
10^4	$7,4 \times 10^{10}$

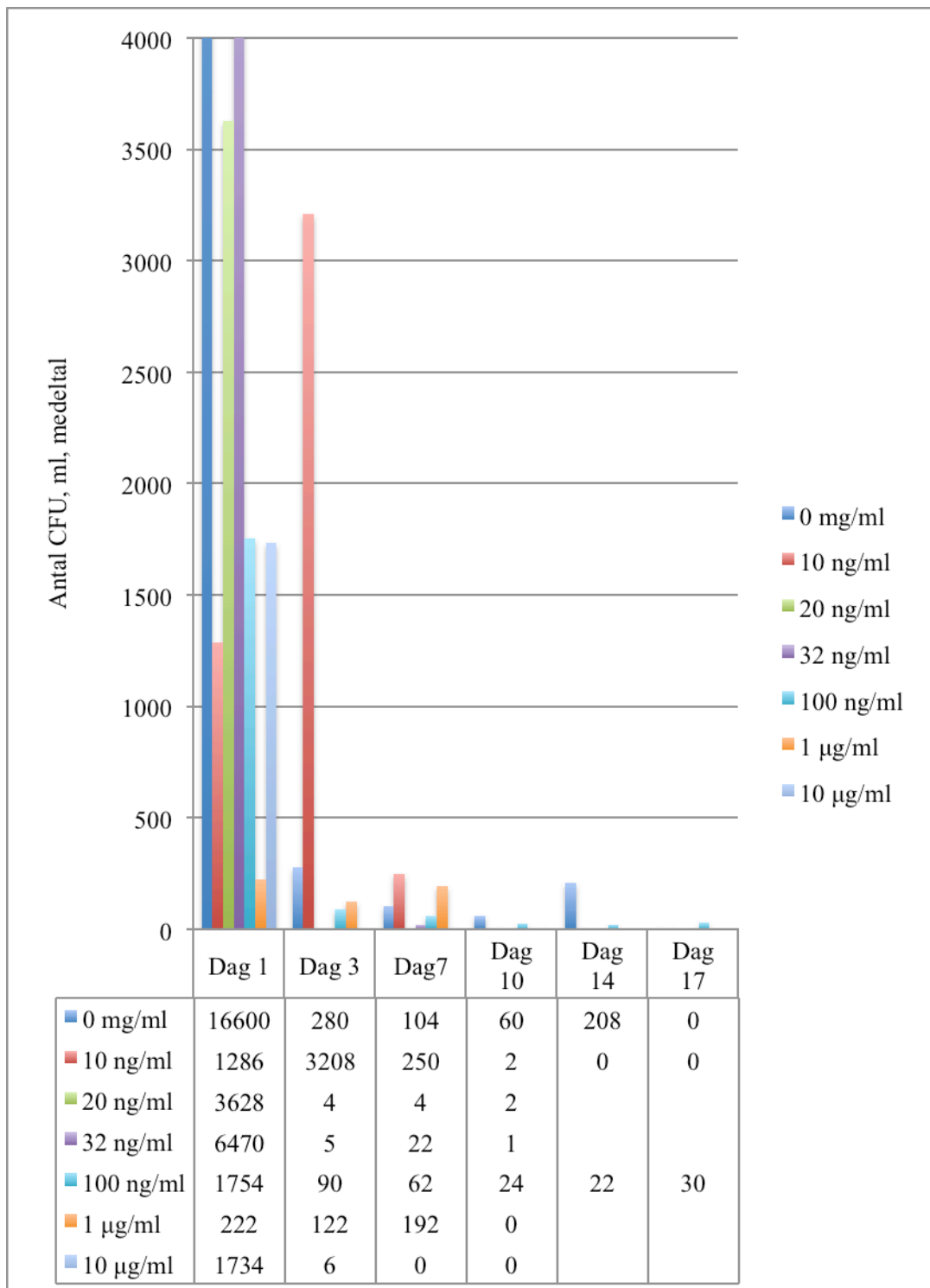
Provtagning före försöksstart

Inte vid något tillfälle kunde streptomycinresistenta koliforma bakterier i ändernas egen tarmflora påvisas i proverna. Vid den inledande provtagningen vid ändernas ankomst bar 14 av 30 provtagna änder på ciprofloxacinresistenta koliforma bakterier.

Provtagning under försöksomgångarna

Antal streptomycinresistenta *colony forming units* i proverna

Antalet CFU i proverna är beräknat som ett medelvärde av antalet CFU/ml i proverna från de fem änder som ingick i respektive grupp och redovisas i figur 1. Fyra prover, tre prover från försöksomgången utan ciprofloxacin och ett prov från den med 32 ng/ml), hade vid dag 1 så stor mängd streptomycinresistenta bakterier att kolonierna bildade som en matta på streptomycinplattorna. Då det inte gick att avgöra exakt hur många kolonier som fanns på plattan, uppskattades antalet till 25×10^3 CFU/ml.



Figur 1. Antalet streptomycinresistenta colony forming units (CFU) per milliliter i proverna, medeltal. $n=5$ i samtliga försök förutom 32 ng/ml där $n=4$. Under stapeldiagrammet ses en tabell med de exakta värdena. Två av värdena dag ett är så höga att de trunckerats i stapeldiagrammet.

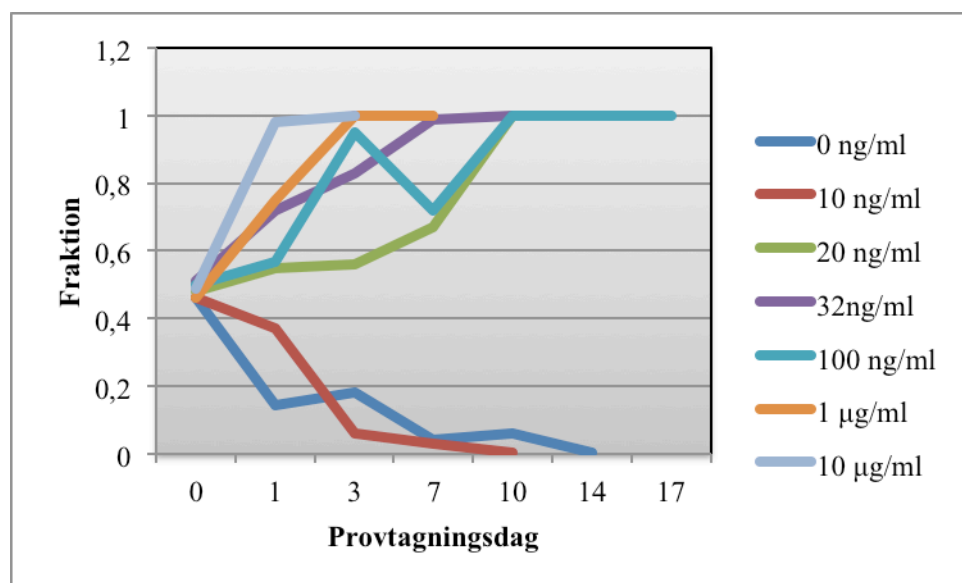
En and i försöksomgången med 32 ng/ml avlivades efter några dagar eftersom rangordningen gjorde att den inte fick tillgång till vattenbaljan. Resultaten från denna

and är inte medräknade och resultaten här bygger alltså på fyra änder. Omgångarna med koncentrationerna 20 och 32 ng/ml avbröts innan samtliga änder var negativa p.g.a. tidsbrist. I försöksomgången med 100 ng/ml fanns det också positiva fåglar vid sista provtagningstillfället. Vid 20 ng/ml hade en and 8 CFU/ml i sista provet, vid 32 ng/ml 2 CFU/ml och i den med 100 ng/ml hade en and 146 och en annan 2 CFU/ml.

Vanligtvis fortsatte en and som inte utsöndrade streptomycinresistenta bakterier i träcken vid ett provtagningstillfälle att vara negativ vid efterföljande provtagningar. Det finns dock ett fåtal undantag; tre i försöksomgången med 20 ng/ml, ett i 32 ng/ml, ett i 100 ng/ml och ett i 1 µg/ml.

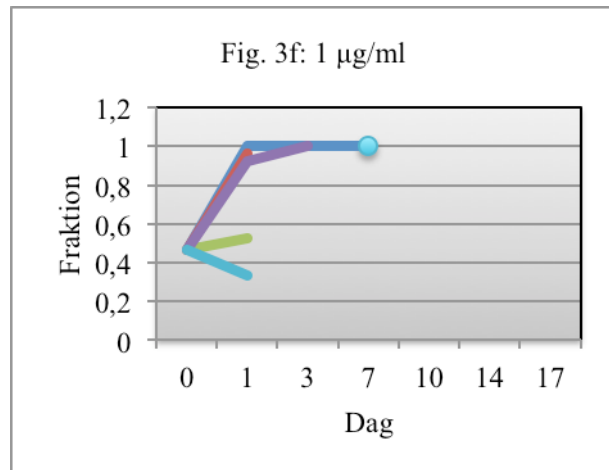
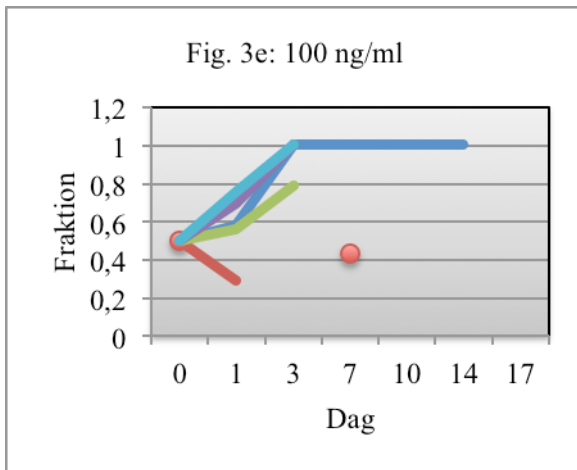
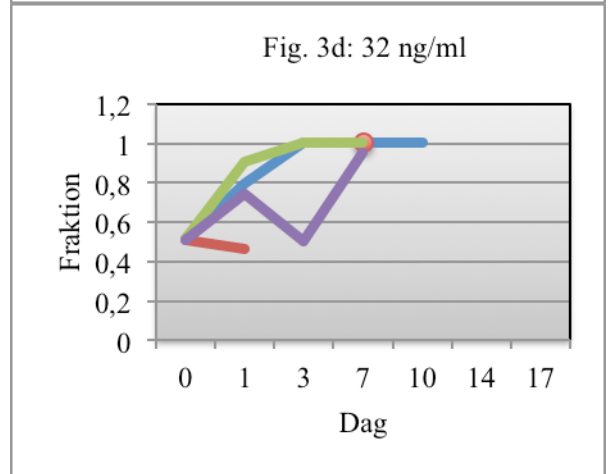
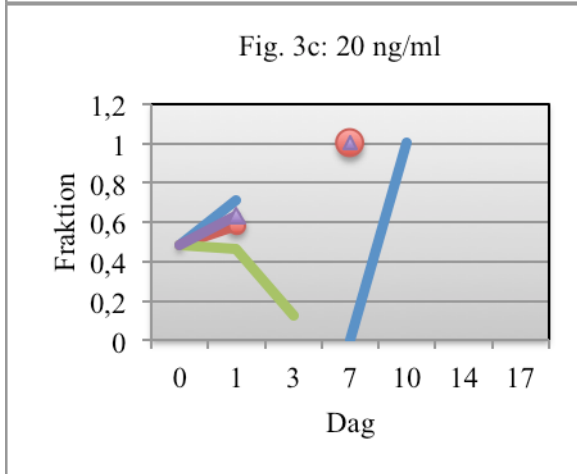
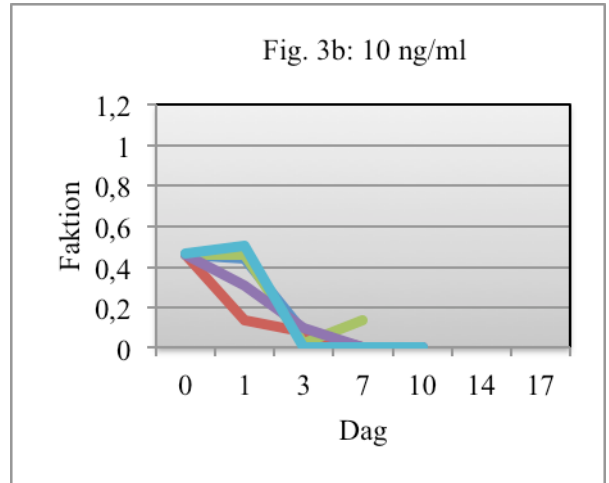
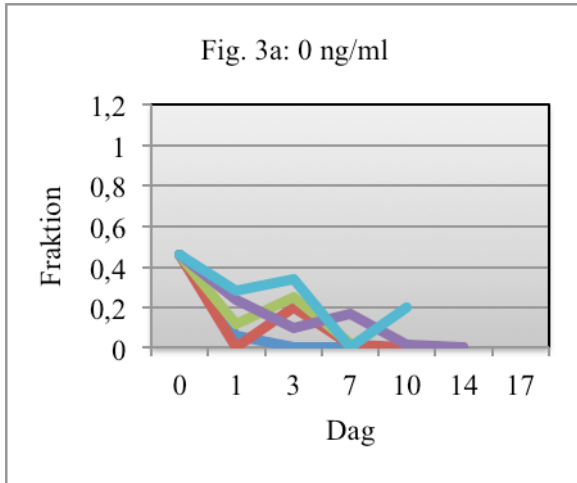
Fraktion

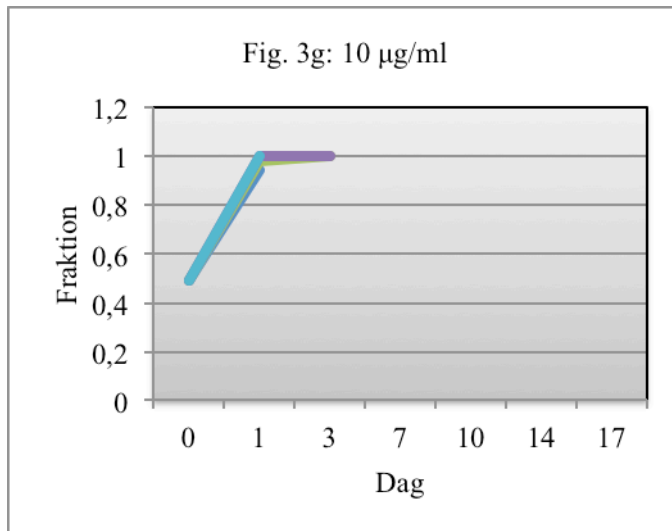
I figur 2 anges hur stor andel av de streptomycinresistenta koliforma CFU i proverna som också är ciprofloxacinresistenta, d.v.s. fraktionen ciprofloxacin- och streptomycinresistenta CFU av det totala antalet streptomycinresistenta CFU.



Figur 2. Andelen (fraktionen) ciprofloxacin- och streptomycinresistenta CFU av det totala antalet streptomycinresistenta CFU vid de olika provtagningstillfällena i de olika försöksomgångarna. Fraktionen är uträknad som ett medeltal av fraktionerna i varje enskilt prov hos de änder som ingick i respektive försöksomgång. Värdet vid dag 0 är fraktionen för inokulatet.

För att synliggöra variationen mellan änderna i en omgång, redovisas i figur 3 a-g fraktionerna omgångsvis, för varje enskild and.





Figur 3a-g. Fraktionen i de enskilda proverna från varje and i en försöksomgång. Okontinuerliga linjer indikerar att det saknades streptomycinresistenta kolonier i provet från ett provtagningsstillfälle.

Streptomycinresistenta bakterier i tarminnehållet vid obduktionen

Proverna från obduktionen var negativa med undantag för sex änder som redovisas i tabell 3.

Tabell 3. Resultaten från obduktionerna i slutet av varje försöksomgång

Försöksomgångens ciprofloxacin-koncentration, ng/ml	Tarmavsnitt	Antalet streptomycin-resistenta CFU/ml	Fraktion	Antalet streptomycin-resistenta CFU/ml i sista provet
0	Grovtarm	128	0,5	0
	Blindtarm	62	0,58	
20	Tunntarm	2	1	8
20	Grovtarm	62	0,71	0
100	Blindtarm	4	1	2
10 ⁴	Blindtarm	2	1	0

Endast ett fåtal av proverna tagna vid obduktionen innehöll alltså streptomycinresistenta koliformer. En av de fem änderna som var positiva på proverna från obduktionen och negativa på det ordinarie provet precis innan, hade varit negativ vid de två senaste provtagningarna och en annan and vid de tre senaste.

Ändernas vikter

Resultaten från vägningen av änderna vid försöksförsöksomgångens start och slut redovisas i tabell 4. Viktförändringarna hos änderna från försöksomgångarnas start till slut varierade mellan 5,6 % viktökning till 5,5 % viktminskning. Fåglarna i försöksomgången med mest ciprofloxacin var den enda omgång där alla gick upp i vikt. Från 0 och 10 ng/ml-omgångarna saknas data.

DISKUSSION

I studien tycktes det börja ske en selektion av ciprofloxacin- och streptomycinresistenta *E. coli* i änderna vid ciprofloxacin-koncentrationen 20 ng/ml i vattenmiljön, medan en koncentration av 10 ng/ml inte resulterade i en sådan selektion. Brytpunkten för när selektionen börjar ske förefaller således ligga någonstans mellan 10 och 20 ng/ml.

Förutom att inverka på den ciprofloxacin-känsliga andelen av streptomycinresistenta *E. coli* i träcken, spelade ciprofloxacin-koncentrationen i vattnet också roll för kolonisationslängden i änderna. Änderna i försöksomgången utan antibiotika i vattnet bar streptomycinresistenta *E. coli* i tarmen längst tid och i försöksomgången med högst koncentration försvann de snabbast. Det enda undantaget är en and i försöksomgången med 100 ng/ml som fortfarande utsöndrade streptomycinresistenta *E. coli* i träcken vid sista provtagningen.

Antal streptomycinresistenta bakterier

Antalet streptomycinresistenta *E. coli* i proverna relaterat till antibiotikakoncentrationen i vattnet uppvisar inte något entydigt mönster. Till exempel inokulerades änderna i försöksomgångarna utan ciprofloxacin och med 10 ng/ml i vattnet med samma inokulat, eftersom dessa två omgångar löpte parallellt (de övriga inokulaten bereddes enskilt inför varje omgång). Likväl så urskiljde änderna i den senare försöksomgången betydligt mer streptomycinresistenta bakterier i träcken vid dag 3 än änderna i den första, trots att motsatsen skulle vara att förvänta.

Antalet streptomycinresistenta *E.coli* i proverna fluktuerade hos flera individer mycket mellan provtagningarna (figur 3 1-g). Exempelvis hade en and i försöksomgången med 1 µg/ml ciprofloxacin 3200 CFU/ml i träcken dag 1 och sedan 2, 960 och slutligen 0 CFU/ml vid de följande tre provtagningarna. Variationen kan bero på vilken del av tarmen som töms vid provtagningstillfället. En tidigare studie utförd på slaktkycklingar har visat att antalet *E. coli* i blindtarmarna är högre än i övriga tarmavsnitt (Seidavi, 2010). En annan orsak till variationen kan vara att träckmängden i proverna inte varit exakt lika. Själva metoden med provtagning med tops tillför också en viss osäkerhet till studien, då mängden träck som resultaten grundar sig på är liten och innehållet i proven inte kan anses vara representativa för eller reflektera bakterieförhållanden i träcken i stort.

Kolonisationslängd

I studien tenderade stigande antibiotikakoncentrationer att ge en allt kortare kolonisationslängd i änderna. I försöksomgången utan antibiotika i vattnet hade de gjort sig av med de streptomycinresistenta *E. coli* först vid dag 17 och i försöksomgången med den högsta koncentrationen (10 µg/ml) redan vid dag 3. En individ i försöksomgången med 100 ng/ml avviker genom att den fortsatte utsöndra streptomycin- och ciprofloxacinresistenta *E. coli* fortfarande dag 17 då experimentet avslutades. Försöksomgångarna med 20 och 32 ng/ml avslutades innan samtliga änders var negativa. Dock återstod bara enstaka kolonier vid sista provtagningen i dessa försöksomgångar och det är troligt att de skulle ha varit helt negativa dag 14.

Den and i försöksomgången med 100 ng/ml som utsöndrade streptomycin- och ciprofloxacinresistenta *E. coli* under hela försöket trots att alla andra änders varit negativa sedan dag 10 är ett bra exempel på vad som kan ske i en *in vivo*-situation där individfaktorer spelar roll för ett förlopp. Anledningen till avvikelser i såväl kolonisationslängd, antal bakterier som fraktion kan vara skillnader i immunstatus, övrig tarmflora, tarmpassagehastighet och/eller allmänt hälsotillstånd. Andens tillgång till vattnet kan också ha betydelse för vilken antibiotikakoncentration bakterierna i tarmen utsätts för. Detta kan i sin tur bero på beteendefaktorer hos änderna som t.ex. rangordning i gruppen. Ändernas beteenden och rangordning är inte studerade. Noggranna observationer och kartläggningar av rangordning och uppehållstid i vattenbaljan skulle kunna ge intressant information. En annan tänkbar förklaring till

det förlängda bärarskapet är att det uppstått ytterligare mutationer som givit ökad resistens. Det är inte vidare undersökt hos den aktuella anden. I provet från en annan and i försöket med 32 ng/ml som utsöndrade ciprofloxacin- och streptomycinresistenta *E. coli* när de övriga i försöksomgången hade upphört att göra det, påvisades dock ingen förändring i MIC-värdet vilket talar emot att ytterligare mutationer uppstått.

Då änderna i försöket levde med en mer begränsad vattentillgång än situationen *in vivo* är det möjligt att fekal-oral spridning kan ha skett i större utsträckning än i det vilda. I en gräsandsstudie med liknande upplägg sågs att ESBL-producerande *E. coli* kunde spridas mellan änder i en grupp om 15 (Josef Järhult, Inst. för medicinska vetenskaper, Uppsala Akademiska Sjukhus, pers. medd.).

I denna studie förekom inget antibiotiketryck och de ESBL-producerande *E. coli*-stammar som användes var inte resistens-modifierade som i detta examensarbete. Potentiellt skulle en återcirkulation kunna leda till en överskattning av antalet streptomycinresistenta *E. coli*. I flera av försöksomgångarna är också koncentrationerna i vattnet tillräckligt höga för att inhibera tillväxten hos bakterierna; om denna faktor har betydelse skulle den eventuellt kunna bidra till att förklara den kortare kolonisationslängden i försöken med högre antibiotikakoncentrationer.

Fraktion

I studien sker en selektion av ciprofloxacinresistens hos streptomycinresistenta *E. coli* vid låga ciprofloxacin-koncentrationer i vattnet med en brytpunkt mellan 10 och 20 ng/ml.

I fitnessförsöken innan försöket inleddes tappade den resistenta stammen 3 % för varje generation gentemot den känsliga när de jämfördes med vildtypens tillväxthastighet. Försöksomgången utan ciprofloxacin visar att ciprofloxacinresistensen faktiskt innebär en kostnad för bakterierna också *in vivo*, eftersom de bakterier som bär den börjar försvinna redan dag 1.

Resistensmutationerna hos experimentbakterierna har inte uppkommit under naturligt urval utan *in vitro* under kort tid och hårt selektionstryck. Man har sett att fitnessen för ciprofloxacinresistenta gonokocker där resistensen medieras på *gyrA* till och med

kan vara högre än för vildtypen. Studien visar också att kostnaden för ciprofloxacinresistensen kan kompenseras för *in vivo* och helt elimineras (Kunz, 2012). Om ciprofloxacin-resistensmutationen hade uppkommit i det vilda under naturligt urval, är det alltså möjligt att den inte skulle ha medfört någon kostnad överhuvudtaget. Det innebär att det i en naturlig miljö skulle kunna ske en selektion av resistent bakterier vid ännu lägre antibiotikakoncentrationer än vad som iakttogs i det här försöket.

I studien sammanföll den minsta selektiva vattenkoncentrationen med MIC-värdet för den ciprofloxacin-känsliga mutanten. Det här stämmer väl överens med MSW-hypotesen. Det är dock okänt vilken den faktiska antibiotikakoncentrationen som bakterierna utsattes för i tarmen var, vilket gör det svårt att relatera MIC-värdet för stammarna till koncentrationen i vattnet. Ciprofloxacinets höga biotillgänglighet och utsöndringsgraden i faeces i kombination med att det skedde en utspädning av tarminnehållet av fodret, talar för att bakterierna utsattes för lägre ciprofloxacin-koncentrationer än de i vattnet. Avsikten är att analysera obduktionsproverna med avseende på ciprofloxacin-koncentrationen i olika delar av tarmen.

I slutet av försöksomgångarna återfinns i regel mycket få streptomycinresistenta *E. coli* i proverna. Det här har inverkan på de redovisade fraktionsresultaten där fraktionen för en enskild and potentiellt kunde ändrats från 0 till 1 beroende på om den enda streptomycinresistenta *E. coli*-kolonin i provet var ciprofloxacin-känslig eller -resistent. När samtliga fraktionsberäkningar gjordes på ett alternativt sätt genom att addera samtliga ciprofloxacinresistenta CFU vid ett provtagningstillfälle och dividera detta med det sammanlagda antalet streptomycinresistenta *E. coli* i proverna, blev resultaten förhållandevis lika som de som redovisas i figur 2. Skillnaderna var att försöksomgången med 32 ng/ml då bättre faller in i mönstret med stigande fraktioner vid stigande koncentrationer och att fraktionen i försöksomgången med 20 ng/ml först sjunker från dag 1 till dag 3 och sedan stiger till 1.

Hur de ciprofloxacinresistenta koliformerna som redan fanns hos flera av änderna innan försökets start påverkar studien är inte närmare undersökt. Det förefaller dock osannolikt att spridning av ciprofloxacinresistens från dessa till experimentbakterierna

skulle förekomma då den plasmidmedierade fluorokinolon-resistensgenen *qnrA* är ovanlig i Enterobacteriaceae (Robicsek, 2006).

Studien i ett större perspektiv

Syftet med studien var att undersöka om det sker en selektion av resistent bakterier vid låga antibiotikakoncentrationer i en *in vivo*-modell. Den lägsta selektiva vattenkoncentrationen av ciprofloxacin i det här försöksupplägget låg någonstans mellan 10 och 20 ng/ml.

Den lägsta ciprofloxacin-koncentrationen där det skedde en selektion i studien är högre än de man som regel uppmätt i vattendrag. I flera studier på olika håll i världen har man uppmätt ytvattenkoncentrationer under 1 ng/ml eller inte kunnat detektera ciprofloxacin (Xiao, 2008; Christian, 2003; Barnes, 2008; Brown, 2006; Focazio, 2008, Pena, 2007; Kolpin, 2002). Vid provtagningen av vatten från 18 floder i Kina uppmättes 5,93 ng/ml ciprofloxacin, som högst (Wei, 2012). Den uppskattade koncentrationen av ciprofloxacin i tyska ytvatten, baserat på information om konsumtion, vattenrening och nedbrytning, är 0,05 ng/ml, vilket också gäller för motsvarande uppskattning för europeiska ytvatten (Kümmerer, 2003; Halling-Sørensen, 2000). Betydligt högre koncentrationer på 2,5-6,5 µg/ml uppmättes i en sjö i anslutning till, men utan direkt tillflöde av avloppsvatten från, en läkemedelsfabrik i Indien (Fick, 2009). De flesta studier är utförda i I-länder men problemen med antibiotika i miljön förväntas vara högre i U-länder.

Ciprofloxacin-koncentrationerna i avloppsvatten innan rening är högre. I avloppsvattnet direkt från ett schweiziskt, ett brasilianskt och flera tyska sjukhus var ciprofloxacin-koncentrationerna upp till 87, 99 och 124 ng/ml (Hartmann, 1998; Martins 2008; Hartmann, 1999). I en reviewartikel som sammanställt resultaten i 52 artiklar var mediankoncentrationen av fluorokinoloner i avloppsvatten 205 ng/ml och medelkoncentrationen 152 µg/ml (Segura, 2009). Innan vattnet renats, har bakterierna i avloppsvattnet hunnit utsättas för de högre koncentrationerna en tid och en eventuell resistensselektion kan ha skett. En del av dessa resistent bakterier kan sedan undgå processerna i vattenreningsverket och släppas ut i vattendrag och där sprida sina resistensgener vidare. I en vietnamesisk studie fanns det fortfarande kvar fler än 1000 *E. coli*-kolonier per 100 ml renat vatten, som släpptes ut i det mottagande

vattendraget, trots att den biologiska reningen i verket hade minskat mängden bakterier hundrafalt (Duong, 2008).

Efter rening är koncentrationerna i vattnet lägre. Ciprofloxacinkoncentrationerna i renat avloppsvatten var i en schweizisk och en kanadensisk studie ungefär 0,12 ng/ml (Morasch, 2010; Miao, 2004). I det renade vattnet från ett indiskt vattenreningsverk som renar vatten från flera läkemedelsfabriker, uppmättes dock så höga koncentrationer av ciprofloxacin som 31 µg/ml (Larsson, 2007). I det vatten som släpptes ut i vattendrag från ett sjukhus i Hanoi uppmättes ciprofloxacinkoncentrationen till 10,9 ng/ml som högst (Duong, 2008).

I västvärlden är de flesta uppmätta koncentrationerna av ciprofloxacin i vattendrag alltså lägre än de vattenkoncentrationer i studien där selektion av ciprofloxacin- och streptomycinresistenta *E. coli* började ske. Det här talar emot att vattenkoncentrationerna skulle ha betydelse för selektion av resistenta bakterier i denna del av världen.

Trots att man uppmätt så låga ciprofloxacinkoncentrationer i vattendrag kan betydligt mer ciprofloxacin finnas i miljön bundet till partiklar och slam. Så mycket som 90 % av läkemedlet i avloppsvatten binder till slammet i vattenreningsverk (Giger, 2003; Lahti 2011). Koncentrationen i slammet, som också nådde miljön, var från ett reningsverk på Gran Canaria 200 ng/g (Montesdeoca- Esponda, 2012). Motsvarande siffra för ett schweiziskt reningsverk var 2,4 µg/g torrsvikt (Giger, 2003). Om slammet sedan används som gödselmedel eller av annan anledning hamnar i miljön, tillförs stora mängder ciprofloxacin till miljön.

Man har också sett att ciprofloxacin absorberas i sediment och binder till jord (Nowara, 1997). Bottensediment från vatten i anslutning till ett vattenreningsverk på Gran Canaria hade ciprofloxacinkoncentrationer på 34,3 ng/g (Montesdeoca - Esponda, 2012). I sediment från tre kinesiska floder hittade man ciprofloxacinkoncentrationer på 653 ng/g som högst (Zhou, 2011). I 17 % av jordproverna från 20 österrikiska fält som gödslats med slam 4-8 veckor innan, fann man enro- och ciprofloxacin, som högst 0,37 µg/g (Martínez-Carballo, 2007). I

brasilianska jordprover hittades inte ciprofloxacin, men däremot enrofloxacin i medelkoncentrationen 22,93 µg/g (Pereira Leal, 2012).

Gräsänder och andra vilda vattenfåglar betar gärna i anslutning till vattendrag och söker föda i bottensedimenten. Ciprofloxacin tas dessutom upp av växter och ackumuleras i dessa under en växtsäsong (Lillenberg, 2010). Det innebär att fåglarna sannolikt utsätts för betydligt högre koncentrationer av ciprofloxacin än vad koncentrationerna i vattendragen indikerar. Detta antagande i kombination med att resistenta bakterier förväntas selekteras för vid lägre koncentrationer än i studien i situationer med naturligt uppkomna resistensmutationer, talar för att antibiotika i miljön faktiskt skulle kunna selektera för resistens. Det saknas dessutom tillräcklig kunskap om antibiotikakoncentrationer i miljön i områden där koncentrationerna kan antas vara som högst. Det är däremot ett faktum att antibiotikakoncentrationerna i miljön stiger. En nederländsk studie där jordprover ända från 1940 och framåt analyserats, visar att nivåerna av alla olika antibiotikaklasser som testades har stigit signifikant (Knapp, 2010).

I takt med att kunskapen om hur antibiotikaresistens uppkommer, upprätthålls och sprids ökar, ökar vikten av att minska eller i alla fall begränsa ytterligare ökning av förekomsten. Ett samlat, kraftfullt grepp kring problematiken är mycket viktigt men har tyvärr inte åstadkommit än. I USA och många andra länder är antibiotika som fodertillsats i livsmedelsproduktionen fortfarande tillåtet. I flera länder säljs antibiotika direkt över disk, utan krav på recept från läkare. Det finns heller inte några bestämmelser som reglerar hur mycket antibiotika som får släppas ut i miljön (Kemper, 2008), vilket är mycket problematiskt speciellt med tanke på länder som Indien, där det produceras mycket antibiotika, men där vattenreningen inte är tillräckligt bra. Ytterligare en aspekt av detta problem är att många länder, inklusive Sverige, i sin iver att minska sjukvårdskostnaderna köper billiga generiska läkemedel från Indien och därigenom bidrar till resistensutvecklingen.

Jordbruksverket har nyligen reviderat föreskrifterna om läkemedel och läkemedelsanvändning som försvårar, men inte förbjuder, användandet av vissa sistahandspreparat som karbapenemer inom veterinärmedicinen. Grundregeln för kinoloner är att veterinär endast får inleda behandling med antibiotika innehållande

kinoloner när mikrobiologisk undersökning och resistensbestämning visar att verksamt alternativ saknas.

(Statens jordbruksverks författningssamling, SJVFS 2012:32, 2012) Det här, liksom kampanjer på sjukhus och bland allmänheten om minskad antibiotikaanvändning, är steg i rätt riktning. Problemen går inte att lösa inom en disciplin, utan att ett brett och välutvecklat samarbete mellan läkare, mikrobiologer, ekologer, veterinärer, politiker med flera är absolut nödvändigt.

TACK

Ett stort tack till Josef Järhult, Ulrika Lustig, Susanna Bloemberg och Anna Gillman!

REFERENSER

- Aarestrup, F. M., Kruse, H. Tast, E., Hammerum, A. M. & Jensen, L. B. (2000) Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland and Norway. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease* 6, 63-70.
- Aarestrup, F. M., Seyfarth, A. M., Emborg, H. D., Pedersen, K., Hendriksen, R. S. & Bager, F. (2001) Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food- animals in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 2054-2059.
- Allen, H. K., Moe, L. A., Rodbumrer, J., Gaarder, A., Handelsman, J. (2009) Functional metagenomics reveals diverse b-lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME Journal* 3, 243–251.
- Andersson, D. I. & Levin, B. R. (1999) The biological cost of antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* 2, 489–493.
- Andersson, D. I. (2006) The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Current Opinion in Microbiology* 9, 461–465.
- Andersson, D. I. & Hughes, D. (2010) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology* 8, 260-271.
- Aminov, R. I. (2009) The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology* 11(12), 2970–2988.
- Bager, F., Madsen, M., Christensen, J. & Aarestrup, F. M. (1997) Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine* 31, 95-112.
- Barnes, K. K., Kolpin, D. W., Furlong, E., Zaugg, S. D., Meyer, M. T. & Barber, L. B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States: I) groundwater. *Science of the Total Environment* 402, 192–200.
- Beaber, J.W., Hochhut, B. & Waldor, M. K. (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427, 72–74.
- Bonnedahl, J., Drobni, M., Gauthier-Clerc, M., Hernandez, J., Granholm, S., Kayser, Y., Melhus, Å., Kahlmeter, G., Waldenstrom, J., Johansson, A. & Olsen, B. (2009)

- Dissemination of *Escherichia coli* with CTX- M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. *PLoS One*, 4(6).
- Brown, K. D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T. H. & Mawhinney, D. B. (2006) Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment* 366, 772–783.
- Canton, R. (2009) Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting, *Clinical Microbiology and Infection* 15 (Suppl. 1), 20–25.
- Cole, D., Drum, D. J. V., Stallknecht, D. E., White, D. G., Lee, M. D., Ayers, S., Sobsey, M. & Maurer, J. J. (2005) Free-living Canada Geese and Antimicrobial Resistance, *Emerging Infectious Diseases* 11 No 6, 935-938.
- Christian, T., Schneider, R. J., Farber, H. A., Skutlarek, D., Meyer, M. T. & Goldbach, H. E. (2003) Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 31(1), 36–44.
- Deneve, C. (2009) Effects of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on Colonization Factor Expression by Moxifloxacin-Susceptible and Moxifloxacin-Resistant *Clostridium difficile* Strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53(12), 5155 -5162.
- Dolejska, M., Cizek, A. & Literak, I. (2007) High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic. *Journal of Applied Microbiology* 103, 11–19.
- Drlica, K. & Zhao, X. (2007) Mutant Selection Window Hypothesis Updated, *Clinical Infectious Diseases* 44, 681–688.
- Duong, H.A., Pham, N.H., Nguyen, H. T., Hoang, T. T., Pham, H. V., Pham, V. C., Berg, M., Giger, W. & Alder, A. C. (2008) Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere* 72, 968–973.
- Drug Topics 2010 Top 200 generic drugs by total prescriptions <http://drugtopics.modernmedicine.com/drugtopics/data/articlestandard//drugtopics/252011/727243/article.pdf> Hämtad 19/12-12.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2011) Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). ISBN 978-92-9193-323-5 .
- European Commission (2003) Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition.
- Feighner, S. D. & Dashkevich, M. P. (1987) Subtherapeutic levels of antibiotics in poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 331–336.
- Focazio, M. J., Kolpin, D. W., Dana, W., Barnes, K. K., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Barber, L. B. & Thurman, M. E. (2008) A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States: II) Untreated drinking water sources. *Science of the Total Environment* 402, 201–216.
- Fick, J., Söderstrom, H., Lindberg, R. H., Phan, C., Tysklind, M. & Larsson, D. G. J. (2009) Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12), 2522–2527.
- Fung-Tomc, J., Kolek, B. & Bonner, D. P. (1993) Ciprofloxacin-induced, low-level resistance to structurally unrelated antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 1289–1296.

- Giger, W., Alder, A.C., Golet, E. M., Kohler, H. P. E., McArdeU, C. S., Molnar, E., Siegrist, H. & Suter, M. J. F. (2003) Occurrence and Fate of Antibiotics as Trace Contaminants in Wastewaters, Sewage Sludges, and Surface Waters. *Chimia* 57, 485–491.
- Gillespie, S.H., Basu, S., Dickens, A. L., O’Sullivan, D. M. & McHugh, T. D. (2005) Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56, 344–348.
- Golet, E. M., Strehler, A., Alder, A. C. & Giger, W. (2002) Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge- treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid- phase extraction. *Analytical Chemistry* 74, 5455 – 5462.
- Golet, E. M., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A. & Giger, W. (2003) Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environmental Science and Technology* 37, 3243–9.
- Gullberg, E., Cao ,S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D. & ,Andersson, D. I. (2011) Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLoS Pathogens* 7(7): e1002158.
- Halling-Sørensen, B, Holten Lützhøft, H.-C. , Andersen, H. R., & Ingerslev, F. (2000) Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46, 53 – 58.
- Hartmann, A., Alder, A. C., Koller, T. & Widmer, R. M. (1998) Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater, *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 377–382.
- Hartmann, A., Golet, E. M., Gartsier, S., Alder, A. C., Koller, T. & Widmer, R. M. (1999) Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36, 115–119.
- Henderson-Begg, S. K., Livermore, D. M. & Hall, L. M. (2006) Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on mutation frequency in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57, 849–854.
- Herold, S., Siebert, J., Huber, A. & Schmidt, H. (2005) Global expression of prophage genes in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 in response to norfloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 931-944.
- Ho, P.T. P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D. H., Viet, P. H. & Suzuki, S. (2011) Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Science of the Total Environment* 409, 2894–2901.
- Hopkins, K. L., Davies, R. H., & Threlfall, E. J. (2005) Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents* 25, 358–373.
- Jacela, J. Y., DeRouchey, J. M. & Tokach, M. D. (2009) Feed additives for swine: Fact sheets – acidifiers and antibiotics. *Journal of Swine Health Prod.* 17(5), 270–275.
- Jensen, B. B. (1998) The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences* 7, 45-64, Suppl. 1.
- Kemper, N. (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators* 8, 1–13.
- Knapp, C. W., Dolfing, J., Ehlert, P. A. I. & Graham, D. W. (2010) Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science and Technology* 44, 580–587.

- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B. & Buxton, H. T. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organics wastewater contaminants in U.S. streams, 1999 – 2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36, 1202 – 1211.
- Krinke, A.L. & Jamroz, D. (1996) Effect of feeding antibiotic avoparcin on organ morphology in broiler chickens. *Poultry Science* 75, 705-710.
- Kunz, A. N., Begum, A. A., Wu, H., D'Ambrozio, J. A., Robinson, J. M., Shafer, W. M., Bash, M. C. & Jerse, A. E. (2012) Impact of Fluoroquinolone Resistance Mutations on Gonococcal Fitness and In Vivo Selection for Compensatory Mutations. *Journal of Infectious Diseases* 205(12), 1821-1829.
- Kümmerer, K. & Henninger, A. (2003) Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clinical Microbiology and Infection* 9, 1203 – 1214.
- Kümmerer, K. (2004) Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(2), 311–320.
- Lahti, M. & Oikari, A. (2011) Pharmaceuticals in settleable particulate material in urban and non-urban waters. *Chemosphere* 85, 826-831.
- Larsson, D. G. J., de Pedro, C. & Paxeus, N. (2007) Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials* 148, 751–755.
- Levy, S. B. & Marshall, B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10(12), 122-129.
- Lillenberg, M., Litvin, S. V., Nei, L., Roasto, M. & Sepp, K. (2010) Enrofloxacin and ciprofloxacin uptake by plants from soil. *Agronomy Research* 8(1), 807-814.
- Lopez, E., Elez, m., Matic, I., & Blazquez, J. (2007) Antibiotic-mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 64, 83–93.
- Lopez, E. & Blazquez, J. (2009) Effect of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on Intrachromosomal Homologous Recombination in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(8), 3411 -3415.
- Martinez, J. L., Sanchez, M. B., Martinez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A. & Alvarez-Ortega, C. (2009a) Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *Fems Microbiology Reviews* 33(2), 430 -449
- Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., 1,2, Hernandez, A., Linares, J. F., Martinez-Solano, L. & Sanchez, M. B. (2009b) A global view of antibiotic resistance. *Fems Microbiology Reviews* 33, 44–65.
- Martínez-Carballo, E., Barreiro-González, C., Scharf, S. & Gans, O. (2007) Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution* 148, 570–579.
- Martins, A.F., Vasconcelos, T.G., Henriques, D.M., Frank, C.D., König, A. & Kümmerer, K., 2008. Concentration of ciprofloxacin in Brazilian hospital effluent and preliminary risk assessment: a case study. *Clean – Soil Air Water* 36, 264–269.
- Miao, X. S., Bishay, F., Chen, M. & Metcalfe, C. D. (2004) Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environmental Science and Technology* 38, 3533–3541.
- Mirzaagha, P., Louie, M., Sharma, R., Yanke, L. J., Topp, E. & McAllister, T. A. (2011) Distribution and characterization of ampicillin- and tetracycline- resistant *Escherichia coli* from feedlot cattle fed subtherapeutic antimicrobials. *BMC Microbiology* 11(78).

- Montesdeoca- Esponda, S., Sosa- Ferrera, Z. & Santana- Rodríguez, J. J. (2012) Combination of microwave- assisted micellar extraction with liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of fluoroquinolone antibiotics in coastal marine sediments and sewage sludges samples. *Biomedical Chromatography* 26, 33–40.
- Morasch, B., Bonvin, F., Reiser, H., Grandjean, D., de Alencastro, L. F., Perazzolo, C., Chevre, N. & Kohn, T. (2010) Occurrence and fate of micropollutants in the Vidy Bay of Lake Geneva, Switzerland. Part II: Micropollutant removal between wastewater and raw drinking water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(8), 1658–1668.
- Nowara, A., Burhenne, J., & Spiteller, M. (1997) Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1459-1463.
- Ohlsen, K., Werner, G., Ternes, T., Ziebuhr, W., Witte, W. & Hacker, J., (2003) Impact of antibiotics on conjugational resistance in gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage. *Environmental Microbiology* 5, 711–716.
- Pena, A., Chimielova, D., Lino, C. & Solitch, P. (2007) Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using a monolithic column. *Journal of Separation Science* 30 (17), 2924–2928.
- Pereira Leal, R. M., Figueira, R. F., Tornisielo, V. L., Regitano, J. B. (2012) Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from Sao Paulo State, Brazil. *Science of the Total Environment* 432, 344-349.
- Poole, K. & Srikumar, R. (2001) Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1, 59–71.
- Radhouani, H., Poeta, P., Igrejas, G., Goncalves, A., Vinue, L. & Torres, C. (2009) Antimicrobial resistance and phylogenetic groups in isolates of *Escherichia coli* from seagulls at the Berlengas nature reserve. *Veterinary Record* 165, 138-142.
- RAF Referensgruppen för Antibiotikafrågor (RAF) och metodgruppen (NordicAST) 2010 <http://www.srga.org/> Hämtad 22/12-12
- Robicsek, A., Jacoby, G. A. & Hooper, D. C. (2006) The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious Diseases* 6(10), 629 -640.
- Rotem, E., Friedman, N., Molshanski-Mor, S. & Cimron, U. (2012) [Reversing Bacterial Resistance to Antibiotics by Phage](#)-Mediated Delivery of Dominant Sensitive Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 78(3), 744-751.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment, *Chemosphere* 65, 725–759.
- Sayah, R. S., Kaneene, J. B., Johnson, Y. & Miller, R. (2005) Patterns of Antimicrobial Resistance Observed in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Domestic- and Wild-Animal Fecal Samples, Human Septage, and Surface Water. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3), 1394–1404.
- Schmieder, R. & Edwards, R. (2012) Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches, *Future Microbiology* 7(1), 73–89.
- Segura, P. A., Francois, M., Gagnon, C. & Sauv , S. (2009) Review of the Occurrence of Anti-infectives in Contaminated Wastewaters and Natural and Drinking Waters, *Environmental Health Perspectives* 117(5), 675-684.
- Seidavi, A., Mirhosseini, S. Z., Shivazad, M., Chamani, M., Sadeghi, A. A. & Pourseify, R. (2010) Detection and investigation of *Escherichia coli* in contents of duodenum, jejunum, ileum and cecum of broilers at different ages by PCR. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 18(3), 321-326.

- Simoes, R. R., Poirel, L., Da Costa, P. M. & Nordmann, P. (2010) Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases* 16(1), 110-112.
- Sjölund, M., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Bengtsson, S., Cederbrant, G., Pinhassi, J., Kahlmeter, G. & Olsen, B. (2008) Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. *Emerging Infectious Diseases* 14, 70–72.
- Song, J. S., Jeon, J. H., Lee, J. H., Jeong, S. H., Jeong, B. C., Kim, S. J., Lee, J. H. & Lee, S. H. (2005) Molecular characterization of TEM- type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (south of Lihir Island, Papua New Guinea). *The Journal of Microbiology* 43, 172–178.
- Statens jordbruksverks författningssamling: Föreskrifter om ändring i Statens jordbruksverks föreskrifter (SJVFS 2009:84) om läkemedel och läkemedelsanvändning; SJVFS 2012:32 Saknr D 9
- Summers, A. O. (2002) Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. *Clinical Infectious Diseases* 34(Suppl. 3), 85–92.
- Svarm 2011, Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring, The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden, 2012, www.sva.se, ISSN 1650-6332
- Swedres 2011, A Report on Swedish Antibiotic Utilisation and Resistance in Human Medicine, Swedish Institute for Communicable Disease Control, 2012, ISBN 978-91-86723-05-7 www.smittskyddsinstitutet.se/publikationer
- Tello, A., Austin, B. & Telfer, T. C. (2012) Selective Pressure of Antibiotic Pollution on Bacteria of Importance to Public Health. *Environmental Health Perspectives* 120, 1100–1106.
- Varhimo, E., [Savijoki, K.](#), Jefremoff, H., Jalava, J., Sukura, A. & [Varmanen, P.](#) (2008) Ciprofloxacin induces mutagenesis to antibiotic resistance independent of UmuC in *Streptococcus uberis*. *Environmental Microbiology* 10(8), 2179-2183.
- Walters, E., McClellan, K. & Halden, R. U. (2010) Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids-soil mixtures in outdoor mesocosms. *Water Research* 44(20), 6011 -6020.
- Wei, R. C., Ge, F., Chen, M. & Wang, R. (2012) Occurrence of ciprofloxacin, enrofloxacin, and florfenicol in animal wastewater and water resources. *Journal of environmental quality* 41(5), 1481-1486.
- World Economic Forum: Global Risks 2013 An Initiative of the Risk Response Network, Eighth Edition ISBN: 92-95044-50-9 978-92-95044-50-0 Hämtad 9/1-13 <http://reports.weforum.org/global-risks-2013/>
- Wright, G. D. (2010) Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology* 13(5), 589–94.
- Xiao, Y., Chang, H., Jia, A. & Hu, J. Y. (2008) Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1214, 100–108.
- Zhou, L. J., Ying, G. G., Zhao, J. L., Yang, J. F., Wang, L., Yang, B. & Liu, S. (2011) Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in northern China. *Environmental Pollution* 159, 1877-1885.