



Antibiotikaresistens

ESBL-bildande E. coli i svenskt råvatten – en pilotstudie

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

Förord

Antibiotikaresistens är ett av de största hoten mot folkhälsan. Ett av de allvarligaste resistensproblemen är så kallade ESBL-bildande tarmbakterier, vilka påvisas i ökande omfattning inom sjukvården och samhället. För att bättre förstå hur denna typ av antibiotikaresistens sprids och för att kunna sätta in relevanta hanteringsåtgärder, behövs kunskap om förekomsten av dessa bakterier hos människa, djur, i livsmedel och miljö samt om ESBL-bildande tarmbakterier från olika provtyper är av samma slag. Resistensproblemet måste därför ses ur ett tvärsektorielt, "one health – one medicine"- perspektiv och hanteras i samverkan mellan myndigheter i livsmedelskedjan, inom sjukvården och den yttre miljön. Mot denna bakgrund genomför Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) och Smittskyddsinstitutet ett kunskapsuppbyggande projekt: "Antibiotikaresistens – Livsmedels roll som källa och spridningsväg för ESBL-bildande tarmbakterier och potentiell betydelse för folkhälsan". Projektet avslutas 2014 och finansieras av MSB-anslag 2:4 krisberedskap som ett led i att stärka den nationella krisberedskapen på området.

Ett av delprojekten är denna pilotstudie som har genomförts med syfte att öka kunskapen om förekomst och halter av ESBL-bildande *E. coli*-bakterier i svenskt råvatten och därmed få en indikation på spridning av dessa bakterier i miljön. Livsmedelsverket har ansvarat för insamling av råvattenprover och för isolering och haltbestämning av ESBL-bildande *E. coli*. SVA har ansvarat för antibiotikaresistensbestämning och molekylär karakterisering av gjorda fynd från dessa prover.

Uppsala maj 2013

Projektgrupp

Livsmedelsverket

Maria Egervärn	Riskvärderare mikrobiolog, Risk- och nyttovärderingsavdelningen
Karin Gustafsson	Informatör, Kommunikationsavdelningen
Torbjörn Lindberg	Statsinspektör, Kontrollstödsenheten
Mats Lindblad	Riskvärderare mikrobiolog, Risk- och nyttovärderingsavdelningen
Marianne Ljunge	Laboratorieingenjör, Mikrobiologienheten
Christer Wiberg	Mikrobiolog, Mikrobiologienheten

SVA

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

Innehåll

Summary.....	5
Sammanfattning.....	6
Inledning.....	7
Syfte.....	7
ESBL-bildande tarmbakterier.....	7
ESBL - människa.....	8
ESBL - livsmedelsproducerande djur och livsmedel	8
ESBL - vatten och miljön	9
Kommunala vattenverk.....	10
Råvatten.....	10
Beredning	11
Mikrobiologisk kontroll av råvatten och dricksvatten.....	11
Utförande	12
Val av vattenverk.....	12
Provtagning.....	13
Provhantering	13
Isolering av ESBL-bildande <i>E. coli</i> i råvatten.....	13
Kvantifiering av ESBL-bildande <i>E. coli</i> i råvatten.....	14
Karakterisering av ESBL-bildande <i>E. coli</i> i råvatten	14
Resultat	15
Förekomst av ESBL-bildande <i>E. coli</i> i råvatten.....	15
Halter av ESBL-bildande <i>E. coli</i> i råvatten.....	15
Karakterisering av ESBL-bildande <i>E. coli</i> i råvatten	16
Diskussion	19
Finansiering	21
Tack	21
Referenser.....	22

Summary

This pilot study, performed by the National Food Agency and the National Veterinary Institute of Sweden, investigated the occurrence and concentrations in Swedish raw water of *E. coli* capable of producing extended spectrum beta-lactamases (ESBL) or transferable AmpC beta-lactamases (pAmpC).

E. coli and other Enterobacteriaceae producing ESBL or pAmpC are a rapidly emerging public health problem, as they produce enzymes that hydrolyse clinically important antibiotics such as penicillins, cephalosporins and some carbapenems. The presence of ESBL/pAmpC-producing bacteria is increasingly being reported in humans, food-producing animals and food. As yet, few studies have addressed the occurrence and the impact of ESBL-producing bacteria in water samples, e.g. raw water.

A total of 98 1-L samples of surface water were collected from February 2012 to November 2012 at five Swedish water treatment plants that normally have a relatively high prevalence and concentration of *E. coli* bacteria. ESBL/pAmpC-producing *E. coli* were isolated from samples of raw water after selective culture with cefotaxime and the isolates were characterised phenotypically and using different molecular methods. The concentration of ESBL/pAmpC-producing *E. coli* was determined in follow-up samples of raw water collected on three occasions in January-February 2013 at the two water treatment plants with the highest frequency of ESBL/pAmpC-producing *E. coli* in the raw water.

ESBL/pAmpC-producing *E. coli* were commonly found in raw water from two of the five water treatment plants studied, showing that resistant bacteria are spread in the environment. The prevalence varied depending on the surface water source. However, the concentration of the resistant bacteria was low, 1-3 cfu per 100 mL, constituting approximately 4% of the total amount of *E. coli* bacteria in the respective raw water sample. The resistant bacteria were found in surface water, which is treated to meet drinking water standards. No *E. coli* bacteria were found in drinking water samples collected within the sampling programmes of the participating water treatment plants during 2012.

Six types of ESBL/pAmpC genes were found in the 27 *E. coli* isolates obtained from the positive samples, of which four were found during the whole sampling period and were prevalent in samples taken at more than one water treatment plant. In addition, the genes were situated on various types of plasmids and most *E. coli* isolates were not closely related, indicating high diversity among the ESBL/pAmpC-producing *E. coli* found in the water samples. The combinations of ESBL genes, plasmids and *E. coli* isolates were partly similar to previous findings primarily in humans, but also in food-producing animals and food. Similar studies on the prevalence of ESBL/pAmpC-producing *E. coli* in various foods, in healthy people and in patients in Sweden are currently underway in collaboration with the Swedish Institute for Communicable Disease. The aim of the main project is to compare the data from studies such as this on raw water with similar data obtained from different populations, thereby increasing knowledge on the impact of various sources and dissemination routes for this type of antibiotic resistance.

Sammanfattning

Livsmedelsverket och Statens veterinärmedicinska anstalt har i denna pilotstudie undersökt förekomst och halter av antibiotikaresistenta, så kallade ESBL-bildande *E. coli* i svenskt råvatten med syfte att få en indikation på hur stor spridningen av dessa bakterier är i miljön. Råvatten är det vatten som ska bli dricksvatten och är antingen ytvatten från sjöar och vattendrag eller grundvatten från grävda eller borrhållningar i marken.

Ett av de allvarligaste globala folkhälsoproblemen är infektioner orsakade av tarmbakterier som bildar enzymet ESBL. Dessa bakterier är resistenta mot de kliniskt viktiga antibiotikagrupperna penicilliner, cefalosporiner och i vissa fall karbapenemer. *E. coli* och andra tarmbakterier ur familjen Enterobacteriaceae som bildar ESBL påvisas i ökande omfattning hos människa, livsmedelsproducerande djur och i livsmedel. Kunskapen om förekomsten och betydelsen av resistenta bakterier i vatten är dock överlag bristfällig.

Totalt 98 enlitersprov av råvatten samlades in fortlöpande från februari till november 2012 vid fem svenska vattenverk som samtliga brukar ha förhållandevis hög förekomst och halt av *E. coli*-bakterier i råvattnet. Förekomsten av ESBL-bildande *E. coli* i råvattenproven undersöktes med en selektiv odlingsmetod och framodlade bakterier art- och resistensbestämdes samt karakteriserades därefter med molekylära metoder. Halten *E. coli* med respektive utan ESBL-enzym bestämdes i uppföljningsprov tagna vid tre tillfällen i januari-februari 2013 i råvatten från de två vattenverken som hade flest prov positiva för ESBL-bildande *E. coli*.

ESBL-bildande *E. coli* var vanligt förekommande i råvattenprov från två av de fem medverkande vattenverken. Förekomsten varierade beroende på vilken vattentäkt råvattnet kom från. Halten ESBL-bildande *E. coli* i råvattenproven var dock låg; 1-3 cfu per 100 mL, vilket utgjorde i i genomsnitt cirka 4 procent av totala mängden *E. coli* från samma råvattenprov. Fynden har gjorts i råvatten, som innan det kan konsumeras som dricksvatten först ska beredas i olika steg i vattenverken i syfte att göra dricksvattnet hälsomässigt säkert. Inga *E. coli*, resistenta som icke resistenta, påvisades i prov från utgående dricksvatten tagna i de medverkande vattenverkens egen kontroll under 2012.

I de totalt 27 *E. coli*-isolaten från råvattenproven påvisades sex olika ESBL-genvarianter, varav fyra var spridda över hela provtagningsperioden och förekom i prov från fler än ett vattenverk. Detta, samt att generna var belägna på flera olika typer av plasmider och att de flesta *E. coli*-isolaten inte var närbesläktade, tyder på hög diversitet bland fynden av ESBL-bildande *E. coli* i vattenproven. De kombinationer av ESBL-gener, plasmider och *E. coli*-isolat som påvisades i råvatten var till viss del av samma slag som tidigare rapporterats framför allt från människa, men även från livsmedelsproducerande djur och livsmedel. Studier om förekomst av ESBL-bildande *E. coli* i olika livsmedel och hos friska och sjuka människor i Sverige pågår för närvarande tillsammans med Smittskyddsinstitutet inom ramen för samma projekt. Målet är att jämföra resistensdata från vatten såsom dessa med motsvarande data från olika provtyper och därmed öka kunskapen om olika källors och spridningsvägars betydelse för denna typ av antibiotikaresistens.

Inledning

Syfte

Syftet med pilotstudien var att undersöka förekomst och halter av cefalosporin-resistenta, så kallade ESBL-bildande *E. coli* i råvatten från fem vattenverk i Sverige. Studien syftade även till att identifiera och karakterisera gener för produktion av ESBL hos *E. coli* som isolerats från råvattenproven samt att undersöka släktskap hos ESBL-plasmiderna respektive hos *E. coli*-isolaten från dessa prov.

Förekomst av ESBL-bildande *E. coli* i råvatten är en indikation på spridning av dessa bakterier i miljön. Således bidrar studien till att bättre förstå kretsloppet för hur denna typ av antibiotikaresistens sprids i samhället.

ESBL-bildande tarmbakterier

E. coli och andra gramnegativa tarmbakterier som bildar ”extended spectrum betalactamase” (ESBL) är resistenta mot de kliniskt viktiga antibiotikagrupperna penicilliner, cefalosporiner och i vissa fall karbapenemer. ESBL är enzymer som bryter ner betalaktam, den reaktiva delen av dessa så kallade betalaktamantibiotika. Gener för ESBL-produktion (*bla*) är ofta belägna på rörliga genetiska element såsom plasmider, vilket innebär att resistensen kan överföras mellan olika tarmbakterier främst inom familjen Enterobacteriaceae. ESBL-plasmiderna innehåller ofta även andra resistensgener, vilket gör att tarmbakterier med ESBL ofta är multiresistenta, det vill säga resistenta mot tre eller fler antibiotikaklasser. Därmed riskerar infektioner orsakade av dessa bakterier att bli mer svårbehandlade.

Det finns många varianter av ESBL med varierande förmåga att bryta ned olika betalaktamantibiotika. Inom humanmedicinen i Norden görs sedan 2009 följande indelning av ESBL-typerna (Giske *et al.* 2009):

- **ESBL_A** omfattar 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-enzymerna som kodas av *bla*_{CTX-M}-gener, TEM som kodas av *bla*_{TEM} och SHV som kodas av *bla*_{SHV}.
- **ESBL_M** omfattar plasmidburna AmpC-betalaktamaser (pAmpC), 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-enzymerna som kodas av *bla*_{CMY}-gener. Utanför Norden benämns ESBL_M som pAmpC (EFSA 2011).
- **ESBL_{CARBA}** omfattar karbapenemaser (t ex KPC), metallo-betalaktamaser (t ex VIM, NDM, IMP) och oxacillinaser (OXA). ESBL_{CARBA} ger resistens mot alla betalaktamantibiotika inklusive karbapenemer, som är särskilt viktiga inom

humansjukvården. Utanför Norden benämns ESBL_{CARBA} som karbapenemaser (EFSA 2011).

ESBL - människa

ESBL-bildande tarmbakterier som orsakar infektioner är ett av de allvarligaste globala folkhälsoproblemen. Den huvudsakliga uppkomsten och spridningen av ESBL-bildande tarmbakterier inom humansjukvården bedöms vara kopplad till användning av antibiotika till människor (framförallt cefalosporiner med brett spektrum) och spridning av infektioner mellan människor (van de Sande-Bruinsma *et al.* 2008). I Sverige är resistensläget bättre än i många andra länder, men även här har förekomsten av ESBL-bildande tarmbakterier ökat. Fynd hos människa (från infektioner med ESBL-bildande Enterobacteriaceae liksom från screeningodlingar hos symptomfria) är sedan 2007 anmälningspliktigt för kliniska laboratorier enligt smittskyddslagen och sedan dess har antalet rapporterade fall varje år ökat med i snitt cirka 25 procent (SMI 2013). Under 2011 var incidensen av ESBL-bildande Enterobacteriaceae 60 fall per 100 000 invånare. De flesta fynden gjordes i urinprover (63 procent) och *E. coli* med ESBL utgjorde 87 procent av samtliga 5667 rapporterade fall. ESBL_A av typen CTX-M (främst CTX-M-15) rapporterades mest frekvent (SWEDRES 2011). Fynd av ESBL_{CARBA}-bildande Enterobacteriaceae, för vilka både anmälningsplikt och smittspårningsplikt föreligger, har rapporterats i ett fyrtiotal fall fram till 2012. Majoriteten av fallen var kopplade till sjukhusvård utomlands i framförallt Indien, Grekland och Irak (SMI 2013).

ESBL-bildande tarmbakterier kan också utgöra en del av normalfloran hos människor utan att man blir sjuk. Tidigare undersökningar har visat att ungefär 2-5 procent av symptomfria människor i Sverige är bärare av tarmbakterier med ESBL (Chabok *et al.* 2010; Strömdahl *et al.* 2011). Att vara symptomfri bärare är således inget problem i sig, men bakterierna i tarmen kan utgöra en reservoar av ESBL-gener som med tiden skulle kunna överföras till sjukdomsframkallande bakterier med svårbehandlade infektioner som följd.

ESBL - livsmedelsproducerande djur och livsmedel¹

ESBL_A- och ESBL_M-bildande Enterobacteriaceae, framförallt *E. coli* och salmonella, påvisas i ökande omfattning även hos livsmedelsproducerande djur och i livsmedel inom EU och är framförallt vanliga hos slaktkyckling och på kycklingkött (DANMAP 2011; EFSA 2011; Overdevest *et al.* 2011; Egea *et al.* 2012; Kola *et al.* 2012). En nyligen gjord kartläggning av ESBL-bildande *E. coli* på kött som importerats till Sverige visar i likhet med ovan nämnda studier på hög förekomst i prov från kycklingkött från EU-länder utanför Skandinavien (61 procent) och från Sydamerika (95 procent) (Egervärn *et al.* 2011). Fynd gjordes också i prov från europeiskt kött av nöt och gris, men i mycket lägre omfattning än på kycklingkött.

¹ Andelen (procent) ESBL-bildande *E. coli* avser selektiv odlingsmetod, d v s tillsats av cefalosporin i odlingsmediet.

I *E. coli* från europeiskt kycklingkött dominerade *bla*_{CTX-M-1} och *bla*_{CMY-2} (Egervärn *et al.* 2011), vilka tillhör de vanligast förekommande ESBL-generna överlag hos isolat från livsmedelsproducerande djur och livsmedel inom EU (EFSA 2011). ESBL_{CARBA}-bildande *E. coli* och salmonella isolerades nyligen för första gången från djur inom EU, nämligen från gris och kyckling i Tyskland (Fischer *et al.* 2012; Fischer *et al.* 2013). Tarmbakterier med ESBL_{CARBA} har inte påvisats i livsmedel.

ESBL_A- och ESBL_M-bildande *E. coli* är också vanligt förekommande i tarm-innehåll från svensk slaktkyckling (54 procent; SVARM 2011) och på svenskt kycklingkött (44 procent; Börjesson *et al.* 2013). I Sverige används dock inte cefalosporiner inom uppfödningen av slaktkyckling och övrig antibiotikaanvändning är mycket begränsad. Fynden beror troligtvis på spridning av resistenta bakterier från importerade avelsdjur (SVARM 2010). Indikationer på sådan spridning har också rapporterats från andra EU-länder (EFSA 2011). *E. coli* med ESBL har också påvisats i tarminnehåll från svenska slaktsvin (2 procent; SVARM 2011). Däremot gjordes inga fynd av ESBL-bildande *E. coli* på svenskt griskött eller i tarminnehåll från svenska nötkreatur vid det senaste resistensövervakningstillfället år 2011 respektive 2009 (sammanfattat i SVARM 2011).

Kunskapen är bristfällig om förekomsten och betydelsen av ESBL-bildande Enterobacteriaceae på vegetabilier (EFSA 2011). De fåtal studier med selektiv odlingsmetod som gjorts visar på låg förekomst (Egea *et al.* 2011; Reuland *et al.* 2011). För att öka kunskapen på området genomför Livsmedelsverket, SVA och Smittskyddsinstitutet under 2012-2014 en större kartläggning av ESBL-bildande *E. coli* på inhemska och importerade bladgrönsaker.

ESBL - vatten och miljön

Om *E. coli* med eller utan ESBL förekommer i sjöar och vattendrag indikerar det direkt eller indirekt förorening med avföring från människa och/eller djur, men det innebär inte nödvändigtvis att dessa bakterier är sjukdomsframkallande eftersom de allra flesta *E. coli*-stammar är ofarliga. Vattenmiljön utgör dock en möjlig spridningsväg för de resistenta bakterier som förekommer och den ger dessutom bakterier från olika populationer möjlighet att interagera och utbyta resistensgener. Tarm- och miljöbakterier med ESBL som förekommer i sjöar och vattendrag kan således liksom resistenta bakterier i tarmen utgöra en reservoar av resistensgener som med tiden skulle kunna överföras till sjukdomsframkallande bakterier och därigenom ytterligare bidra till spridningen av resistenta bakterier i samhället. Dessutom kan vattnet på grund av förorening från närliggande utsläppskällor såsom avloppsreningsverk innehålla antibiotika och tungmetaller som kan selektera för resistenta bakterier (Baquero *et al.* 2008; Lupo *et al.* 2012; Wellington *et al.* 2013). Selektion kan ske även vid de låga antibiotikakoncentrationer som man generellt finner i miljön (Gullberg *et al.* 2011).

Kunskap om förekomsten och betydelsen av antibiotikaresistenta, ESBL-bildande tarmbakterier i vatten är överlag bristfällig enligt EFSA² (2011). Fynd av

² Europeiska myndigheten för livsmedelssäkerhet

E. coli med ESBL har nyligen rapporterats i vattenprov från Svartån/Hjälmarén (Jass och Olsson 2013). Någon större undersökning om ESBL-bildande tarmbakterier i svenska sjöar eller vattendrag har dock inte gjorts. ESBL_A-bildande Enterobacteriaceae framför allt av typen CTX-M har under senare år påvisats i olika vattendrag i mellersta och södra Europa (Dhanji *et al.* 2011; RIVM 2012; Tacao *et al.* 2012; Zurfluh *et al.* 2013), Afrika (Chouchani *et al.* 2013) och Asien (Kim *et al.* 2008; Chen *et al.* 2010). I endast en av dessa studier undersöktes förekomsten av ESBL_M-bildande tarmbakterier. Ett fåtal undersökningar visar dock att även Enterobacteriaceae med ESBL_M av typen CMY-2 förekommer i vattendrag i exempelvis Kanada (Mataseje *et al.* 2009) och Korea (Kim *et al.* 2008). ESBL_{CARBA}-bildande Enterobacteriaceae har nyligen påvisats i vattendrag i exempelvis Schweiz (Zurfluh *et al.* 2013), Tunisien (Chouchani *et al.* 2013), USA (Aubron *et al.* 2005) och Indien (Walsh *et al.* 2011). Än mer oroväckande är att tarmbakterier med ESBL, inklusive ESBL_{CARBA} även har påvisats i dricksvatten från områden såsom Sydostasien (Bhatta *et al.* 2007; Walsh *et al.* 2011) och Centralafrika (De Boeck *et al.* 2012).

Fynd av ESBL-bildande tarmbakterier har också rapporterats utanför Skandinavien i prov från avloppsreningsverk och sjukhusavlopp (t ex Galvin *et al.* 2010; Reinthaler *et al.* 2010; Dolejska *et al.* 2011; Korzeniewska *et al.* 2013; Wellington *et al.* 2013). Ytterligare en indikator på att denna typ av resistenta bakterier numera är globalt spridd i miljön är att resistenstypen även förekommer hos tarmbakterier i faecesprov från fåglar och andra vilda djur i olika delar av världen (sammanfattning av Guenther *et al.* 2011; Hernandez *et al.* 2012), inklusive från fåglar i Sverige (Bonnedahl *et al.* 2010; Wallensten *et al.* 2011).

Kommunala vattenverk

Råvatten

Råvaran till dricksvatten kallas råvatten och är antingen ytvatten från sjöar och vattendrag eller grundvatten från grävda eller borrhålor i marken. Cirka hälften av allt dricksvatten i Sverige bereds från ytvatten i knappt 170 ytvattenverk (Svenskt-Vatten 2013). Dessa anläggningar är ofta stora och försörjer bland annat flera stora svenska städer. Dricksvattenförsörjningen i Sverige karakteriseras annars av många små anläggningar. Det finns knappt 1500 grundvattenverk, varav cirka 80 procent försörjer färre än 2000 personer med dricksvatten (Svenskt-Vatten 2013). Knappt 130 vattenverk använder konstgjort grundvatten, vilket framställs genom att låta ytvatten infiltreras i marken, till exempel passera genom en grusås (Svenskt-Vatten 2013). För att råvattnet ska räknas som grundvatten anser Livsmedelsverket att det behövs en infiltration som är längre än 14 dagar (Livsmedelsverket 2006).

Beredning

Råvatten bereds till dricksvatten genom olika processteg i vattenverken. Beredningens huvudsyfte är att göra dricksvattnet hälsomässigt säkert, främst ur mikrobiologisk synpunkt. Vattenverken använder i varierande omfattning olika avskiljande (fällning eller filtrering) och inaktiverande (desinfektion) säkerhetsbarriärer för att motverka förekomsten av sjukdomsframkallande mikroorganismer i dricksvattnet. Eftersom ytvatten har en mer skiftande kvalitet jämfört med grundvatten både med avseende på kemiska och mikrobiologiska föroreningar, har ytvattenverken ofta mer komplicerade beredningsprocesser (Svenskt-Vatten 2013).

Mikrobiologisk kontroll av råvatten och dricksvatten

En förutsättning för att bereda säkert dricksvatten är att ha kunskap om råvattnets kvalitet och dess variationer så att beredningsprocessen kan optimeras. Kravet på att ta hänsyn till råvattnets kvalitet när man bereder dricksvattnet finns i Livsmedelsverkets dricksvattenföreskrifter (SLVFS 2001:30), men de detaljkrav på råvattenundersökningar som fanns före 2001 är borttagna. Det är alltså upp till varje verksamhetsutövare att ta fram ett eget undersökningsprogram för att bestämma sin råvattenkvalitet. Till stöd finns en branschriktlinje från Svenskt Vatten (Svenskt-Vatten 2008).

Eftersom det är omständigt och kostnadskrävande att påvisa sjukdomsframkallande mikroorganismer, innebär den löpande kvalitetsövervakningen av dricksvatten hos de flesta vattenverk att följa förekomst och halt av bakteriella indikatorer såsom *E. coli*. Trots avsaknad av detaljkrav är det många dricksvattenproducenter som rutinmässigt även övervakar sitt råvatten (Svenskt-Vatten 2008b). Antibiotikaresistens ingår dock inte i vattenverkens ordinarie analyser av bakterier varken i rå- eller dricksvatten.

Utförande

Val av vattenverk

Urvalet baserades på data om förekomst av *E. coli* i råvattenprov tagna i den egna kontrollen vid olika vattenverk i Sverige. Pilotstudien omfattade prov av råvatten tagna vid fem vattenverk som samtliga brukar ha förhållandevis hög förekomst av *E. coli* i råvattnet i halter om cirka 10-100 cfu/MPN per 100 mL (Tabell 1). Fyra av de medverkande anläggningarna är ytvattenverk med olika beredningsprocesser och en av anläggningarna (Skråmsta) använder konstgjort grundvatten (Tabell 1).

Tabell 1. Förekomst av *E. coli* i råvattenprov tagna i den egna kontrollen under 2011 vid respektive medverkande vattenverk samt kort beskrivning av de olika säkerhetsbarriärerna i respektive anläggning.

Vattenverk/ Kommun	Typ av råvatten	Avskiljande beredningssteg	Inaktiverande beredningssteg	Antal prov	Andel prov positiva för <i>E. coli</i> * /100 mL	Andel positiva prov ≥10 <i>E. coli</i> * /100 mL
Alelyckan/ Göteborg stad	Ytvatten från Göta älv eller Delsjöarna	Kemisk fällning med efterföljande kolfilter	Klorering	155	92 %	89 %
Borg/ Norr- köpings kommun	Ytvatten från sjön Glan	Kemisk fällning med efterföljande sedimentering, kolfilter och långsamfilter	Klorering	57	39 %	11 %
Karlskrona/ Karlskrona kommun	Ytvatten från Lyckebyån	Kemisk fällning med efterföljande sandfilter	Klorering och UV-ljus	18	100 %	44 %
Långasjön/ Karlshamns kommun	Ytvatten från Långasjön	Kemisk fällning med efterföljande sedimentering och sandfilter	UV-ljus	55	80 %	35 %
Skråmsta/ Örebro kommun	Konstgjort grundvatten från Svartån**	-	Klorering	26 [‡]	96 %	92 %

*Kvantifiering av *E. coli*-bakterier med membranfiltermetod ("colony forming units", cfu per 100 mL) eller med MPN-metod ("most probable number", MPN per 100 mL).

**Konstgjort grundvatten tillverkas genom >14 dagars infiltration av ytvatten från Svartån. Själva infiltrationssteget föregås av kemisk fällning med efterföljande sedimentering och sandfilter.

‡Prov tagna i den egna kontrollen 2010 och 2011.

Provtagning

För kvalitativ bestämning av ESBL-bildande *E. coli* i råvatten togs prov vid respektive vattenverk varannan vecka från februari till november 2012 av respektive deltagande vattenverks egen personal. Råvattenprov vid Skråmsta vattenverk togs från Svartån, det vill säga innan infiltrationssteget. För kvantitativ bestämning av *E. coli* med och utan ESBL togs uppföljningsprov från råvatten vid Skråmsta respektive Alelyckans vattenverk vid tre tillfällen i januari-februari 2013. Varje prov omfattade en liter råvatten, vilket fördelades på två stycken sterila plastflaskor à 500 mL. Proven packades och skickades samma dag i isolerade lådor med kylklampar till Livsmedelsverket.

Provhantering

Inkomna prov från råvatten hanterades enligt Livsmedelsverkets instruktion för provhantering på Mikrobiologiska enheten, MI-i052. Proven analyserades som regel direkt vid ankomst, det vill säga inom ett dygn efter provtagningstillfället. Tre försenade prov analyserades rumsvarma två dagar efter provtagning och då enbart för kvalitativ bestämning, dvs ingen kvantifiering gjordes. Prov som motogs mer än två dygn efter provtagning analyserades däremot inte, utan exkluderades från undersökningen.

Isolering av ESBL-bildande *E. coli* i råvatten

Detektion av ESBL-bildande *E. coli* i råvatten gjordes enligt Livsmedelsverkets instruktion MI-m196. Nedan följer en översiktlig beskrivning av analysmetoden, en selektiv odlingsmetod som togs fram av Livsmedelsverket under pilotstudiens första del.

Cirka en liter råvatten filtrerades genom 90 mm membranfilter med porstorleken 0,45 µm. Filtret fördes över till 270 mL buffrat peptonvatten med 1 µg/mL cefotaxim och inkuberades vid 37°C i 18-24 h. Cirka 10 µl av anrikningbuljongen spreds på CHROMagar™ med 1 µg/mL cefotaxim (CHROMagar™ CTX) och CHROMagar™ ESBL. Agarplattorna inkuberades vid 37°C i 18-24 h. Cefalosporinresistenta *E. coli* växer som rosa kolonier på dessa plattor, ESBL_A-bildande *E. coli* växer på båda platttyperna och ESBL_M-bildande *E. coli* enbart på CHROMagar™ CTX. I första hand valdes en rosa koloni från plattan med CHROMagar™ CTX och om den inte innehöll några kolonier valdes en rosa koloni från plattan med CHROMagar™ ESBL. Artbestämning av renstrukna kolonier gjordes med API20E och ESBL-produktion hos dessa verifierades fenotypiskt med Etest®ESBL. Misstänkta ESBL_M-bildande *E. coli* testades vid SVA med Etest®AmpC för att påvisa enzymet AmpC och alla verifierade ESBL-bildande *E. coli*-isolat testades för karbapenemasproduktion med Etest®Meropenem.

Kvantifiering av ESBL-bildande *E. coli* i råvatten

Cirka 100 mL råvatten filtrerades enligt ovan. Samma förfarande upprepades två gånger. Varje filter fördes över till en av två föjande plattor: Chromocultagar™ med 1 µg/mL cefotaxim för bestämning av halten ESBL (ESBL_A eller ESBL_M)-bildande *E. coli* samt Chromocultagar™ utan tillsats av cefalosporin för bestämning av halten *E. coli* totalt i varje prov. Varje filter inkuberades på respektive platta vid 37°C i 18-24 h. *E. coli*-bakterier växer som blå kolonier på chromocultagar. Misstänkta *E. coli*-kolonier räknades på varje platta och halten ESBL-bildande *E. coli* och totalhalten *E. coli* redovisades som cfu/100 mL. ESBL hos de cefotaximresistenta isolaten verifierades till genfamiljsnivå med multiplex-PCR enligt nedan.

Karakterisering av ESBL-bildande *E. coli* i råvatten

Karakterisering av ESBL-bildande *E. coli* och tillhörande gener och plasmider gjordes på SVA enligt rekommendationer från EFSA (2011).

Resistens mot fjorton antibiotika undersöktes med en mikrodilutionsmetod enligt CLSIs standard (CLSI 2008) med VetMIC GN-mo paneler (SVA, Uppsala), för bestämning av lägsta hämmande antibiotikakoncentration (MIC; mg/L). Epidemiologiska brytpunkter enligt EUCAST (2011) användes för att klassificera isolaten som resistenta eller känsliga. Genfamiljer för ESBL-fenotyperna CTX-M, SHV, TEM, OXA och CMY detekterades med multiplex-PCR (Perez-Perez och Hanson 2002; Woodford *et al.* 2006; Fang *et al.* 2008) och specifika genvarianter bestämdes med DNA-sekvensering (Hasman *et al.* 2005; Ryoo *et al.* 2005; McGettigan *et al.* 2009; Börjesson *et al.* 2013). Släktskap mellan bakterieisolaten undersöktes med genotypningsmetoden MLST ("multilocus sequence typing") för att få fram specifika sekvenstyper, ST (<http://mlst.ucc.ie>). Släktskap mellan olika ESBL-plasmider undersöktes med PCR-baserad replikontyning, en metod som delar in plasmider i inkompatibilitetsgrupper (Inc) (Carattoli *et al.* 2005).

Resultat

Förekomst av ESBL-bildande *E. coli* i råvatten

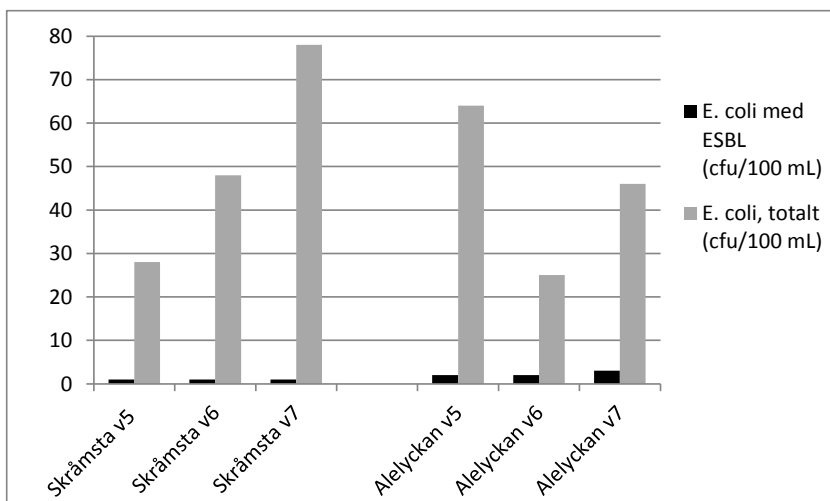
Prov av råvatten samlades in fortlöpande från februari till och med november 2012 från de fem vattenverken. Sammanlagt analyserades 98 inkomna prov. ESBL-bildande *E. coli* påvisades i 27 av proven, varav 25 togs vid två av vattenverken (Tabell 2). De övriga två positiva proven togs vid olika tillfällen och vid olika vattenverk. Samtliga prov från Karlskrona vattenverk var negativa, trots att det historiskt sett har haft högst förekomst av *E. coli* i råvattnet (Tabell 1). De flesta positiva prover togs under provinsamlingens första tredjedel, det vill säga under våren 2012 (Tabell 2).

Tabell 2. Påvisande (+/-) av ESBL-bildande *E. coli* i råvatten från de fem medverkande vattenverken under perioden februari till november 2012. Skuggat fält indikerar uteblivet provtagnings- och/eller analystillfälle.

Vattenverk	v7	v9	v11	v13	v15	v17	v19	v21	v23	v25	v27	v29	v31	v33	v35	v37	v39	v41	v43	v45	v47	v48
Karlskrona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Långasjön		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Borg		-	-	+	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Skråmsta		+	+	+	+	+	-			-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Alelyckan	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+		+	+	+	-		+	+	-		-	-

Halter av ESBL-bildande *E. coli* i råvatten

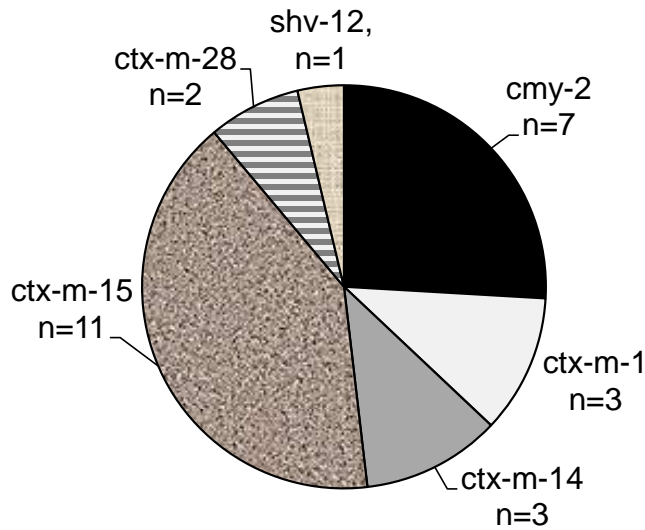
Halten *E. coli* med ESBL samt *E. coli* totalt bestämdes vid tre senare tillfällen i råvatten från de två vattenverken med flest prov positiva för ESBL-bildande *E. coli* (Figur 1). ESBL-bildande *E. coli* påvisades i samtliga undersökta prov. I de tre proven från Skråmsta vattenverk påvisades 1 cfu ESBL-bildande *E. coli* per 100 mL råvatten, vilket utgjorde 1-4 procent av totala mängden *E. coli*. I motsvarande prov från Alelyckans vattenverk påvisades ESBL-bildande *E. coli* i en halt av 2-3 cfu per 100 mL, vilket utgjorde 3-8 procent av totala mängden *E. coli* (Figur 1).



Figur 1. Haltbestämning av *E. coli* med ESBL samt *E. coli* totalt i råvatten från Skråmsta respektive Alelyckans vattenverk vid tre provtagningsstillfällen i januari-februari 2013.

Karakterisering av ESBL-bildande *E. coli* i råvatten

Hos de 27 ESBL-bildande *E. coli* som påvisats i råvattenproven 2012 identifierades totalt sex ESBL-gener, varav de vanligaste var *bla*_{CTX-M-15} och *bla*_{CMY-2} (Figur 2, Tabell 3). Fynd av *E. coli* med de fyra vanligast förekommande ESBL-generna var spridda över hela provtagningsperioden och gjordes i råvatten från båda vattenverken med högst frekvens prov positiva för ESBL-bildande *E. coli* (Tabell 3). I vissa prov påvisades även *bla*_{TEM-1} eller *bla*_{OXA-1}, som är gener för betalaktamaser men utan utvidgat spektrum (Tabell 3).



Figur 2. Fördelning av de ESBL (*bla*)-gener som återfanns hos de 27 ESBL-bildande *E. coli* i råvatten från de medverkande vattenverken. Genvarianterna *bla*_{CTX-M-28} och *bla*_{CTX-M-15} skiljer sig i enbart ett DNA-baspar.

ESBL-generna *bla*_{CTX-M-1} och *bla*_{CMY-2} var oftast belägna på plasmider tillhörande replikontyp *incI1* (Tabell 3). Även vissa *E. coli* med *bla*_{CTX-M-15} bar ESBL-genen på *incI1*-plasmider. Två *bla*_{CTX-M-15}-gener liksom båda *bla*_{CTX-M-28}-generna var belägna på plasmider som var positiva för såväl *incFIB*, *incFIA* som *incFII*. För knappt hälften av *bla*_{CTX-M-15}-generna liksom en *bla*_{CMY-2}-gen och båda påvisade *bla*_{CTX-M-14}-generna kunde replikontypen för tillhörande plasmider inte bestämmas.

Av de 27 ESBL-bildande *E. coli* som isolerats från råvattenproven identifierades 17 olika MLST-typer (Tabell 3). Av dessa var ST58, ST394 och ST648 vanligast förekommande. Ett av *E. coli*-isolaten med *bla*_{CTX-M-15} tillhörde MLST-typ ST131. Cirka 74 procent av de ESBL-bildande *E. coli*-isolaten var multi-resistenta, det vill säga resistenta mot tre eller fler antibiotikaklasser. Resistens mot kinoloner, aminoglykosider och trimetoprim-sulfa var vanligast förekommande. *E. coli* som innehöll *bla*_{CTX-M-1} eller *bla*_{CMY-2} var överlag mer känsliga mot antibiotika än övriga ESBL-bildande *E. coli*-isolat. Två av *E. coli*-isolaten, som innehöll *bla*_{CTX-M-14} respektive *bla*_{SHV-12}, var enbart känsliga mot colistin och ytterligare ett antibiotikum (Tabell 3). Samtliga *E. coli*-isolat var känsliga mot karbapenemen meropenem.

Tabell 3. Karakterisering av ESBL-bildande *E. coli* påvisade i råvatten 2012: genvarianter, plasmidreplikontyp, MLST-typ och antibiotikaresistensmönster. Ampicillin (Am), cefotaxim (Ctx), ceftazidim (Caz), ciprofloxacin (Ci), nalidixinsyra (Nal), chloramphenicol (Cm), florfenicol (Ff), gentamicin (Gm), kanamycin (Km), streptomycin (Sm), tetracyclin (Tc), colistin (Cs), sulfametoxazol (Su), trimetoprim (Tm). Brytpunkter för resistens mot visst antibiotikum enligt EUCAST (2011).

Vattenverk	Tidpunkt för provtagning	ESBL-gen	Plasmid-replikontyp	MLST-typ	Resistensmönster utöver betalaktamresistens (Am, Ctx, Caz)
Skråmsta	v47	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	I1	ST10	-
Skråmsta	v48	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	I1	ST10	-
Alelyckan	v7	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	I1	ST2178	Sm, Su, Tm
Skråmsta	v31	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	ej påvisad	ST38	Sm, Tm
Alelyckan	v11	<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-1}	ej påvisad	ST38	Ci, Nal, Cm, Ff, Gm, Sm, Tc, Su, Tm
Alelyckan	v25	<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-1}	FIB, FIA, FII	ST648	Ci, Nal, Gm, Km, Tc, Su, Tm
Alelyckan	v39	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ej påvisad	ST58	Ci
Alelyckan	v29	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ej påvisad	ST226	Ci, Tc
Skråmsta	v37	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ej påvisad	ST648	Ci, Nal, Sm, Tc, Su, Tm
Alelyckan	v21	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ej påvisad	ST648	Ci, Nal, Cm, Gm, Tc, Su, Tm
Skråmsta	v11	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	FIB, FIA, FII	ST394	Ci, Nal, Sm, Tc, Tm
Borg	v13	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	I2	ST3058	Ci, Gm, Km
Skråmsta	v9	<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{OXA-1}	FII	ST295	Cm, Sm, Tc, Su, Tm
Alelyckan	v15	<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1}	ej påvisad	ST131	Cm, Sm, Tc, Su, Tm
Skråmsta	v39	<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1}	FIA	ST405	Ci, Nal, Tc, Tm
Alelyckan	v33	<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1}	I1	ST62	Ci, Nal, Sm, Tc, Tm
Alelyckan	v9	<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1}	I1	ST746	Cm, Gm, Km, Sm, Tc, Su, Tm
Skråmsta	v15	<i>bla</i> _{CTX-M-28}	FIB, FIA, FII	ST394	Ci, Nal, Tc, Tm
Skråmsta	v13	<i>bla</i> _{CTX-M-28}	FIB, FIA, FII	ST394	Ci, Nal, Sm, Tc, Tm
Skråmsta	v17	<i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{TEM-1}	ej påvisad	ST224	Ci, Nal, Cm, Gm, Km, Sm, Tc, Su, Tm
Alelyckan	v41	<i>bla</i> _{CMY-2}	I1	ST58	Ci, Nal
Skråmsta	v45	<i>bla</i> _{CMY-2}	I1	ST1432	Cs
Skråmsta	v43	<i>bla</i> _{CMY-2}	I1	ST3594	-
Alelyckan	v31	<i>bla</i> _{CMY-2} + <i>bla</i> _{TEM-1}	ej påvisad	ST69	Sm, Tc, Su, Tm
Alelyckan	v17	<i>bla</i> _{CMY-2} + <i>bla</i> _{TEM-1} *	I1	ST58	-
Långasjön	v33	<i>bla</i> _{CMY-2} + <i>bla</i> _{TEM-1} *	I1	ST58	Ci, Nal, Su
Alelyckan	v23	<i>bla</i> _{CMY-2} + <i>bla</i> _{TEM-1}	K, FIB, FIA	ST69	Sm, Su, Tm

*Negativ i sekvenseringen av tem-genfragmentet

Diskussion

Multiresistenta, ESBL-bildande *E. coli* var vanligt förekommande i prov från råvatten från två av de fem medverkande vattenverken (Alelyckan respektive Skråmsta), vilket visar att denna typ av resistenta bakterier även är spridda i miljön. Förekomsten av *E. coli* som bildar ESBL varierade dock beroende på vilken vattentäkt råvattnet kom från, eftersom bara enstaka fynd gjordes i prov från de tre andra vattentäkterna.

I de totalt 27 *E. coli* som isolerats från råvattenproven påvisades sex olika ESBL-genvarianter, varav fyra var spridda över hela provtagningsperioden och förekom i prov från fler än ett vattenverk. Detta, samt att generna var belägna på plasmider av flera olika replikontyper och att *E. coli*-isolaten tillhörde många olika MLST-typer, tyder på hög diversitet bland fynden av ESBL-bildande *E. coli* i vattenproven. Resistenta bakterier är ett växande problem i samhället i stort och resultaten är oroväckande ur den aspekten. Fynden har dock gjorts i råvatten, som innan det kan konsumeras som dricksvatten först ska beredas i olika steg i vattenverken i syfte att göra dricksvattnet hälsomässigt säkert. *E. coli* och andra bakterier är normalt känsliga för klor, UV-ljus eller ozon som används på ytvattenverk för att inaktivera mikroorganismer från råvattnet. Inga *E. coli*, resistenta som icke resistenta, påvisades i prov från utgående dricksvatten tagna i de medverkande vattenverkens egen kontroll under 2012 (ej visade data). Halten ESBL-bildande *E. coli* i råvattenproven som togs i denna pilotstudie var dessutom låg, 1-3 cfu per 100 mL. Andelen *E. coli* i råvatten som bildar ESBL var däremot hög jämfört med vad som påvisats i exempelvis tarminnehåll från nöt, gris och kyckling; i genomsnitt cirka 4 procent (denna studie) mot upp till 0,1 procent (Horton *et al.* 2011).

Fynden av ESBL-bildande *E. coli* i råvatten från Svartån vid Skråmsta vattenverk bekräftar det tidigare gjorda enskilda fyndet av J. Jass *et al.* (2013) i Svartån/Hjälmaran år 2010. Att inte fler fynd av *E. coli* med ESBL gjordes i den tidigare studien (Jass och Olsson 2013) kan bero på att bakterierna isolerades utan tillsats av cefalosporin i odlingsmediet, att olika provvolymmer användes eller att provtagningsplatserna inte var desamma. Olika provtagningsplatser (uppströms eller nedströms från utsläppskällor såsom avloppsreningsverk, enskilda avlopp eller djuruppfödning) innebär olika påverkan. I pilotstudien ingick dock inte att identifiera de utsläppskällor som är av störst betydelse för förekomsten av resistenta bakterier i respektive råvatten.

Resultaten från pilotstudien överensstämmer med vad som rapporterats på andra håll inom EU med flera fynd av ESBL-bildande *E. coli* och andra Enterobacteriaceae i vattenprov från floder i exempelvis Schweiz (Zurfluh *et al.* 2013), Nederländerna (RIVM 2012), Storbritannien (Dhanji *et al.* 2011) och Portugal (Tacao *et al.* 2012). De vanligast förekommande generna av ESBL_A-typ; *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-1} och *bla*_{CTX-M-14} var vanliga även i denna pilotstudie. *E. coli* med *bla*_{CTX-M-15}, den idag vanligaste ESBL-typen överlag inom svensk sjukvård, påvisades i 40 procent av de positiva råvattenproven. I ett fåtal fall var *bla*_{CTX-M-15}-genen dessutom belägen på IncFII-plasmider eller så tillhörde *E. coli*-isolatet

ifråga MLST-typen ST131, vilket är typiskt för de CTX-M-15-bildande isolat som infekterar människa (Naseer och Sundsfjord 2011).

En begränsning i många vattenkartläggningar är att endast förekomsten av tarmbakterier med de klassiska ESBL_A-enzymerna undersöks. Några av undantagen är kanadensiska och koreanska studier i vilka genen *bla*_{CMY-2} har påvisats i *E. coli* från olika vattendrag (Kim *et al.* 2008; Mataseje *et al.* 2009). I denna pilotstudie var *E. coli* med ESBL_M av typen *bla*_{CMY-2} vanligast förekommande efter *bla*_{CTX-M-15}, vilket visar att även tarmbakterier med ESBL_M bör inkluderas i framtida undersökningar av råvatten och andra provtyper. Generna *bla*_{CTX-M-1} och *bla*_{CMY-2} tillhör de vanligaste bland ESBL_A- respektive ESBL_M-bildande Enterobacteriaceae hos såväl livsmedelsproducerande djur, livsmedel som människa, inom liksom utanför Sveriges gränser (EFSA 2011; Egervärn *et al.* 2011; SWEDRES 2011; Börjesson *et al.* 2013; Börjesson *et al.* 2013). De båda genvarianterna var i de flesta fall belägna på plasmider av replikontyp IncII, en gen/plasmid-kombination som tidigare har påvisats hos ESBL-bildande Enterobacteriaceae från olika provtyper (CloECKAERT *et al.* 2010; Börjesson *et al.* 2013).

Sammanfattningsvis visar denna pilotstudie att förekomsten av ESBL-bildande *E. coli* varierade beroende på vattentäkt och att bakterierna var vanligt förekommande i råvattenprov från två av de fem medverkande vattenverken. Halterna var dock låga. De kombinationer av ESBL-gener, plasmider och *E. coli*-isolat som påvisades i råvatten var till viss del av samma slag som tidigare har rapporterats framför allt från människa, men även från livsmedelsproducerande djur och livsmedel. För att få en heltäckande bild av läget avseende ESBL-bildande *E. coli* och tillhörande gener i svenskt råvatten krävs dock en större kartläggning med analys av råvattenprov från ytterligare vattenverk i Sverige.

För att öka kunskapen om olika vattenmiljöers roll som spridningsväg för ESBL-bildande *E. coli* och som reservoar för tillhörande ESBL-gener, behöver resistensdata från vatten såsom dessa koordineras med data från motsvarande studier om resistensläget hos människor och djur i Sverige. Studier om förekomst av ESBL-bildande *E. coli* i olika livsmedel och hos friska och sjuka människor pågår för närvarande inom ramen för samma projekt. Målet är att jämföra ESBL-gener, plasmider och *E. coli*-isolat från olika provtyper och därmed öka kunskapen om olika källors och spridningsvägars betydelse för denna typ av antibiotikaresistens.

Finansiering

Myndigheten för samhällsskydd och beredskap var huvudfinansiär och stod för merparten av kostnaderna, inklusive utgifter för provmaterial och -transport, metodutveckling och analyser. Utgifter i samband med provtagning bekostades av respektive medverkande vattenverk.

Tack

Ett stort tack riktas till vattenverkspersonal vid Alelyckan, Borg, Karlskrona, Långasjön och Skråmsta för deltagande i provtagningen samt bidrag av råvattenprov och analysdata.

Referenser

- Aubron, C., L. Poirel, R. J. Ash, *et al.* (2005). "Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U.S. rivers." Emerg Infect Dis **11**(2): 260-264.
- Baquero, F., J. L. Martinez och R. Canton (2008). "Antibiotics and antibiotic resistance in water environments." Curr Opin Biotechnol **19**(3): 260-265.
- Bhatta, D. R., A. Bangtrakulnonth, P. Tishyadhigama, *et al.* (2007). "Serotyping, PCR, phage-typing and antibiotic sensitivity testing of *Salmonella* serovars isolated from urban drinking water supply systems of Nepal." Lett Appl Microbiol **44**(6): 588-594.
- Bonnedahl, J., P. Drobni, A. Johansson, *et al.* (2010). "Characterization, and comparison, of human clinical and black-headed gull (*Larus ridibundus*) extended-spectrum beta-lactamase-producing bacterial isolates from Kalmar, on the southeast coast of Sweden." J Antimicrob Chemother **65**(9): 1939-1944.
- Börjesson, S., M. Egervärn, M. Lindblad, *et al.* (2013). "Frequent occurrence of extended-spectrum beta-lactamase- and transferable ampc beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on domestic chicken meat in Sweden." Appl Environ Microbiol **79**(7): 2463-2466.
- Börjesson, S., C. Jernberg, A. Brolund, *et al.* (2013). "Characterization of plasmid-mediated AmpC-producing *E. coli* from Swedish broilers and association with human clinical isolates." Clin Microbiol Infect **Epub date 2013/04/16**.
- Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, *et al.* (2005). "Identification of plasmids by PCR-based replicon typing." J Microbiol Methods **63**(3): 219-228.
- Chabok, A., M. Tärnberg, K. Smedh, *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.
- Chen, H., W. Shu, X. Chang, *et al.* (2010). "The profile of antibiotics resistance and integrons of extended-spectrum beta-lactamase producing thermotolerant coliforms isolated from the Yangtze River basin in Chongqing." Environ Pollut **158**(7): 2459-2464.
- Chouchani, C., R. Marrakchi, I. Henriques, *et al.* (2013). "Occurrence of IMP-8, IMP-10, and IMP-13 metallo-beta-lactamases located on class 1 integrons and other extended-spectrum beta-lactamases in bacterial isolates from Tunisian rivers." Scand J Infect Dis **45**(2): 95-103.
- Cloekaert, A., K. Praud, M. Lefevre, *et al.* (2010). "Inc11 plasmid carrying extended-spectrum-beta-lactamase gene *bla*CTX-M-1 in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008." Antimicrob Agents Chemother **54**(10): 4484-4486.
- CLSI (2008). "Performance Standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-third edition. Clinical and Laboratory Standard Institute."

- DANMAP (2011). "Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark in 2011."
- De Boeck, H., B. Miwanda, O. Lunguya-Metila, *et al.* (2012). "ESBL-positive Enterobacteria isolates in drinking water." Emerg Infect Dis **18**(6): 1019-1020.
- Dhanji, H., N. M. Murphy, C. Akhigbe, *et al.* (2011). "Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase from UK river water." J Antimicrob Chemother **66**(3): 512-516.
- Dolejska, M., P. Frolkova, M. Florek, *et al.* (2011). "CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents." J Antimicrob Chemother **66**(12): 2784-2790.
- EFSA (2011). "Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum beta-lactamases and/or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals. EFSA Panel on Biological hazards." The EFSA Journal **9**(8): 2322.
- Egea, P., L. Lopez-Cerero, M. D. Navarro, *et al.* (2011). "Assessment of the presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in eggshells and ready-to-eat products." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **30**(9): 1045-1047.
- Egea, P., L. Lopez-Cerero, E. Torres, *et al.* (2012). "Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain." Int J Food Microbiol **159**(2): 69-73.
- Egervärn, M., S. Englund, S. Börjesson, *et al.* (2011). "Kartläggning av ESBL-bildande *E. coli* och salmonella på kött på den svenska marknaden. Livsmedelsverket, SVA och Smittskyddsinstitutet. www.slv.se."
- EUCAST (2011). "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST. <http://www.eucast.org/>."
- Fang, H., F. Ataker, G. Hedin, *et al.* (2008). "Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006." J Clin Microbiol **46**(2): 707-712.
- Fischer, J., I. Rodriguez, S. Schmoger, *et al.* (2012). "*Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm." J Antimicrob Chemother **67**(7): 1793-1795.
- Fischer, J., I. Rodriguez, S. Schmoger, *et al.* (2013). "*Salmonella enterica* subsp. *enterica* producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms." J Antimicrob Chemother **68**(2): 478-480.
- Galvin, S., F. Boyle, P. Hickey, *et al.* (2010). "Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources." Appl Environ Microbiol **76**(14): 4772-4779.

- Giske, C. G., A. S. Sundsfjord, G. Kahlmeter, *et al.* (2009). "Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **63**(1): 1-4.
- Guenther, S., C. Ewers och L. H. Wieler (2011). "Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution?" Front Microbiol **2**: 246.
- Gullberg, E., S. Cao, O. G. Berg, *et al.* (2011). "Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations." PLoS Pathog **7**(7): e1002158.
- Hasman, H., D. Mevius, K. Veldman, *et al.* (2005). "Beta-lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands." J Antimicrob Chemother **56**(1): 115-121.
- Hernandez, J., J. Stedt, J. Bonnedahl, *et al.* (2012). "Human-associated extended-spectrum beta-lactamase in the Antarctic." Appl Environ Microbiol **78**(6): 2056-2058.
- Horton, R. A., L. P. Randall, E. L. Snary, *et al.* (2011). "Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum {beta}-lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production." Appl Environ Microbiol **77**(11): 3715-3719.
- Jass, J. och P.-E. Olsson (2013). "Antibiotic resistance in fecal indicator bacteria. Muntlig presentation vid Mikrobiologiskt vårmöte i Örebro 2013-04-10".
- Kim, J., H. Y. Kang och Y. Lee (2008). "The identification of CTX-M-14, TEM-52, and CMY-1 enzymes in *Escherichia coli* isolated from the Han River in Korea." J Microbiol **46**(5): 478-481.
- Kola, A., C. Kohler, Y. Pfeifer, *et al.* (2012). "High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany." J Antimicrob Chemother **67**(11): 2631-2634.
- Korzeniewska, E., A. Korzeniewska och M. Harnisz (2013). "Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment." Ecotoxicol Environ Saf **91**: 96-102.
- Livsmedelsverket (2006). "Vägledning dricksvatten. Vägledning till Livsmedelsverkets föreskrifter (SLVFS 2001:30) om dricksvatten."
- Lupo, A., S. Coyne och T. U. Berendonk (2012). "Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies." Front Microbiol **3**: 18.
- Mataseje, L. F., N. Neumann, B. Crago, *et al.* (2009). "Characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* isolates from recreational beaches and private drinking water in Canada between 2004 and 2006." Antimicrob Agents Chemother **53**(7): 3126-3130.
- McGettigan, S. E., B. Hu, K. Andreacchio, *et al.* (2009). "Prevalence of CTX-M beta-lactamases in Philadelphia, Pennsylvania." J Clin Microbiol **47**(9): 2970-2974.

- Naseer, U. och A. Sundsfjord (2011). "The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones." Microbial Drug Resistance **17**(1): 83-97.
- Overdevest, I., I. Willemsen, M. Rijnsburger, *et al.* (2011). "Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands." Emerg Infect Dis **17**(7): 1216-1222.
- Perez-Perez, F. J. och N. D. Hanson (2002). "Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR." J Clin Microbiol **40**(6): 2153-2162.
- Reinthaler, F. F., G. Feierl, H. Galler, *et al.* (2010). "ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge." Water Res **44**(6): 1981-1985.
- Reuland, E. A., N. al Naiemi, M. C. Rijnsburger, *et al.* (2011). "Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) in raw vegetables." ECCMID. ESBLs from the environment to the clinic, 17, S4.O102.
- RIVM (2012). "Prevalence of antibiotic resistant bacteria in the rivers Meuse, Rhine and New Meuse. National Institute for Public Health and the Environment. RIVM Report 703719071/2011."
- Ryoo, N. H., E. C. Kim, S. G. Hong, *et al.* (2005). "Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea." J Antimicrob Chemother **56**(4): 698-702.
- SMI (2013). "<http://www.smittskyddsinstitutet.se/>."
- Strömdahl, H., J. Tham, E. Melander, *et al.* (2011). "Prevalence of faecal ESBL carriage in the community and in a hospital setting in a county of Southern Sweden." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **30**(10): 1159-1162.
- SVARM (2010). "Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (SVARM) 2010. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden. 2011. <http://www.sva.se>."
- SVARM (2011). "Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (SVARM) 2011. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden. 2012. <http://www.sva.se>."
- SWEDRES (2011). "A Report on Swedish Antimicrobial Utilisation and Resistance in Human Medicine. Smittskyddsinstitutet, Sverige."
- Svenskt-Vatten (2008). "Råvattenkontroll - Krav på råvattenkvalitet. Branschriktlinje från Svenskt Vatten 2008-12-08."
- Svenskt-Vatten (2008b). "Enkätundersökning: Hur fungerar dricksvattenkontrollen. Utförd av Miljökemigruppen i Sverige AB (projektnr 0706P17) 2008-08-19."
- Svenskt-Vatten (2013). "Svenskt Vattens hemsida. <http://www.svensktvatten.se/Vattentjanster/Dricksvatten/>."
- Tacao, M., A. Correia och I. Henriques (2012). "Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of bla(CTX-M)-like genes." Appl Environ Microbiol **78**(12): 4134-4140.

- Wallensten, A., J. Hernandez, K. Ardiles, *et al.* (2011). "Extended spectrum beta-lactamases detected in *Escherichia coli* from gulls in Stockholm, Sweden." Infect Ecol Epidemiol **1**.
- Walsh, T. R., J. Weeks, D. M. Livermore, *et al.* (2011). "Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study." Lancet Infect Dis **11**(5): 355-362.
- van de Sande-Bruinsma, N., H. Grundmann, D. Verloo, *et al.* (2008). "Antimicrobial drug use and resistance in Europe." Emerging Infectious Diseases **14**(11): 1722-1730.
- Wellington, E. M., A. B. Boxall, P. Cross, *et al.* (2013). "The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria." Lancet Infect Dis **13**(2): 155-165.
- Woodford, N., E. J. Fagan och M. J. Ellington (2006). "Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases." J Antimicrob Chemother **57**(1): 154-155.
- Zurfluh, K., H. Hachler, M. Nuesch-Inderbinen, *et al.* (2013). "Characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolated from rivers and lakes in Switzerland." Appl Environ Microbiol **79**(9): 3021-3026.