

Antibiotikaresistensgener: förekomst och spridning i akvatisk miljö

Antibiotic resistance genes: prevalence and dispersal in aquatic environments

Emmy Johansson

Handledare: Gunnar Carlsson och Stefan Örn institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Eva Tyden, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Kandidatarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 15 hp
Nivå och fördjupning: grundnivå, G2E
Kurskod: EX0700

Utgivningsort: Uppsala
Utgivningsår: 2015

Delnummer i serie: 2015:51

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

Nyckelord: antibiotikaresistens, resistensutveckling, antibiotikaresistensgener, akvatisk miljö

Key words: antibiotic resistance, resistance development, antibiotic resistance genes, aquatic environment

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturöversikt	3
Resistensmekanismer och genöverföring hos bakterier	3
Antibiotikaresistensgener i akvatisk miljö	5
Ursprung till antibiotikaresistensgener i akvatisk miljö	5
Vattenreningsverk - möjlig plats för selektion av resistensgener	7
Risker med antibiotikaresistensgener i akvatisk miljö	7
Spridning från akvatisk miljö via fisk	9
Diskussion	9
Referenser	13

SAMMANFATTNING

Antibiotikaresistens hos bakterier har de senaste årtionden ökat drastiskt och är idag en av de största medicinska utmaningarna samhället står inför. Resistensutvecklingen har ökat i takt med den oförsiktiga användning av antibiotika som präglat både sjukvård och djuruppfödning i många år. Via akvatisk miljö har antibiotikaresistensgener stora möjligheter att spridas och är svårkontrollerbara. Den här litteratursammanställningen undersöker vilka ursprung antibiotikaresistensgener i akvatisk miljö kan ha och om det kan ske en horisontell genöverföring mellan bakterier. Vidare undersöks olika risker med antibiotikaresistensgener i akvatisk miljö, vilken möjlig roll de kan ha i resistensutvecklingen och hur de kan spridas tillbaka till människor och landlevande djur.

Antibiotikaresistensgener i akvatisk miljö kommer ifrån utsläpp av resistent bakterier från djuruppfödningar, akvakultur, sjukhus och bostäder. I dessa miljöer sker en resistensutveckling som bl.a. drivs av antibiotikaanvändning. Antibiotika i utflödesvatten från sjukhus och läkemedelsindustri gör att ett selektivt tryck uppstår i akvatiska miljöer. Detta i sin tur gör att bakterier med resistensmekanismer frodas medan de övriga försvinner och lämnar utrymme för de resistent att föröka sig ytterligare. I många fall är inte vattenreningen tillräckligt effektiv för att förhindra detta och i värsta fall selekteras det för antibiotikaresistens i vattenreningsverken.

Ett antal risker följer med en ökad halt antibiotikaresistensgener i akvatisk miljö. Via vattendrag och den naturliga förflyttningen av vatten som finns kan antibiotikaresistensgener potentiellt förflytta sig långa sträckor. Via livsmedel som odlas eller fångas i akvatisk miljö kan multiresistenta bakterier och antibiotikaresistensgener tas upp i människor och landlevande djur. Detta kan leda till att kommensaler och patogener som finns i tarmfloran utvecklar resistensmekanismer. Ett sådant upptag kan även ske via dricksvattnet och i flera studier har antibiotikaresistensgener hittats vid råvattenupptag.

Sammanfattningsvis måste spridningen av antibiotikaresistensgener ut i akvatisk miljö hejdas för att försöka minska takten på antibiotikaresistensutvecklingen. Detta bör göras genom effektivare vattenrening, vilket är av särskild vikt vid sjukhus och läkemedelsfabriker. Vattenreningsverk måste även få ökad effektivitet för att förhindra att en selektion av resistent bakterier sker. För att minska mängden av resistent bakterier i avloppsvatten bör antibiotikaanvändningen till akvakultur, djuruppfödning och sjukvård minska. Bättre rutiner för hygien och antibiotikaanvändning tillsammans med en bättre djurhållning skulle minska mängden antibiotika som idag anses nödvändig. Detta skulle bromsa dagens resistensutveckling och bibehålla läkemedel som i framtiden kan avgöra skillnaden mellan liv och död.

SUMMARY

Antibiotic resistance in bacteria has increased during the past decades and is today one of the greatest medical challenges for our society. The ongoing large use of antibiotics for medical purposes and in animal breeding has increased the rate of resistance development. Antibiotic resistance genes are easily spread and hard to control in aquatic environments. This literature study investigates the multiple origins of antibiotic resistance genes in aquatic environments and whether or not horizontal gene transfer can occur between bacteria. The main risks of antibiotic resistance genes in aquatic environments, the possible role of them in resistance development and different routes back to humans and land-living animals will also be investigated..

There are different sources of antibiotic resistance genes in aquatic environments and these include animal husbandry, aquaculture, hospitals and human housing facilities. In these sources the development of resistance is usually fueled by the use of antibiotics. Antibiotics in the effluent water from hospitals and the pharmaceutical industry creates a selective pressure in aquatic environments. This benefits the bacteria with resistance mechanisms while the less resistant bacteria disappear. The void left after less resistant bacteria can be used by the ones with resistance mechanisms to grow even further. Water purification is often not effective enough to stop this process and in the worst case scenario there is a selective pressure for antibiotic resistance in water treatment plants.

Antibiotic resistance genes in aquatic environments comes with several risks. There is a possibility for antibiotic resistance genes to travel great distances by watercourses and the natural movement of water. Food caught or grown in aquatic environments can act as a way of antibiotic resistance genes and multi resistant bacteria to be taken up by humans or land-living animals. This could lead to resistance development in commensals and pathogens that normally reside in the gut. A similar uptake can also occur with drinking water and several studies have found antibiotic resistance genes near raw water uptakes.

The dispersal of antibiotic resistance genes into aquatic environments have to be stopped to slow down the rate of resistance development. This can be done through more effective water treatment, especially for the water effluent from hospitals and pharmaceutical factories. Water treatment plants have to become more effective to also prevent a selective pressure for resistant bacteria within their system. The amount of antibiotics in aquaculture, animal husbandry and for medical use has to decrease in order to decrease the amount of bacteria resistant to antibiotics in effluent water. By implementing better routines in many fields, including hospitals, and increasing the quality of animal husbandry the use of antibiotics today could drastically decrease.

INLEDNING

Antibiotikaresistens hos bakterier är idag ett av de största hoten som den moderna medicinen står inför. Redan vid introduktionen av antibiotika under mitten av 1900-talet fanns det rapporter om antibiotikaresistens (Davies & Davies, 2010) och det har i studier under de senaste åren visat sig att bakterier har haft resistensmekanismer långt innan människor fanns (Bhullar *et al.*, 2012). Det är dock tydligt att den utbredda och oförsiktiga användning av antibiotika, som pågått under en längre tid, idag har givit upphov till ett resistensläge som allvarligt hotar djur och människors hälsa. Ett område som tills för bara några år sedan nästan ignoreras är hur akvatiska miljöer kan påverka resistensutveckling och hjälpa till att sprida antibiotikaresistensgener (ARG:er). I den här litteraturstudien undersöks vilka ursprung ARG:er i akvatisk miljö kan ha och hur de kan spridas vidare. Fokus ligger på att studera om horisontell genöverföring är möjlig mellan bakterier i t.ex. vattenreningsverk och fiskodlingar. Fokus ligger också på att undersöka vilka risker det finns med ARG:er i akvatisk miljö och vilken roll de spelar i resistensutveckling. Slutligen undersöks möjligheten att ARG:er och multiresistenta bakterier i akvatisk miljö kan spridas tillbaka till landlevande djur och människor. Detta skulle kunna ha förödande konsekvenser för de försök som idag pågår för att minska resistensutvecklingen.

MATERIAL OCH METODER

Huvudsakligen har databasen Web of Science används, men sökningar har även gjorts i PubMed och SLU:s söktjänst Primo. Sökbegreppen har från början varit många då området kan beskrivas på flera olika sätt. Ord som har sökts på enskilt och i kombination är t.ex. "antibiotic*", "antibiotic resistance gene*", "ARG*", "environmental pollution", "fish", "shellfish", "gene transfer", "bacteria", "water", "aquatic", "marine", "ecosystem", "origin", "source", "growth", "dispersal", "prevalence" m.m. En anledning till de många sökorden har varit att källor som behandlar grundläggande bakteriologi har behövts men även källor som är snäva och behandlar t.ex. ARG:er i nötkreaturuppfödning.

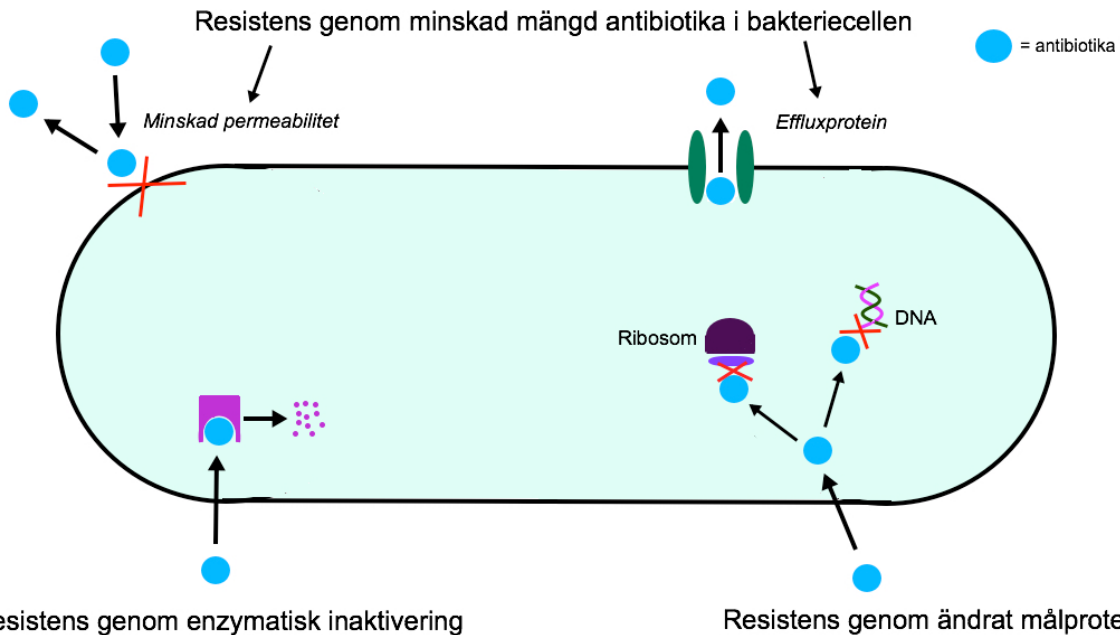
LITTERATURÖVERSIKT

Resistensmekanismer och genöverföring hos bakterier

Antibiotikaresistens hos bakterier kan bero på ett antal olika mekanismer t.ex. ett ökat uttryck av effluxproteiner eller genom enzymatisk inaktivering av läkemedel (se Figur 1). Resistensmekanismer kan antingen vara medfödda eller förvärvade. Förvärvade resistensmekanismer fås genom en mutation i bakteriens genetiska material eller genom ett upptag av en antibiotikaresistensgen (ARG). En del bakteriesorter har en medfödd resistens mot specifika typer av antibiotika som verkar mot en struktur de saknar. Detta gäller t.ex. antibiotika som verkar mot bakteriers cellvägg (Quinn *et al.*, 2011).

Bakterier har flera rörliga genetiska enheter som möjliggör överföring av gener mellan bakterieceller. Detta kallas horisontell genöverföring och är en bidragande orsak till spridning

Resistensmekanismer hos bakterier



Figur 1. Resistens hos bakterier kan uppnås genom att de utsätts för minskad mängd antibiotika via minskat upptag eller inaktivering av antibiotika innan den hinner utföra sin verkan. Resistens kan även uppnås genom att antibiotika inte kan binda in till sitt målprotein.

av ARG:er. En genetisk enhet som har stor betydelse för resistensutveckling är plasmider. De existerar fritt i cytoplasman som stängda ringar med dubbelsträngat DNA och innehåller allt från en till flera hundra gener (Rang *et al.*, 2012). Genom konjugering överförs en sträng av DNA:t i plasmiden till en närliggande bakteriecell och används därefter som en mall för att återskapa en dubbelsträngad plasmid i mottagarcellen. Främst DNA från plasmider överförs genom konjugering men i undantagsfall kan även kromosomalt DNA överföras på detta sätt. Konjugering spelar en viktig roll i resistensutvecklingen och kan ske i tarmen bland kommensaler (Quinn *et al.*, 2011). Bakterier kan även ta upp gener genom transformation och transduktion. Det är ett fåtal bakterier som har förmågan att ta upp gener från miljön och integrera dem i DNA:t genom normal homolog rekombination, vilket kallas transformation (Rang *et al.*, 2012). Det är vanligare att bakterier får nya gener via transduktion. Transduktion innebär att en bakterie tar upp nya gener i sitt DNA genom en bakteriofag. Bakteriofagen fungerar som en vektor och sprider både sina egna och överförbara resistensgener mellan bakterier den infekterar (Quinn *et al.*, 2011).

Två andra viktiga exempel på rörliga genetiska enheter är genkassetter och integroner. En genkassetter är en gen, ofta en ARG, som är fäst vid en igenkänningsplats och kan igenom denna plockas upp i integroner. Integronen är en större rörlig genetisk enhet som innehåller en gen för enzymet integras vilket har förmågan att plocka upp fria gener som t.ex. genkassetter och föra in dem i integronen (Rang *et al.*, 2012). I många fall innehåller en integron flera

olika genkassetter tillsammans med en promotor. Promotorn är kopplad till alla genkassetter som finns på integronen vilket gör att selektion av en viss ARG också medför selektion av de övriga ARG:er integronen innehåller. Det här är en av mekanismerna bakom multiresistenta bakterier (Quinn et al., 2011). Ytterligare en rörlig genetisk enhet är transposomer, vilka kan innehålla en eller flera gener. De rör sig oberoende mellan plasmider och kromosomer (Rang et al., 2012). De kan dock inte initiera replikation utan endast replikeras som en del av den plasmid eller kromosom de sitter i (Quinn et al., 2011).

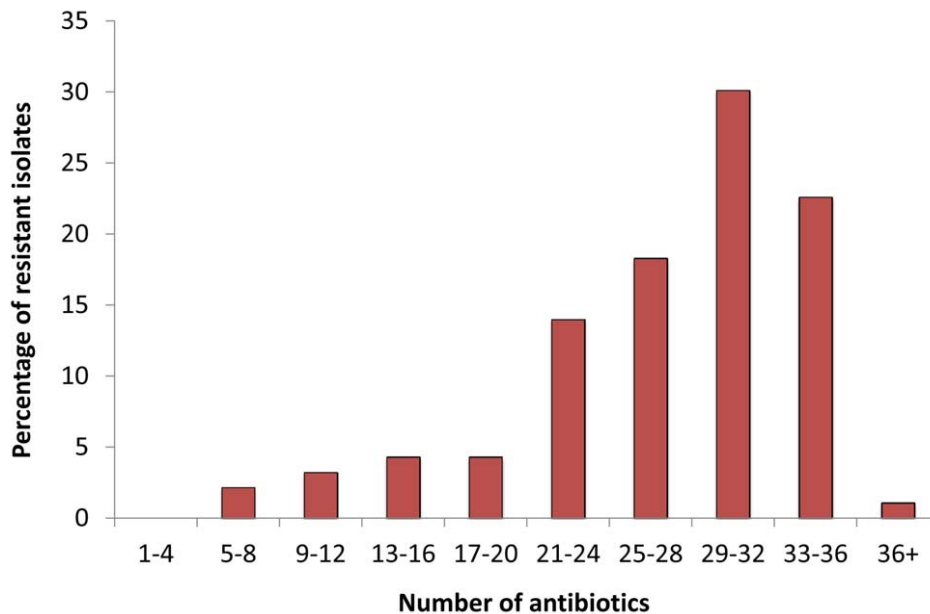
Antibiotikaresistensgener i akvatisk miljö

Bakterier har haft resistensmekanismer under en väldigt lång tid. I en grotta som varit isolerad i fyra miljoner år har forskare hittat resistenta bakterier. Av dessa har vissa bakteriestammar uppvisat resistensmekanismer mot så många som 14 olika antibiotikum (Bhullar *et al.*, 2012). Naturlig resistens har funnits långt innan mänsklig påverkan, men ökad användning av antibiotika skapar ett selektivt tryck som påskyndar resistensutveckling. Användning av antibiotika skapar ett selektivt tryck som främjar utveckling och spridning av resistensmekanismer (Quinn *et al.*, 2011). Pruden *et al.* (2012) fann i deras studie ett tydligt samband mellan mänsklig aktivitet och ökat antal ARG:er i akvatisk miljö. Det sambandet påvisades även i en studie gjord av Storteboom *et al.* (2010) där olika provtagningsplatser längs en och samma flod i Colorado, U.S.A., jämfördes gällande andelen ARG:er i de vattenprover som togs. Prover togs från både ursprunget till floden upp i en bergskedja och längre ned där floden bl.a. hade runnit förbi både djuruppfödningar, akvakultur och en storstad. Metoden som användes för att mäta andelen ARG:er var detektionsfrekvens, vilken togs fram genom att dela antalet upptäckta ARG:er med antal prover som togs på samma plats. Detektionsfrekvensen för ARG:er från prover vid ursprunget till floden låg på 0,09 medan detektionsfrekvensen vid en provtagningsplats där floden ansågs ha utsatts för mänsklig påverkan låg på 0,29. Detta visar tydligt att mänsklig påverkan ökar andelen ARG:er i akvatisk miljö (Storteboom *et al.*, 2010).

Ursprung till antibiotikaresistensgener i akvatisk miljö

Det finns flera möjliga ursprung till antibiotikaresistensgener i akvatisk miljö och en av dem är läkemedelsindustrin. Avfallsvatten från läkemedelsfabriker kan i vissa fall innehålla stora mängder läkemedel inklusive antibiotika. Vid mätningar av vatten och sediment från ett vattenreningsverk som drivs av Patancheru Environment Technology Limited (PETL) och tar emot avfallsvatten från läkemedelsfabriker kunde 93 olika bakteriestammar odlas fram. Dessa testades sedan för resistens mot 39 olika antibiotikasorter. Resultaten visade att alla bakteriestammar var resistenta mot fem eller fler antibiotikum. Dessutom kom det fram att 86% av alla bakteriestammar i vattenreningsverket var resistenta mot 20 eller fler av de antibiotikum som testades för (se Figur 2). I samma undersökning hittades integroner i 95% av bakterierna (Marathe *et al.*, 2013). Integroner är, som ovan nämnts, en rörlig genetisk enhet. Vid förekomst av dessa finns det en risk för horisontell genöverföring. Andra studier

fastslår att rikliga mängder läkemedel släpps ut i miljön från läkemedelsindustrin vilket har stor inverkan på resistensutvecklingen (Larsson *et al.*, 2007).



Figur 2. Multiresistens som observerats i de 93 bakteriestammar som togs från vattenreningsverket PETL i studien av Marathe *et al.* (2013). X-axeln visar antalet antibiotikum som resistens testades för medan y-axeln i procent anger hur stor andel av de 93 bakteriestammarna det var som visade resistens mot ett visst antal antibiotikum. (Marathe, N.P., Viduthalai, R.R., Walujkar, S.A., Charan, S.S., Moore, E.R.B., Larsson, D.G.J., Shouche, Y.S., 2013, s. 6).

Sjukhus är ytterligare en källa till utsläpp av ARG:er och multiresistenta bakterier. En studie gjord av Czekalski *et al.* (2012) mätte ARG:er och antibiotikaresistenta bakterier i en flod som mynnar ut i sjön Geneva i Schweiz. Prover samlades in från fem olika platser bl.a. vid utflödet av avloppsvattnet från ett stort sjukhus i området. Trots att Schweiz anses vara ett av de länder i världen med lägst antibiotikaanvändning var 86% av bakteriestammarna vid utflödet från sjukhuset resistenta mot fler än sex antibiotikasorter (Czekalski *et al.*, 2012).

Vidare är djuruppfödning en bidragande faktor till att ARG:er kommer ut i akvatisk miljö. Trots att det i många fall finns en plan för hur gödsel, avfallsvatten och avrinning ska kontrolleras har djuruppfödning visats ha en stark korrelation till ökande andel ARG:er i närliggande flodbäddar (Storteboom *et al.*, 2010; Pruden *et al.*, 2012). Det här är särskilt bekymmersamt vid djuruppfödning där antibiotika används. Nötkreatursbesättningar där antibiotika användes jämfördes med de där ingen antibiotika förekom och resultatet visade att bakterieprover från de förstnämnda innehöll 100-1000 ggr högre andel ARG:er mot tetracykliner (Peak *et al.*, 2007). Inte heller grundvattnet är opåverkat då ARG:er har hittats i grundvatten kring svinfarmar i högre utsträckning än vad som väntas finnas naturligt. Detta undersöktes i en studie där prover togs från gödselbrunnar tillhörande två olika svinproducenter (provplats A och C) och grundvattnet runtomkring dessa under tre år. Antal prover innehållandes ARG:er varierade från år till år. Vid provplats A hittades det ARG:er i

55-77 av 112 prover och vid provplats C hittades det ARG:er i 14-34 av 46 prover. Studien visade även på att de ARG:er som hittades i grundvattnet högst troligen kom från gödselbrunnarna (Koike *et al.*, 2007).

Slutligen bidrar även akvakultur till spridning av ARG:er ut i akvatisk miljö. Utvecklingen av ARG:er som kommer från akvakultur kan gå till på flera olika sätt. Dels genom att det sker en resistensutveckling hos bakterierna i fisken och i sedimentet under fiskodlingen när antibiotika används som behandling eller i tillväxtbefrämjande syften (Gao *et al.*, 2012). Men även genom att gödsel och organiskt avfall tillsätts i vattnet i fiskodlingen för att öka tillväxten av plankton. Med gödslet och det organiska avfallet följer ARG:er och antibiotikaresistenta bakterier från höns, nötkreatur, svin och människor. Fiskodlingen blir då en groplats för ytterligare resistensutveckling (Shah *et al.*, 2012). Det har däremot visats i flera studier att spridningen av ARG:er från fiskodlingen längre ut i den akvatiska miljön är begränsad (Pruden *et al.*, 2012; Muziasari *et al.*, 2014). ARG:er har i en studie hittats persisterande i sediment direkt under fiskodlingen men inte vid mätplatser längre ut varav den närmaste endast låg 200 meter bort (Muziasari *et al.*, 2014).

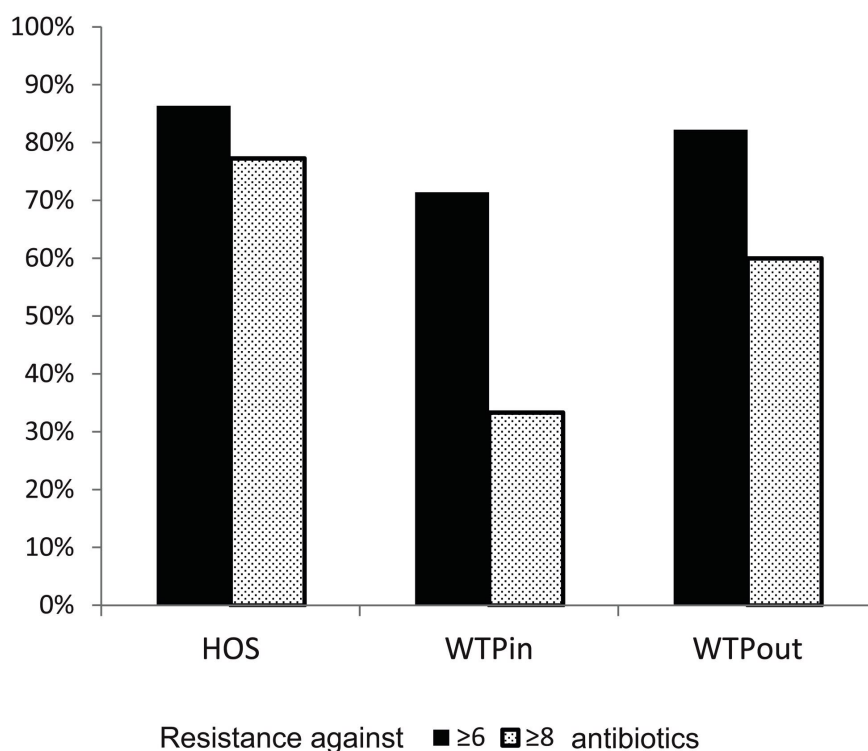
Vattenreningsverk - möjlig plats för selektion av resistensgener

Vattenreningsverk tar emot vatten från många olika ursprung inklusive avloppsvatten från bostäder, industrier, sjukhus och djuruppfödning. Därför är det inte förvånande att flera studier har visat att utflödesvatten från vattenreningsverk innehåller ARG:er och multiresistenta bakterier. Vattenreningsverk visades i en studie vara en av huvudkällorna för utsläpp av ARG:er i floderna Cache la Poudre och South Platte i Colorado (Storteboom *et al.*, 2010). Trots att vatten i stor utsträckning renas från bakterier i vattenreningsverk finns det anledning att tro att selektion sker av vissa sorters ARG:er och multiresistenta bakterier. I ett vattenreningsverk var andelen bakterier resistenta mot fler än åtta antibiotikasorter 27% högre i utflödet än i inflödet (se Figur 3). Samma studie hittade även evidens för horisontell genöverföring inuti vattenreningsverket (Czekalski *et al.*, 2012).

Avfallsvatten från läkemedelsfabriker har som ovan nämnts höga halter av antibiotika. Larsson *et al.* (2007) beskriver i deras studie gjord vid ett vattenreningsverk i Indien hur ciprofloxacin hittades i halter högre än den maximala terapeutiska plasmanivån hos människa. I det undersökta vattenreningsverket blandas vatten från läkemedelsfabriker med avloppsvatten från bostäder för att öka den biologiska aktiviteten. Detta innebär en risk då mänskliga patogener som kan finnas i avloppsvattnet utsätts för antibiotika under en längre period vilket skulle kunna främja utveckling av ARG:er och multiresistenta bakterier i vattenreningsverket (Larsson *et al.*, 2007).

Risker med antibiotikaresistensgener i akvatisk miljö

Den största risken med ARG:er i akvatisk miljö är att en eventuell spridning tillbaka till människor och landlevande djur kan gå många olika vägar och är därför svår att kontrollera.



Figur 3. Figuren visar andelen bakterier resistenta mot sex respektive åtta antibiotikum vid olika provtagningsplatser i en studie gjord i Schweiz. Provtagningsplatserna var vid ett sjukhus (HOS), inflödet till ett vattenreningsverk (WTPin) som tog emot vatten från bl.a. sjukhuset och utflödet från samma vattenreningsverk (WTPout), (Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., Bürgmann, H., 2012, s. 11)

En studie gjord på östkusten i USA undersökte om bad vid havsstränder kunde vara en möjlig spridningsväg. Prover togs i sanden och i vattnet från tio olika stränder och vid fem av dessa hittades flera olika bakteriestammar av meticillinresistent *Staphylococcus aureus* (MRSA). Dessa bar på rörliga ARG:er som kodade för resistensmekanismer mot både tetracykliner och macrolider. Källan till dessa bakterier blev dock inte kartlagd då stränderna låg långt ifrån sjukhus och enligt författarna är vattnet vid dessa så kallt att inte många människor lockas dit för att bada (Soge *et al.*, 2009).

ARG:er i vattendrag ökar risken att människor och djur får i sig dessa via dricksvatten och livsmedel. Vid bevattning av olika grödor kan avrinningsvatten från gödselbrunnar användas vilket innebär en direkt risk för att ARG:er sprids från djuravföring till livsmedel (Peak *et al.*, 2007). Vidare kan kontaminering av dricksvatten via råvatten vara ett allvarligt problem. ARG:er har hittats i av floderna som försörjer Shanghai med dricksvatten. Sju olika platser i floden provtogs och tre av dessa var vid råvattenupptag. Resultaten visade att de prover som togs vid råvattenupptag innehöll några av de högsta nivåerna av ARG:er i hela studien. I studien konstaterades att det fanns fria rörliga genetiska enheter som kodar för resistensmekanismer mot tetracykliner i vattnet. En av dessa var antibiotikaresistensgenen tet(G), vilken kodar för effluxproteiner och oftast sitter på transposomer och plasmider (Jiang

et al., 2013). Ovan nämnda studie av Czekalski *et al.* (2012) visade att det finns en möjlig selektion av multiresistenta bakterier i vattenreningsverk. I samma studie mättes ARG:er i sediment och vatten vid det råvattenupptag som låg 3,2 km från utflödet till det vattenreningsverk som undersöktes i studien. Inga ARG:er hittades i vattenproverna som togs, men däremot i prover tagna från sedimentet. I studien dras slutsatsen att upptag av ARG:er från vattenreningsverket till råvattnet inte går att utesluta (Czekalski *et al.*, 2012).

Spridning från akvatisk miljö via fisk

I studier tidigare nämnda har ARG:er och multiresistenta bakterier hittats i eller i närheten av akvakultur (Gao *et al.*, 2012; Pruden *et al.*, 2012; Muziasari *et al.*, 2014), även i länder där ingen antibiotika används till det (Shah *et al.*, 2012; Akinbowale *et al.*, 2007). Detta är anmärkningsvärt gällande en studie gjord i Australien där multiresistenta bakterier hittades i fiskodlingar trots att ingen antibiotika är tillåten att använda i akvakultur i landet. Författarna spekulerar i att det kan bero på att en spridning har skett från de djuruppfödningar som finns i området eller att de multiresistenta bakterierna har uppkommit genom otillåten användning av antibiotika (Akinbowale *et al.*, 2007). Tet-gener från fiskodlingar har visats kunna ha samma ursprung som de som isolerats från klinisk miljö (Furushita *et al.*, 2003). Vidare har det på fisk och skaldjur tagna från olika fiskmarknader i Kina hittats *E. coli*-stammar som är resistenta mot en eller flera former av antibiotikum. I 2663 prover som togs från olika havsprodukter under tre år hittades 179 *E. coli* isolat och av dessa var 39,1% resistenta mot någon av de 16 antibiotikum som resistens testades för (Rye *et al.*, 2011).

Akvariefisk

Antibiotika används till akvariefisk som behandling av olika sjukdomar men även för att undertrycka bakterietillväxt vid transport (Verner-Jeffreys *et al.*, 2009). I en studie gjord i Storbritannien togs det prover från 25 olika laster av akvariefisk och de bakterier som hittades testades för antibiotikaresistens. Det visade sig att 47 av 97 isolat hade resistensmekanismer mot 15 eller fler antibiotikasorter. Dessutom hittades höga toleransnivåer mot alla kinoloner och florokinoloner (Verner-Jeffreys *et al.*, 2009). Ytterligare studier har gjorts där mikroorganismer i akvarievatten har testats för antibiotikaresistens och det har visats sig att dessa ofta bär på resistensgener (Gerzova *et al.*, 2014).

DISKUSSION

Det selektiva trycket som användning av antibiotika utgör driver resistensutvecklingen till att gå framåt i högre takt än den annars skulle göra, detta gäller både den medfödda och den förvärvade resistensen. Bakteriers förmåga att kunna byta gener med varandra genom horisontell genöverföring gör att en ARG som uppstår har potentialen att sprida sig relativt fort mellan bakterier. Vad som möjliggör detta är de rörliga genetiska enheterna som berördes tidigare. ARG:er hos bakterier hittas ofta på dessa rörliga genetiska enheter, speciellt på plasmider. Mekanismen bakom detta är inte helt förstådd men det är påvisat att bakterier har

en förmåga att dela med sig av fördelaktiga gener med varandra (Quinn *et al.*, 2011). Om dessa gener finns fritt i akvatisk miljö är det extra allvarligt för då finns det stor risk att de tas upp av människor eller djur och får fäste i normalfloran.

Det är av största vikt att spridningen ut i naturen och den akvatiska miljön hejdas eller åtminstone minskar. En början till en minskad spridning bör vara att se över vilka ursprung ARG:er i den akvatiska miljön har och hur dessa kan förhindras. Sjukhus är en naturlig källa till både ARG:er och multiresistenta bakterier. Dels för att människor som bär på dessa vistas där och dels för att stora mängder läkemedel, inklusive antibiotika, används där. I studien av Czekalski *et al.*, (2012) fastslås att multiresistenta bakterier sprids från sjukhus och ut med avloppsvattnet. Studien är gjord i Schweiz där användningen av antibiotika anses vara relativt låg. Det hade varit intressant att jämföra denna med studier gjorda i andra länder för att se om nivåerna av ARG:er och multiresistenta bakterier skiljer sig åt. Det kan vara ett område att utforska i ytterligare litteraturstudier.

Läkemedelsindustrin är ytterligare en väg ut i miljön för höga halter av antibiotika och andra läkemedel. Dessa måste försökas stoppas genom vattenrening men tyvärr har det visats att denna i bästa fall är otillräcklig och i värsta fall skapar en grogrund för antibiotikaresistensutveckling hos patogener. Genom att tillsätta avföring från djur och människor till vatten från läkemedelsfabriker finns det risk för att bakterier, inklusive patogener, blandas med stora mängder antibiotika (Larsson *et al.*, 2007). När detta sker är det hög risk för att patogener utvecklas till multiresistenta bakterier som sedan sprids vidare ut i floder, sjöar och hav. De resultat som Marathe *et al.* (2013) fick fram i deras studie tyder på att en utveckling av multiresistenta bakterier redan sker i de vattenreningsverk som tar emot utflödesvatten från läkemedelsfabriker. Det är av största vikt att hejda denna utvecklingen genom att förbättra de vattenreningstekniker som används. Mer forskning bör också göras på hur spridning från läkemedelsfabriker till vattenreningsverk och vidare ut i vattendrag går till. Det är av intresse att veta hur långt eventuella ARG:er sprider sig och om de riskerar att tas upp av människor och djur som befinner sig längs de vattendrag där utsläppen sker.

Vidare är utsträckt användning av antibiotika inom djuruppfödning ett allvarligt problem. I många länder har det gjorts försök med att minska användningen rejält men tyvärr används stora mängder av antibiotika fortfarande i många delar av världen som profylax och i tillväxtbefrämjande syften. Detta leder till att multiresistenta bakterier utvecklas i djuruppfödningar och sprider sig ut i den akvatiska miljön via avrinning från gödselhantering eller via avloppsvatten. En bättre djurhållning skulle i många fall minska behovet av antibiotika vilket i sin tur skulle sakta ner resistensutvecklingen. Peak *et al.* (2007) belyser problemet med att bevattning av olika grödor med vatten från gödselhantering kan sprida ARG:er. Det är viktigt att ARG:er inte sprids med livsmedel därför bör bevattning som ovan beskrivs undvikas om antibiotikaanvändning är hög i djuruppfödningen.

Akvakultur är ytterligare en livsmedelsproducerande näring där det finns stor risk för spridning av ARG:er ut i den akvatiska miljön och via livsmedel till människor. Spridningen ut från fiskodlingar är omdiskuterad då Muziasari *et al.* (2014) endast fann ARG:er i sedimentet under fiskodlingarna som undersöktes. Pruden *et al.* (2012) hittade heller inga konkreta samband mellan fiskodlingar och ARG:er i floderna som undersöktes. Dessa resultat torde dock variera med strömmar, antibiotiketryck och årstid. Då ARG:er finns persisterande i sediment kan en möjlig spridning ske om sedimentet löses upp och sprids iväg, t.ex. under en storm eller vårfloed. Fiskodlingar är uppbyggda på olika sätt och i vissa länder används mer eller mindre antibiotika. Möjligheten finns att en större spridning av ARG:er ut i den akvatiska miljön runtomkring sker från fiskodlingar med högre användning av antibiotika. Anmärkningsvärt är dock att ARG:er utöver normal förväntan även har hittats i fisk från akvakultur där ingen antibiotika är tillåten (Akinbowale *et al.*, 2007). En trolig anledningen som författarna spekulerar i är att dessa kommer via olika vattenvägar som en förorening från diverse djuruppfödningar i samma område eller genom otillåten antibiotikaanvändning i fiskodlingen. Om ytterligare forskning skulle visa på att ingen antibiotika användes är det ett klart bevis för att spridning av ARG:er via vatten är större än vad som tidigare trots.

En av de största farorna med ARG:er är att de kan sprida resistensmekanismer till patogena bakterier. För att detta ska ske måste de komma i kontakt med varandra och ett möjligt sätt är genom att tas upp i djur eller människor via t.ex. födan eller dricksvattnet. Fisk kan bära på ARG:er och multiresistenta bakterier vilket visas genom att dessa hittas i akvakultur och i fisk från olika fiskmarknader (Rye *et al.*, 2012). Om en fisk bärandes på ARG:er används till livsmedel finns det risk för att dessa tas upp av bakterier i tarmen. I en studie gjord av Furushita *et al.* (2033) påvisades ett gemensamt ursprung till tet-gener från fiskodlingar och tet-gener från klinisk miljö. Om spridningen har gått från fisk till människor eller tvärtom är oklart, dock är det intressant och skrämmande att samband nu har påvisats. ARG:er kan tas upp av människor och djur via dricksvattnet där kontaminering av råvattnet är huvudproblemet. Vid råvattenuptag har fria rörliga genetiska enheter innehållandes ARG:er hittats och dessa kan lätt tas upp av vissa typer av bakterier. Tet(G) kodar för resistens mot tetracykliner via effluxproteiner och är en av ARG:erna som hittades i stor utsträckning på fria rörliga genetiska enheter vid råvattenuptag (Jiang *et al.*, 2013). En ineffektiv rening av råvattnet och en möjlig selektion av ARG:er i vattenreningsverk förstärker problematiken kring dricksvatten.

Vidare kan ARG:er tas upp i människor och djur via spridningsvägar som inte är helt självklara. Akvariefisk har visats bära på stora mängder multiresistenta bakterier. Via hantering av akvariefisk kan en kontaktsmitta ske genom t.ex. hudsår. Global handel med akvariefisk innebär också en stor risk för spridning mellan länder. Även havsbad kan innebära en möjlig smittorisk med ARG:er via hudsår. Soge *et al.* (2009) fann multiresistenta bakterier vid flera badstränder i U.S.A. trots att dessa låg långt från närmaste sjukhus, vilket visar på en

utbredd problematik med ARG:er i akvatisk miljö då en spridning möjligtvis kan ske långa sträckor.

Sammanfattningsvis har resistensmekanismer hos bakterier funnits under en lång tid men den takt resistensutvecklingen har gått de senaste åren måste hejdas. Utsläppen av ARG:er till akvatisk miljö måste minska då de bidrar till att öka takten för resistensutvecklingen. Akvatisk miljö är på många sätt unik då det finns flera spridningsvägar tillbaka till människor och djur men också för att det finns en möjlighet att sprida multiresistenta bakterier och ARG:er långt via vattnet. Bättre rutiner och kontroll av vattenanvändning kring akvakultur, djuruppfödningar och bevattning är ett måste då det i nuläget finns en stor risk att ARG:er sprids via livsmedel. Mer forskning kring vattenreningsverk bör göras för att undersöka om en selektion av multiresistenta bakterier verkligen sker. Även om forskningen skulle visa att det inte sker någon selektion måste vattenreningen i många delar av världen bli mer effektiv, speciellt för de vattenreningsverk som tar emot vatten från läkemedelsindustrin. Dricksvatten bör inte innehålla ARG:er vilket är ytterligare en anledning till att effektivisera vattenreningsverken. Antibiotikaresistens är en av de stora utmaningarna inom medicinen idag och det är en utmaning som måste tas på allvar.

REFERENSER

- Akinbowale, O.L., Peng, H., Grant, P., Barton, M.D. (2007). Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30: 177-182
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E.D., Johnston, M.D., Barton, H.A., Wright, G.D., (2012). Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PLoS ONE*, 7(4): e34953
- Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., Bürgmann, H., (2012). Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Frontiers in Microbiology*, 3:1-17
- Davies, J., Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74: 417-433
- Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, K., Hasegawa, T., Ohta, M. (2003). Similarity of Tetracycline Resistance Genes Isolated from Fish Farm Bacteria to Those from Clinical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5336-5342
- Gao, P., Mao, D., Luo, Y., Wang, L., Xu, B., Xu, L., (2012). Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Research*, 46: 2355-2364
- Gerzova, L., Videnska, P., Faldynova, M., Sedlar, K., Provaznik, I., Cizek, A., Rychlik, I. (2014). Characterization of Microbiota Composition and Presence of Selected Antibiotic Resistance Genes in Carriage Water of Ornamental Fish. *PLoS ONE*, 9(8): e103865
- Jiang, K., Hu, X., Xu, T., Zhang, H., Sheng, D., Yin, D. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *Science of The Total Environment*, 458-460: 267-272
- Koike, S., Krapac, I.G., Oliver, H.D., Yannarell, A.C., Chee-Sanford, J.C., Aminov, R.I., Mackie, R.I., (2007). Monitoring and Source Tracking of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Adjacent to Swine Production Facilities over a 3-year Period. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 4813-4823
- Larsson, D.G.J., de Pedro, C., Paxeus, N., (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*. 148: 751-755
- Marathe, N.P., Viduthalai, R.R., Walujkar, S.A., Charan, S.S., Moore, E.R.B., Larsson, D.G.J., Shouche, Y.S., (2013). A Treatment Plant Receiving Waste Water from Multiple Bulk Drug Manufacturers Is a Reservoir for Highly Multi-Drug Resistant Integron-Bearing Bacteria. *PLoS ONE*, 8(10): e77310
- Muziasari, W.I., Managaki, S., Pärnänen, K., Karkman, A., Lyra, C., Tamminen, M., Suzuki, S., Virta, M., (2014). Sulphonamide and Trimethoprim Resistance Genes Persist in Sediments at Baltic Sea Aquaculture Farms but Are Not Detected in the Surrounding Environment. *PLoS ONE*, 9(3): e92702
- Peak, N., Knapp, C.W., Yang, R.K., Hanfelt, M.M., Smith, M.S., Aga, D.S., Graham, D.W., (2007). Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environmental Microbiology*. 9:143-151
- Pruden, A., Arabi, M., Storteboom, H.N. (2012). Correlation Between Upstream Human Activities and Riverine Antibiotic Resistance Genes. *Environmental Science & Technology*. 46: 11541-11549

- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan P.J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Andra upplagan, 129-164.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G. (2012). *Rang and Dale's Pharmacology*. Sjunde upplagan. Elsevier Limited, 617-618.
- Ryu, S.H., Park, S.G., Choi, S.M., Hwang, Y.O., Ham, H.J., Kim, S.U., Lee, Y.K., Kim, M.S., Park, G.Y., Kim, K.S., Chae, Y.Z. (2011). Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 152: 14-18
- Shah, S.Q.A., Colquhoun, D.J., Nikuli, H.L., Sørum, H., (2012). Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in the Bacterial Flora of Integrated Fish Farming Environments of Pakistan and Tanzania. *Environmental Science & Technology*. 46: 8672-8679
- Soge, O.O., Meschke, J.S., No, D.B., Roberts, M.C. (2009). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from US West Coast public marine beaches. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64: 1148-1155
- Storteboom, H., Arabi, M., Davies, J.G., Crimi, B., Pruden, A. (2010). Tracking Antibiotic Resistance Genes in the South Platte River Basin Using Molecular Signatures of Urban, Agricultural, and Pristine Sources. *Environmental Science & Technology*, 44: 7397-7404.
- Verner-Jeffreys, D.W., Welch, T.J., Schwarz, T., Pond, M.J., Woodward, M.J., Haig, S.J., Rimmer, G.S.E., Roberts, E., Morrison, V., Bakker-Austin, C. (2009). High Prevalence of Multidrug-Tolerant Bacteria and Associated Antimicrobial Resistance Genes Isolated from Ornamental Fish and Their Carriage Water. *PLoS ONE*, 4(12): e8288