

# Vankomycinresistenta enterokocker (VRE) i slaktkycklingbesättningar

## *Prevalens och persistens inom produktionsanläggningar, möjliga spridningsvägar samt effekt av åtgärder för att begränsa förekomsten*

Björn Bengtsson och Christina Greko, Avd. för Antibiotika, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, Uppsala

### Mål för studien

Incitamentet till undersökningen var att tarmbakterier okänsliga (resistenta) för vankomycin (vankomycinresistenta enterokocker, VRE) påvisats i en ökande andel prov av tarminnehåll från svenska slaktkycklingar undersökta i det svenska resistensövervakningsprogrammet SVARM under åren 2000-04.

Avsikten var att ta fram underlag för åtgärder med syfte att förhindra spridning av VRE mellan produktionsanläggningar och att undersöka möjligheter att minska förekomsten i anläggningar där bakterien finns. Specifika frågeställningar var:

1. Hur spridd bakterien är inom en produktionsanläggning.
2. Var i miljön bakterien finns kvar mellan konsekutiva flockar.
3. Om förekomsten av VRE i miljön och i efterföljande flock påverkas av olika typer av rengöring.
4. Om VRE finns på utrustning som används vid uttag för slakt.
5. Om förekomsten av VRE kan minskas genom tillförsel av probiotika/tarmflorekultur.

I den ursprungliga planeringen var avsikten att undersöka frågeställningarna i en fältstudie. Detta visade sig omöjligt eftersom det probiotika som var tänkt att användas inte blev registrerat för bruk till slaktkyckling och därför inte kunde användas i produktionsbesättningar. Undersökningen delades därför i en **Fältstudie** (frågeställningarna 1-4) och en **Experimentell studie** (frågeställning 5). Undersökningarna har genomförts i samarbete med Johan Lindblad, Svensk Fågel AB och Desirée Jansson, Avdelningen för Lantbrukets djur, SVA.

### Sammanfattning/Slutsatser

- På anläggningar där VRE förekommer är bakterien vitt spridd i miljön. Bakterien kan påvisas i prov från ut- och inluftsdon, vilket tyder på att den cirkulerar i luften i djurutrymmet. Därmed finns den sannolikt på flertalet ytor i djurutrymmet. Bakterien kan också påvisas på dörrhandtag på utsidan av djurutrymmet vilket visar att smittskyddsbarriärer mellan avdelningar inte begränsar bakteriens spridning på en anläggning. När VRE förekommer på en anläggning måste därför alla avdelningar betraktas som kontaminerade.
- På de tre anläggningar där VRE aldrig tidigare påvisats var samtliga prov, såväl från miljö som från kycklingar, negativa med avseende på VRE. Detta tyder på att bakterien inte tillhör den normala bakteriefloren i stallmiljön på produktionsanläggningar för slaktkyckling utan introducerats till anläggningar där den förekommer.
- Konventionell rengöring/desinfektion eliminerar inte VRE från miljön. Sannolikt koloniserar nyinsatta kycklingar av bakterier som finns kvar i miljön. Detta leder till att konsekutiva flockar i samma utrymme ofta är koloniserade.
- Rengöringsrutiner skiljer sig inte påtagligt mellan de anläggningar där VRE finns och de där bakterien inte finns. Det tyder på att rutinerna för rengöring/desinfektion som används idag inte är av primär betydelse för om VRE kvarstår på en anläggning.
- VRE finns på truckar, och förmodligen även på annan utrustning som containrar, som används för utlastning vid uttag för slakt. Bakterierna finns på utrustningen efter rengöring när den lämnar slakteriet för ett nytt uppdrag. Detta innebär en möjlig spridningsväg för VRE mellan anläggningar men dess betydelse i praktiken kan inte bedömas utifrån gjorda undersökningar.
- I en experimentell infektionsmodell kunde inte visas att användning av probiotika (Lactiferm®) eller tarmflorekultur (Broilact®) minskade andelen kycklingar som koloniserades med VRE. Resultaten talar för att s.k. "competitive exclusion" inte är en framkomlig väg för att minska förekomsten av VRE i produktionsbesättningar. Den utprovade infektionsmodellen för överföring av VRE från miljön till insatta daggamla kycklingar kan emellertid vara användbar för fortsatta epidemiologiska undersökningar av VRE-förekomsten hos slaktkyckling.

### Bakgrund

Enterokocker tillhör den normala tarmfloran hos såväl djur som människor men kan orsaka allvarliga infektioner hos människor med nedsatt motståndskraft. Vankomycin är ett "sista linjens" antibiotikum som inom humansjukvården används vid infektioner med t.ex. enterokocker som är resistenta för andra antibiotika. Resistens mot vankomycin innebär en kraftig begränsning av behandlingsmöjligheterna. Infektioner med vankomycinresistenta enterokocker

(VRE) är ett tilltagande problem på sjukhus i USA och i några Europeiska länder (Goossens *et al.*, 2003). I Sverige är infektioner med VRE ovanliga hos människor (SWEDRES 2003) men den vikt man ur folkhälsosynpunkt fäster vid bakterien illustreras av att fynd av VRE hos människor är anmälningspliktigt.

Vankomycinresistens hos enterokocker kodas av gener som kan överföras mellan enterokocker (Bonten *et al.*, 2001). VRE hos animalieproducerande djur utgör därför en reservoar av resistensgener som kan överföras till bakterier hos människor.

I mitten av 90-talet visades att avoparcin, ett antibiotikum i samma grupp som vankomycin, selekterade för vankomycinresistens hos enterokocker vid användning i tillväxtbefrämjande syfte till animalieproducerande djur. Därigenom uppstod en reservoar av VRE bland animalieproducerande djur. Som en följd av dessa upptäckter förbjöds användning av avoparcin inom EU 1997. I länder där preparatet använts var VRE då vanligt förekommande bland slaktkycklingar och slaktsvin och är fortfarande endemiska, även om förekomsten har minskat som en följd av avoparcinförbudet (Bonten *et al.*, 2001).

I Sverige har avoparcin inte använts sedan tidigt 80-tal. Detta är sannolikt orsaken till att endast enstaka isolat av VRE påvisats hos slaktkyckling i svenska undersökningar från 90-talet. I undersökningarna användes icke-selektiva odlingsmetoder med låg sensitivitet att detektera VRE om bakterien utgör en liten andel av enterokockerna i provet. Sensitiviteten kan ökas betydligt om odlingsmedier innehållande vankomycin används, sk selektiva medier (Borgen *et al.*, 2000a).

I SVARM odlas prov av tarminnehåll från slaktkyckling på såväl selektiva som icke-selektiva medier. Vid användning av icke-selektiva medier påvisades VRE i endast fyra av cirka 1000 prov från slaktkyckling undersökta mellan 2000-04 men användning av selektiva medier visade att bakterien förekom i betydligt fler prov och i ökande frekvens (SVARM 2000-04). Åren 2000, 2001, 2002 och 2004 var <1 %, 7 %, 24 % respektive 36 % av proven positiva avseende VRE (Fig 1). Samtliga isolat var *Enterococcus faecium* med en likartad biokemisk fenotyp och ett likartat antibiogram vilket talar för att de tillhör en klon. Ökningen i förekomst av VRE och isolatens klonalitet var oväntad och antyder en gemensam källa varifrån bakterien spridits.

För att öka kunskapen om epidemiologin bakom förekomsten av VRE hos svensk slaktkyckling genomfördes 2002-03 en undersökning i samarbete med branschorganisationen Svensk Fågel AB och finansierad med medel från SVA, (SVA Rapport, 2003). Undersökningen visade bland annat att VRE förkom i poolade avföringsprov från 18 % av 106 svenska anläggningar för slaktkycklinguppfoärdning och att konsekutiva flockar i en avdelning där VRE tidigare påvisats ofta var koloniserade. Majoriteten av de VRE som isolerades i studien hade en likartad biokemisk fenotyp och likartat antibiogram som isolaten från SVARM åren 2001-2004. VRE påvisades däremot inte i miljöprov vare sig från svenska foderfabriker eller från slaktkycklingkläckerier och inte heller i avföringsprov från fåglar ur de avelsflockar som var aktiva hösten 2002.

VRE isoleras sällan vid direktodling av prov från svenska kycklingar och utgör sannolikt en liten del av kycklingens tarmflora. Andelen svenska produktionsanläggningar där VRE förekommer är liten i ett internationellt perspektiv. I Danmark och Norge förekommer VRE i majoriteten av de anläggningar där avoparcin användes till sent 90-tal, 74 respektive 96 % (Heuer *et al.*, 2002a, Sörum *et al.*, 2004).

## Fältstudie (prevalens/persistens, effekt av desinfektion, möjliga spridningsvägar)

### Material och metoder

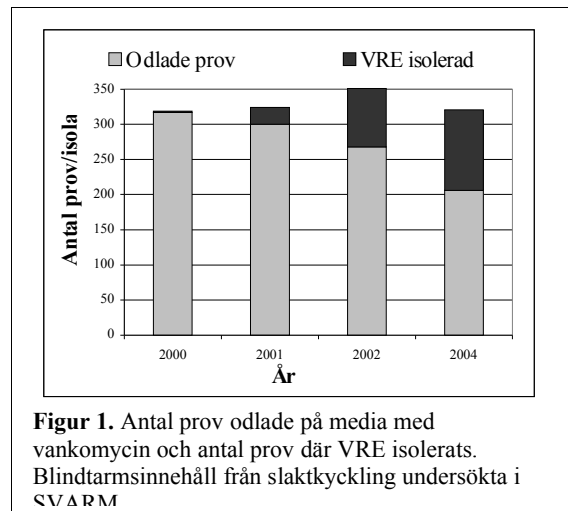
#### Provinsamling (produktionsanläggningar)

Studien genomfördes under mars-juni 2004 i 12 produktionsanläggningar för slaktkyckling. I nio anläggningar (VRE 1-9) hade VRE tidigare isolerats från samlingsprov av träck och/eller blindtarmsinnehåll från enskilda kycklingar. I tre anläggningar (CON 1-3) hade VRE inte isolerats i sådana prov. Val av anläggningar baserades på tidigare undersökningar vid SVA (SVA Rapport, 2003, SVARM 2001-02). Försöksupplägget framgår av Tab I. Provtagningen utfördes av personal på anläggningarna efter detaljerade instruktioner (se bilaga 1-4).

I anslutning till provinsamlingen intervjuades producenten per telefon angående rutiner vid rengöring samt övriga förhållanden på anläggningen. Delar av intervjuens innehåll framgår av Tab II (Bilaga 7).

**Träck 1 och Träck 2:** Samlingsprov av träck togs cirka två veckor före slakt från fyra flockar på varje anläggning. Provtagningen upprepades i nästkommande flock i samma avdelning.

**Miljö 1** ("Dörr", "Inluft", "Utluft", "Skruvlåda helfoder"): Proven togs efter uttag för slakt men före rengöring från två avdelningar per anläggning (från en anläggning, VRE 8, inkom prov från fyra avdelningar). Prov från handtag på



utsidan till dörren in till avdelningen, insidan av ett inluftsdon och ett utluftsdon togs med sterila lappar, 8x10 cm, klippta ur disktrasor ("Vileda"). Damm/foderrester insamlades från skruvlådan till avdelningens helfodersilo.

**Miljö 2** ("Golv", "Fodertråg", "Hel-vete"): Prov togs från samma avdelningar som "Miljö 1" men efter rengöring enligt anläggningens ordinarie rutiner (från en anläggning, VRE 8, inkom prov från samtliga fyra avdelningar). Prov från golvet ("Golv") togs genom att med en lapp (enligt ovan) torka cirka 0,5 m<sup>2</sup> i mitten av avdelningen och med en annan lapp torka i ett hörn cirka 1 meter i vardera riktningen i vinkeln mellan golv och vägg. Dessa två prov poolades. Med lapp togs också prov från botten, utsida och insida från två fodertråg i varje avdelning. Alternativt togs prov från två ställen på foderrännan i avdelningar med detta utfodringssystem. Damm/foderrester insamlades från skruvlådan till helvetesilo.

### **Provinsamling (lasttruck)**

Under maj-juni 2004 togs prov från truckar för lastning av containers vid uttag för slakt. Två truckar från två olika arbetslag undersöktes vid tre konsekutiva tillfällen (söndag, torsdag, söndag) innan arbetslaget lämnade slakteriet för uppdrag. Proven togs från två av truckens däck genom att med lapp (enligt ovan) torka slitbanan och sidorna på cirka en fjärdedel av däckets omkrets. De två proven poolades. Provtagningen utfördes enligt detaljerade instruktioner av personal ansvarig för utrustningen (se bilaga 5).

### **Bakteriologisk odling och bestämning av antibiotikakänslighet**

Förekomst av VRE undersöktes med selektiv metodik innebärande anrikning i Enterococcoselbuljong med tillsats av klindamycin (0.25 mg/L) och vankomycin (8 mg/L) följt av odling på Slanetz-Bartley agar med tillsats av 16 mg/L vankomycin (SlaBa-v).

*Poolade avföringsprov*: Prov späddes 1:2 i fysiologisk NaCl och blandades med stomacher. Från blandningen späddes 10 mL 1:5 med Enterococcosel. Efter inkubering 24 h i 37 °C spreds 0,1 mL på SlaBa-v. Efter inkubering 48 h i 37 °C renodlades två kolonier av varje presumtiv typ på blodagar och på bile-esculinagar 18-24 h i 37 °C. En koloni av varje presumtiv typ identifierades därefter till speciesnivå enligt Devriese *et al.* (1993) med följande biokemiska test: mannitol, sorbitol, arabinos, sackaros, ribos, metyl-alfa-D-glucopyranosid och raffinosa.

*Miljöprov (lappar och damm/foderrester)*: Proven inkuberades i 30 mL Enterococcosel med tillsats av klindamycin och vankomycin 6 h i 37 °C. Prov med positivt BE-omslag hanterades som avföringsproven enligt ovan. Vid negativt omslag filtrerades 10 mL Enterococcosel (0,45 µm) och filtret placerades på SlaBa-v. Efter inkubering i 48 h i 37 °C, hanterades presumtiva kolonier enligt ovan.

Antibiotikakänsligheten hos ett presumtivt isolat av VRE från varje prov undersöktes med mikrodilutionsmetod (VetMIC™) enligt ordinarie rutiner vid Avdelningen för Antibiotika, SVA. Undersökta substanser och brytpunkter för resistens framgår av Tab IV.

### **Övriga undersökningar**

Hos ett isolat av VRE från varje positivt prov bestämdes biokemisk subtyp med PhenePlate™ systemet (PhPlate Microplate Techniques AB, Stockholm, Sweden) enligt Kühn *et al.* (1995).

Sex isolat, varav två från lasttruckar, undersöktes med pulsfälts-gelelektrofores (PFGE) efter restriktionsklyvning av DNA i huvudsak enligt Murray *et al.* (1990).

## **Resultat och Kommentarer**

### **Produktionsanläggningar**

I anläggningarna VRE 1-9 påvisades VRE (*Enterococcus faecium*, MIC vankomycin >128 mg/L) i 99 av 202 (49 %) prov (Tabell I). I endast en av de 36 avdelningar som undersöktes (Avd5/VRE 8) var alla prov negativa avseende VRE. I kontrollanläggningarna (CON 1-3) påvisades VRE inte i något prov.

Bakterien isolerades från 50 av 60 prov (83 %) från dörrhandtag och ventilationsdon före rengöring i anläggningar VRE 1-9 (Tab I). I prov från ventilationsdon fanns VRE i 37 av 40 prov (93 %), vilket tyder på att bakterien finns i luften och därmed troligen även på flertalet ytor i stallutrymmet. VRE fanns på 13 av 20 (65 %) dörrhandtag. Endast i en av de 9 anläggningarna var alla prov från dörrhandtag negativa vilket visar att smittskyddsbarriärerna mellan avdelningarna inte förhindrar spridning av VRE.

I sju anläggningar påvisades VRE i prov av damm/foderrester från silons skruvlåda. Detta innebär inte nödvändigtvis att fodret i silon är kontaminerat med VRE utan kan vara en följd av spridning "bakvägen" från djurutrymmet. I tidigare undersökningar har bakterien inte påvisats i miljöprov från foderfabriker (SVA Rapport, 2003).

I sex avdelningar påvisades VRE i träck från två konsekutiva flockar (Tab I och III). (En anläggning lämnade inga prov från efterföljande flock). Sambandet mellan förekomst av VRE i träck från konsekutiva flockar i samma avdelning är statistiskt signifikant (Fischer Exact Test; P<0,05) (Tab III). Resultaten talar för att om en flock är koloniserad med VRE, kommer nästa flock i samma avdelning ofta att vara koloniserad vilket överensstämmer med tidigare erfarenheter (SVA Rapport, 2003).

I alla åtta avdelningar där VRE påvisades i träck, återfanns bakterien även i miljön men i 11 avdelningar där bakterien påvisades i miljöprov var träckproven negativa (Tab I). Resultaten tyder på att om VRE förekommer i tarmen hos fåglarna återfinns den även i miljön, men förekomst av VRE i miljön innebär inte alltid att fåglarna utskiljer bakterien i träck. Inte heller innebär förekomst av VRE i miljön att bakterien alltid kan isoleras i träck från de insatta fåglarna. Endast i en av 11 avdelningar där VRE fanns i miljön vid insättning påvisades bakterien i träck före slakt. Däremot påvisades bakterien hos insatta fåglar i fyra avdelningar där VRE inte påvisades i miljön efter rengöring.

**Tabell III.** Förekomst av VRE i träck från två konsekutiva flockar i samma avdelning.

		Träck 2	
		Positivt	Negativt
Träck 1	Positivt	6	4
	Negativt	3	19

Uppenbarligen eliminerar de rengöringsrutiner som tillämpas inte VRE från stallmiljön. I endast två av nio anläggningar påvisades inte VRE på golv och/eller fodertåg efter rengöringen (Tab I). Intervjuerna med producenterna visar att rengöringsrutinerna i de två anläggningarna inte avviker från de i övriga anläggningar (Tab II; Bilaga 7). Inte heller kontrollanläggningarna (CON 1-3) har rutiner som systematiskt avviker från de i anläggningar där VRE förekommer. Eftersom rengöringsrutinerna inte skiljer sig påtagligt mellan anläggningar där VRE finns respektive inte finns, är de troligen inte av primär betydelse för om bakterien förekommer på en anläggning.

### Lasttruck

I alla tre prov från en truck och i två av tre prov från den andra trucken påvisades VRE. Rengöringen av trucken eliminerar inte förekomst av VRE. Förmodligen förekommer bakterien även på annan utrustning som används vid slaktuttag, t.ex. containers. I vilken mån detta innebär att bakterien förs mellan anläggningar i en mängd som innebär att nyinsatta fåglar koloniserar kan inte bedömas. Risken för en sådan överföring är förmodligen störst vid uttagsslakt eftersom kvarvarande fåglar skulle kunna koloniserar och bakterierna uppföras till nivåer som gör att de finns kvar i miljön i utrymmet.

### Resistensmönster, PhenePlate och PFGE

Majoriteten av de 98 isolat från träck-/miljöprov och de fem isolat från lasttruckar som resistensundersöktes hade samma resistensfenotyp som tidigare isolat från svensk slaktkyckling (Tab IV) (ett isolat; VRE 8, avd 1, inluft undersöktes inte).

Majoriteten av isolaten tillhörde samma biokemiska subtyp som tidigare VRE-isolat (Bilaga 6). Sex isolat, inklusive två från lasttruckar, undersökta med PFGE hade dessutom ett pulsältsmönster som överensstämmer med mönstret hos majoriteten av tidigare undersökta VRE (Bilaga 6). Likheter i antibiogram, biokemisk subtyp och PFGE-mönster styrker antagandet om en klonal spridning av VRE inom slaktkycklingproduktionen.

**Tabell IV.** Resistensfenotyp för 103 isolat av VRE (VRE II). Som jämförelse visas resistensfenotypen hos isolat undersökta inom ramen för SVARM åren 2000, 2001, 2002 och 2004 samt i en undersökning genomförd vid SVA 2003 (SVARM 2000, 2001, 2002 och 2004; SVA Rapport 2003). Brytpunkter för resistens (mg/mL är angivna). R = resistent, S = sensitiv.

VRE II	SVARM					SVA 2003	Totalt	Resistensfenotyp <sup>a</sup>												
	2000	2001	2002	2004	2003			Va	Em	Fl	Na	Av	Tc	Ba	Vi	Am	Gm	Nm	Sm	Cm
								>16	>4	>32	>2	>32	>8	>32	>8	>8	>512	>1024	>1024	>16
92	24	75	101	91	383	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8		6	5	19	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1				1	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			1	1	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			1	1	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
				1	R	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
				1	R	R	R		R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
				1	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1			1	5	7	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			7	7	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			1	1	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1				1	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1				1	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>103</b>	<b>2</b>	<b>24</b>	<b>83</b>	<b>115</b>	<b>98</b>	<b>425</b>														

<sup>a</sup> Va = vankomycin; Em = erythromycin; Fl = flavomycin; Na = narasin; Av = avilamycin; Tc = tetracyklin; Ba = bacitracin; Vi = virginiamycin; Am = ampicillin; Gm = gentamicin; Nm = neomycin; Sm = streptomycin; Cm = kloramfenikol.

**Tabell I.** Provtagning och odlingsresultat i nio produktionsanläggningar där VRE tidigare påvisats (VRE 1-9) och i tre anläggningar där VRE inte tidigare påvisats (CON 1-3). Nej = VRE ej påvisade i prov, Ja = VRE påvisade. För detaljer om provtagning och odling se ”Material och metoder”.

Besättning	Avdelning	Träck 1		Dörr	Inluft	Utluft	Skruvlåda helfoder		Golv	Fodertråg	Skruvlåda hel-vete		Träck 2			
VRE 1	1	Nej	Slakt					Rengöring				Insättning av ny omgång	Nej			
	2	Nej												Nej		
	3	Nej		Ja	Ja	Ja	Nej		Ja	Nej	Nej		Nej	Nej	Nej	
	4	Nej		Ja	Ja	Ja	Nej		Ja	Ja	Nej		Nej	Nej	Nej	
VRE 2	5	Nej														Nej
	6	Nej														Nej
	7	Nej		Ja	Ja	Ja	Nej		Ja	Ja	Ja		Nej	Nej	Nej	Nej
	8	Nej		Nej	Ja	Ja	Nej		Nej	Ja	Nej		Nej	Nej	Nej	Nej
VRE 3	1	Nej														Nej
	2	Nej														Nej
	3	Nej		Nej	Ja	Ja	Ja		Ja	Nej	Nej		Nej	Ej helvete	Nej	Nej
	4	Ja		Nej	Ja	Ja	Ja		Ja	Nej	Nej		Nej	Ej helvete	Ja	Ja
VRE 4	1	Ja		Ja	Ja	Ja	Ja		Ja	Nej	Nej		Nej	Nej	Ja	Ja
	2	Ja													Nej	Nej
	3	Nej													Ja	Ja
	4	Ja		Ja	Ja	Ja	Ja		Ja	Ja	Nej		Nej	Nej	Ja	Ja
VRE 5	1	Nej		Ja	Ja	Ja	Nej		Nej	Ja	Nej		Nej	Nej	Nej	Nej
	2	Nej		Nej	Ja	Ja	Ja		Ja	Ja	Ja		Nej	Nej	Nej	Nej
	3	Nej													Nej	Nej
	4	Nej													Nej	Nej
VRE 6	1	Nej														Inga prov
	2	Nej		Ja	Ja	Ja	Ja		Ja	Ja	Ja		Ja	Nej	Ja	Ja
	3	Ja		Ja	Ja	Ja	Ja		Ja	Nej	Nej		Nej	Nej	Nej	Nej
	4	Nej													Nej	Nej
VRE 7	3	Ja													Nej	Nej
	4	Ja		Ja	Ja	Ja	Ja		Ja	Ja	Nej		Nej	Ja	Nej	Nej
	5	Ja		Ja	Ja	Ja	Ja		Ja	Ja	Ja		Nej	Nej	Nej	Nej
	6	Ja													Nej	Nej
VRE 8	1	Nej	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja		Nej	Nej			
	2	Nej	Nej	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nej		Ja	Ja			
	5	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Ej helvete	Ja	Ja			
	6	Nej	Nej	Nej	Ja	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Ej helvete	Ja	Ja			
VRE 9	1	Nej											Ja			
	2	Ja	Ja	Ja	Ja	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej			
	3	Nej										Nej	Nej			
	4	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej			
CON 1	1	Nej											Nej			
	2	Nej											Nej			
	5	Nej	Inga prov				Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej			
	6	Nej	Inga prov				Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej			
CON 2	A	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej			
	B	Nej														
	C	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej			
	D	Nej														
CON 3	1;1	Nej											Inga prov			
	1;2	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej				
	2	Nej														
	3	Nej	Inga prov				Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej				

## Experimentell studie (effekten av probiotika/tarmflorekultur på kolonisation med VRE)

Avsikten var att i en infektionsmodell undersöka om tillförsel av probiotika eller tarmflorekultur påverkar kolonisationen med VRE av daggamla slaktkycklingar som sätts in i en miljö kontaminerad med bakterien. För att avgöra lämplig kontaminationsgrad i infektionsmodellen gjordes en förstudie (Försök 1). Försöksupplägg och provtagningar framgår av Tab V och VI.

**Försök 1** (förstudie) gjordes med tre grupper om 25 kycklingar (Tab V). Cirka 18 timmar före insättning av kycklingarna sprayades 100 ml VRE suspension i fysiologisk NaCl över golvytan med ”blomspruta”. För att få olika kontaminationsgrad i de tre grupperna användes suspensioner med olika koncentration av VRE. Kycklingarna avlivades efter 14 dagar.

**Försök 2** (försök) gjordes också med tre grupper kycklingar (Tab VI). Baserat på resultaten av förstudien kontaminerades golvytan i varje box med  $10 \times 10^6$  CFU VRE. En grupp kycklingar gavs probiotika (**Lactiferm**<sup>®</sup>) i vatten under hela försökstiden. En grupp tillfördes tarmflorekultur (**Broilact**<sup>®</sup>) som spray före insättning och i vatten tre dagar därefter och en grupp (**Kontroll**) gavs ingen behandling. Kycklingarna avlivades efter 21 dagar.

## Material och metoder

### Djur och lokaler

Undersökningen genomfördes i djurhuset vid SVA efter godkännande av Uppsala djurförsöksetiska nämnd (C 260/4). Daggamla kycklingar inköptes från Väderstads slaktkycklingkläckeri. Prov av träck från transportlådan var för båda leveranserna negativa med avseende på VRE vid bakteriologisk odling enligt nedan. Inte heller i det foder som användes påvisades VRE.

Fåglarna hölls på betonggolv med kutterspån i boxar med en yta av cirka 1m<sup>2</sup>. Kycklingarna hade fri tillgång till vatten (”klocka”), fri tillgång till kommersiellt kycklingfoder utan coccidiostatika i automat och gavs vitamintillskott vid några tillfällen under försökstiden. I varje box fanns värmelampa. Rummen i djurhuset utgör separata epidemiologiska enheter med separat ventilation mm och i varje rum användes separata skyddskläder. Mellan Förstudie och Försök rengjordes och desinficerades utrymmena enligt djurhusets ordinarie rutiner med Virkon<sup>®</sup>.

När Förstudie respektive Försök avslutades avlivades fåglarna genom injektion av avlivningsvätska intravenöst. Fåglarna obducerades därefter och blindtarmar insamlades för provtagning.

### Kultur för kontaminering av boxmiljö

För kontaminering av boxmiljön valdes en VRE-stam (EK 42/01) isolerad vid SVA år 2001 från blindtarmsinnehåll från en svensk slaktkyckling. Stammen har ett antibiogram och ett mönster vid biokemisk subtypning med PhenePlate<sup>™</sup> som överensstämmer med majoriteten av de VRE som isolerats vid SVA åren 2000-2003. Stammen bär *vanA* genen.

För beredning av suspension för kontamination, renodlades stammen på blodagar. Därifrån togs 5-10 kolonier till 10 mL Mueller-Hinton buljong och inkuberades i 37 °C i 18 h. Förundersökningar visade att kulturens koncentration efter 18 h var  $2-3 \times 10^8$  CFU/mL. Från kulturen bereddes, i fysiologisk NaCl, suspensioner om 100 mL med den mängd bakterier som i Förstudie och Försök skulle sprayas i boxarna (Tab V och VI). Suspensionerna bereddes cirka 2 h innan de sprayades på golvytorna.

### Probiotika/tarmflorekultur

Probiotika (Lactiferm L-50, *Enterococcus faecium* M74<sup>®</sup>) tillhandahölls av Medipharm AB, Kågeröd, Sverige. Enligt anvisning från tillverkaren tillfördes produkten via vatten under hela försökstiden i en koncentration av  $10 \times 10^9$  CFU/L under dag 1-14 och därefter i en koncentration av  $12 \times 10^9$  CFU/L.

”Tarmflorekultur” (Broilact<sup>®</sup>) tillhandahölls av Orion Corporation, Turku, Finland. Enligt tillverkaren utgörs produkten av: ”A preparation of selected microflora, such as is normally present in the intestine of adult fowl.” Enligt tillverkarens anvisningar löstes den frystorkade produkten i vatten och sprayades över kycklingarna före insättning och gavs sedan via vatten under tre dagar.

### Provinsamling

Se Tab VI och VII.

### Bakteriologisk odling

Kontaminationsgraden på golv och väggar i boxarna undersöktes med ”tryckplattor” med en yta av 14,3 cm<sup>2</sup> (SlaBa, med vankomycin 32 mg/L) enligt Tab V och VI. Plattorna inkuberades i 48 h i 37 °C varefter kolonier morfologiskt överensstämmande med enterokocker räknades. Kontaminationsgraden beräknades som antal CFU/m<sup>2</sup>.

Prov av träck/blindtarmsinnehåll (cirka 5 g) spädades i fysiologisk NaCl 1:10, 1:100 och 1:1000. Från spädningarna spreds 0,1 ml på SlaBa med vankomycin (16 mg/L). Efter inkubering i 48 h i 37 °C räknades kolonier av presumtiv typ. Representativa kolonier renodlades på blodagar och på bile-esculinagar. Från dessa kulturer identifierades presumtiva kolonier som VRE efter undersökning av antibiotikakänsligheten med mikrodilutionsmetod (VetMIC<sup>™</sup>). Kolonityper bedömdes som VRE vid MIC mot vankomycin >128 mg/l.

För att kvantifiera det totala antalet enterokocker i prov av blindtarmsinnehåll odlades dessa prov i Försök 2 även på SlaBa utan tillsats av vankomycin och antalet kolonier av presumtiv typ räknades.

## Resultat och Kommentarer

### Försök 1 (förstudie)

Resultaten av förstudien presenteras i Tab V. Kontaminering av miljön med de tre doserna ( $1 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  och  $100 \times 10^6$  VRE per box) resulterade i att ytterst få bakterier återfanns på golvet när kontaminationsgraden undersöktes med tryckplattor efter 18 timmar. Detta var förvånande eftersom pilotundersökningar, i samma utrymmen som användes i försöket, visat på en högre överlevnad på golvet. I pilotstudien sprayades  $20 \times 10^6$  CFU VRE i 100 ml NaCl över  $1 \text{ m}^2$ . När kontaminationen på golvet undersöktes efter 18 timmar med samma typ av tryckplattor som användes i förstudien påvisades  $2 \times 10^4$  VRE/ $\text{m}^2$ . En möjlig orsak till att så få VRE återfanns på golvet i förstudien kan vara att det fanns rester av desinfektionsmedel (Virkon) på golvet.

Uppenbarligen var ändå kontaminationsgraden tillräcklig för att fåglarna i Grupp 2 och 3 skulle koloniseras. Inom en vecka påvisades VRE i samlingsprov av träck från båda dessa grupper och efter 14 dagar var alla samlingsprov och 100 respektive 70 % av individuellt undersökta fåglar positiva med avseende på VRE (Tab V). Dessutom påvisades VRE i tarminnehåll från två kycklingar ur Grupp 3 som dog dag 2 respektive dag 9. I tarminnehåll från en kyckling ur Grupp 2 som dog dag 6 påvisades däremot inte VRE.

Kontaminationsgraden i Grupp 1 var uppenbarligen inte tillräcklig eftersom samlingsprov av träck efter en vecka var negativt och VRE påvisades hos endast 1 av 10 fåglar efter 14 dagar. Med utgångspunkt från resultaten av förstudien valdes att använda  $10 \times 10^6$  CFU VRE som kontaminationsdos i Försök.

Tabell V. Försöksupplägg och resultat av Försök 1. För detaljer se text.

	Åtgärd	Grupp 1	Grupp 2	Grupp 3
Dag 0	Kontaminering av boxar med VRE	$1 \times 10^6$ CFU	$10 \times 10^6$ CFU	$100 \times 10^6$ CFU
Dag 1	Provtagning golv; 8 tryckplattor/box	Ingen växt av VRE	$\approx 1,4 \times 10^2$ CFU/ $\text{m}^2$	Ingen växt av VRE
	Insättning kycklingar	25 kycklingar	25 kycklingar	25 kycklingar
Dag 8	Samlingsprov av träck; 15 fåglar/grupp*	Inga VRE påvisade	$\approx 4 \times 10^6$ VRE/g	$> 10^7$ VRE/g
	Provtagning boxvägg; 4 tryckplattor/box	$\approx 7 \times 10^3$ VRE/ $\text{m}^2$	$\approx 10 \times 10^3$ VRE/ $\text{m}^2$	$> 10^5$ VRE/ $\text{m}^2$
Dag 14	Avlivning Blindtarmsinnehåll från 15 fåglar/grupp odlas individuellt Från resterande fåglar i varje grupp odlas blindtarmsinnehåll som samlingsprov i omgångar om fem.	<u>Samlingsprov:</u> VRE ej påvisad  <u>Individuella prov:</u> VRE i 1 av 10 prov	<u>Samlingsprov:</u> VRE påvisad i alla tre prov <u>Individuella prov:</u> VRE i 10 av 10 prov	<u>Samlingsprov:</u> VRE påvisad i alla tre prov <u>Individuella prov:</u> VRE i 7 av 10 prov

\*15 fåglar fördes temporärt till en papplåda, träck insamlad från lådan utgjorde samlingsprovet.

### Försök 2

Efter sprayning med totalt  $10 \times 10^6$  CFU VRE per box påvisades i Lactiferm och Broilact grupperna  $4-5 \times 10^4$  VRE/ $\text{m}^2$  på golvet efter 18 timmar (Tab VI). I kontrollgruppen påvisades  $2 \times 10^5$  VRE/ $\text{m}^2$ . Vid provtagning av boxväggarna en vecka efter insättning var kontaminationsgraden av samma storleksordning i de tre grupperna ( $3-4 \times 10^3$  CFU/ $\text{m}^2$ ). Detta tyder på att miljöerna i de tre boxarna inte skiljde sig påtagligt avseende kontaminationsgrad och att förutsättningarna i det avseendet var likartade.

Någon effekt av Lactiferm eller Broilact på kolonisationsgraden kunde inte visas vid provtagning en och två veckor efter insättning. VRE påvisades i samlingsprov av träck från samtliga grupper efter en vecka och efter två veckor var antalet VRE/g träck av samma storleksordning i de tre grupperna,  $1-3 \times 10^6$  VRE/g (Tab VI).

När försöket avslutades var andelen kycklingar koloniserade med VRE lägst i Kontroll, 10 av 25 fåglar (40 %). I gruppen som fått Lactiferm påvisades VRE hos 16 av 24 fåglar (66 %) och hos 23 av 26 fåglar (89 %) i gruppen som fått Broilact. Skillnaden i kolonisationsgrad är statistiskt signifikant mellan Kontroll och Broilact ( $P < 0,001$ ;  $\text{Chi}^2$ ) och mellan Lactiferm och Broilact ( $P < 0,05$ ;  $\text{Chi}^2$ ). Däremot är skillnaden mellan Kontroll och Lactiferm inte signifikant ( $P = 0,62$ ;  $\text{Chi}^2$ ). Resultaten talar inte för att vare sig Broilact eller Lactiferm tillförda på de sätt och i de doser som användes förhindrar kolonisation med VRE. Snarare antyder resultaten att kolonisationen skulle gynnas produkterna.

Totalantalet enterokocker i blindtarmsinnehåll när försöket avslutades var av samma storleksordning i de tre grupperna (Tab VII). Även totalantalet VRE, hos fåglar där bakterien påvisades, var av samma storleksordning i de olika grupperna även om antalet tenderar att vara högre i grupperna som fått Lactiferm eller Broilact. Även andelen VRE av enterokockerna tenderar att vara högre i dessa båda grupper.

Tabell VI. Försöksupplägg och resultat av Försök 2. För detaljer se text.

	Åtgärd	Kontroll Ingen behandling	Lactiferm Lactiferm i vatten hela försökstiden	Broilact Kycklingarna sprayas vid ankomst, i vatten 3 dagar
Dag 0	Kontaminering av boxar med VRE	10 x 10 <sup>6</sup> CFU	10 x 10 <sup>6</sup> CFU	10 x 10 <sup>6</sup> CFU
Dag 1	Provtagning golv; 8 tryckplattor/box	≈20 x 10 <sup>4</sup> VRE/m <sup>2</sup>	≈5 x 10 <sup>4</sup> VRE/m <sup>2</sup>	≈4 x 10 <sup>4</sup> VRE/m <sup>2</sup>
	Insättning kycklingar	25 kycklingar	24 kycklingar	26 kycklingar
Dag 7	Samplingsprov av träck, 15 fåglar/grupp*	VRE påvisad	VRE påvisad	VRE påvisad
	Provtagning boxvägg; 4 tryckplattor/box	≈3 x 10 <sup>3</sup> VRE/m <sup>2</sup>	≈4 x 10 <sup>3</sup> VRE/m <sup>2</sup>	≈4 x 10 <sup>3</sup> VRE/m <sup>2</sup>
Dag 14	Samplingsprov av träck; 15 fåglar/grupp*	≈3 x 10 <sup>6</sup> VRE/g	≈1 x 10 <sup>6</sup> VRE/g	≈2 x 10 <sup>6</sup> VRE/g
Dag 21	Avlivning Blindtarmsinnehåll odlas individuellt från 25 fåglar/grupp	VRE i 10 av 25 prov	VRE i 16 av 24 prov	VRE i 23 av 26 prov

\*15 fåglar fördes temporärt till en papplåda, träck insamlad från lådan utgjorde samlingsprovet.

Tabell VII. Totalantal (geometriskt medelvärde) och range för totalantal enterokocker och VRE i blindtarmsinnehåll dag 21 i de olika grupperna i Försök 2, samt ratio totalantal VRE/totalantal enterokocker (aritmetiskt medelvärde).

Grupp	Totalantal enterokocker (CFU/g)		Antal VRE i positiva prov (CFU/g)		Ratio: VRE/enterokocker	
	Medel	Range	Medel	Range	Medelvärde/Median	Range
Kontroll (n=25)	1,1 x 10 <sup>6</sup>	0,4 – 10 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	0,2 – 5 x 10 <sup>5</sup>	0,12/0,08	0,03-0,33
Lactiferm (n=23)	1,9 x 10 <sup>6</sup>	1,0 – 3,0 x 10 <sup>6</sup>	3,8 x 10 <sup>5</sup>	0,5 – 20 x 10 <sup>5</sup>	0,40/0,39	0,02-1,00
Broilact (n=26)	4,9 x 10 <sup>6</sup>	1,0 – 10 x 10 <sup>6</sup>	5,3 x 10 <sup>5</sup>	0,5 – 20 x 10 <sup>5</sup>	0,22/0,10	0,01-1,00

## Diskussion

Fältstudien visade att VRE är spridd i stallmiljön på de anläggningar där bakterien förekommer och alla avdelningar måste betraktas som kontaminerade. Förekomst i ut- och inluftsdon tyder på att bakterien cirkulerar i luften och därmed troligen finns på flertalet ytor i djurutrymmena. Anläggningarnas smittskyddsbarriärer hindrar inte att VRE sprids ut från djurutrymmena eftersom bakterien påvisades på dörrhandtag utanför djurutrymmen.

Undersökningen visar också att rengöring/desinfektion enligt ordinarie rutiner inte eliminerar VRE från miljön i djurutrymmet och att nyinsatta fåglar förmodligen koloniserar av kvarvarande bakterier. Förekomst av VRE i stallmiljön efter rengöring har också visats i danska och norska undersökningar och författarna konkluderar att det är dessa persisterande bakterier som koloniserar nyinsatta kycklingar (Heuer *et al.*, 2002b, Borgen *et al.*, 2000b).

I de anläggningar där VRE inte tidigare påvisats, isolerades inte bakterien vare sig från miljöprov eller från träck. VRE förekommer alltså inte i den normala bakteriefloren hos kycklingar eller i miljön i djurutrymmen. Detta tyder på att VRE introducerats till de svenska besättningar där de förekommer och inte är en rest från 80-talet när användningen av avoparcin selekterade för VRE. Majoriteten av de svenska anläggningarna för uppfödning av slaktkyckling är dessutom byggda efter avoparcinförbudet, vilket gör det än mindre troligt att VRE hos svensk slaktkyckling har sin grund i bruket av avoparcin för 20 år sedan. Andelen svenska anläggningar där VRE förekommer har ökat under de senaste fem åren (SVARM 2000-2004) vilket styrker att det under svenska förhållanden är fråga om en spridning av VRE.

Majoriteten av VRE-isolaten i undersökningen har samma antibiogram och biokemisk subtyp som tidigare isolat från svensk slaktkyckling. De isolat som undersökts med PFGE har också i huvudsak ett likartat mönster. Detta talar för en klonal spridning. I Danmark är situationen annorlunda och flera olika VRE-kloner förekommer hos slaktkyckling (Aarestrup 2000, Hammerum *et al.* 2002, Heuer *et al.* 2002b). Avoparcin användes fram till senare delen av 90-talet i Danmark varför de kloner som förekommer troligen är en kvarleva från den tiden.

Mycket talar alltså för att VRE introducerats till anläggningar i Sverige. Hur detta skett/sker är oklart men VRE har inte påvisats hos föräldradjur, i miljön på kläckerier eller på foderfabriker (SVA Rapport, 2003). Inte heller norska och danska undersökningar har givit belägg för spridning från dessa källor (Borgen *et al.*, 2000b, Heuer *et al.*, 2002b). En annan möjlig spridningsväg, som bland annat diskuterats i Norge (Sörum *et al.*, 2004) är utrustning för slaktuttag. Vår undersökning visade att VRE, med samma PFGE-mönster som isolat från anläggningarna, finns på lasttruckar som används vid uttag för slakt. Bakterien finns troligen även på annan utrustning som används vid slaktuttag. VRE förs alltså mellan anläggningar men vilken betydelse detta har kan inte avgöras utifrån de gjorda undersökningarna. Sannolikt måste en introduktion vara av en sådan omfattning att VRE i tillräcklig mängd finns kvar när nästa omgång fåglar sätts in i djurutrymmet. Sannolikheten för detta torde vara störst vid uttagsslakt då kolonisation av de fåglar som är kvar i avdelningen skulle kunna ge en uppförökning av bakterien till en nivå som kontaminerar miljön i djurutrymmet i tillräcklig utsträckning.



Användningen av tarmflorekultur har varit ett framgångsrikt sätt att begränsa förekomst av *Salmonella* spp. i fjäderfäproduktionen (Wierup *et al.*, 1987). Försöket att med probiotika eller tarmflorekultur förhindra eller minska graden av VRE kolonisation av fåglar som sätts in i miljöer där bakterien finns, tyder däremot inte på att förekomsten av VRE skulle kunna begränsas på detta sätt. Resultaten tolkas skall dock med försiktighet eftersom undersökningen endast omfattade en försöksomgång och ett begränsat antal fåglar.

Försöksmodellen var framgångsrik i så motto att kycklingarna koloniserades av VRE från bakterier i miljö. Resultaten av förstudien tyder på ett samband mellan kontaminationsgrad och kolonisationsgrad. Efter ytterligare utveckling kan modellen vara användbar i studier av epidemiologin bakom förekomst av VRE hos slaktkyckling. Möjliga tillämpningar är studier av olika VRE kloners egenskaper med avseende på överlevnad i miljön, deras förmåga att kolonisera tarmkanalen hos kycklingar i konkurrens med andra enterokocker samt effekten av desinfektionsmedel. Betydelsen av antibiotikaanvändning för kolonisationsgraden skulle också kunna studeras.

I vilken utsträckning modellen efterliknar verkliga förhållanden i produktionsbesättningar är svårt att bedöma. Möjligen var kontaminationsgraden i boxarna högre än i produktionsbesättningar. Några uppgifter om verklig kontaminationsgrad i produktionsbesättningar finns inte, men den kan förmodligen variera avsevärt såväl mellan avdelningar som inom en avdelning. Orienterande undersökningar i svenska besättningar, med tryckplattor av samma typ som användes i studien, tyder på en lägre kontaminationsgrad än den i försöket. Hos kycklingarna i infektionsmodellen var dock antalet VRE i blindtarmsinnehåll efter 3 veckor ( $1-5 \times 10^5$  CFU/g) jämförbart med antalet i träck från kycklingar i norska produktionsbesättningar ( $7-30 \times 10^5$  CFU/g) (Sörum *et al.*, 2004). I den norska undersökningen var totalantalet enterokocker i kycklingträck dock högre än i vår försöksmodell och därmed andelen VRE, 0,005-0,023, lägre.

I Försök 2 var andelen kycklingar koloniserade med VRE lägst i kontrollgruppen. Detta kan möjligen bero på att förhållandena i de tre grupperna inte var lika avseende kontaminationsgrad även om provtagningarna med tryckplattor tyder på att antalet VRE i miljön var lika i grupperna. I kontrollgruppen var också andelen kycklingar som koloniserades med VRE lägre (40 %) än i gruppen i förstudien (100 %) som utsattes för en liknande kontaminationsgrad. Skillnaden kan bero på att kycklingarna i Försök 1 och Försök 2 kom från olika kläckningar och därför inte hade en likvärdig tarmflora vid insättningen. En antydning om att så var fallet är att andelen fåglar med subklinisk gulsäcksinflammation var hög i Försök 1 och tre kycklingar dog medan gulsäcksinflammationer inte observerades i Försök 2 och ingen fågel dog.

## Resultatförmedling

Eftersom studien nyligen slutförts har inga resultat publicerats än. Preliminära resultat från projektet har dock presenterats i föredrag vid Stiftelsen Veterinär Fjäderfäforsknings årsmöte på SVA, mars 2005 och vid Svensk Fågel ABs stämma i Lund april 2005. Delar av studien kommer också att presenteras vid 2<sup>nd</sup> International ASM Conference on Enterococci i Elsinore, Danmark, augusti 2005.

Resultaten kommer att sammanställas för publicering i internationell tidskrift med refereesystem, t.ex. Applied and Environmental Microbiology.

## Referenser

Aarestrup, F. M. Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: Genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. *J Clin Microbiol.* 2000, 38:2774-2777.

Bonten, M. J. M., Willems, R. & Weinstein, R. A. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet* 2001, 1:314-325.

Borgen, K., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A., Wasteson, Y., Olsvik, Ö. & Kruse, H. Continuing high prevalence of vanA-type vancomycin-resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned. *J Appl Bacteriol* 2000a, 89:478-485.

Borgen, K., Sörum, M., Kruse, H. & Wasteson, Y. Persistence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) on Norwegian broiler farms. *FEMS Microbiol Lett.* 2000b, 191:255-258.

Devriese, L.A., Pot, B. & Collins, M.D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J Appl Bacteriol.* 1993, 75:399-408.

Dutka-Malen, S., Evers S. & Courvalin, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995, 33:24-27.

Goossens, H., Jabes, D., Rossi, R., Lammens, C., Privitera, G. & Courvalin, P. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and *in vitro* susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2003, 51, Suppl. S3 iii5-iii12.

Hammerum, A. M., Fussing, V., Aarestrup, F. M. & Wegener, H. C. Characterization of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* isolates from humans, chickens and pigs by RiboPrinting and pulsed field gel electrophoresis. *J Antimicrob Chemother.* 2000, 45:677-680.

Heuer, OE., Pedersen, K., Andersen, JS. & Madsen, M. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in broiler flocks 5 years after the avoparcin ban. *Microb Drug Resist.* 2002a, 8:133-138.

Heuer, O. E., Pedersen, K., Jensen, L. B., Madsen, M. & Olsen, J. E. Persistence of Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in broiler houses after the avoparcin ban. *Microb Drug Res.* 2002b, 8:355-361.

Kühn, I., Burman, LG., Haeggman, S., Tullus K., & Murray, BE. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. *J Clin Microbiol.* 1995, 33:2812-2817.

Murray, BE., Singh, KV., Heath, JD., Sharma, BR. & Weinstock, GM. Comparison of genomic DNA of different Enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J Clin Microbiol.* 1990, 28:2059-2063.

SVARM 2000-2004, Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden. [www.sva.se](http://www.sva.se). ISSN 1650-6332.

SWEDRES 2003, The Swedish strategic programme for the rational use of antimicrobial agents (STRAMA) and the Swedish institute for infectious disease control. Ed; Cars, O and Ekdahl, K. ISSN 1400-3473.

SVA Rapport. Vankomycinresistenta enterokocker (VRE) i slaktkycklingbesättningar. National Veterinary Institute. 2003.

Sörum, M., Holstad, G., Lillehaug, A. and Kruse, H. Prevalence of vancomycin resistant enterococci on poultry farms established after the ban of avoparcin. *Avian Diseases.* 2004, 48:823-828.

Wierup, M., Wold-Troell, M., Nurmi, E. & Häkkinen, M. Epidemiological evaluation of the Salmonella-controlling effect of a nationwide use of a competitive exclusion culture in poultry. *Poultry Science.* 1987, 67:1026-1033.