

# Antibiotikaresistens hos bakterier isolerade från friska hundar i Sverige

Indikatorbakterier – *E coli* & *Enterococcus* spp  
samt  
*Staphylococcus* spp isolerade från hud

**Johanna Zwenson**

Handledare: Hans Tjälve  
Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap, SLU

Biträdande handledare: Björn Bengtsson  
Avdelningen för Antibiotika, Statens Veterinärmedicinska Anstalt

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	4
Summary .....	5
Inledning.....	6
Syfte .....	7
Material .....	8
Metoder .....	8
Isolering och identifiering .....	8
Resistensbestämning .....	10
Kvalitetskontroll.....	11
Statistik.....	11
Resultat.....	12
Ras- och Åldersfördelning .....	12
Indikatorbakterier .....	12
Escherichia coli .....	12
Enterokocker .....	13
Stafylokocker .....	15
Staphylococcus aureus .....	15
Staphylococcus intermedius.....	15
Staphylococcus schleiferi subsp coagulans.....	16
Diskussion .....	17
Indikatorbakterier .....	17
Stafylokocker .....	19
Material .....	20
Konklusion .....	21
Litteraturförteckning .....	23
Bilaga 1: MRSA – ett problem som kryper närmare .....	25
Bilaga 2: Remiss för hund som deltar i resistensstudien 2006.....	26

## Tack

- Först och främst ett varmt tack till alla hundägare som ställt upp med sina hundar till detta projekt, utan er hade det inte gått att genomföra!
- Svenska Kennelklubben (SKK), arrangörer av hundutställningarna och Kjell Bräster (SKK) för att ni stött mig i insamlandet.
- Alla de personer som ställt upp med sin tid och kunskap för att underlätta mitt arbete, ett speciellt tack till Margareta Horn af Rantzien, Avdelningen för Antibiotika på Statens Veterinärmedicinska Anstalt, SVA.
- Övrig personal på Avdelningen för Antibiotika på SVA, inte minst Björn Bengtsson för hans hjälp med att analysera statistiken.
- STRAMA (Strategigruppen för Rationell Antibiotikaanvändning och Minskad Antibiotikaresistens) för finansiellt stöd till stafylokockanalyserna.

## **SAMMANFATTNING**

Syfte: Syftet med denna studie är att kartlägga förekomsten av resistens hos bakterier hos friska svenska hundar och att undersöka om det finns friska hundar som är bärare av MRSA (meticillinresistent *Staphylococcus aureus*).

Material: Hudprov från perineum samt träckprov tagna med bomullspinne (Copanrör) från 299 friska svenska hundar deltagande i olika hundutställningar.

Metod: Proverna odlades och bakterier (*Escherichia coli*, enterokocker och stafylokocker) isolerades och typades enligt gängse metoder och resistensbestämdes med mikrodilutionsmetod varvid MIC-värden erhöles. Stafylokocker som hade oxacillin- eller utvidgad resistens testades avseende *mecA*-genen med PCR.

Resultat: För hela materialet sågs ingen skillnad i resistens hos indikatorbakterier hos hund jämfört med lantbrukets djur. Ingen åldersskillnad avseende resistens kunde påvisas. För ampicillin och sulfametoxazole sågs en signifikant ökning av antibiotikaresistensen hos *E. coli* isolerade från de hundar som behandlats med antibiotika senaste året. En *E. coli* med resistens mot tredje generationens cefalosporiner påvisades. En djurslagsskillnad, mellan hund, kyckling och svin, sågs i fördelningen av vilka species av enterokocker som förekom. En meticillinresistent *Staphylococcus intermedius* (MRSI), den första isolerad från hund i Sverige, påvisades. En tendens till lägre resistens sågs hos *S. intermedius* isolerade från hundarna i studien jämfört med kliniska prover från hundar (material från SVARM), däremot sågs en tendens av högre frekvens resistensfrekvens jämfört med en tidigare svensk studie baserad på ett mindre material, som utförts för tio år sedan.

## SUMMARY

Objective: To determine the frequency of antimicrobial resistance in bacteria from healthy Swedish dogs and whether they are carriers of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Material: Samples from skin from the perineal region and from faeces collected in the anus with cottonswab (Copan) from 299 healthy Swedish dogs. Samples were collected at dog exhibitions.

Method: Specimens were submitted for bacterial culture where bacteria (*Escherichia coli*, enterococci and staphylococci) were isolated and identified by current methods. Antimicrobial susceptibility testing was performed with a microdilution method where MIC-values were determined. Staphylococci with high degree of resistance were tested for presence of *mecA*-gene by PCR.

Results: Looking at the whole material there were no difference in antimicrobial resistance compared with food-producing animals. No difference in resistance regarding age could be detected. Ampicillin and sulfametoxazole showed a higher degree of resistance in *E. coli*-isolates from dogs that had been treated with antibiotics during the last 12 months compared to non-treated dogs. One isolate of *E. coli* showed resistance against the third generation cephalosporines. A difference in species distribution was seen for enterococci between dogs, pigs and chickens. One methicillinresistant *Staphylococcus intermedius* (MRSI) was isolated which is the first isolate of this kind from a dog in Sweden. Compared with clinical *S. intermedius*-isolates from dogs there was a tendency of overall less resistance in the dogs in this study. On the other hand there was a tendency of a higher resistance compared to a small Swedish study performed ten years ago.

## INLEDNING

Vetenskapen utkämpar hela tiden ett krig mot mikroorganismerna. Det sägs ju att det inte är kulor som dödar flest människor i krig, utan det är bakterier och andra mikroorganismer. När penicillinet kom på 1940-talet såg man början på en era där människan kunde besegra naturen, men nästan i samma stund som vi upptäckte och började använda penicillin utvecklade bakterier resistens mot ämnet. För att komma runt problemet utvecklades nya preparat med andra verkningsmekanismer, men hela tiden överlistar bakterierna oss. Nya preparat utvecklas fortfarande och mekanismerna bakom resistensutvecklingen kan med dagens teknik åtminstone åskådliggöras.

Det förekommer flera övervakningsprogram avseende antibiotikaresistens, både inom veterinär- och humanmedicinen. Det finns flera viktiga anledningar att övervaka antibiotikaresistensen. Man kan se trender av ökad resistens tidigt och kan utifrån dessa ändra användningen av, eller till och med förbjuda, vissa substanser för att undvika en fortsatt resistensutveckling. Dessutom kan man ge riktlinjer till kliniker angående vilka preparat som kan förväntas vara effektiva för behandling av olika sjukdomar. Ett bra exempel på övervakningsprogram är SVARM-rapporten (Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring), där SVA (Statens Veterinärmedicinska Anstalt) sedan år 2000 övervakat antibiotikaförbrukningen och förskrivningen till djur samt resistensundersökt zoonotiska bakterier, kliniska isolat från sjuka djur och indikatorbakterier från kalv, slaktkyckling och svin. Liknande övervakningsprogram finns till exempel i Norge (NORM-VET), Danmark (DANMAP) och Holland (MARAN). De indikatorbakterier som används i dessa studier är *E. coli* och *Enterococcus* spp från tarmfloran hos normala, friska djur då dessa bakterier anses spegla antibiotiketrycket i populationen (Bogaard & Stobberingh 2000). I SVARM-rapporten har man varje år påvisat låg förekomst av resistens bland indikatorbakterier hos lantbrukets djur, men samtidigt ser man att användning av antibiotika tenderar att driva bakteriepopulationen mot en ökad resistens mot de använda substanserna.

Sverige har ett i ett internationellt perspektiv gott resistensläge bland bakterier från såväl djur som människor (SVARM/SWEDRES 2005). Förskrivningen av antibiotika till människor har minskat 2005 jämfört med 2004, den totala användningen till djur är under samma period oförändrad. En kraftig ökning i förskrivningen av cefalosporiner och fluorokinoloner till hundar har dock setts under den senaste 5-årsperioden.

Tidigare har indikatorbakterier i Sverige endast undersökts hos lantbrukets djur och det finns få undersökningar avseende resistens hos indikatorbakterier från sällskapsdjur. (NORM-VET, 2004). Enterokocker från hund och katt har undersökts av De Leener et al. (2005) i avseende att se förekomsten av och mekanismen hos förvärvad resistens hos enterokocker. Djuren var antingen inlagda på klinik eller i sin hemmiljö. Man påvisade hög förekomst av gener som kodar för resistens mot ett eller flera antibiotika.

I en finsk studie (Rantala et al. 2004) undersöktes resistensen hos stafylokocker isolerade från huden på en grupp hundar (22 stycken) som behandlats för pyodermi med stafylokocker från friska, inte antibiotikabehandlade hundar (56 stycken). Samtidigt provtog man träck från hundarna för isolering av *E. coli* och enterokocker.

*Staphylococcus intermedius* är en vanlig kolonisatör och infektionsorsak hos hundar. Den isoleras ofta från hud- och öroninfektioner hos hund och är den bakterie man primärt räknar med att behandla hos en hund med sådana infektioner. I flera tidigare studier har man undersökt resistens hos stafylokocker från såväl friska hundar som från hundar med pyodermi och dessutom i jämförande studier mellan antibiotikabehandlade och icke antibiotikabehandlade hundar (Hoekstra och Paulton 2002; Malik et al. 2005; Holm et al. 2002; Rantala et al. 2004).

Det har under senare år kommit flera rapporter om att hundar kan vara bärare av MRSA, Meticillinresistenta *Staphylococcus aureus* (Weese, 2005; Kania et al. 2004; Gortel et al. 2004; Guardabassi et al. 2004; van Duijkeren 2004). MRSA är ett stort problem inom humansjukvården. Det är stafylokocker som är resistenta mot alla betalaktamantibiotika (t.ex penicillin och cefalosporiner) och ofta är resistenta även mot många andra substansgrupper. För utförligare beskrivning av MRSA och dess spridning se Bilaga 1.

En ökad antibiotikaresistens bland bakterier hos våra sällskaps- eller produktionsdjur är inte bara ett problem för djurägare och veterinärer. Många bakterier som ger infektion eller koloniserar djur kan även infektera människor eller överföra resistens till bakterier som kan infektera människor, varför en zoonosrisk finns invävd i problemet.

Med anledning av ovanstående är det intressant att få en bild av resistensläget hos friska hundar i Sverige. Tidigare studier i Sverige är framförallt gjorda på stafylokocker isolerade från sjuka och behandlade hundar där kliniska prover undersökts (SVARM) eller jämförande studier där antalet friska hundar varit relativt litet (Holm et al. 2002). För *E. coli* finns en studie (Hagman & Greko 2005) avseende isolat från tikan med pyometra som kan tjäna som indikatorbakterie, men i övrigt saknas denna typ av studier.

## **SYFTE**

Syftet med denna studie är att kartlägga förekomsten av resistens hos bakterier hos friska svenska hundar och att undersöka om det finns friska hundar som är bärare av MRSA.

## MATERIAL

Prover från 299 hundar insamlades på totalt 4 hundutställningar samt från hundar tillhöriga personal och studenter vid Sveriges Lantbruksuniversitet och SVA i Uppsala. Etiskt tillstånd för insamlandet beviljades av Uppsala Försöksetiska Nämnd (Diarienummer C 3/06).

Insamlingen skedde omgångsvis på hundutställningar under våren och hösten 2006. Ett informationsblad (skrivet i samråd med Kjell Bräster på Svenska Kennelklubben) om undersökningen bifogades den information som går ut till hundägarna inför en utställning. I varje omgång togs mellan 20 och 80 prover. Faecesproverna, för isolering av indikatorbakterier, togs med rektalsvabb och hudproverna, för stafylokockisolering, med svabb från perineum. För båda provtyperna användes Aimes kolade eller okolade medium (Copan). Endast en hund från varje hushåll provtogs. Hundägaren ombads fylla i ett formulär med uppgifter om hundens ålder, ras och eventuell antibiotikabehandling, hur hunden bor, om fler hundar finns i hushållet och i vilket postnummerområde hunden finns. (Formulär, se Bilaga 2).

## METODER

### Isolering och identifiering

#### *Escherichia coli*

Svabben ströks ut på en *MacConkey*-platta (DIFCO) som inkuberas i 37 °C över natten. En slumpvis vald laktospositiv koloni med morfologi typisk för *E. coli* isolerades till hästblodagarplatta (Blodagarbas med 5 % hästblod). Från dessa isolat utfördes sedan typning genom att påvisa PGUA och indol (PI-test, artikelnr 392000, SVA). Endast laktospositiva stammar med typisk kolonimorfologi som är positiv för båda testerna bedömdes som *E. coli*. Dessa isolat frystes in i -70°C (nötserum med 15 % glycerol, SVA) och tinades senare upp för resistensbestämning med mikrodilutionsmetod.

#### *Sammanfattning E. coli-metod*

Rektalsvabb ⇒ MacConkey-agar 37°C 1 dygn  
⇒ kolonier isoleras på hästblodagar 37°C 1 dygn  
⇒ PI-test  
⇒ positiv stam fryses och resistensbestämnes

#### *Enterokocker*

Svabben ströks ut på *SlaBa*-agar (Slanetz-Bartley, OXOID) som inkuberas i 37°C i 48 h. En slumpmässigt vald koloni med rätt kolonimorfologi isolerades på gall-eskulin-agar och hästblodagarplatta (inkuberas 37°C i 24 h). Eskulinpositiva stammar (svarta på gall-eskulin-agar) isolerades till en ny hästblodplatta samt ny gall-eskulin-agar för att undvika mikroocker. Kolonier med typisk enterokockmorfologi som var eskulinpositiva typades till



species med metod enligt Devriese (1993) genom fermentation av mannitol, sorbitol, arabinos, sackaros, ribos, raffinosa och metyl- $\alpha$ -D-glukopyranidos. (Lösning av Lablemcpowder –OXOID- och Pepton –DIFCO-, med tillsats av respektive sockerart). Isolaten frystes i  $-70^{\circ}\text{C}$  (nötserum med 15 % glycerol, SVA) för att senare tas upp till resistensbestämning med mikrodilutionsmetod.

#### *Sammanfattning Enterokock-metod*

Rektalsvabb  $\Rightarrow$  SlaBa-agar  $37^{\circ}\text{C}$  2 dygn  
 $\Rightarrow$  kolonier strykes på gall-esculin-agar + blodplatta  $37^{\circ}\text{C}$  i 1 dygn  
esculinpos  $\Rightarrow$  ny renstrykning gall-esculin-agar + blodplatta  $37^{\circ}\text{C}$  i 1 dygn  
esculinpos  $\Rightarrow$  typning enligt "Metod"  
 $\Rightarrow$  stammen fryses och resistensbestämnes

#### *Stafylokocker*

Provtagningspinnen odlades primärt på nötblodplatta, vilken inkuberades i  $37^{\circ}\text{C}$ . Pinnen fördes även ned i en anrikningsbuljong (TSB-buljong, Tryptone-Soya-broth, OXOID med 10 % NaCl) vilken inkuberas 48 h i  $37^{\circ}\text{C}$  varefter den odlades ut på nötblodagar (inkuberades  $37^{\circ}\text{C}$ ) samt Mannitol-salt-agar (MSA) med och utan tillsats av  $4\ \mu\text{g}$  cefoxitin (inkuberades i  $35^{\circ}\text{C}$ ). Samtliga plattor avlästes efter ett och två dygn, då typiska kolonier isolerades till en ny nötblodplatta och typades till species genom att använda koagulas (kaninplasma, SVA), DN:as (OXOID), maltos och trehalos (Purple agar base DIFCO med tillsats av 1 % maltos resp trehalos), metod enligt Barrow och Feltham (1993). I PCR-metoden för *mecA*-genen (se under Resistensbestämning) ingår även en analys för *nuc*-genen, som är specifik för *S. aureus*.

Stammarna fryses in i  $-70^{\circ}\text{C}$  (nötserum med 15 % glycerol, SVA) och tinas senare upp för resistensbestämning med mikrodilutionsmetod.

#### *Sammanfattning Stafylokock-metod*

Hudsvabb \*  $\Rightarrow$  nötblodplatta  $37^{\circ}\text{C}$  1 + 2 dygn  
 $\Rightarrow$  plocka typiska kolonier, isolera på nötblod

\*  $\Rightarrow$  anrikningsbuljong  $37^{\circ}\text{C}$  2 dygn  
 $\Rightarrow$  nötblod  $37^{\circ}\text{C}$  1 + 2 dygn  
 $\Rightarrow$  MSA-platta med och utan Cefoxitin  $35^{\circ}\text{C}$  1 + 2 dygn  
 $\Rightarrow$  plocka typiska kolonier, isolera nötblod

$\Rightarrow$  Typning enligt "Metod"  
 $\Rightarrow$  stammen fryses och resistensbestämnes

## Resistensbestämning

### *Mikrodilutionsmetod*

Resistensbestämning av samtliga stammar utfördes med ackrediterad mikrodilutionsmetod som följer CLSIs (Clinical and Laboratory Standards Institute) anvisningar. De använda plattorna\* (VetMIC™) tillverkas på SVAs antibiotikaavdelning. Analysen bygger på mikrodilution där antibiotika i tvåstegsspädningar torkats in i brunnarna på mikrotiterplattor. Analysen är kvantitativ och man får ett MIC-värde (minsta inhiberande koncentration) angivet i µg/ml för respektive antibiotikum. De antibiotika och koncentrationer som använts framgår av Tabell 1, 5 och 7.

I korthet sker analysen på följande sätt: En förkultur görs genom att föra ner 3-5 kolonier av stammen i 5 ml Mueller Hinton-buljong (DIFCO) som inkuberas i 37°C i 3-5 timmar. Från denna bakteriekultur överförs 3-10 µl (beroende på species) till 10 ml Mueller Hinton-buljong. I denna nya buljong ska nu bakterierna finnas i en täthet av ca 10<sup>5</sup> CFU/ml. Till varje brunn på mikrotiterplattan sätts 50 µl av bakterielösningen. Stammens renhet kontrolleras genom att man även inokulerar ca 10 µl till en blodplatta som inkuberas tillsammans med mikrotiterplattan. För att kontrollera att tätheten i inokulaten är lagom (ca 10<sup>5</sup> CFU/ml) görs en bakterieräkning per analysomgång genom att 10 µl av arbetslösningen överförs till 10 ml Mueller Hinton, varifrån 100 µl odlas ut på en blodagarplatta. Efter inkubering skall det växa 10 – 50 bakterier på denna platta.

Avläsningen sker efter 16 till 18 timmars inkubering i 37°C (för plattorna med endast oxacillin och cefoxitin sker inkuberingen i 35°C i 48 timmar med avläsning efter både 24 och 48 timmar). Växt i en brunn bedöms som att bakterien inte hämmas av den aktuella substansen i den koncentrationen. Första brunnen utan växt räknas som den lägsta koncentration där bakterien hämmas och anges som MIC-värde för den stammen.

För stafylokockerna utfördes dessutom β-laktamastest med nitrocefinlapp (BioDisk) på samtliga stammar. Nitrocefinlappen placerades i den brunn med högsta koncentration av oxacillin där stafylokocken växte och inkuberades i 30 minuter i 37 °C varefter den avlästes.

### *Tolkningskriterier*

Med mikrodilutionsmetoden erhålls direkt MIC-värden (minsta inhiberande koncentration) för varje antibiotikum. Bakterier kategoriseras i resistenta och känsliga för respektive antibiotika baserat på så kallade mikrobiologiska brytpunkter (MIC-värde i mg/L) som anger skiljelinjen mellan den population som anses ha förvärvat resistens och den som anses känslig (wild-type) för varje bakteriespecies. De brytpunkter som använts för *E. coli* och Enterokocker i denna studie är de samma som används i SVARM och de bygger i huvudsak på referensvärden från EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) vilka finns tillgängliga på [http://www.escmid.org/sites/index\\_f.aspx?par=2.4](http://www.escmid.org/sites/index_f.aspx?par=2.4). För stafylokockerna har i huvudsak de brytpunkter som används på SVA för kliniska isolat från hundar använts. Brytpunkterna åskådliggörs som lodräta linjer i diagrammen över resistens för respektive bakterie. (Tabell 1, 5 och 7)

---

\* För enterokocker används plattan "VetMIC™ E-cocci (Art.nr E395100)" samt "Komplement till E-cocci och GN-mo (tidigare produktioner)". För stafylokocker "VetMIC™ GP-mo-A" (Art. nr E395102), "VetMIC™ GP-mo-B" (Art. nr E395106) samt en specialtillverkad platta med oxacillin samt cefoxitin i koncentrationerna 0,12-16 µg/l och för *E. coli* "VetMIC™ GN-mo (version 3)" (Art. nr E395103).

### PCR för *mecA*-gen.

Stafylokokker, oavsett species, med MIC-värden för oxacillin och/eller cefoxitin på > 1 mg/L eller resistens mot tre eller fler antibiotika analyserades med PCR-metod för att påvisa eventuell förekomst av *mecA*-gen. Stammarna analyserades med SVAs ordinarie metod vilken är en modifiering av en metod (Smyth et al. 2001) där man använder två *mecA*-primers (5'-GCA ATC GCT AAA GAA CTA AG samt 5'-GGG ACC AAC ATA ACC TAA TA). Metoden används som beskrivet i artikeln, men med maskinen Progene från Techne samt en förändring i PCR-cykeln. Första cykeln är 94°C i 3 minuter, därefter körs 30 cykler om vardera 94°C i 10 sekunder, 58°C i 20 sekunder och 72°C i 15 sekunder. Den sista cykeln körs 5 minuter i 72°C. Proverna kyls därefter till 4°C till analys. Man har även minskat mängden magnesiumklorid i master mixen, från 5 mM till 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Metoden är från början utprovad för MRSA, men i prover isolerade från djur får man många *S. intermedius*-stammar, vilka gav ospecifika reaktioner innan metoden modifierades.

### Utvidgad resistensundersökning *E. coli*

För en *E. coli*-stam med resistens mot tredje generationens cefalosporiner gjordes en utvidgad resistensundersökning med diskdiffusionsmetod enligt CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Antibiotikalappar innehållande cefotaxim, cefpodoxim och ceftazidim med och utan tillsats av klavulansyra användes. Stammen blev även resistensgenotypad på externt laboratorie.

### Kvalitetskontroll

För varje omgång som resistensbestämdes analyserades även en känd kontrollstam, för *E. coli* ATCC 25922, för *S. aureus* ATCC 29213 och för enterokocker *E. faecalis* ATCC 29212.

För PCR för *mecA* användes *S. aureus* CCUG 35601 som positiv kontroll och Ma 429 (stam från mastitlaboratoriet, SVA) som negativ kontroll.

Kontrollstammar användes även vid samtliga typningar. För stafylokokker användes *S. aureus* CCUG 4151 som positiv kontroll och *S. pulvereri* CCUG 41658 som negativ kontroll.

För enterokocker användes endast positiv kontroll (mikrotiterplatta) *E. faecalis* ATCC 29212.

För *E. coli* användes *E. coli* ATCC 25922 som positiv kontroll och *Klebsiella pneumoniae* 9971 (SVA) som negativ kontroll.

### Statistik

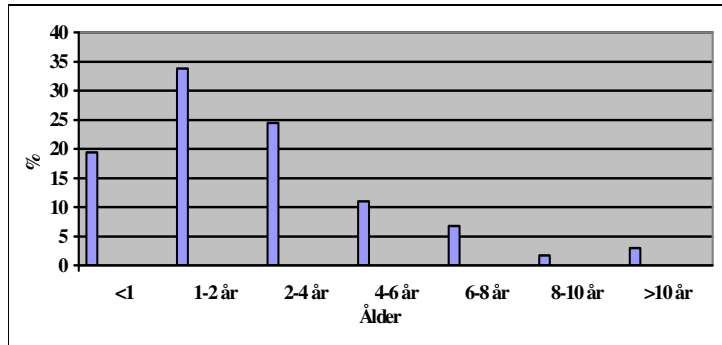
Resultaten presenteras som antal hundar, antal isolat eller procent av antalet hundar respektive isolat. Statistisk analys av skillnader i andelen resistent isolat beroende på hundarnas ålder eller tidigare användning av antibiotika baserades på Chi-2 analys, med  $p > 0.05$  som gräns för statistisk signifikans, samt jämförelse av andelen resistent isolat (%) med 95 % konfidensintervall. Beräkningar utfördes i dataprogrammet Epi Info™ 3.3.2 (Centers for Disease Control and Prevention). Analysen avseende ålder gjordes med hundarna kategoriserade på två sätt; <5 år/≥5 år samt <3 år/≥3 år. För analysen avseende antibiotikabehandling kategoriserades hundarna i tre grupper; Aldrig antibiotikabehandlad eller endast lokalbehandlad / Allmänbehandlad <1 år sedan / Allmänbehandlad ≥ 1 år sedan. I de fall uppgifter för kategorisering saknades uteslöts hunden ur beräkningarna.

Resultaten av provtagningen avseende MRSA utvärderades som högsta möjliga prevalens vid ett negativt utfall av ett givet antal prover (299). Beräkningen utfördes enligt Martin et al. (1992) med en signifikansnivå på 0,95 och med en sensitivitet av 0,6 och en specificitet av 1,0 avseende detektionsmetoden. Beräkningarna gjordes med hjälp av dataprogram tillgängligt via AusVet Animal Health Services, Australien ([www.aus.vet.com](http://www.aus.vet.com)).

## RESULTAT

### Ras- och Åldersfördelning

Totalt provtogs 299 hundar av 126 olika raser. Dvärgschnauzer var den vanligaste rasen med 12 individer. Åldern på de provtagna hundarna redovisas i Figur 1.



Figur 1. Åldersfördelning på hundar i studien, procentuell fördelning (n=299).

### Indikatorbakterier

#### *Escherichia coli*

Totalt isolerades *E. coli* från 257 hundar. Frekvensen resistens och distribution av MIC-värden för respektive antibiotika hos *E. coli* redovisas i Tabell 1.

Frekvensen resistens hos *E. coli* isolerade från hundar som allmänbehandlats med antibiotika senaste året (n=51) var för flera antibiotika högre än för isolat från de hundar som aldrig behandlats/enda behandlats lokalt (n=154) (Tabell 2). Skillnaden var statistiskt signifikant avseende ampicillin och sulfametoxazole men inte för övriga antibiotika. Värden för fyra antibiotika redovisas i Tabell 2. För de hundar som behandlats för över ett år sedan (n=52) fanns inte samma samband med ökad frekvens resistens.

Ingen skillnad i frekvens resistens hos *E. coli* kunde påvisas mellan äldre (5 år eller äldre) och yngre (under 5 år) hundar och inte heller mellan hundar äldre eller yngre än tre år.

Hos en av de isolerade *E. coli*-stammarna påvisades resistens mot cefotaxim (MIC >2mg/L). Utvidgad resistensundersökning påvisade även resistens mot cefalosporinerna cefotaxim, cefpodoxim och ceftazidim. Denna resistens påverkades inte av tillsats av klavulansyra. Vid resistensgenotypning på externt laboratorie påvisades en hyperproduktion av AmpC.

Tabell 1. Resistens(%) hos *Escherichia coli* och distribution av MIC (n= 257).

Substans	Resis- tens (%)	Distribution (%) av MIC <sup>a</sup> (mg/L)																				
		≤0.008	0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	>2048	
Ampicillin	5						0.4	1.2	21.4	69.6	1.6	0.4			5.4							
Cefotaxime	<1				48.6	49.8	1.2					0.4										
Ceftiofur	<1					1.9	27.6	65.0	5.1		0.4											
Kloramfenikol	<1								0.8	1.6	59.1	37.0	0.8	0.4			0.4					
Ciprofloxacin	2	1.2	3.9	28.4	64.6		0.4	1.2				0.4										
Florfenikol	0										25.3	71.6	3.1									
Gentamicin	0							26.1	67.7	5.8	0.4											
Kanamycin	1									30.0	61.1	6.6	1.2	1.2								
Nalidixan syra	2							0.8	30.0	65.0	2.3											
Streptomycin	6									0.8	33.5	53.3	5.4	0.8	1.6	1.9	1.2	1.6				
Sulfamethoxazole	6												19.5	32.7	34.6	6.6		0.4				6.2
Tetracyklin	2								10.1	86.8	0.8				0.8	1.6						
Trimetoprim	4					7.0	45.5	38.1	5.4				0.4	3.5								

<sup>a</sup> Vita fält anger det testade koncentrationsintervallet. MIC högre än testat koncentrationsintervall anges som värdet närmast över testat intervall. MIC lika med eller lägre än testat intervall anges som den lägsta testade koncentrationen. Brytpunkter för resistens anges med lodräta streck.

Tabell 2 Resistens (%) hos *Escherichia coli* från icke-antibiotikabehandlade eller lokalbehandlade hundar (n=154), från hundar behandlade för mer än ett år sedan (n=52) och från hundar allmänbehandlade med antibiotika senast året (n = 51). Konfidensintervall (95 %) anges inom parentes. Signifikanta skillnader fetmarkerade.

Antibiotika	Resistens (%)		
	Ej behandlad	Behandlad > 1 år sedan	Behandlad < 1 år sedan
<b>Ampicillin</b>	<b>2,6</b> (0,7–6,5)	3,8 (0,5-13,2)	<b>15,7</b> (7,0–28,6)
<b>Sulfamethoxazole</b>	<b>3,2</b> (1,1–7,4)	5,8 (1,2-15,9)	<b>17,6</b> (8,4–30,9)
Tetracyklin	0,6 (0,0–3,6)	1,9 (0,0-10,3)	7,2 (2,2–18,9)
Kloramfenikol	0,0 (0,0–2,4)	0,0 (0,0-6,8)	3,9 (0,5–13,5)

### Enterokocker

I studien isolerades enterokocker från 259 hundar. Av dessa var 52,1 % *E. faecalis*, 11,2 % *E. faecium* och 8,5 % *E. hirae*. Resterande 28,2 % var andra enterokockspecies eller enterokocker som ej kunnat typas med den använda metoden. Fördelningen redovisas i Tabell 3.

Då det finns speciesvariation mellan olika enterokockstammar avseende resistensmönster redovisas enterokockerna både totalt (Tabell 4) och uppdelat på *E. faecalis* (Tabell 5) och *E. faecium* (Tabell 6) vilka är de vanligast förekommande hos hund.

Ingen skillnad i frekvens av resistens hos enterokocker kunde påvisas mellan äldre (5 år eller äldre) och yngre (under 5 år) hundar och inte heller mellan hundar äldre eller yngre än tre år. Inte heller sågs någon skillnad i frekvens resistens beroende på om hunden antibiotikabehandlats eller inte.

Tabell 3 Frekvens av enterokockspecies hos olika djurslag. Siffror för svin och kyckling från SVARM, belgiska hundar från studie av Leener et al. 2005

	Frekvens enterokockspecies			
	Hund (n=259)	Hund, belgisk studie (n=104)	Svin (n=262)	Kyckling (n=306)
<i>E. faecalis</i>	52 %	57 %	21 %	16 %
<i>E. faecium</i>	11 %	14 %	18 %	53 %
<i>E hirae</i>	9 %	12 %	43 %	11 %

Tabell 4 Resistens (%) hos enterokocker.

Antibiotika	Alla species (n=259)	<i>E. faecalis</i> (n=135)	<i>E. faecium</i> (n=29)	<i>E hirae</i> (n=22)
Ampicillin	1.2	0.7	0.0	0.0
Avilamycin	2.3	3.0	0.0	0.0
Bacitracin	1.2	1.5	3.5	0.0
Ciprofloxacin	3.1	0.8	10.3	0.0
Erytromycin	17.0	14.1	27.6	13.6
Flavomycin	NR <sup>a</sup>	1.5	NR	NR
Gentamicin	0.4	0.8	0.0	0.0
Kanamycin	3.5	4.5	3.5	4.6
Kloramfenikol	3.5	6.7	0.0	0.0
Linezolid	0.0	0.0	0	0.0
Narasin	2.3	1.5	6.9	4.6
Neomycin	2.3	3.7	0.0	4.6
Streptomycin	6.6	9.0	0.0	4.6
Tetracycline	25.3	32.1	17.2	13.6
Vancomycin	0.0	0.0	0.0	0.0
Virginiamycin	7.0	0.0	0.0	4.6

<sup>a</sup> Ej relevant eftersom vissa species av enterokocker till sin natur är resistenta mot flavomycin

Tabell 5 Resistens hos *Enterococcus faecalis* och distribution av MIC (n= 135).

Substans	Resis- tens (%)	Distribution (%) av MIC <sup>a</sup> (mg/L)																	
		≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	>2048
Ampicillin	<1				8.9	85.2	4.4	0.7	0.7										
Avilamycin	3					1.5	1.5	38.5	51.9	3.7	3.0								
Bacitracin	2					2.2	3.7	13.3	60.7	16.3	2.2		0.7	0.7					
Ciprofloxacin	<1	0.7		2.2	7.5	66.4	22.4				0.7								
Erytromycin	14				17.8	21.5	21.5	25.2	3.0	3.7	1.5	0.7	5.2						
Flavomycin	2					5.9	25.9	28.1	17.0	16.3	5.2	0.7		0.7					
Gentamicin	<1						4.5	3.7	32.1	56.7	2.2					0.7			
Kanamycin	5									5.2	37.3	50.0	2.2	0.7			0.7		3.7
Kloramfenikol	7					1.5	2.2	23.0	66.7			5.2	1.5						
Linezolid	0				0.7	3.7	93.3	2.2											
Narasin	2		0.7	17.8	57.0	17.0	5.9	1.5											
Neomycin	4									25.2	50.4	17.8	0.7	2.2			3.7		
Streptomycin	9								3.0		3.7	37.3	47.0					9.0	
Tetracyklin	32				50.7	14.9	2.2			1.5	7.5	22.4	0.7						
Vankomycin	0					17.0		62.2	20.7										
Virginiamycin	0				1.5	0.7	3.0	3.7	19.3	52.6	19.3								

<sup>a</sup> Vita fält anger det testade koncentrationsintervallet. MIC högre än testat koncentrationsintervall anges som värdet närmast över testat intervall. MIC lika med eller lägre än testat intervall anges som den lägsta testade koncentrationen. Brytpunkter för resistens anges med lodräta streck.

Tabell 6. Resistens hos *Enterococcus faecium* och distribution av MIC (n= 29).

Substans	Resis- tens (%)	Distribution (%) av MIC <sup>a</sup> (mg/L)																	
		≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	>2048
Ampicillin	0				13.8	13.8	48.3	20.7	3.4										
Avilamycin	0								10.3	55.2	34.5								
Bacitracin	3					3.4	10.3	6.9	6.9	37.9	31.0				3.4				
Ciprofloxacin	10				3.4	17.2	31.0	24.1	13.8	6.9	3.4								
Erytromycin	28				20.7	3.4	27.6	20.7	10.3	10.3	3.4			3.4					
Flavomycin	NR <sup>b</sup>							3.4	3.4					6.9	86.2				
Gentamicin	0							13.8	20.7	55.2	10.3								
Kanamycin	3										3.4	17.2	37.9	31.0	6.9	3.4			
Kloramfenikol	0						3.4	3.4	31.0	62.1									
Linezolid	0						13.8	44.8	41.4										
Narasin	7				10.3	10.3	55.2	17.2	3.4		3.4								
Neomycin	0										100.0								
Streptomycin	0								3.4	6.9	27.6	55.2	6.9						
Tetracycline	17				79.3	3.4						6.9	10.3						
Vankomycin	0						86.2	6.9	6.9										
Virginiamycin	0				20.7	27.6	6.9	44.8											

<sup>a</sup> Vita fält anger det testade koncentrationsintervallet. MIC högre än testat koncentrationsintervall anges som värdet närmast över testat intervall. MIC lika med eller lägre än testat intervall anges som den lägsta testade koncentrationen. Brytpunkter för resistens anges med lodräta streck; <sup>b</sup> Ej relevant eftersom *E. faecium* till sin natur är resistent mot flavomycin.

## Stafylokokker

Stafylokokker isolerades från 220 av de 299 hundarna. Fyra isolat var *S. aureus*, 135 *S. intermedius*, 13 *S. schleiferi* subsp *coagulans* och övriga KNS.

### *Staphylococcus aureus*

Från fyra hundar isolerades *S. aureus*. Inte något av dessa isolat uppvisade någon resistens mot oxacillin eller cefoxitin. En av dem var  $\beta$ -laktamasnegativ, de övriga tre positiva. Inga MRSA påvisades och ingen *S. aureus* hade resistens mot mer än ett av de antibiotika som testades (se Tabell 7 för specificering)

### *Staphylococcus intermedius*

Denna bakterie påvisades hos 135 hundar. Av dessa isolerades 113 stammar från primärplatta, 22 från MSA struken från TSB-buljong med 10 % NaCl, men inga från MSA med cefoxitintillsats. Distributionen av MIC-värden för *S. intermedius* redovisas i Tabell 7.

Ingen skillnad i frekvens av resistens hos *S. intermedius* kunde påvisas mellan äldre (5 år eller äldre) och yngre (under 5 år) hundar och inte heller mellan hundar äldre eller yngre än tre år. Inte heller sågs någon skillnad i frekvens resistens beroende på om hunden antibiotikabehandlats eller inte.

En av de *S. intermedius* som isolerades var resistent mot erytromycin, klindamycin, kloramfenikol, fusidinsyra och hade ett MIC-värde för oxacillin på 1 mg/L (brytpunkten för resistens är > 1 mg/L). Vid PCR-analys påvisades *mecA*-genen.

De 21 isolat som hade ett MIC-värde för oxacillin eller cefoxitin > 1 mg/L analyserades med PCR för *mecA*-genen. Samtliga isolat var negativa.

### ***Staphylococcus schleiferi subsp coagulans***

13 isolat (från 13 olika hundar) av *S schleiferi subsp coagulans* isolerades. Sex av dessa uppvisade inte någon resistens mot de antibiotika som testades. Tre isolat var resistent mot erytromycin, klindamycin och kloramfenikol, två av dessa isolat hade även ytterligare resistens (mot neomycin respektive neomycin och fusidinsyra). Fyra isolat var resistent mot endast ett antibiotikum (oxacillin, tetracyklin, fusidinsyra respektive neomycin). Isolatet resistent mot oxacillin (2 mg/L) analyserades med PCR för *mecA*-genen och var negativt.

Tabell 7 Resistens hos *Staphylococcus intermedius* och distribution av MIC. Data avseende kliniska isolat från hundar från SVARM 2005 medtagna som jämförelse.

Substans	Resistens (%)		Distribution (%) av MIC <sup>a</sup> (mg/L)														
	2006 (Antal isolat)	SVARM 2005 n=126	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Avilamycin	0 (90)	-						3.3	61.1	33.3	2.2						
Cefalothin	0 (134)	1			95.5	3.0	1.5										
Cefoxitin	0 (104)	-				15.4	75.0	6.7	1.0	1.9							
Enrofloxacin	3 (134)	3			60.4	35.1	1.5	2.2			0.7						
Erythromycin	14 (134)	22				49.3	36.6							14.2			
Fucidin	19 (134)	25		1.5	33.6	42.5	3.0		3.0	1.5	3.0	11.9					
Gentamicin	0 (134)	1					99.3	0.7									
Klindamycin	11 (133)	18				83.5	2.3	2.3	0.8	0.8			0.8	9.8			
Kloramfenikol	3 (134)	-								85.1	11.9			3.0			
Neomycin	19 (134)	-						81.3		3.7	11.9	3.0					
Oxacillin 2 % NaCl	1 <sup>e</sup> (134)	1 <sup>c</sup>				4.5	25.4	56.0	12.7	1.5							
Oxitetracyklin	32 (134)	31					67.2	0.7					23.1	9.0			
Penicillin <sup>b</sup>	82 (134)	84															
Streptomycin	19 (90)	28							43.8	37.1				2.2	9.0	7.9	
Trimethoprim	2 (134)	6 <sup>d</sup>							11.9	61.9	20.1	3.7		2.2			
Vancomycin	0 (90)	-						92.2	7.8								
Virginiamycin	0 (92)	-				2.2	83.7	12.0	2.2								

<sup>a</sup> Vita fält anger det testade koncentrationsintervallet. MIC högre än testat koncentrationsintervall anges som värdet närmast över testat intervall. MIC lika med eller lägre än testat intervall anges som den lägsta testade koncentrationen. Brytpunkter för resistens anges med lodräta streck; <sup>b</sup> Andel resistens baserad på betalaktamasproduktion; <sup>c</sup> Testat utan NaCl, ej konfirmerad med PCR; <sup>d</sup> Trimethoprim/sulfa, testat i koncentrationsratio 1/20 (trimethoprim/sulphametoxazole); <sup>e</sup> Samtliga isolat med MIC >1mg/L testade med PCR och var negativa avseende *mecA*



## DISKUSSION

### Indikatorbakterier

Överlag sågs en låg förekomst av resistens hos indikatorbakterierna, *E. coli* och enterokocker. I SVARM har resistensbestämning avseende indikatorbakterier gjorts årligen på lantbrukets djur sedan år 2000. I samtliga studier har resistensen överlag legat lågt men en viss ökning av frekvensen resistens ses för de antibiotika som använts mycket (ampicillin, streptomycin, sulfonamider, tetracyklin och trimetoprim för *E. coli* samt tetracyklin och makrolider hos enterokocker). Resistens mot dessa substanser sågs även hos bakterier isolerade från hund. Trots en ökad användning av fluorokinoloner är frekvensen resistens mot ciprofloxacin förhållandevis ovanlig.

I den finska studien (Rantala et al. 2004) påvisades en högre förekomst av resistent *E. coli* i gruppen med hundar som behandlats för pyodermi jämfört med de friska hundarna. För enterokockerna sågs inte denna skillnad. Även en åldersskillnad kunde påvisas, yngre hundar hade mer multiresistenta stammar än äldre hundar avseende stafylokocker, däremot gällde det omvända för *E. coli*. En signifikant skillnad kunde dock bara påvisas för enstaka preparat. Denna åldersskillnad kunde inte påvisas i detta material

### *E. coli*

Att ampicillin och sulfametoxazole hade signifikant högre resistens hos bakterier isolerade från hundar som antibiotikabehandlats senaste året är intressant. Framförallt ampicillin förskrivs i hög grad till hundar. Det är även intressant att se att hos hundar som antibiotikabehandlats för *mer* än ett år sedan är denna effekt inte lika markant. Naturligtvis finns en möjlighet att det inte enbart är antibiotikabehandlingen i sig som påverkar resistensen, utan att även andra faktorer spelar in. Men det är en trend som ses för flera antibiotika varför det ligger nära till hands att anta att det är en styrning mot resistens på grund av antibiotikaanvändning. I en studie gjord 2003 (Hagman & Greko 2005) har *E. coli* isolerats från tikar med pyometra vilka kan anses vara en slags indikatorbakterie då infektionen oftast inte föregåtts av någon antibiotikabehandling. En signifikant ökning i frekvensen resistens påvisades mellan dessa stammar och stammar isolerade från urinprover från kroniska UVier. Resistensfrekvensen för *E. coli* isolerade från tikar med pyometra i Hagmans material stämmer ganska väl med siffrorna för de friska hundarna, endast ampicillin avviker med en frekvens på 10 % mot 5 % i denna studie. Frekvensen resistens är även jämfört med motsvarande studier (NORM, 2004, Rantala et al. 2004) likvärdig eller något lägre. Rantalas studie har bara fyra antibiotika angivna, men en jämförelse ses i Tabell 8.

Tabell 8 Jämförelse över frekvensen resistens (%) avseende *E. coli* isolerad från friska svenska (denna studie), norska (NORM 2004) och finska (Rantala et al. 2004) hundar.

Antibiotika	Resistens (%)		
	Sverige (n=257)	Norge (n=68)	Finland (n=74)
Ampicillin	5	9	10
Sulfametoxazole <sup>a</sup>	6	9	6
Tetracyklin	2	3	9
Streptomycin	6	14	10
Kloramfenikol	0,8	0	
Trimetoprim	4	6	

<sup>a</sup> För finska hundar testad som trimetoprim-sulfa

Ett isolat av *E. coli* med resistens mot tredje generationens cefalosporin påvisades för första gången hos hund i Sverige. Cefalosporiner indelas i olika generationer som har olika antibakteriellt spektrum. Tredje generationens cefalosporiner (cefotaxim, ceftazidim, cefpodoxim m.fl) utvecklades i början av 1980-talet. De har behandlingsmässiga fördelar genom att vara mindre nefrotoxiska än t.ex aminoglykosider som i övrigt har liknande spektrum för användning (May et al. 2005). Det aktuella isolatets resistensgenotyp bestämdes på ett externt laboratorium (European Union Centrum Reference Laboratory i Köpenhamn). Resistensen visade sig bero på en uppreglering/hyperproduktion av AmpC, ett kromosomalt cefalosporinas, som förekommer hos *E. coli*. Många bakteriearter har denna gen. Produktionen av betalaktamas är normalt undertryckt av en suppressorgen vilket leder till att ingen resistenseffekt uppnås. Hos vissa stammar är suppressorgen inaktiverad p.g.a. en punktmutation – troligen orsaken i det här fallet – varvid en s.k hyperproduktion av betalaktamas sker (Batchelor, Threlfall et al. 2005). Denna typ av resistens är normalt inte överförbar annat än vid celledning. Genen har dock etablerat sig även i plasmidform, det finns exempel på salmonellastammar i USA som bär på en plasmidform av AmpC som ursprungligen kommer från *Citrobacter freundii*.

Ett problem som aktualiserats i humanmedicinen i Sverige under hösten 2006 är ESBL, Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases, gramnegativa bakterier med resistens mot  $\beta$ -laktamantibiotika, t.ex. penicillin och samtliga cefalosporiner. ESBL kan liksom MRSA spridas inom sjukhus och orsaka stora problem just på grund av att de är så svårbehandlade. Ett stort problem både inom animalieproduktionen och som zoonos är de salmonellastammar som har ESBL (Arlet et al. 2006). Enstaka fall har påvisats hos friska nötkreatur i bland annat Wales (Teale et al. 2005) och Storbritannien (Batchelor, Clifton-Hadley et al. 2005). Övervakningen och smittspårningen av dessa är en ny utmaning för sjukvården och att ha hittat en stam hos hund som bär denna egenskap är mycket intressant och värdet av detta får utredas vidare, huruvida någon fortsatt screening skall ske framöver och isåfall i vilken form.

### *Enterokocker*

Ingen behandlingsberoende skillnad i frekvensen resistens kunde påvisas för enterokocker. Jämfört med frekvensen i NORM (2004) är resistensen likvärdig avseende såväl *E. faecalis* som *E. faecium*. Det som ser ut att avvika mest är tetracyclin för *E. faecium* som är högre (42 % jämfört med 17 %) i det norska materialet, men då det är så få stammar (n=12) i NORM blir konfidensintervallet så stort att en eventuell signifikans inte kan avgöras. I Rantalas (2004) studie anges resistensen för enterokocker endast för ampicillin och den var mellan 4 och 7 %. Förekomsten av resistens hos enterokocker var lägre än i en belgisk studie (De Leener et al., 2005). Endast erytromycin (17 % i denna jmf med 26 % hos De Leener), tetracyclin (25 % jmf med 41 %) och kloramfenikol (3,5 % jmf med 11 %) finns med i båda studierna

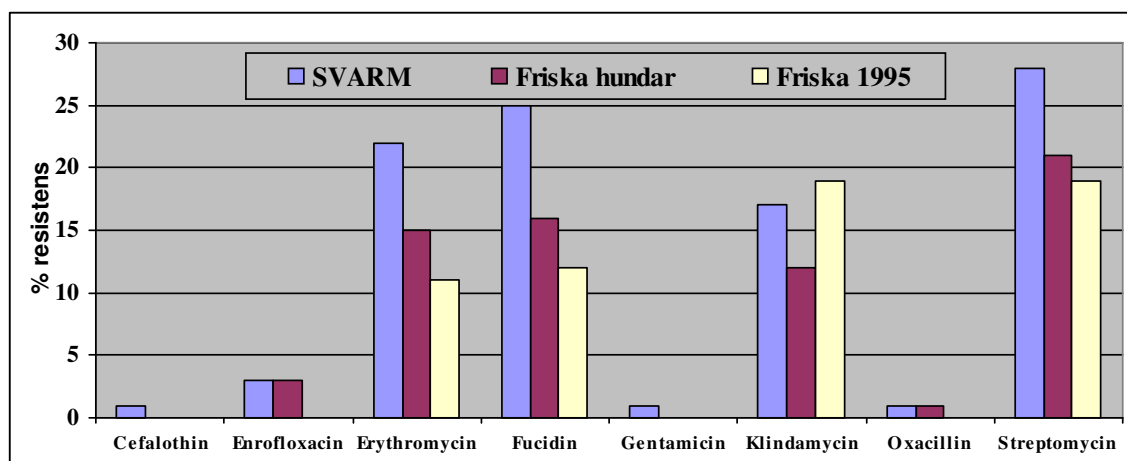
Fördelningen av vilka enterokockspecies som koloniserar hund skiljer sig från den hos grisar (SVARM 2005) och hos slaktkyckling (SVARM 2004). Detta tyder på att det finns en djurslagsskillnad i vilka typer av enterokocker som koloniserar tarmen. Under de 4 år grisar har undersökts i SVARM (2000, 2001, 2003 och 2005) har fördelningen varit relativt stabil, liksom fallet är för slaktkycklingar. De Leener et al. (2005) visade i sin studie en förekomst hos belgiska hundar som stämmer ganska väl med fördelningen i denna studie. För procentuell jämförelse se Tabell 3.

## Stafylokokker

Stafylokokker påvisades i 220 av perineumproverna. I övriga prover växte inga bakterier alls eller en överväxt av faecesflora (proteus, andra gramnegativa bakterier eller streptokocker). *Staphylococcus aureus* påvisades hos endast fyra hundar. Oftast koloniserar hundar inte av denna bakterie (Loeffler et al. 2005), det låga antalet stämmer bra överens med detta faktum. Däremot kan hundar infekteras med *S. aureus*, det är alltså en bakterie som förekommer hos hund men som inte hör till deras normalflora.

Hundens motsvarighet till människans *S. aureus* är *Staphylococcus intermedius*. Jag valde att fokusera på *S. intermedius* i arbetet, då de fyra *S. aureus*-stammarna är ett för litet underlag att statistiskt beräkna några resultat på. De koagulasnegativa stafylokockerna (KNS) är en mycket heterogen grupp och då de inte är typade till species blir det omöjligt att dra några slutsatser av det materialet inom ramen för detta arbete.

Förekomsten av resistens hos *S. intermedius* isolerade från friska hundar är överlag lägre än hos kliniska isolat presenterade i SVARM (Figur 2). Proverna där är inte specificerade men materialet utgörs troligen till stor del av antibiotikabehandlade hundar. För penicillin är resistensen i princip likvärdig baserad på betalaktamasproduktion (82 respektive 84 %). Detta faktum kan jämföras med de resultat som visades i den svenska studien från 1995 (Holm et al. 2002) där man påvisade högre frekvens resistens hos *S. intermedius* isolerade från hundar med recidiverande pyodermi jämfört med hundar med en förstagångspyodermi. Resultaten för stafylokokker isolerade från friska hundar i Holms studie (som utgjordes av *S. intermedius* -84 %- samt övriga koagulaspositiva species) användes som jämförelse avseende eventuell resistensutveckling mellan 1995 och 2006. Frekvensen resistens hos stafylokokker från friska hundar har ökat för de flesta antibiotika under den senaste tio-årsperioden. (Figur 2). I materialet från 1995 ingick endast 26 hundar varför man får vara lite försiktig med slutsatser om eventuella trender.



Figur 2 Resistens (%) hos *Staphylococcus intermedius* isolerade från hundar i föreliggande studie ("Friska hundar", n=134) jämfört med kliniska isolat från SVARM 2005 ("SVARM", n=126) och friska hundar i Sverige 1995 (Holm et al. 2002, "Friska 1995", n=26).

Inga MRSA påvisades i denna studie, däremot ett isolat av MRSI (meticillinresistent *S. intermedius*). Detta är den första MRSI-stammen isolerad från en hund i Sverige, dessutom en frisk hund som kan räknas som bärare eller koloniserad. I en studie från Slovenien (Vengust M et al. 2006) har man för första gången påvisat MRSI hos tre (av 299) kliniskt friska hundar.

Dessutom har sju fall av MRSI konfirmerats i kliniska prover från svenska hundar under senaste året (Ulrika Grönlund-Andersson, SVA, personligt meddelande). Det är alltså ett reellt problem att stafylokocker med *mecA*-genen finns i den svenska hundpopulationen. I flera utländska studier (Kania et al., 2004; Gortel et al. 2004) har man isolerat MRSI från hundar med pyodermi. Det stora problemet med MRSI är att det är stafylokocker som är anpassade till att kolonisera och infektera hundar. Om man får en stor spridning av *mecA*-genen bland bakterier som orsakar hudinfektioner får veterinärkåren ett stort problem. Det finns idag egentligen endast fem substanser i FASS-Vet för behandling av pyodermi; cefalosporiner, amoxicillin-klavulansyra, klindamycin, tetracyklin, kinoloner och i viss mån penicillin. Om den stammen som är isolerad i detta material sprids (resistent mot betalaktamantibiotika, klindamycin och fusidinsyra) så finns endast tetracyklin och kinoloner kvar som behandlingsalternativ, båda substanser med stor tendens till snabb resistensutveckling.

Om man extrapolerar resultaten i studien - inga påvisade MRSA hos 299 undersökta hundar - till att gälla hela hundpopulationen kan man med 95 % säkerhet säga att prevalensen MRSA-bärare i den friska svenska hundpopulationen är mindre än 1,7 % förutsatt att man antar en sensitivitet på detektionsmetoden (odling och konfirmering) på 0.6. Detta är beräknat via en metod utvecklad av Martin et al. (1992 *Prev Vet Med*, **14**: 33-43) erhållen från [www.ausvet.com](http://www.ausvet.com). Den förhållandevis låga förekomsten av MRSA bland svenska hundar beror troligen på att vi har så låg prevalens bland människor i samhället, då det ofta är en smitta från människa till hund (Weese 2005).

Under senhösten 2006 har de två första fallen av MRSA konfirmerats från hund i Sverige (Franklin et al. 2006). Sverige har med tanke på sitt goda resistensläge försökt bekämpa spridningen av MRSA inom humansjukvården med övervakning, screeningprogram och god hygien. Det är oklart vilka åtgärder som förväntas av veterinärmedicinen nu när MRSA påvisats hos hund. Men att fortsätta övervakningen är en viktig del i processen. Som kliniker är det viktigt att vara uppmärksam på och ta prover från hundar med infektioner, framförallt sådana som är svårärläka.

### **Material**

Proverna togs på hundutställningar eftersom det var "friska" hundar, representativa för den normala populationen i Sverige som skulle undersökas. Hundar är i de allra flesta fall friska på utställningsdagen och ska då inte stå på någon behandling. Risken att de kommer till en utställning med hudproblem är ganska liten. Dessutom kan man ta många prover på en och samma dag till skillnad mot om de skulle tas på en djurklinik eller motsvarande. Detta var en förutsättning för att förenkla logistiken. Om proverna hade samlats in på djurklinik skulle hundarna förmodligen ha varit sjuka eller under behandling i större utsträckning än vad man förväntar sig av medelpopulationen. Med tanke på tidigare publicerade studier (Loeffler et al., 2005) finns även risken att det finns resistent bakterier i miljön på en djurklinik som skulle kunna påverka resultatet. Om proverna skulle ha tagits på hundar som bara kom för vaccinationer skulle man dock kunna komma runt det problemet, men då kvarstår problemet med att ta tillräckligt många prov åt gången.

Eftersom det primära målet i denna studie var att se vilka stafylokocker som normalt finns på huden och *om någon av dessa* var MRSA togs proverna för isolering av stafylokocker från perineum. I flera studier (Holm et al. 2002; Rantala et al. 2004) har det visats att det är en lokalisering där man har stor chans att hitta stafylokocker. Holm et al. (2002) hänvisar dessutom till en opublicerad studie av Bjurström, L som isolerade stafylokocker från 16 av 26 prover tagna från perinealregionen men bara i sju av 26 prover från ljumsk- och axillområdet. Även för att undvika att få med stafylokocker, kanske främst *S. aureus*, som ägarna eller andra människor råkat placera på hunden är perineum en bra ställe att ta prov från. När man klappar om eller kelar med sin hund är det främst i huvudregionen eller på kroppen man rör hunden, sällan i området under svansen.

I andra studier med specifik avsikt att påvisa MRSA har förutom från perineum prover också tagits från nos- och munslemhinna (Loeffler et al. 2005; O'Mahony et al. 2005).

Det finns en viss skevhet i materialet jämfört med hur hundpopulationen i Sverige ser ut. De vanligaste raserna i Sverige är schäfer, golden retriever och tax, men i detta material var dvärgschnauzer, kungspudel, labrador och golden retriever de mest provtagna, representerade med 10 eller fler exemplar av varje ras. Totalt provtogs 126 raser, 63 av dem representerade av enda individ, så det är inte möjligt att göra en rasfördelning över resistensen. Det finns en predisposition för vissa sjukdomar hos vissa raser. Hundraser med predisposition för hudproblem skulle kunna vara mer antibiotikabehandlade än genomsnittet. En mycket avvikande rasfördelning i studiematerialet jämfört med medelpopulationen skulle alltså kunna ge icke-extrapolerbara resultat. Betydelsen av detta för de statistiska beräkningarna bör dock inte vara så stor då knappt 1/3 av hundarna i studien (73/299) var behandlade med antibiotika senaste året, om man räknar in både allmän och lokal behandling. Detta stämmer relativt väl med den siffra på 318 antibiotikarecept per 1000 svenska hundar som beräknats i SVARM (2005).

Det är en övervikt av unga hundar i studien, 88 % av hundarna är 6 år eller yngre. Dessutom saknas valpar yngre än 5-6 månader. Det är vanligare att man åker på utställningar med yngre hundar än med äldre. Fördelningen är trots detta ganska representativ då beräknade livslängden för en hund är 10 – 12 år (lägre för de stora raserna) och även om många individer blir mycket äldre än 12 år så stämmer det nog ganska väl med populationen i stort. Medelåldern på hundarna i materialet var lite drygt tre år.

## KONKLUSION

Frekvensen resistens hos stafylokocker är på gränsen till oroande då över 80 procent är betalaktamasproducerande och därmed resistent mot penicillin. Närmare var tredje frisk hund har *S. intermedius* resistent mot tetracyklin medan var femte har stammar med resistens mot streptomycin och var sjätte stammar med resistens mot erytromycin och fusidinsyra. De två senare substansgrupper är frekvent använda och har ett relativt smalt spektrum. Om man i framtiden inte längre kan använda dessa som "drug of choice" betyder det att man istället kan komma att använda mer fluorokinoloner eller övriga bredspektrumantibiotika som vid användning snabbt ger en resistensutveckling.

Den första MRSA-stammen har i denna studie isolerats från en frisk svensk hund. Inga MRSA har däremot påvisats och det är få hundar som bär *S. aureus*. En *E. coli* med misstänkt hyperproduktion av betalaktamas har också isolerats för första gången från hund i Sverige.

Hos *E. coli* och enterokocker ses samma höga förekomst av resistens mot erytromycin och tetracyclin som påvisats hos lantbruksdjuren, men i övrigt är frekvensen låg. En högre frekvens ses hos de hundar som antibiotikabehandlats senaste året, jämfört med de hundar som inte är behandlade eller där behandlingen skett för mer än ett år sedan.

Det är första gången ett så stort material av friska hundar undersöks avseende resistens, varför resultaten i denna studie kan användas som utgångsvärde för framtida resistensövervakning.

Med dessa fakta sammantagna är det viktigt med en fortsatt resistensövervakning av bakterier isolerade från hundar och att misstänkta infektioner verifieras med en odling och resistensbestämning. Därmed kan behandlingen optimeras och antibiotikaförbrukningen minskas.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Arlet, G., Barrett, T.J et al. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology (Microbes and Infection xx, 2006, sid 1-10)
- Batchelor M., Clifton-Hadley F.A et al. Detection of Multiple Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* from a Cattle Fecal Sample in Great Britain (Microbial Drug Resistance Vol 11, Nr 1, 2005 sid 58-61)
- Batchelor M., Threlfall E.J. and Liebana E. Cephalosporin resistance among animal-associated *Enterobacteria*: a current perspective (Expert Rev. Anti Infect. Ther. 3 (3) 2005 sid 403-417)
- Barrow, G.I. & Feltham, R.K.A. Cowan and Steele's manual for the Identification of Medical Bacteria. (3<sup>rd</sup> edn. Cambridge, Cambridge University Press 1993)
- De Leener, E., Decostere A. et al. Presence and Mechanism of Antimicrobial Resistance among Enterococci from Dogs and Cats (Microbial Drug Resistance Vol 11 Nr 4, 2005, sid 395-403)
- Devriese, L.A., Pot, B. and Collins, M.D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. )Journal of Applied Bacteriology 1993, vol 75 sid 399-408.)
- Franklin, A. Greko, C., Grönlund Andresson, U., Bengtsson, B. MRSA – nu också hos svenska hundar (Svensk Veterinärtidning nr 15 2006 sid 31-34)
- Gortel, K et al. Methicillin-resistance among staphylococci isolated from dogs (AJVR, Vol 60, No. 12, dec 2004 1526-1530)
- Guardabassi, L Schwarz, S and Lloyd D H Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria (Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004; 54 (2); 321-332)
- Hagman, R. Greko, C. Antimicrobial resistanse in *Escherichia coli* isolated from bitches with pyometra and from urine samples from other dogs. (Veterinary Record 2005, nr 157 sid 193-197)
- Hoekstra, K.A. and Paulton R.J.L. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staph. intermedius* in dogs (Journal of Applied Microbiology; Vol 93; sept 2002, p 406)
- Holm B.R., Petersson U, et al. Antimicrobial resistance in staphylococci from canine pyoderma: a prospective study of first-time and resurrent cases in Sweden (Veterinary Record (2002) 151, 600-605)
- Kania, S.A., Williamson, N.L et al. Methicillin-resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma (Am Journal of Veterinary Research, Vol 65, Nr 9, sept 2004, s 1265-1267)
- Lee, J H Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans (Applied and Environmental Microbiology; Nov 2003; 6489-6494)
- Loeffler, A., Boag A.K., Sung, J. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small referral hospital in the UK. (Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2005; 56: 692-697)
- Malik, S Peng, H and Barton M.D. A Review: Antibiotic resistance in staphylococci associated with cats and dogs (Journal of Applied Microbiology; Vol 99; p01283, Dec 2005)
- Malik, S., Peng, H. and Barton, M.D. Partial Nucleotide Sequencing of the *mecA* Genes of *Staphylococcus aureus* Isolates from Cats and Dogs. (Journal of Clinical Microbiology, Feb 2006, p 413-416)

- Malik, S., Coombs, G.W, O'Brien, F.G et al. Molecular typing of methicillin-resistant staphylococci isolated from cats and dogs. (Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006; 58; 428-431)
- Martin, S., Shoukri, M. and Thorburn, M.A. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. (Preventive Veterinary Medicine, 1992,14; 33-43.
- NORM/NORM-VET 2004 Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. ISSN 1502-2307 www.vetinst.no
- Okuma, K., Iwakawa, K., Turnidge, J.D. et al. Dissemination of New Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in the Community (Journal of Clinical Microbiology 2002 November; 40(11): 4289–4294)
- O'Mahony, R., Abbott, Y., Leonard, F.C et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland (Veterinary Microbiology; Vol 109, Issues 3-4, 30 aug 2005; 285-296)
- O'Rourke, K Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, An emerging problem in horses? (AVMA Journals Home Nov 15, 2003)
- Paterson, D.L. och Bonomo R.A Extended-Spectrum  $\beta$ -Laktamases: a Clinical Update (Clinical Microbiology Reviews, Oct 2005, p 657-686)
- Rantala, M, Lahti, E et al. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. In dogs given antibiotics for chronic dermatological disorders, compared with non-treated control dogs (Acta vet. Scand. 2004, 45, 37-45)
- Smyth R.W., Kahlmeter G. et al. Methods for identifying methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (Journal of Hospital Infection, 2001, 48: 103-107)
- Strommenger, B., Kehrenberg C., Kettlitz, C. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. (Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006; 57; 461-465)
- SVARM/SWEDRES (2002) Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring www.sva.se
- Teale C.J., Barker L. et al. Extended-spectrum beta-lactamase detected in *E. coli* recovered from calves in Wales (Letters, The Veterinary Records, February 5, 2005)
- van Duijkeren, E., Box, A.T.A et al. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals (Veterinary Microbiology; Vol 103, Issues 1-2; 5 oct 2004, 91-97)
- van den Bogaard, A.E. och Stobberingh, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans (International Journal of Antimicrobial Agents 2000; 14; sid 327-335)
- Vengust M., Anderson M.E.C., et al. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community (Letters in Applied Microbiology 43 (2006) 602-606)
- Weese, S.J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An Emerging Pathogen in Small Animals (Journal of the American Animal Hospital Association 2005; 41; 150-157)
- Zetola, N., Francis, J.S, Nuernberger, E.L and Bishai, W.R Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat (Lancet Infectious Diseases 2005; 5: 275-286)



## BILAGA 1: MRSA – ETT PROBLEM SOM KRYPER NÄRMARE

Meticillinresistenta *Staphylococcus aureus* (MRSA) är ett stort problem inom humansjukvården. Det är stafylokocker som är resistent mot alla betalaktamantibiotika (t.ex penicillin, cefalosporiner) och ofta är resistent även mot många andra substansgrupper. Resistensen beror på att bakterien bär den så kallade *mecA*-genen, en gen som kodar för ett förändrat penicillinbindande protein (PBP2a). PBP är ett ytprotein på stafylokocken som penicillin binder in till och därigenom kan utöva sin effekt. När det är förändrat, som hos MRSA-stammar, blir affiniteten sämre och penicillinet är inte längre effektivt, resistens uppkommer. Bakterien i sig är vanligtvis inte mer aggressiv än ”vanliga” *S. aureus* men på grund av att den är så resistent blir den svårbehandlad och kan därför ge upphov till mycket allvarliga infektioner. I flera artiklar (Zetola et al. 2005; Okuma et al. 2002) diskuteras dock en ny, ”aggressivare”, samhällsförvärd variant av MRSA (community acquired, CA-MRSA) som förutom att vara resistent även är mer patogen än ”vanliga” MRSA-stammarna (hospital acquired, HA-MRSA), angriper friska unga människor och orsakar bl.a. suppurativa hudinfektioner och nekrotiserande pneumonier. Människor koloniserar lätt av *S. aureus* och MRSA är inget undantag. Personer runt den smittade/koloniserade blir lätt smittade. Det är denna egenskap som gör den så fruktad, då den lätt kan spridas mellan patienter på sjukhus via personalen.

Meticillin började användas i humanmedicinen 1959 och första Meticillinresistenta *Staphylococcus aureus*-stammen isolerades 1961 (Lee 2003; Zetola et al. 2005). I flera undersökningar har man påvisat MRSA hos hund och andra djur (Malik, Peng et al. 2006; Strommenger et al. 2006; Lee 2003; Weese 2005) och de flesta av dessa stammar är identiska med de nosokomiala (sjukhusrelaterade) humana stammar som florerar (Malik, Peng et al. 2006; Strommenger et al. 2006). Det tyder på att det kan vara en omvänd zoonos. När man diskuterar MRSA hos hundar och om de är en risk för att smitta människor i sin omgivning kan man notera att samtliga hundar som i en studie (Weese 2005) påvisades ha MRSA hade människor med MRSA i sin omgivning. Däremot kan hunden fungera som reservoar efter att ha fått bakterien från en redan smittad människa. Det finns även beskrivet flera fall av svårläkta sårinfektioner hos hund där man isolerat MRSA (Malik et al. 2006).

De senaste 5-6 åren har det börjat komma rapporter om förekomst av MRSA hos djur (Malik, Peng et al. 2006; van Duijkeren 2004; O'Rourke 2003). I en studie (Loeffler et al. 2005) undersöktes förekomsten och sambandet mellan MRSA hos hund och människa. Studien är gjord på ett djursjukhus i Storbritannien där man tagit prover från nos- och munslemhinna på personal, ineliggande hundar och katter samt omgivningsprov. Enligt författarna till studien bär 1-10 % av hundar och katter normalt på *S. aureus*. I denna studie påvisades MRSA hos 18 % av personalen, 9 % av hundarna och i 10 % av omgivningsproverna. Sex olika resistensmönster påvisades hos MRSA-stammarna, de flesta av den nosokomiala stammen EMRSA-15.

I en annan studie (Malik, Coombs et al. 2006) poängteras att man inte använder oxacillin- eller meticillinpreparat till hund och katt men att de trots detta är/kan vara bärare av MRSA. Dessutom hittades de flesta stammarna på friska djur, alltså en kolonisation och inte en infektion. Liksom i andra studier påvisades här fem olika SCC (Staphylococcal cassette chromosome), en mobil genbit där *mec*-genen finns. Denna används för epidemiologiska undersökningar på människa för att följa olika stammar av MRSA. Såväl HA-MRSA som CA-MRSA återfanns hos de 10 hundar och katter (av 252 provtagna) i denna studie från Australien.

**BILAGA 2: REMISS FÖR HUND SOM DELTAR I RESISTENSSTUDIEN 2006**

Löpnr: \_\_\_\_\_





Provtagningsdatum: \_\_\_\_\_ Utställningsplats: \_\_\_\_\_

Hundens ras: \_\_\_\_\_ Hundens ålder: \_\_\_\_\_

Bor hunden med familjen eller i hundgård? \_\_\_\_\_

Hur många hundar finns i familjen/kenneln förutom denna hund? \_\_\_\_\_

Har hunden någon gång blivit behandlad med antibiotika? Ja / Nej

Om Ja: När?  Över ett år sedan  6-12 mån sedan  3-6 mån sedan  
 senaste 3 mån  behandlas nu

Om Ja: Av vilken anledning fick er hund antibiotika?

- Urinvägsproblem
- Öronproblem
- Hudproblem
- I samband med operation
- Ehrlichia/borreliä
- Mag/tarmproblem
- Annat

Hur länge fick hunden antibiotika? \_\_\_\_\_

Vilket preparat? \_\_\_\_\_

Har någon annan hund i hushållet behandlats med antibiotika? Ja / Nej

Vilket postnummerområde bor hunden i? \_\_\_\_\_

**Djurägarens medgivande:**

Jag har tagit del av information om undersökningen och ger härmed mitt godkännande till insamlingen av prov och uppgifter från min hund samt vetenskaplig bearbetning och redovisning av dessa.

Dag som ovan

..... Telefon .....