

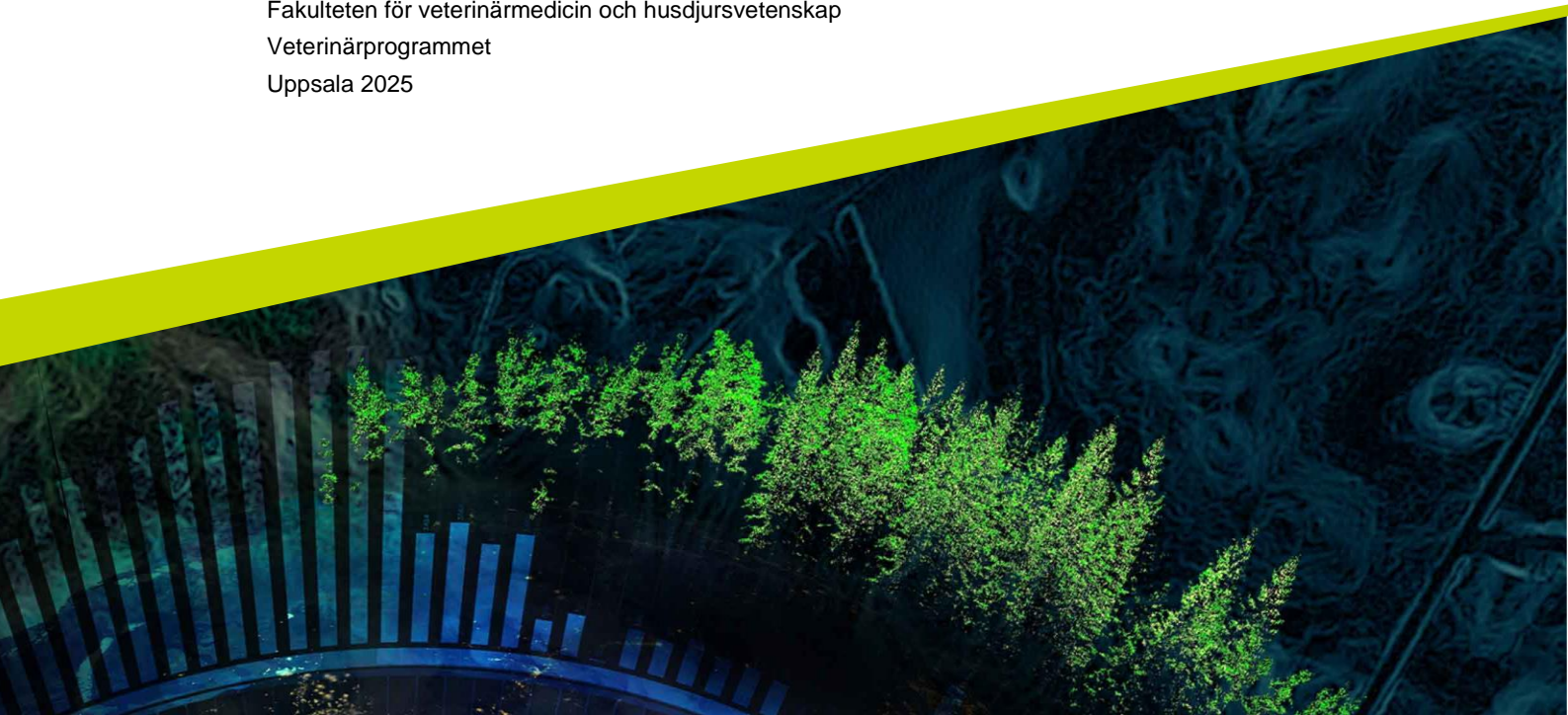


Resistensövervakning i miljö runt djurbesättningar

En pilotstudie

Ebba Moltheus

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2025



Resistensövervakning i miljö runt djurbesättningar – en pilotstudie

Assessment of antibiotic resistance in the environment around animal farming – a pilot study

Ebba Moltheus

Handledare:	Susanna Sternberg Lewerin, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper, Enheten för bakteriologi och livsmedelssäkerhet
Bitr. handledare:	Elisabeth Rajala, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Examinator:	Stefan Örn, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Omfattning:	30 hp
Nivå och fördjupning:	Avancerad nivå, A2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod:	EX1003
Program/utbildning:	Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för kliniska vetenskaper
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2025
Upphovsrätt:	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.
Nyckelord:	antibiotikaresistens, antibiotikaresistensgener, <i>Escherichia coli</i> , djurbesättningar, miljöövervakning

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Sammanfattning

Antimikrobiell resistens (AMR) innebär att bakterier utvecklar motståndskraft mot antimikrobiella läkemedel, antibiotika, vilket gör bakterierna okänsliga för läkemedlets effekt. Detta ger de antibiotikaresistenta bakterierna en konkurrensfördel genom selektionstryck vid antibiotika-exponering. Resistens kan uppkomma genom mutationer eller upptag av främmande DNA. Idag ses en globalt ökad trend i användningen av antibiotika samt i spridningen av antibiotikaresistens, vilket utgör ett hot mot möjligheten att behandla infektioner och leder till ett ökat antal dödsfall samt ökat lidande. Antibiotikaresistenta bakterier kan spridas mellan människor, djur och miljö, vilket gör AMR till ett tydligt One Health-problem. One Health-konceptet betonar samspelet mellan hälsan hos människor, djur och miljö, och hur dessa områden är nära sammankopplade. Idag finns fortfarande kunskapsluckor när det gäller miljöns roll i spridningen av AMR och det finns ännu inga standardiserade metoder för övervakning. Detta arbete syftar till att vara en pilotstudie för att bidra med underlag kring miljöövervakning av AMR. Målet är att utvärdera miljöprovtagning nära djurbesättningar som en del av utvärderingen av de risker som är kopplade till spridning av AMR från djurbesättningar till miljön.

I studien samlades prover in från gödseltankar på ett antal gris-och mjölkobesättningar, samt från vatten i diken kring åkermark där gödsel från dessa besättningar nyligen spridits. Proverna analyserades därefter i laboratorium, där bakterien *Escherichia coli* isolerades som indikatorbakterie och resistens analyserades med mikrodilutionsmetod på EUVSENC-plattor. Resultatet presenteras tillsammans med data från en tidigare provtagning genomförd året innan med samma metodologi. Resistensbestämningen omfattade totalt 48 *E. coli*-isolat, varav fem isolat (10,4 %) uppvisade MIC (minimum inhibitory concentration) som översteg de fastställda gränsvärdena för resistens. De substanser mot vilka resistens identifierades var ampicillin, tetracyklin, trimethoprim samt sulfamethoxazole, där den största andelen resistens var mot ampicillin. Bland de resistenta isolaten uppfyllde tre stycken (60 %) kriterier för multiresistens. Samtliga isolat som uppvisade MIC över gränsvärdena härstammade från gödseltankarna, och inga isolat från miljön överskred dessa gränsvärden. Med hänsyn till metodens begränsningar och de erhållna resultaten kan effektiviteten av denna metod ifrågasättas, och alternativa metoder kan vara att föredra.

Nyckelord: antibiotikaresistens, antibiotikaresistensgener, *Escherichia coli*, djurbesättningar, miljöövervakning

Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) refers to the ability of bacteria to develop resistance to anti-microbial drugs, antibiotics, making the bacteria insensitive to the drug's effect. This gives antibiotic-resistant bacteria a competitive advantage through the selection pressure exerted by the presence of antibiotics. Resistance can arise through mutations or the uptake of foreign DNA. Currently, there is an increasing trend in both the use of antibiotics and the spread of antibiotic resistance, which poses a threat to the ability to treat infections and leads to an increased number of deaths and suffering. Antibiotic resistant bacteria can be spread between humans, animals and the environment, which makes it a One Health problem. The One Health concept emphasizes the connection between the health of humans, animals and the environment and how these factors are aligned with one another. There are still knowledge gaps regarding the role of the environment in the spread of AMR, and no standardized methods for monitoring have been established. This study aims to serve as a pilot study to contribute to the development of environmental monitoring of AMR. The goal is to evaluate environmental sampling near animal farms as part of assessing the risks associated with the spread of AMR from animal farms to the environment.

In the study, samples were collected from manure pits of several pig and dairy cattle farms, as well as from water in ditches surrounding farmlands where manure had recently been spread. The samples were then analysed in the laboratory, where *Escherichia coli* was isolated as an indicator bacterium and then resistance was assessed using the microdilution method on EUVSENC plates. The results are presented alongside data from a previous sampling conducted the year before, using the same methodology. The resistance determination covered a total of 48 *E. coli* isolates, of which five isolates (10.4%) had MIC (minimum inhibitory concentration) levels exceeding the established cutoff values. The identified resistances included ampicillin, tetracycline, trimethoprim and sulfmethoxazole, with the highest resistance observed against ampicillin. Among the resistant isolates three (60%) met the criteria for multidrug resistance. All isolates that had MICs above the cutoff values were collected from the manure pits, and no isolates from the environment exceeded these cutoff values. Given the limitations of the method and the results obtained, the effectiveness of this method may be questioned, and alternative methods could be preferable.

Keywords: Antibiotic resistance, antibiotic resistance genes, animal farms, *Escherichia coli*, environmental monitoring

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	9
Figurförteckning.....	10
Förkortningar.....	11
1. Introduktion	13
2. Litteraturoversikt.....	14
2.1 Antibiotika inom veterinärmedicin	14
2.1.1 Antibiotikariktlinjer	14
2.2 Antibiotikaresistens	15
2.2.1 Mekanism och spridning.....	15
2.2.2 Statistik över antibiotikaresistens	16
2.3 <i>Escherichia coli</i>	17
2.3.1 Olika typer av resistens	18
2.4 Antibiotikaresistens i miljön.....	19
2.4.1 Pre-antibiotika eran.....	19
2.4.2 Utsläpp av antibiotika till miljön.....	20
2.4.3 Resistensutveckling i miljön.....	21
2.4.4 Hotspots.....	22
2.4.5 Långsiktiga effekter på resistensnivån i miljön	22
2.5 Betydelse och potentiella risker	23
2.5.1 One Health.....	23
2.5.2 Metoder för övervakning av antibiotikaresistens i miljön	24
2.5.3 Revidering av EU-lagstiftning	26
3. Material och Metod	27
3.1 Provtagning.....	27
3.1.1 Våren och hösten 2024.....	27
3.1.2 Tidigare provtagning, grisgårdar.....	28
3.2 Bakteriedodling och typning.....	28
3.3 Resistensbestämning.....	31
4. Resultat	33
4.1 Antal <i>E. coli</i> -stammar	33
4.1.1 Grisbesättningen.....	33
4.1.2 Mjölkbesättning 1	33
4.1.3 Mjölkbesättning 2	33
4.1.4 Tidigare provtagningar	33
4.2 Resultat resistensbestämning.....	33
5. Diskussion	37

5.1	Tolkning av prevalens antibiotikaresistens	37
5.2	Utvärdering av metod.....	37
	5.2.1 Framtida miljöövervakning av AMR	40
	5.2.2 Framtida svensk övervakning av AMR	41
5.3	Begränsningar och bias	42
6.	Slutsatser.....	43
	Referenser.....	44
	Populärvetenskaplig sammanfattning	49

Tabellförteckning

Tabell 1. Andel resistens över cutoff-värdena för AMP, TET, TMP, SMX fördelat mellan de olika provtagningstillfällena samt mellan gödselproverna och vattenproverna.	36
---	----

Figurförteckning

Figur 1. Figuren demonstrerar vart proverna togs under provtagningen. Figuren är fiktiv och ej av verklig skala.....	27
Figur 2. Vatten samlat från diket runt åker från provtagen gård. Foto: privat	28
Figur 3. Filtrering av vattenproverna. Foto: privat	30
Figur 4. Renodling av E. coli på blodagar. Foto: privat	30
Figur 5. Avläsning av resistensplatta. Foto: privat	32
Figur 6. Stapeldiagram, andel resistenta E. coli, över cutoff-värdena. Av de resistenta isolaten härstammade alla från gödseltanken, inget isolat från miljön uppvisade dessa nivåer av resistens.	34
Figur 7. Sammanställning resistensbestämning. Blå rutor representerar intervaller enligt EUVSEC plattorna (sensitiv) och cutoff-värdena, markerade med en svart tjockare kant, enligt EUCAST med undantag för sulfametoxazol där SVARM-gränsvärden används	35
Figur 8. Stapeldiagram, andel resistens över cutoff-värdena hos AMP, TET, TMP, SMX som identifierades hos gödselproverna.	36

Förkortningar

Förkortning	Betydelse
AMI	Amikacin
AMP	Ampicillin
AMR	Antimikrobiell resistens
ARG	Antibiotikaresistensgener
AZI	Azithromycin
CHL	Chloramphenicol
CIP	Ciprofloxacin
COL	Colistin
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended spectrum beta-lactamases
EU	Europeiska unionen
FN	Förenta nationerna
FOT	Cefotaxime
GEN	Gentamicin
MERO	Meropenem
MIC	Minimal inhibitory concentration
MSC	Minimal selective concentration
NAL	Nalidixic Acid
SDZ	Sulfadiazine
SMX	Sulfamethoxazole
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
SVA	Sveriges veterinärmedicinska anstalt
TAZ	Ceftazidime
TET	Tetracycline
TGC	Tigecycline
TMP	Trimethoprim
WHO	World Health Organization

1. Introduktion

I dag ses antimikrobiell resistens (AMR) som ett allvarligt och omedelbart hot för både människor och djur. AMR är en naturlig företeelse där bakterier genomgår genetiska förändringar eller förvärvar resistensgener som resulterar i att de inte längre är mottagliga för antibakteriella läkemedel (antibiotika). Resistenta bakterier kan överföras mellan människor, djur samt miljön. I dag är antibiotika en grundpelare i modern medicin och den ökande förekomsten av AMR bidrar till ökade svårigheter att behandla och bota infektiösa sjukdomar, vilket i sin tur orsakar stort lidande och ett ökat antal dödsfall världen över (World Health Organization 2023).

Behandlade djur kan utsöndra antibiotikarester och metaboliter såväl som resistenta bakterier till miljön via urin och avföring. Detta ökar risken för spridning av antibiotikaresistenta bakterier i och via miljön. Därför ses miljöövervakning som en viktig del i AMR-övervakningen. Idag saknas dock ännu metoder för en kostnadseffektiv övervakning för att bedöma miljöbelastningen av resistenta bakterier från djuranläggningar.

Denna studie syftar därför till att bidra med underlag för miljöövervakning av AMR där målet är att kunna utvärdera miljöprovtagning runt djurbesättningar som en del i att bedöma resistensrisker från dessa.

2. Litteraturöversikt

2.1 Antibiotika inom veterinärmedicin

Likväl som inom humanvården har användningen av antibiotika inom djurvård varit en viktig komponent för att behandla olika sjukdomar (WOAH 2024a). Antibiotika har bidragit till att djur med infektiösa sjukdomar har kunnat behandlas på ett effektivt sätt vilket räddat många liv och besparat lidande. I Sverige får antibiotika till djur endast användas enligt recept förskrivet av en veterinär (EU 2019/6). Sedan medvetenheten ökat om riskerna med den alltmer utbredda resistensutvecklingen har mer fokus lagts på att vara sparsam med användningen av antibiotika. I rapporten *The Swedish experience* (Grundin *et al.* 2020) framgår det att sedan 1980 har försäljningen av antibiotika till svenska djur minskat med cirka 70 procent samt att Sverige är ett av de tre länder med den lägsta antibiotikaanvändningen till djur i Europa.

En viktig del i strategin är sjukdomsförebyggande insatser där man kan förebygga behovet av att använda antibiotika (Grundin *et al.* 2020). Antibiotikaanvändning i tillväxtökande syfte är fortfarande tillåtet i vissa länder men har varit förbjudet i Sverige sedan 1986 och inom EU 2006.

2.1.1 Antibiotikariktlinjer

Som stöd till veterinärer finns flertalet antibiotikariktlinjer som hjälpmedel men även lagstiftningar att ta hänsyn till. I Jordbruksverkets författning SJVFS 2023:21 anges bland annat kriterier och krav som ska uppfyllas för tillåten antibiotikaanvändning till djur. EUs förordning (EU) 2019/6 reglerar också användningen av antibiotika inom veterinärmedicin inklusive restriktioner för användning av vissa typer för att minska risken för antibiotikaresistens. Läke-medelsverket hänvisar även till (EU) 2022/1255 som innehåller en lista på antibiotika som inte får användas till djur utan reserveras för humant bruk. EMA/CVMP har tagit fram en lista där olika typer av antibiotika kategoriseras utifrån en riskvärdering av antibiotikaresistens där veterinärer kan ta stöd i valet av antibiotika (EMA/CVMP 2020).

Sveriges Veterinärförbunds frivilliga riktlinjer betonar att antibiotika endast ska användas då bakteriell sjukdom har konstaterats eller när man har starka indikationer för misstanke (Sveriges Veterinärförbund 2021). I störst möjliga mån ska resistensundersökning föregå behandling för att undvika att icke verksamma antibiotika eller onödigt bred antibiotika sätts in. Val av antibiotika ska alltid eftersträva användning av preparat med så smalt spektrum som möjligt.

Det vanligaste förstahandsvalet av antibiotika till lantbruksdjur är bensylpenicillin/bensylpenicillinprokain, med undantag för de fall där laboratoriediagnostik talar för att bredare antibiotika bör sättas in (Sveriges Veterinärförbund 2021). Tetracykliner har ett bredare verkningspektrum och är ofta andrahandsval på grund av att risken för selektion av resistenta bakterier är större än vid behandling med bensylpenicillin.

Enligt EU-lagstiftningen (EU) 2019/6 samt svensk lagstiftning SJVFS 2023:21 klassas fluorokinoloner och tredje samt fjärde generationens cefalosporiner som särskilt viktiga för humanhälsan, därför får dessa endast förskrivas till lantbrukets djur när diagnostik och resistensbestämning indikerar att inga andra alternativ finns eller när situationen är akut och snabb insättning av korrekt antibiotika är direkt livräddande. I det senare fallet ska behandlingen omprövas när resultat från odling och resistensbestämning föreligger.

2.2 Antibiotikaresistens

Antibiotika är idag ett värdefullt verktyg i modern medicin. Ända sedan upptäckten och introduktionen till klinisk verksamhet har antibiotika använts med stor framgång för att behandla infektiösa sjukdomar, något som minskat morbiditeten samt mortaliteten hos människor och djur globalt (WHO 2023). Tyvärr har resistensen hos patogena bakterier ökat vilket delvis orsakats av den intensiva och stundtals onödiga användningen av antibiotika (Martinez 2009). Detta har påverkat den globala resistensutvecklingen och resulterat i att allt fler sjukdomar blir svårbehandlade. Antibiotika som används till djur är ofta samma som används inom humanvården (Jechalke *et al.* 2014a). Detta innebär att resistensutveckling hos djurbakterier påverkar både djur och människor.

2.2.1 Mekanism och spridning

AMR kan uppkomma på olika sätt, dels genom upptag av främmande DNA men även genom mutationer i det existerande genomet (Reygaert 2018). Resistensutvecklingen är en naturlig process som drivs av närvaro av antibiotika och med den ökade användningen av antibiotika har denna process påskyndats. När vi behandlar människor och djur med antibiotika skapas en optimal miljö för resistensutveckling i tarmens mikrobiota (Larsson & Flach 2022). Bakterierna i mikrobiotan utsätts för ett selektionstryck där de drivande faktorerna är det påtagliga hotet från antibiotikan samt den konstanta konkurrensen mellan mikroorganismerna om begränsade resurser.

Resistensmekanismer kan skilja sig mellan bakterier och typ av antibiotika (Reygaert 2018). Bakterierna behöver försvarsmekanismer som gör att de ej är känsliga mot antibiotikans effekt. Dessa försvarsmekanismer kan vara exempelvis

effluxpumpar i cellväggen som pumpar ut antibiotikan, eller enzym som bryter ner antibiotika. Resistensmekanismer är dock ofta energikrävande och kan leda till att bakterier som bär på dessa har en minskad tillväxthastighet. På så sätt är vissa resistensgener ofördelaktiga om antibiotika inte är närvarande.

Att patogener tar upp nya resistensgener från andra bakteriearter är vanligt förekommande (Larsson & Flach 2022). De evolutionära processer som leder till uppkomst av nya resistensmekanismer är relativt ovanliga medan transmission av redan befintliga antibiotikaresistensgener (ARG) är mycket vanligt. ARGs kan spridas vertikalt mellan bakteriegenerationer när bakterierna delar sig samt horisontellt mellan olika bakterier tillsammans med andra egenskaper via genetiska element såsom plasmider, fritt DNA eller bakteriofager.

2.2.2 Statistik över antibiotikaresistens

I en rapport Browne *et al.* (2021) presenteras en uppskattning av den globala antibiotikakonsumtionen bland människor baserat på flertalet datakällor så som WHO. Det beskrivs hur antibiotikaanvändningen globalt sett ökat markant inom humanvården under de senaste åren. Enligt artikeln har ökningen setts framför allt i låg- och medelinkomstländer vilket författarna anser delvis skett på grund av bristande regleringar, felaktig användning och lättillgängliga läkemedel.

WHO har även släppt GLASS-rapporten 2022 som är en global rapport där 127 medlemsländer deltog i en övervakning av antibiotikaresistens hos människor. GLASS-rapporten visar en fortsatt ökning av resistensnivåer hos flera sjukdomsframkallande patogener. Det finns dock stora luckor i data från många länder vilket försvårar förståelsen av den fulla omfattningen av resistensläget, dock visar rapporten att mellan 2016 till 2022 har antalet länder som rapporterar data till GLASS ökat (GLASS report 2022).

Enligt WHO (2023) kunde AMR kopplas till cirka 4,95 miljoner humana dödsfall globalt sett år 2019 varav 1,27 miljoner dödsfall ansågs direkt orsakade av AMR. Enligt samma rapport kan högst belastning ses i låginkomstländer där Västafrika hade den högsta dödligheten till följd av AMR år 2019. De ledande patogenerna som bidrog till AMR-relaterade dödsfall globalt inkluderar *Escherichia coli* och *Staphylococcus aureus* (Murray *et al.* 2022).

WOAH (världshälsoorganisationen för djurhälsa) släpper en årlig rapport om antibiotika som används till djur (WOAH 2024b). Statistik från rapporten år 2022 presenterade resultat sammanställt från 152 medlemsländer där den globala trenden mellan år 2019 och 2021 visade en ökad användning av antibiotika till djur på 2 % med största ökningen i Afrika. Samma rapport anger att en fjärdedel

av medlemmarna rapporterar fortsatt användning av antibiotika i tillväxtfrämjande syfte.

I en artikel Zhao *et al.* (2024) diskuterar författarna att bakgrunden till de stora skillnaderna i antibiotikaanvändning hos djur mellan länder kan bero på olika faktorer såsom lagstiftningar, djurpopulationers sammansättning, vilka typer av antibiotika som används, sjukdomsläge och förebyggande sjukdomsarbete, samt hur mycket som rapporteras och förs in i statistiken. I samma artikel görs en kartläggning över hotspots gällande antibiotikaresistens hos livsmedelsproducerande djur. Artikeln belyser högst förekomst av AMR hos livsmedelsproducerande djur i låg- och medelinkomstländer där resistensen mot penicilliner och tetracykliner förväntas överstiga 50 % i Afrika och Sydamerika inom det närmsta decenniet.

Sammanfattningsvis visar statistiken att AMR är ett växande globalt problem, både hos människor och djur. Humanvårdens användning av antibiotika fortsätter att öka, framför allt i låg- och medelinkomstländer och djurhållningen har fortfarande en antibiotikaanvändning kopplat till tillväxtfrämjande syften. Variationerna i antibiotikaanvändning och resistensnivåerna kan kopplas till bland annat skillnader i lagstiftningar och regleringar, sjukdomsförebyggande arbete samt sociokulturella skillnader i sjukdomsbehandling, men också till skillnader i infrastruktur och avfallshantering (Iskandar *et al.* 2020). Detta har gjort att låg- och medelinkomstländer har den största trenden av en ökad antibiotikaresistens vilket styrker behovet av en global och enhetlig strategi för att övervaka samt hantera antibiotikaresistensen.

2.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) är en bakterie som tillhör familjen *Enterobacteriaceae* och är en gramnegativ, fakultativt anaerob stav (VetBact 2023). De allra flesta stammar av *E. coli* är inte sjukdomsframkallande utan är en del av den normala tarmfloran hos däggdjur och fåglar. Vissa stammar är dock patogena och kan orsaka sjukdom. Bakterien är zoonotisk vilket innebär att den kan smitta mellan människor och djur. Det finns olika typer av patogena *E. coli* med olika virulensfaktorer, bland annat EHEC (Enterohemorragisk *E. coli*) som kan orsaka blödande tarminfektioner och skador på njurarna.

E. coli kan spridas via direkt eller indirekt kontakt där bristande hygien och fekal kontamination inom livsmedelsprocessen anses vara viktiga riskfaktorer (Livsmedelsverket 2023). *E. coli* kan spridas via icke tillredda animaliska livsmedel såsom rått kött samt icke pastöriserad mjölk, men även via vegetabiliska livsmedel som kontaminerats med avföringsbakterier. Infektioner orsakade av *E. coli* brukar kunna behandlas med flera olika typer av antibiotika, bland annat ampi-

cillin, cefalosporiner samt trimetoprim (Poirel *et al.* 2018). En alltmer utbredd resistens har dock observerats hos bakterien, där ESBL-producerande *E. coli* blir ett allt större problem.

E. coli är en viktig modellorganism inom forskning och används även som indikatorbakterie i EFSA:s resistensövervakningar för att övervaka AMR från livsmedelsproducerande djur (EFSA 2019). *E. coli* har använts i denna studie som indikatorbakterie då den utsöndras med avföringen och anses bäst reflektera fekala föroreningar.

2.3.1 Olika typer av resistens

I och med att olika typer av antibiotika verkar genom olika verkningsmekanismer har bakterier utvecklat olika typer av resistensmekanismer för att överleva (Reygaert 2018). De huvudsakliga grupperna av verkningsmekanismer hos antibiotika består av depolarisering av cellmembranet samt hämmandet av antingen proteinsyntesen, nukleinsyrasyntesen eller cellväggssyntesen. Genom användning av antibiotika har bakterier selekterats som bär på gener som kodar för relevanta resistensmekanismer då dessa är fördelaktiga vid närvaro av antibiotika.

I denna studie har *E. coli* resistensbestämts avseende flera olika sorters antibiotika. Några av de vanligaste antibiotika som används inom veterinärmedicinen idag är ampicillin, tetracyklin, sulfamethoxazole samt trimetoprim (Sveriges Veterinärförbund 2021). Dessa tillsammans med flera andra antibiotika har ingått i denna studie där förekomsten av resistens mot dessa har undersökts.

Tetracykliner är antibiotika som verkar genom att hämma proteinsyntesen hos bakterier (Poirel *et al.* 2018). Flera resistensgener har identifierats hos *E. coli* från djur där de vanligaste resistensmekanismerna inkluderar aktiva effluxpumpar, enzymatisk inaktivering samt ribosomskyddande proteiner. Många av dessa gener är lokaliserade på mobila genelement, något som underlättar den horisontella resistensspridningen.

Trimetoprim och sulfamethoxazole är antibiotika som ofta ges i kombination (Poirel *et al.* 2018). De verkar hämmande i flera steg i folsyrasyntesen, och tillsammans ger de en synergistisk bakteriedödande effekt. Resistens mot dessa består främst av mutationer i gener som kodar för förändringar i enzymer involverade i folsyrasyntesen, något som kan göra läkemedlen ineffektiva. Gener som kodar för enzym som är okänsliga för trim-sulfa kan även nedärvas mellan bakterier och göra att bakterierna fortsätter producera folsyra trots närvaron av antibiotika. I *E. coli* från livsmedelsproducerande djur har dessa gener hittats på mobila genelement så som integroner och plasmider.

Betalaktamas är ett samlingsnamn för enzymer som kan bryta ner betalaktamer (Folkhälsomyndigheten 2016). Bland dessa finns en grupp enzymer som kallas ”extended spectrum beta-lactamases” (ESBL) som utvecklats som resistensmekanism hos bakterier och kan resultera i resistens mot några av de viktigaste antibiotikagrupperna såsom penicillinerna och till och med tredje respektive fjärde generationens cefalosporiner. ESBL bryter ner betalaktamer och gör att betalaktamantibiotika inte är verksamma, något som försvårar behandling mot infektioner (Gekenidis *et al.* 2020). *E. coli* tillhör en av de arter där man ofta påvisar ESBL. Generna för ESBL-produktion kan sitta lokaliserade på kromosomer samt på mobila element såsom plasmider och transposoner. Mobila element kan lätt överföras mellan bakterier och anses därför av betydelse för spridning av resistens om de bär på resistensgener.

Man kan tänka sig att resistensutveckling i sig är något förväntat eftersom all användning av antibiotika förr eller senare leder till någon form av resistens. ESBL blir dock särskilt problematiskt eftersom det ger resistens mot många nyare betalaktamantibiotika så som tredje och fjärde generationens cefalosporiner, vilka är aktiva även mot gramnegativa bakterier och är nödvändiga för behandling av bakterier som är resistent mot många andra antibiotika. Detta kan leda till en ond cirkel där ännu mer breda och reserverade antibiotika måste användas när gamla antibiotika inte längre fungerar, något som driver på resistensutvecklingen ytterligare.

2.4 Antibiotikaresistens i miljön

2.4.1 Pre-antibiotika eran

Många bakterier i miljön visar tecken på att ha utvecklat AMR långt före människor började använda antibiotika i medicinskt syfte (D’Costa *et al.* 2011). Isolerade platser i miljön såsom grottor samt permafrost tros ha bevarat mikroorganismer från flera tusen år tillbaka där ARGs har identifierats.

Antibiotika produceras naturligt av mikroorganismer, något som tidigare har antagits vara en evolutionär anpassning för att påverka interaktioner med andra mikroorganismer i dess omgivning (Clardy *et al.* 2009). Många mikroorganismer bär på resistensgener, både för antibiotika som de själva producerar, som en typ av självförsvar, men även för antibiotika de inte själva kan producera. Detta har tolkats som att den producerade antibiotikans roll är att skada konkurrerande mikrober, medan resistensgenernas funktion är att skydda den egna organismen. Vissa ARGs kan dock ha utvecklats primärt för andra syften, så som metaboliska funktioner och signalering, där förmågan att inaktivera antibiotika snarare kan ses som

en bieffekt (Martinez 2009). En del forskare argumenterar för att antibiotikan som mikroorganismerna producerar i själva verket är signaleringsmolekyler, och att deras dödliga verkan endast uppstår vid onaturligt höga koncentrationer (Clardy *et al.* 2009). AMR i miljön är alltså en naturlig företeelse och inte enbart ett resultat av modern antibiotikaanvändning.

2.4.2 Utsläpp av antibiotika till miljön

Antibiotika kan nå miljön på flertalet sätt (Larsson & Flach 2022). Dels genom direkt miljöförorening, avfall från antibiotikaproduktion och felaktig hantering av oanvända läkemedel. Reningsverk har visat sig vara en betydande källa till antibiotikaförorening i miljön, där antibiotikakoncentrationerna ofta är tillräckligt höga för att kunna utöva en selekterande effekt. Resistensutvecklingen i dessa anläggningar kan även påverkas av fekala föroreningar, som kan innehålla bakterier som bär på ARGs. Därmed kan reningsverken fungera som en källa för förorening av vattendrag med antibiotika och resistenta bakterier. Eftersom yt-vatten bland annat används för bevattning av åkrar kan detta också anses som en potentiell väg för spridning av AMR i miljön.

Ytterligare en källa till spridning av AMR i miljön kommer från jordbrukets användning av gödsel (Nava *et al.* 2022). När antibiotika används till djur utsöndras dessa med urin och avföring som sedan många inom jordbruket berikar sin åkermark med som gödsel. Exponeringsnivåerna via denna spridningsväg kommer skilja sig till följd av flertalet faktorer, exempelvis hur stor andel av djuren som exponerats för antibiotika vid en given tidpunkt, doser som används och metabolismen hos det enskilda djuret. Vid provtagning påverkas även nivåerna som ses i proverna av tid och väderförhållanden mellan provtagningstillfälle och fekal exponering i miljön, samt vilken typ av miljö som provtas (Larsson & Flach 2022).

Antibiotika kan utsöndras i sin helhet eller som aktiva metaboliter till miljön via gödsel (Jechalke *et al.* 2014a). Dessa rester kan kvarstå i miljön och påverka den lokala mikrobiotan. I jorden kan antibiotikametaboliterna transformeras så att de återgår till sin ursprungsform. Metaboliterna kan också vara aktiva, ibland kan deras antibakteriella effekt vara starkare än ursprungsmolekylen (Löffler *et al.* 2023). Efter spridning av gödsel på åkermark stannar en stor del av antibiotikan kvar i ytjorden men en del kan spridas vidare till miljön genom ytavrinning (Jechalke *et al.* 2014a). En liten del kan även tas upp av växter. De fekala bakterierna i gödslet kan bära på ARGs som på detta sätt sprids vidare till miljön.

2.4.3 Resistensutveckling i miljön

Utvecklingen av AMR har påskyndats sedan antibiotika introducerades kliniskt, genom selektionstryck (Larsson & Flach 2022). Detta har framförallt setts hos mikrobiotan hos människor och tamdjur som behandlats med antibiotika, men även i miljöer som utsatts för antibiotikakontamination.

På grund av det starka selektionstryck på mikrobiotan som uppstår i ett antibiotikabehandlat djur eller människa så är den mutationsbaserade resistensutvecklingen vanligare i en biologisk värd än i en extern miljö (Larsson & Flach 2022). I miljön är det istället den resistensutveckling som sker via upptag av främmande DNA som har bättre förutsättningar då vatten, jord och andra platser i miljön erbjuder en rik och varierande ekologisk mångfald med en genpool som överträffar mikrobiotan hos en biologisk värd (Schulz *et al.* 2017). Den mångfald av gener som miljön tillhandahåller ger möjlighet för patogener att förvärva dessa (Larsson & Flach 2022). Alla användbara antibiotikaklasser som tagits fram hittills, både naturliga och syntetiska möter någon form av resistensgrad hos åtminstone vissa av de patogener som de är avsedda att användas mot. Detta betyder att resistens mot all antibiotika som finns idag, men även som någonsin kommer att utvecklas, kan finnas i den externa miljön.

Resistensutveckling hos patogena bakterier är dock vanligare i mikrobiotan hos en biologisk värd än vad den är i en extern miljö (Bengtsson-Palme & Larsson 2015). När man jämför den externa miljön med mikrobiotan hos en biologisk värd ser man att överföring av ARGs mellan patogener sker i högre frekvens i tarmen där det är ett större selektionstryck samt där symbiotiska och patogena bakterier oftare förekommer tillsammans.

Möjligheten för genutbyte mellan lokala miljöbakterier och bakterier från djurens mikrobiota ökar i och med den fysiska kontakten som skapas när de fekala bakterierna förorenar miljön (Larsson & Flach 2022). De flesta tarmbakterier har mobila genetiska element som underlättar överföringen till patogener, så som plasmider, transposoner samt integroner (Klümper *et al.* 2015). Det har även visats att tungmetaller och desinfektionsmedel som används på gården kan öka resistensutvecklingen (Jechalke *et al.* 2014a). Detta beror på att generna som kodar för resistens mot desinfektionsmedel och tungmetaller ofta sitter på samma mobilelement som antibiotikaresistensgener (Jechalke *et al.* 2014b). Därför finns risken att desinfektionsmedel och tungmetaller kan selektera för bakterier som även är resistenta mot antibiotika.

ARGs som kan återfinnas i miljön har olika förutsättningar till spridning baserat på förhållandena i miljön (Shintani *et al.* 2020). En hög förekomst av fekala

bakterier gynnar frekvensen av genutbyten tack vare mobila genetiska element som underlättar horisontell överföring. Även en miljö med kontinuerlig närvaro av antibiotika gynnar frekvensen genutbyten då det leder till att mikroorganismerna utvecklar strategier för att hantera eller övervinna denna stress. Hastigheten i den horisontella överföringen beror på faktorer så som fuktighet, temperatur, pH och kemisk sammansättning (Nava *et al.* 2022).

2.4.4 Hotspots

Koncentrationerna av antibiotika i miljön kan variera starkt (Bengtsson-Palme & Larsson 2016). I vissa fall är koncentrationerna lägre än MIC, de minimala bakteriehämmande koncentrationerna, och är då lägre än de koncentrationer som förutsätts kunna leda till selektion och resistensutveckling i en laboratoriesituation. Dock finns det stöd för att koncentrationer även under MIC kan bidra till ett selektivt tryck som gynnar resistenta bakterier (Gullberg *et al.* 2011). Att bedöma antibiotikakoncentrationer vid provtagning är en utmaning eftersom enstaka jordprover inte ger en helt representativ bild då antibiotika och resistenta mikroorganismer inte är jämnt fördelade i jorden utan samlas i hotspots som då har högre koncentration (Jechalke *et al.* 2014a).

Koncentrationen är oftast högre och kvarstår längre i fasta eller halvfasta medier såsom jord än vad den gör i vattenbaserade medier (Cabello *et al.* 2013). Det är även oftast endast en liten del av antibiotikan som är bioaktiv, då ökad tid i jorden minskar biotillgängligheten. Biotillgängligheten påverkas av jordens sorption- och desorptionsreaktioner som påverkas av faktorer så som pH och tidigare gödsling (Jechalke *et al.* 2014a).

2.4.5 Långsiktiga effekter på resistensnivån i miljön

Kunskapen om långsiktiga effekter på resistensnivåer i miljön är fortfarande begränsad (Jechalke *et al.* 2014a). I en studie Heuer & Smalla (2007) undersöktes hur tillsättning av antibiotikan sulfadiazine (SDZ) i gödsel påverkade mängden resistensgener i jorden. I cirka två månaders tid efter att gödsel spridits kunde forskarna observera en ökning av ARGs mot SDZ i jorden jämfört med kontrolljord där gödsel utan tillsatt SDZ använts. Gödslet med tillsatt antibiotika hade ett ökat antal SDZ-resistenta bakterier och en ökad frekvens av ARGs mot SDZ i plasmider hos *E. coli*.

Det finns även andra studier som tyder på att effekterna av antibiotika i gödsel kan vara övergående med tiden. I en studie Sengeløv *et al.* (2003) noterades att jord där svinggödsel innehållande tetracyklin spreds kunde en initial ökning av resistenta bakterier observeras men sedan gick de ner över tid, vilket kan ha berott på de resistenta bakteriernas begränsade överlevnadsförmåga i jorden.

2.5 Betydelse och potentiella risker

I miljöns mikrobiota finns en rik mångfald och stor tillgänglighet av gener som potentiellt kan bidra till ökad förekomst av AMR (Schulz *et al.* 2017). ARGs i miljön skulle kunna medföra att resistens överförs horisontellt i flera steg till patogener som sedan infekterar människor och djur. I en artikel av Bengtsson-Palme och Larsson (2015) bedöms dock den kliniska betydelsen av resistensutveckling till följd av miljöförekomst av ARGs som redan är vanliga i djur- och människors mikrobiota som begränsad. Detta eftersom det finns vissa barriärer i miljön som måste övervinnas för att resistens ska kunna spridas vidare i flera led. Andra studier ex Huang *et al.* (2013) har observerat att bakterier bärandes på ARGs i miljön kan migrera vertikalt till djupare jordlager samt grundvatten där de potentiellt skulle kunna spridas längre sträckor samt nå fler potentiella patogener och i sin tur människor och djur.

Miljön skulle alltså potentiellt kunna öppna vägar för resistent bakterier att nå biologiska värdar (Collignon *et al.* 2018). Den globala konsekvensen av enstaka överföringar anses begränsad när det kommer till uppkomst av nya resistensgenotyper hos patogener. Dock skulle, i situationer där dessa spridningsvägar uppkommer oftare så som i låginkomstländer med bristande avloppshantering på grund av otillräcklig infrastruktur, miljömässig spridning av ARGs kunna ha en större effekt på det totala resistensläget.

Ständiga utsläpp av antibiotika i miljön leder till en konstant förorening i många miljöer där bland annat livsmedel framställs (Nava *et al.* 2022). De ARGs som stannar kvar i jorden efter spridning av gödsel kan absorberas av växter och nå människor vid intag av grödor som odlats och säljs som livsmedel. Det har observerats att jord som berikats med gödsel hade högre nivåer av ARGs i skördad sallad jämfört med kontroller. Dessutom, i de delar av världen där antibiotikautsläpp kontaminerar vatten och livsmedel anses detta vara en ökande hälsorisk som bidrar till ett ökat behov av metoder för övervakning av antibiotika och AMR från olika miljökällor.

2.5.1 One Health

One Health är ett begrepp som används för att beskriva de globala kopplingarna mellan hälsan hos människor, djur och miljön (Mackenzie & Jeggo 2019). Att förstå One Health-konceptet är viktigt för att kunna hantera antibiotikaresistens-krisen eftersom bakterier och gener korsar miljö- och artgränser. One Health betonar betydelsen av samarbete mellan olika sektorer för att bemöta globala gemensamma hot så som AMR där övervakning, kontroll och åtgärder behöver sättas in för att arbeta förebyggande.

För att utforma strategier för att minska antibiotikaexponering i miljön krävs att det är praktiskt genomförbart från ekonomiska, geografiska samt politiska perspektiv (Larsson & Flach 2022). Utöver de rent tekniska åtgärderna är skapandet av socioekonomiska och juridiska drivkrafter viktigt för att åtgärderna ska fungera hållbart. Nyligen har flera åtgärder föreslagits av internationella organisationer så som EU och FN samt flertalet regeringar för att långsiktigt minska utsläppen av antibiotika i miljön. Dessa åtgärder inkluderar bland annat olika kontroller i upphandlingsprocesser, ökad transparens om utsläppsnivåer, lagstadgade gränser för utsläpp samt fortsatt forskning angående miljömässiga övervakningsmetoder.

2.5.2 Metoder för övervakning av antibiotikaresistens i miljön

Övervakning av AMR har införts på många sätt i kliniska sammanhang men saknas nästan helt i miljön (Bengtsson-Palme *et al.* 2023). För att få en helhetsbild och förstå dynamiken kring AMR med spridningsvägar, selektion av resistent bakterier samt de risker som finns med AMR i miljön är det av vikt att införa miljömässig övervakning. Syftet med övervakning av AMR i kliniska sammanhang är ofta kopplat till att införa specifika åtgärder mot identifierade hot. Detta blir svårare i miljön, något som gör det viktigt att identifiera vilket syfte övervakning av AMR i miljön har.

I en artikel av Bengtsson-Palme *et al.* (2023) diskuteras miljöns roller kopplat till AMR. Författarna lyfter miljöns två huvudsakliga viktiga roller vilka dels är som spridningsväg för redan resistent bakterier mellan artbarriärer, men även som källa till nya ARGs. Författarna hävdar att för att kunna övervaka AMR i miljön är det viktigt att koppla övervakningen till dessa roller, man behöver identifiera vilka källor som bidrar till spridningen av resistent bakterier till miljön samt hur djur och människor exponeras för resistent bakterier från miljön. Med hjälp av övervakning skulle även förändringar i AMR-nivåer över tid studeras, något som skulle kunna leda till att mer direkta åtgärder sätts in oftare om ett potentiellt AMR-hot identifieras, detta skulle kunna innebära exempelvis tillfälliga avspärrningar på vissa platser. I samma artikel diskuteras det att en utmaning med AMR-övervakning i miljön är att identifiera vilka miljöer som ska provtas. Miljöer där resistent bakterier potentiellt kan släppas ut genom mänsklig aktivitet bör provtas för att övervakningen ska bli meningsfull, platser så som avloppsreningsverk men även jordbruksmiljöer där antibiotika kan spridas. Andra relevanta miljöer att övervaka är de miljöer där människor och djur potentiellt riskerar att vara med i spridningen genom att komma i kontakt med bakterierna, exempelvis dricks- och badvatten.

En av begränsningarna som finns i övervakningen av AMR och ARGs i miljön kopplat till djurhållning är den otillräckliga forskningen kring spårbarhet från gödsel till andra miljöer och vidare till människor och djur (Zhou *et al.* 2022). Övervakning av ARGs inom jordbruk har hittills dominerats av PCR-metoder för att undersöka förekomst av kända ARGs och vilka mobila genetiska element som kan hittas i jord, vatten och sediment. Gas- och vätskekromatografi har använts för att undersöka antibiotikakoncentrationer i organiskt avfall och så kallad high-throughput sequencing har använts för att mäta ARGs i jordbruksmiljöer (Nava *et al.* 2022).

I en artikel av Abramova *et al.* (2023), lyfter författarna att kvantitativ realtids-PCR (qPCR) kan vara en lovande metod för AMR-övervakning. Det är en teknik som kan upptäcka ARGs utan att odla bakterier, metoden är även relativt känslig. Utmaningen med metoden är att välja vilka gener som ska analyseras samt vilka referensvärden som ska användas. Metoden ger heller ingen fullständig information om antibiotikakänsligheten kopplat till specifika bakteriearter. I artikeln diskuteras behovet av bakgrundsdata för prevalens av ARGs i både orörda och mänskligt påverkade miljöer. Det skulle öppna upp för möjligheten att identifiera nivåer av ARGs som är naturligt förekommande i miljön samt hur mänsklig aktivitet kan ha berikat en miljö med ARGs. I samma artikel har mer än 800 vetenskapliga artiklar om qPCR-data för ARGs i olika miljöer granskats för att identifiera referensnivåer i miljöer som kan användas för övervakning. I studien uppskattade forskarna sedan typiska nivåer av ARGs i olika miljöer och kom fram till att cirka en av tusen miljöbakterier bär på kliniskt relevanta ARGs. Författarna påpekar dock att mycket av värdena som användes återspeglade främst ARG-nivåer i miljöer som påverkats av mänsklig aktivitet och väldigt få prover var från orörda platser.

Det finns även skillnader i hur mängden ARGs rapporteras (Nguyen *et al.* 2021). Detta beror på skillnader i de olika metoder som används för att kvantifiera ARGs. En standardisering av enheten för mängden ARGs är nödvändigt för att på ett effektivt sätt jämföra resultat. Förslagsvis kan ARGs rapporteras i termer av koncentration eller relativ mängd.

En studie gjord på orenat sjukhusavloppsvatten visade hög förekomst av multi-resistenta *E. coli* (Kraupner *et al.* 2021). I studien exponerades olika *E. coli*-stammar för sterilt filtrerat samt orenat sjukhusavloppsvatten samt kommunalt avloppsvatten. Sjukhusvattnet visade en tydlig selektion för multiresistenta *E. coli* medan det kommunala avloppsvattnet hade en mindre selektionseffekt. Studien diskuterar att den troliga drivkraften för resistensutvecklingen var de realtvt höga nivåer av antibiotika som finns i sjukhusavloppsvatten.

Orenat avloppsvatten är fördelaktigt för storskalig övervakning (Böhm *et al.* 2020). Vattnet innehåller avföringsbakterier från stora populationer där man kan screena bakterier från många olika människor i samma prov. Proverna ger representativa resultat och en bred täckning som kan ge tidiga indikationer avseende uppkomst eller spridningshastighet av olika resistenstyper, något som hade varit mycket resurskrävande och tagit lång tid via övervakning av enskilda kliniska fall.

I denna studie togs prover från vatten i anslutning till åkrar där gödsel nyligen spridits, detta för att ge underlag till om undersökning av indikatorbakterien *E. coli* kan användas för att bedöma påverkan av djurbesättningar på AMR i miljön. Flera studier har visat att förekomsten av resistenta bakterier och ARGs ökar efter att gödsel från antibiotikabehandlade djur sprids på åkern (Larsson & Flach 2022). Därför är det av intresse att undersöka hur detta påverkar närmiljön runt omkring svenska djurbesättningar som har låg antibiotikaanvändning.

2.5.3 Revidering av EU-lagstiftning

Under 2024 har diskussioner pågått angående revidering av EU-lagstiftning där utvidgad övervakning av AMR i miljön inkluderas (European Commission 2024). Förslaget uppmuntrar att stödja forskning om samband mellan antibiotika i miljön och AMR samt metoder som är både kostnadseffektiva och som kan hjälpa till att minska förekomst av AMR i gödsel och avloppsslam. Ett av målen som Europeiska miljöbyrån tillsammans med flertalet europeiska länder tog fram var att genomföra en pilotundersökning av AMR i ytvatten under 2024 och bygga kapacitet och erfarenhet för fortsatt övervakning i framtiden. Att göra ytvattenstudier är av intresse för att identifiera den minimala koncentrationen av antimikrobiella ämnen som selekterar för resistens (European Commission 2024). Även undersökning av närvaron av ARGs och antibiotika i lågt förorenade vattendrag är av intresse för att identifiera vilka bakterier som bär på ARGs. Målet är att kunna ta fram ett övervakningsprogram som ger underlag till ett urval av ARGs som ska övervakas i ytvatten i framtiden samt vilka urvalskriterier och metoder som ska användas (Nava *et al.* 2022).

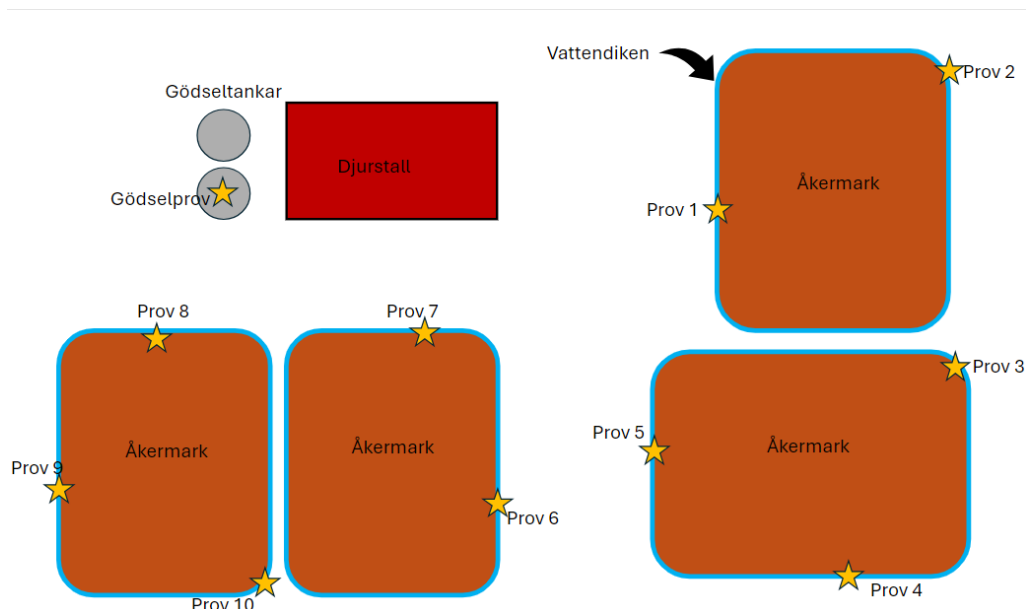
3. Material och Metod

3.1 Provtagning

3.1.1 Våren och hösten 2024

Under våren och hösten 2024 genomfördes provtagning vid olika gårdar i närheten av Uppsala. En grisbesättning och två mjölkbesättningar ingick i studien och vid varje gård togs ett gödselprov och tio vattenprover. Gödselprover togs med rena burkar ur gödseltanken och vattenprover togs med rena burkar från diken runt åkermark där gödsel från besättningen nyligen spridits, se figur 1 och 2. När vattnet samlades gjordes en initial grovfiltrering på plats genom ett kaffefilter, detta för att inte få med smuts och sand. Proverna märktes och dess lokalisation noterades. Provtagningen genomfördes en gång under våren och två gånger under hösten. Alla gårdar som ingår i studien har gett sitt godkännande till provtagningen, blivit informerade om syftet med provtagningen samt kommer förbli anonyma.

Med hjälp av kommunikation med gårdarna kunde provtagningen planeras in i anslutning till att gödsel spridits på åkermark. I samtliga provtagningar anpassades även provtagningen till att invänta nederbörd så att möjligheten gavs för avrinning av gödsel till diken runt åkermarken.



Figur 1. Figuren demonstrerar vart proverna togs under provtagningen. Figuren är fiktiv och ej av verklig skala.



Figur 2. Vatten samlat från diket runt åker från provtagen gård. Foto: privat

3.1.2 Tidigare provtagning, grisgårdar

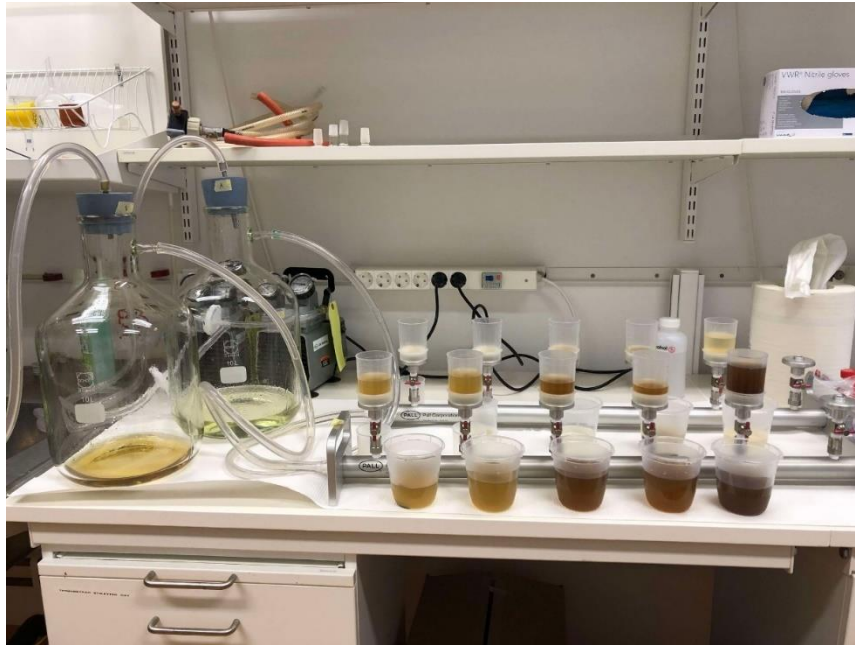
Under 2023 gjordes en liknande studie, baserat på 10 grisbesättningar, där provtagningen utfördes på samma sätt, från gödseltankar och i vattendiken i anslutning till åkermark där gödsel sprids. Dessa prover togs i juni samt i oktober under år 2023 men till skillnad från denna studies provtagning togs ingen hänsyn till när i tid gödslet spridits i anslutning till provtagningen. Datan från dessa provtagningar kommer att ingå även i denna studie för att ge mer underlag.

3.2 Bakterieodling och typning

Proverna transporterades till laboratoriet vid SLUs institution för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, där vattenproverna filtrerades genom sterila filter, porstorlek 0,45 μm (Filtertratt MicroFunnel 515-0050, Cytiva [Formely Pall Lab]) i en volym av cirka 300 ml per prov, se figur 3. För mer smutsiga prover kunde flera filter behövas för att klara av att filtrera hela volymen. Filtren tillsattes sedan till provrör med 25 ml buffrat peptonvatten (Oxoid Limited, Hampshire, United Kingdom) i varje prov som sedan skakades i cirka 10 minuter. Från den skakade buljongen gjordes primär-, sekundär- och tertiär-utstryk med hjälp av blåa öglor (10 μL) på selektiv-agar för *E. coli* på McConkey plattor (SVA, Uppsala, Sverige) som inkuberades i 37 grader C i 24 timmar. För gödseltanksproverna gjordes utstryket på samma sätt men direkt från provet då dessa ej filtrerades.

Dagen efter noterades tillväxten på varje McConkey platta och bedömdes antingen som sparsam (0-30 kolonier), måttlig (30-100 kolonier) eller riklig (>100 kolonier) växt. Tre olika kolonier från McConkey plattan renodlades på nötblodagar (SVA, Uppsala, Sverige) i 37 grader i 24 timmar, se figur 4. Kolonierna som valdes för renodling var ca 2-3 mm i diameter, runda och ljusrosa till färgen, då denna makromorfologi stämmer överens med *E. coli* (VetBact 2023). För renodlingen användes en vit ögla (1 µL) som försiktigt doppades i kolonin innan utstryket gjordes.

Med hjälp av MALDI-TOF kunde bakteriekolonierna från renodlingen typas dagen efter. MALDI-TOF masspektrometri är en teknik som används för bakterieidentifiering där analyser kan göras direkt från bakteriekolonier (VetBact 2023). Bakterieisolatet som tas direkt från bakteriekolonin adderas till en platta (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) där sedan ett matrix (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) i en volym av en mikroliter tillsätts. Sedan bestrålas plattan med ett laser UV-ljus. När lasern träffar isolatet sker en jonisering av molekylerna som fragmenteras till positivt laddade partiklar som rör sig mot en detektor. Beroende på fragmentens storlek och laddning kommer tiden att nå fram till detektorn variera, denna tid kallas time of flight och mäts. Resultatet blir för bakteriestammen ett karakteristiskt masspektrum som identifieras med hjälp av jämförelse mot lagrade referensvärden. Kolonierna som typades som *E. coli* frystes in i en BHI-buljong (Oxoid Limited, Hampshire, United Kingdom) innehållandes 17 % glycerol. Endast *E. coli* användes som indikatorbakterie då de anses bäst reflektera fekala föroreningar.



Figur 3. Filtrering av vattenproverna. Foto: privat



Figur 4. Renodling av E. coli på blodagar. Foto: privat

3.3 Resistensbestämning

När alla prover samlats in tinades de infrusna *E. coli*-stammarna och en ny renodling sattes på nötblod-agar i 37 grader C i 24 timmar. Resistensbestämningen gjordes sedan med mikrodilutionsmetod på EUVSENC-plattor (TREK Diagnostic Systems Ltd, East Grinstead, West Sussex, United Kingdom). Med en vit ögla togs en liten del från en *E. coli*-koloni och tillsattes i ett glasrör innehållande 1 ml milliq-vatten. Glasröret vortexades tills bakteriekolonin löst upp sig i milliq-vatten. Med hjälp av en spektrofotometer kan koncentrationen partiklar i vätskan mätas där optimala värdet ligger på 0,5 Mcf, (McFarland) och godtagbara värden mellan 0,48-0,55 Mcf. När vätskan nått godtagbar koncentration överfördes 10 mikroliter ur glasröret till ett plaströr innehållandes 11 ml Mueller Hinton-buljong (SVA, Uppsala, Sverige) som sedan vortexades.

Buljongen hälldes sedan ner i en tom Petriskål där 50 mikroliter i tolv doser pipetterades upp i fyra pipettspetsar med en flerkanalpipett. Doserna fördelades sedan lika i alla brunnar på resistensplattan. Innan resistensplattan förseglades med ett plastöverdrag användes en vit ögla för att ta upp del av innehållet i den positiva kontrollen. Denna ströks sedan på en blodagarplatta för att göra en täthetskontroll. Från buljongen i Petriskålen användes en blå ögla för att stryka ut innehållet på en blodagarplatta för renhetskontroll. Därefter inkuberades resistensplattan samt blodagarplattorna i 37 grader i 24 timmar följt av avläsning av plattorna. Därefter gjordes en avläsning av plattorna. För varje prov kontrollerades renhet och en täthet på ca 20-100 cfu på blodagarplattorna. Resistensplattan avlästes med hjälp av en spegel, se figur 5. Resistensbestämningen utgick från intervaller enligt EUVSEC plattorna (sensitiv) och gränsvärdena enligt EUCAST (MIC EUCAST u.å.). Undantag för sulfametoxazol där SVARM-gränsvärden används i brist på ECOFF (SVA u.å.). Figurer och tabeller har skapats genom datahantering i Microsoft Excel.



Figur 5. Avläsning av resistensplatta. Foto: privat

4. Resultat

4.1 Antal *E. coli*-stammar

4.1.1 Grisbesättningen

Provtagningen av grisbesättningen gjordes på våren cirka tio dagar efter gödsling och nederbörd hade hunnit falla vid flera tillfällen innan provtagningen. Proverna från gödseltanken hade kraftig växt av *E. coli*. Från vattenproverna isolerades två *E. coli*-stammar.

4.1.2 Mjölkkobesättning 1

Provtagningen av mjölkkobesättning 1 gjordes tidigt på hösten och delades upp på två tillfällen där tio prover togs per tillfälle. Första provtagningen gjordes cirka fem dagar efter gödsling där nederbörd hunnit falla vid ett tillfälle. Andra provtagningen gjordes cirka åtta dagar efter gödsling där nederbörd hade hunnit falla vid tre tillfällen. Proverna från gödseltanken hade kraftig växt av *E. coli*. Från vattenproverna isolerades fyra *E. coli*-stammar vid första tillfället och sex vid andra tillfället.

4.1.3 Mjölkkobesättning 2

Provtagningen av mjölkkobesättning 2 gjordes senare på hösten cirka sex dagar efter gödsling där nederbörd hunnit falla vid ett tillfälle innan provtagningen. Proverna från gödseltanken hade kraftig växt av *E. coli*. Från vattenproverna isolerades en *E. coli*-stam.

4.1.4 Tidigare provtagningar

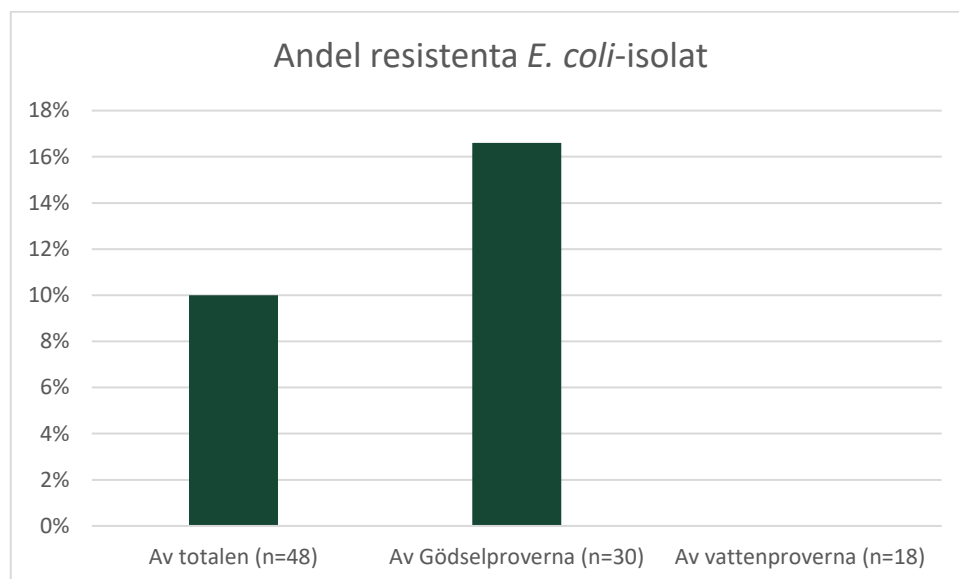
Vid den tidigare studien resistensbestämdes 26 stycken *E. coli*-isolat, varav fem hittades via vattenprover ute i miljön (tre från juni och 2 från oktober), resterande isolat härrörde från gödseltank. Den tidigare studiens provtagningar möttes av utmaningen av torra diken under juni månad där det var svårare att hitta tillräcklig mängd vatten i dikena. Under provtagningen i oktober hittades mer vatten i dikena men det var sparsamt med *E. coli*, de flesta bakterierna som hittades typades som övriga miljöbakterier.

4.2 Resultat resistensbestämning

Resultatet för både denna studie samt förra studien presenteras i figur 6-8. Av alla 48 *E. coli*-isolat var det fem isolat (10,4 %) som uppvisade MIC över de satta gränsvärdena, tre av dessa (60 %) uppvisade resistens mot tre eller flera olika antibiotika, vilket definieras som multidrug resistance (MDR). Det var betydligt

högre andel resistent isolat i gödselproverna än i vattenproverna, samtliga resistent isolat över cutoff-värdena kom från gödseltanken, inga isolat från miljön hade MIC som gick över gränsvärdena (se tabell 1). Andelen resistent isolat varierade för de olika substanserna, i figur 8 ses detta för de substanser där resistens påvisades. De resistenser som identifierades var mot ampicillin, tetracyclin, trimethoprim och sulfamethoxazole.

En sammanställning av distributionen av de olika MIC-värdena presenteras i figur 7. Denna typ av sammanställning förekommer frekvent, bland annat i den svenska övervakningen (SVA u.å.) för att ge en överblick och identifiera eventuella isolat som avviker markant från de övriga. Sådana isolat kan indikera förvärv av resistens egenskaper som annars inte är vanligt förekommande i den aktuella bakteriepopulationen. I figur 7 kan man observera att ett antal isolat uppvisar betydligt högre MIC-värden för vissa substanser, även om de ligger under cutoff-värdena.



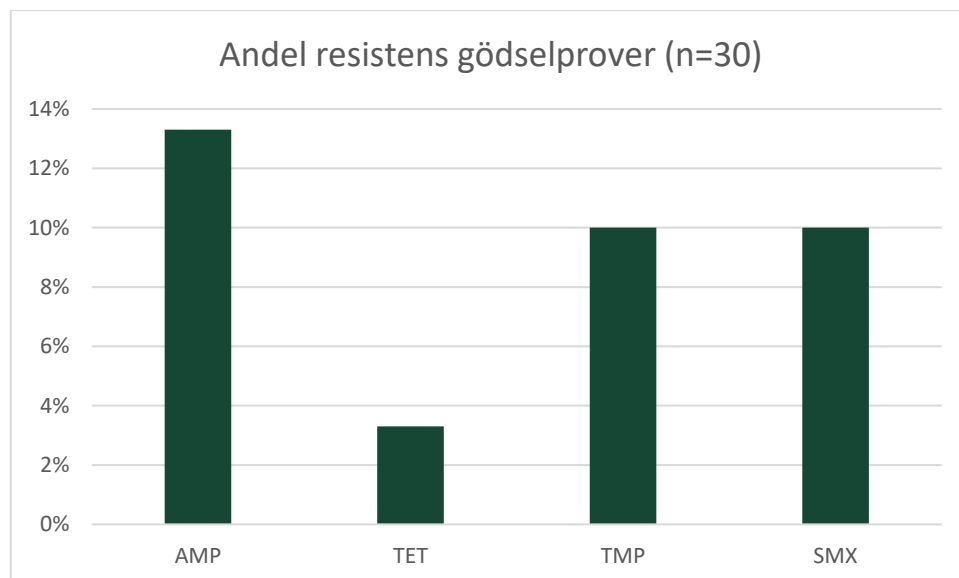
Figur 6. Stapeldiagram, andel resistent *E. coli*, över cutoff-värdena. Av de resistent isolaten härstammade alla från gödseltanken, inget isolat från miljön uppvisade dessa nivåer av resistens.

E.coli (n=48)	%R	0,08	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512
Ampicillin	8,3							2	8	33	1				4				
Amikacin	0								47			1							
Azitromycin	0							19		16	12		1						
Cefotaxime	0					47	1												
Ceftazidime	0					48													
Chloramphenicol	0									47			1						
Ciprofloxacin	0	22																	
Colistin	0						48												
Gentamicin	0						43	4	1										
Meropenem	0		47		1														
Nalidixic acid	0									47		1							
Sulfamethoxazole	6,3										22		18	4	1				3
Tetracycline	2,1								47										
Tigecycline	0					48										1			
Trimethoprim	6,3					17		22	6			1		2					

Figur 7. Sammanställning resistensbestämning. Blå rutor representerar intervaller enligt EUVSEC plattorna (sensitiv) och cutoff-värdena, markerade med en svart tjockare kant, enligt EUCAST med undantag för sulfametoxazol där SVARM-gränsvärden används

Tabell 1. Andel resistens över cutoff-värdena för AMP, TET, TMP, SMX fördelat mellan de olika provtagningsstillfällena samt mellan gödselproverna och vattenproverna.

	Mjölkgård 1		Mjölkgård 2		Grisgård		Tidigare studie	
	Vatten (n=10)	Gödsel (n=3)	Vatten (n=1)	Gödsel (n=3)	Vatten (n=2)	Gödsel (n=3)	Vatten (n=5)	Gödsel (n=21)
AMP	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	67 %	0 %	9,5 %
TET	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	67 %	0 %	4,7 %
TMP	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	4,7 %
SMX	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	67 %	0 %	4,7 %



Figur 8. Stapeldiagram, andel resistens över cutoff-värdena hos AMP, TET, TMP, SMX som identifierades hos gödselproverna.

5. Diskussion

5.1 Tolkning av prevalens antibiotikaresistens

De resistenser som hittades i denna resistensundersökning var mot ampicillin, sulfamethoxazole, och trimethoprim. I den tidigare studiens provtagning hittades liknande prevalens av resistens för samma antibiotika samt ett isolat med resistens mot tetracyklin. Resistens mot dessa antibiotika är väntat då de tillhör de vanligaste susbtanserna inom veterinärmedicin som används till lantbrukets djur (Sveriges Veterinärförbund 2021; SVA u.å.).

Resultatet från denna studie visar att den resistens som identifierades över cutoff-värdena härstammar från samma två isolat hittade i gödseltanken på grisbesättningen. Av de resistenser som påvisades i miljön var det inget isolat som hade resistens överstigande cutoff-värde. Förra studiens resultat hade tre resistenta isolat, även de identifierade från gödseltanken. Inga resistenser över cutoff-värden identifierades från de isolat som påvisades i miljön.

Sammantaget påträffades de högsta MIC-värdena i prover från gödseltanken, även om MIC-värdena i majoriteten av isolaten inte översteg cutoff-värdena för resistens. I vissa vattenprover identifierades isolat med högre MIC-värden än övrigt undersökta, men dessa låg fortfarande under cutoff. I ett antal andra vattenprover observerades dock högre MIC-värden än de som återfanns hos isolaten från gödselproverna. Orsaken till dessa variationer är svåra att fastställa då urvalet av isolat är så pass begränsat. Variationerna motsvarar dessutom endast ett steg i MIC skalan vilket är inom felmarginalen för metoden då det motsvarar ett titreringssteg. De isolerade bakterierna från miljön behöver inte heller vara relaterade till gödslingen.

5.2 Utvärdering av metod

Provtagningarna hade olika förutsättningar efter olika påverkande faktorer. Dels hur miljön runt åkermarken var utformad med mer eller mindre möjlighet för vatten att ansamlas. Även tid mellan gödslingen och provtagningen och väder med mer eller mindre nederbörd skiljde sig mellan provtagningstillfällena, något som kan ha påverkat hur mycket av avföringsbakterierna som hann nå vattenansamlingarna i diken. Dessa skillnader i provtagningen skulle kunna påverka resultatet och gör resultatet mer svårtolkat.

Av resultatet går det inte att dra några kopplingar relaterat till antibiotikaanvändningen på de aktuella gårdarna då detta ej har undersökts. En undersökning av

gårdarnas användning av antibiotika i relation till förekomsten av AMR skulle kunnat vara av intresse för mer underlag till studien.

I både den här studien samt den förra identifierades endast ett fåtal *E. coli*-isolat i miljön, något som kan ha haft med bakteriernas överlevnad i miljön att göra. För att ge en representativ bild av *E. coli* som kan återfinnas i miljön efter spridning av gödsel kan en relativt omedelbar avrinning krävas för att de fekala bakterierna ska finnas kvar i tillräcklig mängd med bevarad resistensprofil. Det kan även vara så att det inte blir så mycket avrinning från åkern om man sprider gödslet rätt. Syftet är att gödslet ska ner i jorden och då kommer inte bakterierna nå vattendrag. På Jordbruksverket (SJV 2023) finns regler hur avrinning ska undvikas efter gödsling, detta är motiverat av att minska förlust av kväve och fosfor från åkern via avrinning, men fungerar i sammanhanget även för bakterier.

Bakterierna som tar sig vidare från åkern kan eventuellt växa till i miljön men kommer behöva någon form av näring och lämplig temperatur för att överleva. Detta eftersom bakterierna trivs bäst i en miljö som liknar tarmens mikrobiota. Vid låga temperaturer kommer bakterierna inte att växa till i diket, och hinner avklinga och spädas ut innan de blir isolerade vid provtagning. En viss avdödning kan förväntas i alla temperaturer men kompenseras med tillväxt vid varmare temperaturer. Vid frystemperaturer kan dock de isolat som överlevt bevaras bra, men att frysa och tina isolat i omgångar är inte heller optimalt då det leder till en snabbare död.

E. coli-stammarna som isolerades från vattenproverna antas i detta fall ha en korrelation med avföringsbakterierna från gödsel som spridits på åkern. Dock kan dessa bakterier ha kommit från andra vilda djur som rör sig i miljön som provtogs. Proverna kan alltså representera avrinning från åkern men även avrinning från andra miljöer med andra källor för kontamination. Därför kan en korskontamination skett som gör det svårare dra slutsatsen att dessa *E. coli* kommer från besättningens gödsel. Att kunna se utsläpp från djurbesättningarna är en förutsättning för att kunna använda miljöprovtagning för att se djurbesättningarnas påverkan på förekomst av resistent bakterier i miljön. Så om denna koppling ej går att säkerställa är metodens funktion begränsad.

För att undvika punktprover ansågs vattenprover mer representativa snarare än prover från jord och slam. Förhoppningen var att vattnet bättre reflekterar vad som finns i miljön då vattnets rörlighet ger möjlighet till att undersöka vad som flyter omkring i ett större område och avrinning från olika håll är möjligt. Något som inte jord-och slamprover visar på samma sätt.

Ytterligare utmaningar vid provtagning, särskilt när prover tas längre bort från källan, i detta fall djuren, skulle kunna antas vara en ökad risk för att resistensprofilen hos bakterierna inte är densamma. Detta eftersom att miljön erbjuder en risk mångfald av gener, och bakterier har förmågan att förvärva dessa genom horisontell överföring (Larsson & Flach 2022). Samt eftersom att vissa ARGs inte längre är fördelaktiga i frånvaro av antibiotika och kan då istället tappas (Reygaert 2018). Därför kan man anta att bakterier både förvärvar och förlorar resistensgener under sin resa i miljön.

Den initiala filtreringen av proverna som gjordes på plats vid provtagnings-tillfället har varierat mellan provtagningarna. Vid vissa provtagningar har ingen initial filtrering gjorts medan vid andra tillfällen har proverna filtrerats med antingen ett grovmaskigt filter eller ett finmaskigt filter. Huruvida detta har påverkat förekomsten av *E. coli* i proverna är oklart, men en standardisering av metod för filtrering bör sättas upp för att kunna jämföra resultat mer noggrant. Hur rena proverna ska vara för optimal analys kan vara fördelaktigt att undersöka då det gäller att inte få med för mycket smuts från provtagningsplatsen men ändå tillräcklig mängd bakterier. En del av dilemmat är även att bakterier kan förväntas sitta i slammet och inte flyta runt fritt i vattnet.

Ur ett kostnadseffektivt perspektiv är metoden som använts i studien inte optimal. Provtagningen kräver mycket tid och planering då många faktorer ska samverka. För att säkerställa att provtagningen har optimala förutsättningar krävs en god kommunikation med djur-och markägaren för att synkronisera gödslingen och provtagningen. Dessutom påverkas provtagningen av faktorer som är svåra att förutbestämma, så som nederbörd vilket är en förutsättning för att möjliggöra avrinning, något som bör ske i nära i tid efter gödslingen för att bakterierna ska överleva och finnas kvar i miljön. Laboratoriearbetet som innefattar isolering av *E. coli* samt resistensbestämning kräver flera dagars arbete och inköp av specifikt material och utrustning. Både i den aktuella studien samt föregående studie har endast ett begränsat antal *E. coli* identifierats från miljön, och resistensbestämningarna har visat att resistensnivåerna hos dessa varit under cut-off. Därmed ifrågasätts metodens kostnadseffektivitet då de erhållna resultaten inte ger tillräcklig grund för att dra några signifikanta slutsatser.

Vid bristande slutsatser och om denna typ av miljöprovtagning bedöms ineffektiv skulle ett alternativ vara att endast provta djuren i besättningen för att undersöka vad som kan potentiellt spridas vidare, och därefter jobba med förebyggande åtgärder. Hur denna provtagning skulle gå till kan diskuteras, eventuellt skulle sockprover samla upp tillräckligt representativa prover i djurstallar, men som även i detta fall blir ett typ av punktprov som endast visar en punktprevalens av vad

som finns i besättningen. Eventuellt skulle prover från gödseltanken kunna jämföras med sockproverna för att undersöka om det finns skillnader och ge underlag om resistensutvecklingen under tid.

5.2.1 Framtida miljöövervakning av AMR

Som tidigare nämnts står den framtida miljöövervakningen av AMR inför utmaningar. Som Bengtsson-Palme *et al.* (2023) lyfter fram krävs både tydliga syften med övervakningen samt identifiering av relevanta platser att provta. Utan tydliga mål finns det risk att övervakningen blir för omfattande och praktiskt ogenomförbar. Metoden kan behöva skilja sig beroende på om syftet är att spåra effekter av mänsklig aktivitet, att bedöma miljörisker eller för att utvärdera insatta åtgärder. Metoden bör alltså vara lämplig för att nå uppsatta mål, vara ekonomiskt genomförbart samt ge resultat inom en tidsram som möjliggör eventuella åtgärder.

I Bengtsson-Palme *et al.* (2023) diskuterar även författarna att relevanta platser att provta är de med nära koppling till människor och djur. AMR på orörda platser kommer finnas naturligt men orsakar oftast inga problem om det inte riskerar att spridas vidare till människor eller djur. Därför bör övervakningen fokuseras på platser där detta är en risk. Avloppsreningsverk, jordbruk och sjukhus är exempel på sådana platser, dessa miljöer är även relevanta då det finns möjligheter att reglera och begränsa flödet med resistenta bakterier genom förändringar och lösningar inom produktionsledet. Samma artikel presenterar även riktlinjer för framtida forskning som kan främja utvecklingen av miljöövervakning av AMR. En viktig aspekt är att fastställa hur olika metoder för AMR övervakning ska jämföras, detta för möjligheten att ta del av varandras resultat. Det föreslås även att patogencentrerade databaser för ARGs bör kompletteras med data från miljöns mikrobiota för att identifiera nya ARGs.

Att identifiera typiska nivåer av AMR i olika miljöer och undersöka under vilka omständigheter det fortfarande är fördelaktigt för bakterierna att bära på ARGs i avsaknad av antibiotikatillförsel till miljön kan vara en ledtråd till hur övervakningen bör utformas. Ett fastställande av i vilken utsträckning det finns samband mellan fekala föroreningar och latent ARGs i miljön skulle kunna indikera när utökade provtagningar bör göras av specifika miljöer.

I artikeln Abramova *et al.* (2023) lyfter författarna att framtida övervakning kräver mer data och referensnivåer av ARGs i olika miljöer, samt för att förstå långsiktig antibiotikaresistensutveckling i miljön krävs det analyser av förändringarna i mängden ARGs över tid och därför finns behovet av tidsseriedata. Som tidigare nämnts uppmärksammar författarna qPCR-teknik som en lovande metod då den är mycket känslig och kan upptäcka låga nivåer av ARGs, den har

även förmågan att detektera ARGs i både odlingsbara men även icke odlingsbara bakterier. Dock är qPCR på många prover kostsamt och detekterar endast specifika gener vilket är något att ha i åtanke.

I artikeln Hart *et al.* (2023) frågar sig författarna om en resistent organism måste vara en känd patogen för att vara av intresse för AMR-övervakning. Exponering för dessa organismer sker även de kontinuerligt via vistelse i miljön exempelvis i samband med bad. Det finns för närvarande ett stor kunskapslucka kring vilka risker som finns med att bära resistent bakterier från miljön, författarna anser att det behövs mer data om exponeringsvägar och eventuella samband för olika hälsoutfall.

I samma artikel diskuteras möjligheterna att utföra riktade insatser på platser med hög AMR-belastning, för att dessa platser ska kunna identifieras kan andra metoder vara till hjälp, allt ifrån visuella observationer, kemiska markörer eller mikrobiell spårning. Något relativt nytt är förslaget att fastställa antimikrobiella ämnens "minimum selection concentrations", (MSC), vilket representerar den lägsta koncentrationen där resistent bakterier har en konkurrensfördel över icke-resistent bakterier, vid denna koncentration är det inte längre en nackdel att bära på resistensgenen utifrån ett tillväxtperspektiv. MSC kan sedan användas som ett verktyg för reglering och policy där värdena kan användas för att utforma utsläppsgränser till miljön. Eftersom MSC ger en mer specifik insikt i selektionsstryck kan den tänkas vara ett mer relevant mått för framtida övervakning för att förebygga resistensspridning. Jämfört med MIC som informerar om den koncentration antibiotika som behövs för att förhindra bakterietillväxt informerar MSC mer specifikt om när resistensgenerna ger en konkurrensfördel och ökar selektionstrycket. Idag finns det få ämnen för vilka MSC finns fastställda och metoderna är fortfarande under utveckling. (Hart *et al.* 2023)

5.2.2 Framtida svensk övervakning av AMR

Den AMR-övervakning som genomförs på djur i Sverige idag omfattar bland annat de övervakningsprogram som tagits fram av EFSA och SVA (Swedres-Svarm). EFSA:s övervakningsprogram är ett EU-omfattande initiativ där data från nationella övervakningsprogram från medlemsländerna sammanställs, inklusive de svenska resultaten från Swedres-Svarm. I den svenska övervakningen undersöks antibiotikakänslighet hos zoonotiska bakterier, indikatorbakterier från friska djur samt hos bakterier som orsakar sjukdom hos djur. (SVA u.å.; EFSA 2024)

Enligt EFSA:s övervakningsprogram ska *E.coli* användas som indikatorbakterie och proverna tas från slumpmässigt valda friska djur där resultaten kan indikera hur antibiotikaanvändningen över tid har påverkat den normala bakteriefloran hos

djuren. Provtagningarna sker regelbundet och omfattar bland annat tarmprover från slaktkycklingar och slaktsvin samt köttprover från gris och nötkreatur. De isolerade bakterierna resistensundersöks och resultaten jämförs med de fastställda gränsvärdena enligt EUCAST. Syftet med övervakningen är att hålla koll på mönster i AMR-utvecklingen samt för att utvärdera insatta åtgärder för att minska AMR. (SVA u.å.; EFSA 2024)

I brist på effektiva metoder för miljöövervakning av AMR skulle en fortsatt och eventuell utökad provtagning av djur potentiellt vara ett bättre alternativ. Detta gäller särskilt i länder som Sverige där den rapporterade användningen av antibiotika är låg i jämförelse med andra länder. Därför kan det vara mer motiverat att prioritera resurser för övervakning av AMR direkt i djurbesättningar för att undersöka hur resistensläget ser ut och vad som eventuellt kan spridas vidare i miljön. I länder med en hög rapporterad antibiotikaanvändning och utveckling av AMR kan miljöövervakning vara mer motiverat, framför allt i länder med bristande infrastruktur och ökade risker kopplat till miljö.

5.3 Begränsningar och bias

Denna studie är ett examensarbete och är därför begränsad på flera sätt. Studien var begränsad i både tid och resurser där endast ett fåtal gårdar provtagits med ett begränsat antal prov. Antalet besättningar är för litet för att möjliggöra en detaljerad analys av flera prover och bedöma direkt koppling mellan olika prover från samma besättning. Begränsningen i antal besättningar gör att studien är att betrakta som en pilotstudie.

Eftersom endast gårdar i närheten av Uppsala har provtagits blir det ett visst selektionsbias och urvalet är ej representativt för djurpopulationen, något som inte heller var syftet med studien då den endast var en pilotstudie. Eftersom antalet besättningar är lågt är även precisionen hos studien låg.

6. Slutsatser

AMR utgör ett växande problem där miljöövervakning har lyfts fram som en viktig men fortfarande underutvecklad komponent i den övergripande övervakningen av AMR. Det finns idag omfattande kunskapsluckor gällande miljöns roll i spridning och utveckling av AMR, och det saknas standardiserade metoder för övervakning.

De genomförda mätningarna i denna studie visade en relativt låg förekomst av resistens bland de identifierade *E. coli*-isolaten. Resistenserna som observerades rörde sig främst om ampicillin, tetracyklin, sulfamethoxazole och trimetoprim, som är bland de mest använda antibiotika hos svenska lantbruksdjur. De resistenta isolaten som överskred gränsvärdena påträffades i gödseltanken medan inget av isolaten från miljön översteg dessa gränsvärden. Flertalet av de resistenta isolaten uppvisade dessutom MDR, dvs flera av de påvisade resistenserna sågs hos samma isolat.

På grund av urvalets storlek samt studiens begränsningar kan inga signifikanta slutsatser dras angående metodens förmåga att identifiera *E. coli* i miljön som kan kopplas till djurbesättningen, eller hur de funna isolaten reflekterar besättningens påverkan på miljön. Metodens effektivitet med hänsyn till både resultat och kostnad bör därför ifrågasättas och alternativa metoder kan vara att föredra.

Framtida miljöövervakning av AMR kommer att möta flera utmaningar och kommer att behöva definiera tydliga provtagningsmål samt identifiera relevanta miljöer för provtagning. Mer data och referensvärden gällande ARGs på olika platser i miljön skulle underlätta framtida övervakning. Upprepade mätningar över tid krävs även för att få insikt i långsiktiga effekter av AMR i miljön.

Referenser

- Bengtsson-Palme, J., Abramova, A., Berendonk, T.U., Coelho, L.P., Forslund, S.K., Gschwind, R., Heikinheimo, A., Jarquín-Díaz, V.H., Khan, A.A., Klümper, U., Löber, U., Nekoro, M., Osińska, A.D., Ugarcina Perovic, S., Pitkänen, T., Rødland, E.K., Ruppé, E., Wasteson, Y., Wester, A.L. & Zahra, R. (2023). Towards monitoring of antimicrobial resistance in the environment: For what reasons, how to implement it, and what are the data needs? *Environment International*, 178, 108089. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108089>
- Bengtsson-Palme, J. & Larsson, D. (2015). Antibiotic resistance genes in the environment: prioritizing risks. *Nature Reviews. Microbiology*, 13 (6). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3399-c1>
- Bengtsson-Palme, J. & Larsson, D.G.J. (2016). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environment International*, 86, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015>
- Browne, A.J., Chipeta, M.G., Haines-Woodhouse, G., Kumaran, E.P.A., Hamadani, B.H.K., Zaraa, S., Henry, N.J., Deshpande, A., Reiner, R.C., Day, N.P.J., Lopez, A.D., Dunachie, S., Moore, C.E., Stergachis, A., Hay, S.I. & Dolecek, C. (2021). Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. *The Lancet Planetary Health*, 5 (12), e893–e904. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00280-1](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00280-1)
- Böhm, M.-E., Razavi, M., Marathe, N.P., Flach, C.-F. & Larsson, D.G.J. (2020). Discovery of a novel integron-borne aminoglycoside resistance gene present in clinical pathogens by screening environmental bacterial communities. *Microbiome*, 8 (1), 41. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00814-z>
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A. & Buschmann, A.H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15 (7), 1917–1942. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>
- Clardy, J., Fischbach, M.A. & Currie, C.R. (2009). The natural history of antibiotics. *Current Biology*, 19 (11), R437–R441. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.001>
- Collignon, P., Beggs, J.J., Walsh, T.R., Gandra, S. & Laxminarayan, R. (2018). Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *The Lancet. Planetary Health*, 2 (9). [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30186-4](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30186-4)
- D’Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W.L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N. & Wright, G.D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477 (7365), 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>

- EFSA (2024). *Monitoring AMR in Escherichia coli*. ArcGIS StoryMaps. <https://storymaps.arcgis.com/stories/788684f1e7cd48f09238101536577dc4> [2024-12-10]
- EFSA, E.F.S. (2019). Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food. *EFSA Journal*, 17 (6), e05709. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5709>
- EMA/CVMP (2020). *Categorisation of antibiotics used in animals*. <https://www.ema.europa.eu/en/news/categorisation-antibiotics-used-animals-promotes-responsible-use-protect-public-and-animal-health> [2024-10-14]
- EU 2019/6 (2018). Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC. <http://data.europa.eu/eli/reg/2019/6/oj>
- European Commission (2024). *Update on AMR-related issues in several environmental policy contexts*. https://ec.europa.eu/assets/sante/health/amr/docs/amr_20240229_co04_en.pdf
- Folkhälsomyndigheten (2016). *Sjukdomsinformation om bakterier med Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)*. <https://www.folkhalsomyndigheten.se/smittskydd-beredskap/smittsamma-sjukdomar/extended-spectrum-beta-lactamase-esbl/> [2024-09-19]
- Gekenidis, M.-T., Kläui, A., Smalla, K. & Drissner, D. (2020). Transferable extended-spectrum β -lactamase (ESBL) plasmids in Enterobacteriaceae from irrigation water. *Microorganisms*, 8 (7), 978. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070978>
- GLASS report (2022). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702> [2024-10-17]
- Grundin, J., Blanco Penedo, I., Fall, N. & Sternberg Lewerin, S. (2020). "The Swedish experience" – a summary on the Swedish efforts towards a low and prudent use of antibiotics in animal production. *SLU Framtidens djur, natur och hälsas rapportserie*, (5). <https://res.slu.se/id/publ/105237> [2024-10-14]
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D. & Andersson, D.I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens*, 7 (7), e1002158. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>
- Hart, A., Warren, J., Wilkinson, H. & Schmidt, W. (2023). Environmental surveillance of antimicrobial resistance (AMR), perspectives from a national environmental regulator in 2023. *Eurosurveillance*, 28 (11), 2200367. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.11.2200367>
- Heuer, H. & Smalla, K. (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental Microbiology*, 9 (3), 657–666. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x>

- Huang, X., Liu, C., Li, K., Liu, F., Liao, D., Liu, L., Zhu, G. & Liao, J. (2013). Occurrence and distribution of veterinary antibiotics and tetracycline resistance genes in farmland soils around swine feedlots in Fujian Province, China. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20 (12). <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1905-5>
- Iskandar, K., Molinier, L., Hallit, S., Sartelli, M., Catena, F., Coccolini, F., Hardcastle, T.C., Roques, C. & Salameh, P. (2020). Drivers of antibiotic resistance transmission in low- and middle-income countries from a "One Health" Perspective - A review. *Antibiotics (Basel)*, 9 (7), 372-. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070372>
- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W. & Smalla, K. (2014a). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*, 22 (9), 536–545. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>
- Jechalke, S., Schreiter, S., Wolters, B., Dealtry, S., Heuer, H. & Smalla, K. (2014b). Widespread dissemination of class 1 integron components in soils and related ecosystems as revealed by cultivation-independent analysis. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00420>
- Klümper, U., Riber, L., Dechesne, A., Sannazzarro, A., Hansen, L.H., Sørensen, S.J. & Smets, B.F. (2015). Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. *The ISME Journal*, 9 (4), 934–945. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.191>
- Krapuner, N., Hutinel, M., Schumacher, K., Gray, D.A., Genheden, M., Fick, J., Flach, C.-F. & Larsson, D.G.J. (2021). Evidence for selection of multi-resistant E. coli by hospital effluent. *Environment International*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106436>
- Larsson, D.G.J. & Flach, C.-F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20 (5), 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Livsmedelsverket (2023). *Escherichia coli*. Kontrollwiki - Fördjupning från Livsmedelsverket. [https://kontrollwiki.livsmedelsverket.se/artikel/154/escherichia-coli- \[2024-12-03\]](https://kontrollwiki.livsmedelsverket.se/artikel/154/escherichia-coli- [2024-12-03])
- Löffler, P., Escher, B.I., Baduel, C., Virta, M.P. & Lai, F.Y. (2023). Antimicrobial transformation products in the aquatic environment: global occurrence, ecotoxicological risks, and potential of antibiotic resistance. *Environmental Science & Technology*, 57 (26), 9474–9494. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c09854>
- Mackenzie, J.S. & Jeggo, M. (2019). The One Health approach—Why is it so important? *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4 (2), 88. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020088>
- Martinez, J.L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276 (1667), 2521–2530. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0320>

- MIC EUCAST (u.å.). *Antimicrobial wild type distributions of microorganisms*.
https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecies%5D=261&search%5Bdisk_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50 [2024-11-11]
- Murray, Christopher J.L. & et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399 (10325), 629–655.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nava, A.R., Daneshian, L. & Sarma, H. (2022). Antibiotic resistant genes in the environment-exploring surveillance methods and sustainable remediation strategies of antibiotics and ARGs. *Environmental Research*, 215, 114212-.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114212>
- Nguyen, A.Q., Vu, H.P., Nguyen, L.N., Wang, Q., Djordjevic, S.P., Donner, E., Yin, H. & Nghiem, L.D. (2021). Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater treatment: Current strategies and future challenges. *The Science of the Total Environment*, 783. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146964>
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P. & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6 (4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>
- Reygaert, W.C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4 (3), 482–501.
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Schulz, F., Eloe-Fadros, E.A., Bowers, R.M., Jarett, J., Nielsen, T., Ivanova, N.N., Kyrpides, N.C. & Woyke, T. (2017). Towards a balanced view of the bacterial tree of life. *Microbiome*, 5 (1), 140. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0360-9>
- Sengeløv, G., Agersø, Y., Halling-Sørensen, B., Baloda, S.B., Andersen, J.S. & Jensen, L.B. (2003). Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment International*, 28 (7).
[https://doi.org/10.1016/s0160-4120\(02\)00084-3](https://doi.org/10.1016/s0160-4120(02)00084-3)
- Shintani, M., Nour, E., Elsayed, T., Blau, K., Wall, I., Jechalke, S., Spröer, C., Bunk, B., Overmann, J. & Smalla, K. (2020). Plant species-dependent increased abundance and diversity of IncP-1 plasmids in the rhizosphere: New insights into their role and ecology. *Frontiers in Microbiology*, 11, 590776.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.590776>
- SJV (2023). *Sprida gödsel*. [text].
<https://jordbruksverket.se/vaxter/odling/vaxtnaring/sprida-godselsel> [2025-01-07]
- SJVFS 2023:21. *Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd om veterinärs ordination av läkemedel, djurhållares registrering av uppgifter samt operativa ingrepp som djurhållare får utföra*. (Saknr D 35/L 41). Statens jordbruksverk.
- SVA (u.å.). *Swedres-Svarm*.
<https://www.sva.se/amnesomraden/antibiotika/overvakning/swedres-svarm/> [2024-11-18]

- Sveriges Veterinärförbund (2021). *Antibiotikariktlinjer nötkreatur och gris*.
<https://www.svf.se/forbundet/policydokument/antibiotikapolicy/antibiotikariktlinjer-notkreatur-och-gris/> [2024-09-23]
- VetBact (2023). *E. coli*. <https://www.vetbact.org/species/68> [2024-09-19]
- WHO (2023). *Antimicrobial resistance*. World Health Organization.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> [2024-09-11]
- WOAH (2024a). *Antimicrobial resistance*. World Organisation for Animal Health.
<https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/antimicrobial-resistance/> [2024-12-12]
- WOAH (2024b). Eighth annual report on antimicrobial agents intended for use in animals. *AMR Insights*. World Organisation for Animal Health. <https://www.amr-insights.eu/eighth-annual-report-on-antimicrobial-agents-intended-for-use-in-animals/> [2024-10-17]
- Zhao, C., Wang, Y., Mulchandani, R. & Van Boeckel, T.P. (2024). Global surveillance of antimicrobial resistance in food animals using priority drugs maps. *Nature Communications*, 15 (1), 763. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45111-7>
- Zhou, S., Xiong, C., Su, Y., Wang, Y., Gao, Y., Tang, Z., Liu, B., Wu, Y. & Duan, Y. (2022). Antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in uranium mine: Distribution and influencing factors. *Environmental Pollution*, 304, 119158. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119158>

Populärvetenskaplig sammanfattning

Antimikrobiellresistens innebär att bakterier utvecklar resistens och blir motståndskraftiga mot läkemedel som antibiotika, vilket gör att dessa läkemedel inte längre fungerar. Antibiotikaresistenta bakterier kan därför överleva och fortsätta spridas trots behandling med antibiotika. Resistens kan uppkomma genom förändringar i bakteriernas egen arvs massa eller genom upptag av främmande gener från andra mikroorganismer. Vid närvaro av antibiotika skapas ett selektionstryck där de bakterier som har gener för resistens konkurrerar ut de som inte har det.

Idag ser vi en ökning både i användningen av antibiotika och spridning av antibiotikaresistens. Den ökade resistensen gör det svårare att behandla vissa infektioner, vilket leder till fler dödsfall och ökat lidande. Därför betraktas antibiotikaresistens som ett allvarligt och globalt hot, och det är viktigt att vidta åtgärder för att bromsa denna utveckling. För att veta vart dessa åtgärder ska riktas är det avgörande att identifiera riskmiljöer och mönster i spridningen. Därför är övervakningen av antibiotikaresistens ett viktigt verktyg.

Vi vet idag att den globala hälsan mellan människor, djur och miljö är nära sammanlänkade och påverkar varandra enligt det som kallas One Health-konceptet. Detta gäller även antibiotikaresistens som kan spridas mellan människor, djur och miljö. Det finns fortfarande mycket vi inte vet om miljöns roll i spridningen samt utvecklingen av antibiotikaresistens, och i dagsläget finns det inga standardiserade metoder för att följa upp detta.

Denna studie är ett pilotprojekt som syftar till att undersöka hur man kan övervaka resistens i miljön. Djur som behandlats med antibiotika kan utsöndra rester av antibiotikan samt resistenta bakterier genom urin och avföring. Eftersom avföring från lantbruksdjur ofta används som gödsel och sprids på åkrar kan det medföra en ökad risk för spridning av antibiotikaresistenta bakterier till miljön. Målet med studien är att utvärdera miljöprovtagning i närheten av djurbesättningar som en del av bedömningen av resistensrisker och miljöbelastning som orsakas av resistenta bakterier från djuranläggningar.

I denna studie samlades prover från gödseltanken på olika gris- och mjölkko-gårdar samt vattenprover från diken runt åkermark där gödsel från dessa besättningar nyligen spridits. Proverna bearbetades på laboratorium där bakterien *Escherichia coli* togs fram för att användas som indikatorbakterie, detta eftersom denna bakterie anses bäst avspegla föroreningar från avföring. Dessa bakterier resistensbestämdes sedan med hjälp av speciella plattor där bakterien tillsattes i små brunnar innehållande olika antibiotika i olika koncentrationer. Efter ett dygn lästes plattor-

na av för att se vart bakterien växt. Om bakterien inte växte visade den ingen resistens och bedöms som känslig för den koncentrationen av den antibiotikan. Om bakterien växte bedömdes bakterien som okänslig för just den koncentrationen av den antibiotikan.

Resultatet av resistensbestämningen presenteras tillsammans med data från en tidigare provtagning året innan som utförts på samma sätt. Totalt resistensbestämde 48 bakterier varav fem bakterier (10,4 %) uppvisade resistensnivåer som översteg de fastställda gränsvärdena för resistens. De identifierade resistenserna omfattade följande antibiotikum, ampicillin, tetracyclin, trimethoprim och sulfamethoxazole, vilka är bland de vanligaste antibiotikumen som används inom veterinärmedicin. Bland de fem resistenta bakterierna visade tre (60 %) egenskaper för multiresistens vilket innebar att samma bakterie var okänslig mot minst tre olika antibiotikum. De bakterier som uppvisade resistenser över gränsvärdena var alla från gödseltanken hos djurbesättningarna och ingen bakterie från miljön visade dessa nivåer av resistens.

Det är svårt att dra slutsatser från detta resultat på grund av studiens begränsningar samt den relativt lilla mängd bakterier som hittades. Fler provtagningar och fler bakterier för resistensbestämning hade behövts för att bättre kunna undersöka hur väl metoden speglar gödslingens påverkan på miljön. Upprepade mätningar över tid hade även varit nödvändigt för att kunna undersöka utvecklingen av resistens i miljön. Med tanke på metodens begränsningar och effektivitet kan alternativa metoder vara att föredra.

De huvudsakliga utmaningarna för framtida miljöövervakning av antibiotikaresistens är att identifiera tydliga mål och miljöer att provta. Det behövs också gemensamma enheter för referensvärden så att studier lättare kan jämföras. En större databas med information gällande naturliga nivåer av antibiotikaresistens från både orörda samt mänskligt påverkade miljöer hade varit värdefullt för att följa upp hur dessa nivåer förändras över tid. Riktade miljöövervakningar på särskilda riskmiljöer kan även vara fördelaktigt för att kunna sätta in både kort- och långsiktiga åtgärder.

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU kan publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver i sådana fall godkänna publiceringen. I samband med att du godkänner publicering kommer SLU även att behandla dina personuppgifter (namn) för att göra arbetet sökbart på internet. Du kan närsomhelst återkalla ditt godkännande genom att kontakta biblioteket.

Även om du väljer att inte publicera arbetet eller återkallar ditt godkännande så kommer det arkiveras digitalt enligt arkivlagstiftningen.

Du hittar länkar till SLU:s publiceringsavtal och SLU:s behandling av personuppgifter och dina rättigheter på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>

JA, jag har läst och godkänner avtalet för publicering samt den personuppgiftsbehandling som sker i samband med detta

NEJ, jag ger inte min tillåtelse till att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.