



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap

Förekomst av fekala mikroorganismer och antibiotikaresistenta bakterier i gödsel och vattendrag kring hästanläggningar

Elin Gertzell

*Uppsala
2017*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2017:3*

Förekomst av fekala mikroorganismer och antibiotikaresistenta bakterier i gödsel och vattendrag kring hästanläggningar

Prevalence of fecal microorganisms and antibiotic-resistant bacteria in manure and watercourses surrounding horse facilities

Elin Gertzell

Handledare: Stefan Örn, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Biträdande handledare: Lise-Lotte Fernström, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Biträdande handledare: Gunnar Carlsson, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

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

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0751

Program: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Delnummer i serie: Examensarbete 2017:3

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: fekal förorening, antibiotikaresistens, ESBL, häst

Keywords: fecal contamination, antibiotic resistance, ESBL, horse

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

Med en tillväxt på 10-20 % mellan åren 2004 och 2010 är hästnäringen en växande bransch. Kopplat till konstaterat höga utsläpp av näringsämnen från hästanläggningar och indikationer på utsläpp även av föroreningar i form av fekala mikroorganismer gör det till en bransch som är angelägen är undersöka med avseende på dess miljöpåverkan. Studien jämförde halter av fekala indikatorbakterier i vattendrag uppströms och nedströms större hästanläggningar, och analyserade också förekomsten av ESBL-producerande *E.coli* både i vattendragen och i gödsel. Ingen *Salmonella* spp., som analyserades som ett exempel på en fekal patogen, hittades i studien. Ingen koppling kunde göras mellan hästanläggningar och vattnets mikrobiologiska kvalitet, även om enstaka gårdar gav upphov till misstanke om förorening. Resultaten kan vara falskt negativa då studien genomfördes vid torrt väder utan nämnvärd avrinning. ESBL-producerande *E.coli* hittades i ca 30 % av både vatten- och gödselproverna. Fler vattenprov nedströms anläggningarna var positiva för resistent *E.coli* än uppströms. Alla isolat var multiresistenta i varierande grad, och flera var resistent mot de antibiotika som används till häst. Resultaten tyder på att ESBL-producerande *E.coli* förekommer spritt i miljön och förekommer på besättningsnivå i hög utsträckning.

SUMMARY

The horse industry is growing in Sweden with a growth rate of 10-20% between the years 2004 to 2010. Previous studies tell us of high emissions of nutrients, and suggest possible emissions of fecal microorganisms. Altogether this makes it an interesting industry to study regarding its environmental effects. This study compared the amount of fecal indicator bacteria in waters up- and downstream of larger horse stables, and analyzed the prevalence of ESBL-producing *E.coli* in both the waters and horse manure. *Salmonella* spp. was analyzed as an example of a fecal pathogen, but not found in any of the samples. No correlation was found between higher numbers of indicator bacteria and the stables, though specific stables were suspected to be a source of contamination. These may be false negative results due to very dry weather during the period of sampling resulting in minimal runoff. ESBL-producing *E.coli* were found in approximately 30 % of both water and manure samples. More water samples downstream were positive for ESBL-producing *E.coli* than upstream. All the isolates carried multi-resistance, and many were resistant to several, or all, of the antibiotics used to treat horses. The results indicate a widespread prevalence in the environment and in horses on herd level.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	3
Hästhållning i Sverige	3
<i>Gödselhantering</i>	3
Fekala föroreningar i vatten	3
<i>Mikroorganismer i fekalier</i>	3
<i>Fekala föroreningar i vatten från livsmedels- producerande djur</i>	4
<i>Fekala föroreningar i vatten från häst</i>	5
Antibiotika och antibiotikaresistens	5
<i>Antibiotikaanvändning globalt</i>	5
<i>Antibiotikaanvändning i Sverige</i>	6
Antibiotikaanvändning hos häst i Sverige	6
<i>Antibiotikaresistens</i>	6
Extended spectrum β -lactamases, ESBL	7
Antibiotikaresistens globalt	7
Antibiotikaresistens i Sverige	8
Antibiotikaresistens hos häst	8
<i>Spridning av antibiotikaresistens</i>	9
MATERIAL OCH METODER	10
Urval och enkätstudie	10
Provtagning och transport	11
Mikrobiologisk analys	11
RESULTAT	13
Urval	13
Enkäter	13
Övriga parametrar	14
Mikrobiologisk analys	14
DISKUSSION	19
SLUTSATS	23
REFERENSER	24
APPENDIX 1	29
APPENDIX 2	30

INLEDNING

Vatten är livsnödvändigt för allt liv på jorden och World Health Organization, WHO, (2011) pekar ut tillgången till säkert dricksvatten som en grundläggande mänsklig rättighet. I Sverige har vi sedan länge varit bortschämda med rent vatten i riklig mängd, men för att detta ska vara en verklighet även i framtiden behöver alla möjliga källor till utsläpp och förorening utvärderas och, om så behövs, åtgärdas. Ungefär hälften av det svenska dricksvattnet kommer från ytvatten, och hälften från grundvatten. Ytvatten är mer exponerat och risken är större att det innehåller förorening; därför bereds det oftast mer än grundvatten, som ibland inte behöver bearbetas alls. Innan vattnet når konsumenten behandlas det i vattenverk med olika avskiljande och inaktiverande steg för att göra det säkert att dricka, framför allt ur mikrobiologisk synpunkt. Förutom vatten från vattenverk får en del hushåll vatten från egna, grävda eller borrhåll, brunnar (Svenskt Vatten, 2016). Utsläpp av fekala mikroorganismer till vattendrag i miljön, vilket kan göra vattnet osäkert ur mikrobiologisk synpunkt, kan komma från flera typer av källor. En del av utsläppen kommer ifrån avlopp och reningsverk efter att ha startat i våra hem, vårt samhälle och våra industrier, och en annan del består av direkt förorening av fekalier antingen direkt eller via avrinning. Det senare kan orsakas av såväl vilda som tama djur som lever i anslutning till vattendrag, eller avrinning från till exempel gödsel och animalieproduktion i vattnets närhet.

Mikrobiologiska faror är enligt WHO (2011) det största hotet mot dricksvattenssäkerheten. Fekala föroreningar är både den vanligaste orsaken och största risken för mikrobiologiska faror gällande vatten. Utöver de risker som finns idag kommer kommande klimatförändringar inte bara göra vatten till en bristvara, utan riskerar också att hota dess kvalitet. Risken med fekala föroreningar är de många sjukdomar som kan spridas fekal-oralt. De enskilda patogenernas förekomst är svåra att förutse och analysera, och därför används ofta fekala indikatorbakterier, som till exempel *Escherichia coli* och *Enterococcus* spp. (enterokocker), istället för att utvärdera vattenkvalitén. Ett vatten utan fekala indikatorbakterier kan dock ändå innehålla patogener eftersom överlevnaden för olika mikroorganismer varierar. I denna studie analyseras *Salmonella* spp. som en möjlig fekal patogen då *Salmonella* spp. har misstänkts kunna spridas mellan gårdar via vatten, och *E.coli* samt enterokocker som fekala indikatorbakterier. Förorening av vatten med fekala mikroorganismer från livsmedelsproducerande djur har studerats i viss utsträckning genom analys av fekala indikatorbakterier, bland annat i Östersjöregionen inom ramen för Baltic Compass (Norman Haldén *et al.*, 2013). Flera studier tyder på kopplingar mellan betande djur och djuranläggningar och förhöjda halter av fekala indikatorbakterier i omkringliggande vattendrag. Det finns mycket få studier kring utsläpp av fekala föroreningar från hästar och hästanläggningar men Sullivan (2010) anser att man kan överföra kunskaperna det finns kring utsläpp från nötkreatur till häst. Däremot finns många studier kring utsläpp av näringsämnen från hästgödsel till omkringliggande vattendrag vilket kan indikera även spridning av mikroorganismer från gödseln. Hästnäringen i Sverige växer (Persson *et al.*, 2005) och dess inverkan på miljön borde därför undersökas.

Antibiotikaresistensen ökar bland djur och människor i Sverige så väl som utomlands (Swedres-Svarm, 2014; WHO, 2014) och de senaste åren har det kommit flera rapporter om fynd av

antibiotikaresistenta bakterier i miljön och ytvatten (Länsstyrelsen Örebro län, 2012; Egervärn *et al.*, 2013). Samtidigt har forskningen inte lyckats få fram någon ny grupp av användbar antibiotika på närmare 30 år. Antibiotikaresistensen hos fekala indikatorbakterier som *E.coli* undersöks vanligtvis i studier och detta kan användas som indikator på resistensen hos en undersökt grupp djur eller miljö, och indirekt visa på mängden använd antibiotika (Swedres-Svarm 2014). De resistenta bakterierna behöver i sig inte orsaka sjukdom men kan bära på resistensgener som de kan föra vidare till andra bakterier. Denna studie är tänkt som en pilotstudie för att utvärdera eventuella risker med fekala föroreningar och spridning av antibiotikaresistens till miljön från större hästanläggningar i Sverige.

LITTERATURÖVERSIKT

Hästhållning i Sverige

Jordbruksverket undersökte år 2004, för första gången på 50 år, hur många hästar som fanns i landet (Persson *et al.*, 2005). Då uppskattades antalet till drygt 280 000 fördelat på 56 000 anläggningar, vilket senare visades vara en underskattning. Antalet hästar hade ändå ökat med 10-20% fram till 2010 till drygt 360 000 hästar fördelat på knappt 80 000 anläggningar (Enhäll, 2011). I den senaste undersökningen 2010 hade Skåne fler hästar än något annat län, medan Gotland hade flest hästar per invånare (Enhäll, 2011). Både 2004 och 2010 års undersökningar uppskattade hästtätheten som störst i och kring tätorter, då tre fjärdedelar av alla hästar, och två tredjedelar av alla hästanläggningar låg i större tätorter eller tätortsnära områden (Persson *et al.*, 2005; Enhäll 2011). En enkätundersökning under 2010 (Enhäll *et al.*, 2012) identifierade hur hästhållningen såg ut i Sverige. Avel och uppfödning var de vanligaste inriktningarna bland de som höll hästar näringsmässigt, men det vanligaste var hästhållning som hobby vid sidan av annan anställning.

Gödselhantering

Lagstiftningen angående gödsel och gödselhantering hos häst bygger på Miljöbalkens SFS 1998:808 allmänna hänsynsregler 2 kap 3§, som säger att man ska utföra skyddsåtgärder och vidta den försiktighet som krävs för att förhindra att man orsakar skada eller olägenhet för människors hälsa eller miljön. Detta innebär enligt Förordning SFS 1998:915 om miljöhänsyn i jordbruket att lagringsutrymmet ska vara utformat så att avrinning och läckage från gödsel till miljön inte sker. De flesta hästhållare lagrar sin gödsel på betongplatta och drygt 15 % använder container eller vagn. Drygt 60 % av hästhållarna sprider gödseln på egen mark och hos cirka en tredjedel tas gödseln omhand av andra lantbrukare (Enhäll *et al.*, 2012).

Fekala föroreningar i vatten

Dricks- och badvattens mikrobiologiska kvalitet är reglerat både i europeisk och i svensk lagstiftning. Badvatten bedöms utifrån mängden så kallade indikatorbakterier, *E.coli* och intestinala enterokocker. Indikatorbakterier finns i varierande mängd i avföring från alla djur, inklusive människor, och indikerar således fekal förorening. Ett vatten fritt från indikatorbakterier behöver däremot inte vara fritt från andra patogena bakterier eftersom indikatorbakterierna ofta har kortare överlevnadstid än dessa (WHO, 2011). Gränsvärden finns för både tillfredställande, bra, och utmärkt kvalitet i inlands- respektive kustvatten. Enligt Europaparlamentets och rådets direktiv 2006/7/EG om förvaltning av badvattenkvaliteten och om upphävande av direktiv 76/160/EEG är nivån för tillfredställande och utmärkt kvalitet av inlandsvatten <900 cfu/100 ml respektive <500 cfu/100ml för *E.coli* och <330 cfu/100 ml respektive <200 cfu/100ml för enterokocker. I Livsmedelsverkets föreskrifter SLVFS 2001:30 om dricksvatten är gränsvärdet för samma bakterier endast påvisande i 100 ml. I samma föreskrift finns också krav på hänsynstagande till råvattnets kvalitet vid rening av vattnet.

Mikroorganismer i fekalier

Det finns en mängd mikroorganismer i avföring, framförallt normalflora men också patogener.

Smitta via fekalier är vanligt, med både bakterier, virus och parasiter. Många av dessa, framför allt bakterier, är zoonoser och kan spridas från djur till människor via till exempel vatten. Indikatorbakterier är oftast inte patogener utan opportunist, även om patogena stammar finns av till exempel *E.coli*. Globalt sett är ändå *E.coli* den vanligaste orsaken till vissa infektioner, som urinvägsinfektioner och sepsis, och en av de vanligaste orsakerna till livsmedelsburna utbrott (WHO, 2014). Överlevnaden i miljön för *E.coli*, liksom andra bakterier, påverkas av olika omgivningsfaktorer. Temperatur, pH, ljusförhållanden, tillgång på vatten och näringsämnen, samt konkurrens med och predation av andra mikroorganismer är exempel på sådana faktorer (van Elsas *et al.*, 2011; Norman Haldén *et al.*, 2013). Bakterienivåerna i vatten minskar också på grund av utspädning (Norman Haldén *et al.*, 2013). Flint (1987) undersökte överlevnadstiden hos *E.coli* genom att tillsätta *E.coli* till flaskor med flodvatten och inkubera i olika temperaturer, samt i autoklaverat vatten. Överlevnaden var kort i obehandlat varmt vatten och mycket lång i autoklaverat vatten. Författarna föreslår att flodvattnets mikrobiota var den primära orsaken, och temperatur var en sekundär orsak, till de sjunkande nivåerna av *E.coli*, i de undersökta proverna.

Salmonella spp. är likt *E.coli* också en bakterie i familjen *Enterobacteriaceae*. *Salmonella* spp. är också en vanlig bakteriell orsak till livsmedelsburen sjukdom globalt, och räknas till skillnad från *E.coli* alltid som en patogen. Det uppskattas att icke-typhoidal salmonellos orsakar 94 miljoner gastroenteriter och 155 000 dödsfall årligen (WHO, 2014). Det finns även vissa typer av *Salmonella* spp., som till skillnad från många andra bakterier kan föröka sig i vatten (WHO, 2011). *Salmonella* spp. förekommer i Sverige men är ovanligt hos människor och djur på grund av ett väl fungerande kontrollprogram. Det är anmälningspliktigt hos både människor och djur, enligt Smittskyddslagen SFS 2004:168 respektive Zoonoslagen SFS 1999:658 och Statens jordbruksverks föreskrifter SJVFS 1999:101 om zoonotiska sjukdomar.

Fekala föroreningar i vatten från livsmedelsproducerande djur

Det finns flera studier som har visat samband mellan djurhållning och antal bakterier i avrinningsvattnet (Hooda *et al.*, 2000). Risken för kontaminering av vattendragen med fekala föroreningar beror enligt samma artikel på flera faktorer, som djurhälsa, behandling, lagring och spridning av gödsel, djurdensitet och överlevnadstid hos bakterierna.

Redan 1974 såg Janzen *et al.* (1974) tecken på fekal kontaminering av vattendrag nedströms mjölkgårdar jämfört med prover uppströms, med statistiskt signifikanta skillnader vid flera enskilda gårdar. Flera studier har sedan funnit samband mellan fekala indikatorbakterier och djurhållning (Doran & Linn, 1979; Crowther *et al.*, 2002; Hunter *et al.*, 1999), men sambandet blev tydligare eller kunde först ses vid avrinningsförhållanden, som t.ex. regnväder. Samma samband har kunnat ses vid nordiska förhållanden (Norman Haldén *et al.*, 2013). Hunter *et al.* (1999) tolkade resultaten som att ett bete kan fungera som en reservoar för bakterier vilka sedan transporteras hydrologiskt till vattendrag. Bakteriemängden i uttorkad gödsel visades i en annan studie kunna vara lika hög som i färsk gödsel och skulle därför kunna kontaminera vatten långt efter att djuren avlägsnats (Weaver *et al.*, 2005). En studie visade på samband först vid större djurdensitet (Gary *et al.*, 1983). Enligt Roser & Ashbolt (2007) kan ett tillfälle med hög avrinning (till exempel regnoväder) orsaka lika mycket föroreningar till vattendrag som hade

skett under 300 år vid torrt väder. Provtagning vid torrt väder ger således betydligt mindre information om möjliga föroreningar. En annan studie såg att stormar på våren orsakade mer fekala föroreningar i avrinningsvatten än stormar sent på säsongen (Tiefenthaler *et al.*, 2011). Tre år i rad fann en studie mer bakterier vid varmt väder, innan betessäsongen kommit igång (Jawson *et al.*, 1982). Författarna fann ingen korrelation mellan fekala indikatorbakterier och hur nyligen betet betats av djur.

Fekala föroreningar i vatten från häst

Det finns mycket få studier kring bakterieförorening till miljön från hästar, men Sullivan (2010) anser att man kan överföra mycket av den kunskap man har om nöt till häst. Avrinning av näringsämnen från hästanläggningar och -gödsel har däremot studerats. Fosfor och kväve läcker från gödsel ut i miljön, och kväve transporteras lättare genom jord medan fosfor binder hårdare. Det senare är således mer likt bakterier i deras transport genom miljön (Norman Haldén *et al.*, 2013). En svensk studie i Åkerströmmens avrinningsområde studerade hästanläggningars påverkan på intilliggande vattendrag med avseende på kväve- och fosforhalter (Lönn & Lindberg, 2011). Alla sju provtagna vattendrag uppvisade extremt höga totalfosforhalter, och fyra av dem även höga totalkvävehalter. En annan studie undersökte fekala indikatorbakterier i avrinningsvatten under stormar för att jämföra olika typer av markanvändning och fann att hästanläggningar orsakade större förorening med fekala bakterier än andra studerade typer av markanvändning (Tiefenthaler *et al.*, 2011).

Airaksinen *et al.* (2007) jämförde vattenkvalitén med avseende på näringsämnen och fekala indikatorbakterier från ytvattenavrinning från en stalldel med en mockad paddock med en stalldel med omockad paddock. De såg högst halter näringsämnen vid ätplatsen i den omockade paddocken, vilket var långt högre halter än i vattendrag och liknade dem från avloppsreningsverk. De drog därför slutsatsen att man regelbundet bör mocka sina rasthagar för att minska föroreningar i avrinningsvattnet. Samma rekommendation ger Malgeryd & Persson (2013) för att minska fosforläckaget från hagar. De skriver fortsatt att mindre eller inget växttäckte ökar läckaget och uppskattar att 0.3-1.5 hektar per häst behövs under en sommar. Foderplatser i hagar blir snabbare upptrampade och texten rekommenderar att de flyttas med jämna mellanrum.

Antibiotika och antibiotikaresistens

Antibiotikaanvändning globalt

Den totala antibiotikaanvändningen i världen ökar (WHO, 2014). En expertpanel bestående av representanter från Food and Agricultural Organization, World Organisation for Animal Health och WHO (2008) jämförde bedömningar av kritiskt viktiga antibiotikagrupper för människor respektive djur, och fann att 3:e och 4:e generationens cefalosporiner, kinoloner, makrolider, penicilliner och aminoglykosider var kritiskt viktiga för både human- och veterinärmedicin. Samma rapport ansåg att riskhanteringen angående 3:e och 4:e generationen cefalosporiner, kinoloner och makrolider var högsta prioritet. Makrolider är inte aktuellt vid behandling av *E.coli* på grund av deras spektrum mot framförallt grampositiva bakterier.

I EU är tetracyklin är den vanligast administrerade antibiotikan till djur, mätt i milligram per

population correction unit, ett mått som tar hänsyn till storleken på ländernas djurpopulation, följt av penicillin (European Medicines Agency, 2015). Fluorokinoloner och senare generationens cefalosporiner står för en liten del av antibiotikaanvändningen, men med stora skillnader mellan länder. Det är även stor skillnad i total förskrivningsmängd mellan länderna i EU. Generellt minskar användningen men i ett antal länder ökar den.

Antibiotikaanvändning i Sverige

Humankonsumtionen av antibiotika minskar i Sverige. Mellan åren 2000-2014 minskade användningen med 11 %, och åren 2014-2015 med 1,3 % (Swedres-Svarm, 2014; Swedres-Svarm, 2015). Sedan 90-talet minskar även antibiotikaanvändningen till djur men efter apotekens avreglering är det svårare att med exakthet säga hur mycket (Swedres-Svarm, 2015). Den enskilt största antibiotikagruppen, uttryckt i såld volym, för djur är bensylpenicillin och står för drygt hälften av föreskriven antibiotika till dem, medan tetracyklin är lika vanligt som penicillin inom humansjukvården (Swedres-Svarm, 2015). Sedan 2013 finns även lagstiftning kring användningen av fluorokinoloner och senare generationers cefalosporiner till djur (Statens jordbruksverks föreskrifter SJVFS 2013:42 om läkemedel och läkemedelsanvändning), vilket särskilt har minskat användningen av dessa (Swedres-Svarm, 2014). Samma lagstiftning kräver också att veterinären i val och dosering bland annat ska beakta risken för utveckling av antibiotikaresistens.

Antibiotikaanvändning hos häst i Sverige

Det finns få antibiotika godkända för användning till häst i Sverige; endast fyra olika antibiotika har indikation för häst (FASS, 2016). Dessa är bensylpenicillin, blandningen bensylpenicillin och streptomycin, gentamicin, samt blandningen trimetoprim och en sulfonamid. Utöver dessa får man använda andra antibiotikatyper om det finns karensvärden, alternativt om hästen tas ur livsmedelskedjan. Det är svårt att exakt kvantifiera antibiotikaanvändningen till häst eftersom mycket lämnas ut och/eller administreras på plats av veterinären, och skrivs inte ut för att hämtas på apotek av djurägaren. Mer än hälften av all trimetoprim-sulfonamid som används till djur, används dock till hästar för oralt bruk (Swedres-Svarm, 2015). Försäljningen av oral trimetoprim-sulfonamid har sjunkit med 30 % sedan 2010.

Sveriges Veterinärmedicinska Sällskaps Riktlinjer för användning av antibiotika inom hästsjukvård (2013) pekar ut stuterier som särskilt stora användare av antibiotika, dels på grund av att spädningssvåtskan till hingstesperma innehåller antibiotika och dels på grund av antibiotikabehandling till exempel hos ston med endometrit och föl med infektioner.

Antibiotikaresistens

WHO (2014) klassar antibiotikaresistens som ett hot mot den globala hälsan. Antibiotikaresistensen ökar och inget nytt antibiotikum har kommit ut på marknaden de senaste 30 åren. Det innebär större kostnader för sjukvården och är större risk för individen att drabbas av allvarlig sjukdom, inklusive död, vid infektion med antibiotikaresistenta bakterier om de inte kan behandlas. Dock finns det väldigt få kostnads- och riskstudier, och inga tillförlitliga studier kring samhällskostnader i stort. De kostnadsstudier som finns är dessutom alla gjorda i medel- eller höginkomstländer. Resistensnivåerna hos *E.coli* kan leda till att man behöver behandla

med bredare antibiotika, och med injektion istället för oral behandling, t.ex. vid urinvägsinfektion. Injektionsbehandling leder till större kostnader för både patienten och sjukvården (WHO, 2014). Antibiotikaresistenta tarmbakterier behöver inte i sig kunna orsaka sjukdom, men kan bära på resistensgener som kan överföras till andra, eventuellt patogena, bakterier (Swedres-Svarm 2014).

Precis som fekala indikatorbakterier som *E.coli* och enterokocker pekar på fekal kontaminering kan resistensmönstret hos dessa användas som indikator för antibiotikaresistensen i samhället eller en grupp djur. Indirekt visar således mängden antibiotikaresistens på omfattningen av antibiotikaanvändningen (Swedres-Svarm, 2014). Antibiotikaresistens uppkommer hos *E.coli* antingen via mutationer eller via överförbara genetiska element, t.ex. plasmider. WHO (2014) föreslår förebyggande arbete mot infektioner som en av de fem viktigaste åtgärderna mot antibiotikaresistens.

Extended spectrum beta-lactamases, ESBL

ESBL definieras enligt European Food Safety Authority, EFSA, (2011) som ”plasmid-encoded enzymes found in *Enterobacteriaceae*, frequently found in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, that confer resistance to a variety of β -lactam antibiotics, including penicillin, 2nd -, 3rd - and 4th - generation cephalosporins and monobactams (eg aztreonam), but usually not the carbapenems and the cephamycins (e.g. cefoxitin)”. Fritt översatt och förkortat definieras ESBL som plasmid-kodade enzym hos bakteriefamiljen *Enterobacteriaceae*, vilka bryter ner betalaktam-antibiotika så som penicillin och cefalosporiner. Enzymen finns i flera olika varianter och är överförbara mellan olika tarmbakterier via plasmiderna. De olika varianterna av ESBL är olika vanliga hos djur respektive människor (EFSA, 2011). Utöver ESBL sitter det ofta även gener för andra resistenser på plasmiderna, vilket gör att ESBL-bildande bakterier ofta är multiresistenta (Egervärn *et al.*, 2014). Antibiotikabehandling är därför i teorin alltid selekterande för ESBL (EFSA, 2011).

ESBL är anmälningspliktigt hos människor i Sverige, enligt Folkhälsomyndighetens föreskrifter 2015:7 om anmälan av anmälningspliktig sjukdom i vissa fall. Hos djur är däremot bara ESBL_{CARBA}, en variant av ESBL som är resistent mot antibiotikagruppen karbapenemer, anmälningspliktig, enligt Statens jordbruksverks föreskrifter 2012:24 om anmälningspliktiga djursjukdomar och smittämnen. EFSA (2011) nämner restriktioner för användandet av 3:e och 4:e generationens cefalosporiner, samt minskning av den totala antibiotikaanvändningen i livsmedelsproduktion som effektiva kontrollsteg för att stoppa ökningen av ESBL-producerade bakterier.

Antibiotikaresistens globalt

Globalt sett finns det, på grund av dålig dokumentation, stora brister i kunskapen kring hur utbredd antibiotikaresistensen är. Klart är dock att antibiotikaresistens är spridd över hela världen med rapporter om resistens hos över 50 % av *E.coli*-stammarna mot 3:e generationens cefalosporiner och mot fluorokinoloner, i fem av sex regioner i världen (WHO, 2014). Man har hittat ESBL-bildande *Enterobacteriaceae* i vattnet i flera länder runt om i världen (Egervärn *et al.*, 2013).

Antibiotikaresistens i Sverige

Förekomsten av ESBL ökar varje år, framförallt hos *E.coli* (Swedres-Svarm, 2014). År 2015 hade förekomsten av ESBL-producerande bakterier ökat med 9 % till strax under 10 000 humanfall, och den årliga ökningstakten har legat på 8-33% sedan år 2007 (Swedres-Svarm, 2015). Studier har påvisat resistent tarmbakterier i ytvatten i Sverige, vilket tyder på att resistensen är spridd i miljön och är ett tecken på problemet med antibiotikaresistenta bakterier i samhället i stort (Länsstyrelsen Örebro län, 2012). Egervärn *et al.* (2013) drog också slutsatsen att ESBL-bildande bakterier var spridda i miljön efter att ha hittat dessa i råvattnet till flera vattenverk i Sverige spritt över året. Förekomsten var låg men hög i jämförelse med vad man påvisat i tarminnehåll från produktionsdjur. 27 av 98 prover innehöll ESBL-producerande *E.coli*, men 25 av de 27 positiva proverna var från samma två vattenverk. Av de identifierade ESBL-bildande *E.coli* var 74 % även multiresistenta (resistenta mot tre eller fler antibiotikaklasser). Vanligast var resistens mot fluorokinoloner, aminoglykosider och trimetoprim-sulfonamid. De olika resistensgenerna som påvisades var sådana som tidigare påvisats hos både människa, livsmedelsproducerande djur och livsmedel. Inga *E.coli* hittades dock i det renade utgående vattnet. Utöver analys av fekala indikatorbakterier i vatten kring djuranläggningar, analyserade en nordisk studie även antibiotikaresistens hos indikatorbakterierna, och fann resistens i vattenprov både vid referenspunkterna och nedströms (Norman Haldén *et al.*, 2013). Alla prov med bakterier med resistens mot mer än en typ av antibiotika låg nedströms anläggningar. Resistenta *E.coli* hittades i tre prov av de totalt 61 proverna.

Antibiotikaresistens hos bakterier hos häst

År 2015 hittades 14 fall av ESBL hos kliniska prover från häst mot 8 fall 2014 (Swedres-Svarm, 2014; Swedres-Svarm, 2015). Ingen kontinuerlig övervakning av ESBL-producerande bakterier görs hos friska hästar i Sverige, men när sådan genomfördes år 2010 hittades ESBL-bildande *E.coli* i 1 % av de 431 avföringsproverna (Swedres-Svarm, 2015). I England däremot har man gjort flera studier kring förekomst av ESBL-producerande *E.coli* hos häst (Ahmed *et al.*, 2010; Maddox *et al.*, 2011). Undersökningar av fecesprov från dels djursjukhus och dels inackorderingsstall fann 17 isolat, eller 6,4 %, med misstänkt ESBL-producerande *E.coli* (Ahmed *et al.*, 2010). Prevalensen av desamma hos hästar – de flesta kliniskt friska – som av en eller annan anledning besökte veterinären, uppmättes i en annan studie till 6,3 % (Maddox *et al.*, 2011). Dolejska *et al.* (2011) studerade också förekomsten hos hästar på djursjukhus respektive ett ridcenter. De fann ESBL-producerande *E.coli* i 32 % av proverna från djursjukhuset och 9 % av proverna från ridcentret. Författarna ansåg att fynden var alarmerande då förekomsten var förhållandevis hög och att cefalosporiner är så viktiga för både human- och veterinärmedicinen. I en annan studie av antibiotikabehandlade hästar var prevalensen för ESBL-producerande *E.coli* 3,1 % (Johns *et al.*, 2012).

En av de engelska studierna jämförde fecesprov från hästar på djursjukhus med friska hästar ute i fält (Ahmed *et al.*, 2012). De fann ett samband mellan sjukhusvistelse och både resistent och multiresistent *E.coli* i tarmen. Maddox *et al.* (2012) hittade däremot inget generellt samband mellan antibiotikabehandling och resistens mot den använda antibiotikan hos *E.coli*, utan bara för vissa antibiotikasorter. Statistiskt signifikanta riskfaktorer för ESBL var dock

vistelse på djursjukhus de senaste tre månaderna, samt uppställning nära en annan häst som varit inlagd på djursjukhus. Även uppställning på tävlingsstall var en riskfaktor för ESBL men antogs bero på andra orsaker än själva uppställningen. Johns *et al.* (2012) undersökte hur lång tid hästar utsöndrade antibiotikaresistenta *E.coli* i feces efter en antibiotikabehandling. De fann att hästar behandlade utanför djursjukhus snabbare gjorde sig av med de resistenta bakterierna; vid provtagning två veckor efter behandling respektive två månader efter behandling.

Spridning av antibiotikaresistens

Möjliga smittvägar, av såväl antibiotikaresistenta som andra bakterier, från djur till människor är via direktkontakt, indirekt via föremål, animaliska livsmedel, vegetabiliska livsmedel (via gödsling eller bevattning) samt vatten via kontamination av gödsel eller avlopp (Egervärn *et al.*, 2014). Det finns stor risk att bli bärare av resistenta tarmbakterier vid utlandsvistelse (Egervärn *et al.*, 2014, Swedres-Svarm, 2014). Heuer *et al.* (2011) framhåller att riskerna med spridning från miljön kan vara underskattade, och att en låg exponering från miljön för samhället i stort kan vara en större risk för överföring av antibiotikaresistenta bakterier än enstaka högriskpatienter från sjukvården. Tre svenska studier jämförde isolat av antibiotikaresistenta bakterier från människor och sjukhusutbrott med dem i miljö, djur och livsmedel, och såg att isolaten från livsmedel och livsmedelsproducerande djur bara till en liten del var identiska med de humana (Iversen *et al.* 2003; Egervärn *et al.*, 2014). De drog därför slutsatsen att risken för spridning från livsmedel till människor är liten, men att läget kan komma att förändras och fortsatt övervakning krävs.

MATERIAL OCH METODER

Studien syftade till att undersöka om större hästanläggningar kan vara en källa till fekal förorening, med eller utan antibiotikaresistens, till närstående vattendrag. Detta studerades genom att ta vattenprov uppströms och nedströms anläggningarna, samt gödselprov från gödselanläggningen.

Urval och enkätstudie

Enligt nedanstående metod valdes 10 anläggningar ut för undersökning:

Ett registerutdrag över godkända tillståndspliktiga hästanläggningar (enligt Djurskyddslagen SFS 1988:534, 16§), från 2009 till 2015-11-26, begärdes ut från Länsstyrelsen i Skåne. Varje namn eller företag tillhörande ett godkänt tillstånd kontrollerades via två sökningar på www.google.se; en med bara namnet/företaget, och en med namnet/företaget + häst. Hittades ingen hästanläggning med sökningarna ströks namnet/företaget från listan. Antalet hästar på anläggningen uppskattades genom samma sökning. Adressen till hästanläggningarna som hittades via sökningarna kontrollerades med avseende på närhet till vattendrag på www.hitta.se, dels via vanlig kartvy och dels satellitbild. De anläggningar som låg mer än 500 m från ett vattendrag ströks från listan. Kvarvarande anläggningar rangordnades efter förmodat antal hästar och närhet till lämpliga vattendrag. Hästanläggningarna kontaktades efter rangordningen via i första hand telefon och i andra hand e-post och tillfrågades om de ville ingå i studien. De anläggningar som tackade nej ströks från listan.

En enkät skickades till anläggningarna via mejl eller intervjuades via telefon eller på plats vid provtagning, se appendix 1. Övriga parametrar uppskattades enligt följande; väder vid provtagning samt två dagar innan provtagning efter egna observationer samt www.smhi.se, och hästarnas tillgång till vatten efter egna observationer och information från hästanläggningarna, se tabell 1. En uppskattning gjordes om anläggningarna var tätortsnära eller inte enligt samma kriterier som Jordbruksverket använder (Persson *et al.*, 2005; Enhäll, 2011). Invånarantalet i relevanta närliggande tätorter uppskattades via sökning på www.wikipedia.se och avståndet via www.hitta.se.

Tabell 1. Övriga parametrar som registrerades vid provtagning

Parameter	Svarsalternativ
Väder vid provtagning	Uppehåll sol Uppehåll moln Nederbörd <5 mm Nederbörd >5 mm
Väder två dagar innan provtagning	Uppehåll sol Uppehåll moln Nederbörd <5 mm Nederbörd >5 mm
Har hästarna direkt tillgång till vattendraget?	Ja Nej
Ligger anläggningen tätortsnära? *	Ja Nej

*Enligt Persson et al., 2005 samt Enhäll 2011

Provtagning och transport

Vattenprov à 1500 ml samlades under maj 2016 i vattendrag uppströms och nedströms hästanläggningarna i sterila flaskor, och ett gödselprov togs med tre gödselbollar från gödselanläggningen i hundbajspåsar alternativt förslutningsbar burk. Fanns ingen gödselanläggning tillgänglig togs prov från tre olika ställen i hagen. Vattentemperaturen mättes före provtagning i fält och innan analysering på laboratorium, med undantag för prover från två anläggningar. Proverna transporterades kylda till laboratorium med krav på vattentemperatur 5 +/- 3 grader innan analys, samt analyserades inom 24 h från provtagningstillfället.

Totalt 19 vattenprover togs från de tio anläggningarna, varav nio uppströms och tio nedströms. Det sista uppströmsprovet, utanför stall 2, kunde inte tas på grund av dålig åtkomlighet. Alla vattenprov togs från vattendrag som direkt angränsade till eller gick igenom anläggningarnas marker.

Mikrobiologisk analys

Vattenproverna analyserades med avseende på *E.coli*, *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp. och ESBL-producerande *E.coli*, och gödselproverna analyserades med avseende på ESBL-bildande *E.coli*. *E.coli* och enterokocker analyserades kvantitativt enligt SS-EN ISO 9308-1 respektive SS-EN ISO 7899-2. *Salmonella* spp. bestämdes kvalitativt enligt ISO 19250:2010, modifierad med MSRV-agar istället för RVS-buljong.

500 ml vatten filtrerades genom filter med porstorlek 0,45 µm för att kvalitativt påvisa ESBL-bildande *E.coli*. Filtren anrikades i 100 ml MacConkey-buljong med cefotaxim 1 mg/L i skakinkubator 37 grader i 24 h. Den analyserade vikten på gödselproverna varierade från ca 3 gram till ca 21 gram, och vikten späddes 1:10 med ovanstående MacConkey-buljong och

inkuberades på samma sätt. Från den inkuberade MacConkey-buljongen ströks 20 µl på CHROM-agar med cefotaxim 1 mg/L och inkuberades 37 grader i 24 h. Misstänkta kolonier med *E.coli* renströks på blod- och blåagar. Kolonier från blodagar testades sedan med oxidase (Oxidase, Becton, Dickinson and Company) och indoltest (SPOT-indol, SVA). Laktosfermenterande, oxidasnegativa och indolpositiva kolonier med typiskt utseende skickades till SVA för verifiering med Malditof. Efter verifiering med Malditof sattes resistenspanel VetMIC GN-mo (SVA). Vid resistens mot cefalosporiner sattes resistenspanel Sensititre (Oxoid AB) dagen efter för kontroll av karbapenem-resistens. Koklysats från de testade stammarna framställdes genom att fem kolonier slammades upp i 100 µl TE-buffert (SVA), kokades i 15 minuter, lades på is i minst 10 minuter och sedan centrifugerades. Supernatanten frystes in och användes för PCR-analys av mikrobiologisk resistenstyp vid SVA.

Provsvaren från resistenspanelerna bedömdes enligt epidemiologiska cut-off-värde, ECOFFs, enligt European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2016, u.å.), se tabell 2. Antibiotika grupperades in i 10 grupper enligt tabell 4. Resistens mot en eller fler av antibiotikatyperna inom gruppen rapporteras som resistens mot gruppen i fråga.

Tabell 2. Gruppering och ECOFFs för testade antibiotikum för *E.coli* enligt European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing för testade antibiotika på VetMIC GN-mo samt Sensititre (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, u.å)

Antibiotikum	ECOFF (mg/L)	Grupp
Ampicillin	>8	Penicilliner
Temocillin*	-	
Ciprofloxacin	>0.064	Kinoloner
Nalixidinsyra	>16	
Gentamicin	> 2	Aminoglykosider
Streptomycin	>16	
Kanamycin	>8	
Tetracyklin	>8	Tetracyklin
Florfenikol	>16	Amfenikoler
Kloramfenikol	>16	
Sulfamethoxazol	>64	Sulfonamider
Trimetoprim	>2	Trimetoprim
Cefotaxim	>0,25	Cefalosporiner (2a, 3e och 4e generationen)
Ceftazidim	>0,5	
Cefoxitin	>8	
Cefepim	>0,125	
Ertapenem	> 0,064	
Imipenem	>0,5	Karbapenemer
Meropenem	>0,125	
Cefotaxim/klavulansyra	>0,25	
Ceftazidim/klavulansyra	>0,5	Kombinationspreparat cefalosporin + klavulansyra

*För Temocillin finns inget EUCOFF

RESULTAT

Urval

Utdraget register från Länsstyrelsen innehöll 347 poster om ansökningar för tillståndspliktiga hästverksamheter. Samma person eller företag förekom flera gånger. Flera av namnen/företagen hittades inte vid sökningar enligt ovan, och valdes då bort. Kvar efter sällningar från sökningar och inklusionskriterier var 23 rangordnade anläggningar. Av de främsta tio anläggningarna på listan accepterade sju gårdar medverkan i studien och övriga tre var rangordnade som 11-13.

Enkäter

Nio enkäter besvarades i sin helhet, och en enkät (stall 2) kunde delvis besvaras med hjälp av observationer från provtagningen men besvarades inte av hästanläggningen, se tabell 3. Vissa frågor hade genomgående ofullständiga svar från anläggningarna, till exempel frågan om antibiotikabehandling. Orsaken till ofullständiga svar var att kontaktpersonerna inte kom ihåg exakta uppgifter, eller att de inte hade ansvar och således information om frågan.

Anläggningarna sysslade med många olika typer av verksamhet, varav sex helt eller delvis sysslade med någon typ av avelsverksamhet. De flesta anläggningarna besöktes över 50 hästar på årsbasis, och hästarna hölls utomhus på lösdrift eller i box. Arealen betesmark/hagar per häst varierade mycket, från mycket små till mycket stora arealer. Majoriteten av hästarna i studien hade aldrig varit utanför Norden.

I princip alla anläggningar använde gjuten platta eller någon form av container eller vagn för sin gödselhantering. Stall 7 var de enda utan permanent gödselhantering; de löste hanteringen med en granne om någon häst var tvungen att stå uppstallad. Många nämnde att de på olika sätt harvade ner, eller mockade, gödseln i hagarna.

Alla anläggningar som svarat på enkäten hade haft antibiotikabehandling det senaste året, men ingen på grund av utbrott av smittsam sjukdom. Det enda stallet som upplevt utbrott av smittsam sjukdom hade haft problem med virusabort (ekvint herpesvirus). Sex stall nämnde vilken typ av antibiotika som hade använts, och det var vanligast med penicillin. Färre hade behandlat med trimetoprim-sulfonamid. De flesta anläggningarna angav att de behandlat någon eller några enstaka hästar med antibiotika. Ett stall, stall 3, berättade att de behandlat cirka 30 hästar det senaste året. Samma stall uppgav också att de hade haft två kliniska fall med resistens föregående år.

Sex anläggningar hade enskilt avlopp och egen brunn, och tre hade kommunalt vatten och avlopp. Av de sistnämnda hade två även egna brunnar, till exempel borrhade brunnar i hagarna. Alla med egen brunn som använde vattnet till humant bruk hade borrhade brunn, och den enda anläggningen med grävd brunn hade denna till hästar. Den senare, stall 8, var också den enda som hade haft bakteriella problem med sitt vatten. Enligt de boende på anläggningen berodde detta på att deras borrhade brunn satt mitt i deras gamla grävda brunn, och att denna svämmade över vid översvämning. Inga vattenprover togs men ägarna blev sjuka.

Övriga parametrar

Maj månad var mycket torr i provtagningsområdena, och ingen nederbörd föll vid eller i anslutning till dessa. På fyra av åtta anläggningar hade hästarna direkt tillgång till det provtagna vattendraget. Sju av tio anläggningar låg tätortsnära.

Vissa anläggningar, som stall 6 och 8, hade lämpliga små vattendrag genom markerna. Andra, som stall 1, 5 och 7 hade små lämpliga vattendrag som gick i kanten på anläggningens mark. Utanför stall 9 togs prover från ett större vattendrag som gick längs kortsidan på anläggningens hagar. På andra sidan vattendraget vid nedströmsprovet vid stall 10 betade nötkreatur. Varken korna eller hästarna hade direkt tillgång till vattnet. Vattnet nedströms stall 4 gick igenom en mindre sjö innan själva provtagningslokalen.

Mikrobiologiska analyser

E.coli och enterokocker

Halterna av *E.coli* varierade kraftigt, framförallt i uppströmsproverna, se tabell 4. Ett prov innehöll halter högre än dubbla gränsvärdet för badvatten. Medelvärdet uppströms var 307 Colony Forming Units (CFU)/100ml och medianen 107 CFU/100ml. Nedströms var samma värden 67 CFU/100ml respektive 47,5 CFU/100ml. Skillnaden mellan nedströms och uppströms varierade, men sex av nio anläggningar hade mindre halter nedströms än uppströms och en hade ökade halter, se Figur 1.

Halterna av enterokocker varierade mindre än antalet *E.coli*, och var oftast lägre än dessa, se tabell 4. Medelvärdet samt medianen var 40 respektive 19 CFU/100ml uppströms och 23,5 respektive 14 CFU/100 ml nedströms. Vid tre anläggningar ökade halterna, vid en var de oförändrade, och vid fem minskade de nedströms jämfört med uppströms.

Tabell 4. Antal *E.coli* och *Enterococcus spp.* (CFU/100ml) i vattenprov uppströms och nedströms

	Stall									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>E.coli</i>										
Uppströms	56	-	23	4	264	2040	39	120	108	107
Nedströms	46	4	23	4	49	162	30	222	67	60
<i>Enterococcus spp.</i>										
Uppströms	18	-	18	10	20	211	39	19	3	26
Nedströms	23	1	5	1	24	111	32	5	3	30

Tabell 3. Enkät svar och övriga parametrar

	Stall 1	Stall 2	Stall 3	Stall 4	Stall 5	Stall 6	Stall 7	Stall 8	Stall 9	Stall 10
<i>Verksamhets- beskrivning</i>	Tävlingsstall med isländs- hästar, en del egna hästar, inackorde- ring. Rehab	Försäljn ingsstall , förmedl ar från Europa	Uppfödn ing trav- hästar	Uthyrning av box- plaser till travare och ridhästar	Inackorde ring och uppfödni ng av islandshä star	Uppfödni ng av sporthäst ar, viss egen semin	Tur- ridning isländs- hästar, viss egen avel. B&B	Semin- station och egen uppfödnin g	Ridskola och privat uppstallni ng	Utbildnin g, tävlningar, avel och veterinär praktik
<i>Inhyssning</i>	Lösdrift ute + enkelboxar	Enkelbo boxar	Lösdrift utomhus	Enkelboxa r	Lösdrift utomhus	Enkelbox ar	Lösdrift utomhus	Framföral It enkel boxar	Enkelbox ar	Enkelbox ar
<i>Hästar</i>	20-35	35-50	>50	>50	>50	20-35	<20	<20	35-50	>50
<i>Hästar över året</i>	>50	>50	>50	>50	>50	20-35	<20	>50	35-50	>50
<i>Andel hästar utanför Norden (i år)</i>	<25%	-	<25%	Ingen	Ingen	Ingen	Ingen	<25%	<25%	<25%
<i>Antal hästar utanför Norden (livet)</i>	<25%	-	<25%	Ingen	Ingen	Ingen	Ingen	25-50%	<25%	<25%
<i>Areal haggar</i>	>2	<0,1	0,5-1	<0,1	1-2	1-2	1-2	1-2	<0,1	<0,1
<i>Antibiotika senaste året</i>	Ja	-	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
<i>Utbrott</i>	Nej	-	Ja	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej

	Stall 1	Stall 2	Stall 3	Stall 4	Stall 5	Stall 6	Stall 7	Stall 8	Stall 9	Stall 10
<i>Gödsel- hantering</i>	Gjuten platta	Container /vagn	Gjuten platta och container	Gjuten platta	Container	Gjuten platta	Övrigt	Gjuten platta	Gjuten platta	Gjuten platta
<i>Avlopp</i>	Enskilt avlopp	-	Enskilt avlopp	Enskilt avlopp	Enskilt avlopp	Kommunal t avlopp	Enskilt avlopp	Enskilt avlopp	Kommunal t avlopp	Kommunal t avlopp
<i>Vattenkälla</i>	Egen brunn	-	Egen brunn	Egen brunn	Egen brunn	Kommunal t vatten och egen brunn	Egen brunn	Egen brunn	Kommunal t vatten och egen brunn	Kommunal t vatten och egen brunn
<i>Bakterier i dricks- vattnet</i>	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Ja	Nej	Nej
<i>Identifierat egna risker?</i>	Nej	-	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
<i>Väder (vid provtagning g)</i>	Uppehåll, sol	Uppehåll, sol	Uppehåll, sol	Uppehåll, moln	Uppehåll, moln	Uppehåll, sol	Uppehåll, moln	Uppehåll, moln	Uppehåll, sol	Uppehåll, sol
<i>Väder (2 dagar innan)</i>	Uppehåll, sol	Uppehåll, sol	Uppehåll, sol	Uppehåll, moln	Uppehåll, moln	Uppehåll, sol	Uppehåll, moln	Uppehåll, moln	Uppehåll, sol	Uppehåll, sol
<i>Direkt tillgång till vattendrag</i>	Ja	-	-	Nej	Ja	Ja	Ja	Nej	Nej	Nej
<i>Närhet till tätor</i>	Ja	Nej	Nej	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja	Ja	Ja

Salmonella

Salmonella spp. hittades inte i något av proven.

ESBL-producerande *E.coli*

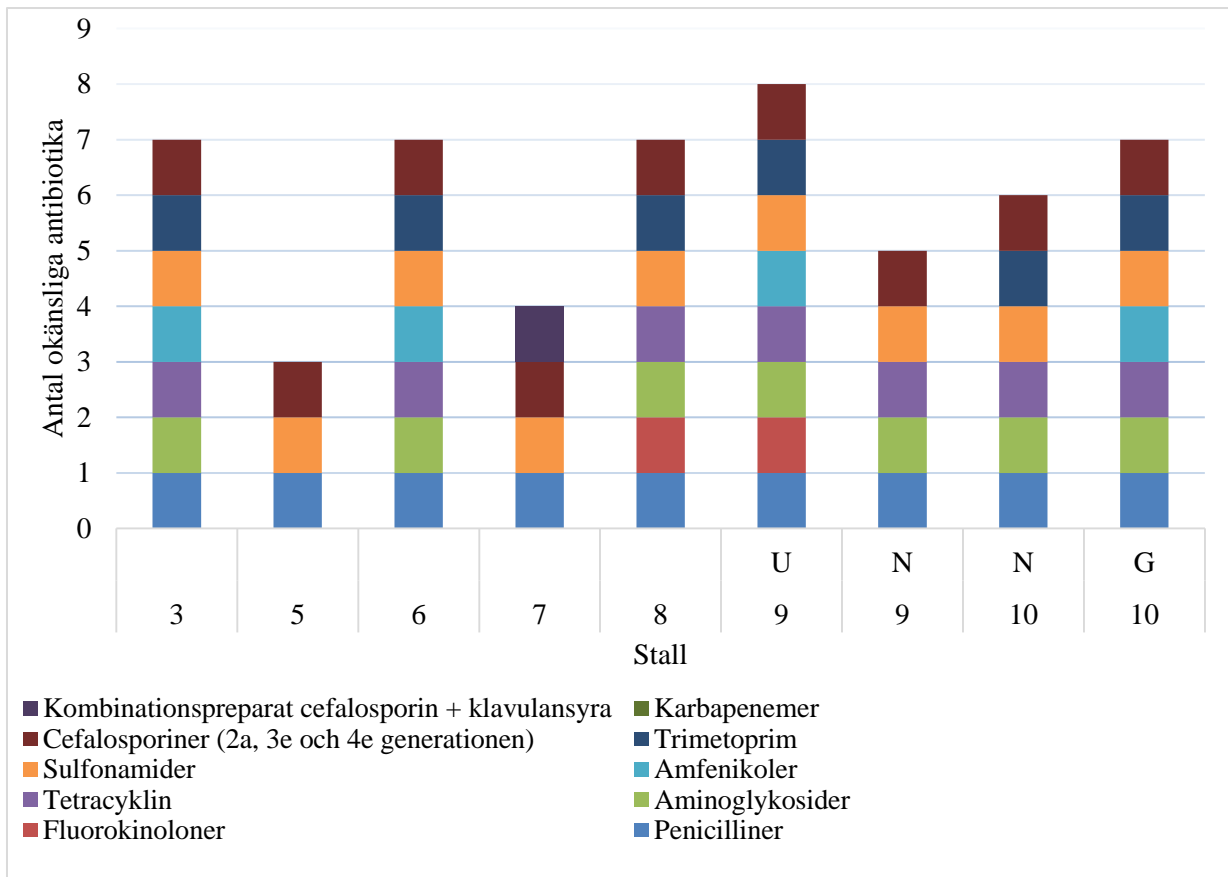
ESBL-producerande *E.coli* hittades i något av proverna vid sju av tio anläggningar, se tabell 5. Bland vattenproverna fanns de i två av nio prov uppströms (konfidensintervall 95 %: -5 – 49,4 %) samt fyra av tio prov (9,6-70,4 %) nedströms. I gödsel hittades ESBL-producerande *E.coli* i prov från tre av tio (1,6–58,4 %) anläggningar. De flesta anläggningar hade endast ett positivt prov av tre analyserade, men två anläggningar hade flera positiva prov. Proven från stall 9 visade på ESBL i båda vattenproverna, och i stall 10 fanns ESBL både i vattnet nedströms samt i gödseln.

Tabell 5. Påvisande av ESBL-producerande *E.coli*, inklusive resistensgener, per stall och provtagningsställe

	Uppströms	Nedströms	Gödsel
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	TEM/SHV
4	-	-	-
5	TEM/CTX-M3	-	-
6	-	-	CTX-M3
7	-	*	-
8	-	OXA-1/CTX-M3	-
9	OXA-1/CTX-M3	*	-
10	-	CTX-M3	TEM/CTX-M9

*Påvisande av ESBL-producerande *E.coli* men inte fastställd resistensgen

Alla analyserade ESBL-producerande *E.coli* var multiresistenta – resistenta mot tre eller fler typer av antibiotika – se figur 2. Utöver resistens mot penicillin och cefalosporiner var resistens mot sulfonamider genomgående, medan ingen resistens mot varken kolistin eller karbapenemer hittades. Två isolat, ett från vattenprov och ett från gödsel, var även resistenta mot kinoloner utöver ESBL-resistens.



Figur 2. Antal okänsliga antibiotika per isolat. U= Uppströms. N= Nedströms. G= Gödsel.

DISKUSSION

Med en tillväxt på 10-20 % mellan åren 2004 och 2010 är hästnäringen en växande bransch. Kopplat till konstaterat höga utsläpp av näringsämnen från hästanläggningar och indikationer på utsläpp även av föroreningar i form av fekala mikroorganismer gör det till en bransch som är angelägen är undersöka med avseende på dess miljöpåverkan.

Studien fann inget tydligt samband mellan hästanläggningar och fekala föroreningar i närliggande vattendrag. De flesta prover visade tvärtom minskade halter nedströms anläggningarna, vilket skulle kunna tyda på en utspädnings- och avdöningseffekt och att gårdarna inte är källor till förorening. Det sågs inte heller några tendenser till högre halter i vattendrag nedströms anläggningar med många hästar eller hästar med direkt tillgång till vatten. Inte heller anläggningar med mindre hagar, vilket skulle kunna innebära ett mindre växttäck, visade tendens till högre halter. Svårigheten med varierande förhållanden i verkligheten gör att det dock kan vara svårt att utvärdera riskfaktorer till höga halter, även om man hade hittat sådana. Varje anläggning har enskilda förutsättningar och de provtagna lokalerna var mer eller mindre lämpade studieobjekt. Ett av vattenproven innehöll långt högre halter *E.coli* än tillåtet för att vara lämpligt som badvatten, och nära gränsen avseende enterokocker. Provet samlades uppströms en hästgård där det enligt anläggningen tidigare, men inte nu, betat nötkreatur. Höga halter efter betad mark, utan betande djur, skulle stödjas av tidigare studier (Weaver *et al.*, 2005; Jawson *et al.*, 1982). Genom att hålla efter och mocka hagarna hade föroreningar kunnat minskas (Airaksinen *et al.*, 2007). De höga halterna gör vattnet olämpligt för bad och rekreation men vattendraget har inget sådant värde eller användning i dagsläget. Trots att vattendraget gick rakt igenom hagen, med direkt tillgång för hästarna, var halterna avsevärt lägre nedströms anläggningen vilket stärker övriga resultat i att hästanläggningar inte verkar vara någon källa till förorening. Som förväntat nådde inget av vattendragen upp till kraven för dricksvatten. Förhållandena vid provtagningen var dock mycket ogynsamma för att kunna upptäcka förorening. Vädret var torrt och det regnade inte alls under månaden som provtagningen skedde. Flera studier har kunnat visa samband mellan djur och fekala föroreningar i vatten vid regn eller annan avrinning, men inga eller mindre skillnader vid torrt väder. Roser & Ashbolt (2007) menade att det tar 300 år av torrt väder för att uppnå samma nivåer av förorening som under ett tillfälle med stor avrinning. Vårsäsongen är i övrigt en lämplig tidpunkt för provtagning då flera studier visat på större skillnader och högre halter tidigt på säsongen. En annan generell svaghet med studien är att proverna togs vid ett tillfälle och är en ögonblicksbild. Det finns då stor risk att både över- och undertolka resultat beroende på enstaka händelser. Avsaknaden av resultat behöver således inte betyda att hästanläggningar inte är en källa till fekal förorening. Nya studier inom området hade med stor fördel gjorts under avrinningsförhållanden och tagit upprepade prover.

De flesta hästanläggningar hade, i enlighet med tidigare studier, gjuten platta för sin gödselhantering, och övriga använde container eller vagn (Enhäll *et al.*, 2012). Generellt följdes lagstiftningen väl och riskerade inte avrinning från gödsellagring till miljö. Möjliga risker som sågs i studien var direktkontakt med vattendrag, permanenta foderplatser i hagarna, och små hagar och/eller utan växttäck (Malgeryd & Persson, 2013; Airaksinen *et al.*, 2007; Hooda *et al.*, 2000). Dessa faktorer avspeglades inte i resultaten, men svårigheten med det torra vädret

gäller även här. Vissa anläggningar nämnde jordbearbetning eller mockning av hagar som del av deras gödselhantering, men eftersom ingen direkt fråga ställdes kan fler anläggningar ha tillämpat dessa strategier och således minskat risken för förorening av omgivande miljö. Gödseln var i de flesta fall i fast form förutom vid stall 8 som lagrade både fast och flytande gödsel på gjuten platta. Stallet hade två gödselanläggningar varav den ena nästan var full. Den bedömdes kunna svämma över vid regnväder om den inte hade tömts innan dess, och förorena ett lägre liggande mindre vattendrag. Stall 8 var också det enda stall i studien där högre halter *E.coli* hittades nedströms jämfört med uppströms, och anläggningen var sannolikt orsaken till detta. Föroreningen kan i sin tur ha berott på antingen de fulla och eventuellt läckande gödselanläggningarna, avrinning från hagar, hushållets enskilda avlopp eller naturliga källor (till exempel vilda djur). Det ska dock kommas ihåg att halterna fortfarande var inom gränsen för ”utmärkt” badvatten, även om de ökade nedströms. Samma anläggning hade även vid tidigare tillfällen haft problem med dricksvattenkvalitén från sin brunn. Brunnen var ursprungligen grävd men senare borrhärad på samma plats, och problemen hade uppstått vid höga avrinningsförhållanden. Problemen kan också vara relaterade till verksamhet genom ovan nämnda ursprung. Under de avrinningsförhållanden som rådde under studieperioden fanns alltså inga generella problem med gödselhanteringen hos de undersökta anläggningarna.

Ingen *Salmonella* spp. hittades i vattenproverna, vilket måste anses förväntat med Sveriges låga förekomst hos djur och framgångsrika kontrollprogram. *Salmonella* spp. analyserades inte i gödsel för att det antogs att fler anläggningar skulle vara tveksamma till medverkan om så skett, på grund av anmälningsplikten vid positivt provsvar.

Sverige har ett unikt resistensläge med låg förekomst jämfört med Europa i allmänhet och övriga världen i synnerhet. Vi har implementerat EFSA's rekommendationer för att kontrollera ökningen av ESBL, och minskar vår antibiotikaförbrukning hos både djur och människor varje år. Vi har strikta regler kring användandet av tredje och fjärde generationens cefalosporiner hos djur, men trots detta ökar resistensen för varje år och är nu vitt spridd i miljön. ESBL-producerande *E.coli* odlades fram från drygt 30 % (6 av 19) av vattenproverna och 30 % (3 av 10) av gödselproverna. Det är höga siffror, men handlar om kvalitativ och inte kvantitativ analys av bakterien. Man ska även komma ihåg att provmaterialet är litet och konfidensintervallen stora. Liknande siffror hittades av Egervärn *et al.* (2013) men där kom de positiva proven framförallt från enstaka provlokaler. ESBL-producerande *E.coli* kan ses som väl spridd i miljön. Alla prover visade även på multiresistens i varierande grad. För gödsel finns en tidigare siffra för förekomst av ESBL-producerande *E.coli* i gödselprov; 1 % förekomst hos friska hästar år 2010 (Swedres-Svarm, 2015). Gödselproverna i den här studien är däremot troligtvis inte från en och samma häst utan ett samlingsprov från 1-3 hästar och beskriver resistens på besättningsnivå. Andra möjliga orsaker till skillnaden är att den förra studien är 6 år gammal, att den innehöll en mycket större studiepopulation, eller att hästar från olika typer av anläggningar studerats. Resultaten pekar dock i samma riktning som övrig forskning; att antibiotikaresistensen ökar och att den kan finnas väl spridd bland svenska hästbesättningar. Motsvarande utländska siffror från England, berättar även de om lägre förekomst än vad som hittats i den här studien, trots en lägre antibiotikaförbrukning i Sverige. Siffrorna kommer dock även de från individprov från år 2010 och behöver inte vara aktuella varken i dagens England

eller jämförbara med studien av ovan nämnda anledningar. Ett av stallen med positivt prov för ESBL höll sina hästar på lösdrift och gödseln togs från de hästar som stod inne på box. Man kan tänka sig att de hästar som står inne med större sannolikhet är sjuka hästar, eller att där tidigare stått sjuka hästar. Provet behöver därför inte heller vara representativt för hela anläggningen. Flera studier visar på ett samband mellan antibiotikabehandling (och särskilt vistelse på djursjukhus) för bärandet av antibiotikaresistenta tarmbakterier. I den här studien hade ett av stallen med ESBL-producerande *E.coli* i gödseln antibiotikabehandlat en häst en månad innan provtagning, medan tiden för senaste behandling för de två andra positiva stallen var oklar. Alla anläggningar hade dock behandlat någon häst med antibiotika under året. Vid kommunikation av resultaten till ett av stallen positivt för ESBL berättade de att de haft två kliniska fall med resistenta bakterier under föregående år. Stallägaren visste dock inte vad det var för resistens. ESBL-resistens hittades i 14 kliniska fall under samma år (Swedres-Svarm, 2015) och det hade varit intressant att veta om resistensen hos stallets kliniska fall korrelerade med den som hittades i studien. Enligt Johns *et al.* (2012) gjorde sig antibiotikabehandlade hästar i fält av med resistenta *E.coli* på två veckor, men i denna studie hade minst en häst kvar antibiotikaresistenta *E.coli* en månad efter antibiotikabehandling av någon häst i stallet. Resistensen kan ha uppkommit i samband med behandlingen, men kan hellre ses som en indikator på antibiotikaanvändningen på anläggningarna (Swedres-Svarm, 2014). Alla tre stall med gödselprover positiva för ESBL-producerande *E.coli* arbetade med avel på något sätt. Stuterier har pekats ut som särskilt stora användare av antibiotika, bland annat på grund av behandlingar av ston mot endometrit inför seminering, följsjukdomar och spermatransport. Endometrit kan orsakas av till exempel *E.coli* och måste förebyggas med bra hygien och korrektion av anatomiska avvikelser i de fall de förekommer. Antibiotikabehandling bör om möjligt undvikas för att spara kritiskt viktiga antibiotika till humanvården. Ett av stallen var en seminestation som drevs av en veterinär, ett annat hade mångfasetterad verksamhet med bland annat veterinärpraktik och stuteri, och ett tredje arbetade endast med avel och uppfödning av travhästar. Antibiotikaresistens hos bakterierna vid just dessa stall kan ses som en trolig högre användning av antibiotika, möjligtvis på grund av dess verksamhetsområde inom just avel. Resistensen gör det extra viktigt att förebygga sjukdomar och så långt som möjligt undvika antibiotikabehandling inom verksamheterna, för att fortsatt kunna behandla de fallen som kräver antibiotika.

I den här studien innehöll något fler vattenprov nedströms än uppströms ESBL-producerande *E.coli*, men skillnaden är liten och konfidensintervallen överlappar varandra. Fynd i vattnet, både uppströms och nedströms, kan bero på andra källor uppströms anläggningen, men de nedströms kan också vara orsakade av anläggningen. Endast en av anläggningarna med fynd nedströms har enskilt avlopp som skulle kunna vara orsaken, och för alla anläggningar kan orsaken vara hästarna och hästverksamheten (direkt eller indirekt via avrinning) även om antalet indikatorbakterier inte ökat. Andra, mer eller mindre troliga orsaker kan vara förorening av andra djur (som möjligt i fallet med stall 10, se nedan), vilda djur eller sällskapsdjur på gården, eller spontan mutation. Halterna indikatorbakterier ökade inte nedströms stall 10, men det fanns ändå viss anledning att misstänka att anläggningen kan vara en källa till förorening av resistens. Vid anläggningen hittades ESBL-producerande *E.coli* både i gödsel och nedströms anläggningen, men inte uppströms. Resistensmönstret hos de två positiva proverna jämfördes,

och liknade varandra, men resistensen var dock inte orsakad av samma gener. Förorening med resistenta bakterier från anläggningen kunde därför inte styrkas. Det ska också noteras att det betade nötkreatur de sista hundra meterna längs vattendraget. De resistenta bakterierna i vattendraget utanför stall 10 behöver därför, precis som ovan nämnt, inte orsakas av hästverksamheten. Vid en anläggning, precis i utkanten av en mindre stad, påvisades resistenta bakterierna både uppströms och nedströms. Vattenprovet uppströms innehöll bakterier som var resistenta mot åtta grupper av antibiotika, flest i studien. Någon kilometer bort mynnade samma vattendrag i stadens hamn och dess populära badstrand. Provet innehöll inte förhöjda halter indikatorbakterier men förekomsten av multiresistenta bakterier är ändå intressant på grund av vattnets rekreativvärde. Eftersom de flesta anläggningar, både allmänt i Sverige och i studien, ligger tätortsnära hade många människor varit drabbade om förorening skedde. Flera svenska studier (Iversen *et al.*, 2003, Egervärn *et al.*, 2014) har konkluderat att risken för överföring av antibiotikaresistens från djur och miljö till människor är mycket liten, men Heuer *et al.* (2011) anser att riskerna är underskattade. Ytvatten är källa till hälften av vårt dricksvatten och är samtidigt mycket utsatt för risker med föroreningar. Felaktiga bevattningsrutiner med förorenat vatten har orsakat många livsmedelsburna sjukdomsutbrott. Kommunala vattenverk prioriterar mikrobiologisk kvalitet och skiljer bort även de antibiotikaresistenta bakterierna. I Sverige och i studien har dock många egna brunnar med vatten vars kvalitet inte är lika kontrollerad. Reningsverk skiljer heller inte bort antibiotikarester som kan ge upphov till resistens. Risken att exponeras för ESBL-producerande *E.coli* vid kontakt med våra vattendrag eller vid kontakt med hästgödsel kan med studiens resultat i åtanke inte anses som obetydlig. Kontakt innebär däremot inte att bakterierna behöver kolonisera vår tarm eller infektera oss, då resistenta bakterier inte har någon fördel i miljön förutom om de kommer i kontakt med antibiotika. Då bakterier med ESBL också ofta bär på andra resistensgener är det därför viktigt att tänka på att i princip all antibiotikabehandling, inte bara bredspektrumantibiotika, gynnar ESBL-producerande bakterier. Minskad förekomst av antibiotika i miljön, och således mindre selektion för antibiotikaresistens, kan till slut bara nås genom mindre antibiotikaanvändning. Selektionstrycket i vår miljö kan också minskas genom bättre rening och avfallshantering av läkemedel och antibiotikarester.

Ingen ESBL-producerande *E.coli* i studien var resistent mot karbapenemer, varken i gödsel eller i vatten. Ingen resistens hittades heller mot kolistin. Två av de positiva proverna, ett gödselprov och ett vattenprov, visade däremot resistens mot kinoler och aminoglykosider utöver sin resistens mot cefalosporiner och penicillin. Isolaten var således resistent mot alla de antibiotika som pekats ut som kritiskt viktiga att bevara. Alla isolat i studien var enligt panelerna resistent mot sulfonamider. Detta kan bero på metodfel för just sulfamethoxazol, men förändrar inte studiens resultat nämnvärt. För hästars del finns det få godkända antibiotika, och det är viktigt att de som finns fungerar. I alla tre gödselprov, samt två av fem vattenprov, fanns resistents mot alla godkända antibiotika till häst. Skulle bakterierna orsaka infektion finns det således inte många alternativ kvar. Alla ESBL-producerande *E.coli* i gödselproverna var också resistent mot tetracyklin, vilket annars hade varit ett alternativ. Ett gödselprov innehöll bakterier med resistens även mot kinoloner. Om bakterien hade orsakat sjukdom hade den således i princip inte varit behandlingsbar, då övriga antibiotika inte i praktiken är aktuella för behandling av häst. Vid en eventuell infektion av de två andra isolaten från gödsel hade behandling med

fluorokinoloner varit möjlig och i det här fallet laglig eftersom verksamt alternativ saknas. Man ska dock komma ihåg att epidemiologiska gränsvärden för antibiotikaresistens inte behöver innebära klinisk antibiotikaresistens och att resistensen inte hittades i kliniska prov utan från gödselprov från förmodat friska hästar och vattenprov.

SLUTSATS

Inga slutsatser kring hästanläggningars eventuella roll som källa till fekala föroreningar i miljön kan dras utifrån studiens resultat. Resultaten hade dock troligen blivit mer rättvisande om provtagningen hade skett under förhållanden med större ytavrinning och vid upprepade tillfällen, och vid fortsatta studier kring området rekommenderas sådan provtagning starkt. Förekomsten av antibiotikaresistens i form av ESBL-producerande *E.coli* får anses vara väl spridd i den svenska miljön och förekommer hos en stor del av hästanläggningarna på besättningsnivå.

REFERENSER

- Ahmed, M.O., Clegg, P.D., Williams, N.J., Baptiste K.E., Bennett, M. (2010). *Antimicrobial resistance in equine faecal Escherichia coli isolates from North West England*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 9 (12). Tillgänglig: http://download.springer.com/static/pdf/52/art%253A10.1186%252F1476-0711-9-12.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Fann-clinmicrob.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2F1476-0711-9-12&token2=exp=1464800210~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F52%2Fart%25253A10.1186%25252F1476-0711-9-12.pdf*~hmac=d6fa6de925e99b65f89b5a2e3b8096c51a142f3e7bb63efd3156455c08d5336d [2016-06-02]
- Ahmed, M.O., Williams, N.J., Clegg, P.D., van Velkinburgh, J.C., Baptiste, K.E., Bennett, M. (2012). Analysis of risk factors associated with antibiotic-resistant *Escherichia coli*. *Microbiol Drug Resistance*, vol. 18 (2). Tillgänglig: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229818> [2016-06-03]
- Airaksinen, S., Heiskanen, M.-L., Heinonen-Tanski, H. (2007). Contamination of surface runoff water and soil in two horse paddocks. *Bioresource Technology*, vol.98 (9), ss. 1762-1766. Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852406003695> [2016-06-03]
- Crowther, J., Kay, D., Wyer, M.D. (2002). Faecal-indicator concentrations in waters draining lowland pastoral catchments in the UK: relationships with land use and farming practices. *Water Research*, vol. 36 (7), ss. 1725-1734. Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135401003943> [2016-06-03]
- Djurskyddslagen (1988). (1988:534). Tillgänglig: http://www.riksdagen.se/sv/dokument-lagar/dokument/svensk-forfattningssamling/djurskyddslag-1988534_sfs-1988-534 [2017-01-14]
- Dolejska, M., Duskova, E., Rybarikova, J., Janoszowska, D., Roubalova, E., Dibdakova, K., Maceckova, G., Kuhoutova, L., Literak, I., Smola, J., Cizek, A. (2011). Plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 66, ss. 757-764. Tillgänglig: <http://jac.oxfordjournals.org/content/66/4/757.full.pdf+html> [2016-06-02]
- Doran, J.W., Linn, D.M. (1979). Bacteriological quality of runoff from pastureland. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 37 (5), ss. 985-991. Tillgänglig: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243336/pdf/aem00209-0207.pdf> [2016-06-03]
- Egervärn, M., Englund, S., Börjesson, S., Lindblad, M. (2013). *ESBL-bildande E.coli i svenskt råvatten – en pilotstudie*. Livsmedelsverket och Statens Veterinärmedicinska Anstalt. Tillgänglig: http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/om_sva/publikationer/esbl_bildande_ecoli_ravatten.pdf [2016-06-03]
- Egervärn, M., Rosengren, Å., Englund, S., Börjesson, S., Löfmark, S., Ny, S., Byfors, S. (2014). ESBL-bildande *E.coli* i vår omgivning – livsmedel som spridningsväg till människa. Livsmedelsverket, Statens Veterinärmedicinska Anstalt och Folkhälsomyndigheten. Tillgänglig: <http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/antibiotika/antibiotikaresistens/msb-esbl-slutrapport.pdf> [2016-06-03]
- Enhäll, J. (2011). *Hästar och anläggningar med häst 2010*. Jordbruksverket och Statistiska centralbyrån (JO 24 SM 1101). Tillgänglig: <https://www.jordbruksverket.se/webdav/files/SJV/Amnesomraden/Statistik,%>

- 20fakta/Husdjur/JO24/JO24SM1101/JO24SM1101/JO24SM1101.pdf [2016-05-30]
- Enhäll, J., Nordgren, M., Kättström, H. (2012). *Hästhållning i Sverige 2010*. Jordbruksverket (Rapport 2012:1). Tillgänglig:
http://www.jordbruksverket.se/download/18.6223f767134a3048c1e8000226/HasthallningiSverige_2010.pdf [2016-05-30]
- Europaparlamentets och rådets direktiv 2006/7/EG om förvaltning av badvattenkvaliteten och om upphävande av direktiv 76/160/EEG (2006). (EG 2006/7). Tillgänglig:
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:064:0037:0051:SV:PDF> [2016-06-03]
- European Food Safety Authority. (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 Journal*, vol. 9 (8):2322. Tillgänglig: <http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/2322> [2016-06-03]
- European Medicines Agency (2015). European surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption. *Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2013*. (EMA/387934/2015) Tillgänglig:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2015/10/WC500195687.pdf [2016-05-30]
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (u.å.). *Antimicrobial wild type distributions of microorganisms*. Tillgänglig: <http://mic.eucast.org/Eucast2/> [2016-06-03]
- Flint, K.P. (1987). The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 63, ss. 261-270. Tillgänglig:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1987.tb04945.x/epdf> [2016-06-03]
- Folkhälsomyndighetens föreskrifter om anmälan av anmälningspliktig sjukdom i vissa fall (2015). (HSLF-FS 2015:7). Tillgänglig:
<https://www.folkhalsomyndigheten.se/documents/publicerat-material/foreskrifter/hslf-fs-2015-7-foreskrifter-om-anmalan-av-anmalningspliktig-sjukdom-i-vissa-fall.pdf> [2016-06-03]
- Food and Agriculture Organization, World Organisation for Animal Health, World Health Organization (2008). *Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials. Report of the FAO/WHO/OIE Expert meeting, FAO Headquarters, Rome, 26-30 November 2007*. Tillgänglig: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/i0204e/i0204e00.pdf> [2016-06-02]
- Förordning om miljöhänsyn i jordbruket (1998). (SFS 1998:915). Tillgänglig:
http://www.riksdagen.se/sv/Dokument-Lagar/Lagar/Svenskforfattningssamling/Forordning-1998915-om-miljo_sfs-1998-915/ [2016-06-03]
- FASS. *Djurläkemedel*. Tillgänglig:
http://www.fass.se/LIF/startpage;jsessionid=zISUBzkR2WJfB6T4mG5ICy1_tL3URJk7BMjCs4SOQRHFjM6N3jxv!163349971?userType=1 [2016-02-10]
- Gary, H.L., Johnson, S.R., Ponce, S.L. (1983). Cattle grazing impact on surface water quality in a Colorado Front Range stream. *Journal of Soil and Water Conservation*, vol. 38, ss. 124-128. Tillgänglig:
http://www.fs.fed.us/rm/pubs_exp_forests/manitou/rmrs_1983_gary_h001.pdf [2016-06-03]
- Heuer, H., Schmitt, H., Smalla, K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, vol 14, ss. 236-243. Tillgänglig: http://www.jki.bund.de/downloadFatPdf.php?file=2011_0176.pdf [2016-06-03]

03]

- Hooda, P.S., Edwards, A.C., Anderson, H.A., Miller, A. (2000). A review of water quality concerns in livestock farming areas. *Science of the Total Environment*, vol. 250, ss. 143-167. Tillgänglig: https://www.researchgate.net/publication/12507100_A_Review_of_Water_Quality_Concerns_in_Livestock_Farming_Areas [2016-05-31]
- Hunter, C., Perkins, J., Tranter, J., Gunn, J. (1999). Agricultural land-use effects on the indicator bacterial quality of an upland stream in Derbyshire peak district in the U.K.. *Water Research*, vol. 33(17), ss. 3577-3586. Tillgänglig: http://ac.els-cdn.com/S0043135499000834/1-s2.0-S0043135499000834-main.pdf?_tid=14b0c17e-c666-11e5-aab7-00000aacb360&acdnat=1454057924_7547ab9db3429285d0f6a4e485253fe4 [2016-06-03]
- Iversen, A., Kühn, I., Rahman, M., Franklin, A., Burman, L.G., Olsson-Liljequist, B., Torell, E., Möllby, R. (2003). Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*. *Environmental microbiology*, vol. 6(1), ss. 55-59. Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1462-2920.2003.00534.x/full> [2016-06-03]
- Janzen, J.J., Bodine, A.B., Luszcz, L.J. (1974). A survey of effects of animal wastes on stream pollution from selected dairy farms. *Journal of Dairy Science*, vol. 57, ss. 260-263. Tillgänglig: <http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302%2874%2984869-1/pdf> [2016-06-03]
- Jawson, M.D., Elliott, L.F., Saxton, K.E., Fortier, D.H. (1982). The effect of cattle grazing on indicator bacteria in runoff from Pacific northwest Watershed. *Journal of Environmental Quality*, vol. 11 (4), ss. 621-627. Tillgänglig: <http://lshs.tamu.edu/docs/lshs/end-notes/the%20effect%20of%20cattle%20grazing%20on%20indicator%20bacteria%20in%20runoff%20from%20a%20pacific%20northwest%20watershed.pdf> [2016-06-03]
- Johns, I., Verheyen, K., Good, L., Rycroft, A. (2012). Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from horses treated with antimicrobials: A longitudinal study in hospitalized and non-hospitalised horses. *Veterinary Microbiology*, vol. 159 (3-4), ss. 381-389. Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113512002593#Rbib0020> [2016-06-02]
- Livsmedelsverkets föreskrifter om dricksvatten (2001). (SLVFS 2001:30). Tillgänglig: <http://www.livsmedelsverket.se/globalassets/om-oss/lagstiftning/dricksvatten---naturl-mineralv---kallv/slvfs-2001-30-kons.pdf> [2016-06-03]
- Länsstyrelsen Örebro län (2012). *Fynd av antibiotikaresistenta tarmbakterier i Svartån och Hjälmarén*. Länsstyrelsen i Örebro Län (Publikation 2012:20). Tillgänglig: <http://www.lansstyrelsen.se/orebro/SiteCollectionDocuments/Sv/publikationer/2012/rappo-rt-resistenta-bakterier-i-svartan-och-hjalmaren.pdf> [2016-06-03]
- Lönn, A., & Lindberg, S. (2011). Hästhållning i åkerströmmens avrinningsområde – utsläpp av fosfor och kväve samt metoder för att minska påverkan. Kungliga Tekniska Högskolan. Institutionen för mark och vattenteknik (LWR-KAND-EX-2011:02). Tillgänglig: <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:541988/FULLTEXT01.pdf> [2016-06-03]
- Maddox, T.W., Williams, N.J., Clegg, P.D., O'Donnell, A.J., Dawson, S., Pinchbeck, G.L. (2011). Longitudinal study of antimicrobial-resistant commensal *Escherichia coli* in the faeces of horses in an equine hospital. *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 100 (2), ss. 134-145. Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587711000377> [2016-10-16]
- Maddox, T.W., Clegg, P.D., Diggle, P.J., Wedley, A.L., Dawson, S., Pinchbeck, G.L.,

- Williams, N.J. (2012). Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 1: Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Stafylococcus aureus*. *Equine Veterinary Journal*, vol. 44 (3), ss. 289-296. Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3306.2011.00441.x/epdf> [2016-06-02]
- Malgeryd, J., Persson, T. (2013). *Hästgödsel – en naturlig resurs*. Jordbruksverket. [Broschyr] Tillgänglig: http://www2.jordbruksverket.se/webdav/files/SJV/trycksaker/Pdf_jo/jo13_5.pdf [2016-05-30]
- Miljöbalken (1998). (SFS 1998:808). Tillgänglig: https://www.riksdagen.se/sv/Dokument-Lagar/Lagar/Svenskforfattningssamling/Miljobalk-1998808_sfs-1998-808/ [2016-06-30]
- Norman Haldén, A., Boqvist, S., Huitu, H., Jaakkola, E., Norrgren, L., Ryd Ottoson, J., Sternberg Lewerin, S., Tattari, S. (2013). *Biosecurity considerations for the Baltic Sea Region. Focus on transmission of microorganisms from livestock to the aquatic environment*. Baltic Compass. Tillgänglig: <http://www.balticcompass.org/PDF/Reports/WP5-Biosecurity-considerations.pdf> [2016-09-13]
- Persson, P., Bratt, M., Selander, R. (2005). *Hästar och anläggningar med häst 2004*. Jordbruksverket och Statistiska centralbyrån (JO 24 SM 0501). Tillgänglig: <http://www.jordbruksverket.se/webdav/files/SJV/Amnesomraden/Statistik,%20fakta/Husdjur/JO24/JO24SM0501.pdf> [2016-05-30]
- Roser, D. & Ashbolt, N. (2007). *Source water quality assessment and the management of pathogens in surface catchments and aquifers*. The Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment (Research Report No29). Tillgänglig: http://www.monitor2manage.com.au/userdata/downloads/p_/Roser%20and%20Ashbolt%202004%20Water%20borne%20pathogens.pdf [2016-06-03]
- Smittskyddslagen (2004). (SFS 2004:168). Tillgänglig: http://www.riksdagen.se/sv/dokument-lagar/dokument/svensk-forfattningssamling/smittskyddslag-2004168_sfs-2004-168 [2016-06-03]
- Sveriges Veterinärmedicinska Sällskap (2013). *Riktlinjer för användning av antibiotika inom hästsjukvård*. Tillgänglig: <http://sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/antibiotika/riktlinjer-anitibiotikabeh-hast.pdf> [2017-01-14]
- Statens jordbruksverks föreskrifter om anmälningspliktiga djursjukdomar och smittämnen (2012). (SJVFS 2012:24). Tillgänglig: <https://www.jordbruksverket.se/download/18.3620351113a04a2bd9b8000962/2012-024.pdf> [2016-12-17]
- Statens jordbruksverks föreskrifter om läkemedel och läkemedelsanvändning (2013). (SJVFS 2013:42). Tillgänglig: <https://www.jordbruksverket.se/download/18.53b6e8e714255ed1fcc4fd9/1385713779939/2013-042.pdf> [2016-06-03]
- Statens jordbruksverks föreskrifter om zoonotiska sjukdomar (1999). (SJVFS 1999:101). Tillgänglig: <https://www.jordbruksverket.se/download/18.26424bf71212ecc74b080002090/1370040584334/1999-101.pdf> [2016-06-03]
- Sullivan, K. (2010). *Literature review: Equine facility runoff*. Water Resources Program. Tillgänglig: http://water.rutgers.edu/Research/equine_runoff_lit_review_042910.pdf [2016-05-31]
- Svenskt vatten (2016-05-19). Produktion av dricksvatten. Tillgänglig: <http://www.svensktvatten.se/fakta-om-vatten/dricksvattenfakta/produktion-av-dricksvatten/> [2016-05-31]

- Swedres-Svarm (2014). Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden. Solna/Uppsala. Tillgänglig: http://sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/om_sva/publikationer/swedres_svarm2014.pdf [2016-06-03]
- Swedres-Svarm (2015). Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden. Solna/Uppsala. Tillgänglig: http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/om_sva/publikationer/swedres_svarm2015.pdf [2016-09-12]
- Tiefenthaler L., Stein E.D., Schiff K.C. (2011). Levels and patterns of fecal indicator bacteria in stormwater runoff from homogenous land use sites and urban watersheds. *Journal of Water and Health*, vol. 9 (2), ss. 279-290
- van Elsas, J.D., Semenov, A.V., Costa, R., Trevors, J.T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, vol. 5, ss. 173-183. Tillgänglig: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20574458> [2016-06-03]
- Weaver, R.W., Entry, J.A., Graves, A. (2005). Number of fecal streptococci and *Escherichia coli* in fresh and dry cattle, horse, and sheep manure. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 51, ss. 847-851. Tillgänglig: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/w05-071> [2016-06-03]
- World Health Organization (2011). *Drinking-water guidelines*. 4th ed. Tillgänglig: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf [2016-05-31]
- World Health Organization (2014). Antimicrobial resistance global report on surveillance. Tillgänglig: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1 [2016-06-03]
- Zoonoslagen (1999). (SFS 1999:658). Tillgänglig: https://www.riksdagen.se/sv/dokument-lagar/dokument/svensk-forfattningssamling/zoonoslag-1999658_sfs-1999-658 [2016-12-17]

Appendix 1

Frågor och svarsalternativ från enkäten till hästanläggningarna. Alternativ separerade med semikolon

Fråga	Svarsalternativ
Vad för verksamhet sysslar er hästanläggning med?	<i>Fritext</i>
Hur hålls era hästar?	Enkelboxar; gruppboxar; lösdrift inomhus; lösdrift utomhus; övrigt
Hur många hästar vistas i anläggningen just nu?	<20; 20-35; 35-50; >50
Hur många hästar vistas i anläggningen under året?	<20; 20-35; 35-50; >50
Hur stor andel av era hästar har varit utanför Norden det senaste året? (%)	Ingen; <25; 25-50; 50-75 ; >75 %
Hur stor andel av era hästar har varit utanför Norden under hela deras livstid? (%)	Ingen; <25; 25-50; 50-75; >75
Hur stor areal hagar/betesmark vistas era hästar på under året? <i>Antal hektar per häst.</i>	<0.1; 0.1-0.5; 0.5-1; 1-2; >2
Har några hästar antibiotikabehandlats det senaste året? <i>Om ja, ange om möjligt antal hästar, orsak till behandling, antibiotikasort, längd på behandling och tidpunkt.</i>	Ja; Nej
Har ni haft något utbrott av smittsam sjukdom under det senaste året? <i>Om ja, ange gärna vilken sjukdom och hur många som drabbades.</i>	Ja; Nej
Hur sker gödsellagringen och –hanteringen? <i>Ange gödselanläggningens placering på gården (se karta). Beskriv även rutiner kring hantering av gödsel inomhus samt utomhus.</i>	Gjuten platta; Container; Direkt på marken/stuka; Övrigt
Vad för avlopp används på anläggningen? <i>Om enskilt avlopp, ange typ av avlopp och dess placering på gården (se karta). Om ni har flera avlopp, beskriv alla.</i>	Kommunalt avlopp; Enskilt avlopp
Vad för vattenkälla används på anläggningen? <i>Om egen brunn, ange typ av brunn och dess placering på gården (se karta). Om ni har flera vattenkällor, beskriv alla.</i>	Kommunalt vatten; Egen brunn
Har ni haft problem med bakterier i dricksvattnet tidigare? <i>Om ja, ange om möjligt vad för problem ni hade och tidpunkt.</i>	Ja; Nej
Har ni själva identifierat några risker i verksamheten som kan ge upphov till spridning av gödsel/bakterier till omkringliggande vattendrag?	<i>Fritext</i>

Appendix 2

Resistensmönster med MIC-värden för ESBL-producerande *E.coli*. I de fall där ett antibiotikum testats med både VetMIC GN-mo och Sensititre, och olika MIC-värden noteras, presenteras värdena åtskiljda med semikolon

	Stall										
	3	5	6	7	8	9	10	Uppströms	Nedströms	Nedströms	Gödsel
<i>Ampicillin</i>	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<i>Ciprofloxacin</i>	0,03	0,03	0,03	0,03	>1	>1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>Nalixidinsyra</i>	4	2	4	2	>128	>128	4	4	2	4	4
<i>Gentamicin</i>	>16	0,5	>16	0,5	16	>16	0,5	0,5	0,5	0,5	>16
<i>Streptomycin</i>	>256	8	>256	8	32	256	8	8	64	64	256
<i>Tetracyclin</i>	64	<1	64	2	16	64	64	64	32	32	64
<i>Florfenikol</i>	<4	<4	8	8	8	>32	8	8	8	8	8
<i>Kolistin</i>	1	1	1	<0,5	<0,5	1	1	1	1	1	1
<i>Sulfamethoxazol</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
<i>Trimetoprim</i>	>16	1	>16	0,5	>16	>16	0,25	>16	>16	>16	>16
<i>Kloramfenikol</i>	>64	4	>64	4	4	64	8	4	4	>64	>64
<i>Kanamycin</i>	>16	<8	<8	<8	16	>16	>16	<8	<8	<8	<8
<i>Cefotaxim</i>	>2,8	>2;>64	>2;32	2;4	>2;>64	>2;>64	>2;16	>2;>64	>2;>64	>2;32	>2;32
<i>Ceftazidim</i>	>16;64	8;32	12	2;4	4	8;16	1	2;4	1;0,5	1;0,5	1;0,5
<i>Cefoxitin</i>	2	8	8	32	16	8	4	8	4	4	4
<i>Ertapenem</i>	<0,015	0,03	<0,015	0,03	0,03	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015
<i>Imipenem</i>	<0,12	<0,12	<0,12	<0,12	<0,12	<0,12	<0,12	<0,12	<0,12	<0,12	<0,12
<i>Meropenem</i>	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
<i>Cefepim</i>	2	>32	4	0,12	18	16	4	>32	4	4	4
<i>Cefo/klav*</i>	<0,06/4	<0,06/4	<0,06/4	2;4	<0,06/4	<0,06/4	<0,06/4	<0,06/4	<0,06/4	<0,06/4	<0,06/4
<i>Cefta/klav**</i>	<0,12/4	0,25;4	<0,12/4	2;4	<0,12/4	<0,12/4	<0,12/4	<0,12/4	<0,12/4	<0,12/4	<0,12/4
<i>Temocillin***</i>	4	16	8	8	16	8	8	16	16	4	4

* Cefo/klav = Cefoxitim/klavulansyra ** Cefta/klav = Ceftazidim/klavulansyra *** För temocillin finns inget EUCOFF.