

Orsaker till antibiotikaresistens hos tarmbakterier från kalvar i mjölkbesättningar

Översikt

I projektet undersöks samband mellan förekomst av resistent tarmbakterier hos mjölkkalvar och användningen av antibiotika. Särskild vikt har lagts vid om utfodring av kalvar med mjölk från kor som behandlats med antibiotika påverkar förekomsten av resistent bakterier hos kalvarna.

Avsikten är att klarlägga samband som kan vara underlag för rekommendationer för att minska förekomsten av resistens hos kalvarna. Ett exempel på en sådan rekommendation är hur mjölk från antibiotikabehandlade kor bör användas.

Projektet är ett fyraårigt doktorandprojekt som avslutas med att doktoranden disputerar i maj 2015. Här redovisas aktiviteter under de två första åren "Del I" (2011-2012) enligt projektansökan V1030056. Medel för doktorandprojektets avslutande år "Del II" (2013-15) har beviljats genom V1223008 och kommer att slutredovisas i juli 2015.

Projektledning

Projektet drivs från Avdelningen för Djurhälsa och Antibiotikafrågor vid SVA. Doktorand i projektet är veterinär Anna Duse.

Projektet leds av Docent Björn Bengtsson tillsammans med övriga sökande Professor Karin Persson Waller, VMD Ylva Persson och Professor Ulf Emanuelson. I ledningsgruppen ingår också VMD Helle Ericsson Unnerstad laboratorieveterinär vid SVA.

En referensgrupp är knuten till projektet. I gruppen ingår: Laborator Christina Greko, veterinär Maria Torsein, veterinär Torben Bennedsgaard och agronom och mjölkproducent Annica Lundgren. Projektgruppen samlades vid projektstarten februari 2011 och i januari 2013 för att diskutera uppnådda resultat och planlägga andra delen av projektet.

Bakgrund (för referenser se projektansökan)

I Sverige är resistensläget i såväl veterinär- som humanmedicin mer fördelaktigt än i de flesta andra länder. Inte minst är läget gott bland svenska nötkreatur där resistens är ovanlig hos bakterier som framkallar sjukdom i juver, luftvägar och klövar. Också hos tarmbakterier som *Escherichia coli* (*E. coli*) och enterokocker från friska svenska mjölkkor och ungnöt är resistens ovanligt.

Hos yngre kalvar är dock tarmbakterier som *E. coli* ofta resistent (okänsliga) mot antibiotika som används för behandling av både människor och djur. Eftersom resistensen ofta är överförbar är tarmbakterierna en reservoar för resistensanlag (gener) som kan föras över till bakterier som orsakar sjukdom hos djur och/eller människor.

Utländska undersökningar i mjölkbesättningar visar en liknande bild med en mycket hög andel resistens bland *E. coli* från kalvar under mjölkperioden och en mycket lägre förekomst bland äldre djur. Hos såväl svenska som utländska kalvar är resistens mot ampicillin, streptomycin, sulfa eller tetracyklin vanligast och resistens mot andra antibiotika förekommer i lägre frekvens.

Orsakerna till den höga förekomsten av resistens hos kalvar är flera men ett selektionstryck genom användning av antibiotika är av central betydelse eftersom det innebär att resistent bakterier gynnas (selekteras) på bekostnad av de som är känsliga.

En faktor som diskuterats är om unga kalvar utsätts för ett ”dolt” selektionstryck genom att de ibland utfodras med mjölk från kor som behandlats med antibiotika. Behandlade kor utsöndrar en del av tillförd antibiotika i mjölken och möjligen är koncentrationerna under behandlingen och delar av karenstiden för humankonsumtion så höga att resistenta bakterier i tarmfloran gynnas om mjölken ges till kalvar.

När mjölkkor i Sverige antibiotikabehandlas används i majoriteten av fallen bensylpenicillin och det är detta antibiotikum som kalvarna i huvudsak skulle kunna exponeras för om de ges mjölk från behandlade kor. Men *E. coli* är naturligt okänslig (resistent) mot bensylpenicillin som är ett antibiotikum med smalt spektrum. Dessutom inaktiveras detta antibiotikum i stor utsträckning vid passagen av löpmagen. Den selektiva effekten mot resistenta tarmbakterier hos kalvar genom rester av bensylpenicillin i mjölk från behandlade kor är därför sannolikt liten.

Antibiotika med bredare spektrum som också används till mjölkkor, som enrofloxacin, ceftiofur, streptomycin, tetracyklin och trimetoprim-sulfa, ger sannolikt ett större selektionstryck än bensylpenicillin. Selektionen kompliceras också av att *E. coli* kan förvärva resistens mot flera antibiotika, så kallad multiresistens. Användning av ett antibiotikum kan därför innebära att förekomsten av resistens mot en eller flera andra substanser också gynnas, så kallad ko-selektion.

Genomförda studier i Del I (Projektansökan V1030056)

Projektet har följt den plan som sattes upp i ansökningar.

Enkätundersökning – användning av mjölk från antibiotikabehandlade kor

Under våren 2011 gjordes en webbenkät om och hur mjölkproducenter använder mjölk från antibiotikabehandlade kor till kalvar. Enkäten gick ut till 1735 mjölkproducenter vilket är 33 % av landets alla mjölkproducenter.

Enkäten besvarades av 457 mjölkproducenter och visade att råmjölk från kor som behandlats med antibiotika vid sinläggningen ges till kalvarna på de flesta gårdar (89 %) medan något färre (85 %) använde övergångsmjölk från kor som antibiotikabehandlats vid sinläggningen.

Mjölk från kor som antibiotikabehandlas under laktationen användes som foder till kalvarna under den tid kon fortfarande behandlas på cirka hälften av gårdarna (56 %). En större andel gårdar (79 %) använder mjölken efter det att behandlingen avslutats men under karenstiden, innan den får levereras för human konsumtion. Bönderna var mindre benägna att använda mjölken från kor som behandlats för juverinflammation än om de behandlats för någon annan sjukdom.

Att använda mjölk från antibiotikabehandlade kor som foder var vanligare på konventionella gårdar än på ekologiska och vanligare i södra Sverige än i andra delar av landet. Det var mindre vanligt att använda sådan mjölk på gårdar med kall lösdrift än på gårdar med andra inhysningssystem.

Detta är den första studie som systematiskt undersökt hur mjölk från antibiotikabehandlade kor i svenska mjölkbesättningar används. Studien visar att kalvar i en stor andel av besättningarna sannolikt exponeras för rester av antibiotika via mjölk från behandlade kor.

Det finns endast ett fåtal liknande undersökningar från andra länder publicerade men rutinerna i England och Wales för användning av mjölk från behandlade kor liknar de i Sverige (Brunton et al., 2012). I Kanada och USA är däremot användningen av sådan mjölk mindre vanlig (USDA, 2007; Vasseur et al., 2010).

Resultaten från studien har presenterats på nationella och internationella konferenser och möten samt uppmärksammats i branschtidskrifter och publicerats i en vetenskaplig tidskrift (Duse et al., 2013) (se Resultatförmedling nedan).

Besättningsstudie - resistens i relation till användning av mjölk från behandlade kor

För att undersöka om exponering av kalvar för mjölk som kan innehålla rester av antibiotika ökar sannolikheten för resistens hos kalvarna gjordes en ny enkätundersökning. Enkäten sändes till de mjölkproducenter som i den tidigare enkäten anmält intresse för att vara med i en utökad studie och kombinerades med att varje djurägare sände in avföringsprov från tre kalvar för bakteriologisk undersökning. Studien påbörjades i augusti 2011 och slutfördes i december 2012.

Specifikt undersöktes om utfodring av kalvar med råmjölk och övergångsmjölk från sintidsbehandlade kor eller med mjölk från kor som behandlades under laktationen är riskfaktorer för resistens hos kalvarna. Betydelsen av antibiotikabehandling av kalvar och kor, kalvarnas ålder och besättningsfaktorer såsom besättningsstorlek, inhysningssystem och geografisk lokalisering undersöktes också. Avsikten var också att undersöka förekomsten (frekvensen) resistens hos tarmbakterien *E. coli* från friska kalvar under mjölkperioden.

Totalt deltog 243 besättningar i enkäten och prov från 756 kalvar i åldern 7-28 dagar undersöktes. Selektiv bakteriologisk odling av varje prov för förekomst av *E. coli* resistent mot streptomycin, tetracyklin eller cefotaxim visade att sådana bakterier fanns i 90 %, 49 % respektive 11 % av proven.

Undersökning av resistens hos ett slumpmässigt valt isolat av *E. coli* från varje prov visade att cirka hälften (48 %) av isolaten var resistenta mot minst ett antibiotikum. Vanligast var resistens mot streptomycin (40 %), sulfa (31 %), tetracyklin (23 %) och ampicillin (19 %). Cirka en fjärdedel av isolaten (27 %) var resistenta mot tre eller fler antibiotika.

Från nio kalvar isolerades *E. coli* med överförbar resistens av ESBL-typ vilket är första gången bakterier med sådan resistens påvisats hos nötkreatur i Sverige.

Analys av resultaten (multivariabel regression) från resistensundersökningarna i relation till enkätsvaren visade att användning av råmjölk från sintidsbehandlade kor inte ökade risken för resistens hos *E. coli* bakterier hos kalvarna. Användning av mjölk från kor som behandlats med antibiotika under laktationen ökade däremot risken för kinolon- eller streptomycinresistens hos *E. coli*-bakterier i kalvarnas tarmflora. Risken för kinolonresistens ökade ytterligare om korna behandlats med kinolonantibiotika (enrofloxacin).

Även andra faktorer såsom användning av DHS-tabletter till kalvar, användning av tetracyklin eller ceftiofur i besättningen liksom inhysning av kalvar och deras ålder men också gårdens geografiska lokalisering var förknippade med ökad förekomst av specifika resistenstyper.

Studien tyder på att förekomst av resistens hos tarmbakterier från kalvar beror av flera faktorer och visar att användning av mjölk från kor som behandlas under laktationen som foder åt kalvarna är en av dessa. Genom att begränsa användningen av mjölk från kor som behandlas under laktationen skulle förekomsten av resistenta bakterier i kalvarnas tarmflora kunna minskas.

Resultat från studien har presenterats vid nationella och internationella möten och konferenser och sammanställts i en artikel accepterad för publicering i Journal of Dairy Science (se Resultatförmedling nedan).

Genomförda och pågående studier i Del II (Projektansökan V1223008)

I Del II av doktorandprojektet görs en fördjupad undersökning genom besök och provtagning i ett tjugotal av besättningarna från besättningsstudien i Del I för att närmare studera skillnader i rutiner/karakteristika hos besättningar med hög respektive låg förekomst av kinolonresistens hos kalvarna. Del II ska slutredovisas till SLF i maj 2015 men en kort summering av arbetet lämnas här.

Avsikten är att identifiera vilka faktorer som är av störst betydelse för förekomsten av denna typ av resistens och att undersöka hur kinolonresistens sprids inom en besättning. Dessutom studeras hur resistens mot nyare generationers cefalosporiner (ESBL-resistens) sprids i en besättning.

I besättningarna tas prov för bakteriologisk undersökning från kor, kalvar och mjölk samt från miljön. Djurägaren intervjuas detaljerat om specifika rutiner som kan tänkas ha betydelse för förekomsten av resistens.

Besättningsbesöken har genomförts under höst och vinter 2013-2014 och för närvarande pågår kompletterande undersökningar av isolerade bakteriestammar. Bland annat görs typning (MLVA) av bakterierna för att fastställa deras släktskap, som underlag för slutsatser om hur de sprids i en besättning. Därefter vidtar epidemiologisk analys av resultaten och sammanställning.

Med underökningarna hoppas vi kunna visa hur de resistenta bakterierna sprids mellan djur i en besättning och att kunna identifiera enskilda faktorer som är av speciell betydelse. Förhoppningsvis kan spridningen av resistens begränsas om de enskilda faktorerna åtgärdas. Undersökningen ska ge underlag för två artiklar i vetenskaplig tidskrift.

Slutsatser

Studierna visar att mjölk från kor som behandlats med antibiotika används som foder till kalvar i många besättningar i Sverige.

Studierna visar också att flera faktorer har betydelse för förekomsten av antibiotikaresistenta *E. coli* i kalvarnas tarmflora och att de flesta faktorer som utvärderats har relativt liten, men statistiskt signifikant, betydelse. En sådan faktor är utfodring av mjölk från kor som antibiotikabehandlats under pågående laktation och det kan därför vara motiverat att begränsa användning av sådan mjölk som fodermedel. Ett sätt att minska riskerna är att kassera sådan mjölk under pågående behandling av kon och att helt undvika att utfodra med sådan mjölk från kor som har behandlats med kinoloner.

Råmjölk från sinbehandlade kor kan däremot ges till kalvar då det inte tycks ha någon betydelse för förekomsten av resistenta tarmbakterier. Dock är det lämpligt att begränsa användandet av vissa antibiotikapreparat, t.ex. DHS-tabletter till kalvar.

Resultatförmedling

Projektet har i huvudsak följt den resultatförmedlingsplan som angavs i ansökan.

Artiklar

1. Duse, A. Mjölk från antibiotikabehandlade kor – bör det ges till kalvar? *Husdjur* 2011, 4.
2. Duse, A. Milk from cows treated with antimicrobials – should it be fed to calves or not? *International , IDF Animal Health Newsletter* no. 5 2011.
3. Duse, A. Farming practices in Sweden related to feeding milk and colostrum from cows treated with antimicrobials to dairy calves, *SVARM/SWEDRES* 2012.

4. Persson, Y. Kalvar får mjölk med antibiotika, *Husdjur* 2013, 9:13.
5. Duse A, Persson Waller K, Emanuelson U, Ericsson Unnerstad H, Persson Y, Bengtsson B. Farming practices in Sweden related to feeding milk and colostrum from cows treated with antimicrobials to dairy calves, *Acta Veterinaria Scandinavica* 2013, 55:49.
6. Duse A, Persson Waller K, Emanuelson U, Ericsson Unnerstad H, Persson Y, Bengtsson B. Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. *Journal of Dairy Science*, accepted september 2014.
7. Duse, A. Kalvar kan bli resistent av råmjölk. *Husdjur* 2014, 1.

Presentationer

1. Duse, A, Emanuelson U, Ericsson Unnerstad H, Persson Waller K, Bengtsson B. *Is there an association between herd-level routines for waste milk management and the prevalence of antimicrobial resistance in fecal Escherichia coli from preweaned dairy calves?* – poster. 4th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the environment, Frankrike 2011.
2. Duse. A. *Orsaker till förekomst av antibiotikaresistens hos tarmbakterier från kalvar i mjölkbesättningar* – muntlig presentation, SVA:s projektråd, Sigtuna 2012.
3. Duse. A, Emanuelson U, Ericsson Unnerstad H, Persson Waller K, Bengtsson B. *Milk from cows treated with antimicrobials as feed for calves – a potential risk for the selection of resistant bacteria?* – poster 22nd European Congress on Clinical Infectious Diseases, London, England 2012.
4. Duse. A, Emanuelson U, Ericsson Unnerstad H, Persson Waller K, Bengtsson B. *Milk from cows treated with antimicrobials – should it be fed to calves or not?* – poster. The 13th conference of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Holland 2012.
5. Duse. A. *Orsaker till antibiotikaresistens hos tarmbakterier från kalvar i mjölkbesättningar* – muntlig presentation. Svensk Mjölk's forskningsinfodag, Uppsala 2012.
6. Duse. A. *Antibiotikaresistens hos mjölkkalvar* – muntlig presentation Veterinärkongressen, Uppsala 2012.
7. Duse. A, Emanuelson U, Ericsson Unnerstad H, Persson Waller K, Bengtsson B. *Regional differences in antimicrobial use for dairy cows in Sweden – visualizing the need for regional-specific campaigns?* – muntlig presentation. 15th International Conference on Production Diseases in Farm Animals, Uppsala, 2013.
8. Duse. A, Emanuelson U, Ericsson Unnerstad H, Persson Waller K, Bengtsson B. *Regional differences in antimicrobial use for preweaned dairy calves in Sweden – visualizing the need for regional-specific campaigns?* – poster 15th International Conference on Production Diseases in Farm Animals, Uppsala, 2013.
9. Duse. A. *Faktorer som påverkar förekomsten av antibiotikaresistenta tarmbakterier hos mjölkkalvar.* – muntlig presentation. Växas Djurhälso- och Utfodringskonferens, Skövde 2013.
10. Duse A. *Antibiotikaresistenta tarmbakterier hos kalvar* – muntlig presentation. Växas vårmöte, Uppsala 2014.

Kurser som Anna Duse genomgått

1. EURL-AR Training Course, Genotypic characterization of antimicrobial-resistant bacteria. 5 dagar (1.5 hp), 2011.

2. Laboratory Animal Science, Sveriges Lantbruksuniversitet. 5 dagar (1.5 hp). 2011.
3. Information retrieval and methods for scientific communication. Sveriges lantbruksuniversitet. (2 hp). 2011.
4. NOVA Post Graduate Course in Research Methodology – Planning of Controlled Clinical and Experimental Trials, Basic and Laboratory Research Faculty of Life Science, University of Copenhagen, Denmark. 2 veckor (6 hp). 2011.
5. EpiNOVA advanced course GIS (geographical information system) and spatial analysis using open source software. Helsinki University, Finland. 10 dagar (6hp). 2012.
6. Workshop in Molecular Epidemiology. Ghent, Belgien. 3 dagar (1 hp). 2012.
7. Statistics for biologists II. Sveriges lantbruksuniversitet. (7.5 hp). 2013.
8. Infection microbiology – Bacterial typing and antimicrobial resistance. (6 hp). 2013.
9. Grundkurs i högskolepedagogik. Sveriges Lantbruksuniversitet. (6 hp). 2014.

Ekonomisk redovisning

Kostnader i projektet har från februari 2011 och fram till augusti 2013 täckts av medel från projektansökan V1030056. Budgeten i ansökan har delvis modifierats så att medel under ”Material” istället delvis använts till lönebidrag för doktoranden. Denna förändring har i e-postkontakt i december 2012 godkänts av SLF (Nilla Nilsson Linde).

Saldo (SEK) per 30/6 2014.

Intäkter	1 733 000
Kostnader	
Löner	-744 928
Sociala avgifter	-374 743
Externa tjänster	-15 480
Interna tjänster	-30 000
Resor Konferenser	-66 861
Förbrukningsmateriel	-205 745
Laboratorieundersökningar SVA	-685
Overhead	-344 640
Utgående balans	-50 082

Referenser

- Brunton, L.A., Duncan, D., Coldham, N.G., Snow, L.C., Jones, J.R., 2012, A survey of antimicrobial usage on dairy farms and waste milk feeding practices in England and Wales. *The Veterinary record* 171, 296.
- Duse, A., Waller, K.P., Emanuelson, U., Unnerstad, H.E., Persson, Y., Bengtsson, B., 2013, Farming practices in Sweden related to feeding milk and colostrum from cows treated with antimicrobials to dairy calves. *Acta Vet Scand* 55, 49.
- USDA 2007. United States Department of Agriculture, Dairy 2008 - heifer calf health and management practices on U.S. dairy operations (Fort Collins: USDA).

Vasseur, E., Borderas, F., Cue, R.I., Lefebvre, D., Pellerin, D., Rushen, J., Wade, K.M., de Passille, A.M., 2010, A survey of dairy calf management practices in Canada that affect animal welfare. *J Dairy Sci* 93, 1307-1315.