



Antibiotikaresistens

Kartläggning av ESBL-bildande E. coli och salmonella på kött på den svenska marknaden

av Maria Egervärn, Stina Englund, Stefan Börjesson och Mats Lindblad

Rapporten har tagits fram av Livsmedelsverket och Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) i samverkan med Smittskyddsinstitutet



Förord

Livsmedel utgör en av flera möjliga spridningsvägar för antibiotikaresistenta bakterier från djur till människor. Det är dock oklart vilken betydelse överföring av resistensgener eller resistenta bakterier från livsmedel till människa har för resistensproblematiken i stort. En förutsättning för att värdera folkhälsoriskerna av livsmedelsburen antibiotikaresistens är att det finns kunskap om såväl förekomst av som släktskap mellan resistenta bakterier från livsmedel, djur, människor och miljö. Denna kunskap saknas idag och behöver snabbt inhämtas.

Resistensproblemet måste därför ses ur ett tvärsektoriellt perspektiv och hanteras i samverkan mellan myndigheter i livsmedelskedjan och inom sjukvården.

Detta kartläggningsprojekt har haft som syfte att öka kunskaperna om förekomst av ESBL-bildande tarmbakterier på kött på den svenska marknaden och en eventuell koppling till förekomst hos patienter. Projektet har genomförts vid Livsmedelsverket och Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) och har finansierats av MSB anslag 2:4 krisberedskap som ett led i att stärka den nationella krisberedskapen. Livsmedelsverket har ansvarat för insamling av livsmedelsprover och för isolering av ESBL-bildande tarmbakterier. SVA har ansvarat för antibiotikaresistensbestämningen och den genetiska karakteriseringen av gjorda fynd från dessa prover. Samarbetet med Smittskyddsinstitutet initierades under projektets gång och myndigheten har bidragit med sekvenseringsdata för ESBL-gener från patientisolat.

Uppsala december 2011

Projektgrupp

Livsmedelsverket

Irina Boriak	Laboratorieingenjör, Mikrobiologiska enheten
Anna Brådenmark	Veterinärinspektör, Kontrollstödsenheten
Maria Egervärn ¹	Mikrobiolog, Risk- och nyttovärderingsavdelningen
Eva Fredberg	Veterinärinspektör, Regelutvecklingsavdelningen
Sara Byfors ¹	Mikrobiolog, Mikrobiologiska enheten (2009)
Karin Gustafsson	Kommunikatör, Kommunikationsavdelningen
Caroline Kaipe ¹	Laboratorieingenjör, Mikrobiologiska enheten (2010)
Mats Lindblad	Riskvärderare, Risk- och nyttovärderingsavdelningen
Marianne Ljunge	Laboratorieingenjör, Mikrobiologiska enheten
Ingela Tillander	Laboratorieingenjör, Mikrobiologiska enheten
Christer Wiberg	Mikrobiolog, Mikrobiologiska enheten
Paula Ågren	Laboratorieingenjör, Mikrobiologiska enheten

SVA

Stefan Börjesson	Forskare mikrobiolog, Enhet för Djurhälsa och Antibiotikafrågor
Stina Englund ¹	Forskare mikrobiolog, Enhet för Djurhälsa och Antibiotikafrågor
Maria Finn	Biomedicinsk analytiker, Enhet för Djurhälsa och Antibiotikafrågor

Smittskyddsinstitutet

Petra Edquist	Mikrobiolog, Enheten för Antibiotika och vårdhygien
Cecilia Jernberg	Mikrobiolog, Enheten för Livsmedel och Vatten
Karin Tegmark Wisell	Enhetschef, Överläkare, Enheten för Antibiotika och vårdhygien

¹ Projektledare

Innehåll

Summary in English.....	4
Sammanfattning	6
Förslag till vidare åtgärder	8
Inledning	10
ESBL-bildande tarmbakterier	10
Faroidentifiering.....	10
Farokarakterisering	12
Förekomst hos livsmedelsproducerande djur och på livsmedel.....	13
Livsmedel som spridningsväg för ESBL-bildande tarmbakterier.....	15
Syfte	16
Utförande	17
Infört och importerat kött.....	17
Valet av produkter.....	17
Provtagning	17
Provhantering	19
Analys av salmonella	19
Isolering av ESBL-bildande <i>E. coli</i>	19
Karakterisering av ESBL-bildande <i>E. coli</i>	19
Svenskt kycklingkött.....	20
Importerat bladgrönt från Sydostasien.....	20
Resultat.....	21
Infört och importerat kött.....	21
Inkomna prover	21
Förekomst av salmonella och antibiotikaresistensbestämning	22
Förekomst av ESBL-bildande <i>E. coli</i> och antibiotikaresistensbestämning ..	23
Molekylär karakterisering	26
Svenskt kycklingkött.....	27
Förekomst av ESBL-bildande <i>E. coli</i> och antibiotikaresistensbestämning ..	27
Molekylär karakterisering	28
Genetisk jämförelse mellan ESBL-bildande <i>E. coli</i> från kött och patienter	28
Importerat bladgrönt från Sydostasien.....	30
Förekomst av ESBL-bildande <i>E. coli</i>	30
Diskussion	31
Förekomst av ESBL-bildande <i>E. coli</i> och salmonella samt antibiotikaresistensbestämning	31
Metodik	32
Molekylär karakterisering	33
Genetisk jämförelse mellan ESBL-bildande <i>E. coli</i> från kött och patienter	33
Finansiering.....	35
Tack.....	35
Referenser	35

Summary in English

Occurrence of ESBL-producing *E. coli* and salmonella in meat obtained from the Swedish market

Extended spectrum betalactamase (ESBL)-producing bacteria are a rapidly emerging public health problem. These bacteria produce enzymes that hydrolyse antibiotics belonging to the betalactam group, including third and fourth generation cephalosporins, which are important antimicrobial agents in human medicine. The presence of ESBL-producing bacteria is increasingly being reported in humans and in food-producing animals, so food may be a possible link between the two populations. This project aimed to provide data required for identifying the extent to which food serves as a source of human exposure to ESBL-producing bacteria for use in future risk management strategies.

The prevalence of ESBL-producing *E. coli* was investigated in 518 samples of imported meat from cattle, pigs and broilers and in 100 samples of Swedish broiler meat. The latter samples were included due to the recent report of ESBL-producing *E. coli* in Swedish broilers within the Swedish monitoring programme SVARM. Samples of the imported meat were collected at retail stores and outlets from June 2009 to June 2011, while the Swedish broiler meat samples were collected at slaughter-houses during ten weeks in autumn 2010.

ESBL-producing *E. coli* were isolated from meat after selective culture with cefotaxime and the isolates were characterised phenotypically and using different molecular methods. To investigate the potential link between meat-associated ESBLs and those found in patients in Sweden, ESBL genes identified in *E. coli* from meat were compared against gene data from clinical ESBL-producing *E. coli* isolates reported within the national surveillance programme SWEDRES in 2010.

ESBL-producing *E. coli* were found in 0-8 percent of imported beef samples, 2-13 percent of imported pork samples and 15-95 percent of broiler meat samples available on the Swedish market. The highest prevalence was in South American broiler meat (95 percent), followed by European broiler meat (61 percent) and Danish broiler meat (15 percent). ESBL-producing *E. coli* were found in 44 percent of the Swedish broiler meat samples tested. Thus, ESBL-producing bacteria were frequently found in broiler meat, even in countries such as Sweden and Denmark with no use of cephalosporins in broiler production.

The most prevalent ESBL gene among clinical *E. coli* in Sweden, *bla*_{CTX-M-15}, was found in 1 percent of the bacteria isolated from meat. The overall overlap between gene variants in bacteria isolated from meat and from Swedish patients was limited, indicating that meat is probably only a limited source of ESBL genes in human medicine. Further studies are needed, including a more detailed comparison of ESBL genes and *E. coli* isolates from meat and patients, to assess the potential public health risk of these bacteria in food.

Salmonella was found in 5 of 430 imported meat samples tested. None of the isolates was resistant to third generation cephalosporins, nor was this resistance found among *E. coli* isolated from leafy greens imported from South East Asia.

However, more studies using selective culture methods are needed to properly examine the impact of raw vegetables as a dissemination route for ESBL-producing bacteria.

Sammanfattning

Denna kartläggning visar att ESBL-bildande *E. coli* förekommer på kött på den svenska marknaden och är framförallt vanliga på kycklingkött. Resultaten tyder också på att kött verkar ha en begränsad betydelse som källa för den ESBL-problematik som finns inom sjukvården.

Ett av de allvarligaste och snabbast ökande folkhälsoproblemen är tarmbakterier som bildar enzymet ESBL. ESBL-bildande tarmbakterier är motståndskraftiga mot flera typer av antibiotika, däribland nyare generationers cefalosporiner, som används för behandling av svåra och invasiva infektioner inom humansjukvården. Den huvudsakliga spridningen av ESBL-bildande tarmbakterier bland människor bedöms i första hand vara kopplad till användning av antibiotika till människor och spridning av infektioner mellan människor. ESBL-bildande tarmbakterier påvisas i ökande omfattning även hos livsmedelsproducerande djur, och livsmedel kan utgöra en del i spridningsvägen till människa. Projektets syfte var att öka kunskapen om livsmedels betydelse som spridningsväg för ESBL-bildande tarmbakterier och resistensgener och därmed bidra till kunskapsunderlaget för riskhantering.

Förekomst av ESBL-bildande *E. coli* undersöktes med selektiv odlingsmetod på 518 prover från importerat kött av nöt, gris och kyckling från länder inom och utanför EU. Provtagningen genomfördes hos grossister och i butiksledet från juni 2009 till juni 2011 med hjälp av kommuner, köttimportörer och Livsmedelsverket. Med anledning av fynd av ESBL-bildande *E. coli* hos svensk slaktkyckling inom det nationella resistensövervakningsprogrammet SVARM undersöktes efterhand förekomst av dessa bakterier även på 100 prover från svenskt kycklingkött, vilka samlades in under en tioveckorsperiod under hösten 2010 med hjälp av branschorganisationen Svensk Fågel. Framodlade ESBL-bildande *E. coli* karakteriserades med molekylära metoder. De ESBL-gener som påvisades hos *E. coli* från kött jämfördes med de som återfanns hos patienter i en av Smittskyddsinstitutet tidigare genomförd punktprevalenstudie. Detta för att undersöka eventuell koppling till förekomst av ESBL-bildande tarmbakterier hos patienter.

ESBL-bildande *E. coli* förekommer på kött på den svenska marknaden. Bakterier påvisades på kött av nöt (0-8%) och gris (2-13%) från olika områden, men i betydligt lägre omfattning än för kycklingkött (15-95%), vilket överensstämmer med studier från andra länder. Högst var förekomsten i kycklingkött från Sydamerika med 95 procent positiva prover jämfört med övriga EU (ej Danmark) med 61 procent och Danmark med 15 procent. I det svenska kycklingköttet var förekomsten av ESBL-bildande *E. coli* 44 procent. Eftersom proverna från svenskt kött är insamlade under en kortare tidsperiod är resultaten inte direkt jämförbara. Studien visar dock att ESBL-bildande *E. coli* är vanligt förekommande på kycklingkött, även kött producerat i länder som Sverige och Danmark i vilka cefalosporiner inte används vid uppfödning av slaktkyckling.

Den idag vanligaste ESBL-genen överlag inom svensk sjukvård påvisades i 1 procent av det totala antalet ESBL-bildande *E. coli* från kött. De livsmedelsburna generna var dock inte kopplade till den typ av plasmid och *E. coli*-bakterie som vanligen infekterar människor. De genvarianter som påvisades i störst utsträckning hos *E. coli* från köttproverna utgjorde en låg andel av de ESBL-gener som förekom hos *E. coli* från patienter. Samma typer av gener för ESBL-produktion förekommer således i låg omfattning hos *E. coli*-bakterier från kött respektive patienter i Sverige. Detta tyder på att kött verkar ha en begränsad betydelse som källa för den ESBL-problematik som finns inom sjukvården. Det krävs dock ytterligare studier med utförligare jämförelser mellan livsmedels- och patientisolat för att säkert kunna värdera folkhälsoriskerna av ESBL-bildande tarmbakterier från livsmedel.

Salmonella påvisades i 5 av 430 prover från infört och importerat kött. Däremot gjordes inga fynd av *Salmonella* med resistens mot tredje generationens cefalosporiner i dessa prover. Resistentypen påvisades inte heller hos de *E. coli*-bakterier som isolerats från bladgrönt från Sydostasien inom Riksprojekt 2009. Dessa bakterier är dock framodlade med en mindre känslig metod än ovan, varför det inte går att avskriva vegetabilier som spridningsväg för ESBL-bildande *E. coli* enbart baserat på dessa resultat.

Förslag till vidare åtgärder

- ESBL-bildande *E.coli* påvisades på kött från samtliga undersökta djurslag. Gentyperna från de ESBL-bildande *E.coli* från kött förekommer även hos en låg andel av *E.coli* med ESBL från patienter. Ytterligare studier behövs för att kunna göra mer utförliga jämförelser mellan fynd på livsmedel respektive hos människa samt för att kunna värdera riskerna. Studier av förekomst hos friska människor i samhället är också prioriterat. Fortsatt samverkan mellan berörda myndigheter inom landet och på nordisk nivå och EU-nivå är i sammanhanget viktigt.
- Fynden av ESBL-bildande *E.coli* på kött från samtliga djurslag ger anledning till att understryka vikten av en god livsmedelshygien som ett effektivt sätt att förhindra spridning av antibiotikaresistens i livsmedelskedjan. God hygien minskar risken för spridning av alla bakterier.
- Denna studie visade att ESBL-bildande *E. coli* förekommer på svenskt kycklingkött. Preliminära resultat av pågående studier vid SVA tyder på att fynden av ESBL-bildande *E.coli* i svensk kyckling hänger samman med spridning av resistenta bakterier från importerade avelsdjur. Denna situation har också uppmärksammats av EFSA i en publicerad rapport om ESBL, i vilken man identifierat olika åtgärder för att komma tillrätta med problemet inom EU (EFSA 2011)². I Sverige samarbetar branschen och berörda myndigheter för att klarlägga spridningsvägar så att förekomsten på sikt kan elimineras.
- Eftersom selektiv odlingsmetod inte användes vid undersökning av vegetabilier i denna studie, är det prioriterat att utföra ytterligare undersökningar av förekomst av ESBL-bildande tarmbakterier på vegetabilier. Det är viktigt att inom kontrollprogram och andra studier använda jämförbara metoder för provtagning och odling för att kunna jämföra resultaten.
- Fyra av fem positiva salmonellaisolat i denna studie var multiresistenta. Livsmedelsverket kommer under 2012 att genomföra ett Riksprojekt tillsammans med kommunerna för att följa upp efterlevnaden av de svenska salmonellagarantierna vid införsel av kött och ägg. I den undersökningen ingår även resistensbestämning av eventuella positiva salmonellaisolat.

² Europeiska myndigheten för livsmedelssäkerhet

Resultaten från Riksprojektet kommer att visa på eventuella behov av vidare åtgärder.

- Generellt är det viktigt att påpeka att antibiotikaresistensproblematiken är ett globalt problem som måste tas på största allvar och myndigheter och branschorganisationer måste fortsätta arbeta såväl internationellt som nationellt i linje med den svenska strategiska planen mot antibiotikaresistens. Detta innebär bland annat fortsatt arbete med minskad antibiotikaanvändning, arbete med god djurhälsa, ett gott smittskydd, god livsmedelshygien och kunskapshöjande åtgärder.

Inledning

Bakterier som blir resistenta, motståndskraftiga, mot antibiotika bedöms av Världshälsoorganisationen, WHO, och den Europeiska smittskyddsmyndigheten, ECDC, som ett av de största hoten mot folkhälsan (ECDC 2007; WHO 2007). Bara i Europa dör minst 25000 människor varje år som en direkt följd av bakterieinfektioner som inte är behandlingsbara med antibiotika (ECDC 2007). Verksamma antibiotika är dessutom en förutsättning för dagens högspecialiserade sjukvård, till exempel vid organtransplantationer och cellgiftsbehandlingar.

Felaktig och överdriven användning av antibiotika inom både den humana och veterinära sektorn gör att antibiotikaresistenta bakterier kan selekteras fram och spridas bland människor och djur, inom sjukvården och samhället, lokalt som globalt. Den huvudsakliga spridningen av antibiotikaresistenta bakterier inom humansjukvården bedöms vara kopplad till användning av antibiotika till människor och spridning av infektioner mellan människor (van de Sande-Bruinsma, Grundmann et al. 2008). Dock kan antibiotika som används till livsmedelsproducerande djur också gynna tillväxt av resistenta bakterier. Bakterier kan sedan överföras via förorening vid slakten till animaliska livsmedel eller via gödsel eller förorenat vatten till vegetabiliska livsmedel. Livsmedel kan således utgöra en spridningsväg för resistenta bakterier från djur till människor. Det är dock oklart hur mycket av resistensproblematiken inom sjukvården och samhället som beror på livsmedelsburen antibiotikaresistens.

En förutsättning för att värdera folkhälsoriskerna av livsmedelsburen antibiotikaresistens är att det finns kunskap om såväl förekomst av som släktskap mellan resistenta bakterier från livsmedel, djur och människor. I den riskprofil för området som sammanställdes av Livsmedelsverket och Strama VL (Livsmedelsverket 2009) betonas att ökad kunskap behövs framförallt om förekomst av ESBL-bildande tarmbakterier på importerade livsmedel och livsmedel införda från EU-länder. Detta är viktigt inte minst med tanke på att importen av livsmedel har ökat de senaste åren (SJV 2011). Drygt 30 procent av allt kött och köttvaror som konsumeras i Sverige produceras i andra länder (uppskattning baserad på 2009 års data från SJV 2011b).

ESBL-bildande tarmbakterier

Faroidentifiering

Cefalosporiner hör liksom penicilliner till antibiotikaklassen betalaktamer, som blockerar cellväggssyntesen hos vissa bakterier genom att binda till så kallade penicillinbindande proteiner. Tredje och fjärde generationens cefalosporiner har till skillnad mot tidigare generationers preparat ett utvidgat spektrum och kan därigenom verka på många olika bakterier. Tredje och fjärde generationens cefalosporiner används i stor omfattning inom humanmedicinen för behandling av svåra och invasiva infektioner såsom blodförgiftning och lunginflammation och

utgör tillsammans med kinoloner och makrolider de för folkhälsan viktigaste antibiotikaklasserna enligt WHO (WHO 2007b).

En viktig resistensmekanism mot dessa nyare generationers cefalosporiner är så kallade ESBL, ”extended spectrum β -lactamase”, som är enzym med utvidgat spektrum för nedbrytning av cefalosporiner. Dessa enzym kodas av så kallade *bla*-gener, som sitter på överförbara genetiska element såsom plasmider. Bakterier med ESBL är ofta multiresistenta (resistenta mot tre eller fler antibiotikaklasser) och plasmiderna kan bära på ytterligare resistensgener, vilket innebär att användning av andra antibiotika än nyare generationers cefalosporiner kan ha betydelse för selektion och spridning av ESBL. Enzymerna förekommer främst hos tarmbakterier inom familjen *Enterobacteriaceae*, till exempel *E. coli* och salmonella. Nya varianter av ESBL utvecklas konstant genom stegvisa mutationer och idag har flera hundra varianter beskrivits, vilka är klassificerade enligt olika scheman (EFSA 2011). Nyligen presenterades en utvidgad ESBL-definition för humanmedicinen inom Norden i vilken tre huvudkategorier beskrivs: ESBL_A, ESBL_M och ESBL_{CARBA} (Tabell 1) (Giske, Sundsfjord et al. 2009; Strama 2009).

ESBL_A är de klassiska ESBL-enzymerna som bryter ned tredje och fjärde generationens cefalosporiner, men inte karbapenemer eller cefamyciner. ESBL_A hämmas av klavulansyra och delas in i grupper bestående av olika enzymvarianter: CTX-M-enzym som kodas av *bla*_{CTX-M}-gener, TEM som kodas av *bla*_{TEM} och SHV som kodas av *bla*_{SHV} (Tabell 1). ESBL_M inkluderar plasmidmedierade AmpC-betalaktamasgener, som kodar för enzym som bryter ned tredje generationens cefalosporiner och cefamyciner, men inte fjärde generationens cefalosporiner eller karbapenemer. ESBL_M, som hämmas av kloxacillin men inte klavulansyra, består av flera enzymfamiljer däribland CMY-enzym som kodas av *bla*_{CMY}-gener. Utanför Norden benämns ESBL_M som plasmidmedierat AmpC eller pAmpC (EFSA 2011). Kromosomalt lokaliserat AmpC, som förekommer hos bland annat *E. coli*, inkluderas inte i ESBL-definitionen. ESBL_{CARBA} omfattar karbapenemaser, metallobetalaktamaser och oxacillinaser, vilka orsakar resistens mot alla betalaktamantibiotika inklusive karbapenemer, som är särskilt viktiga inom humansjukvården (Tabell 1) (Giske, Sundsfjord et al. 2009; Strama 2009).

Tabell 1. Indelning av ESBL-enzym

ESBL-kategori (Strama 2009)	Exempel på enzymfamiljer
ESBL _A	CTX-M (inklusive CTX-M grp 1, grp 2, grp 8, grp 9, grp 25); TEM; SHV
ESBL _M	CMY; AAC
ESBL _{CARBA}	<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemaser (KPC), metallobetalaktamaser (MBL); oxacillinaser (OXA)

Farokarakterisering

ESBL-bildande bakterier i tarmen kan finnas som en del av normalfloran hos människor. Som bärare är man inte sjuk, men bakterierna i tarmen kan utgöra en reservoar av resistensgener som med tiden skulle kunna överföras till sjukdomsframkallande bakterier med svårbehandlade infektioner som följd. Olika undersökningar visar att i Sverige har ungefär 2-5 procent av symptomfria människor ESBL-bildande tarmbakterier (Chabok, Tärnberg et al. 2010; Strömdahl, Tham et al. 2011).

ESBL-bildande tarmbakterier som ger upphov till infektioner är ett av de allvarligaste folkhälsoproblemen. En meta-analys av Schwaber *et al.* (2007) visade att dödligheten var upp till två gånger högre hos patienter med blodförgiftning orsakade av ESBL-bildande *Enterobacteriaceae* jämfört med patienter infekterade med bakterier som var känsliga för tredje generationens cefalosporiner. Inom EU var år 2007 nästan 3000 dödsfall och drygt 120 000 extra vård dagar kopplade till infektioner i blodet orsakade av *E. coli* med resistens mot tredje generationens cefalosporiner (de Kraker, Davey et al. 2011). I samma studie uppskattas att sjukdomsördan kopplad till multiresistenta *E. coli* sannolikt snart kommer överträffa den kopplad till MRSA. Internationellt har förekomsten av bland annat patogena *E. coli* och *Klebsiella pneumoniae* som bildar ESBL ökat under de senaste åren hos människa. Exempelvis är förekomsten av cefalosporinresistenta *K. pneumoniae* i blododlingar numera över 50 procent i flera länder i centrala och sydöstra Europa (Ears-Net 2009).

Även i Sverige har förekomsten av ESBL ökat och fynd hos människa är sedan 2007 anmälningspliktigt enligt smittskyddslagen. Sedan dess har man sett en ökning med i snitt cirka 30 procent av antalet rapporterade fall varje år (SMI 2011). Under 2010 var den rapporterade incidensen av ESBL-bildande *Enterobacteriaceae* i Sverige 53 fall/100000 invånare. De flesta positiva fynden gjordes i urinprover (65 procent), medan fynd i blododlingar gjordes i 3 procent av fallen. *E. coli* och salmonella med ESBL utgjorde 81 respektive mindre än 1

procent av samtliga rapporterade fall. ESBL_A av CTX-M-typ rapporterades mest frekvent (SWEDRES 2010).

CTX-M är det vanligaste enzymet överlag. Särskilt enzymvarianten CTX-M-15 tillhörande CTX-M grupp 1 förekommer frekvent inom *Enterobacteriaceae* hos människor världen över, vilket till stor del beror på spridning av patogena *E. coli*-klonen O25b:H4-ST131 som kan innehålla *bla*_{CTX-M-15} eller andra ESBL-gener (Naseer and Sundsfjord 2011). Ett av undantagen är Sydamerika där CTX-M-2 dominerar (Dhanji, Murphy et al. 2010). Förekomst av ESBL_M har tidigare främst beskrivits i studier från USA, men fynd av CMY-typ rapporteras allt oftare inom EU (EFSA 2011). I en svensk punktprevalensstudie påvisades ESBL_A (CTX-M eller SHV) och ESBL_M (CMY) hos 78 respektive 5 procent av cefalosporinresistenta *E. coli* från människor (SWEDRES 2010). Bland ESBL_A utgjorde CTX-M grupp 1 78 procent (varav genvarianten CTX-M-15 av omkring 90 procent), CTX-M grupp 9 23 procent, CTX-M grupp 2 nästan 1 procent och SHV drygt 1 procent. ESBL_{CARBA}-bildande tarmbakterier har sedan anmälningspliktens införande påvisats i 33 humanprover i Sverige. Majoriteten av fallen var kopplade till sjukvård utomlands (SWEDRES 2010; personlig kommunikation K. Tegmark Wisell, november 2011). Tidigare har ESBL i allmänhet setts främst i samband med utbrott inom sjukvården, men resistenstypen påvisas i ökande omfattning även ute i samhället. En studie vid Akademiska sjukhuset i Uppsala om antibiotikaresistens och resande visade att 24 procent av deltagarna som vistats utanför Nordeuropa hade koloniserats med ESBL-bildande *E. coli* (Tängden, Cars et al. 2010).

Förekomst hos livsmedelsproducerande djur och på livsmedel

ESBL-bildande *E. coli* och salmonella påvisas i ökande omfattning hos livsmedelsproducerande djur och livsmedel inom EU (EFSA 2011). Detta trots att selektiva metoder inte används i de flesta nationella övervakningsprogrammen inom EU, utan istället undersöks slumpmässigt utvalda isolat från odling utan tillsats av antibiotika (EFSA 2008). Framförallt har en ökning av cefalosporinresistenta, till största del ESBL-bildande, *E. coli* från slaktkyckling och kycklingkött uppmärksammats i vissa länder (Tabell 2). En hypotes är att den höga förekomsten främst är en följd av användning av cefalosporinen ceftiofur inom kycklingproduktionen, inklusive på kläckerier där avelsdjur kläcks, och att resistenta bakterier sedan sprids genom avelskedjan genom så kallad top-down spridning. Även miljösmitta genom cirkulation av ESBL-bildande bakterier i produktionsmiljön tros ha betydelse för den höga förekomsten (EFSA 2011). Två brittiska undersökningar visade nyligen att ESBL-bildande *E. coli* är vanligt förekommande i kycklingkött som importerats från Sydamerika (Warren, Ensor et al. 2008; Dhanji, Murphy et al. 2010). *E. coli* och salmonella resistenta mot tredje generationens cefalosporiner rapporteras också inom EU från nötkreatur och slaktsvin och på kött från dessa djur, men i lägre omfattning än för kyckling och kycklingkött (EFSA 2011).

ESBL-bildande *E. coli* har även påvisats i tarminnehåll från svensk slaktkyckling. Vid icke selektiv odling var 1 procent av *E. coli*-isolaten ESBL-

bildande och vid tillsats av cefalosporin under analysen ökade andelen ESBL-bildande *E. coli* till 34 procent (SVARM 2010). I Sverige används dock inte cefalosporiner vid uppfödning av slaktkyckling och övrig antibiotikaanvändning är mycket begränsad. Mängden tredje generationens cefalosporiner som förskrevs år 2009 till svenska djur, framförallt häst och nöt, var ca 20 kg, vilket motsvarar cirka en promille av den totala försäljningen av all antibiotika till djur i Sverige (EMA 2011). Preliminära resultat av provtagning i olika led i svensk kycklingproduktion tyder istället på spridning av ESBL-bildande *E. coli*-bakterier från importerade avelsdjur, vilket också rapporterats från andra EU-medlemsländer (MARAN 2009; SVARM 2010). I Sverige påvisades inga ESBL-bildande bakterier i tarminnehåll från slaktsvin och nötkreatur vid den senaste övervakningen som genomfördes av SVA år 2008 respektive 2009 (sammanfattat i SVARM 2010). Inte heller i livsmedel har resistenstypen påvisats tidigare i Sverige, men endast ett fåtal begränsade analyser har gjorts (Livsmedelsverket 2009). Inga fynd av ESBL-bildande *E. coli* gjordes på svenskt kycklingkött med icke selektiv odlingmetod vid det senaste svenska övervakningstillfället (Tabell 2) (SVARM 2010).

Publicerade studier där genetisk karakterisering genomförts visar att hos livsmedelsproducerande djur och på livsmedel inom EU dominerar ESBL_A-genen *bla*_{CTX-M-1}, men även *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{TEM-52} och *bla*_{SHV-12} har påvisats liksom andra gener i mindre omfattning. Förekomsten av *E. coli* och salmonella som bildar ESBL_M av typen CMY (*bla*_{CMY-2}) var begränsad för bara några år sedan, men ökar nu bland livsmedelsproducerande djur och livsmedel inom EU. Detta beror troligtvis till viss del på att man tidigare främst undersökte förekomst av de klassiska ESBL_A-enzymerna. ESBL_{CARBA}-produktion har till dags datum inte påvisats i tarmbakterier från djur- eller livsmedel (EFSA 2011).

När det gäller förekomst av ESBL-bildande *Enterobacteriaceae* på vegetabilier finns i dagsläget ett fåtal publicerade studier i vilka selektiva metoder och genetisk karakterisering har använts. Exempelvis påvisades nyligen *Enterobacteriaceae* med ESBL av typen CTX-M-1 eller SHV i 4 (5 procent) av 79 analyserade prover från grönsaker på den nederländska marknaden (Reuland, al Naiemi et al. 2011).

Tabell 2. Andel *E.coli* resistenta mot tredje generationens cefalosporiner från kycklingkött. Slumpmässigt utvalda isolat från icke selektiv odling. Brytpunkt för resistens: cefotaxim MIC >0.25 mg/L; ceftiofur MIC >1 mg/L.

Land*	År	Antal isolat	Andel resistens (%)
Danmark	2006	534	0
Danmark	2008	113	1
Danmark	2010	158	1
Frankrike	2009	151	3
Kanada	2007	402	23
Kanada	2008	480	28
Nederländerna	2007	230	15
Nederländerna	2008	329	15
Nederländerna	2009	328	21
Norge	2006	119	0
Tyskland	2009	194	6
USA	2007	299	7
USA	2008	306	11
Sverige	2010	77	0

*Referenser: (CIPARS ; DANMAP ; MARAN ; NARMS ; NORM/NORMVET ; SVARM 2010; EFSA 2011)

Livsmedel som spridningsväg för ESBL-bildande tarmbakterier

Livsmedel kan utgöra en del i spridningsvägen för ESBL-bildande *E. coli* och salmonella från djur till människor (Livsmedelsverket 2009). Utanför Sverige har flera utbrott av ESBL-bildande salmonellabakterier förknippats med konsumtion av animaliska livsmedel, framförallt kycklingkött. Exempelvis i Belgien återfanns en CTX-M-2-positiv *Salmonella* Virchov-klon genom hela livsmedelskedjan och isolerades förutom från kycklingkött även från slaktkycklingar och patienter som insjuknat i gastroenterit (Bertrand, Weill et al. 2006). Vad gäller sjukdomsframkallande ESBL-bildande *E. coli*-kloner finns i dagsläget inga direkta bevis för överföring till människor via livsmedelskedjan (EFSA 2011). I en nyligen publicerad holländsk studie har dock identiska ESBL-gener belägna på identiska plasmider påvisats hos *E. coli*-isolat från kycklingkött, slaktkyckling och patienter (Leverstein-van Hall, Dierix et al. 2011). Det är också visat att resistensgener både i tarmen och i köksmiljö kan överföras från olika bakterier till patogena bakterier (Livsmedelsverket 2009). Livsmedelsburna bakterier skulle således kunna överföra resistensgener till sjukdomsframkallande bakterier. Det är dock oklart hur ofta så sker och vilken betydelse sådan spridning har för sjukvården och samhället i stort.

Syfte

Det övergripande syftet var att öka kunskapen om livsmedels betydelse som spridningsväg för ESBL-bildande tarmbakterier och resistensgener och på sikt skapa underlag för beslut om riskhanteringsåtgärder. Specifika mål var att:

- utveckla metoder för isolering och karakterisering av ESBL-bildande *E. coli* på livsmedel
- kartlägga den aktuella förekomsten av ESBL-bildande *E. coli* på infört och importerat kött av nöt, gris och kyckling
- identifiera och karakterisera de gener som kodar för produktion av ESBL hos *E.coli* isolerade från livsmedel
- undersöka släktskap hos bakterieisolat och plasmider från livsmedel samt jämföra resistensgener mellan de ESBL-bildande *E.coli* som påvisas i livsmedel och de som infekterar människa

Övriga mål som tillkom under projektperioden var att:

- kartlägga den aktuella förekomsten av ESBL-bildande *E. coli* på svenskt kycklingkött
- kartlägga den aktuella förekomsten av antibiotikaresistenta salmonellabakterier på infört och importerat kött
- undersöka *E.coli* som isolerats från bladgrönt från Sydostasien (Riksprojekt 2009) avseende resistens mot tredje generationens cefalosporiner.

Utförande

Infört och importerat kött

Valet av produkter

Kartläggningen omfattade prover av kött eller köttberedningar av nöt, gris och kyckling som förts in till Sverige från EU-länder eller importerats från Sydamerika. Både fryst och kylförvarat, icke värmebehandlat, kött samlades in för analys.

Provtagning

Provtagning i den här typen av kartläggningar är inte i statistisk mening sannolikhetsbaserad, eftersom det inte är praktiskt möjligt att skapa en lista över hur införda och importerade produkter förekommer i landets olika butiker (vilket krävs för att slumpmässigt fördela hur proverna ska tas). En översiktlig provtagningsplan togs ändå fram med målet att kunna jämföra andelen ESBL-positiva prover från de länder och områden som står för störst del av det införda eller importerade köttet, samt från andra områden av särskilt intresse (Sydamerika) (Fig. 1; Tabell 4). Provtagningen gjordes fortlöpande från och med juni 2009 till och med juni 2011. Under projektets gång gavs information till provtagare för att styra provtagningen mot länder eller områden med få prover.

För provtagningen nyttjades Livsmedelsverkets sedan tidigare etablerade nätverk för utbrottsanalyser bestående av landets största kommuner. Tio av dessa kommuner deltog i omgångar (Tabell 3). Proverna togs, dels hos grossister och dels i butiksledet på stormarknader och i mindre butiker. Även ett antal köttimportörer bidrog med prover till kartläggningen från sina respektive anläggningar. Prover togs också av Livsmedelsverkets egen personal, både i butiksledet och vid gränskontrollstationerna (Tabell 3).

Varje prov omfattade minst 200 gram. Proven packades och skickades kylda eller frysta till Livsmedelsverket. Prov av samma varumärke skulle ha olika batchnummer och i de fall den uppgiften saknades var kravet att de hade olika bäst-före-datum. Ifall två identiska prov samlades in och analyserades, inkluderades bara resultaten från det senast inkomna provet i kartläggningen.

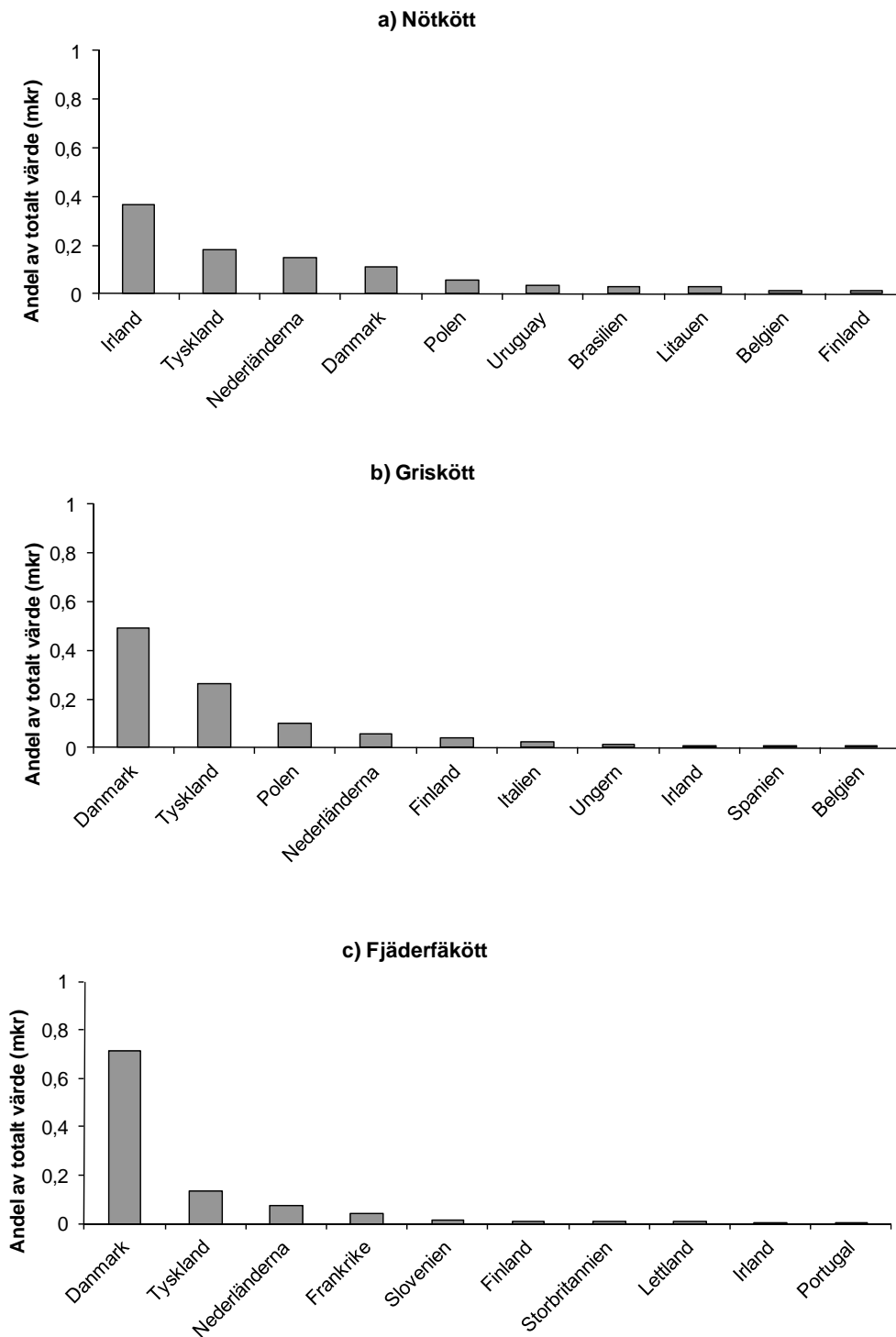


Fig. 1. Sveriges viktigaste handelspartners (avsändningsland) år 2008 avseende a) nötkött, b) griskött och c) fjäderfäkött. Data från Jordbruksverket (SJV 2009).

Provhantering

Inkomna köttprover hanterades enligt Livsmedelsverkets instruktion för provhantering på Mikrobiologiska enheten, MI-i052. Köttsaft liksom små bitar från ytan av provmaterialet, totalt 25 gram, finfördelades i 225 ml buffrat peptonvatten.

Analys av salmonella

Detektion av salmonella gjordes enligt senaste upplagan av metod nr 71 beskriven av Nordisk Metodikommitté för livsmedel (NMKL). Isolaten artbestämdes med API20E och skickades därefter till SVA för serotypning. Antibiotikaresistensundersökning gjordes på Livsmedelsverket med en så kallad mikrodilutionsmetod för bestämning av lägsta hämmande koncentration (MIC; mg/L) av totalt 12 antibiotika, VetMIC GnMO för gramnegativa bakterier. Analys av salmonella utfördes på prover insamlade under 2010 och 2011. Vid fynd av salmonella kontaktades lokal tillsynsmyndighet för vidare åtgärder.

Isolering av ESBL-bildande *E. coli*

Detektion av *E. coli* resistent mot tredje generationens cefalosporiner gjordes enligt Livsmedelsverkets instruktion MI-m016. Nedan följer en översiktlig beskrivning av analysmetoden, en selektiv odlingsmetod som utvecklades av Livsmedelsverket under projektets första del.

Totalt 100 ml av homogenatet blandades med 1 µg/ml cefotaxim och anrikades vid 37°C i 18-24 h. Olika spädningar av anrikningsbuljongen spreds på CHROMagar™ med 1 µg/ml cefotaxim (CHROMagar™ CTX) och CHROMagar™ ESBL, som sedan inkuberades 37°C i 18-24 h.

Cefalosporinresistenta *E. coli* växer som rosa kolonier på dessa plattor, ESBL_A-bildande *E. coli* växer på båda platttyper och ESBL_M-bildande *E. coli* enbart på CHROMagar™ CTX. Den senare plattan användes för prover som togs under 2010 och 2011. Ett isolat per prov analyserades enligt nedan. I första hand valdes en rosa koloni från plattan med CHROMagar™ ESBL och om den inte innehöll några kolonier valdes en rosa koloni från plattan med CHROMagar™ CTX. Artbestämning gjordes med API20E och ESBL-produktion verifierades fenotypiskt med Etest®ESBL.

Misstänkta ESBL-bildande *E. coli* skickades därefter till SVA för ytterligare analyser och karakterisering. Misstänkta ESBL_M-bildande *E. coli* från CHROMagar™ CTX-plattan testades med Etest®AmpC för att påvisa enzymet AmpC och alla verifierade ESBL-bildande *E. coli*-isolat testades för karbapenemasproduktion med Etest®Imipenem.

Karakterisering av ESBL-bildande *E. coli*

Resistens mot fjorton antibiotika undersöktes med mikrodilutionsmetod enligt ovan. Genfamiljer för ESBL_A detekterades med två multiplex-PCR-metoder och misstänkta ESBL_M-bildande *E. coli* testades med multiplex-PCR för att verifiera om resistensgenen är plasmidburen (pAmpC) eller inte. Specifika genvarianter

bestämdes med DNA-sekvensering. Hur de olika bakterieisolaten är besläktade undersöktes med en genotypningsmetod, multilocus sequence typing (MLST). Med MLST bestäms gensekvensen för sju olika gener som finns hos alla bakterier. Varje enskild sekvens tilldelas ett specifikt nummer som tillsammans utgör en unik sifferprofil, vilken i sin tur ges en specifik sekvenstyp (ST). Släktskap mellan resistensplasmider undersöktes genom naturlig överföring (så kallad konjugation) av plasmiden och sedan med replikontypning. Det senare är baserat på plasmidens oförmåga att förekomma tillsammans i en värdbakterie om de har lika replikon, startpunkt för kopiering. Med PCR kan specifika replikon identifieras vilket möjliggör indelning av plasmider i så kallade Inc ("incompatibility")-grupper.

Svenskt kycklingkött

Kartläggningen inkluderade efterhand även prover från svenskt kycklingkött. Detta med anledning av de positiva fynd av ESBL-bildande *E. coli* som under projektperioden gjordes i tarminnehåll från svensk slaktkyckling (SVARM 2010). Proven fördelades på de största anläggningarna i Sverige i förhållande till respektive anläggnings slaktvolym. Totalt 100 prov från olika batcher av frysta kycklingfiléer avsedda för försäljning i butik samlades in från sju anläggningar knutna till branschorganisationen Svensk Fågel samt från ytterligare en anläggning (ett prov). Provtagningen gjordes under tio veckors tid från september till november 2010.

Varje uttaget prov fick ett kodnummer och de kodade proven packades och skickades frysta till Livsmedelsverket. Inkomna prover analyserades för förekomst av ESBL-bildande *E. coli* enligt ovan. Analys av salmonella ingick inte, eftersom detta görs inom kontrollprogrammet och genom kontinuerlig övervakning av svenska djur. Förekomsten av salmonella hos svenska livsmedelsproducerande djur är överlag mycket låg (SVA 2010).

Importerat bladgrönt från Sydostasien

I Riksprojekt 2009 undersöktes bland annat förekomst av *E. coli* på färska kryddörter och bladgrönsaker som importerats till Sverige från Sydostasien (Riksprojekt 2009). Proverna samlades in av kommuner och analyserades av laboratorier som kommunerna har avtal med. Misstänkta *E. coli* som isolerats från dessa prover med icke selektiv odling analyserades utanför Riksprojektet med avseende på resistens mot tredje generationens cefalosporiner.

Ett till fem isolat per positivt prov skickades i ampuller från analyslaboratorierna till Livsmedelsverket. Bakterier från respektive ampull ympades i BHI-buljong och inkuberades vid 37°C över natt. Olika spädningar av anrikningsbuljongen spreds på CHROMagar™ ESBL, som sedan inkuberades 37°C i 18-24 h. ESBL_A-bildande *E. coli* växer som rosa kolonier på dessa plattor. CHROMagar™ CTX användes inte vid dessa försök och således undersöktes inte förekomst av ESBL_M-bildande *E. coli* på dessa prover.

Resultat

Infört och importerat kött

Inkomna prover

Totalt 547 prover samlades in och analyserades (Tabell 3).

Tabell 3. Fördelning av prover bland deltagande provtagare

Provtagare	2009	2010	2011	TOTALT
Gävle kommun	-	-	7	7
Göteborg stad	-	16	13	29
Helsingborgs kommun	-	34	7	41
Linköpings kommun	-	-	7	7
Malmö kommun	13	33	16	62
Norrköpings kommun	-	-	14	14
Stockholm stad	40	-	16	56
Uppsala kommun	4	49	-	53
Västerås kommun	-	-	5	5
Örebro kommun	-	-	15	15
Köttimportörer	-	35	13	48
Gränskontrollen	-	6	-	6
Centrala Livsmedelsverket	37	112	55	204
TOTALT	94	286	168	547

Utav dessa exkluderades analysresultaten från 22 dublettprover från samma batch; 6 från 2009, 12 från 2010 och 4 från 2011. Även analysresultaten från ett prov från svenskt griskött (från 2010) samt sex nötköttsprov från Nya Zeeland, Australien och USA (3 från 2010 och 3 från 2011) exkluderades, eftersom dessa inte ingick i provtagningsplanen (salmonella eller ESBL-bildande *E. coli* påvisades inte i något av dessa prov). Kartläggningen på kött av ESBL_M-bildande *E. coli* och salmonella omfattade inte 2009 års prover.

Således utgjordes kartläggningen av ESBL_A-bildande *E. coli* av 518 prover, varav 430 prover inkomna under 2010 och 2011 även analyserades avseende ESBL_M och salmonella. Provtagningsplanen uppfylldes så när som på 16 prover på griskött från övriga EU och 6 prover på kycklingkött från Sydamerika (Tabell 4).

Tabell 4. Provtagningsplan för infört och importerat kött

Köttslag	Ursprung	Målsättning, antal prover	Utfall, antal prover
Nöt	Irland	50	52
	Övriga EU	100	107
	Sydamerika	50	58
	TOTALT	200	217
Gris	Danmark	50	60
	Tyskland	50	57
	Övriga EU	50	34
	TOTALT	150	151
Kyckling	Danmark	50	54
	Övriga EU	50	52
	Sydamerika	50	44
	TOTALT	150	150

Förekomst av salmonella och antibiotikaresistensbestämning

Salmonella påvisades i 5 av totalt 430 analyserade prover, tre från kycklingkött och två från griskött (Tabell 5). Alla salmonellapositiva prov var av tyskt ursprung utom ett prov av griskött som kom från Italien. De serotyper som identifierades var *Salmonella* Typhimurium, *S. Infantis* och *S. Paratyphi B*. variant Java. Två av isolaten var inte fullt typbara utan bestämdes till *Salmonella* subspecies I.

Antibiotikaresistensbestämningen visade att ett av salmonellaisolaten från tyskt kycklingkött var känsligt för samtliga testade antibiotika och att övriga fyra isolat var multiresistenta, det vill säga resistenta mot tre eller flera antibiotikaklasser. Resistens mot ampicillin, tetracyclin och sulfa var vanligast förekommande bland dessa. Kinolonresistens påvisades hos två av isolaten, båda från tyskt kycklingkött. Inget salmonellaisolat var resistent mot tredje generationens cefalosporiner.

Tabell 5. Karakterisering av påvisade salmonellafynd: identifierade serotyper och antibiotikaresistensprofiler. Skuggat fält indikerar resistens mot viss antibiotikum, det vill säga MIC (mg/L) > angiven brytpunkt* för resistens (mg/L) enligt EUCAST (EUCAST 2011).

Provtyp Ursprung	Serotyp	Am	Ctx	Ci	Nal	Km	Gm	Sm	Tc	Su	Tp	Ff	Cm
Fläskfilé Italien	<i>Salmonella</i> subsp. I	>64	<0.06	0.06	8	4	0.5	>256	>64	>1024	0.5	4	4
Fläskkarré Tyskland	<i>S. Typhimurium</i>	>64	0.12	0.06	4	2	0.5	4	>64	>1024	>32	4	4
Hel kyckling Tyskland	<i>Salmonella</i> subsp. I	1	0.12	0.03	4	2	0.5	8	2	256	0.5	8	8
Hel kyckling Tyskland	<i>S. Paratyphi B.</i> variant Java	64	0.25	0.5	>256	1	<0.25	32	>64	>1024	>32	16	256
Kycklingfilé Tyskland	<i>S. Infantis</i>	>64	0.12	0.5	>256	2	0.5	8	2	>1024	0.5	8	4

*Brytpunkter för resistens: ampicillin (Am) MIC >8 mg/L; cefotaxim (Ctx) MIC >0.5 mg/L; ciprofloxacin (Ci) MIC >0.06 mg/L; nalidixinsyra (Nal) MIC >16 mg/L; kanamycin (Km) MIC >16 mg/L; gentamicin (Gm) MIC >2 mg/L; streptomycin (Sm) MIC >16 mg/L; tetracyklin (Tc) MIC >8 mg/L; sulfametoxazol (Su) MIC >256 mg/L; trimetoprim (Tp) MIC >2 mg/L; florfenicol (Ff) MIC >16 mg/L; chloramfenicol (Cm) MIC >16 mg/L.

Förekomst av ESBL-bildande *E. coli* och antibiotikaresistensbestämning

Nötkött

ESBL_A-bildande *E. coli* påvisades i 9 (8 procent) av 107 analyserade prover från europeiskt (ej irländskt) nötkött (Tabell 6a). Över hälften av dessa fynd gjordes i kött av holländskt ursprung. ESBL_A-bildande *E. coli* påvisades inte i irländskt eller sydamerikanskt nötkött (Tabell 6a), medan ESBL_M-bildande *E. coli* inte påvisades i nötkött av något ursprung (Tabell 6b). Sju av de nio ESBL_A-bildande *E. coli*-isolaten var multiresistenta, dvs resistenta mot tre eller flera antibiotikaklasser.

Tabell 6a. Förekomst av ESBL_A-bildande *E. coli* på infört och importerat nötkött. Samtliga prov 2009-2011

Ursprung	Antal prov	Antal (%) <i>E. coli</i> med ESBL _A
Irland	52	0 (0)
Tyskland	39	2
Nederländerna	28	5
Övriga*	40	2
Totalt övriga EU	107	9 (8)
Brasilien	26	0
Uruguay	24	0
Argentina	8	0
Totalt Sydamerika	58	0 (0)

*Danmark, Estland, Italien, Litauen, Polen, Storbritannien, Österrike

Tabell 6b. Total förekomst av ESBL-bildande *E. coli* på infört och importerat nötkött. Data från 2010-2011

Ursprung	Antal prov	Antal <i>E. coli</i> med ESBL _A	Antal <i>E. coli</i> med ESBL _M	Totalt antal (%) <i>E. coli</i> med ESBL
Irland	40	0	0	0 (0)
Tyskland	35	1	0	1
Nederländerna	25	5	0	5
Övriga*	36	2	0	2
Totalt övriga EU	96	8	0	8 (8)
Brasilien	18	0	0	0
Uruguay	18	0	0	0
Argentina	6	0	0	0
Totalt Sydamerika	42	0	0	0 (0)

*Danmark, Estland, Italien, Litauen, Polen, Storbritannien, Österrike

Griskött

ESBL_A-bildande *E. coli* påvisades i två procent (1 av 60) av grisköttsproven från Danmark, fem procent (3 av 57) från Tyskland och tolv procent (4 av 34) från övriga EU (Tabell 7a). Samtliga positiva prover från övriga EU hade sitt ursprung i Italien. Fynd av cefalosporinresistenta *E. coli* av ESBL_M-typ gjordes i ett prov från polskt kött (Tabell 7b). Alla ESBL-bildande *E. coli* var multiresistenta förutom ett isolat från italienskt kött.

Tabell 7a. Förekomst av ESBL_A-bildande *E. coli* på infört och importerat griskött. Samtliga prov 2009-2011.

Ursprung	Antal prov	Antal (%) <i>E. coli</i> med ESBL _A
Danmark	60	1 (2)
Tyskland	57	3 (5)
<i>Italien</i>	23	4
<i>Övriga*</i>	11	0
Totalt övriga EU	34	4 (12)

*Finland, Nederländerna, Polen, Spanien

Tabell 7b. Total förekomst av ESBL-bildande *E. coli* på infört och importerat griskött. Data från 2010-2011.

Ursprung	Antal prov	Antal <i>E. coli</i> med ESBL _A	Antal <i>E. coli</i> med ESBL _M	Totalt antal (%) <i>E. coli</i> med ESBL
Danmark	44	1	0	1 (2)
Tyskland	44	3	0	3 (7)
<i>Italien</i>	20	3	0	3
<i>Övriga*</i>	11	0	1	1
Totalt övriga EU	31	3	1	4 (13)

*Finland, Nederländerna, Polen, Spanien

Kycklingkött

ESBL_A-bildande *E. coli* påvisades i 40 (91 procent) av de 44 analyserade proven från sydamerikanskt, i huvudsak brasilianskt, kycklingkött, medan förekomsten var 42 procent hos de 52 analyserade proven från övriga EU (ej Danmark) (Tabell 8a). Inga fynd av ESBL_A-bildande *E. coli* gjordes i danskt kycklingkött. ESBL_M-bildande *E. coli* påvisades i prover från samtliga inkluderade områden (Tabell 8b).

Omkring 90 procent av de ESBL_A-bildande *E. coli*-isolaten från övriga EU och Sydamerika var multiresistenta. Av de ESBL_M-bildande isolaten var 7 (70 procent) isolat från kött från övriga EU (ej Danmark) och båda isolaten från sydamerikanskt kött multiresistenta. De ESBL_M-bildande *E. coli*-isolaten från danskt kött var enbart resistent mot betalaktamer, förutom ett isolat som också var resistent mot aminoglykosider.

Tabell 8a. Förekomst av ESBL_A-bildande *E. coli* på infört och importerat kycklingkött. Samtliga prov 2009-2011.

Ursprung	Antal prov	Antal (%) <i>E. coli</i> med ESBL _A
Danmark	54	0 (0)
Tyskland	30 [□]	14
Övriga*	22	8
Totalt övriga EU	52 [□]	22 (42)
Brasilien	41	39
Övriga**	3	1
Totalt Sydamerika	44	40 (91)

* Estland, Finland, Frankrike, Nederländerna, Kroatien, Lettland, Polen

** Argentina, Chile

□ Ett prov var även positivt för ESBL_M

Tabell 8b. Total förekomst av ESBL-bildande *E. coli* på infört och importerat kycklingkött. Data från 2010-2011.

Ursprung	Antal prov	Antal <i>E. coli</i> med ESBL _A	Antal <i>E. coli</i> med ESBL _M	Totalt antal (%) <i>E. coli</i> med ESBL
Danmark	46	0	7	7 (15)
Tyskland	28	14 [□]	9	23
Övriga*	16	3	1	4
Totalt övriga EU	44	17 [□]	10	27 (61)
Brasilien	40	38	0	38
Övriga**	3	1	2	3
Totalt Sydamerika	43	39	2	41 (95)

* Estland, Finland, Frankrike, Nederländerna, Kroatien, Lettland, Polen

** Argentina, Chile

□ Ett prov var även positivt för ESBL_M

Molekylär karakterisering

Nötkött

ESBL-produktionen hos *E. coli* från infört nötkött orsakades av tre genvarianter: *bla*_{CTX-M-1} (n=6), *bla*_{CTX-M-15} (n=2) och *bla*_{TEM-52} (n=1). De två isolaten som innehöll *bla*_{CTX-M-15} kom från nötfärs från Nederländerna respektive Österrike och tillhörde MLST-typen ST10. Preliminära resultat tyder på att ESBL-genen i båda fallen är belägen på en plasmid tillhörande replikontyp Inc11. Totalt identifierades sju olika MLST-typer, vilket indikerar hög diversitet bland bakterieisolaten från nötkött.

Griskött

Följande fyra genvarianter påvisades hos *E. coli* från infört griskött: *bla*_{CTX-M-1} (n=6), *bla*_{CTX-M-14} (n=1), *bla*_{TEM-52} (n=1) och *bla*_{CMY-2} (n=1). Totalt identifierades sex olika MLST-typer, vilket tyder på hög diversitet även bland bakterieisolaten från griskött.

Kycklingkött

Hos *E. coli* från kycklingkött som förts in från EU-länder påvisades framförallt *bla*_{CMY-2} (n=18) samt *bla*_{CTX-M-1} (n=11), liksom andra gener i mindre omfattning (Fig. 2a). Ett isolat från tyskt kycklingkött innehöll två ESBL-gener, *bla*_{SHV-12} och *bla*_{CMY-2}. I *E. coli* från sydamerikanskt kycklingkött påvisades tre genvarianter: *bla*_{CTX-M-2} (n=20), *bla*_{CTX-M-8} (n=20) och *bla*_{CMY-2} (n=2) (Fig. 2b).

Fem av sju danska isolat tillhörde MLST-typ ST38 (av totalt tre MLST-typer) och bar på *bla*_{CMY-2} med indikationen att genen är belägen på en plasmid tillhörande replikontyp IncK. Ingen dominerande MLST-typ kopplad till en specifik ESBL-gen kunde identifieras hos isolaten från kycklingkött från övriga EU (totalt 21 MLST-typer) eller Sydamerika (totalt 24 MLST-typer).

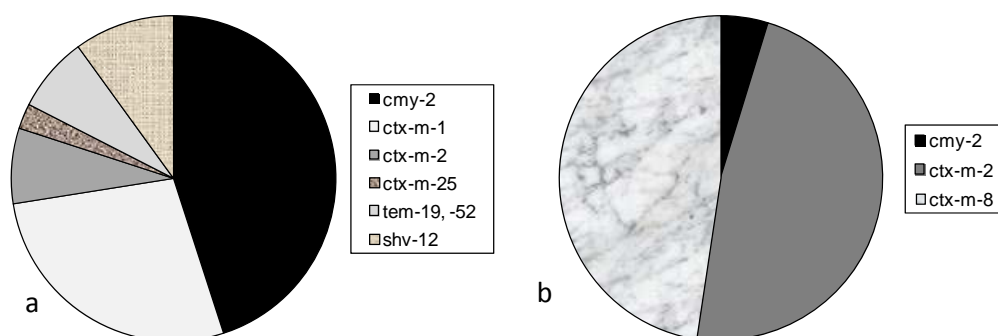


Fig. 2. Fördelning av de ESBL-gener som påvisades hos *E. coli* från a) 39 positiva prover från kycklingkött som förts in från EU-länder (Danmark, Estland, Finland, Frankrike, Kroatien, Lettland, Nederländerna, Polen, Tyskland) och b) 42 positiva prover från kycklingkött som importerats från Sydamerika (Argentina, Brasilien, Chile). Ett *E. coli*-isolat innehöll både en *bla*_{SHV-12}-gen och en *bla*_{CMY-2}-gen.

Svenskt kycklingkött

Förekomst av ESBL-bildande *E. coli* och antibiotikaresistensbestämning

ESBL_A- och ESBL_M-bildande *E. coli* påvisades i 4 (4 procent) respektive 40 (40 procent) av 100 analyserade prover. Utav de 44 ESBL-bildande *E. coli*-isolaten var 10 (22 procent) multiresistenta, dvs resistenta mot tre eller flera antibiotikaklasser, medan 23 (52 procent) var resistenta enbart mot betalaktamer.

Molekylär karakterisering

De fyra ESBL_A-bildande *E. coli*-isolaten från svenskt kycklingkött innehöll genen *bla*_{CTX-M-1} och samtliga 40 *E. coli* med ESBL_M var positiva för genen *bla*_{CMY-2}. Totalt identifierades 17 stycken olika MLST-typer från det svenska köttet, varav ST38 var den vanligaste med 13 (30 procent) av isolaten. Samtliga isolat tillhörande ST38 innehöll genen *bla*_{CMY-2} och preliminära resultat tyder på att genen är belägen på en plasmid tillhörande replikontyp IncK.

Genetisk jämförelse mellan ESBL-bildande *E. coli* från kött och patienter

De ESBL-gener som påvisades hos *E. coli* från köttproverna jämfördes med motsvarande gener som tidigare påvisats hos *E. coli* från patienter i en punktprevalensstudie av Smittskyddsinstitutet februari till april 2009 tillsammans med nya framtagna sekvenseringsdata för vissa patientisolat (Tabell 9) (SWEDRES 2010; personlig kommunikation C. Jernberg och K. Tegmark Wisell, november 2011). Kollektionen består av konsekutiva ESBL-bildande *E. coli* som isolerats från urin från patienter i såväl öppen som slutenvård och som samlats in från landets samtliga laboratorier (undantaget Uppsala). Detta som ett första steg för att få en bättre uppfattning om i vilken omfattning ESBL-problematiken bland människor kan härröra från ESBL-bildande tarmbakterier från livsmedel.

Den vanligast förekommande gengruppen bland patientisolaten var CTX-M grupp 1 (Tabell 9), varav den klart dominerande genvarianten bland dessa, *bla*_{CTX-M-15}, återfanns i *E. coli* från två prover³ av nötkött motsvarande drygt 1 procent av ESBL-bildande *E. coli* isolerade från köttproverna totalt. Den nästvanligast förekommande genvarianten på europeiskt kycklingkött samt överlag, *bla*_{CTX-M-1}, utgjorde sannolikt en låg andel inom CTX-M grupp 1 liksom av generna bland patientisolaten totalt sett. Den vanligast förekommande genvarianten på svenskt kycklingkött och kycklingkött infört från EU-länder, *bla*_{CMY-2}, utgjorde högst 7 procent av generna bland patientisolaten, där hela CMY-gengruppen utgjorde 7 procent av totala antalet ESBL_A och ESBL_M. På motsvarande sätt utgjorde de vanligast förekommande genvarianterna på sydamerikanskt kycklingkött, *bla*_{CTX-M-2} och *bla*_{CTX-M-8}, högst 1 respektive 0 procent av generna bland patientisolaten (Tabell 9).

³ Se även Resultat, Infört och importerat kött, Molekylär karakterisering, Nötkött

Tabell 9. Fördelning av de ESBL-gengrupper och genvarianter som påvisades hos *E. coli* från 143 ESBL-positiva prover från svenskt, infört och importerat kött samt från 288 ESBL-positiva humanprover från Smittskyddsinstitutets punktprevalensstudie från 2009 (SWEDRES 2010). Ett *E. coli*-isolat från kött med ESBL av SHV-typ (*bla*_{SHV-12}) innehöll även gen ur CMY-gruppen (*bla*_{CMY-2}). Två av patientisolaten ur CTX-M grupp 1 innehöll även gen ur CMY-gruppen.

ESBL-gengrupper och genvarianter	Köttisolat (n=143): antal (%) <i>E. coli</i> med specifik ESBL-typ	Patientisolat (n=288): antal (%) <i>E. coli</i> med specifik ESBL-typ
□CTX-M grupp 1, varav: <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{CTX-M-1}	□29 (20) 2 27	□ 204 (71) - *
□CTX-M grupp 9, varav: <i>bla</i> _{CTX-M-14}	□1 (1) 1	□ 60 (21) -
□CTX-M grupp 2, varav: <i>bla</i> _{CTX-M-2}	□23 (16) 23	□ 2 (1) -
□CTX-M grupp 8, varav: <i>bla</i> _{CTX-M-8}	□20 (14) 20	□0 (0) 0
□CTX-M grupp 25, varav: <i>bla</i> _{CTX-M-25}	□1 (1) 1	□0 (0) 0
□SHV, varav: <i>bla</i> _{SHV-12}	□4 (3) 4	□ 5 (2) -
□TEM, varav: <i>bla</i> _{TEM-19} <i>bla</i> _{TEM-52}	□5 (3) 1 4	□0 (0) 0 0
□CMY, varav: <i>bla</i> _{CMY-2}	□61 (43) 61	□19 (7) - *

* Sekvensering av patientisolat inom CTX-M grupp 1 samt CMY-gruppen har gjorts inom ett bredare material med överlapp utav kollektionen från punktprevalensstudien 2009 med kompletterande stammar från 2010. Cirka 90 procent av patientisolaten inom CTX-M grupp 1 innehöll genen *bla*_{CTX-M-15} och cirka 4 procent var positiva för *bla*_{CTX-M-1}. Inom CMY-gruppen innehöll 90 procent av patientisolaten *bla*_{CMY-2}.

Importerat bladgrönt från Sydostasien

Förekomst av ESBL-bildande E. coli

Ingen resistens mot tredje generationens cefalosporiner påvisades hos 59 presumtiva *E. coli* isolerade med icke selektiv odling från färska kryddor och bladgrönsaker från Sydostasien.

Diskussion

Förekomst av ESBL-bildande *E. coli* och salmonella samt antibiotikaresistensbestämning

Kartläggningen beskriver den aktuella förekomsten av ESBL-bildande *E. coli* och salmonella på kött på den svenska marknaden, kunskap som tidigare saknats och som behövs för att värdera folkhälsoriskerna att sådana bakterier och tillhörande resistensgener sprids till människor via livsmedel.

Resultaten visar att ESBL-bildande *E. coli* var vanligt förekommande på kycklingkött som förts in till Sverige från EU-länder utanför Norden eller importerats från Sydamerika. ESBL-bildande *E. coli* påvisades också på köttprodukter av nöt (0-8%) och gris (2-13%) från olika områden, men i betydligt lägre omfattning än för kycklingkött (15-95%), vilket överensstämmer med vad som rapporterats tidigare av EFSA (2011). Högst var förekomsten i kycklingkött från Sydamerika med 95 procent positiva prover jämfört med övriga EU (ej Danmark) med 61 procent och Danmark med 15 procent. Förekomsten var således högre än i den danska kartläggning där ESBL-bildande *E. coli* påvisades i 50 procent av proverna från importerat kycklingkött och i 9 procent av proverna från inhemskt, danskt kött (selektiv odling) (DANMAP 2010). En förklaring till det kan vara att varje prov från den danska studien omfattade 5 g jämfört med denna studie med 25 g kött/köttsaft per prov. Det framgår inte heller vilka importländer som ingick i provtagningen, vilket förstås har betydelse för resultatet. I samma studie påvisades ESBL-bildande *E. coli* i en procent av proverna från danskt griskött, vilket är i samma storleksordning som rapporteras här.

I svenskt kycklingkött påvisades ESBL-bildande *E. coli* i 44 procent av proverna. Förekomsten var således hög, men fynden var inte oväntade med tanke på att 34 procent av proverna var positiva då tarminnehåll från svensk slaktkyckling nyligen undersöktes och att kycklingkött lätt förorenas vid slakten (SVARM 2010). Det är viktigt att poängtera att proverna från svenskt kycklingkött samlades in under en relativt kort tidsperiod (10 v) sent under studien. Proverna från infört och importerat kött var däremot insamlade under en tvåårsperiod, vilket innebär att resultaten inte är direkt jämförbara. Exempelvis ökade förekomsten av ESBL-bildande *E. coli* från danskt kycklingkött över tid, vilket innebär att andelen positiva prover från danskt kött sannolikt hade blivit högre om dessa prover hade samlats in under samma tidsperiod som det svenska kycklingköttet (ej redovisade data). Studien visar dock att ESBL-bildande *E. coli* är vanligt förekommande på kycklingkött, även kött producerat i länder som Sverige och Danmark i vilka cefalosporiner inte används vid uppfödning av slaktkyckling. Orsaken tros som tidigare nämnts vara spridning av resistenta bakterier från importerade avelsdjur.

ESBL-bildande *E. coli* med resistens mot ytterligare antibiotikaklasser såsom kinoloner och aminoglykosider var vanligt förekommande på infört och

importerat kött, undantaget Danmark och Finland. Användning av andra antibiotika än nyare generationers cefalosporiner kan således ha betydelse för selektion och spridning av de multiresistenta *E. coli*-isolaten.

Fynden av drygt en procent salmonella på infört kött visar på behovet av efterlevnad av kraven i de svenska salmonellagarantierna (förordning 1688/2005) vid införsel/import av kött. Den höga förekomsten av resistens hos salmonella i vissa länder, till exempel Tyskland och Spanien, förklaras till stor del av spridning av vissa multiresistenta varianter (EFSA 2011). Även här var fyra av fem påvisade salmonellaisolat från kyckling- respektive griskött multiresistenta med resistensmönster överensstämmande det som nyligen redovisades i EUs zoonosrapport för dessa bakterier och köttslag (EFSA 2011). Inget av påvisade salmonellaisolat var dock resistent mot tredje generationens cefalosporiner, medan zoonosrapporten visade på fyra procents förekomst bland isolaten från tyskt kycklingkött, den vanligaste smittkällan för salmonella i denna studie.

Inte heller något av *E. coli*-isolaten från sydostasiatiskt bladgrönt var resistent mot tredje generationens cefalosporiner. Resultatet ska dock tolkas med försiktighet, eftersom bakterierna odlats fram utan tillsats av cefalosporiner. Det går därför inte att avskrivna vegetabilier som spridningsväg för ESBL-bildande *E. coli* enbart baserat på dessa data. För att öka kunskapen på området planerar Livsmedelsverket, SVA och Smittskyddsinstitutet en kartläggning av ESBL-bildande tarmbakterier på vegetabilier med selektiv odlingsmetod.

Metodik

Selektiv odling av provmaterialet i både buljong och på agar användes för isolering av ESBL-bildande *E. coli* från kött, vilket också Europeiska Livsmedelssäkerhetsmyndigheten, EFSA, rekommenderar för den här typen av riktade ESBL-kartläggningar (EFSA 2011). Selektiv odling är en känsligare metod än den utan tillsats av antibiotika som vanligen används i de nationella övervakningsprogrammen inom EU. Andelen ESBL-positiva prov förväntas därför bli högre här och resultatet är inte jämförbart med data från övervakningsprogrammen i absoluta tal. Kartläggningen av salmonella var i huvudsak en prevalensstudie och därför valdes inte selektiv odling. För att undersöka ESBL-bildande salmonella specifikt bör dock samma metodik användas som för isolering av ESBL-bildande *E. coli*. Även *E. coli*-isolaten från bladgrönt är framodlade utan tillsats av aktuellt antibiotika, då dessa initialt inte togs fram i syfte att resistensbestämmas.

En begränsning i vårt tillvägagångsätt, av praktiska skäl, var att endast en koloni per positivt prov analyserades och att detta i första hand var en koloni från plattan med CHROMagar™ ESBL. Detta medför en risk att missa ytterligare ESBL-enzymvarianter hos andra *E. coli*-bakterier från ett och samma prov, i synnerhet av typen ESBL_M, som enbart växer på CHROMagar™ CTX. Exempelvis påvisades *E. coli* med olika ESBL-gener hos två par analyserade dublettprover från samma batch (ej redovisade data). Andelen (procent) ESBL_M kan således vara högre än vad som rapporteras här och därför har bara antalet *E. coli* med ESBL_M angivits.

Molekylär karakterisering

Hos människor, djur och livsmedel med ESBL-bildande tarmbakterier är det vissa genotyper, särskilt av CTX-M-typ, som dominerar i olika geografiska områden (Smet, Martel et al. 2010). Resultaten från denna kartläggning bekräftar detta. Gener som kodar för CTX-M-1 dominerade i *E. coli* från köttprover från EU, följt av CMY-2 (främst kycklingkött). Dessa två genotyper samt CTX-M-14, TEM-52 och SHV-12 är de som rapporteras mest frekvent i samband med ESBL-bildande *E. coli* på livsmedel inom EU (EFSA 2011). De senare tre genotyperna påvisades också i denna kartläggning, men i mycket lägre omfattning än CTX-M-1 och CMY-2.

I sydamerikanskt kycklingkött däremot dominerade ESBL av typen CTX-M-2 och CTX-M-8. CTX-M-8 påvisades enbart i isolat från det sydamerikanska kycklingköttet medan inga av dessa prover var positiva för CTX-M-1. ESBL av typen CTX-M-2 och CTX-M-8 dominerade också hos ESBL-bildande *E. coli* från kycklingkött som importerats från Sydamerika till Storbritannien (Dhanji, Murphy et al. 2010). I den ovan nämnda danska studien utgjorde CTX-M-1 och CMY-2 merparten av alla positiva fynd från importerat kött medan däremot CTX-M-8 inte påvisades i något prov.

Även i *E. coli* från svenskt kycklingkött påvisades gener som kodar för CTX-M-1 och i synnerhet CMY-2. Inte helt oväntat var det samma resistensgener i ungefär samma fördelning som tidigare har påvisats i tarminnehåll från svensk slaktkyckling (SVARM 2010).

Totalt 12 *bla*_{CMY-2}-positiva *E. coli* från svenskt, 5 *bla*_{CMY-2}-positiva *E. coli* från danskt och 1 *bla*_{CMY-2}-positiva *E. coli* från finskt kycklingkött var av samma MLST-typ och hade samma resistensmönster. Preliminära resultat från replikontypningen tyder på att plasmiderna som innehåller *bla*_{CMY-2} i dessa isolat tillhör samma Inc-grupp. Det är också värt att notera att den danska kycklingproduktionen köper in en stor del av sina föräldradjur från Sverige. Detta stödjer teorin om vertikal spridning av dels bakterier men även plasmider inom kycklingproduktionen. Resultaten av MLST och resistensmönster för *E. coli*-isolaten från kött från samtliga områden tyder överlag på en hög diversitet bland bakterieisolaten. Ytterligare studier behövs för att undersöka släktskap mellan olika ESBL-plasmider i bakteriepopulationen.

Genetisk jämförelse mellan ESBL-bildande *E. coli* från kött och patienter

Flera av de ESBL-gener som påvisades hos *E. coli* från köttproverna återfinns även hos *E. coli* från patienter. Det var dock inte samma resistensgener som dominerade hos *E. coli* på kött och hos *E. coli* från patienter. *E. coli* med *bla*_{CTX-M-15}, den idag vanligaste ESBL-typen överlag inom svensk sjukvård, påvisades i *E. coli* från två prover av nötkött från Nederländerna respektive Österrike, vilket motsvarar 1 procent av totala antalet positiva köttisolat. De livsmedelsassocierade generna var dock sannolikt belägna på plasmider av

replikontyp IncI1 och de båda isolaten tillhörde MLST-typ ST10, medan de CTX-M-15-positiva isolat som infekterar människa vanligen bär genen på IncFII-plasmider och tillhör ST131 (Naseer and Sundsfjord 2011). Genen *bla*_{CTX-M-15} har överlag påvisats i enstaka fall i prover från livsmedel inom EU (EFSA 2011), vilket överensstämmer med resultatet från denna kartläggning.

De två genvarianter som påvisades i störst utsträckning hos *E. coli* från köttproverna, *bla*_{CMY-2} och *bla*_{CTX-M-1}, utgjorde totalt sett en låg andel av de ESBL-gener som förekom hos *E. coli* bland humanfallen i den punktprevalensstudie som genomfördes av Smittskyddsinstitutet från februari till april 2009 (SWEDRES 2010). Detta är sannolikt lägre än i studien av Leverstein *et al.* (Leverstein-van Hall, Dierikx *et al.* 2011) som visar att genvarianterna som var vanligast (91 procent) i holländskt kycklingkött, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM-52} och *bla*_{SHV-12}, utgjorde 34 procent av ESBL-generna hos *E. coli* från holländska patienter. Detta trots att studien inte inkluderade ESBL_M-bildande *E. coli*.

Eftersom provtagningen av kött inte överlappar helt i tiden med insamlingen av patientisolat, är det förstås svårt att direkt koppla ihop förekomsten av ESBL-gener och ESBL-bildande *E. coli* från de aktuella köttproverna med nämnda humanfall. Det är dock troligt att fördelningen av gener för livsmedels- respektive patientisolaten inte förändras dramatiskt på så kort tid, vilket möjliggör en jämförelse av provtyperna.

Sammanfattningsvis visar denna kartläggning att ESBL-bildande *E. coli* förekommer på kött på den svenska marknaden. Förekomsten är några procent för nö- och griskött, men är betydligt vanligare på kycklingkött. Samma typer av gener förekommer i låg omfattning hos *E. coli*-bakterier från kött respektive patienter i Sverige. Ytterligare studier av plasmiderna på vilka ESBL-generna är belägna krävs dock för att med säkerhet kunna fastställa att livsmedel har en begränsad betydelse som källa för spridning av ESBL-gener till patienter. För att värdera folkhälsoriskerna att ESBL-bildande *E. coli* och tillhörande gener sprids till människor via livsmedel behövs, förutom prevalensdata för kött och vegetabilier, även haltdata för olika livsmedel. Det behövs också ökad kunskap om släktskap hos ESBL-bildande tarmbakterier och ESBL-plasmider från både livsmedel, djur och människor, inklusive friska individer i samhället.

Finansiering

Myndigheten för samhällsskydd och beredskap var huvudfinansiär och stod för merparten av kostnaderna, inklusive Livsmedelsverkets provinköp samt utgifter för transport, metodutveckling och analyser. Utgifter i samband med provtagning bekostades av respektive provtagande deltagare.

Tack

Ett stort tack riktas till kommuner, gränskontrollen, köttimportörer och Svensk Fågel för deltagande i provtagningen och bidrag av prover. Vi vill också tacka medverkande laboratorier för utskick av *E. coli*-isolat från sydostasiatiskt bladgrönt (Riksprojekt 2009).

Referenser

Bertrand, S., F. X. Weill, et al. (2006). "Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003)." Journal of Clinical Microbiology **44**(8): 2897-2903.

Chabok, A., M. Tärnberg, et al. (2010). "Prevalence of fecal carriage of antibiotic-resistant bacteria in patients with acute surgical abdominal infections." Scandinavian Journal of Gastroenterology **45**: 1203-1210.

CIPARS "Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance."

DANMAP "Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark."

DANMAP (2010). "Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark in 2010."

- de Kraker, M. E., P. G. Davey, et al. (2011). "Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe." PLoS Medicine **8**(10): e1001104.
- Dhanji, H., N. M. Murphy, et al. (2010). "Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **65**(12): 2534-2537.
- EARS-Net (2009). "Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)."
- ECDC (2007). "Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2005. http://ecdc.europa.eu/pdf/ECDC_epi_report_2007.pdf."
- EFSA (2008). "Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food and animals." The EFSA Journal **141**: 1-44.
- EFSA (2011). "The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. EFSA and ECDC." The EFSA Journal **9**(7): 2154.
- EFSA (2011). "Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum betalactamases and/or AmpC betalactamases in food and food-producing animals. EFSA Panel on Biological hazards." The EFSA Journal **9**(8): 2322.
- EMA (2011). "European Medicines Agency. Trends in the sales of veterinary antimicrobial agents in nine European countries (2005-2009). (EMA/238630/2011)."
- EUCAST (2011). "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST. <http://www.eucast.org/>."
- Giske, C. G., A. S. Sundsfjord, et al. (2009). "Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **63**(1): 1-4.
- Leverstein-van Hall, M. A., C. M. Dierikx, et al. (2011). "Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains." Clinical Microbiology and Infections **17**(6): 873-880.
- Livsmedelsverket (2009). "Riskprofil: Livsmedel som spridningsväg för antibiotikaresistens. Livsmedelsverket och Strama VL, SVA. M Egervärn och H Lindmark."

- MARAN "Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in the Netherlands".
- MARAN (2009). "Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in the Netherlands in 2009."
- NARMS "National Antimicrobial Resistance Monitoring System. USA."
- Naseer, U. and A. Sundsfjord (2011). "The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones." Microbial Drug Resistance **17**(1): 83-97.
- NORM/NORMVET "Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway."
- Reuland, E. A., N. al Naiemi, et al. (2011). "Prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) in raw vegetables." ECCMID. ESBLs from the environment to the clinic, **17**, S4.O102.
- Riksprojekt (2009). "Salmonella, campylobacter och *E. coli* i färska kryddor och bladgrönsaker från Sydostasien av N Karnehed och M Lindblad. Livsmedelsverkets rapport 5/2010."
- Schwaber, M. J. and Y. Carmeli (2007). "Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **60**(5): 913-920.
- SJV (2009). "Sveriges utrikeshandel med jordbruksvaror och livsmedel 2006-2008. Jordbruksverket. Rapport 2009:18."
- SJV (2011).
<http://www.sjv.se/amnesomraden/handel/politikochframtid/eusjordbrukspolitik>.
- SJV (2011b). "Jordbruksstatistisk årsbok 2011 med data om livsmedel. Jordbruksverket och Statistiska centralbyrån. 2011."
- Smet, A., A. Martel, et al. (2010). "Broad-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health." FEMS Microbiology Review **34**: 295-316.
- SMI (2011). "www.smittskyddsinstitutet.se/statistik/extended-spectrum-beta-lactamase-esbl/."
- Strama (2009). "Implementering av en ny ESBL-definition. Supplement 2 till Stramas förslag till vårdprogram mot ESBL-resistens hos tarmbakterier 2007."

- Strömdahl, H., J. Tham, et al. (2011). "Prevalence of faecal ESBL carriage in the community and in a hospital setting in a county of Southern Sweden." European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 12 March 2011.
- SVA (2010). "Surveillance of zoonotic and other animal disease agents in Sweden 2010. SVA, Jordbruksverket, Smittskyddsinstitutet och Livsmedelsverket."
- SVARM (2010). "Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden. <http://www.sva.se>."
- SWEDRES (2010). "A Report on Swedish Antimicrobial Utilisation and Resistance in Human Medicine. Smittskyddsinstitutet, Sverige."
- Tängden, T., O. Cars, et al. (2010). "Foreign travel is a major risk factor for colonization with *Escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases: a prospective study with Swedish volunteers." Antimicrobial Agents Chemotherapy **54**(9): 3564-3658.
- van de Sande-Bruinsma, N., H. Grundmann, et al. (2008). "Antimicrobial drug use and resistance in Europe." Emerging Infectious Diseases **14**(11): 1722-1730.
- Warren, R. E., V. M. Ensor, et al. (2008). "Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **61**(3): 504-508.
- WHO (2007). "The world health report 2007 - A safer future: global public health security in the 21st century. <http://www.who.int/whr/2007/en/>."
- WHO (2007b). "Antimicrobials for human medicine: Categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use. http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf."