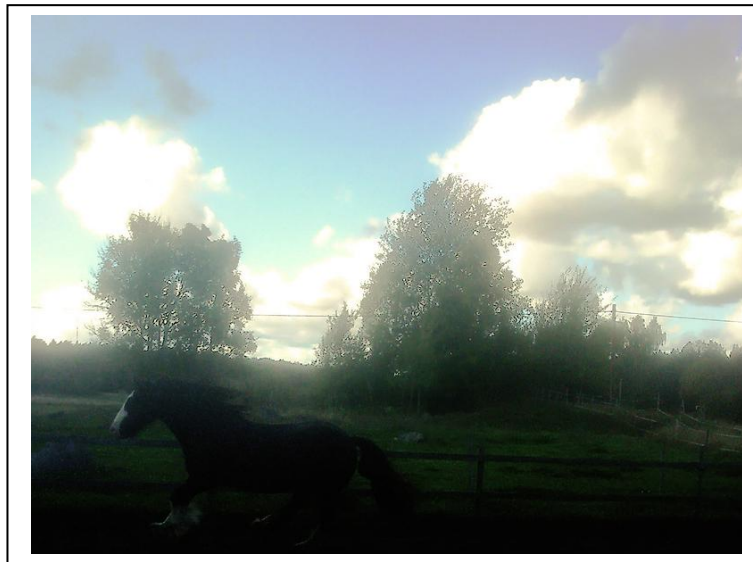




Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## ESBL hos hästar i Europa

*Anna Norinder*



---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013: 56

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## ESBL hos hästar i Europa

ESBL in horses in Europe

*Anna Norinder*

**Handledare:**

Susanna Sternberg Lewerin, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Examinator:**

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2013

**Omslagsbild:** Anna Norinder

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013: 56  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

**On-line publicering:** <http://epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** ESBL, antibiotikaresistens, multiresistens, häst, riskfaktorer

**Key words:** ESBL, antibiotic resistance, multidrug resistance, horses, risk factors



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning.....	3
Material och metoder.....	3
Litteraturoversikt.....	3
$\beta$ -laktamaser .....	3
Extended-spectrum $\beta$ -lactamases .....	4
ESBL hos häst .....	6
Diskussion .....	10
Påvisande av ESBL .....	10
ESBL-typer.....	11
Riskfaktorer .....	12
Litteraturförteckning .....	14



## SAMMANFATTNING

”Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases” (ESBL) är idag ett stort problem inom humanmedicinen men börjar även skapa problem inom veterinärmedicinen. ESBL-produktion hos bakterier medför resistens mot cefalosporiner av 3:e generationen, som är viktiga antibiotika mot infektioner med gramnegativa bakterier. Resistensen är överförbar mellan bakterier, och spridning från djur till människor kan ske. Ofta är bakterier med ESBL-produktion samtidigt resistenta mot flera andra grupper av antibiotika. Multiresistensen hotar vår förmåga att kunna behandla bakterieinfektioner, speciellt hos hästar där valet av antibiotika redan är begränsat. Svårbehandlade infektioner med ESBL-producerande bakterier har i flera fall beskrivits med allvarliga och ibland dödliga konsekvenser hos hästar.

Problemen med ESBL-producerande bakterier hos häst i Sverige är ännu små, endast ett fåtal ESBL-positiva kliniska prover har påvisats de senaste åren. I andra europeiska länder finns det dock studier gjorda på förekomst och potentiella riskfaktorer. I dessa studier är en typ av ESBL överlägset vanligast konstaterad i både kliniska prover och faecesprover från friska hästar, och den tillhör samma grupp som den typ som är vanligast förekommande hos människor. *Escherichia coli* i träckprover används ofta som en indikator på resistensläget i tarmfloran och karakteriserade riskfaktorer associerade med ESBL-förekomst och multiresistens hos dessa bakterier varierar mellan studierna. Riskfaktorerna går ofta inte att särskilja på grund av för litet urval, men har ofta ett samband med klinikvistelse eller antibiotikabehandling av den provtagna hästen eller hästar i dess närmiljö.

## **SUMMARY**

The threat from antimicrobial resistance is an important and growing problem. There is cause for concern regarding the ability to treat important bacterial infections. Production of "Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases" (ESBL) in bacteria confers transmissible resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics including third generation cephalosporins, an important group of antibiotics in both human and veterinary medicine. In addition bacteria with ESBL often show resistance to a wide number of antibiotic classes, further limiting the options for effective treatments. ESBL is spread among bacteria in humans all over the world, and lately emerging in animal bacteria as well. Treatment failure affects animal welfare and is one consequence of antimicrobial resistance in bacteria from animals.

The antibiotic treatment options in horses are already limited, and more than one case of lethal complications caused by ESBL-producing bacteria have been reported. ESBL has been demonstrated in a few isolates from clinical infections in horses in Sweden. Only a few ESBL-types have been detected, in clinical samples and bacteria from the gut flora of healthy horses. One type predominates in all of the studies, and although it is not the same as the one most commonly found in humans, they belong to the same family. A few studies have characterized risk factors for faecal carriage of multidrug resistant and ESBL-producing bacteria in horses. The studies are usually too small to distinguish all factors, but most risk factors are associated with staying in a clinic or antibiotic treatment, of the sampled horse or horses in the same environment.



## INLEDNING

Antibiotikaresistenta bakterier utvecklas i en alarmerande hastighet inom både human- och veterinärmedicinen. "Extended spectrum betalactamases" (ESBL) hos gramnegativa bakterier medför resistens mot tredje generationens cefalosporiner, en viktig grupp antibiotika för att behandla infektioner hos både djur och människor (SVA, 2012). Problemet med ESBL är spritt över hela världen och får konsekvenser för möjligheten att kunna behandla bakterieinfektioner. Gener som kodar för ESBL-produktion är överförbara mellan bakterier, och bakterierna i sin tur kan spridas via miljön eller direktkontakt till andra djur eller människor (Li *et al.*, 2007).

Hästar behandlas idag med antibiotika mot många bakterieinfektioner, flera som kan vara potentiellt livshotande (Li *et al.*, 2007). ESBL produceras ofta av gramnegativa tarmbakterier som *Escherichia coli* och *Klebsiella* spp, som bland annat kan orsaka livmoderinfektioner eller sepsis hos häst (SVA, 2012). Urvalet av antibiotika till häst är begränsat, eftersom hästar är känsliga för störningar i normalfloran, men också på grund av tillgången på godkända preparat. Resistens hos bakterien som påverkar behandlingens effekt får konsekvenser för både djurhälsan och djurväl-färden (Li *et al.*, 2007).

Problemen med ESBL-producerande bakterier hos häst i Sverige är ännu få, endast få ESBL-positiva kliniska prover har påvisats de senaste åren (SVA, 2012). I andra europeiska länder finns det dock studier gjorda på förekomst och potentiella riskfaktorer och det kan därför vara värdefullt att undersöka hur problemet ser ut där. Jag arbetade därför i det här arbetet utifrån två frågeställningar: "Vilka typer av ESBL har påvisats från häst i Europa?" och "Vilka riskfaktorer finns beskrivna för att påvisa ESBL i prover från häst?"

## MATERIAL OCH METODER

Jag har sökt i databasen World of Knowledge med sökorden: "ESBL", "extended spectrum betalactamase" och "antibiotic resistance" i olika kombinationer med "horse\*", "equine\*" eller "animals". Flera artiklar hittade bland dessa sökresultat hänvisade till andra användbara artiklar. För att hitta information om aktuellt resistensläge i Sverige har jag besökt hemsidorna för Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) och Smittskyddsinstitutet (SMI).

## LITTERATURÖVERSIKT

### **β-laktamaser**

β-laktamaser är en grupp enzymer hos bakterier som inaktiverar β-laktamantibiotika. Till gruppen β-laktamantibiotika hör penicilliner och cefalosporiner som är viktiga läkemedel inom veterinär- och humanmedicinen, men även karbapenemer och monobaktamer (Li *et al.*, 2007). Produktion av β-laktamaser är utbrett hos bakterier och är den främsta resistensmekanismen hos gramnegativa bakterier. Nedbrytningsprofilen varierar kraftigt och sträcker sig från väldigt smala spektrum till att inkludera i stort sett alla β-laktamantibiotika som finns idag. β-laktamaser delas ofta upp i funktionella grupper beroende på substratprofil och känslighet för olika inhibitorer, men kan även delas upp i fyra molekylära klasser (Poole, 2004).

## Extended-spectrum $\beta$ -lactamases

"Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases" (ESBL) är förvärvade bredspektrum  $\beta$ -laktamaser som gör penicilliner och cefalosporiner verkningslösa, inklusive cefalosporiner med utvidgat spektrum (Poole, 2004). Många ESBL visar ett samband med resistens mot andra antibiotikagrupper och med andra  $\beta$ -laktamaser. Ofta kodas resistensmekanismerna i gemensamma mobila element eller plasmider (Poole, 2004; Li *et al.*, 2007). ESBL är en heterogen grupp som tillhör flera olika funktionella grupper och molekylära klasser (Paterson & Bonomo, 2005). Giske *et al.* (2009) förelag en ny mer lättillgänglig indelning av de ESBL som är kända idag, inbegripande alla överförbara  $\beta$ -laktamaser som kan bryta ned 3:e generationens cefalosporiner. Den indelningen har kategori ESBL<sub>A</sub> som innehåller de klassiska ESBL, kategori ESBL<sub>CARBA</sub> inbegripande alla karbapenemaser, och kategori ESBL<sub>M</sub> som innehåller de resterande, bland annat plasmidburna AmpC- $\beta$ -laktamaser (*Figur 1*).

### **Klassiska ESBL**

De klassiska ESBL tillhör den funktionella gruppen 2be och molekylärklass A. Dessa inhiberas av klavulansyra och har effekt mot 3:e generationens cefalosporiner (Giske *et al.*, 2009). Klassiska ESBL är en stor grupp med varierande ursprung som kan delas upp i familjer. TEM<sup>1</sup> och SHV<sup>2</sup> är två stora familjer med plasmidmedierade  $\beta$ -laktamaser. Varianter med smala spektrum är mycket vanligt förekommande hos gramnegativa bakterier och kan efter förändringar i aminosyrasekvensen ge ESBL-fenotyp (Paterson & Bonomo, 2005). Det finns ett stort antal ESBL av TEM- och SHV-typ och fram till slutet av 90-talet var identifierade ESBL i Europa nästan uteslutande av TEM- och SHV-typ, oftast detekterade i *Klebsiella* spp (Livermore *et al.*, 2007).

I senare studier har CTX-M<sup>3</sup>-typer blivit de vanligaste identifierade ESBL i många europeiska länder, främst i *E.coli* men även i *Klebsiella* spp. CTX-M-ESBL härstammar från en bakteriefamilj med kromosomalt medierade  $\beta$ -laktamaser med naturligt brett spektrum, tillskillnad från TEM- och SHV- $\beta$ -laktamaser (Paterson & Bonomo, 2005). CTX-M enzymer kan delas in i fem sekvensbaserade undergrupper (Bonnet, 2004). CTX-M-15 är den vanligast påvisade ESBL-typen i prover från människor över världen, dvs. identiska enzymer har identifierats i spridda delar av världen (Paterson & Bonomo, 2005; Livermore *et al.*, 2007). CTX-M är den vanligaste ESBL-typen som har identifierats både från kommensala bakterier och kliniska prover från djur, och enzymer från alla de olika undergrupperna har påvisats (Li *et al.*, 2007).

### **Andra ESBL**

Det finns många olika kromosomala AmpC- $\beta$ -laktamaser med olika spektrum som är naturligt förekommande och påvisade hos många olika bakteriearter. Uttrycket är vanligtvis lågt och resistensproblemen uppstår framför allt vid mutationsorsakad hyperproduktion (Poole, 2004).

---

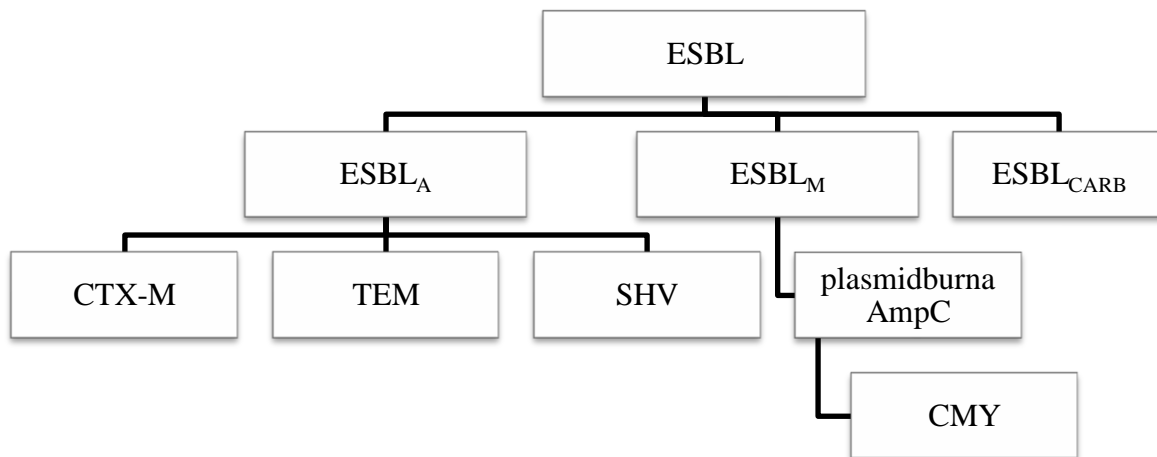
<sup>1</sup> Uppkallad efter Temoneira, första patienten som emzymet isolerades från (Jacoby, 2006).

<sup>2</sup> Namngiven efter enzymets varierande svar på sulfhydryl-inhibitorer (Jacoby, 2006).

<sup>3</sup> Namngiven efter enzymets cefotaxim-hydrolyserande aktivitet, först isolerad i Munich (Jacoby, 2006).

Plasmidburna AmpC- $\beta$ -laktamaser har ett högt genuttryck och kan orsaka resistensproblem och ge ESBL-fenotyp hos många olika bakteriearter (Li *et al.*, 2007). Det är vanligt att kromosomala AmpC- $\beta$ -laktamaser är inducerbara av olika  $\beta$ -laktamer, men även några plasmidburna AmpC-geners uttryck kan induceras (Poole, 2004). Av de plasmidburna AmpC- $\beta$ -laktamaserna är CMY-2 vanligt förekommande hos isolat från både människor och djur, men även andra varianter av CMY och andra gener påvisas mer sällan (Li *et al.*, 2007). AmpC- $\beta$ -laktamaser tillhör den klassiska molekylärklassen C och funktionella gruppen 1, och inhiberas ej av klavulansyra (Poole, 2004).

Karbapenemer är en viktig klass av  $\beta$ -laktamantibiotika som ofta blir ett av få kvarvarande alternativ vid många ESBL-infektioner hos människor, eftersom att de inte bryts ned av de flesta  $\beta$ -laktamaser (Poole, 2004). ESBL<sub>CARB</sub> kan hydrolysera även karbapenemer och är en varierande grupp som härstammar från flera olika ursprung och kan tillhöra flera olika molekylärklasser (Giske *et al.*, 2009). ESBL med karbapenemasaktivitet har spridit sig snabbt hos människor världen över de sista 10 åren, men har enligt Ewers *et al.* (2012) ännu inte rapporterats hos djur.



Figur 1: ESBL-typer (efter Giske *et al.*, 2009).

### **Påvisande av ESBL**

Resistensbestämning sker genom att kvantifiera bakteriens tillväxt i närhet av antibiotika. Brytpunkter används för att kategorisera bakteriers känslighet för olika antibiotika. Fenotypisk ESBL<sub>A</sub> avgörs om bakteriens förmåga att växa till vid närvaro av antibiotika ökar vid närvaro av klavulansyra. Genotypisk konfirmation och klassificering sker med hjälp av PCR ("Polymerase Chain Reaction") med genspecifika primers för de olika typerna av  $\beta$ -laktamaser, och följs av gensekvensering för att bestämma allel. CTX-M-familjerna kan

särskiljas utan sekvensering, med hjälp av endast specifika primers. (Giske & Kahlmeter, 2007a)

Molekyläpidemiologisk typning för att jämföra bakterieisolat görs ofta med PFGE ("Pulsed Field Gel Electrophoresis"). Bakteriens genom klyvs av specificerade enzymer till segment av varierande storlek. Segmenten separeras i storleksordning med hjälp av elektriska fält i en gel, och bildar olika bandmönster som kallas pulsotyper. (Giske & Kahlmeter, 2007b)

*E.coli* från faecesprov används ofta som indikator på resistensläget i tarmfloran. *E.coli* är en kommensal och del av många djurs normalflora, men även en viktig patogen. Resistensdeterminanter sprider sig snabbt hos bakterier i tarmen och kommensaler utsätts för samma selektionstryck som patogener i tarmen och kan därför indikera eventuella resistensproblem man kan förvänta sig hos patogener. Kommensaler kan även fungera som reservoar. (Dunowska *et al.*, 2006)

## **ESBL hos häst**

### ***Påvisade ESBL-typer***

ESBL har påvisats i både kliniska prover och träckprover från friska hästar i Europa. *Tabell 1* visar en sammanställning av påvisade ESBL-gener i fenotypiskt ESBL-positiva prover. Majoriteten av alla kliniska isolat tillhörde *E.coli* (Vo *et al.*, 2007; Ewers *et al.*, 2010; Dolejska *et al.*, 2011; Dierikx *et al.*, 2012; Damborg *et al.*, 2012). I en studie påvisades tre ESBL-producerande *Klebsiella pneumoniae* (Vo *et al.*, 2007). Alla fekala isolat och isolat från andra övervakningsprover tillhörde *E.coli* (Dolejska *et al.*, 2011; Damborg *et al.*, 2012; Johns *et al.*, 2012).

CTX-M-1 identifierades som den enda ESBL-typen i de flesta isolat oavsett ursprung. CMY-2 (Vo *et al.*, 2007) och CTX-M-2 (Dierikx *et al.*, 2012), identifierades som enda ESBL-genen i var sitt kliniskt isolat. CTX-M-14 identifierades som den enda ESBL-genen i ett kliniskt isolat i en studie (Dierikx *et al.*, 2012), samt i ett kliniskt isolat och ett träckprov i en annan studie (Damborg *et al.*, 2012). CTX-M-14 (Dierikx *et al.*, 2012), CMY-34 (Damborg *et al.*, 2012), och CMY-53 (Damborg *et al.*, 2012) identifierades hos samma isolat som CTX-M-1 från kliniska prover.

I flera studier identifierades inga ESBL av TEM- eller SHV-typ (Vo *et al.*, 2007; Dolejska *et al.*, 2011; Damborg *et al.*, 2012; Dierikx *et al.*, 2012). Andra  $\beta$ -laktamaser av SHV-typ, men med smalare spektrum identifierades endast i en studie, av typen SHV-1 (Vo *et al.*, 2007). Smalspektrum TEM-1- $\beta$ -laktamaser identifierades i flertalet studier hos ESBL-positiva isolat, från både kliniska och övervakningsprover (Vo *et al.*, 2007; Dolejska *et al.*, 2011; Damborg *et al.*, 2012; Dierikx *et al.*, 2012). John *et al.* (2012) påvisade TEM- och SHV-gener i flera faecesprover, men sekvenserade inte, vilket gör att ESBL ej kan skiljas från  $\beta$ -laktamaser med smalare spektrum. I studien påvisades dock TEM-gener i fem isolat från prover positiva för

klassisk ESBL-fenotyp utan närvaro av CTX-M-gener. I fyra av dessa prover identifierades även SHV-gener.

Tabell 1: Sammanställning av påvisade ESBL-typer i prover från hästar i Europa (vissa typer påvisade i samma bakterieisolat, se text ovan)

ESBL-typ	Positiva isolat/ antal i studien (%)	Typ av prov	Referens
<b>CTX-M grupp 1</b>			
Ospecificerad allel	6/23 (26%)	Träck	Johns et al. (2012)
CTX-M-1	28/29 (97%)	Träck	Damborg et al. (2012)
	6/7 (86%)	Kliniskt	Damborg et al. (2012)
	70/70 (100%)	Träck, miljö	Dolejska et al. (2011)
	2/2 (100%)	Kliniskt	Dolejska et al. (2011)
	9/11 (82%)	Kliniskt	Dierikx et al. (2012)
	5/6 (83%)	Kliniskt	Vo et al. (2007)
CTX-M-15	1/1 (100%)	Kliniskt	Ewers et al. (2010)
<b>CTX-M grupp 9</b>			
Ospecificerad allel	6/23 (26%)	Träck	Johns et al. (2012)
CTX-M-14	1/29 (3%)	Träck	Damborg et al. (2012)
	1/7 (14%)	Kliniskt	Damborg et al. (2012)
	2/11 (18%)	Kliniskt	Dierikx et al. (2012)
<b>CTX-M grupp 2</b>			
CTX-M-2	1/11 (9%)	Kliniskt	Dierikx et al. (2012)
<b>AmpC</b>			
Ospecificerad CMY	6/23 (26%)	Träck	Johns et al. (2012)
CMY-34	1/29 (3%)	Träck	Damborg et al. (2012)
CMY-53	1/29 (3%)	Träck	Damborg et al. (2012)
CMY-2	1/6 (17%)	Kliniskt	Vo et al. (2007)
<b>TEM</b>			
Ospecificerad allel	12/23 (52%)	Träck	Johns et al. (2012)
<b>SHV</b>			
Ospecificerad allel	4/23 (17%)	Träck	Johns et al. (2012)

### **Epidemiologiska samband**

Damborg *et al.* (2011) undersökte hästar som fick antibiotikaproylax på en klinik inom loppet av några månader. Fem pulstyper med CTX-M-1-producerande *E.coli* hittades hos mer än en häst; tre utav dessa var förknippade med samtidiga klinikvistelser hos hästarna, och två återkommande pulstyper förekom hos hästar som stått i samma stall. Av 12 pulstypvarianter hos 23 isolat, var det endast tre pulstyper som återkom i olika prover från

samma häst. Sex av sju kliniska fall med fynd av ESBL-producerande *E.coli*, alla med påvisade CTX-M-1, på samma klinik sex månader efter försöket med profylaxbehandling, hade identisk pulstyp, men ingen var densamma som under den tidigare studien.

Dolejska *et al.* (2011) isolerade ESBL-producerande *E.coli* från träckprover, miljösvabbar, rektalsvabbar från personal, samt flugor på en hästklinik. Hos alla ESBL-positiva isolat identifierades CTX-M-1. Några få likadana PFGE pulstyper konstaterades i prover från både hästar och olika miljöprover. En pulstyp återfanns i prov från en häst, stallinredning och personal; en annan pulstyp återfanns senare i prov från en häst, stallinredning och flugor. Två isolat från olika hästar visade samma pulstyp vid en provtagning. Vid ett tillfälle under studien isolerades ESBL-producerande *E.coli* i ett sår hos en häst, av samma pulstyp som hos flera flugor i lokalen.

ESBL-producerande *E.coli* isolerades i ett fall från ett föl med septikemi, som behandlats med bredspektrum-cefalosporiner, och från prover i fölens närmiljö i samband med fallet. Positiva prover togs också från stoet och tre hästar från boxar intill, samt miljösvabbprov från stoets box och ytterligare en box. CTX-M-1 och TEM-1 identifierades i alla positiva isolat. Samma pulstyp identifierades i ett prov från en häst och ett miljösvabbprov. Provtagning en och två månader senare i samma stall resulterade i att inga ESBL-producerande *E.coli* kunde påvisas (Dolejska *et al.*, 2011).

Dierikx *et al.* (2012) genotypade kliniska isolat med ESBL-producerande *E.coli* från häst som skickats in till ett centralt laboratorium. Alla isolat tillhörde olika stammar förutom två isolat från hästar med samma ägare. Ewers *et al.* (2010) undersökte 50 ESBL-positiva *E.coli*-isolat från häst, insamlade från flera olika laboratorier i olika länder. De kunde påvisa ett CTX-M-15-producerande kliniskt isolat som tillhörde *E.coli*-linjen B2-O25b-ST131, som tidigare påvisats i samband med kliniska infektioner hos människor på flera olika kontinenter.

### **Multiresistenta ESBL-isolat**

ESBL-producerande *E.coli* från både kliniska och fekala prover från häst har vid flera tillfällen konstaterats vara resistenta mot många olika antibiotikaklasser (Vo *et al.*, 2007; Dolejska *et al.*, 2011; Damborg *et al.*, 2012). I två studier var alla ESBL-positiva isolat multiresistenta, både kliniska och fekala prover, och alla visade resistens mot aminoglykosider, tetracykliner och sulfonamider (Vo *et al.*, 2007; Dolejska *et al.*, 2011). I en studie var några isolat resistenta mot 12 av 12 testade olika antibiotika, inklusive olika aminoglykosider, tetracykliner, fluorokinoloner samt trimetoprim och sulfonamider (Dolejska *et al.*, 2011). I prover från hästar har ESBL-gener påvisats i samma mobila genetiska element som gener för resistens mot fluorokinoloner (Dolejska *et al.*, 2011), tetracykliner (Dolejska *et al.*, 2011), sulfonamider (Dolejska *et al.*, 2011), trimetoprim (Vo *et al.*, 2007) och aminoglykosider (Vo *et al.*, 2007; Dolejska *et al.*, 2011). Resistensdeterminanter för ESBL-resistens hos isolat från häst, har *in vitro* visat sig kunna överföras via konjugering mellan bakterier inom samma art (Dolejska *et al.*, 2011) och mellan olika *Enterobacteriaceae* spp (Vo *et al.*, 2007).

### **Riskfaktorer associerade med multiresistens och ESBL-produktion**

Studier har visat att prevalensen resistent, multiresistent och ESBL-producerande *E.coli* i avföringsprover från hästar på klinik är större än i prover från hästar i hemmiljö (Dunowska *et al.*, 2006; Bryan *et al.*, 2010).

Flera studier har visat att förekomsten multiresistent *E.coli* påvisade i fekala prover från hästar ökar efter inskrivning på klinik (Dunowska *et al.*, 2006; Bryan *et al.*, 2010; Maddox *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2013). Andelen multiresistent prover ökade dagarna som följde efter inskrivning på kliniken (Bryan *et al.*, 2010; Maddox *et al.*, 2011), och detsamma gällde för ESBL-positiva prover (Maddox *et al.*, 2011).

Maddox *et al.* (2011) visade också att det i en omfattande studie av resistent *E.coli* från hästar på klinik, var låg variation av resistensfenotyper; 82% av isolaten uppvisade en av 10 varianter, trots att det totala antalet olika fenotyper som kunde uppvisas uppgick till 127. Efter en vecka på klinik hade förekomsten av multiresistent fenotyper ökat, men ingen skillnad i antalet olika resistensfenotyper kunde ses jämfört med inskrivningsdagen (Williams *et al.*, 2013).

Ett exempel på ökande förekomst efter klinikinskrivning och antibiotikabehandling visades i en studie vid profylaktisk behandling på klinik med bland annat bredspektrumcefalosporiner. Denna medföre att prover från alla 10 hästarna i studien gick från att vara ESBL-negativa till att vara positiva inom tre dagar från behandlingsstart (Damborg *et al.*, 2011). I en annan studie isolerades *E.coli* med gener för klassiska ESBL från prover från sju hästar på klinik som påbörjat behandling med antibiotika fem dagar tidigare. I prover från samma hästar innan behandling, och två veckor samt två månader efter behandlingens slut, påvisades inga ESBL-positiva isolat (Johns *et al.*, 2012). Detta liknar resultaten Dolejska *et al.* (2011) fick när ESBL-positiva isolat endast påvisades i samband med cefalosporinbehandlingen av fölet och inte från provtagning de följande månaderna.

Bryan *et al.*, (2010) visade att efter tre dagar på klinik hade andelen påvisade multiresistent *E.coli* ökat jämfört med dag ett. Ökningen påvisades hos både hästar som antibiotikabehandlats och ej behandlats, och i den studien kunde det inte visas något samband med antibiotikabehandling. Johns *et al.* (2012) påvisade däremot inga multiresistent eller ESBL-producerande *E.coli* efter minst fem dagars klinikvistelse i träckprover från hästar som ej antibiotikabehandlats. Den studien identifierade antibiotikabehandling som riskfaktor för fekal utsöndring av multiresistent *E.coli*. Samma studie visade även att andelen multiresistent prover från hästar som behandlats med antibiotika på klinik, ej skiljde sig från hästar som behandlats i sin hemmiljö.

Både klinikvistelse och antibiotikabehandling identifierades som riskfaktor för multiresistent *E.coli*-prov i en annan studie (Dunowska *et al.*, 2006). I den studien sågs en ökad andel prov med *E.coli* resistent mot sex eller fler olika antibiotika hos antibiotikabehandlade jämfört med ej behandlade hästar på samma klinik. I samma studie kunde inte några *E.coli* resistent mot så många olika antibiotika isoleras från hästar i hemmiljö. Maddox *et al.* (2012) påvisade

ett samband med tidigare vistelse på klinik och ökad antibiotikaresistens hos fekala *E.coli*. Multiresistens och ESBL-produktion var förknippad med ökad risk om hästen varit inskriven på klinik, framför allt inom 10 dagar innan provtagning, men även klinikvistelse inom tre månader gav ökad risk, men inget statistiskt samband påvisades med vistelse inom sex månader. Att en häst som nyligen varit inskriven på klinik stod på samma ställe som den provtagna hästen var också en riskfaktor för ESBL-medierad resistens i samma studie. Inget samband med antibiotikabehandling inom 10 dagar innan provtagning varken för multiresistens eller ESBL-produktion kunde påvisas i samma studie. Antibiotikabehandling inom en vecka påvisades dock i en annan studie som riskfaktor för att hitta multiresistenta *E.coli*, men inte ESBL-positiva (Maddox *et al.*, 2011).

En studie visade en skillnad i hur lång tid efter antibiotikabehandling som andelen hästar med resistent respektive multiresistent *E.coli* återgår till samma proportioner som innan behandling, beroende på om behandlingen skedde på klinik eller i hemmiljö. Behandling på klinik hade ett samband med längre utsöndring av resistent och multiresistent *E.coli* i avföringen. Två veckor efter behandling hade proverna från hästarna i hemmiljö gått tillbaka till referensvärdena, men inte proverna från hästarna som behandlats på sjukhus. Hos hästarna som behandlades på klinik var dock lika stor andel positiva som innan behandling, två månader efter behandlingens slut. (Johns *et al.*, 2012)

Skillnader mellan vilka antibiotika hästarna behandlats med under klinikvistelsen och vilka antibiotika samt hur många olika antibiotikaklasser *E.coli* visat resistens mot har visats i flera studier (Dunowska *et al.*, 2006; Johns *et al.*, 2012; Maddox *et al.*, 2012). Även *E.coli* med resistens mot antibiotika som inte användes alls eller endast sällan, på kliniken under studiens tid påvisades i ett prov vid en studie (Dunowska *et al.*, 2006). Cefalosporin-användning var en riskfaktor för förekomst av *E.coli* resistent mot sex eller flera olika antibiotikagrupper (Dunowska *et al.*, 2006). Cefalosporin- eller fluorokinolonbehandling hade ett samband med ökad risk att hitta *E.coli* med resistens mot alla åtta olika antibiotika som testades i studien, men även med resistens mot fyra eller fler olika klasser samtidigt (Johns *et al.*, 2012). Fluorokinolonbehandling var i en studie en riskfaktor för ökad andel ESBL-positiva prov (Johns *et al.*, 2012). ESBL-fenotyper påvisades i en studie i faecesprover från hästar på en klinik trots att de inte behandlats alls, eller bara med andra grupper av antibiotika än  $\beta$ -laktamer, under studien samt inte behandlats alls 14 dagar innan försöket (Bryan *et al.*, 2010).

Det kan noteras att i flera studier har inte något samband med ras, kön eller ålder och påvisad antibiotikaresistens hos *E.coli* från hästar setts (Williams *et al.*, 2013; Johns *et al.*, 2012; Dunowska *et al.*, 2006). En studie kunde inte visa något samband mellan den fekala densiteten av ESBL-producerande *E.coli* och ålder eller kön (Damborg *et al.*, 2012).

## **DISKUSSION**

### **Påvisande av ESBL**

Det finns flera faktorer som kan påverka och orsaka skillnader mellan studier över ESBL-förekomst. En variabel är resistensbestämningen; vilka bakterier som klassas som resistent.



Vilken metod och vilka brytpunkter som används påverkar resultatet. För att olika metoder ska kunna jämföras måste brytpunkterna vara harmoniserade. Någon form av harmonisering av brytpunkter ska ha skett i Europa, som ska ha gett så pass låga brytpunkter att alla kliniskt relevanta infektioner av ESBL-producerande bakterier ska detekteras (Giske & Kahlmeter, 2007a). I flera studier refererade i det här arbetet har samma internationella standard (<http://www.clsi.org/>) hänvisats till (Bryan *et al.*, 2010; Ewers *et al.*, 2010; Damborg *et al.*, 2012; Johns *et al.*, 2012), inklusive den enda studien som ej kommer från Europa (Dunowska *et al.*, 2006). I de resterande studierna hänvisas nationella policyer eller andra internationella standarder. Vilket antibiotikum som används kan också påverka resultatet; skillnader i spektrum och substratprofiler hos ESBL kan påverka klassificeringen. Dierikx *et al.* (2012) kunde visa på variationer i resistensklassificeringen av ESBL-positiva isolat beroende på vilket antibiotikum som användes, med falskt positiva isolat som följd. Vilket medium resistensbestämningen sker skulle också kunna påverka resultatet; valet av odlingsmedium påverkar bakteriens förmåga att växa och hydrolysera olika antibiotikum (Paterson & Bonomo, 2005).

Ett annat problem uppkommer också i variationerna i definitioner. Den klassiska ESBL-definitionen är snäv och det varierar vilka enzymtyper som ingår i studierna utöver de i den funktionella gruppen 2be. Studiedesignen blir avgörande för rapporteringen om förekomst, vilka fenotypade isolat som också genotypas och vilka primers som används vid PCR detektionen. Det finns många olika gener för ESBL-fenotyp, vissa är vanligare än andra och det varierar mellan studierna vilka som undersöks, utöver de vanliga typerna som nämnts i det här arbetet. Definitionen för vad som klassas som ESBL i studien påverkar även riskfaktoranalyserna. Alla riskfaktorstudier som ingår i det här arbetet har använt den klassiska ESBL-definitionen. Men skillnaderna orsakade av olika definitioner är speciellt viktiga när man tittar på andras sammanställningar där definitionerna för varje ingående studie inte alltid anges. Det gör det svårt att jämföra korrekt, och kan ge en skev bild av förekomsten.

## **ESBL-typer**

I det här arbetet är CTX-M-1 den vanligaste påvisade ESBL-typen i prover från hästar. CTX-M-1 är påvisat hos några procent av alla ESBL-positiva *E.coli* isolat från människor i Europa, och står för största delen av ESBL-fenotyper i fekala *E.coli* från både livsmedelsproducerande djur och sällskapsdjur i Europa, enligt Ewers *et al.* (2012). CTX-M-15 är dock den vanligaste ESBL-typen identifierade hos isolat från människor (Livermore *et al.*, 2007; Ewers *et al.*, 2012), men den tillhör, liksom CTX-M-1, M-1 gruppen, med över 97 % genetisk likhet (Bonnet, 2004). Intressant att notera är att det enligt Ewers *et al.* (2012) är en stor geografisk variation; CTX-M-1 har påvisats i mindre än en procent av fekala *E.coli* med ESBL-fenotyp från både djur och människor i Asien. CTX-M-15 är enligt samma källa även vanligt hos sällskapsdjur, men identifierades endast i ett ESBL-positivt isolat från häst, när en specifik stam var avgörande faktor för om genotypning skulle ske (Ewers *et al.*, 2010).

Ett intressant resultat är även att ingen studie som genotypade ESBL-positiva isolat från häst, påvisade ESBL av TEM- eller SHV-typ. Detta tillskillnad från andra studier, där klassisk ESBL-fenotyp orsakats av andra gener än CTX-M i flera procent av fekala *E.coli* från både människor (Livermore *et al.*, 2007; Ewers *et al.*, 2012) och andra djur (Ewers *et al.*, 2012). Johns *et al.*, (2012) sekvenserade ej ESBL-generna, men kunde ej påvisa CTX-M-gener i fem isolat som var fenotypiskt klassiskt ESBL-positiva. I den studien skulle TEM- eller SHV-ESBL kunnat vara orsaken till fenotypen, eller en annan gen som ej undersöktes. En missvisande ESBL-fenotyp på grund av tidigare diskuterade potentiella problem med resistensbestämning, är också en tänkbar anledning till resultatet.

Studierna som undersöker epidemiologiska samband mellan ESBL-positiva *E.coli*-isolat från häst påvisar att en diversitet förekommer. Samtidigt tyder fynden med liknande pulstyper på att det även skulle kunna finnas vissa likheter mellan isolat. Likheterna kan tyda på ett klonalt samband, och klonal spridning både mellan hästar och till miljön (Dolejska *et al.*, 2011; Damborg *et al.*, 2012). Dock är PFGE en ospecifik metod och man bör vara försiktig med att dra slutsatser om släktskap (Giske & Kahlmeter, 2007b). Men variationen av pulstyper påvisade i samma studier, visar på stor variation av olika stammar med ESBL-fenotyp hos hästar, och att inget starkt klonalt samband finns med spridningen av CTX-M-1-positiva isolat. Genotypning av ESBL-positiva bakterier i två utav studierna stödjer detta (Ewers *et al.*, 2010, Dierikx *et al.*, 2012). Detta tillskillnad från hos människa där den globala spridningen av CTX-M-15 har påvisats ha ett viktigt samband med klonal spridning av *E.coli* (Ewers *et al.*, 2010). Dolejska *et al.* (2011) genotypade plasmider och hittade genetiska likheter mellan olika prover, vilket tyder på att horisontell spridning av CTX-M-1-gener förekommer.

## **Riskfaktorer**

Förklaringar till de varierande resultaten mellan studierna skulle kunna hittas i studiedesign och studiepopulation. De kan påverka och interagerande variabler skapar problem vid analysen, när antibiotikabehandling ska särskiljas från klinikvistelse som riskfaktor. Flera författare spekulerar i att skillnader mellan klinik och hemmiljö kan orsakas av skillnader i hästarnas hälsa mellan grupperna (Dunowska *et al.*, 2006; Johns *et al.*, 2012).

En viktig skillnad som spekuleras om av flera författare som bidragande faktor till olikheterna mellan studiernas resultat är studiepopulationernas exklusionskriterier, framför allt hur lång tid hästarna ej ska ha varit behandlade innan provtagning (Dunowska *et al.*, 2006; Bryan *et al.*, 2010; Johns *et al.*, 2012). Dunowska *et al.* (2006) som påvisade både klinikvistelse och antibiotikabehandling som riskfaktorer hade endast några dagar som exklusionskriterium för kontrollgrupperna. Bryan *et al.* (2010) som påvisade provtagning på klinik som riskfaktor, men inte antibiotikabehandling, hade två veckor som exklusionskriterium för kontrollgruppen. Johns *et al.* (2012) som påvisade antibiotikabehandling men inte klinikvistelse som riskfaktor, hade som exklusionskriterium sex månader utan behandling. En eventuell påverkan får även grund i studien av Johns *et al.* (2012) där återgång till ursprunglig förekomst av resistenta fekala *E.coli* kunde dröja upp till 2 månader efter antibiotikabehandlingens slut. Studien av Maddox *et al.* (2012) tyder också på en lång

återgångsperiod, där klinikvistelse flera månader före provtagningen var en riskfaktor för fekal utsöndring av multiresistenta och ESBL-producerande *E.coli*.

Antalet hästar i studien kan också påverka resultaten. Maddox *et al.*, (2011; 2012) som i båda studierna hade stor studiepopulation totalt, får låg power vid vissa analyser av riskfaktorer helt enkelt på grund av att få hästar utsatts för vissa riskfaktorer. Skillnader orsakad av bias är också en potentiell orsak till vissa resultat. Maddox *et al* (2012) genomförde en omfattande studie om riskfaktorer för antibiotikaresistens i *E.coli* från häst, baserat på frågeformulär till ägarna. Författarna till studien spekulerar i att det förfarandet kan påverka riskfaktorernas särskiljande, om t.ex. minnesbias uppstår om ägaren inte minns med vilket antibiotikum hästen behandlats med, men ändå fyller i att hästen behandlats.

Ahmed *et al* (2010) och Damborg *et al.* (2012) är två studier där ett samband med förekomst och klinikvistelse påvisas, men där antibiotikabehandling ej kan skiljas från klinikvistelse som riskfaktor då de endast sammanfaller som variabel i analysen. Studien gjord av Damborg *et al.* (2012) innehöll endast hästar som var sin egen kontroll. Studien av Ahmed *et al* (2010) kunde inte särskilja behandlade och ej behandlade hästar på kliniken.

Antibiotikabehandling har bevisats tidigare vara den avgörande riskfaktorn för ökad förekomst av antibiotikaresistenta bakterier (Poole, 2004; Paterson & Bonomo, 2005). Bland annat antibiotikaanvändning och långvarig sjukhusvistelse är bevisade riskfaktorer för ESBL-producerande bakterier hos människor (Poole, 2004; Paterson & Bonomo, 2005). Fluorokinolonbehandling har hos människa har påvisats vara en riskfaktor (Paterson & Bonomo, 2005) och likaså hos djur (Ewers *et al.*, 2012). Dock påvisades flurokinolonresistens sällan i ESBL-positiva isolat hos hästar i studierna i det här arbetet; resistens mot tetracykliner, trimetoprim, sulfonamider och aminoglykosider var vanligare. Multiresistens hos ESBL som kan spridas till omgivningen både horisontellt och klonalt leder till att klinikvistelse som riskfaktorer inte är helt ologisk. Hästkliniker skapar en tät hästmiljö, och multiresistensen som ger selektion vid många antibiotikabehandlingar kan selekteras hos andra individer. Maddox *et al.* (2011) och Damborg *et al.* (2012) spekulerar om att ökningen av multiresistenta fekala *E.coli* efter klinikinskrivning kan bero på att hästen får resistensdeterminanter eller koloniserande bakterier från miljön, eller en ökning i tidigare odetekterbara mängder av redan resistenta bakterier i tarmen, eller att resistensdeterminanter mobiliseras från andra kommensaler i tarmen, under selektionstryck. Klinikvistelse har också ofta en viktig stresskomponent som skulle kunna påverka den totala utsöndringen. Men för att avgöra om klinikvistelse faktiskt är en viktig riskfaktor skulle det behövas fler studier med större studiepopulation och med noga genomtänkta exklusionskriterier.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 1-14.
- Bryan, J., Leonard, N., Fanning, S., Katz, L. & Duggan, V. (2010). Antimicrobial resistance in commensal faecal *Escherichia coli* of hospitalised horses. *Irish Veterinary Journal*, 63(6), 373-379.
- Damborg, P., Marskar, P., Baptiste, K.E. & Guardabassi, L. (2012). Faecal shedding of CTX-M-producing *Escherichia coli* in horses receiving broad-spectrum antimicrobial prophylaxis after hospital administration. *Veterinary Microbiology*, 154, 298-304.
- Dierikx, C.M., van Duijkeren, E., Schoormans, A.H.W., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Kant, A., Huijsdens, X.W., van der Zwaluw, K., Wagenaar, J.A. & Mevius, D.J. (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 1368-1374.
- Dolejska, M., Duskova, E., Rybarikova, J., Janoszowska, D., Roubalova, E., Dibdakova, K., Maceckova, G., Kohoutova, L., Literak, I., Smola, J. & Cizek, A. (2011). Plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding center. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 757-764.
- Dunowska, M., Morley, P.S., Traub-Dargatz, J.L., Hyatt, D.R. & Dargatz, D.A. (2006). Impact of hospitalization and antimicrobial drug administration on antimicrobial susceptibility patterns of commensal *Escherichia coli* isolated from the feces of horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(12), 1909-1916.
- Ewers, C., Bethe, A., Semmier, T., Guenther, S. & Wieler, L.H. (2012). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 646-655.
- Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P.A., Diehl, I., Semmler, T., Fruth, A., Beutlich, J., Guerra, B., Wieler, L.H. & Guenther, S. (2010). Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 651-660.
- Giske, C.G. & Kahlmeter, G. (2007a). Diagnostik av ESBL. I: ESBL-resistens hos tarmbakterier – förslag till åtgärdsprogram, bakgrundsdokument 2007. Smittskyddsinstitutet/Strama, Solna. [pdf] Tillgänglig: <http://www.smittskyddsinstitutet.se/amnesomraden/antibiotikaresistens/kunskapsunderlag/esbl-resistens-hos-tarmbakterier/>. [2013-04-04].
- Giske, C.G. & Kahlmeter, G. (2007b). Epidemiologiska typningsmetoder för ESBL. I: ESBL-resistens hos tarmbakterier – förslag till åtgärdsprogram, bakgrundsdokument 2007. Smittskyddsinstitutet/Strama, Solna. [pdf] Tillgänglig: <http://www.smittskyddsinstitutet.se/amnesomraden/antibiotikaresistens/kunskapsunderlag/esbl-resistens-hos-tarmbakterier/>. [2013-04-04].

- Giske, C.G., Sundsfjord, A.S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D.L., Cantón, R. & Walsh, T.R. (2009). Redefining extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, 1–4.
- Jacoby, G.A. (2006).  $\beta$ -Lactamase Nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1123-1129.
- Johns, I., Verheyen, K., Good, L. & Rycroft, A. (2012). Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from horses treated with antimicrobials: A longitudinal study in hospitalised and non-hospitalised horses. *Veterinary Microbiology*, 159, 381-389.
- Li, X.-Z., Mehrotra, M., Ghimire, S. & Adewoy, L. (2007).  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary Microbiology*, 121, 197-214.
- Livermore, D.M., Cantón, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L. & Woodford, N. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 165-175.
- Maddox, T.W., Pinchbeck, G.L., Clegg, P.D., Wedley, A.L., Dawson, S. & Williams, N.J. (2012). Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 2: Risk factors for faecal carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in horses. *Equine Veterinary Journal*, 44, 297-303.
- Maddox, T.W., Williams, N.J., Clegg, P.D., O'Donnell, A.J., Dawson, S. & Pinchbeck, G.L. (2011). Longitudinal study of antimicrobial-resistant commensal *Escherichia coli* in the feces of horses in an equine hospital. *Preventive Veterinary Medicine*, 100, 134-145.
- Paterson, D.L. & Bonomo, P.A. (2005). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686.
- Poole, K. (2004). Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Science*, 61, 2200-2223.
- SVA (Statens Veterinärmedicinska Anstalt) (2012). Antibiotika och djur i Sverige 2011 - En rapport från Strama VL. Uppsala: SVA (Rapportserie 24 ISSN 1654-7098). Tillgänglig: <http://www.sva.se/sv/Mer-om-SVA1/Publikationer/Antibiotikaresistens/Antibiotika-hos-djur-i-Sverige/>. [2013-04-02].
- Vo, A.T.T. van Duijkeren, E., Fluit, A.C. & Gaastra, W. (2007). Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from horses. *Veterinary Microbiology*, 124, 248-255.
- Williams, A., Christley, R.M., McKane, S.A., Roberts, V.L.H., Clegg, P.D. & Williams, N.J. (2013). Antimicrobial resistance changes in enteric *Escherichia coli* of horses during hospitalisation: Resistance profiling of isolates. *The Veterinary Journal*, 185, 121-126.