

Vankomycinresistenta enterokocker (VRE) hos slaktkyckling i konsumtionsledet

Christina Greko och Björn Bengtsson, Avd för antibiotika, Statens veterinärmedicinska anstalt, Uppsala

Mål för studien

Studien har syftat till att kartlägga förekomst av vankomycinresistenta enterokocker (VRE) i de produkter som kommer konsumenten tillhanda. De specifika frågeställningar som studien skulle besvara var:

- Hur stor andel av svenskproducerade slaktkycklingar i konsumtionsledet är kontaminerade med VRE, och vilken är kontaminationsgraden?
- Hur stor andel av importerade slaktkycklingprodukter är kontaminerade med VRE, och vilken är kontaminationsgraden?

Sammanfattning och slutsats

- Andelen av kycklingfiléer där VRE kunde påvisas med känslig metodik var 14% för filéer producerade i Sverige, och 36% för filéer som packats i annat land än Sverige. En mycket stor andel av de positiva proverna i det importerade materialet kom från en enda anläggning.
- Endast från ett prov påvisades VRE med en mindre känslig metod (utan anrikning) och kontaminationsgraden bedöms därför som låg i båda grupperna.
- De VRE som isolerades från svenska kycklingfiléer var alla av arten *E. faecium* och av samma resistensfenotyp som de som isoleras från svenska kycklingar och kycklingstallar. I det importerade materialet förekom flera arter och många olika resistensfenotyper. Detta stämmer väl med tidigare observationer, och talar för att epidemiologin i Sverige är skild från den i länder där avoparcin tidigare använts.

Slutsats: VRE kan påvisas på både svenska och importerade kycklingfiléer. Kontaminationsgraden är för båda grupperna låg.

Bakgrund

Vankomycin är ett ”sista linjens” antibiotikum som används för behandling av människor med infektioner orsakade av stafylokokker eller enterokocker i situationer när andra substanser, pga. resistensutveckling inte längre är verksamma. Om resistens mot vankomycin hos sjukdomsframkallande bakterier blir utbredd kan det få allvarliga konsekvenser. Bland enterokocker förekommer redan förvärvad vankomycinresistens i ökande omfattning i sjukhusmiljöer. Enterokocker tillhör den normala tarmfloran men kan under speciella omständigheter förorsaka sjukdom individer med nedsatt motståndskraft (Patel, 2003).

Den vikt som fästs vid vankomycinresistens illustreras av att fynd av VRE inom humansjukvården är anmälningspliktigt i Sverige sedan år 2000. VRE isoleras sällan i prov från människor i Sverige (Torell *et al.* 1999, SWEDRES 2001). Däremot är förekomst av, och infektioner med, VRE inte ovanligt hos människor i många andra länder i Europa (Goosens *et al.* 2003). Från Nederländerna rapporteras t.ex. att bakterien förekom hos 12 och 3 % av friska människor åren 1996 respektive 1999 (Bruinsma *et al.* 2003).

Hos animalieproducerande djur förekommer VRE endemiskt i många länder i Europa (Bonten *et al.* 2001). Förekomsten har kunnat kopplas till användning av avoparcin, ett antibiotikum som använts i tillväxtbefrämjande syfte i animalieproduktionen (t.ex. Klare *et al.* 1995). Inom EU förbjöds därför användning av avoparcin till djur 1997, vilket resulterat i att förekomsten av VRE hos animalieproducerande djur har minskat. I Sverige har preparatet inte använts sedan 1982.

Förekomsten av vankomycinresistenta enterokocker (VRE) hos svensk slaktkyckling är låg sett ur ett internationellt perspektiv. När prover undersöks med den konventionella odlingsmetodik som är standard i övervakningsprogram är endast ett fåtal av undersökta prover positiva. Inom svensk veterinär antibiotikaresistensmonitorering (SVARM) har också prover undersökts med en känsligare

metod (selektiv odling). Vid dessa undersökningar har frekvensen VRE-positiva prover från svenska kycklingar ökat påtagligt från år 2000 (<1%) till år 2004 (36%). Detta är lägre än i många andra Europeiska länder. I danska och norska undersökningar har andelen slaktkycklingflockar där VRE påvisats med selektiv teknik varit > 70 % vid produktionsanläggningar där avoparcin tidigare använts (Kruse *et al.* 1999; Borgen *et al.* 2000; Heuer *et al.* 2002).

Vid slakt kan slaktkroppen förorenas med tarmbakterier, och alltså även med VRE. Enterokocker är i viss utsträckning djurartspecifika, och kycklingenterokocker har troligen en dålig förmåga att kolonisera människa (Bonten *et al.* 2001). Försök där frivilliga försökspersoner intagit VRE isolerade från kyckling visar dock att bakterien kan klara sig i människors tarmkanal i över 14 dagar (Sörensen *et al.* 2001). Under denna tid kan det genpaket som kodar för vankomycinresistens överföras till människans egna enterokocker. Därigenom skapas en reservoar av VRE hos människor ute i samhället. Ju större denna reservoar är, desto större är risken att VRE förs in på sjukhusavdelningar där svårt sjuka patienter, mottagliga för VRE infektioner, vårdas (Bonten *et al.* 2001). Det är därför av stort intresse att minimera förekomsten av VRE i livsmedel, och det är av detta skäl som EG kommissionen 1997 förbjöd användning av avoparcin inom den europeiska gemenskapen.

Efter förbudet mot avoparcin har förekomsten av VRE i köttprodukter minskat i samma takt som förekomsten i tarminnehåll från djur. Vid icke selektiv odling var förekomsten av VRE i kycklingprodukter i Danmark och Norge under de senaste åren legat på ett par procent (DANMAP 2002; NORM-VET 2002). I USA var samtliga 240 undersökta *Enterococcus* spp. isolerade från kycklingkött var känsliga för vankomycin (Angulo *et al.* 2000). I USA har avoparcin aldrig använts inom animalieproduktionen. I två svenska undersökningar från 1990-talet påvisades inte VRE från kycklingkött eller nackskinn.

Liksom för tarmprover är den rapporterade prevalensen av VRE för kycklingkött betydligt högre om känsligare, selektiva metoder använts. För länder där avoparcin tidigare använts varierar den rapporterade prevalensen efter selektiv odling mellan 16% och 81% (DANMAP 1997; Wegener *et al.* 1997; Klare *et al.* 1999; Pavia *et al.* 2000; Robredo *et al.* 2000; Borgen *et al.* 2001). Den stora variationen förklaras troligen till viss del av skillnader i metodval, samt av att antalet undersökta prover i flera studier är mycket lågt.

Kvantitativa undersökningar från Norge har visat att antalet VRE per gram kycklingkött tre år efter avoparcinförbudet är betydligt lägre än innan förbudet (Borgen *et al.* 2001). Risken för att människor ska koloniseraras med VRE anses därigenom ha minskat betydligt.

För en bedömning av betydelsen av den ökade prevalensen hos levande kycklingar i Sverige är det angeläget att undersöka i vilken utsträckning som bakterierna återfinns på den produkt som när konsumenten. Eftersom en ökande andel av kycklingprodukter på den svenska marknaden idag inte är producerade i Sverige måste även läget avseende dessa kartläggas.

Material och Metoder

Materialinsamling

Under senhösten 2004 och våren 2005 inköptes förpackningar med fryst hel kycklingfilé i butiker i och kring Uppsala, i norra Stockholmsområdet samt Örebro och Småland. Obehandlade eller s.k. saltvattenmarinerade produkter, eventuellt med stabiliseringsmedel (t ex E 450, E450b, E451, E452) inkluderades, men inte produkter som marinerats med kryddor. För att så långt möjligt säkerställa att så många slakomgångar som möjligt inkluderades skedde urvalet så att ett givet "bäst-före datum" endast inkluderades en gång för varje anläggningsnummer. Förpackningarna med kycklingfiléerna förvarades i frys (-20° C) till undersökning.

Insamlingen omfattade 101 förpackningar svenskproducerade filéer och 100 producerade i annat land. Vid sammanställning av data upptäcktes 4 dubletter avseende "bäst-före datum" i respektive grupp. Den senast inköpta förpackningen i varje sådant dubletterpar uteslöts från resultatsammanställningen. Det slutliga antalet filéer i undersökningen var därför 97 respektive 96.

Bakteriologiska undersökningar

En undersökningsmetod baserad på den sköljmetod för hela slaktkroppar som beskrivs i *NMKL No. 119 2a utg.* utarbetades och utprovades i pilotförsök. Sköljmetoden är utformad för campylobacter, och har tidigare med bra resultat använts vid Livsmedelsverket i samband med olika studier.

Från varje förpackning uttogs med sterila instrument en filé som överfördes till en kraftig plastpåse (stomacherpåse). Efter upptining tillsattes 100 ml buffrat peptonvatten till påsen som tillslöts och roterades försiktigt i 1-2 minuter så att hela filén väl sköljdes. Sköljvätskan kom därmed att inkludera ytkontamination och eventuella bakterier i den vätska som avgått vid upptining.

Från sköljvätskan odlades 0,1 mL till odling direkt på Slanez Bartley agar med vancomycin (16 mg/L). Agarplattorna inkuberades i 48h i 37° C.

Dessutom uttogs 25 mL sköljvätska som sattes till 25 mL koncentrerad (2x) anrikningsbuljong (Enterococcosel). Buljongen inkuberades över natt i 37° C varefter 0,1 mL odlades på Slanez Bartley agar med vancomycin (16 mg/L) i 24h i 37° C.

Efter odling avlästes agarplattorna avseende enterokockliknande kolonier. Misstänkta kolonityper renpreps till blodagar och gall-eskulinagar, och presumptiva VRE från varje positivt prov undersöktes avseende känslighet för vankomycin och ett antal andra antibiotika med ackrediterad mikrodilutionsmetod (VetMIC™) och identifierades till art enligt Devriese *et al.* (1993) med följande biokemiska tester: mannitol, sorbitol, arabinos, sackaros, ribos, metyl-alfa-D-glucopyranosid och raffinosa. Som VRE bedömdes enterokocker för vilka minsta hämmande koncentration (MIC) av vancomycin var >16 mg/L.

Resultat

De svenska kycklingfiléerna var packade vid 7 olika anläggningar, och de importerade vid 12 olika anläggningar, varav 5 danska (82 filéer), 5 nederländska, en polsk och en kroatisk.

Endast från ett prov (importerad filé) påvisades VRE i odling utan buljonganrikning, och då endast som en enda koloni.

Efter anrikning var 14/97 (14%) svenska filéer positiva avseende VRE, jämfört med 35/96 (36%) importerade. Skillnaden är statistiskt signifikant ($p < 0,01$). En anläggning i det importerade materialet var kraftigt överrepresenterad avseende positiva prover. Om de 24 proverna från denna anläggning utesluts var andelen VRE positiva prover i det importerade materialet 22%, vilket inte är signifikant skilt från andelen i det svenska materialet.

De VRE som isolerades från svenskt material var samtliga 14 *Enterococcus faecium*. I det importerade materialet förekom fler arter, 25 var *E. faecium*, 6 *E. durans*, 2 *E. hirae* och 2 kunde inte identifieras till artnivå.

Nästan alla isolat (13/14) av *E. faecium* från svenska filéer var av samma resistensfenotyp som tidigare påvisats hos svensk slaktkyckling (Tabell). Isolatet från importmaterialet fördelade sig på 9 olika typer, där två dominerade, och endast ett isolat i hade samma resistensfenotyp som det som vanligen påvisas hos svensk kyckling.

Tabell. Resistensfenotyp för vancomycinresistenta *Enterococcus faecium* från svenska och importerade kycklingfiléer.

| | Resistensfenotyp ^a | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------------------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|------------|-------------|-------------|----------|
| | Va >16 | Em >4 | Fl >32 | Na >2 | Av >32 | Tc >8 | Ba >32 | Vi >8 | Am >8 | Nm >512 | Gm >1024 | Sm >1024 | Cm >8 |
| Svensk | 13 | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | 1 | R | S | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Import | 10 | R | S | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | 7 | R | S | R | R | S | S | R | S | S | S | S | S |
| | 2 | R | S | S | R | S | S | R | S | S | S | S | S |
| | 1 | R | S | R | R | S | R | S | S | S | S | S | S |
| | 1 | R | S | S | R | S | R | S | S | S | S | S | S |
| | 1 | R | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S |
| | 1 | R | R | S | R | S | S | R | S | S | S | S | S |
| | 1 | R | R | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | 1 | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S |

^a Va = vankomycin; Em = erythromycin; Fl = flavomycin; Na = narsin; Av = avilamycin; Tc = tetracyklin; Ba = bacitracin; Vi = virginiamycin; Am = ampicillin; Gm = gentamicin; Nm = neomycin; Sm = streptomycin; Cm = kloramfenikol. Brytpunkter för resistens (mg/mL är angivna). R = resistent, S = sensitiv.

Diskussion

Av vikt för att bedöma konsumentens exponering för VRE via kycklingkött är dels hur ofta VRE förekommer på kycklingkött, dels hur många bakterier som förekommer på varje filé om bakterien alls kan påvisas.

Andelen av kycklingfiléer där VRE kunde påvisas var 14% för filéer producerade i Sverige, och 36% för filéer som packats i annat land än Sverige. Skillnaden var statistiskt signifikant, men en mycket stor andel av de positiva proverna i det importerade materialet kom från en enda anläggning. Skillnaden avseende VRE-förekomst mellan svensk och importerad filé bör därför tolkas med stor försiktighet.

Graden av kontamination, dvs. hur många bakterier som förekommer på varje positiv filé, bedöms säkrast för odlingar där bakterien inte först anrikats. Den teoretiska detektionsgränsen för odlingsmetoden utan anrikning var 1000 kolonibildande enheter (CFU) per filé. Om man antar att all kontamination är på ytan av köttet ger detta en gräns motsvarande 5-10 CFU/g. Endast från ett prov påvisades VRE utan anrikning, och då endast som en enda bakteriekoloni. Den teoretiska detektionsgränsen för den känsligare metoden med buljonganrikning är svårare att bedöma, men uppskattas till i storleksordningen 40-400 CFU per filé.

Baserat på detta resonemang bedöms kontaminationsgraden för de positiva proverna av både svensk och importerad kycklingfilé som låg, motsvarande <1000 CFU/filé eller <5-10 CFU/g.

I en norsk studie (Borgen *et al*, 2001) undersöktes fjäderfäkött från uppfödningar som före 1995 använt respektive inte använt avoparcin som tillväxtbefämjande medel. Från tidigare exponerade besättningar påvisades VRE i 30% av proverna, men samtliga prover från oexponerade uppfödningar var negativa. Odlingsmetoden hade en detektionsgräns på 100 CFU/g kött. Efter anrikning av prover om 5 g var 81 respektive 9 % av proverna positiva. Siffran för de oexponerade uppfödningarna stämmer väl med den för svensk kycklingfilé. I den norska studien var detektionsgränsen för odling utan anrikning 100 CFU/g, varför prover som var positiva endast efter anrikning kan antas varit kontaminerade med <100CFU/g.

De VRE som isolerades från svenska kycklingfiléer var alla av arten *E. faecium* och av samma resistensfenotyp som de som isoleras från svenska kycklingar och kycklingstallar. I det importerade materialet förekom flera arter och många olika resistensfenotyper. Detta stämmer väl med tidigare observationer, och talar för att epidemiologin i Sverige är skild från den i andra länder där avoparcin tidigare använts.

De filéer som undersökts samlades in genom att de inköptes i butiker i olika områden, främst från Uppsala och norra Stockholmsområdet. Avsikten var ursprungligen att ta in material från grossistledet, men detta visade sig inte genomförbart. Den del av studien som avsåg produkter packade i icke-EU länder fick därför strykas. Detta innebär att studien endast speglar situationen för icke kryddmarinerad kycklingfilé i dagligvaruhandeln.

Projektansökan omfattade även konfirmering av vancomycinresistens med molekylärbiologisk metodik (PCR), biokemisk subtypning och genotypsisk subtypning med restriktionsklyvning följt av pulsfält-gel-elektrofores (PFGE). Dessa delar har inte kunnat genomföras, bl.a. på grund av att provinsamligen varit mycket tidskrävande och genom kravet på olika "bäst före datum" för varje anläggningsnummer utdragen i tiden. Resultaten från resistensfenotypning talar dock klart för att vancomycinresistensen kodas för av genen *vanA*, samt att isolaten från det svenska materialet liksom isolat från kycklingar och kycklingstallar är mycket nära besläktade (klonala) vilket uppenbart inte isolaten från importerad kyckling är. Ett enda isolat från den senare gruppen uppvisade samma resistensfenotyp som huvudtypen i Sverige. Isolerade enterokocker har sparats och vidare undersökningar kan vid behov genomföras senare i samband med andra studier.

Slutsats: VRE kunde påvisas på både svenska och importerade kycklingfiléer. Kontaminationsgraden är för båda grupperna låg.

Resultatförmedling

Eftersom studien nyligen slutförts har inga resultat publicerats än. Preliminära resultat från projektet har dock presenterats vid ett seminarium i anslutning till presentation av SVARM 2004 i juni 2005. Resultaten kommer att sammanställas för publicering i internationell tidskrift.

Kommentar till den ekonomiska redovisningen

Jämfört med den ursprungliga ansökan har studien förändrats på två sätt:

- 1) Kycklingar inköptes i butik istället för att som avsikten var (kostnadsfritt) insamlas via grossister. Detta har lett till ökade kostnader främst i form av arbetstid.
- 2) Molekylärbiologisk och biokemisk subtypning har inte utförts vilket lett till lägre kostnader avseende material och arbetstid för denna post.

Nedan ges därför en reviderad detaljerad kostnadsredovisning lämnas.

Materialkostnad

| | |
|--|--------------------------|
| • Utveckling och utprovning av lämplig metodik för selektiv odling av VRE från livsmedel | 2 000 SEK |
| • Selektiv odling och identifiering (201 prov à 80 SEK) | 16 080 SEK |
| • Undersökning av antibiotikakänslighet med VetMIC, 85 misstänkta VRE (à 100 SEK) | 8 500 SEK |
| • Inköp av kycklingar | 13 400 SEK |
| • Reseersättning | 525 SEK |
| <u>Delsumma material</u> | <u>40 775 SEK</u> |

Arbetskostnad

| | |
|---|---------------------------|
| • Laboratoriearbete mostvarande c:a 4 månadader BMA tjänst (inkl LKP) | 120 000 SEK |
| • <u>Total kostnad</u> | <u>160 505 SEK</u> |
| • <u>Förvaltningskostnad SVA (12 %)</u> | <u>19 293 SEK</u> |
| <u>Förbrukade medel</u> | <u>180 068 SEK</u> |

Referenser

- Angulo F, Marano N, Johnson S, Mackinson C, Gilbert L, Park M, Debess E, Taylor B, Madden J, Hill B, Joyce K, Tenover F, Archibald L, and the EIP Enterococci Study Team. EIP enterococci study: monitoring for the seeds of antimicrobial resistance in the food supply. 2nd International Conference on Emerging Infectious Diseases. Atlanta, GA, July 2000.
- 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*. 2000, 89:478-485.
- Borgen, K., Sörum, M., Wasteson, Y & Kruse, H. Van-A type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. *Int. J Food Microbiol*. 2001, 64:89-94.
- Bruinsma, N., Stobbering, E., de Smet, P. & van den Bogaard, A. Antibiotic use and the prevalence of antibiotic resistance in bacteria from healthy volunteers in the Dutch community. *Infection*. 2003, 31:9-14.
- DANMAP 1997 - Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. ISSN 1600-2032.
- DANMAP 2004 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. ISSN 1600-2032.
- Devriese, LA., Pot, B. and Collins, MD. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J Appl Bacteriol*. 1993, 75:399-408.
- Goosens, 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.

- Heuer, O. E., Pedersen, K., Andersen, J. S. & Madsen, M. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in broiler flocks 5 years after the avoparcin ban. *Microb Drug Res.* 2002, 8:133-138.
- Klare, I., Heier, H., Claus, H., Reissbrodt, R. & Witte, W. *vanA*-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiol Lett.* 1995, 125:165-172.
- Klare, I., Badstubner D. Konstabel, C. Bohme, G., Claus H., Witte, W. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community. *Microb Drug Resist.* 1999, 5:45-52.
- Kruse, H., Johansen, B. K., Rörvik, L. M. & Schaller, G. The use of avoparcin as a growth promoter and the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus* species in Norwegian poultry and swine production. *Microb Drug Res.* 1999, 5:135-139.
- NORM/NORM VET 2002. Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway. ISSN 1502-2307.
- Patel, R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother.* 2003, 51, Suppl. S3 iii3-iii21.
- Pavia, M., Nobile, C.G.A., Salpietro, L., Angelillo, I.F. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J of Food Protect.* 63, 912-915
- Robredo, B., Singh, K.V., Baquero, F., Murray, B.E., Torres, C. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *Int J of Food Microbiol.* 54, 197-204
- SVARM 2000, Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden, 2001. ISSN 1650-6332.
- SVARM 2004, Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden, 2005. ISSN 1650-6332.
- Sørensen, T.L. Blom, M., Monnet, D.L., Frimodt-Møller, N., Poulsen, R.L., Espersen, F., 2001. Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. *N Engl J Med.* 345, 1161-1166.
- Torell, E., Hoffman, B-M., Olsson-Liljequist, B, Cars, O. & Burman, L., G. Mear absence of VRE but high carriage rates of quinolone-resistant ampicillin –resistant enterococci among hospitalised patients and non-hospitalised individuals in Sweden. *J Clin Microbiol.* 1999, 37:3509-3513.
- Wegener, H.C., Madsen, M., Nielsen, N., Aarestrup, F.M. Isolation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from food. *Int J Food Microbiol.* 1997, 35:57-66.