



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap  
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

# Hög förekomst av antibiotikaresistens hos *Escherichia coli* i tarmflora hos unga kalvar – en följd av ökad urskiljning av resistent *E. coli* från kon vid tiden för kalvning?

*Lisa Gustafsson*

*Uppsala  
2014*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2014:57*



**Hög förekomst av antibiotikaresistens hos *Escherichia coli* i tarmflora hos unga kalvar – en följd av ökad urskiljning av resistenta *E. coli* från kon vid tiden för kalvning?  
High prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from the gut flora of young calves – caused by increased shedding of resistant *E. coli* from the cow around parturition?**

*Lisa Gustafsson*

**Handledare:** Ulf Emanuelson, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

**Biträdande handledare:** Anna Duse, Statens Veterinärmedicinska Anstalt

**Biträdande handledare:** Björn Bengtsson, Statens Veterinärmedicinska Anstalt

**Examinator:** Nils Fall, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0736

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2014

**Delnummer i serie:** Examensarbete 2014:57

**ISSN:** 1652-8697

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

**Nyckelord:** Antibiotikaresistens, *Escherichia coli*, mjölkkor, tetracyklin, kalvar, tarmflora

**Key words:** Antibiotic resistance, *E. coli*, cattle, tetracycline, dairy calves, gut microbiota

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för Kliniska Vetenskaper



Tack.

Detta projekt hade inte varit möjligt utan den outtröttliga hjälp, de kloka synpunkter och all uppmuntran jag fått från mina handledare, vars kunskaper så vida översträcker mina inom dessa områden. Jag hade heller inte klarat mig utan Maria Persson, biomedicinsk analytiker vid SVA, som med sin långa erfarenhet och positiva inställning gjort att allt laboratoriearbete gått enkelt och smärtfritt. Jag vill också tacka alla deltagande lantbrukare som trots allt arbete som hör hösten till tagit sig tid att tillmötesgå mina krav och lyckats samla in alla prover intill sista kalv. Sist men inte minst, till SVA:s forskningsfond, Stiftelsen Elsa Paulssons minnesfond och Gulli Strålfeldts fond för finansieringen av detta projekt. Tack!

## SAMMANFATTNING

Utveckling av antibiotikaresistens är ett problem som innebär ett stort hot mot folk- och djurhälsa. Resistensläget i Sverige övervakas kontinuerligt genom ett samarbete mellan Smittskyddsinstitutet, SMI och Statens Veterinärmedicinska Anstalt, SVA. I Sverige har vi idag ett gott läge när det gäller resistens, men en oroande ökning av vissa fruktade multiresistenta bakterier ses även här. I flera studier, från olika länder, har man sett att förekomsten av antibiotikaresistens är högre hos unga individer för att sedan minska med åldern. När det gäller nötkreatur ser man en hög resistensförekomst i tarmfloran hos kalvar framför allt under perioden då de utfodras med mjölk.

Syftet med denna studie var att ytterligare öka förståelsen om hur den unga kalven träffar på, och koloniserar av, de resistenta bakterierna. För att testa hypotesen att kon urskiljer en högre andel resistenta bakterier vid tiden för kalvning provtogs kor och deras kalvar under flera tillfällen vid tiden för kalvning. Det totala materialet i studien utgörs av 22 kor, deras kalvar samt 22 kor i mittlaktation (kontrollgrupp) från sex KRAV-anslutna besättningar i Uppland. Avföringsprover togs 1-16 dagar innan kalvning från ko, 1 dag efter kalvning från ko och kalv samt 7-10 dagar efter kalvning från ko och kalv. Proverna undersöktes för andel tetracyklinresistenta *E. coli* (tet-R *E. coli*).

Inga kor i kontrollgruppen hade växt av tet-R *E. coli*. Totalt sju av korna som provtogs före och efter kalvning var positiva för tet-R *E. coli* vid något tillfälle. Högst antal positiva kor sågs vid provtagning 7-10 dagar efter kalvning då fyra av korna urskiljde tet-R *E. coli*. Totalt 21 av 22 kalvar var positiva för tet-R *E. coli* vid något provtillfälle. Hälften av kalvarna (11/22) var positiva för tet-R *E. coli* vid båda provtagningstillfällena. Med några undantag var andelen tet-R *E. coli* låg hos både kor och kalvar. Det fanns en tendens till att kor runt kalvning urskiljer mer resistenta bakterier än kor mitt i laktationen, men en eventuell skillnad kunde inte statistiskt säkerställas utifrån materialet i denna studie. Det var inte några skillnader mellan kalvar vars mödrar var negativa för tet-R *E. coli* jämfört med de vars mödrar var positiva. Förekomsten av tet-R *E. coli* hos kalvar i denna studie kan inte förklaras med en hög urskiljning av resistenta bakterier från kon vid tiden för kalvning, även om det finns vissa indikationer på att en ökad urskiljning faktiskt sker.

## SUMMARY

Antibiotic resistance is an increasing problem which may result in untreatable infections, increased mortality and high costs for the society. Antibiotic resistance in Sweden is monitored by the Swedish Institute for Communicable Disease Control and the National Veterinary Institute. Today we have a low prevalence of antibiotic resistance in Sweden, but during the last decade an increase in some dreaded groups of resistant bacteria have occurred. Several studies from different countries show that the prevalence of resistant bacteria is higher in young individuals and then declines with age. Among cattle, the prevalence of antibiotic resistance in calves seems to peak during the milk feeding period.

The aim of this study was to increase the understanding of how the gut flora of the young calf is colonized by resistant bacteria and to test the hypothesis that cows shed more resistant bacteria around parturition. The six participating farms were located in Uppland and had organic (KRAV) production. Faecal samples were obtained from 22 dairy cows and their offspring at the time around calving. Faecal samples were obtained from cows 1-16 days before, from cows and calves one day after, and 7-10 days after calving. Samples from 22 cows in midlactation (control group) were also obtained. In each sample, the proportion of tetracycline resistant *Escherichia coli* (tet-R *E. coli*) and the total number of *E. coli* was determined.

None of the samples from the control group contained tet-R *E. coli*. Seven of the cows carried tet-R *E. coli* at least in one sampling around calving. Highest proportion of tet-R *E. coli*-positive cows was seen 7-10 days post-partum, when four of the cows shed tet-R *E. coli*. Twenty-one out of 22 calves carried tet-R *E. coli* at least at one sampling. Fifty percent of calves (11/22) carried tet-R *E. coli* at both samplings. In most cases the proportion of tet-R *E. coli* was low in both cows and calves. There was a tendency towards increased shedding for cows around parturition compared to cows in midlactation, but the difference was not statistically significant in this study. There was no difference in shedding of resistant bacteria from calves with tet-R *E. coli*-positive mothers compared to calves with tet-R *E. coli*-negative mothers. The occurrence of resistant bacteria in the calves in this study can not be explained by increased shedding of resistant bacteria from the cow around calving. However, the results indicate that the cow actually does shed more resistant bacteria at the time for calving.

## INNEHÅLL

<b>Inledning</b> .....	<b>1</b>
<b>Litteraturöversikt</b> .....	<b>1</b>
<b>Antibiotikaresistens</b> .....	<b>1</b>
Det globala hotet.....	1
Uppkomst och spridning av resistens.....	2
Olika typer av resistensmekanismer.....	2
Indikatorbakterier som mått på antibiotikaresistens.....	3
<b>Antibiotikaresistens i Sverige</b> .....	<b>4</b>
Tetracyklinresistens.....	5
Indikatorbakterier .....	6
<b>Resistens hos unga individer</b> .....	<b>6</b>
Har antibiotikaanvändning betydelse för resistens hos unga kalvar? .....	7
Selekterar utfodring med karenstidsmjölk för resistent bakterier hos unga kalvar? .....	8
Co-selekteras resistensgener med gener för andra egenskaper som gör att resistent bakterier kan konkurrera ut andra bakterier tidigt i kalvens liv? .....	10
Urskiljer kon en förhöjd andel resistent bakterier vid tiden för kalvning och utgör hon på så sätt en källa till resistensförekomst hos den unga kalven? .....	11
<b>Material och metoder</b> .....	<b>12</b>
<b>Provinsamling och provhantering</b> .....	<b>12</b>
<b>Enkätundersökning</b> .....	<b>12</b>
<b>Bakteriologisk odling</b> .....	<b>13</b>
<b>Statistisk bearbetning</b> .....	<b>13</b>
<b>Resultat</b> .....	<b>14</b>
<b>Enkät svar</b> .....	<b>14</b>
Deltagande besättningar .....	14
Deltagande ko-kalvpar .....	15
Kontrollgrupp .....	17
<b>Resistensförekomst</b> .....	<b>17</b>
Kor inklusive kontrollgrupp .....	17
Kalvar .....	17
Samband ko och kalv.....	18
<b>Diskussion</b> .....	<b>19</b>
<b>Konklusion</b> .....	<b>23</b>
<b>Referenser</b> .....	<b>23</b>
<b>Bilaga 1. Enkät - generella uppgifter om besättningen</b>	
<b>Bilaga 2. Individuella uppgifter ko-/kalvpar</b>	



## INLEDNING

Antibiotikaresistens är ett ständigt aktuellt ämne, både globalt och nationellt, då förekomsten och spridningen av resistent bakterier ses som ett stort hot mot folkhälsan (Världshälsoorganisationen, WHO 2013). I Sverige har förekomsten av vissa resistent bakterier ökat under de senaste åren, trots ansvarsfull användning av antibiotika (SWEDRES-SVARM 2012). Vi vet idag mycket om hur och varför antibiotikaresistens uppkommer och sprids, och det finns många studier i ämnet. Flera av dessa studier har visat att resistensförekomsten är högre hos unga individer inom olika arter – både hos djur och människor. En hög resistensförekomst har ofta tillskrivits en frikostig antibiotikaanvändning, men det finns flera studier som tyder på att andra faktorer också har betydelse och detta särskilt när det gäller resistensförekomsten hos de unga individerna (Khachatryan et al., 2004; Walk et al., 2007). Resistensegenskaper verkar vara kopplade till egenskaper som gör att dessa bakterier har överlevnadsfördelar gentemot bakterier som är känsliga för antibiotika i den unga tarmfloran. När det gäller dessa egenskaper samt hur och var den unga individens tarmflora koloniserar av de resistent bakterierna är mycket fortfarande oklart. I en studie av Watson et al. (2012) urskiljde kor efter kalvning mer resistent bakterier än kor innan kalvning, och kalvningsmiljön sågs som en källa till spridning av resistent bakterier till både kor och kalvar.

Mot denna bakgrund var syftet med denna pilotstudie att testa hypotesen att kor urskiljer en högre andel resistent bakterier vid tiden för kalvning, och på så sätt är en anledning till att tarmfloran hos den unga kalven tidigt i livet koloniserar av resistent bakterier.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Antibiotikaresistens

#### *Det globala hotet*

Redan i sitt Nobeltal sände Alexander Fleming – penicillinets upptäckare – ut ett varningens ord angående utvecklingen av antimikrobiell resistens: ”It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body” (Fleming, 1945 s. 93).

Och mycket riktigt – bakterier som tidigare varit känsliga för penicillinets verkan sågs utveckla resistens. Samma mönster upprepades för andra antibiotikaklasser som introducerades på marknaden. Den entusiasm med vilken nya antibiotikaklasser upptäcktes och utvecklades avtog i takt med den snabba resistensutvecklingen som i de flesta fall rapporterades redan inom ett par år från det att en ny substans börjat användas. Även begreppet multiresistens blev känt – vissa bakterier har utvecklat resistens mot i princip alla läkemedel som kan användas för att bekämpa dem (Aleksun & Levy, 2007).

Idag är antibiotikaresistens enligt WHO ett stort och världsomspännande hot mot den globala folkhälsan (WHO, 2013). Infektioner som tidigare enkelt kunnat behandlas riskerar att bli så gott som omöjliga att behandla vilket kan leda till förlängda sjukdomsförlopp och i värsta fall

till dödsfall. Enligt EU:s smittskyddsmyndighet (ECDC) orsakar antibiotikaresistens 25 000 dödsfall inom EU varje år, och kostar ungefär 1,5 miljarder euro/år i form av sjukvårdskostnader och produktionsbortfall (ECDC, 2009). I längden leder resistensproblematiken också till stora samhällsekonomiska förluster, till exempel i form av minskat resande, minskad internationell handel och minskade internationella transporter (WHO, 2013). Antibiotikaresistens är också ett problem hos våra produktions- och sällskapsdjur bland annat i form av försämrade behandlingsresultat, men även då antibiotikaresistens kan spridas till andra djur och även från djur till människor. I Sverige finns idag lagstiftning som innebär att vissa antibiotika som anses vara särskilt viktiga inom humansjukvården endast får användas för behandling av djur efter särskild prövning (SJV, SJVFS 2012:32).

### **Uppkomst och spridning av resistens**

Bakterier har en fenomenal förmåga att anpassa sig till sin omgivning, och ett exempel på detta är just förmågan att utveckla motståndskraft mot antibiotika. Resistens kan vara förvärvad eller medfödd, ett exempel på medfödd resistens är hur den gramnegativa bakteriens cellvägg inte påverkas av bensylpenicillin (Alekhun & Levy, 2007).

Förvärvad resistens kan uppstå på flera olika sätt. Spontana kromosomala mutationer hos enskilda bakterier kan leda till en överlevnadsfördel i en omgivning där antibakteriella substanser finns närvarande och den enskilda muterade bakteriestammen får då chansen att uppföras och därmed vertikalt sprida sina resistensgener – så kallad klonal spridning (Giedraitienė et al., 2011).

Men resistens kan också spridas horisontellt, genom överföring av extrakromosomala element mellan bakterier. Detta kan ske på olika sätt: *Konjugation* innebär att två intilliggande bakterier överför genetisk information till varandra (både gällande resistens och andra egenskaper) via plasmider. Plasmider är DNA-segment som inte tillhör kromosomen och finns fritt i bakteriens cytoplasma. Denna överföring är vanligt förekommande, även mellan olika bakteriearter och förekommer frekvent till exempel mellan *Escherichia coli* (*E. coli*) och olika *Salmonella*-arter. *Transformation* är när fritt förekommande genetiskt material plockas upp och utnyttjas av en bakterie. Det fria DNA:t kan komma från döende bakterier eller plasmider. Bakteriofager är virus som angriper bakterier och dessa kan också medverka i överföring av genetiskt material och därmed resistensegenskaper. Denna typ av överföring kallas *transduktion* (Alekhun & Levy, 2007).

### **Olika typer av resistensmekanismer**

Resistens hos en bakterie är en följd av att den har en eller flera resistensmekanismer som gör att den blir okänslig för antibiotika som normalt sett dödar eller hämmar den. Vissa resistensmekanismer är specifika för en viss typ av antibiotika och gör då bakterien resistent mot just den antibiotikan eller antibiotikaklassen. Detta kan ske genom förändringar eller skyddande av strukturer som ett antibiotikum verkar mot, eller genom förändringar av cellväggpermeabiliteten. En vanlig resistensmekanism är enzymatisk aktivitet, antingen genom produktion av enzym som bryter ner viktiga komponenter av ett antibiotikum

(exempelvis penicillinas som bryter ner beta-laktamringen i benzylpenicillin), eller som förändrar ett antibiotikums uppbyggnad och får det att förlora sin funktion (Aleksun & Levy, 2007).

Det finns även mekanismer som verkar mer ospecifikt – till exempel effluxpumpar som effektivt pumpar ut antimikrobiella substanser ur bakteriecellen, och som kan verka mot flera olika antibiotikaklasser. Kombinationer av olika resistensegenskaper kan också förekomma (Aleksun & Levy, 2007). Bakterier som bär flera olika resistensmekanismer eller på mekanismer som gör dem resistenta mot flera olika antibiotikaklasser kallas multiresistenta. Ofta definieras multiresistens som resistens mot tre eller flera antibiotikaklasser (SVA, 2013).

### *Tetracyklinresistens*

Tetracykliner verkar genom att störa bakteriens ribosomfunktion och hämmar därmed proteintillverkningen (Aleksun & Levy, 2007). Tetracyklin är ett brett verkande antibiotikum, med effekt mot många gramnegativa, grampositiva, anaeroba, aeroba och intracellulära bakterier, samt även mot en del parasiter. På grund av sin effektivitet och låga kostnad har tetracyklin globalt använts i mycket stor utsträckning, sedan utvecklingen av substansen under slutet av 1940-talet, både för behandling inom human- och veterinärmedicin samt i tillväxtfrämjande syfte hos våra produktionsdjur (van den Bogaard & Stobberingh, 2000; Roberts, 1996).

Effluxpumpar är en vanligt förekommande resistensmekanism, och den mest studerade mekanismen för tetracyklinresistens. Effluxpumpar transporterar aktivt ut antibiotika och gör att koncentrationen inuti bakterien blir alltför låg för att ha någon effekt (Al-Bahry et al., 2013; Roberts, 1996). Man har hittat mer än 20 olika efflux-proteiner, uppdelade i sex olika grupper som verkar mot tetracyklin. Hos vissa av dessa kontrolleras uttrycket av effluxpumpen av en repressor som inhiberar transkriptionen av dem i frånvaro av tetracyklin. Andra typer har andra funktioner för att inte effluxpumpen ska vara aktiv hela tiden, vilket vore slöseri med bakteriens energi, utan enbart vid närvaro av tetracyklin. Vissa effluxpumpar är specifika för just tetracyklin, medan andra kan transportera ut flera olika sorters antibiotika. Tetracyklinresistens kan också medieras av proteiner som skyddar ribosomen från tetracyklins verkan eller genom att bakterien med enzymatisk aktivitet inaktiverar läkemedlet (Aleksun & Levy, 2007).

Resistens mot tetracykliner sprids i stor utsträckning med hjälp av plasmider och andra överförbara element och kan därmed också spridas mellan olika bakteriearter. Gener som kodar för effluxpumpar hos gramnegativa bakterier är ofta belägna på stora, överförbara plasmider som ofta bär gener som kodar för resistens även mot andra antibiotikaklasser. Detta bidrar till spridning av resistens genom så kallad co-selektion (Aleksun & Levy, 2007; Roberts, 1996).

### ***Indikatorbakterier som mått på antibiotikaresistens***

Med indikatorbakterier menas bakterier i normalfloran hos friska individer som undersöks med avseende på resistens för att ge en uppfattning om förekomsten av förvärvad resistens

hos bakteriefloran i en population. *Escherichia coli* är en fakultativt anaerob, gramnegativ bakterie som ofta används som indikatorbakterie. Det är en bakterie som är vanlig i tarmfloran hos både människor och våra husdjur, och hos vilken förvärvad antibiotikaresistens är relativt vanlig (SWEDRES-SVARM 2012; Karami et al., 2006; Österblad et al., 2000).

Antibiotikaanvändning selekterar för resistens även hos bakterier i normalfloran och undersökning av indikatorbakterier är därför ett sätt att indirekt mäta selektionstrycket från antibiotikaanvändningen i en djurpopulation. En stor fördel med att undersöka indikatorbakterier är att metodiken enkelt kan harmoniseras och därigenom kan resultat från olika studier jämföras. Undersökningar av indikatorbakterier ingår därför i många resistensövervakningsprogram (SWEDRES-SVARM 2012; Björn Bengtsson, personlig kommunikation).

Indikatorbakterier ger oftast inte upphov till klinisk sjukdom men de kan utgöra en reservoar för resistensgener som kan spridas till andra, och däribland patogena, bakterier. Vissa patogena stammar av *E. coli* kan dock orsaka allvarliga enteriter hos både djur och människa, och i vissa fall kan kommensala tarmbakterier orsaka infektioner utanför tarmen, till exempel mastiter hos kor och urinvägsinfektioner eller septikemier hos människa (Karami et al., 2006; van den Bogaard & Stobberingh, 2000).

### **Antibiotikaresistens i Sverige**

Resistensläget i Sverige övervakas inom både human- och veterinärmedicin och från år 2012 har resultaten av denna övervakning integrerats i rapporten SWEDRES-SVARM som är ett samarbete mellan Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) och Smittskyddsinstitutet (SMI). Ur ett internationellt perspektiv har vi i Sverige idag ett gott läge när det gäller antibiotikaresistens (SWEDRES-SVARM 2012). Detta bekräftas också i en övervakningsrapport gällande år 2011 med 29 deltagande europeiska länder, där Sverige hade låg förekomst av resistens hos invasiva isolat av *E. coli* hos människor (ECDC, 2012). I en jämförelse av resistensförekomst hos patogena bakterier från nötkreatur i Europa uppvisade svenska isolat hög känslighet mot testade antibiotika (Hendriksen et al., 2008).

År 1986 förbjöds tillväxtfrämjande fodertillsatser för produktionsdjur innehållande antibiotika i Sverige. Användning av sådana tillsatser var dock låg redan då, dels för att effekten av dem ifrågasatts, men även då frågan om resistensutveckling redan var aktuell (Bengtsson & Wierup, 2006). Detta förbud kom tidigare än i många andra europeiska länder, och har i kombination med en långvarig ansvarsfull antibiotikaanvändning troligtvis bidragit till den, i jämförelse, låga resistensförekomsten i landet idag. År 2006 förbjöds liknande preparat inom hela EU, medan det i USA fortfarande är vanligt med fodertillskott innehållande antibiotika, även om viss reglering nu förekommer (Thames et al., 2012; Kaneene et al., 2008; Bengtsson & Wierup, 2006; Berge et al., 2006).

Även om läget i Sverige är fördelaktigt i ett internationellt perspektiv har en ökad förekomst av resistens hos flera olika bakteriearter från djur dokumenterats i det övervakningsprogram,

SVARM (Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring), som sedan år 2000 drivs vid SVA. Exempelvis har andelen resistenta kliniska isolat av *E. coli* från nötkreatur ökat under 2000-talet, för flera olika antibiotikaklasser, exempelvis tetracyklin och streptomycin (SWEDRES-SVARM 2012). Även inom humansidan ses en ökad resistensproblematik, med flera rapporterade fall av bakterier som producerar extended spectrum beta-lactamases, ESBL, meticillinresistenta *Staphylococcus aureus*, MRSA, och vancomycinresistenta enterokocker, VRE, under 2012 jämfört med 2011 (SWEDRES-SVARM 2012).

I en svensk studie insamlades under 2004 och 2005 avföringsprover från kalvar med (fall) eller utan (kontroller) diarré (de Verdier et al., 2012). Proverna samlades in från hela landet och förekomsten av virulensfaktorer och resistens hos *E. coli* undersöktes. Studien innefattade 95 kalvar som var mellan en dag och fyra veckor gamla. Hos isolat av *E. coli* såg man högst förekomst av resistens mot streptomycin (44,2 %), tetracyklin (31,6 %), sulfonamid (31,6 %) och ampicillin (27,4 %). Ingen resistens mot ceftiofur (senare generationens cefalosporin) kunde påvisas i studien. Totalt uppvisade 61 % av isolaten resistens mot en eller flera substanser och 28 % var multiresistenta (uppvisade resistens mot tre eller flera antibiotika). Den vanligaste kombinationen av resistens var streptomycin-sulfonamid-tetracyklin, ofta tillsammans med andra resistenser. Detta resistensmönster, liksom en hög prevalens resistens, återfinns även i andra studier av kalvar, från andra länder samt i tidigare SVARM-rapporter (SWEDRES-SVARM 2012; Berge et al., 2010; Khachatryan et al., 2004).

### **Tetracyklinresistens**

I Sverige var försäljningen av tetracykliner för veterinärmedicinskt bruk hög under 1980-talet men har sedan dess stadigt minskat (Figur 1), och år 2012 såldes 881 kg (aktiv substans) tetracyklin (SVARM 2000-2010; SWEDRES-SVARM 2012). Det är framför allt gruppbehandling med tetracyklin som minskat. Under de första fyra åren på 2000-talet sågs en minskning av tetracyklinresistens hos kliniska *E. coli*-isolat från gris, vilket har kopplats till den minskade användningen av läkemedlet (SVARM 2003; SVARM 2004). Trots detta är tetracyklinresistens fortsatt en av de vanligast förekommande resistenstyperna bland våra husdjur, inte minst hos nötkreatur och gris. Redan i den första SVARM-rapporten gällande år 2000 sågs *E. coli*-fenotyper med resistens mot streptomycin, sulfonamid och tetracyklin och denna resistenskombination är vanligt förekommande hos kliniska isolat av *E. coli* som undersöks på SVA. I SVARM 2009 kan man se att dessa resistenser är associerade till varandra hos *E. coli*-isolat från nötkreatur som samlats in under 2000, 2006 och 2009. Exempelvis är 62 % av tetracyklinresistenta isolat även resistenta mot sulfonamid och 77 % av tetracyklinresistenta isolat även resistenta mot streptomycin. Inom humansjukvården är tetracykliner den grupp antibiotika som näst betalaktamer används i störst utsträckning (räknat i mängd aktiv substans). År 2012 användes mer än fyra gånger så mycket tetracyklin inom humanmedicinen jämfört med den veterinärmedicinska användningen (SWEDRES-SVARM 2012).



Figur 1. Tetracyklinförsäljningen för veterinärmedicinskt bruk har minskat under de senaste decennierna. Y-axeln visar kg aktiv substans.

Källa: SVARM 2000-2011, SWEDRES-SVARM, 2012.

### Indikatorbakterier

Under 2012 undersöktes i övervakningsprogrammet SVARM indikatorbakterier (*E. coli*) i tarmfloran från slaktkyckling, värphöns och hundar i Sverige. I alla dessa grupper var resistens hos slumpmässigt utvalda isolat relativt ovanlig. Vanligast var resistens mot tetracyklin, sulfonamider eller ampicillin (SWEDRES-SVARM 2012). Även tidigare år har resistensförekomsten hos indikatorbakterier hos djur varit låg. Bland annat såg man i SVARM 2006 att 97 % av *E. coli*-isolat från mjölkkor var känsliga för alla testade antibiotika, och hos *E. coli* från ca sex månader gamla kalvar undersökta år 2009 var 95 % av de undersökta isolaten (212/223 isolat) känsliga för alla testade antibiotika (SVARM 2009; SVARM 2006).

### Resistens hos unga individer

Studier från flera olika länder, utförda på flera olika djurslag och i flera olika populationer uppvisar liknande resultat: Unga individer bär på en högre andel resistent bakterier i sin tarmflora än äldre individer i samma population (Berge et al., 2010; Dolejská et al., 2008; Hoyle et al., 2004; Khachatryan et al., 2004; Moro et al., 1998; Langlois et al., 1988). Gemensamt för studier utförda på nötkreatur är att det är under den period som kalvarna utfodras med mjölk eller mjölkersättning som andelen resistent bakterier är högst och man ser samma mönster för många olika antibiotikaklasser (de Verdier et al., 2012; Watson et al., 2012; Berge et al., 2010; Khachatryan et al., 2004; Moro et al., 1998).

Det är lätt att föreställa sig att det är ett högt selektionstryck som leder till denna höga resistensförekomst, men förekomsten hos de unga individerna kan inte förklaras enbart med användning av antibiotika. Hoyle et al. (2004) undersökte antibiotikaresistens hos indikatorbakterier i tarmfloran hos 48 kalvar i en skotsk köttjursbesättning och såg en med ålder linjär minskning av ampicillinresistens från höga nivåer vid födseln. Även resistens mot nalixidinsyra var vanligare hos unga kalvar och minskade när kalven blev äldre. Antibiotikabehandlingar registrerades, men i de fall kalvar fick behandling hade de haft

resistenta bakterier redan innan påbörjad antibiotikakur. Edrington et. al (2012) undersökte betydelsen av flera faktorer i relation till förekomsten av multiresistens hos *E. coli* i unga kalvars tarmflora och fann att åldern var den faktor om hade störst betydelse: De resistenta bakterierna minskade med ålder, vid en veckas ålder hittades bakterier med multiresistens hos ca 98 % av kalvarna, vid sex månaders ålder var denna siffra 60 %. Högst antal resistenta bakterier sågs vid 2-4 veckors ålder.

Flera studier adresserar den komplexa problematiken bakom den höga förekomsten av resistenta bakterier hos unga individer. I denna litteraturöversikt presenteras fyra av de hypoteser till den höga förekomsten som framförts:

- Har antibiotikaanvändning betydelse för resistens hos unga kalvar?
- Selektarar utfodring med karenstidsmjölk för resistenta bakterier hos unga kalvar?
- Co-selektarar resistensgener med gener för andra egenskaper som gör att resistenta bakterier kan konkurrera ut andra bakterier tidigt i kalvens liv?
- Urskiljer kon en förhöjd andel resistenta bakterier vid tiden för kalvning och utgör hon på så sätt en källa till resistensförekomst hos den unga kalven?

### **Har antibiotikaanvändning betydelse för resistens hos unga kalvar?**

I en amerikansk studie från 2005 jämfördes antibiotikaresistens hos *E. coli*-isolat från 30 ekologiska och 30 konventionella mjölkbesättningar (Sato et al., 2005). De ekologiska gårdarna i studien hade haft ekologiskt produktions sätt i minst tre år, och under den tiden hade inga kor behandlats med antibiotika. I fyra av de ekologiska besättningarna angavs att kalvar med allvarliga symtom på diarré eller lunginflammation blev behandlade med antibiotika. Antibiotikabehandlingar i de konventionella besättningarna var betydligt vanligare. Man såg att både produktionsform (ekologisk vs konventionell) och ålder var signifikant associerade med antibiotikaresistens. När det gäller tetracyklinresistens var ca 55 % av isolaten från kalvar i konventionella besättningar resistenta. Prover från kor i samma besättningar visade på resistens hos ca 9 % av isolaten. I de ekologiska besättningarna var andelen resistenta bakterier lägre, men även här sågs samma mönster avseende ålder med ca 36 % tetracyklinresistenta isolat från kalvar och ca 6 % resistenta isolat från kor.

Berge et al. (2005) undersökte också vilka faktorer som påverkar resistensen i tarmflora hos unga kalvar och såg bland annat att kalvar som behandlats med antibiotika inom fem dagar innan provtagning i större utsträckning bar på multiresistenta *E. coli* än kalvar som inte behandlats med antibiotika (odds ratio (OR)=2.0). Tjurkalvar som föddes upp under intensiva förhållanden, transporterades till nya faciliteter och i stor utsträckning utfodrades med mjölk/mjölkersättning med antibiotikatillsats i profylaktiskt syfte hade mer resistenta bakterier än kvigkalvar som föddes upp för mjölkproduktion. Enligt författarna kan detta delvis förklaras med ett högre selektionstryck i den intensiva produktionen. Starkast associerat med antibiotikaresistens var dock kalvens ålder, och även kalvar från mjölkbesättningar som inte hade behandlats med antibiotika uppvisade resistens mot flera olika antibiotika vid två veckors ålder. Man såg även resistens mot antibiotika som inte använts på en väldigt lång tid på den aktuella gården.

I USA är det relativt vanligt med profylaktisk fodertillsats av antibiotika till unga kalvar och flera studier har visat att kalvar som får sådana fodertillsatser i större utsträckning bär på resistent och multiresistent bakterier än kalvar som inte får det (Berge et al., 2006; Kaneene et al., 2008; Pereira et al., 2011). Men det finns även studier som tyder på att antibiotikaanvändning inte behöver medföra en högre resistensförekomst. Khachatryan et al. (2004) utförde ett försök där antibiotikaresistens jämfördes i två kalvgrupper där den ena gruppen utfodrades med tillskottsfoder innehållande oxytetracyklin och den andra gruppen gavs en diet utan tillsatt antibiotika. En högre andel bakterier med resistensmönstret streptomycin-sulfa-tetracyklin fanns i gruppen som inte fick oxytetracyklin, vilket indikerar att andra faktorer än antibiotikaanvändning påverkar resistensförekomsten. För andra undersökta antibiotikaklasser var dock situationen den omvända och den totala förekomsten av resistens var högst i gruppen som fick antibiotika. I samma studie visades att resistensen var som högst hos icke avvanda kalvar (<3 månader), och sedan avklingade med ålder.

Thames et al. (2012) använde sig av PCR för att analysera resistensgener i tarmflora hos 28 kalvar som sedan födseln delats upp i tre olika grupper. Kontrollgruppen utsattes inte för någon antibiotika, medan en grupp fick subterapeutiska tillsatser av antibiotika (tetracyklin och neomycin) i sin mjölkersättning och en grupp blev behandlad per os med terapeutiska doser av samma antibiotika vid 36 dagars ålder. I de olika grupperna fanns ingen skillnad i förekomst av de resistensgener mot tetracyklin och sulfonamider som testades. När det gällde en resistensgen mot erytromycin såg man en lägre förekomst hos de kalvar som fick subterapeutiska doser av antibiotika. Alla kalvar som ingick i studien urskiljde bakterier med minst en av de fem testade generna för tetracyklinresistens vid provtagning när de var tolv veckor gamla och de flesta av kalvarna urskiljde bakterier med flera olika resistensgener mot tetracyklin. I en studie av de Verdier et al. (2012) sågs ingen skillnad i prevalens av antibiotikaresistens hos tarmbakterier från kalvar i besättningar som rutinmässigt använde antibiotika för att behandla diarré hos kalvar jämfört med de som inte gjorde det.

Betydelsen av antibiotikaanvändning har även studerats hos andra djurslag. Langlois et al. publicerade 1988 en studie utförd i en grisbesättning där ingen antibiotika använts under de senaste 126 månaderna. Man såg att förekomsten av tetracyklinresistens var fortsatt hög, trots det minskade selektionstrycket. Allra högst resistens sågs hos de yngsta grisarna (<2 månader) och det konkluderades att resistens var signifikant vanligare hos grisar yngre än 6 månader än hos äldre djur.

Antibiotikaanvändning har alltså visats påverka resistensförekomst i stor utsträckning, men det finns även exempel på att andra faktorer har stor betydelse för att resistent bakterier ska kunna kolonisera den unga kalvens tarmflora. I vissa studier har man till och med sett en lägre resistensförekomst hos grupper som utsatts för antibiotika jämfört med andra grupper (Khachatryan et al., 2004).

### ***Selekterar utfodring med karenstidsmjölk för resistent bakterier hos unga kalvar?***

Karenstid för mjölk är den av Livsmedelsverket fastställda tid efter avslutad behandling med ett läkemedel som måste gå innan mjölken åter får säljas. Detta för att säkerställa att inga



läkemedelsrester finns i den mjölk som når konsumenter. I utländska studier används ofta begreppet ”waste milk” (WM) vilket innefattar all mjölk som av olika anledningar inte får säljas till mejeriet. Begreppen karenstidsmjölk och WM bör därför inte användas synonymt eftersom WM även kan innebära råmjölk, mjölk från sjuka och/eller behandlade djur, mjölk med alltför höga celltal samt överskottsmjölk, när mjölmängden överskrider den kvot som får säljas (Aust et al., 2012). I många fall används sådan mjölk för utfodring till kalvar, då den annars enbart blir en förlust för lantbrukaren. Antibiotikarester i karenstidsmjölk eller WM har föreslagits vara en orsak till den höga resistensförekomsten hos unga kalvar jämfört med hos äldre nötkreatur (Randall et al., 2013, Berge et al. 2005, Langford et al., 2003).

Aust et al. (2012) jämförde effekten på kalvhälsa och antibiotikaresistens när kalvar utfodrades med obehandlad WM, pastöriserad WM, tankmjölk eller pastöriserad tankmjölk. Utfodring med WM, både pastöriserad och opastöriserad, ökade förekomsten av resistent *E. coli* hos deltagande kalvar. Detta gällde dock inte alla antibiotikaklasser, resistens mot tetracykliner påverkades till exempel inte i någon större utsträckning. Ingen skillnad i tillväxt eller kalvhälsa sågs i de olika grupperna. I en annan studie där man jämförde multiresistenta *E. coli* hos kalvar som fick pastöriserad WM och kalvar som fick opastöriserad WM såg man en minskande prevalens av multiresistenta bakterier med kalvens ålder. Denna minskning inföll något tidigare hos de kalvar som utfodrades med opastöriserad mjölk. Det diskuterades att detta kan bero på att pastöriseringen reducerar antalet bakterier som kan konkurrera med de resistent bakterier (Edrington et al. 2012). I samma studie kunde man inte hitta några mätbara mängder antibiotika i mjölken från behandlade kor. Berge et al. (2005) undersökte den mjölk (inklusive mjölk från behandlade kor) som kalvarna utfodrades med och fann inga spår av antibiotika i denna. Randall et al. (2013) fann antibiotikarester i 66 av 103 WM-prover från engelska mjölkbesättningar. De rester som hittades korrelerade med de antibiotika som användes i respektive besättning. Langford et al. (2003) uppmätte antibiotikarester i mjölk från behandlade kor, högst halt sågs under behandlingstiden och lägre halter under karenstiden.

Det finns en del studier som undersöker effekten av utfodring med WM på kalvhälsa och resistensförekomst, och resistensförekomsten påverkas rimligtvis i största utsträckning av eventuella antibiotikarester i mjölken. I en kinesisk studie såg Xu et al. (2013) att gårdar som utfodrade kalvar med mjölk innehållande antibiotikarester från behandlade kor löpte 4,7 gånger så stor risk att vara positiva för ESBL-producerande *E. coli* jämfört med gårdar som inte utfodrade kalvar med sådan mjölk. I en experimentiell studie av Langford et al. (2003) såg man ett tydligt dos-respons samband där hög penicillinhalt i mjölk gav en mindre hämningszon på substrat med penicillinplatta vid odling av tarmbakterier från kalvar som utfodrades med mjölk med hög penicillinhalt jämfört med kalvar som fick mjölk med lägre penicillinhalt. Odlingen var i denna studie icke selektiv och det är oklart vilka bakteriearter som odlades och vilken typ av resistens som sågs (medfödd eller förvärd).

För närvarande pågår ett projekt vid SVA där man undersöker om utfodring med karenstidsmjölk påverkar antibiotikaresistens, med målet att utforma rekommendationer för sådan utfodring (SWEDRES-SVARM 2012). Utfodring av kalvar med karenstidsmjölk är idag relativt vanligt förekommande i Sverige då 79 % av svenska mjölkproducenter anger i en

enkätundersökning att de alltid eller ibland utfodrar kalvar med mjölk från antibiotikabehandlade kor (Duse et al., 2013).

I dagsläget saknas entydiga bevis för att utfodring med karenstidsmjölk skulle selektera för en ökad resistensförekomst hos unga kalvar. Känt är dock att även antibiotikahalter långt under MIC (lägsta hämmande koncentration), kan selektera fram resistenta bakterier (Gullberg et al., 2011).

### **Co-selekteras resistensgener med gener för andra egenskaper som gör att resistenta bakterier kan konkurrera ut andra bakterier tidigt i kalvens liv?**

Vid ett in vivo-försök där man inokulerade *E. coli* med resistensfenotypen streptomycin-sulfonamid-tetracyklin hos nötkreatur i olika åldrar såg man att dessa bakterier konkurrerade ut känsliga stammar hos unga, icke avvanda kalvar trots frånvaro av ett selektionstryck genom antibiotikabehandlingar. Hos äldre djur verkade de resistenta stammarna däremot inte ha några fördelar gentemot känsliga stammar (Khachatryan et al., 2004). I en studie från 2006 fann Khachatryan et al. att en grupp kalvar som inte utfodrades med tillsatsfoder hade lägre andel resistenta indikatorbakterier än kalvgrupper som fick tillsatsfoder. Däremot sågs ingen skillnad i resistensförekomst mellan grupper som utfodrades med tillsatsfoder innehållande antibiotika (oxytetracyklin) eller tillsatsfoder som endast innehöll vitaminer. Även Walk et al. (2007) fann att tetracyklinresistens verkar förekomma utan förekomst av känt selektionstryck och kan vara sammankopplad med egenskaper som gör att bakterien har konkurrensfördelar i den unga kalvens tarmflora. Berge et al. (2005) nämner att det finns indikationer på att de resistenta bakterierna bär på egenskaper så som adhesionsfaktorer, sideroforer och andra koloniseringsegenskaper som gör att de har en högre fitness än de känsliga bakterierna (vidare referenser i Berge et al., 2005).

Hos spädbarn har man sett att resistenta bakterier uppförökas och utsöndras i större utsträckning än det intag av resistenta bakterier man kunnat påvisa hos barnen (Zhang et al., 2011). Karami et al. (2006) undersökte resistens hos *E. coli* i tarmfloran hos 128 svenska spädbarn, där man följde barnen upp till ett års ålder med upprepade provtagningar. Trots att inget av barnen hade behandlats med tetracyklin var prevalensen av tetracyklinresistens 12 % hos de undersökta stammarna. Flera av dessa stammar var även resistenta mot andra antibiotika. Även utan ett direkt selektionstryck verkade de resistenta bakterierna kunna persistera i barnens tarmflora under en längre tid (>3 veckor) utan att bli utkonkurrerade av andra *E. coli*. Man undersökte även virulensfaktorer hos de olika stammarna och såg att de resistenta bakterierna i större utsträckning bar på gener för P-fimbriae och aerobactin, vilket medför förbättrad koloniseringsförmåga och ökat järnupptag för bakterien (Karami et al., 2006).

Flera oberoende studier av djur och människor har visat att resistenta bakterier kan utkonkurrera känsliga stammar och sedan persistera i tarmfloran utan något specifikt selektionstryck från antibiotikaanvändning. Detta tyder på att de resistenta bakterierna har

någon form av överlevnadsfördel som är kopplat till resistensen men som inte påverkas av selektionstryck från antibiotika.

***Urskiljer kon en förhöjd andel resistent bakterier vid tiden för kalvning och utgör hon på så sätt en källa till resistensförekomst hos den unga kalven?***

För att kunna koloniserar av de resistent bakterier måste kalven träffa på dem i sin närmiljö – och det relativt tidigt efter födseln. Watson et al. (2012) undersökte under två år förekomsten av ESBL-producerande *E. coli* i en stor mjölkproducerande besättning i Storbritannien där sådana bakterier tidigare påvisats. Avföringsprover togs från olika djurgrupper och liksom i tidigare studier fann man att resistens var vanligast hos unga kalvar. Vid 53 dagars ålder var prevalensen av resistens 90 %, denna sjönk sedan till 10 % vid 117 dagars ålder. Man fann också en högre andel ESBL-producerande *E. coli* hos mjölkande kor jämfört med sinkor och kvigor. Omgivningsprover togs, vilket visade att kalvnings- och sjukmiljö innehöll mer resistent bakterier än övriga miljöer som provtogs. I studien följdes kor runt tiden för kalvning, med provtagning före, strax efter och ytterligare en tid efter kalvning. Prover tagna efter kalvning innehöll resistent bakterier tio gånger oftare än prover tagna innan kalvning. När man jämförde de resistent stammarna från kor och deras kalvar var dessa av samma klonala ursprung i sju fall, vilket tyder på att bakterier kan ha överförts mellan ko och kalv. I resterande 24 fall hörde dock de resistent stammarna från ko och kalv till olika kloner. Laboriestudier visade att plasmiden som bär på ESBL-genen spreds genom konjugation och på så vis kan ha överförts mellan de olika bakterier som trivs bättre hos kor respektive kalvar (Watson et al., 2012).

I västra Kanada undersöktes förekomst av antibiotikaresistens hos ko-/kalvpar under 2002-2003 (Gow et al., 2008). Författarna såg inget samband i resistensmönster hos kon och hennes egen kalv, utan bedömde att kalvarnas resistensmönster snarare berodde på det generella resistensläget i just den besättningen.

Betydelsen av modern som källa för resistent bakterier hos avkomman har undersökts också hos grisar. Callens et al. (2012) provtog sugor och nyfödda kultingar från tre besättningar. Resistens mot alla testade antibiotika fanns hos bakterier från nyfödda kultingar, oberoende av direkt selektionstryck. Man såg även att resistent bakterier hos sugor vid födsel och digivning var en riskfaktor för resistent bakterier hos deras egna kultingar och gjorde bedömningen att normalfloran hos sugor utgör en reservoar för antimikrobiell resistens hos deras avkomma.

Det finns alltså studier som tyder på att en förändring i urskiljning av bakterier från kon sker i anslutning till, och en tid efter, kalvning. I vilken utsträckning och huruvida detta är av betydelse för den höga förekomsten av resistent bakterier hos de unga kalvarna är dock inte utrett. Pilotstudien i detta examensarbete utfördes för att testa hypotesen att kon urskiljer en högre andel resistent bakterier vid tiden för kalvning och därmed utgör en källa till hög resistensförekomst hos den unga kalven.

## **MATERIAL OCH METODER**

Sex KRAV-an slutna (ekologiska) besättningar belägna i närområdet kring Sveriges Lantbruksuniversitet, SLU, Uppsala, valdes ut och ombads att delta i studien. Dessa besättningar valdes ut då KRAV:s regler innebär att ko och kalv får gå tillsammans i minst 24 timmar efter kalvning och att kalven under denna tid har möjlighet att dia kon. Detta bör medföra att bakterier kan spridas mellan ko och kalv i större utsträckning än på konventionella gårdar, där kalven i många fall tas från kon direkt efter kalvningen. Avsikten var att, i varje besättning, ta prover från kor vid kalvning, från deras kalvar, samt lika många prover från kor i mittlaktation (kontrollgrupp). Inklusionskriterier för kor vid kalvning var att de skulle ha kalvat en gång tidigare och att de var beräknade att kalva i intervallet 7-14 dagar från första provtagningen. Kriterier för korna i mittlaktation var att de skulle befinna sig cirka 80-200 dagar in i laktationen. Beroende på antal kalvningar per besättning provtogs 2-7 kor och deras kalvar, samt lika många kontrollkor från varje besättning. Proverna samlades in under september-oktober 2013.

### **Provinsamling och provhantering**

Proverna utgjordes av avföringsprov tagna via rektum med hjälp av provtagningspinnar med Amie's kolade transportmedium (Copan Diagnostics Inc., Murrieta, California, USA). För varje ko-/kalvpar användes nedanstående provtagningschema:

- Prov 1 togs från ko 7-14 dagar innan beräknad kalvning.
- Prov 2 togs från ko 1 dag efter kalvning.
- Prov 3 togs från kons kalv 1 dag efter kalvning.
- Prov 4 togs från ko 7-10 dagar efter kalvning.
- Prov 5 togs från kons kalv 7-10 dagar efter kalvning.

Prov 1 togs vid det första besökstillfället på gården. Efterföljande provtagningar utfördes i de flesta fall av djurägaren, som sedan förvarade proverna i kylskåp i upp till tre dagar innan de hämtades upp och transporterades i kylväska för analys vid SVA. I samband med att prov 1 togs, provtogs även samma antal kor i mittlaktation, och antal dagar efter kalvning registrerades för dessa kor.

### **Enkätundersökning**

Vid det första besöket på gården användes enkätfrågor som djurägaren/djurskötaren fick svara på för att samla in information om besättningen (bilaga 1). De frågor som ställdes i enkäten var till för att ge en generell bild av besättningen, där olika variabler, framför allt antibiotikabehandlingar och hållningssätt samt utfodring av kalvar sågs som möjliga faktorer som skulle kunna påverka resistensförekomst i besättningen. Enkäten innehöll frågor om besättningsstorlek, medelmjolkproduktion, antibiotikabehandlingar under de senaste fyra månaderna, huvudsakligt inhysningssystem, rutiner för hållning av sinkor, kalvningsmiljö (inklusive om denna ibland används som sjukmiljö), rengöringsrutiner för kalvningsmiljön, kalvens hållningssätt den första veckan samt i hur stor utsträckning kalvar utfodrades med karenstidsmjölk.

För varje ko-/kalvpar registrerades individuella uppgifter om kon, kalvningen och om kalvens första levnadsvecka på en särskild blankett (bilaga 2). Även eventuella behandlingar insatta under studiens gång registrerades.

### **Bakteriologisk odling**

Bakteriologisk odling utfördes för att bestämma om tetracyklinresistenta (tet-R) *E. coli* förekom i avföring hos kor och kalvar och hur stor andel (%) dessa utgjorde av det totala antalet *E. coli* i tarmfloran. Först bestämdes totalantalet kolonier (CFU) *E. coli* och därefter antal CFU med tetracyklinresistens. I de fall det fanns tet-R *E. coli* räknades andelen sådana ut.

Materialet från provtagningspinnen överfördes till 3 ml fysiologisk saltlösning med hjälp av vortex mixer för att frigöra material till vätskan. Detta gav en ospädd lösning (osp) som sedan späddes i tiofaldiga serier, där 0,5 ml av föregående lösning tillsattes till 4,5 ml NaCl så att sex olika spädningsserier erhöles (osp,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ). Av dessa lösningar användes sedan 1 ml för odling på Petrifilm™ Select *E. coli* count plate (3M Microbiology products, St. Paul., Michigan, USA), som är anpassad för odling av *E. coli*. Bakterien växer ut i blågröna kolonier, medan kolonier av andra species blir ljusa. För korna användes (efter justering pga otillräcklig växt) spädning  $10^{-1}$  och  $10^{-3}$  och för kalvarna  $10^{-3}$  och  $10^{-5}$  för att bestämma det totala antalet *E. coli*.

Andelen tet-R *E. coli* i tarmfloran undersöktes genom odling på petrifilm med tillsats av tetracyklin enligt Wu et al. (2008). För dessa selektiva odlingar användes spädning osp och  $10^{-2}$  för både kor och kalvar. Till 1 ml av var och en av dessa spädningar tillsattes 50 µl av en lösning tetracyklin i koncentrationen 1344 mg/L. Efter blandning i vortex mixer användes denna lösning (1050 µl) för odling på petrifilm enligt ovan. Mängden tetracyklin var anpassad för att tillåta växt av *E. coli* med tetracyklin MIC >8mg/L vilket är gränsvärdet för mikrobiologisk resistens enligt EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)). Petrifilmerna inkuberades i 42° C i 24 timmar och därefter räknades och registrerades antalet blågröna kolonier på plattorna. I de fall det växte *E. coli* på både filmen med och utan tetracyklin uträknades andelen tet-R *E. coli*. I de fall växten blev otillräcklig eller alltför riklig för att kunna räknas sattes proverna om på nya petrifilmer med med lägre eller högre spädningsgrad.

### **Statistisk bearbetning**

Enkätsvaren är redovisade med deskriptiv statistik. För att jämföra resistensförekomst före, en dag efter och 7-10 dagar efter kalvning, samt för jämförelse av kor runt kalvning och kontrollgrupp användes ett dubbelsidigt test, Fisher's exakta test, som är lämpligt för små stickprov av kategoriska (ja/nej) variabler, med nollhypotesen:

*H<sub>0</sub>: Ingen skillnad i urskiljning av tetracyklinresistenta E. coli hos kor vid tiden för kalvning jämfört med kor i mittlaktation.*

och mothypotesen:

*H<sub>1</sub>: Det är en skillnad i urskiljning av tetracyklinresistenta E. coli hos kor vid tiden för kalvning jämfört med kor i mittlaktation.*

Fisher's exact test användes också för att jämföra om det var skillnad i resistensförekomst hos kalvar födda av kor med påvisad resistensförekomst och kalvar födda av kor som inte haft växt av tetracyklinresistenta *E. coli*.

*H<sub>0</sub>: Ingen skillnad i resistensförekomst hos E. coli från kalvar födda av kor från vilka resistent E. coli kan isoleras.*

*H<sub>1</sub>: Det finns en skillnad i resistensförekomst hos E. coli från kalvar födda av kor från vilka resistent E. coli kan isoleras.*

Vid denna jämförelse räknades kor och kalvar som positiva om de var positiva vid minst en provomgång.

## RESULTAT

Det totala materialet i studien utgjordes av 22 kor som provtogs runt kalvning och deras kalvar, samt 22 kor i kontrollgruppen från sex KRAV-an slutna besättningar.

### Enkät svar

#### ***Deltagande besättningar***

Information om deltagande besättningar samt andel antibiotikabehandlingar under de senaste fyra månaderna är redovisade i Tabell 1. Enbart ett fall av tetracyklinbehandling under de senaste fyra månaderna i en av besättningarna (gård 5) fanns registrerad och detta gällde en ko som ej var med i studien. Övriga registrerade behandlingar gällde enbart penicillin eller intramammara preparat, oftast sintidsbehandling i form av Siccilactin (Boehringer-Ingelheim Vetmedica, Malmö, Sverige) vilket är penicillin i kombination med aminoglykosid.

De flesta gårdarna hade korna i lösdrift, men gård 5 hade sina djur uppbundna. Hållning av djuren under sintidsperioden skiljde sig mycket mellan de olika besättningarna och dessa enkät svar redovisas inte, då de ej var jämförbara på ett relevant sätt.

När det gällde kalvningsmiljö uppgav fyra av gårdarna att kalvning vanligtvis skedde i ensambox. På gård 1 uppgavs gruppbox för fyra till åtta individer som vid behov kunde delas upp i mindre avdelningar och på gård 5 uppgavs att kalvning antingen skedde på båspall alternativt i ensambox. Alla gårdar använde halm som material i kalvningsmiljön, på två av gårdarna som djupströbbädd, övriga som tunnare bädd alt. på båspall. Gård 6 uppgav att man mellan varje kalvning rengör och desinficerar kalvningsboxen, för övriga besättningar utfördes desinfektion och tvätt med andra intervall, exempelvis ett par gånger/år eller någon gång/månad. Två av gårdarna uppgav att de vanligtvis separerade ko och kalv efter ca ett dygn, en gård efter ca två dygn, tre gårdar efter ca tre dygn och en gård efter ca fyra dygn. Fyra av gårdarna uppgav att den nyfödda kalven inte hade kontakt med några andra djur än sin mor under den första levnadsveckan.

Efter råmjölkperioden fick kalvarna oprocessad mjölk (producerad enligt KRAV:s regelverk). Två av gårdarna uppgav att kalvar aldrig utfodras med karenstidsmjölk, två gårdar uppgav att kalvarna sällan utfodras med sådan mjölk medan två gårdar uppgav att detta sker mindre ofta respektive ofta (Tabell 1).

Gård 1 och 3 angav att kalvningsmiljön aldrig används för hantering av sjuka kor, gård 5 och 6 angav att detta sker sällan medan gård 2 och 4 angav att kalvningsmiljön används som sjukbox mindre ofta. Ingen av gårdarna angav alternativet ofta. I de fall kalvningsmiljön användes för hantering av sjuka djur angav alla att miljön tvättades och/eller desinficerades innan den åter användes som kalvningsmiljö.

Tabell 1. Information om deltagande besättningar samt antal djur vid enkätundersökningen

<b>GÅRD</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Antal år i ekologisk produktion	13	25	8	18	21	20
Medelmjolk-produktion (kg ECM/ko och år)	8 900	7 500	9 000	8 000	8 000	8 600
Mjölknings-system	Robot	Grop	Grop	Robot	Rör <sup>2</sup>	Grop
Antal kor	126	57	130	135	30	60
Antal kvingor	90	50	250	135	40	25
Antal kalvar <3 månader	30	15	20	20	4	7
Övriga djur <sup>1</sup>	0	0	20	2	20	0
Antibiotikabehandlingar under de senaste fyra månaderna/antal djur vid besöket.	2%	0,8%	1,2%	3,8%	3,2%	0%
Intramammara behandlingar under de senaste fyra månaderna/antal kor vid besöket.	9,5%	0%	4,6%	1,5%	3,3%	0%
Utfodras kalvar med karenstidsmjölk?	Mindre ofta	Aldrig	Aldrig	Ofta	Sällan	Sällan

<sup>1</sup> Övriga djur: Ex avvanda stutar eller tjurar i samma besättning; <sup>2</sup> Rörmjölkning

### **Deltagande ko-kalvpar**

De 22 kor som provtogs i samband med kalvning hade fått minst en, och som mest sex tidigare kalvar. Totalt 66 prover från kor och 44 prover från kalvar togs. Ett prov uteslöts på grund av otillräcklig mängd avföring på provtagningspinnen: detta prov var taget från en ko en dag efter kalvning.

I de fall information om juverhälsoklass fanns tillgänglig registrerades denna (Tabell 2). Tre av de deltagande korna var sintidsbehandlade med Siccalactin under denna sinperiod. Ingen av korna fick enligt uppgift allmänbehandling med antibiotika under föregående laktation.

Hur långt innan kalvning kon flyttades till kalvningsmiljön varierade mycket mellan olika besättningar och olika kor (Tabell 2). Majoriteten av korna (12 av 22) kalvade i gruppbox med mellan två och åtta djur i gruppen. Fyra av korna kalvade ute på bete, då i större grupp, med 20 eller 27 kor och/eller kvigor i samma grupp. Kor från gård 2 och gård 6 samt en ko från gård 4 kalvade i ensambox och en ko kalvade på båspall, med 27 kor i samma miljö. Alla kalvar utom tre diade sin mor som första råmjölksgiva. Av de tre som inte diade fick två råmjölk från sin mor och en fick råmjölk från sparad råmjölksbank. Fem av kalvarna hade inte kontakt med någon annan individ än sin mamma från födseln. Två kalvar hade inte kontakt med någon annan individ än sin mamma under den första levnadsveckan. Efter separationen flyttades de flesta kalvarna till gruppbox, i några fall efter att ha varit i ensambox under någon dag, med gruppstorlekar mellan två och tretton djur. Sju kalvar (gård 1) blev födda i gruppbox, och hade därmed kontakt med andra individer vid födseln, men flyttades sedan till ensambox där de befann sig vid sista provtagningen.

Tabell 2. Information om deltagande ko-/kalvpar

Gård	Ko/kalv-par	Kalv i ordn.	Jhkl	Flytt till kalvningsmiljö före kalvning	Kön, kalv	Dgr med ko	Dgr i grupp <sup>1</sup>	Dgr grovfoder <sup>2</sup>
1	1	6	2	<1v	Tjur	1	0	0
1	2	3	0	<1v	Kviga	1	0	0
1	3	4	1	<1v	Tjur	1	0	0
1	4	2	4	<1v	Kviga	1	0	0
1	5	2	3	<1mån	Kviga	1	0	0
1	6	2	1	<1mån	Tjur	1	0	0
1	7	4	9	<1mån	Kviga	2	0	0
2	8	2	0	<1v	Kviga	2	5	7
2	9	3	0	<12h	Tjur	2	5	7
3	10	2	1	>1mån	Tjur	1	8	3
3	11	2	3	>1mån	Kviga	1	9	4
3	12	2	0	>1mån	Kviga	1	7	3
4	13	2	-	<1mån	Tjur	3	7	10
4	14	3	-	<1mån	Kviga	3	7	10
4	15	2	-	<1mån	Tjur	3	5	8
4	16	4	-	>1mån	Kviga	7	0	7
4	17	2	-	<1mån	Tjur	3	6	9
4	18	3	-	<1v	Tjur	3	3	6
5	19	2	3	>1mån	Tjur	10	10	10
5	20	2	7	>1mån	Tjur	5	3	8
6	21	6	2	<12h	Kviga	3	2	7
6	22	7	2	<12h	Kviga	5	0	10

<sup>1</sup>Hur många dagar kalven gått i grupp vid den sista provtagningen. <sup>2</sup>Hur många dagar kalven haft tillgång till grovfoder vid den sista provtagningen.



## **Kontrollgrupp**

Totalt 22 kor i mittlaktation provtogs en gång vardera och utgjorde kontrollgruppen. Dessa kor var 75 till 216 dagar in i laktationen (medelvärde 169 dagar, median 189 dagar).

## **Resistensförekomst**

### **Kor inklusive kontrollgrupp**

*Escherichia coli* isolerades från alla kor i kontrollgruppen, men ingen växt av tet-R *E. coli* förekom i denna grupp (Figur 2).

Före kalvning kunde tet-R *E. coli* påvisas hos en av korna i försöksgruppen (Figur 2). Detta prov var taget tio dagar innan kalvning och andelen tet-R *E. coli* var 0,28 % (Tabell 4). Fem kor hade ingen växt av *E. coli* vid denna första provtagning, hos övriga kunde *E. coli* isoleras. Eftersom kalvningarna inte skedde på exakt utsatt datum skiljde sig tiden från första provtagning till kalvning mellan en och sexton dagar.

En dag efter kalvning hade alla kor växt av *E. coli*, varav tre kor hade växt av tet-R *E. coli* (0,25 %, 100 % resp. 0,27 %). Två kor provtogs av olika orsaker två istället för en dag efter kalvning.

Vid provtagning 7-10 dagar efter kalvning hade fyra kor växt av tet-R *E. coli* (0,01 %, 0,1 %, 0,05 % resp. 0,035 %). En ko provtogs sex dagar efter kalvning. Av de kor som var positiva för tet-R *E. coli* vid andra provtagningen var en ko positiv för tet-R *E. coli* även vid tredje provtagningen (100 % resp. 0,1 %). En ko hade ingen växt av *E. coli* vid denna sista provtagning. Den ko som var positiv för tetracyklinresistens vid första provtagningen var inte positiv i någon av de efterföljande provtagningarna.

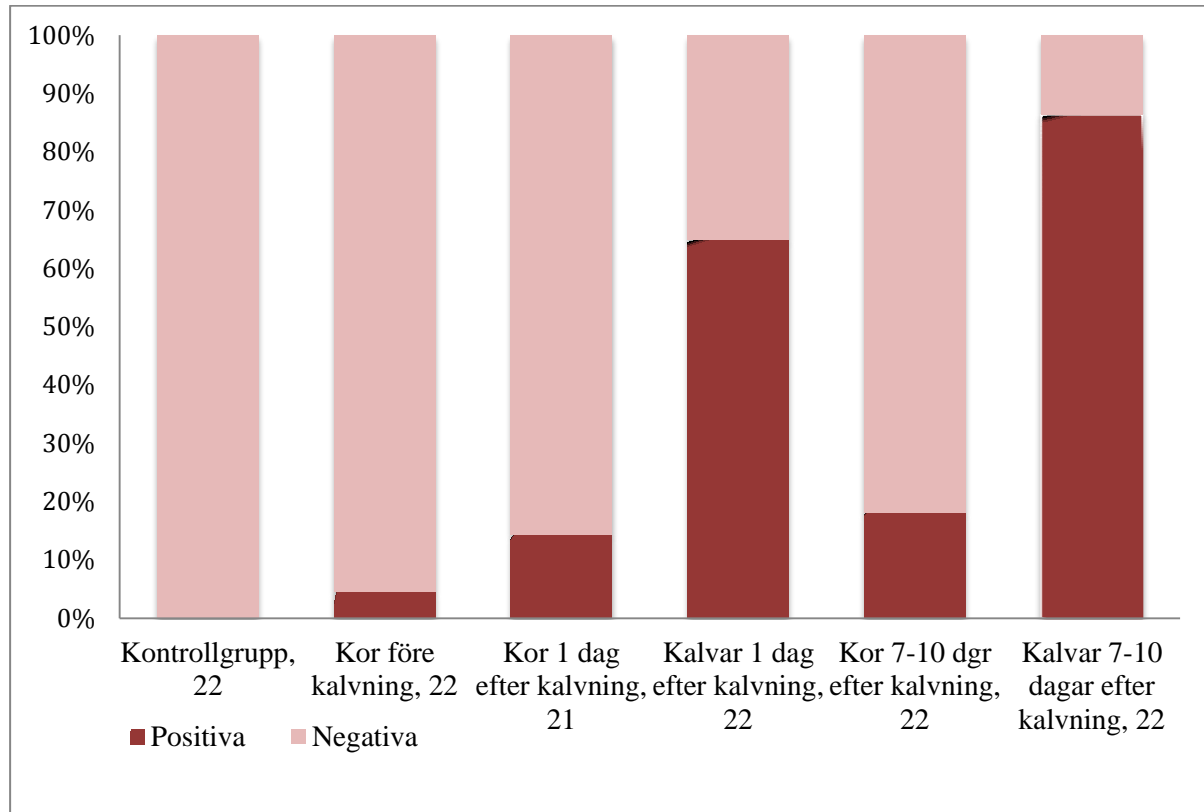
Vid jämförelse av förekomst av tet-R *E. coli* i kontrollgruppen där 0 av 22 prover var positiva för tet-R *E. coli* och provtagning av kor 6-10 dagar efter kalvning där fyra av 22 var positiva för tet-R *E. coli* sågs en tendens till skillnad mellan dessa grupper ( $P=0,11$ ). Samma resultat uppnåddes vid jämförelse av kontrollgruppen och kor en dag efter kalvning där tre av 21 kor var positiva ( $P=0,11$ ). Ingen skillnad sågs vid jämförelse av kor före och en dag efter kalvning ( $P=0,34$ ) eller vid jämförelse av kontrollkor och kor före kalvning ( $P=1,00$ ). Individuella provresultat med andel tet-R *E. coli* är redovisade i Tabell 4.

### **Kalvar**

Tet-R *E. coli* påvisades hos 13 av 22 kalvar (59 %) vid provtagning en dag efter kalvning (hos en kalv togs detta prov två dagar efter kalvning) (Figur 2). *Escherichia coli* isolerades från alla kalvar. Vid provtagning vid sju till tio dagars ålder (en kalv provtogs sex dagar efter kalvning) påvisades tet-R *E. coli* hos 19 av 22 kalvar (86 %). Även vid denna provtagning påvisades *E. coli* hos alla kalvar.

Två kalvar var positiva vid provtagning en dag efter kalvning och negativa vid provtagning efter sju till tio dagar, medan åtta kalvar var negativa vid första provtagningen och positiva

vid den andra. Hälften av kalvarna (11/22 kalvar) var positiva vid båda provtagningarna. En kalv var negativ vid båda provtagningarna. Andel tet-R *E. coli* hos kalvarna var, med några undantag, låg (Tabell 4).



Figur 2. Andel djur med tet-R *E. coli* vid de olika provtagningstillfällena. Siffran efter kategori anger antal provtagna individer.

### **Samband ko och kalv**

Alla de kor som urskiljde resistenta bakterier vid minst ett tillfälle hade kalvar som var positiva vid minst ett tillfälle (Tabell 4). Den kalv som var negativ vid båda provtagningarna hade en mor som också var negativ vid alla provtagningar. Statistiska beräkningar visade dock att det inte var någon skillnad i resistensförekomst mellan de kalvar vars mödrar vid något tillfälle hade tet-R *E. coli* jämfört med de kalvar vars mödrar aldrig hade tet-R *E. coli* ( $P=1,00$ ).

Inga tydliga samband mellan resistensförekomst och andra undersökta faktorer, så som skötsel faktorer och antibiotikaanvändning sågs i denna studie.

Tabell 4. Andel tetracyklinresistenta *E. coli* i % vid de olika provtagningarna

Gård	Ko/ Kalv -par	1-16 dgr innan kalvning		1 dag efter kalvning		7-10 dgr efter kalvning	
		K-ko <sup>1</sup>	Ko	Ko	Kalv	Ko	Kalv
1	1	0	0	0	0	0	0,1
1	2	0	- <sup>2</sup>	0	0	0	<0,1
1	3	0	0	0	0	0	40
1	4	0	0	0	0	0	0,2
1	5	0	0	0	0	0	1,4
1	6	0	0	0	2,9	<0,1	3,0
1	7	0	0	0	<0,1	0	0,1
2	8	0	0	0	0	0	0,2
2	9	0	-	0	<0,1	0	<0,1
3	10	0	0	0	<0,1	0	<0,1
3	11	0	0	0	0	0	8
3	12	0	0	0	0	0	6
4	13	0	0	0	0,5	0	2,5
4	14	0	0	0,3	<0,1	0	<0,1
4	15	0	0	100	<0,1	0,1	0
4	16	0	-	0	6,7	<0,1	22,5
4	17	0	0	0	<0,1	0	6,1
4	18	0	0,3	0	100	0	100
5	19	0	-	X <sup>3</sup>	<0,1	<0,1	0
5	20	0	0	0	0	0	0
6	21	0	0	0,3	40	0	1,8
6	22	0	-	0	<0,1	-	1,8

<sup>1</sup>Kontrollko (ko i mittlaktation 75-216 dagar efter kalvning); <sup>2</sup>Ingen växt; <sup>3</sup>Uteslutet pga för lite material

## DISKUSSION

Ingen statistiskt signifikant skillnad i urskiljning av tet-R *E. coli* mellan kontrollgrupp och kor vid tiden för kalvning sågs i denna pilotstudie. Tet-R *E. coli* påvisades dock vid enstaka tillfällen hos sju av de kor som provtogs innan och efter kalvning, medan inga tet-R *E. coli* kunde påvisas från kor i kontrollgruppen. Dessa resultat indikerar ändå att det kan ske en ökad urskiljning vid tiden för kalvning – även om det begränsade underlaget i studien gör att en sådan förändring intekan säkerställas statistiskt.

Resultaten i denna studie verkar till viss del stämna överens med de resultat som Watson et al. (2012) fick, då det var tio gånger högre sannolikhet att kor urskiljde resistenta bakterier vid provtagning efter kalvning, jämfört med innan. Författarna föreslår i sin diskussion att detta beror på att kalvningsmiljön är kontaminerad med resistenta bakterier och därmed är en källa till kolonisering med resistenta bakterier av både ko och kalv. Detta kan säkerligen vara en orsak, men i de resultat som här framkommit hade även kor och kalvar från den gård (gård 6)

som tvättade och desinficerade kalvningsboxen mellan varje kalvning i lika stor utsträckning resistenta bakterier som övriga gårdar.. Detta innebär alltså att trots att kon flyttades till en nyligen rengjord och desinficerad box fyra till sex timmar före kalvning så hade kalven redan under första levnadsdagen koloniserats av resistenta bakterier i sin tarmflora. Orsaken till detta skulle kunna vara att rengöringen inte fungerade tillfredsställande och att kalvningsmiljön ändå kunde utgöra en reservoar av resistenta bakterier. Att de resistenta bakterierna har en överlevnadsfördel i den unga kalvens tarmflora, eventuellt på grund av att sådana faktorer är kopplade till resistensgener, som föreslagits i tidigare studier skulle också kunna vara en orsak till den tidiga koloniseringen av kalvarna. Varför detta sker just i den unga kalvens digestionssystem är oklart, och den normala tarmfloran och bakteriesammansättningen hos unga kalvar samt hur den sedan förändras vid allt större grovfoderintag är inte känd. Således finns behov av ytterligare studier även här – både för att undersöka utvecklingen av den unga individens tarmflora och för att undersöka faktorer hos de resistenta bakterierna som gör att de har fördelar gentemot andra, känsliga bakterier.

Det var inte någon tydlig koppling mellan kon och hennes egen kalv när det gällde resistensförekomst. Däremot ses på gård 4 flera individer med hög andel tet-R *E.coli*. Det första av dessa prover är taget från en ko, 4-15, en dag efter kalvning. Hon kalvade 24/9 och urskiljde den 25/9 100 % tet-R *E. coli*. Vid efterföljande provtagning, 7 dagar efter kalvning (2/10) urskiljde hon <0,1 % tet-R *E. coli* och hon var den enda ko som var positiv för tet-R *E. coli* vid mer än ett provtagningstillfälle. En lika hög andel (100 %) ses även hos en kalv, 4-18, från gård 4, vid båda provtagningarna. Denna kalv föddes 12/10 och kon flyttades till kalvningsboxen sju dagar innan kalvning. Ko-/kalvpar 4-15 hade då flyttats till en annan miljö. Då gård 4 använder en gruppbox som kalvningsbox och inte rengör denna mellan varje kalvning/kalvningsomgång finns möjligheten att ko 4-15 urskiljde en hög andel resistenta bakterier vid kalvning och spred dessa bakterier till efterkommande kor, och framför allt kalvar som vistades i boxen efter henne. Även kalv 4-16 och kalv 4-17 som vistades i samma miljö efter att ko 4-15 kalvat hade relativt höga andelar tet-R *E. coli* jämfört med andra individer i studien, trots att deras mödrar hade mycket låg eller ingen andel tet-R *E. coli*. Dessa resultat stämmer överens med den teori Watson et al. (2012) lade fram, nämligen den att kalvningsmiljön kan utgöra källa till spridning av resistenta bakterier.

Tidigare studier har visat olika resultat när det gäller om resistenta bakterier kan överföras mellan ko och kalv. Watson et al. (2012) såg med pulsfältsgel elektrofores (PFGE), att ESBL-producerande *E. coli* i prover från kor och kalvar i sju fall av 31 hade samma klonala ursprung vilket visade att spridning mellan kon och hennes egna kalv kan ha skett. Gow et al. (2008) som undersökte köttjursbesättningar i Kanada såg däremot inga sådana samband. I en studie på grisar (Callens et al., 2012) sågs modern som en stor riskfaktor för spridning av resistenta bakterier till kulningar. Man kan tänka sig att hållningssättet här spelar in, smågrisar träffar vanligtvis endast sin egen mor och sina syskon i ung ålder. Kalvar, speciellt av kötttras som de djur som Gow et al. undersökte, hålls ofta i grupp och träffar på många andra individer. Mjölkkalvar skiljs från sina mödrar tidigare och byter miljö i större utsträckning än smågrisar. Kalvarna bör alltså ha fler möjligheter att träffa på resistenta bakterier från andra källor än sina mödrar jämfört med smågrisar.

Andelen kor med tet-R *E. coli* och, undantaget ett prov, även andelen tet-R *E. coli* i tarmfloran hos enskilda kor var mycket låg, vilket stämmer överens med tidigare observationer inom SVARM, där till exempel 97 % av undersökta *E. coli*-isolat från mjölkkor och 95 % av *E. coli*-isolat från sex månader gamla kalvar var känsliga för alla testade antibiotikaklasser (SVARM 2006; SVARM 2009). Även hos kalvarna var andelen tet-R *E. coli* relativt låg i denna studie, däremot var andelen kalvar som vid något tillfälle urskiljde tet-R *E. coli* hög. Högst andel (86 %) tet-R *E. coli*-positiva kalvar sågs vid 7-10 dagar efter kalvning. Detta stämmer väl överens med andra studier då resistensförekomsten varit högst hos en till två veckor gamla kalvar (Pereira et al., 2011, Berge et al., 2005).

Den odlingsmetod som användes i denna pilotstudie avsåg att visa om enskilda djur bar tet-R *E. coli* och hur stor andel dessa utgjorde av det totala antalet *E. coli* i tarmfloran. Med denna metod blir ett djur positivt även om endast en mycket liten del av totalantalet *E. coli* är tet-R. I många andra studier undersöks slumpvis utvalda isolat av *E. coli* för resistens. Metodskillnader måste alltså beaktas vid jämförelser av resultat från olika studier. Om vi i denna studie använt ett antal slumpvis utvalda isolat från varje provtagen individ är det osannolikt att dessa i någon större utsträckning varit tetracyklinresistenta då andelen tet-R *E. coli* hos de flesta individer var mindre än 0,1 % av totalantalet *E. coli*.

I studien av Berge et al. (2005) där man undersökte resistens hos kalvar i västra USA sågs en prevalens av tetracyklinresistens (ofta i kombination med resistens mot andra antibiotikaklasser) på 22,5 % hos slumpvis utvalda isolat från dagsgamla kalvar och 96,4 % hos isolat från två veckor gamla kalvar. Metodskillnaden enligt ovan gör att det inte går att direkt jämföra resultaten med de i denna pilotstudie, men hos de flesta kalvarna i denna pilotstudie var under tio procent av *E. coli* i tarmfloran tet-R. Förekomsten av tetracyklinresistens hos slumpvis utvalda isolat av *E. coli* är därför sannolikt betydligt lägre i denna pilotstudie än vad som sågs hos Berge et al. och även i flera utländska studier. Exempelvis var prevalensen tetracyklinresistens hos slumpvis utvalda isolat *E. coli* från kalvar i åldern två till åtta dagar 87 % (Pereira et al., 2011) och 79,2 % hos kalvar upp till tre månader (Khachatryan et al., 2004) i två andra amerikanska studier. I den svenska studie som utfördes av de Verdier et al. (2012) sågs en prevalens av tetracyklinresistens på 31,6 %. Detta var hos slumpvist utvalda isolat från kalvar med eller utan diarré. Både resistens mot tetracyklin och multiresistens var vanligare hos kalvar som haft diarré. Dessa resultat är också högre än vad som troligtvis skulle setts i denna pilotstudie om samma metod använts enligt resonemanget ovan. Hos kalvar utan diarré-historik var prevalensen tetracyklinresistens hos de utvalda isolaten 5 av 41 (de Verdier et al. 2012), vilket mer liknar de resultat som uppmättes i denna pilotstudie, där 2-3 kalvar per provtagning hade så pass höga andelar tet-R *E. coli* att tetracyklinresistenta isolat borde kommit med vid ett slumpmässigt urval.

Antibiotikaanvändningen i de deltagande besättningarna var jämförelsevis låg under de senaste fyra månaderna. Enligt statistik från Växa Sverige antibiotikabehandlades under 2012 19 kor/100 koar med antibiotika (Marie Mörk, Växa Sverige, personlig kommunikation). Växa Sverige uppskattar också att ungefär 30 % av mjölkkor behandlas med intramammara preparat vid sinläggning (Marie Mörk, personlig kommunikation). Detta är högre än de behandlingsfrekvenser som sågs i alla deltagande besättningar under de senaste fyra

månaderna. Endast en ko i en besättning hade fått behandling med tetracyklin under de senaste fyra månaderna och denna ko var ej inkluderad i studien. Ändå påvisades tet-R *E. coli* hos en stor del av kalvarna, och även en del av korna i studien. Berge et al. (2005) såg i sin studie resistens mot antibiotika som inte använts sedan flera år tillbaka på de undersökta gårdarna. Frånvaro av eller ett lågt selektionstryck från antibiotikaanvändning verkar således inte alltid räcka för en låg förekomst av resistenta bakterier, även om det är antibiotikaanvändning som anses vara grunden till resistensutveckling.

Stress har, framför allt på grisar, setts orsaka ökad urskiljning av resistenta bakterier (Moro et al., 2000; Moro et al., 1998; Langlois et al., 1986). Stress och/eller ökad tarmmotilitet medförde även att en högre andel resistenta bakterier sågs i colon och rektum vid obduktion jämfört med hos andra, icke-stressade, grisar där andelen resistenta bakterier var högst i ileum och caecum (Moro et al. 2000). Alltså verkar det som att det hos grisar kan finnas en reservoar av resistenta bakterier som normalt sett koloniserar ileum och de första delarna av grovtarmen, och som i större utsträckning utsöndras när passagehastigheten genom digestionskanalen av någon anledning (t ex stress) ökar.

Att kalva, samt att vara i höglaktation är en orsak till stress hos kon då det är en tid för hormonella och metabola förändringar. Dagens mjölkproduktion medför en stor energiåtgång i början av laktationen, och kon befinner sig i detta skede ofta i negativ energibalans då hon inte har möjlighet att äta tillräckligt mycket för att täcka upp för den förlorade energin (Flyrén, 2011). Stress orsakad av kalvning och/eller höglaktation skulle kunna vara en orsak till att tet-R *E. coli* i denna pilotstudie endast fanns hos kor i anslutning till kalvning. Kontrollkorna var minst 75 dagar in i laktationen och hade därmed passerat den mest intensiva laktationsperioden. Dock provtogs kontrollkor enbart vid ett tillfälle och kalvande kor vid tre tillfällen, vilket till viss del kan ha ökat sannolikheten att hitta tet-R *E. coli* i den sistnämnda gruppen. Jämför man kontrollgruppen och kor 7-10 dagar efter kalvning så ses dock indikationer på att det är en skillnad i urskiljning mellan dessa grupper.

Det går inte att dra några slutsatser om de övriga faktorerna som undersöktes i studien, till exempel hållningssätt och behandlingsfrekvenser, kan ha betydelse för tetracyklinresistensförekomsten hos *E. coli* från kor och kalvar eftersom det undersökta materialet är så pass litet och svaren varierar mycket mellan olika besättningar. Dessa faktorer bedöms fortfarande vara relevanta för förekomst av resistens men ett större material skulle krävas för att kunna dra några slutsatser om eventuella riskfaktorer. Även undersökning av omgivningsprover vore av intresse för att se om och var resistenta bakterier finns i kalvarnas miljö och i ett pågående projekt vid SVA undersöks omgivningsprover för resistensförekomst (Anna Duse, personlig kommunikation). Flera kor hade ingen växt av *E. coli* vid provtagningarna, detta trots att det är en vanlig tarmbakterie. En större, standardiserad mängd avföring som provmaterial skulle eventuellt ha kunnat ge mer information om förekomsten av *E. coli* och eventuella tet-R *E. coli* i tarmfloran hos vuxna djur.

Den metod som användes för att isolera *E. coli* samt undersöka tetracyklinresistens har utvärderats av Wu et al. (2008) och bedömts ge tillförlitliga resultat som selektiv odlingsmetod för tetracyklinresistenta *E. coli*, i.e. stammar med tetracyklin MIC >8 mg/L.

Tetracyklinresistens undersöktes i denna studie då det är en av de vanligast förekommande resistenstyperna både i svenska och utländska undersökningar. Tetracyklinresistens är ofta överförbar och förekommer ofta i kombination med andra resistensegenskaper. Tre individer hade 100 % tet-R *E.coli*. En så hög andel kan tyckas osannolik då övriga individer generellt sett hade betydligt lägre andelar. En icke selektiv odling, det vill säga, om proverna (av misstag) odlades utan tillsats av tetracyklin skulle kunna vara en orsak till dessa resultat. Det rör sig dock om tre prover som odlades vid olika tillfällen på SVA. Alla prover med dessa höga andelar är från samma gård och två till och med från samma individ, en kalv provtagen en dag efter kalvning (13/10) och sedan sex dagar efter kalvning (18/10). Att detta misstag skulle ha skett två gånger, vid olika tillfällen, för samma individ bedöms som mycket osannolikt men kan inte helt och hållet uteslutas. Som diskuterats tidigare är det också möjligt att den höga förekomsten hos dessa individer kan bero på att dessa individer vistats i samma (eventuellt kontaminerade) miljö..

## KONKLUSION

Kor i kontrollgruppen urskiljde inga tet-R *E. coli* i denna studie. Få kor som provtogs vid tiden för kalvning hade tet-R *E. coli* och dessa hade i de flesta fall låg andel tet-R *E. coli*. En stor del av kalvarna urskiljde tet-R *E. coli* men även här var andelen tet-R *E. coli* hos kalven generellt låg. Fortfarande är mycket oklart när det gäller kolonisering och etablering av resistent bakterier i kalvarnas tarm. Den höga prevalensen av tet-R *E. coli* hos kalvar kan utifrån resultaten i denna studie inte förklaras med en hög urskiljning tet-R *E. coli* från korna vid tiden för kalvning och det är sannolikt andra faktorer som också har betydelse. Det finns behov av ytterligare studier med ett större material för att närmare undersöka varför kalvar oftare har resistent bakterier än äldre nötkreatur.

## REFERENSER

- Al-Bahry, S.N., Al-Mashani, B.M., A.-M., Al-Ansari, A.S., Elshafie, A.E., Mahmoud, I.Y. (2013). *Escherichia coli* tetracycline efflux determinants in relation to tetracycline residues in chicken. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 6, 718–722.
- Alekshun, M.N., Levy, S.B. (2007). Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 128, 1037–1050.
- Aust, V., Knapstein, K., Kunz, H.-J., Kaspar, H., Wallmann, J., Kaske, M. (2012). Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97:6
- Bengtsson, B., Wierup, M. (2006). Antimicrobial Resistance in Scandinavia after a Ban of Antimicrobial Growth Promoters. *Animal Biotechnology* 17, 147–156.
- Berge, A.C., Hancock, D.D., Sisco, W.M., Besser, T.E. (2010). Geographic, farm, and animal factors associated with multiple antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from cattle in the western United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 236, 1338–1344.

- Berge, A.C.B., Atwill, E.R., Sisco, W.M. (2005). Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine* 69, 25–38.
- Berge, A.C.B., Moore, D.A., Sisco, W.M. (2006). Field Trial Evaluating the Influence of Prophylactic and Therapeutic Antimicrobial Administration on Antimicrobial Resistance of Fecal *Escherichia coli* in Dairy Calves. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3872–3878.
- van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14, 327–335.
- Callens, B. Maes, D., Boyen, F., Haesebrouck, F., Dewulf, J. (2012) *Book of abstracts of the 13th international symposium on veterinary epidemiology and economics* (s 61). Maastricht, The Netherlands 20-24 August Tillgänglig: <http://hdl.handle.net/1854/LU-3100173>
- Dolejšká, M., Šenk, D., Čížek, A., Rybaříková, J., Sychra, O., Literák, I. (2008). Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech dairy farms. *Research in Veterinary Science* 85, 491–494.
- Duse, A., Waller, K.P., Emanuelson, U., Unnerstad, H.E., Persson, Y., Bengtsson, B. (2013). Farming practices in Sweden related to feeding milk and colostrum from cows treated with antimicrobials to dairy calves. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55:49.
- ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control (2009) *The bacterial challenge: time to react*. Joint Technical Report from ECDC and EMEA, Stockholm, September 2009. ISBN 978-92-9193-193-4 doi 10.2900/2518. Tillgänglig: [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf) (2013-09-15)
- Erdington, T.S., Farrow, R.L., Carter, B.H., Islas, A., Hagevoort, G.R., Callaway, T.R., Anderson, R.C., Nisbet, D.J. (2012). Age and Diet Effects on Fecal Populations and Antibiotic Resistance of a Multi-drug Resistant *Escherichia coli* in Dairy Calves. *Agriculture, Food and Analytical Bacteriology* Vol 2, 162-174.
- Fleming, A. (1945). Nobel Lecture: Penicillin. *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962* Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964. *Nobelprize.org* ss. 83-93 [20 Dec 2013] Tillgänglig: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html)
- Flyrén, L. (2011). Finns det ett samband mellan ökad mjölkproduktion och mastit? Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr 2011:42.
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., Pavilionis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)* 47, 137–146.
- Gow, S.P., Waldner, C.L., Rajic, A., McFall, M.E., Reid-Smith, R. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance in fecal generic *Escherichia coli* isolated in western Canadian beef herds. Part II -- Cows and cow-calf pairs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 72, 91–100.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilback, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I. (2011). Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLoS Pathogens* 7(7): e1002158. doi:10.1371/journal.ppat.1002158.
- Hendriksen, R.S., Mevius, D.J., Schroeter, A., Teale, C., Meunier, D., Butaye, P., Franco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M., Greko, C., Stärk, K., Berghold, C., Myllyniemi, A.-L., Wasyl, D., Sunde, M., Aarestrup, F.M. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial



- pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50:28.
- Hoyle, D.V., Knight, H.I., Shaw, D.J., Hillman, K., Pearce, M.C., Low, J.C., Gunn, G.J., Woolhouse, M.E.J. (2004). Acquisition and epidemiology of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a cohort of newborn calves. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53, 867–871.
- Kaneene, J.B., Warnick, L.D., Bolin, C.A., Erskine, R.J., May, K., Miller, R. (2008). Changes in Tetracycline Susceptibility of Enteric Bacteria following Switching to Nonmedicated Milk Replacer for Dairy Calves. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1968–1977.
- Karami, N., Nowrouzian, F., Adlerberth, I., Wold, A.E. (2006). Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* and Persistence in the Infantile Colonic Microbiota. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 156–161.
- Khachatryan, A.R., Hancock, D.D., Besser, T.E., Call, D.R. (2004). Role of Calf-Adapted *Escherichia coli* in Maintenance of Antimicrobial Drug Resistance in Dairy Calves. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 752–757.
- Langford, F.M., Weary, D.M., Fisher, L. (2003). Antibiotic Resistance in Gut Bacteria from Dairy Calves: A Dose Response to the Level of Antibiotics Fed in Milk. *Journal of Dairy Science* 86, 3963–3966.
- Langlois, B.E., Dawson, K.A., Cromwell, G.L., Stahly, T.S. (1986). Antibiotic resistance in pigs following a 13 year ban. *Journal of Animal Science* 62, 18–31.
- Langlois, B.E., Dawson, K.A., Leak, I., Aaron, D.K. (1988). Effect of age and housing location on antibiotic resistance of fecal coliforms from pigs in a non-antibiotic-exposed herd. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1341–1344.
- Moro, M. h., Beran, G. w., Griffith, R. w., Hoffman, L. j. (2000). Effects of heat stress on the antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* of the intestinal flora of swine. *Journal of Applied Microbiology* 88, 836–844.
- Moro, M.H., Beran, G.W., Hoffman, L.J., Griffith, R.W. (1998). Effects of cold stress on the antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* of the intestinal flora of swine. *Letters in Applied Microbiology* 27, 251–254.
- Pereira, R.V.V., Santos, T.M.A., Bicalho, M.L., Caixeta, L.S., Machado, V.S., Bicalho, R.C. (2011). Antimicrobial resistance and prevalence of virulence factor genes in fecal *Escherichia coli* of Holstein calves fed milk with and without antimicrobials. *Journal of Dairy Science* 94, 4556–4565.
- Roberts, M. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews* 19, 1–24.
- Sato, K., Bartlett, P.C., Saeed, M.A. (2005). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from dairy farms using organic versus conventional production methods. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226, 589–594.
- Sörum, H., Sunde, M. (2001). Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary Research* 32, 227–241.
- Statens Jordbruksverk, SJV (2012) Föreskrifter om ändring i Statens jordbruksverks föreskrifter (SJVFS 2009:84) om läkemedel och läkemedelsanvändning. Jönköping. (SJVFS 2012:32 Saknr D9)

- SVARM 2000-2011, Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. Statens Veterinärmedicinska Anstalt, SVA (2001-2012). Uppsala, Sverige. ISSN 1650-6332. Tillgänglig: <http://www.sva.se/sv/Antibiotika/SVARM-reports/> (2013-12-20)
- SWEDRES-SVARM 2012. Use of antimicrobials and occurrence of antimicrobial resistance in Sweden. Solna/Uppsala, Sverige. ISSN 1650-6332. Tillgänglig: <http://www.sva.se/sv/Antibiotika/SVARM-reports/> (2013-12-20)
- Thames, C.H., Pruden, A., James, R.E., Ray, P.P., Knowlton, K.F. (2012). Excretion of Antibiotic Resistance Genes by Dairy Calves Fed Milk Replacers with Varying Doses of Antibiotics. *Frontiers in Microbiology* 3.
- de Verdier, K., Nyman, A., Greko, C., Bengtsson, B. (2012). Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from swedish dairy calves. *Acta Veterinaria Scandinavia* 54:2.
- Walk, S.T., Mladonicky, J.M., Middleton, J.A., Heidt, A.J., Cunningham, J.R., Bartlett, P., Sato, K., Whittam, T.S. (2007). Influence of Antibiotic Selection on Genetic Composition of *Escherichia coli* Populations from Conventional and Organic Dairy Farms. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5982–5989.
- Watson, E., Jeckel, S., Snow, L., Stubbs, R., Teale, C., Wearing, H., Horton, R., Toszeghy, M., Tearne, O., Ellis-Iversen, J., Coldham, N. (2012). Epidemiology of extended spectrum beta-lactamase *E. coli* (CTX-M-15) on a commercial dairy farm. *Veterinary Microbiology* 154, 339–346.
- WHO, World Health Organization (2013-05) Antimicrobial resistance. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/index.html> [2013-09-15]
- Wu, S., Chouliara, E., Bogö Jensen, L., Dalsgaard, A. (2008). Evaluation of Petrifilm™ Select *E. coli* Count Plate Medium to discriminate antimicrobial resistant *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Scandinavia* vol. 50:38
- Xu, F., Rösler, U., Friese, A., Baumann, M., Zhao, J., Wei, H., Liu, X., Kreausukon, K. (2013). First Findings on the Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Producing *Escherichia coli* (ESBL-producing *E. coli*) and Risk Factors in Dairy Farms in Beijing Area, China. *10<sup>th</sup> Year Anniversary of Veterinary Public Health Centre for Asia Pacific*. Chiang Mail, Thailand 2-6 July.
- Zhang, L., Kinkelaar, D., Huang, Y., Li, Y., Li, X., Wang, H.H. (2011). Acquired Antibiotic Resistance: Are We Born with It? *Applied and Environmental Microbiology* 77, 7134–7141.
- Österblad, M., Hakanen, A., Manninen, R., Leistevuo, T., Peltonen, R., Meurman, O., Huovinen, P., Kotilainen, P. (2000). A between-Species Comparison of Antimicrobial Resistance in Enterobacteria in Fecal Flora. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 1479–1484.

Bilaga 1. Enkät – generella uppgifter om besättningen

**Gård nr:**

Antal år i ekologisk produktion (exklusive omställningstid):					
Medelproduktion/ko och år: (kg ECM)					
<b>Huvudsaklig inhysningsform:</b>	Uppbunden	Lösdrift Varm		Lösdrift Kall	
<b>Mjölkningsätt</b>	Rörmjölkning	Mjölkgrop	Robot	Karusell	

**Antal djur i besättningen idag, samt antibiotikabehandlingar 4 månader tillbaka:**

	Kor	Kvigor	Kalvar (0-3 mån)	Övriga djur i besättningen
<b>Antal:</b>				
Antal inköpta djur under det senaste året:				
Antal beh med penicillin senaste 4 mån:				
Antal intra-mammara beh senaste 4 mån:				
Antal beh med tetracyklin senaste 4 mån:				
Övriga antibiotikabeh senaste 4 mån:				
Antal veterinärbesök senaste 4 mån:				

**Innan kalvning, lågsin (mer än 3 v kvar till kalvning):**

Hållning av sinkor:	Isolerade från lakterande kor	Isolerade med möjlighet till noskontakt med andra kor	I samma grupp som lakterande kor		
Normal (genomsnittlig) gruppstorlek:					
Huvudsaklig inhysningsform:	Djupströbädd	Liggbås	Uppbundet	Spalt	Övrig
Strömmaterial:	Halm	Spån	Torv	Sand	Övrigt

**Innan kalvning, högsin (3 v eller mindre kvar till kalvning):**

Hållning av sinkor:	Isolerade från lakterande kor		Isolerade med möjlighet till noskontakt med andra kor		I samma grupp som lakterande kor	
Huvudsaklig inhysningsform:	Djupströbädd	Liggbås	Uppbundet	Spalt	Övrig	
Strömmaterial:	Halm	Spån	Torv	Sand	Övrigt	
Normal (genomsnittlig) gruppstorlek:						

**Kalvningsmiljö:**

Huvudsaklig kalvningsmiljö:	Ensambox (isolerad från övriga djur)		Ensambox (med möjlighet till noskontakt med andra djur)		Gruppbox (hur många djur i gruppen?)		Har ej kalvningsbox	
Inhysning:	Box – Djupströbädd		Box – Tunn bädd		Liggbås	Uppbundet	Övrigt	
Strömmaterial:	Halm		Spån		Torv	Sand	Inget/Övrigt	
Hur rengörs kalvningsboxen (alt. kalvningsmiljön)?	Ingen (enbart tillförsel av nytt strö)		Mekanisk rengöring		Tvätt		Desinfektion	
Hur ofta sker detta? (1. mellan varje kalvning, 2. Annat intervall (specificera))	1	2	1	2	1	2	1	2
Används kalvningsmiljön någon gång som sjukbox?	Aldrig		Enstaka gånger		Mindre ofta		Ofta	

**Kalvmiljö:**

Efter hur många timmar/dagar skiljs ko och kalv åt?	
---	--

Bilaga 1. Enkät – generella uppgifter om besättningen

<i>Vart flyttas kalven? (Om olika – ungefär hur stor andel för varje alternativ)</i>	<i>Ensambox – hur länge i ensambox innan grupp?</i>	<i>Kvar i kalvn. box</i>	<i>Gruppbox (hur många i gruppen?)</i>	
<i>Har kalvarna möjlighet till kontakt med andra djur än sin egen mor/jämnåriga kalvar under första levnadsveckan?</i>	<i>Ja</i>		<i>Nej</i>	
<i>Hur utfodras kalvarna första veckan efter råmjölksperioden?</i>	<i>Diar ko</i>	<i>Diar amko</i>	<i>Napphink/ Hink/ Kalvamma</i>	<i>Övrigt</i>
<i>I hur stor utsträckning utfodras kalvarna med karenstidsmjölk?</i>	<i>Aldrig</i>	<i>Sällan</i>	<i>Mindre ofta</i>	<i>Ofta</i>
<i>Vid vilken ålder utfodras kalvarna med grovfoder för första gången?</i>				

**Individuella uppgifter**

**Gård nummer:**

**Ko/kalv-par nummer:**

*Ifylles innan kalvning (besök 1)*

Vilken kalv i ordningen är detta för kon?			
Kons juverhälsoklass (innan sinläggning)			
Är kon sintidsbehandlad med antibiotika vid senaste sinläggning?	Ja	Nej	Om ja – med vad?
Allmänbehandlades kon med antibiotika under föregående laktation?	Ja	Nej	Om ja – med vad?

*Ifylles 1 dag efter kalvning (besök 2)*

Kalvningsdatum:				
När flyttades kon till kalvningsmiljön? (datum) Om dygnet innan kalvning – hur många timmar innan kalvning flyttades kon)?				
Kalvningsmiljö:	Ensambox	Gruppbox – hur många andra djur i samma miljö?	Båspall	Övrigt
Assisterad förlossning?	Nej	Ja, assisterad utan veterinärinsats	Ja, assisterad med veterinärinsats	
Kalvens kön	Tjur		Kviga	
Har kalven diat kon?	Ja	Nej	Vet ej	
Hur tillfördes råmjölk?	Sondning	Diat – mor	Tillfört via hink	Övrigt

**Ifylles 7-10 dgr efter kalvning (besök 3)**

Har kalven haft diarré under de första 7 dagarna?	Nej	Ja, ej antibiotikabehandlad	Ja, antibiotikabehandlad – preparat:
Har kalven haft luftvägsproblem under de första 7 dagarna?	Nej	Ja, ej antibiotikabehandlad	Ja, antibiotikabehandlad – preparat:
Har kon fått någon antibiotikabehandling under tiden 2 veckor före kalvning – 7 dagar efter kalvning?	Nej	Ja	Om ja – med vilket preparat och vilket datum?
Efter hur många dagar skildes ko och kalv åt?			
Vart flyttades kalven?	Ensambox	Kvar i kalvn. box	Gruppbox – hur många i gruppen?
Hur många dagar har kalven gått i grupp vid denna provtagning?			
Hur många dagar har kalven haft tillgång till grovfoder vid denna provtagning?			