



Forord

Denne oppgaven ble skrevet som en avsluttende del av min mastergrad i matvitenskap ved NMBU. Oppgaven ble skrevet for Nofima på Ås, ved avdeling for trygg og holdbar mat.

Arbeidet med masteroppgaven har vært svært tilfredsstillende og lærerikt, og jeg har tilegnet meg mye kunnskap om *Listeria monocytogenes*, og dets egenskaper som gjør bakterien til en stor utfordring for næringsmiddelindustrien.

En stor takk til mine veiledere Trond Møretro og Bjørn C. Tisjø Schirmer, som har bistått med stor kunnskap og god veiledning gjennom det hele. I tillegg vil jeg takke alle andre jeg har hatt gleden av å jobbe med under mitt opphold ved Nofima. En stor takk også til min hovedveileder ved NMBU, Hilde Marit Østlie.

Ikke minst vil jeg takke min kjære samboer, som har vært min største støttespiller hele veien!

Ås, mai 2014

Pernille Hjemli

Sammendrag

Produkter som er mest assosiert med utbrudd av *Listeria monocytogenes* er såkalt spiseklar mat, siden disse ikke varmebehandles før konsum. Hovedkilden for *L. monocytogenes* er krysskontaminering fra utstyr og omgivelser ved prosessering. Persistente stammer kan være tilstede i produksjonsanlegg i måneder og år. En mekanisme relatert til persistens hos *L. monocytogenes* er forhøyet toleranse for desinfeksjonsmidler, som kvartære ammoniumforbindelser (som benzalkoniumklorid, BC) samt større evne til festing til overflater og/eller biofilmdannelse. Forhøyet toleranse for BC hos *L. monocytogenes* kan knyttes til proteiner som kan pumpe ut BC fra cellen, som transmembran effluks proteinene QacH og BcrABC. Mekanisme for biofilmdannelse hos *L. monocytogenes* er ikke fullt ut forstått, men kan involvere proteinet, BapL.

Formålet med denne oppgaven var å undersøke forekomst og betydning av gener knyttet til toleranse for BC (*qacH* og *bcrABC*), og et gen knyttet til biofilmdannelse (*bapL*) hos *L. monocytogenes*. Videre var hensikten å undersøke om disse genene, og mekanismene de er knyttet til, har sammenheng med persistens i matproduksjonsmiljø. Analyse av 27 *L. monocytogenes* stammer viste at 5 stammer hadde *qacH* genet og 6 stammer hadde *bcrABC* genet. Ingen stammer hadde begge genene. Alle stammer med *qacH* eller *bcrABC* hadde signifikant høyere BC minste hemmende konsentrasjon (MIC) (5-10 ppm) enn stammer uten *qacH* og *bcrABC* (2-4 ppm). Stammer med *bapL* og/eller *qacH/bcrABC* viste høyere toleranse for BC i biofilm enn i suspensjon.

Resultatene viste at forhøyet toleranse for BC kan forklares av transmembran effluks proteinene QacH og BcrABC. Resultatene vist også at proteinet BapL og/eller QacH/BcrABC kan bidra til økt toleranse for BC hos *L. monocytogenes* i biofilm. Det ble ikke funnet noen sammenhenger mellom persistens og forekomst av disse genene, eller mekanismer de er knyttet til. Toleranse for BC og persistens i næringsmiddelindustrien skyldes sannsynligvis en kombinasjon av ulike faktorer; *L. monocytogenes* sin evne til å danne og leve i biofilm, naturlig eller ervervet toleranse for BC, og utilstrekkelig vask og desinfeksjon av produksjonsmiljø.

Abstract

Products that are most associated with outbreaks with *Listeria monocytogenes* are ready-to-eat foods, as these are in a form that is edible without additional heat treatment. The main source of *L. monocytogenes* in these foods is cross contamination from equipment and the environment during processing. Persistent strains may be present in production facilities for months and years. A mechanism related to the persistence of *L. monocytogenes* is higher tolerance to disinfectants, such as quaternary ammonium compounds (such as benzalkonium chloride, BC) and also a greater ability for attachment to surfaces and/or biofilm formation. Increased tolerance to BC by *L. monocytogenes* may be related to transmembrane efflux proteins that are able to export BC out of the cell, like QacH and BcrABC. The mechanisms for biofilm formation in *L. monocytogenes* are not fully understood, but may involve the protein, BapL.

The intention of this thesis was to investigate the occurrence and significance of genes associated with tolerance for BC (*qacH* and *bcrABC*), and one gene associated with biofilm formation (*bapL*) in *L. monocytogenes*. The aim was also to investigate if these genes, and the mechanisms they are linked to, are related to persistence in food production environments. Analysis of 27 *L. monocytogenes* strains revealed that 5 strains harbored the *qacH* gene and 6 strains the *bcrABC* gene. None of the strains harbored both genes. All strains harboring *qacH* or *bcrABC* had significantly higher BC minimum inhibitory concentrations (MICs) (5-10 ppm) than strains without *qacH* or *bcrABC* (2-4 ppm). Strains harboring *bapL* and/or *qacH/bcrABC* showed higher tolerance to BC in biofilm compared to when in suspension.

The results showed that elevated tolerance to BC can be explained by the proteins QacH and BcrABC. The results also demonstrated that the protein BapL and/or QacH / BcrABC can contribute to increased tolerance to BC of *L. monocytogenes* in biofilms. There were no correlations found between persistence and the occurrence of these genes, or the mechanisms they were associated with. The tolerance to BC and persistence in the food production environment is likely due to a combination of factors; the ability of *L. monocytogenes* to form and live in biofilms, natural or acquired tolerance of BC, and inadequate cleaning and disinfection of the production environment.

INNHALDSFORTEGNELSE

1. Innledning	1
2. Teori	3
2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	3
2.2. <i>L. monocytogenes</i> i næringsmiddelindustrien.....	4
2.3. <i>L. monocytogenes</i> og persistens i næringsmiddelindustrien.....	5
2.4. Desinfeksjon i næringsmiddelindustrien.....	6
2.4.1. Kvantære ammoniumforbindelser.....	6
2.5. <i>L. monocytogenes</i> og toleranse/resistens for benzalkoniumklorid (BC).....	8
2.6. Resistensmekanismer.....	9
2.6.1. Membranpumper.....	9
2.6.1.1. BcrABC protein.....	9
2.6.1.2. QacH protein.....	10
2.6.2. Ervervet toleranse/resistens.....	12
2.6.3. Biofilm.....	12
2.6.3.1. Biofilmdannelse hos <i>L. monocytogenes</i>	13
2.6.3.2. Mekanismer for forhøyet toleranse i biofilm.....	14
2.6.3.2.1. BapL protein.....	15
3. Materialer og metoder	16
3.1. Bakteriestammer og dyrkningsbetingelser.....	16
3.2. Kartlegging av gener med Polymerase Chain Reaction (PCR).....	19
3.3. Test av minste hemmende konsentrasjon (MIC test) av benzalkoniumklorid....	20
3.4. Suspensjonstest.....	21
3.5. Biofilmdannelse på stål.....	22
3.5.1. Forforsøk biofilmdannelse.....	22
3.5.2. Dyrkning av biofilm.....	22
3.5.3. Kvantifisering av biofilmdannelse.....	22
3.6. Desinfeksjonsforsøk på biofilm på stål.....	23
3.7. Statistikk.....	24

4. Resultater	25
4.1. Forekomst av <i>bapL</i> , <i>bcrABC</i> og <i>qacH</i>	25
4.1.1 <i>bapL</i>	25
4.1.2 <i>bcrABC</i>	26
4.1.3 <i>qacH</i>	27
4.2. Minste hemmende konsentrasjon (MIC) av benzalkoniumklorid (BC).....	28
4.3. Suspensjonstest.....	29
4.4. Biofilmdannelse på stål.....	30
4.5. Desinfeksjonsforsøk på biofilm.....	31
4.6. Mikroskopi av biofilm fra desinfeksjonsforsøk.....	32
4.7. Drapeseffekt av BC i gjenværende suspensjon fra biofilmforsøk.....	34
5. Diskusjon	35
6. Konklusjon	45
7. Referanser	46
8. Vedlegg I Forforsøk og kontrollforsøk.....	53
Vedlegg II Statistikk.....	CD
Vedlegg III Rådata.....	CD

1. Innledning

Listeria monocytogenes fortsetter å være en utfordring for næringsmiddelindustrien, da total eliminering av bakterien fra næringsmiddelkjeden viser seg nesten umulig (Hellström 2011). Det er et stort behov for å forstå bakteriens egenskaper knyttet til vekst og overlevelse i produksjonsmiljø, slik at man på sikt kan finne nye metoder for å redusere forekomst av *L. monocytogenes*.

Vask og desinfeksjon er et viktig virkemiddel i kampen mot *L. monocytogenes* i matproduksjonsmiljøer. Kvartære ammoniumforbindelser (QAC) er blant de vanligste brukte desinfeksjonsmidlene i næringsmiddelindustrien (Sundheim 1999). Benzalkoniumklorid (BC) er en type QAC. Toleranse for QAC er vist hos *Staphylococcus* spp, *Escherichia coli* og *Bordetella avium* (Bay et al. 2008). Noen stammer av *L. monocytogenes* kan ha en naturlig høy toleranse for QAC/BC (Aase et al. 2000; Dutta et al. 2013; Heir et al. 2004), og i tillegg kan noen stammer utvikle en slik forhøyet toleranse (Aarnisalo et al. 2007; Aase et al. 2000; To et al. 2002). *L. monocytogenes* kan feste seg til overflater og danne biofilm (Borucki et al. 2003; Djordjevic et al. 2002; Doyle & Beuchat 2007; Møretrø et al. 2013), og det er vist at celler i biofilm er mer motstandsdyktige mot desinfeksjonsmidler enn planktoniske celler (Best et al. 1990; Cloete & Molobela 2009; Doyle & Beuchat 2007). Produksjonsmiljø som innehar områder eller utstyr som vanskelig lar seg rengjøre og desinfisere, vil være plasser *L. monocytogenes* kan feste seg og danne biofilm. På disse plassene kan *L. monocytogenes* i tillegg utsettes for subletale konsentrasjoner av BC, som kan føre til økt toleranse for BC (Aase et al. 2000). Toleranse for BC og biofilmdannelse hos *L. monocytogenes* er knyttet til persistens i næringsmiddelindustrien (Lunden et al. 2003; Lunden et al. 2002; Nakamura et al. 2013). Persistens hos *L. monocytogenes* i næringsmiddelindustrien kan bidra til vedvarende kontaminering av ferdige produkter (Ferreira et al. 2014).

Denne oppgaven er tilknyttet prosjektet «Kontroll av *Listeria monocytogenes* ved produksjon av animalske produkter». Prosjektet tar sikte på å gi ny kunnskap om hvordan *L. monocytogenes* etablerer seg, overlever og vokser i produksjonsmiljø for kjøtt. Prosjektet er finansiert av kjøttbransjen og av fondet for forskningsavgift på landbruksprodukter (FFL).

Hensikten med oppgaven var å undersøke toleranse mot benzalkoniumklorid (BC) hos stammer av *L. monocytogenes* fra produksjonsmiljø kjøttindustrien. Videre skulle forekomst av gener involvert i toleranse mot BC og biofilmdannelse bestemmes.

2. Teori

2.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria slekten tilhører fylum *Firmicutes*, og består av 6 arter (Rocourt & Buchrieser 2007), hvorav kun to er patogene; *Listeria (L.) monocytogenes* og *L. ivanovii* (Hellström 2011). *Listeria* er en liten (0,5 µm x 1,2 µm), Gram-positiv stav med avrundede ender. Cellene opptrer enkeltvis, i korte kjeder, eller de kan være arrangert i V og Y former. *Listeria* er fakultativ anaerob, katalase positiv og oksidase negativ. De produserer ikke sporer og danner ikke kapsler. *L. monocytogenes* er bevegelig med sine små flageller ved 20-25 °C, men er lite eller ikke bevegelig ved 37 °C. Bakterien vokser ved 1-2 °C og opp til 45 °C, med optimumstemperatur på 30-37 °C (Rocourt & Buchrieser 2007), overlever godt frysing, mens temperaturer over 50 °C er letale for *L. monocytogenes* (Lado & Yousef 2007). Bakterien vokser mellom pH 4,5-9,2, med optimal pH på 7, og kan vokse i 10 % NaCl, og overleve ved enda høyere konsentrasjoner. Overlevelse ved lav pH og høye saltkonsentrasjoner avhenger sterkt av temperaturen. Som en av få matbårne patogener kan *L. monocytogenes* vokse ved vannaktivitet (a_w) under 0,93, og kan overleve over lengre perioder ved a_w 0,83 (Rocourt & Buchrieser 2007), men optimum a_w for vekst er $\geq 0,97$ (Lado & Yousef 2007). *Listeria monocytogenes* finnes overalt i miljøet, inkludert jord, vann og nedbrytende vegetasjon (Painter & Slutsker 2007). Bakterien er hemolytisk for blod av ulike opprinnelser, som sau, hest, ku og menneske (Rocourt & Buchrieser 2007).

Listeria monocytogenes er en fakultativ intracellulær bakterie, som har evnen til å invadere, overleve og formere seg i celler, og kan spre seg fra celle til celle (Granum 2007). Bakterien kan forårsake sykdommen listeriose. De vanligste symptomene til listeriose hos ikke-gravide er meningitt, meningoencephalitt eller sepsis, samt febril gastroenteritt (Granum 2007). Risikoen ved listeriose er størst hos visse høyrisikogrupper, som mennesker med redusert immunforsvar. Hos gravide kvinner kan listeriose føre til abort, dødfødsler og prematur fødsel, eller neonatal infeksjon. (Painter & Slutsker 2007). Listeriose er en sjelden, men alvorlig sykdom, med 20-30 % dødelighet og hvor over 90 % av alle tilfeller fører til hospitalisering (Hellström 2011). Infeksjonsdosen til *L. monocytogenes* regnes å være rundt 10^6 cfu/gram (Vazquez-Boland et al. 2001), men antas lavere for risikogrupper (Granum 2007).

I 1992 hadde Norge det første utbruddet av listeriose, som inkluderte seks personer.

Kontaminert, varmebehandlet kjøttpålegg var smitekilden (Granum 2007). I Norge er det meldt

21-34 tilfeller av listeriose pr år i perioden 2008-2012. 87 % av disse oppgis å ha blitt smittet i Norge (Andersen et al. 2013). *Li monocytogenes* er patogen både for mennesker og dyr, og både dyr og mennesker kan være friske smittebærere. Bakterien er isolert fra en rekke matvarer, og er påvist i rå kylling, kjøtt, kjøttdeig, rå fisk, røkt og gravet fisk, rakfisk, reker, grønnsaker, bløte oster, spiseis og varmebehandlet kjøttpålegg (Granum 2007).

Det er 13 serotyper av *L. monocytogenes* som kan gi sykdom, men mer enn 90 % av isolatene fra syke mennesker, tilhører serotypene 1/2a, 1/2b og 4b. Serotype 4b stammer er ansvarlig for 33-50 % av sporadiske tilfeller av listeriose på verdensbasis, og var også ansvarlig for alle de store utbruddene i Europa og Nord-Amerika på 1980-tallet. Stammer isolert fra mat i mange land tilhører hovedsakelig serotypene 1/2a og 1/2b (Doyle & Beuchat 2007).

2.2. *Listeria monocytogenes* i næringsmiddelindustrien

Listeria monocytogenes kan introduseres til produksjonslokaler fra jord på arbeidernes sko og klær, fra transportutstyr, fra dyr som er smittet selv, eller som er kontaminert på hud og pels, fra råvarer, og også muligens fra mennesker som er friske smittebærere (Doyle & Beuchat 2007). Produkter som er mest utsatt for *L. monocytogenes* er såkalt spiseklar mat, dette er mat som konsumeres uten videre varmebehandling. For denne type produkter har det vist seg at hovedkilden for *L. monocytogenes* er krysskontaminering fra utstyr og omgivelser ved prosessering. Det er svært viktig å kontrollere *L. monocytogenes* i produksjonsmiljøet for å minske risikoen for at *L. monocytogenes* overføres til utsatte produkter (Cloete & Molobela 2009; Doyle & Beuchat 2007; Lunden et al. 2002; Sauders & Wiedmann 2007).

Da den infeksjose dosen er relativt høy, må det skje en oppformering av *L. monocytogenes* i matvarene for at disse skal kunne gi opphav til listeriose. Det er derfor viktig å hindre vekst av *L. monocytogenes* i utsatte matvarer (Granum 2007). Økt konsum av spiseklare produkter, forlenget holdbarhet til matvarer på grunn av kjølelagring og nye pakketeknologier, og internasjonal handel med mat, har gitt en økning i mulige kilder til *L. monocytogenes* (Hellström 2011).

2.3. *Listeria monocytogenes* og persistens i næringsmiddelindustrien

Ferreira et al. (2014) betegner persistens hos *L. monocytogenes* som tilstedeværelse av bakterien i komplekse naturlige eller menneskeskapt miljøer over tid, og typisk så identifiseres stammer av *L. monocytogenes* som persistente når en spesifikk molekylær subtype isoleres fra prøver samlet inn i et gitt miljø over tid. Ferreira et al. (2014) fremhever i sin oversiktsartikkel at formelle statistiske kriterier for identifisering av persistente stammer fortsatt er udefinert, og å skille mellom vedvarende reintroduksjon av en spesifikk *L. monocytogenes* subtype til en fasilitet, og ekte persistens, har vist seg vanskelig. I mange produksjonsmiljøer finner man både persistente og sporadiske *L. monocytogenes* stammer, selv om mange produksjonssteder ser ut til å ha kun sporadiske stammer. Persistente stammer kan være tilstede i produksjonsanlegg i måneder og år, faktisk opp til 7-12 år (Sauders & Wiedmann 2007). Tilgjengelig data antyder at persistens hos *L. monocytogenes* i ulike steg i næringsmiddelkjeden bidrar til kontaminering av ferdige produkter (Ferreira et al. 2014), og at *L. monocytogenes* persistens er en viktig bakenforliggende årsak til flertallet av listeriose utbrudd, noe som demonstrerer hvor stor betydning persistens kan ha for folkehelse, så vel som økonomiske kostnader (Ferreira et al. 2014).

Ferreira et al. (2014) antyder at miljøforhold, som for eksempel forekomst av nisjer hvor *L. monocytogenes* kan vokse, og som er vanskelig å holde rent, er den viktigste faktoren som fører til persistens hos *L. monocytogenes*, men at mekanismene er mindre forstått. Flere forskere har rapportert at persistente stammer innehar egenskaper som bidrar til persistens, som biofilmdannelse og bedre tilpassing til stress, men andre forskere har ikke funnet noen fenotypiske karakteristikk som skiller persistente og sporadiske stammer (Carpentier & Cerf 2011). En mekanisme bak persistens hos *L. monocytogenes* kan være forhøyet toleranse for desinfeksjonsmidler; Lunden et al. (2003) fant at persistente stammer av *L. monocytogenes* hadde høyere toleranse for benzalkoniumklorid (BC) enn sporadiske stammer ved å undersøke minste hemmende konsentrasjon (MIC test) av BC. Studien fant også at persistente stammer viste høyere grad av festing til rustfritt stål enn ikke-persistente stammer av *L. monocytogenes*. I en studie av Lunden et al. (2000), fant man at persistente stammer av *L. monocytogenes* hadde flere celler festet til overflate etter 2 timer inkubasjon ved 25 °C, sammenliknet med ikke-persistente stammer, noe som demonstrerer at persistente stammer viser større evne til initial festing ved korte kontakttider (Lunden et al. 2000). Dette kan ha betydning for persistente

stammers overlevelse i produksjonsmiljø, og kan ha en effekt på en initiering av persistent kontaminasjon i produksjonsmiljø. Nakamura et al. (2013) antyder etter resultatene fra sin studie at persistente *L. monocytogenes* stammer produserer større mengder biofilm og ekstracellulære polymere substanser (EPS) enn de sporadiske stammene, noe som gir de persistente stammene høyere resistens mot desinfeksjonsmidler. Assosiasjonen mellom *L. monocytogenes* sin evne til å feste seg til overflater og/eller danne biofilm, og persistens i matproduksjonsmiljøer, er i stor grad fortsatt uklar (Ferreira et al. 2014).

2.4. Desinfeksjon i næringsmiddelindustrien

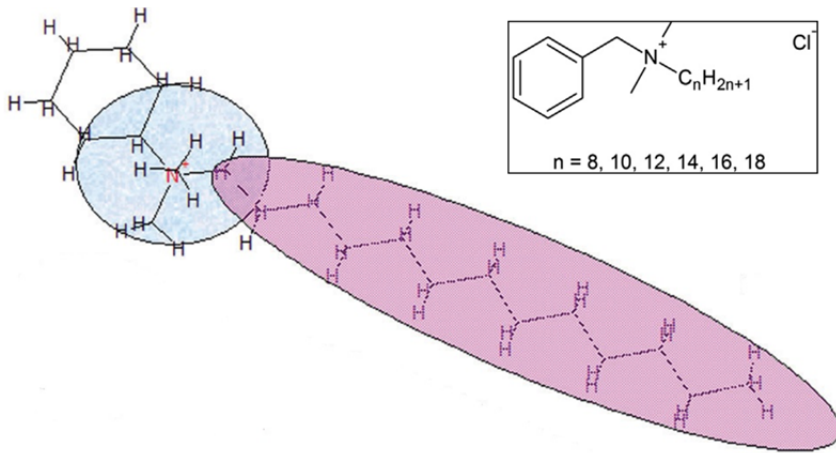
For å anses som effektive, må desinfeksjonsmidler redusere minst 5 log av hvilken som helst testorganisme innen 30 sekunder med eksponering ved romtemperatur (Lado & Yousef 2007). De viktigste gruppene desinfeksjonsmidler som brukes i næringsmiddelindustrien er klorbaserte midler, iodforbindelser, peroksidforbindelser og overflateaktive forbindelser, som kvartære ammoniumforbindelser (QAC). Det er mange ulike desinfeksjonsmidler som baserer seg på overflateaktive komponenter, men mest brukt er QAC (Sundheim 1999).

2.4.1. Kvartære ammoniumforbindelser (QAC)

Kvartære ammoniumforbindelser (QAC) er en gruppe ikke-korrosive kationiske overflateaktive midler som ofte brukes til å desinfisere overflater på utstyr (Lado & Yousef 2007), og som primært er aktivt mot Gram-positive bakterier (Russell et al. 2004). Gram negative bakterier er generelt mindre tolerante for QAC, fordi yttermembranen deres fungerer som en barriere (Langsrud 1998). Midlene er ofte tilsatt komponenter som øker effekten, og det kan derfor være store forskjeller mellom midler basert på samme QAC. Sammen med andre overflateaktive desinfeksjonsmidler, er QAC mye brukt da midlene er lite korrosive, lite toksisk for mennesker og enkle å bruke (Sundheim 1999). En konsentrasjon på 100-200 ppm aktiv forbindelse på overflater er listericidal (Lado & Yousef 2007). I Norge brukes QAC vanligvis i konsentrasjon 200-1000 ppm (Møretrø 2014).

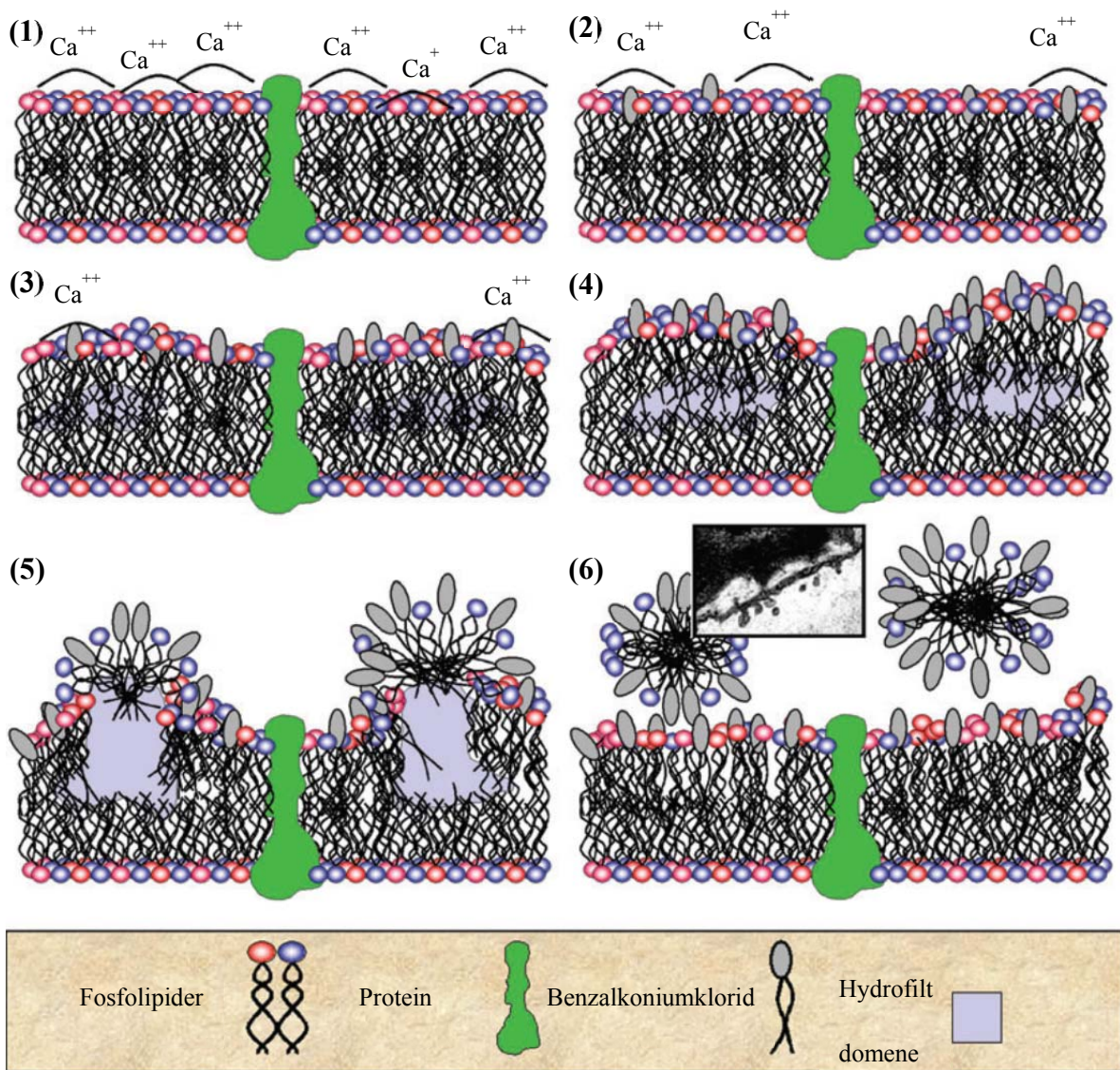
Kvartære ammoniumforbindelser (QAC), som BC, er amfotære overflateaktive stoffer, som generelt inneholder et kvartært nitrogenion assosiert med minst en større hydrofob del (figur

2.1). Benzalkoniumklorider er alltid blandinger av *n*-alkyldimetylbenzyl ammonium klorider hvor *n*-alkylgruppen kan være av variabel lengde (Gilbert & Moore 2005).



Figur 2.1 Strukturen til tetradecyldimetylbenzyl ammonium klorid et benzalkoniumklorid (BC) hvor *n*-alkylgruppen er C14. Motionene er ikke vist. Blå del viser til positivt ladet del, mens den hydrofobe halen er lilla (Gilbert & Moore 2005). Kjemisk struktur til benzalkoniumklorid (N-alkyldimetylbenzylammonium klorid) er vist oppe til høyre. Figur modifisert fra Wessels og Ingmer (2013).

Overflaten til bakterieceller er netto negativt ladet, ofte stabilisert av divalente kationer som Mg^{2+} og Ca^{2+} . QAC er positivt ladete molekyler som binder sterkt til celleoverflaten og integreres i den cytoplasmiske membranen. En slik interaksjon med membranen er tilstrekkelig for å forstyrre veksten, og ved høye nok konsentrasjoner gjøre at membranen mister fluiditet og at cellen dør (figur 2.2) (Gilbert & Moore 2005).



Figur 2.2 Virkningsmekanisme for kvartære ammonium forbindelser (QAC). Segmentene 1-6 viser gradvis adsorpsjon av den kvartære hodegruppen til negativt ladede fosfolipider i membranen med økende konsentrasjon/eksponering av QAC. Dette fører til mindre fluiditet i membranlaget og lager hydrofile lommer i membranen. Proteinfunksjon forstyrres, og cellen vil til slutt lysere. Fosfolipider og proteiner som er løseliggjort danner QAC/fosfolipid miseller (Gilbert & Moore 2005). Figur modifisert fra Gilbert og Moore (2005).

2.5. *Listeria monocytogenes* og toleranse/resistens for BC

Ferreira et al. (2014) definerer resistens som en kapasitet for adaptering og overlevelse av mikroorganismer i respons av anbefalte konsentrasjoner av desinfeksjonsmidler. Resistens kan også beskrive stammer som overlever eller ikke hemmes av en konsentrasjon av desinfeksjonsmiddel som dreper eller hemmer majoriteten av stammene innen samme art (Langsrud 1998). Aase et al. (2000) karakteriserte 10 % av 200 *L. monocytogenes* stammer

isolert fra kjøtt- og fiskeindustri som resistente mot BC (BC MIC 4-7 ppm, mikrotitermetode), og Heir et al. (2004) fant at 16 % av 84 *L. monocytogenes* stammer isolert fra matproduksjonsanlegg var høytolerante for BC (BC MIC 4-8 ppm, mikrotitermetode), mens Dutta et al. (2013) fant at 51 % av 116 *L. monocytogenes* stammer fra råvarer og miljø i næringsmiddelindustri var BC resistente (BC MIC 30-40 ppm, agarfortynningsmetode).

2.6. Resistensmekanismer

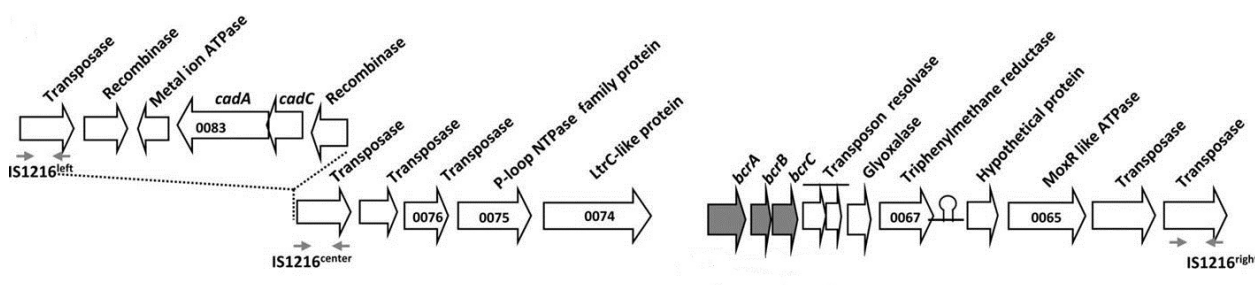
2.6.1. Membranpumper

Membranpumper er assosiert med «small multidrug resistance» (SMR) protein familien, som er proteiner som spenner seg over membranen ved fire transmembrane alfahelikser, og gir toleranse til en rekke kvartære ammoniumforbindelser, som BC og cetyltrimetylammonium bromid (CTAB) (Bay et al. 2008). En studie av Aase et al. (2000) fant at 50 % av de BC-tolerante isolatene også viste resistens mot ethidium bromid (EtBr). En membranpumpe som kunne pumpe ut EtBr ble påvist hos BC-resistente isolater, og hos isolater som opprinnelig var sensitive for BC, men som ervervet evnen til å vokse i BC. Denne membranpumpen ble ikke funnet hos isolater som forble sensitive for BC. Heir et al. (1995) fant at stammer av *Staphylococcus* spp. som var høytolerante mot BC var ikke-fluorescerende, og alle de lavtolerante stammene var fluorescerende etter vekst på media inneholdende EtBr. Dette indikerte muligheten for en link mellom toleranse for BC og akkumulering av EtBr hos disse stammene. Mekanisme for resistens for BC ved membranpumpe ble også vist i en studie av Soumet et al. (2005), som også fant at en ukjent mekanisme gjaldt for BC-resistente-EtBr-sensitive stammer En oversiktsartikkel av Wessels og Ingmer (2013) antyder at oppregulering av membranpumper kan være en resistensmekanisme for BC hos bakterier.

2.6.1.1. BcrABC protein

Elhanafi et al. (2010) karakteriserte en plasmid-assosiert (pLM80) BC resistens tre-gen kassett (*bcrABC*) på et *IS1216* kompositt transposon hos en *L. monocytogenes* stamme. Plasmidet pLM80 har en størrelse på 80-kb. Toleranse for BC i studien til Elhanafi et al. (2010) var grunnet en *bcrABC* resistens kassett bestående av *bcrA*, en transkripsjonell regulator og *bcrBC*, som representerer to SMR transportører (figur 2.3). TetR familie transkripsjonell regulator (*bcrA*) har

et helix-turn-helix (HTH) DNA bindende motiv (peptid sekvens). Medlemmer av TetR familien av regulatorer kontrollerer transkripsjonen av multidrug effluks systemer/ membranpumper, noe som antyder at *bcrA* har en liknende rolle i *bcrABC* (Elhanafi et al. 2010). Polypeptidene BcrB og BcrC viste likhet med flere proteiner i SMR familien. G+C innholdet i regionen av pLM80 hvor *bcrABC* kassetten ligger, antyder at disse genene er ervervet gjennom horisontal genoverføring (transduksjon, transformasjon, konjugasjon), mulig fra ulike kilder (Elhanafi et al. 2010).



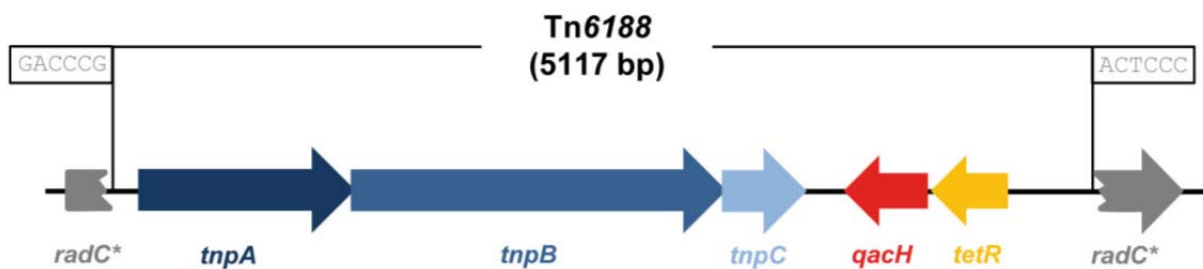
Figur 2.3 Organisasjonen av *bcrABC* region i plasmidet pLM80 hos *Listeria monocytogenes*. Figur modifisert fra Dutta et al. (2013).

Av 116 *L. monocytogenes* stammer isolert fra næringsmiddelindustri, var 50 % positiv for *bcrABC* (45 % fra miljø og 5 % fra råvarer). Alle de *bcrABC* positive stammene ble karakterisert som BC resistente (BC MIC 30-40 ppm, agarfortynningsmetode) (Dutta et al. 2013), og Elhanafi et al. (2010) fant at *L. monocytogenes* stamme med *bcrABC* genet er mer tolerant for BC (BC MIC 40 ppm) enn stammer uten *bcrABC* (BC MIC <10 ppm, agarfortynningsmetode). Av 91 *L. monocytogenes* stammer, fant Muller et al. (2013) at 5 % hadde *bcrABC*, hvor fire av fem var isolert fra næringsmiddelindustri (1 fra miljø, 3 fra råvarer).

2.6.1.2. QacH protein

Muller et al. (2013) indentifiserte et kromosomalt integrert transposon (Tn6188) hos *L. monocytogenes* som gir toleranse for BC, og som inneholder *qacH* genet. Tn6188 er tilsvarende Tn554 hos *S. aureus*, og andre Tn554-liknende transposoner som Tn558, Tn559 og Tn5406 funnet hos ulike *Firmicutes*. Transposon Tn6188 inneholder genene *tnpABC*, *qacH*, og *tetR* (figur 2.4). Genene *tnpABC* er tre sammenhengende transposasegener. Genet *qacH* koder for et

protein med stor likhet til Smr/EmrE/Qac proteiner fra SMR «small multidrug resistance» protein familien (Muller et al. 2013), som er kjent som transportører ansvarlige for utpumping av desinfeksjonsmidler hos *Escherichia coli* og *Staphylococcus aureus* (Bay et al. 2008). Genet *tetR* er en antatt transkripsjons regulator oppstrøms for *qacH*. QacH proteinet i Tn6188 deler høyest aminosyreidentitet med QacH hos *Staphylococcus saprophyticus*, og proteinet fikk derav navnet QacH (Muller et al. 2013). QacH er tidligere identifisert hos *S. saprophyticus*, *E.coli* og *Bordetella avium* (Bay et al. 2008). Det totale G+C innholdet i Tn6188 (32,9 %) er betydelig lavere enn det totale G+C innholdet i *Listeria* genomer, og det antas derfor at Tn6188 er relativt nylig overført til *L. monocytogenes* (Muller et al. 2013). En studie av Heir et al. (1998) viste at en *S. saprophyticus* stamme isolert fra et svinekjøttproduksjonsanlegg hadde et 2,4-kb plasmid som inneholdt *qacH*. Stammen viste også høy EtBr resistens, og tester antydte at dette kom av økt utpumping av substratet via membranpumper.



Figur 2.4 Organisasjon av *Listeria monocytogenes* transposon Tn6188. Figur modifisert fra Muller et al. (2013).

Det var 10 av 91 *L. monocytogenes* stammer isolert fra næringsmiddelindustrien som viste forekomst av *qacH* (7 fra råvarer, 3 fra miljø) (Muller et al. 2013). Muller et al. (2013) fant at *L. monocytogenes* stammer med Tn6188 transposonet hadde signifikant høyere toleranse for BC enn stammer uten Tn6188 (BC MIC $28,5 \pm 4,7$ ppm mot $14 \pm 3,2$ ppm, agarfortynningsmetode). I tillegg fant de at *L. monocytogenes* mutanter, hvor *qacH* genet var fjernet, hadde lavere toleranse for BC enn villtype stammer.

2.6.2. Ervervet toleranse/resistens

En studie av Aase et al. (2000) viste at man kunne øke resistensen (BC MIC 1 ppm til 6-7 ppm) hos stammer som opprinnelig var sensitive for BC, ved og gradvis utsette stammene for økende konsentrasjoner av BC. Tilsvarende er vist i andre studier (Aarnisalo et al. 2007; Lunden et al. 2003; To et al. 2002). I studien til Lunden et al. (2003) holdt den økte toleransen seg i 28 dager. Studier har vist at transkripsjonen av *bcrABC* hos *L. monocytogenes* øker ved eksponering av subletale konsentrasjoner av BC. Det viste seg at transkripsjonen også var høyere ved reduserte temperaturer (4,8 eller 25 °C) enn ved 37 °C, samt høyere ved 10 ppm BC enn ved 20 eller 40 ppm (Elhanafi et al. 2010). Dutta et al. (2013) fant også at transkripsjonen av *bcrABC* ble induisert av 10 ppm BC (gjaldt for stammer innen ulike serotyper og kilder). En signifikant økning av *qacH* ekspresjon i nærvær av BC er også vist (Muller et al. 2013).

Kastbjerg et al. (2010) undersøkte hvordan vanlig brukte desinfeksjonsmidler i næringsmiddelindustrien påvirker ekspresjonen av ulike virulente gener hos *L. monocytogenes* ved eksponering for subletale konsentrasjoner. De fant at QAC induiserte ekspresjonen av virulente gener. Studien understreker at desinfeksjonsmidler bør brukes i den letale konsentrasjonen anbefalt av produsent.

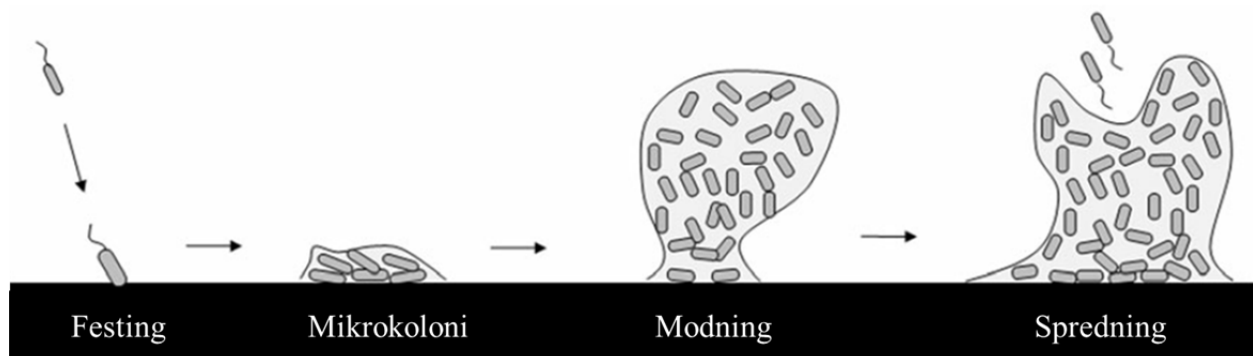
2.6.3. Biofilm

Costerton (2007) definerer biofilm som et multicellulært samfunn bestående av prokaryote og/eller eukaryote celler omsluttet i en matriks, i det minste delvis, bestående av materiale syntetisert av de fastsittende cellene i samfunnet.

Biofilmer kan bestå av monokulturer, men i de fleste tilfeller, både i naturlige og kunstige systemer, består biofilm av et samfunn av flere ulike arter og slekter, hvor cellene er omsluttet av en ekstracellulær matriks i tett nærhet til hverandre. Artene kan være fylogenetisk svært forskjellige, og noen ganger kan et begrenset antall arter være tallmessig og funksjonelt dominerende (Kjelleberg & Givskov 2007). Det er sannsynlig at horisontal genoverføring skjer i bakterielle biofilmer. Nærheten mellom cellene innen en biofilm, kombinert med tilstedeværelsen av matriks materiale som kan konsentrere komponenter som plasmid og

kromosomal DNA, feromoner og bakteriofager, gir anledning for utveksling av mobile genetiske elementer ved prosesser som konjugasjon, transposisjon og transduksjon (Roberts et al. 2001).

Dannelse av biofilm kan beskrives som en prosess som består av definerte stadier. Generelt kan man si at disse stadiene inkluderer reversibel og irreversibel festing; overflatemotilitet og initiering av mikrokolonidannelse; modning, aldring og differensiering av mikrokolonier; og til slutt biofilmoopløsning og generering av spesialiserte spredningsceller (figur 2.5). Det kan antas at spesifikke biofilmgener uttrykkes i en definert rekkefølge som reflekterer livssyklusen til en biofilm (Kjelleberg & Givskov 2007).



Figur 2.5 Livssyklus til biofilm. Individuelle celler fester seg, deretter produseres ekstracellulære polymere substanser (EPS) og festing blir irreversibel. Biofilmen utvikles og modnes, og til slutt løsner enkeltceller fra biofilm (Cloete & Molobela 2009).

2.6.3.1. Biofilmdannelse av *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes er vist å danne biofilm på mange ulike overflatematerialer, blant annet rustfritt stål, glass, polyvinylklorid (PVC), polyetylen (PE), teflon (Martin & Feng 2009).

Ferreira et al. (2014) fremhever at få studier har sterke bevis for at *L. monocytogenes* danner en klassisk biofilm; festing av planktoniske celler etterfulgt av produksjon av EPS, eller om *L. monocytogenes* kun viser sterk adsorpsjon av celler til overflater (Rodriguez-Lozano 2009).

Strukturen til *L. monocytogenes* biofilm er vist å være et homogent lag av celler, mikrokolonier og nettverk av knyttede kjeder (da Silva & De Martinis 2013). Sammenliknet med Gram negative bakterier danner *L. monocytogenes* lite biofilm (Møretrø et al. 2013). Det antas at bevegelighet er en viktig forutsetning for biofilmdannelse av *L. monocytogenes* på overflater, da

flageller bidrar til bakteriens evne til å feste seg på overflater. *L. monocytogenes* er ikke bevegelig ved 37 °C, men er bevegelig ved ≤ 30 °C (Smith et al. 2009). Oppregulering av visse gener ved festing til overflater og under biofilmdannelse er vist hos *L. monocytogenes*, som *flaA* (koder for flageller) og *agr*-gener (koder for blant annet celle-til-celle kommunikasjon/querom sensing) (Renier et al. 2011), og Salazar et al. (2013) fant at en transkripsjonsfaktor (Lmo0753) kan være en annen mulig mekanisme som bidrar til biofilmdannelse hos *L. monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* er en hydrofil mikroorganisme, og cellefesting og overflatekolonisering skjer hurtig (≤ 2 timer ved 20 og 37 °C) på hydrofile substrater. Festing av *L. monocytogenes* til overflater påvirkes av tilstedeværelse av andre bakterier, samt at stammer av *L. monocytogenes* har vist å variere i deres evne til å danne biofilm (Lado & Yousef 2007).

2.6.3.2 Mekanismer for forhøyet toleranse i biofilm

Sammenliknet med planktoniske celler, er biofilmassosierte bakterier mer motstandsdyktige mot inaktivering av antimikrobielle midler og biocider, samt fysisk og kjemisk stress (Cloete & Molobela 2009; Doyle & Beuchat 2007). Effektiviteten av 14 desinfeksjonsmidler mot to stammer *L. monocytogenes* ble undersøkt av Best et al. (1990). Mange av desinfeksjonsmidlene som ble testet viste seg og ikke å være like effektive når testorganismen var tørket på overflaten av stålkuponger, som når organismen var plassert i suspensjon. For 400 ppm QAC (dimetyl benzylammonium klorid) var det en reduksjon i cfu på mellom 5 og 6 log i suspensjonstest og mellom 1 og 2 log på overflatetest.

Årsaker til hvorfor biocider/desinfeksjonsmidler er mindre effektive på celler i biofilm enn på planktoniske celler kan være EPS produsert av biofilmen, som kanskje gjør det vanskelig for biocidene å penetrere, eller at midlene inaktiveres under passasje gjennom EPS, ved å reagere kjemisk med, eller binde seg til biocidet (Grinstead 2009; Langsrud 1998). Andre faktorer som også kan bidra til økt toleranse for desinfeksjonsmidler hos bakterier i biofilm er redusert vekstrate, begrenset næringstilgang og økt produksjon av biocid nedbrytende enzymer (Langsrud 1998). Det er foreslått at celler i biofilm kan komme i et slags hvilestadie. Denne responsen kalles generell stressrespons, og gir populasjoner av celler som syntetiserer høyt fosforylerte nukleotider ppApp og pppApp, og som en konsekvens blir resistent for desinfeksjonsmidler

(Russell et al. 2004). Men Pan et al. (2006) fant at forhøyet toleranse mot desinfeksjonsmidler skyldes egenskaper til biofilmen, og ikke iboende egenskaper til cellene.

2.6.3.2.1. BapL protein

Jordan et al. (2008) identifiserte et celleveggbundet protein, BapL, som hadde likheter med proteiner involvert i biofilmdannelse av stafylokokker. Det antas at BapL er et ekstracellulært protein, forankret i peptidoglykan i celleveggen. Proteinet har regioner som antas å være involvert i celledhering, gjennom protein-protein interaksjon og protein-karbohydrat interaksjoner, ved å virke som en del av den klebende matrixen hos *L. monocytogenes* (Cucarella et al. 2001; Jordan et al. 2008). Men flere *bapL*-negative feltisolater har vist evne til adheering til abiotiske overflater tilsvarende som *bapL*-positive stammer. Av 17 *L. monocytogenes* isolater, fant man *bapL* hos 4 av disse, hvorav 2 var isolert fra sjømatprodukter. (Jordan et al. 2008). Jordan et al. (2008) fant at en *L. monocytogenes* stamme uten *bapL* viste 50 % lavere grad av festing til rustfritt stål sammenliknet med en *L. monocytogenes* stamme med *bapL*. I kontrast fant de også at *L. monocytogenes* stammer isolert fra meieri og ost hvor *bapL* ikke ble påvist, også hadde høy grad av festing til stål.

Studien til Jordan et al. (2008) fant at det er minst to mekanismer bak varig festing til overflater hos *L. monocytogenes*: BapL-avhengig og BapL-uavhengig. Disse mekanismene ser ikke ut til å være distribuert med hensyn på serotype. Det ble funnet både *bapL*-positive og *bapL*-negative stammer blant 1/2a isolatene. Studien fant også at *bapL* ikke bare påvirker evnen til å feste seg til overflater, men også kraften nødvendig for å fjerne allerede festede celler. Men studien fant ikke en generell kobling mellom antallet *L. monocytogenes* celler festet til stål og kraften nødvendig for å løsne dem. Studien konkluderte med at biofilmdannelse er en prosess avhengig av mange faktorer, og at mer arbeid trengs for og fullt ut å forstå mekanismenes bak biofilmdannelse.

3. Materialer og metoder

Alle deler av forsøket som innebar arbeid med *Listeria monocytogenes*, ble utført i sikkerhetsbenk på patogen laboratoriet, og forberedelser ble utført i sterilbenker.

3.1. Bakteriestammer og dyrkningsbetingelser

Det ble tatt utgangspunkt i 27 ulike stammer av *Listeria monocytogenes*, hvor 23 stammer var isolert fra produksjonsmiljø i ulike kjøttbedrifter av Nofima, og 4 var kontrollstammer (tabell 3.1). Stammene var på forhånd typet med Multiple locus variable tandem-repeats analyser (MLVA) (Lindstedt et al. 2008), serotypet og blitt karakterisert som persistent eller sporadisk ved en binomial test basert på påfølgende funn i kjøtt- og fiskebedrifter som beskrevet av Malley et al. (2013).

Tabell 3.1 *Listeria monocytogenes* stammer brukt i dette forsøket. ^{g)}

Stamme	Persistent/sporadisk	MLVA profil	Serogruppe
MF 2184 ^{a)}		negativ kontroll PCR <i>bapL/bcrABC/qacH</i>	
MF 2624 ^{b)}		positiv kontroll PCR <i>bapL</i>	
MF 3005 ^{c)}		positiv kontroll PCR <i>bcrABC</i>	
MF 4977 ^{d)}		positiv kontroll PCR <i>qacH</i>	
MF 4545	Persistent	6-11-15-18-6	IIc
MF 4562 ^{f)}	Persistent	6-11-15-18-6	IIc
MF 4994 ^{f)}	Persistent	6-11-15-18-6	IIc
MF 4999	Persistent	6-11-15-18-6	IIc
MF 5372	Persistent	6-11-15-18-6	IIc
MF 4993 ^{f)}	Persistent	6-9-18-16-6	IIa
MF 5374 ^{f)}	Persistent	6-9-18-16-6	IIa
MF 5369	Persistent	6-9-18-16-6	IIa
MF 4624 ^{f)}	Persistent	7-11-15-18-6	IIc
MF 5406	Persistent	7-11-15-18-6	IIc
MF 3638	Persistent	7-7-10-10-6	IIc
MF 4712 ^{f)}	Persistent	7-7-10-10-6	IIc
MF 4991	Persistent	7-7-10-10-6	IIc
MF 5366	Persistent	7-7-10-10-6	IIc
MF 5367	Persistent	7-7-10-10-6	IIc
MF 4564 ^{f)}	Sporadisk	6-10-2-22-6	IIa
MF 4627 ^{f)}	Sporadisk	6-9-14-16-6	IIc
MF 4675 ^{f)}	Sporadisk	6-9-18-10-6	IIc
MF 5373 ^{f)}	Sporadisk	6-9-18-10-6	IIc
MF 4554 ^{f)}	Sporadisk ^{e)}	7-10-15-18-6	IIc
MF 4997	Sporadisk ^{e)}	7-10-15-18-6	IIc
MF 4563 ^{f)}	Sporadisk	7-11-15-19-6	IIc
MF 5370 ^{f)}	Sporadisk	7-7-11-10-6	IIa

a) Heir et al. (2004)

b) den Bakker et al. (2010)

c) Fugett et al. (2006)

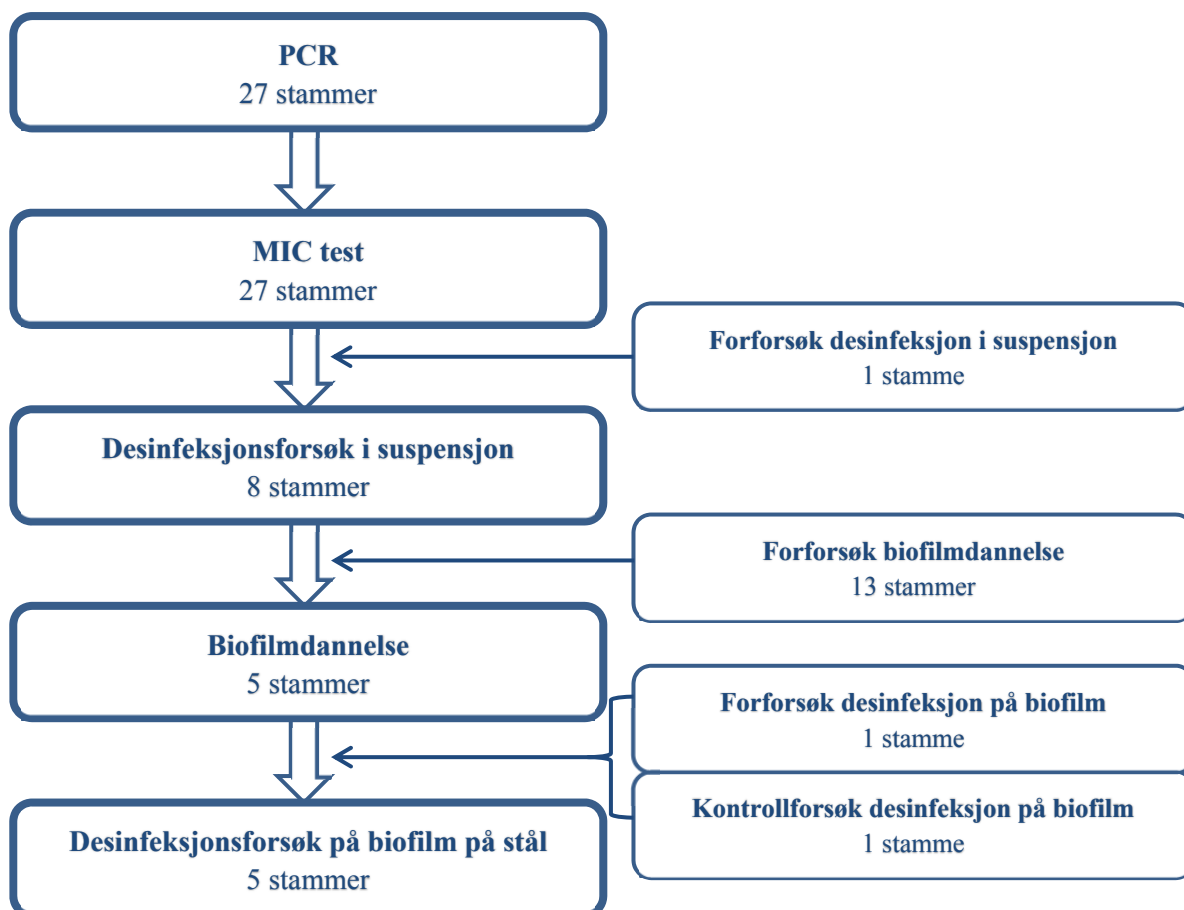
d) Muller et al. (2013)

e) Stammen ble kategorisert som sporadisk, men den ble påvist ved tidligere uttak samme sted som ikke ble tatt hensyn til i beregningen av p-verdi. Det er derfor mulig at denne stammen er persistent.

f) Forforsøk biofilmdannelse

g) Stammene er sortert etter om de antas å være persistente eller sporadiske, og MLVA profil. MF nummer refererer til Nofimas stammesamling.

Det ble laget egne frysekulturer av Nofimas frysestammer ved utplating av stammene på Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) agar. Skålene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer, før koloniplukking fra skålene og poding i rør med 1 ml flytende BHI. Rørene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer før 250 µl glyserol ble tilsatt, og kulturen ble plassert ved -20 °C for oppbevaring. Frysekulturene ble brukt til PCR, og til utstryk på BHI skåler og Blodagar (Blood Agar Base, Oxoid + 7 % Horseblood, Oxoid) (37 °C i 1 døgn). Alle medier ble sterilisert ved autoklaving ved 121 °C i 15 min. Støpte agarskåler ble oppbevart ved 4 °C, og flytende medie oppbevart i romtemperatur fram til bruk, med unntak av D/E som ble oppbevart kjølig fram til bruk. Ionebyttevann ble brukt til tillaging ved alle mediene. Alt ionebyttevann som ble brukt under forsøket, ble også sterilisert ved autoklaving ved 121 °C i 15 min. Forsøk i oppgaven ble utført i flere trinn og med flere metoder (figur 3.1).



Figur 3.1 Flytskjema over forsøkene utført i denne oppgaven.

3.2. Kartlegging av forekomst av *bapL*, *bcrABC* og *qacH* gen med Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR ble brukt for å undersøke om de 27 stammene kunne inneha gener knyttet til biofilmdannelse (*bapL*), og/eller resistens mot desinfeksjonsmidler (*bcrABC* og *qacH*). PCR ble kjørt for alle stammene samtidig, og de tre genene ble testet samme dag. En prøve fra hver av de 27 frysestammene ble strøket ut på BHI-skåler og inkubert ved 37 °C i 24 timer. Etter endt inkubasjon ble en koloni fra hver skål overført til hver sin brønn på et 96-brønns PCR-brett (FALCON® Microtest™ 96 brønns, Becton Dickinson Labware, New Jersey, US), som deretter ble kokt i mikrobølgeovn på full effekt i 1 minutt for og lysere cellene. PCR miks ble tillaget av 12,5 µl 2xQ (2xQIAGEN Multiplex PCR Master Mix, Venlo, Netherlands), 0,5 µl forward primer (10pmol/µl), 0,5 µl revers primer (10pmol/µl), og 11,5 µl dH₂O, og tilsatt til brønnene med de lyserte cellene. Spesifikke primere ble brukt til PCR (tabell 3.2). PCR ble kjørt på Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Tabell 3.2 PCR primere brukt til kartlegging av gener knyttet til biofilmdannelse (*bapL*), og resistens mot kvartære ammoniumforbindelser (*bcrABC* og *qacH*).

Gen	Primere	Sekvens (5' → 3')	Størrelse (bp)	Referanse
<i>bapL</i>	BapL_fwd	TAGGTACCTGCTGGTACTTCTGGCA	919	Jordan et al. (2008)
	BabL_rev	ATGAAGCTCACCTGCTACGTCCTCC		
<i>bcrABC</i>	BcrABC_P1_F	CATTAGAAGCAGTCGCAAAGCA	1100	Elhanafi et al. (2010)
	BcrABC_P2_R	GTTTTTCGTGTCAGCAGATCTTTGA		
<i>qacH</i>	QacH_Lmono_fwd	ATGTCATATCTATATTTAGC	366	Muller et al. (2013)
	QacH_Lmono_rev	TCACTCTTCATTAATTGTAATAG		

PCR-betingelsene var initieringstemperatur 95 °C 15 minutter, denaturering ved 94 °C 30 sekunder, annealing ved 45 °C for *bapL*, 56 grader for *qacH* og 60 grader for *bcrABC* i 90 sekunder, elongering ved 72 °C i 30 sek for *qacH* og 90 sek for *bapL* og *bcrABC*, og tilslutt 72 °C 10 min. Denaturering, annealing og elongering for *bcrABC* og *qacH* ble kjørt med 30 sykluser, mens det ble for *bapL* ble kjørt 35 sykluser.

For kjøring av PCR-produkt på 0,7 % agarose gel (Certified™ Molecular Biology Agarose, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) tilsatt 0,01 % GelRed (GelRed Nucleic Acid Stain, Biotium, Hayward, USA), ble 5 µl PCR-produkt tilsatt til 2 µL Orange G (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) (6 µl av dette til hver brønn). Standard VI (DNA Molecular weight marker, Roche, Basel, Schweiz) ble brukt som ladder. Gel ble kjørt på 100 V i ca. 25 min. Bilde av gel ble tatt i Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad Laboratories), og redigert med Image Lab 4.1 (Bio-Rad Laboratories).

Det ble gjort ett separat gjentak av dette forsøket. Ved usikkerhet rundt resultater, ble det for noen stammer/gener utført flere gjentak.

3.3. Test av minste hemmende konsentrasjon (MIC test) av benzalkoniumklorid (BC)

Samtlige 27 stammer ble undersøkt for toleranse for benzalkoniumklorid (BC, Sigma-Aldrich) i suspensjon. Dette ble gjort ved å måle den minste veksthemmende konsentrasjon av BC (MIC test). Overnattkultur ble tillaget av kolonier dyrket på forhånd på blodagar, som ble overført til rør med 3 ml Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid), og inkubert ved 30 °C på risteinkubator med 200 rpm over natt. De ulike konsentrasjonene av BC ble tillagd samme dag som de skulle brukes, hvor det ble tatt utgangspunkt i en 250 000 ppm stamløsning av BC, som også ble brukt som stamløsning i alle videre forsøk. Videre fortyninger ble gjort i TSB tilsatt 0,6 % gjærekstrakt (TSB+YE, Yeast Extract, Oxoid). Overnattkulturen ble på forsøksdagen fortynt 100 ganger i TSB (100 µl til 10 ml), og brukt som inokulum (ca. $2-3 \times 10^7$ CFU/ml). BC løsning (180 µl) og inokulum (20 µl) ble blandet i 96 brønns mikrotiterbrett (FALCON® Microtest™ 96 well, Becton Dickinson Labware) med en BC konsentrasjon per rad (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 og 10 ppm) og en stamme per kolonne. I den første kolonnen (kontroll) ble det ikke tilsatt bakterie, men 20 µl ekstra medium (TSB+YE), slik at totalvolumet i alle brønner ble 200 µl. Brettene ble deretter inkubert 20 timer ved 30 °C. Etter endt inkubasjon ble brettet ristet på ristebrett i 2 minutter, før OD_{600nm} ble målt på automatisk mikrotiterplate spektrofotometer (Multiscan RC-351; LabSystem Oy, Helsinki, Finland). Grenseverdi for vekst (MIC-verdi) ble satt til OD_{600nm} < 0,05, når OD var trukket fra kontroll. Ved første gjentak ble 11 stammer vilkårlig valgt testet først, og de resterende stammene noen dager senere, mens ved andre gjentak ble samtlige stammer testet samtidig.

Videre ble stammene delt inn i grupper etter målt toleranse for BC, for testing i nye konsentrasjoner av BC. Stammer med en beregnet MIC_{0,05} verdi på 6, 8 og 10 ppm ble testet i konsentrasjonen 0, 4, 5, 6, 7, 8, 9 og 10 ppm BC, mens stammer med en beregnet MIC_{0,05} verdi på 2 og 4 ppm ble testet i konsentrasjonene 0, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 og 4 ppm BC. Samme prosedyre som tidligere ble fulgt, med to gjentak av forsøket.

OD_{600nm} ble også avlest etter ett ekstra døgn ved 30 °C, for å se om veksten faktisk var stoppet etter 20 timer. Detaljer rundt dette kan sees i vedlegg 1.

3.4. Suspensjonstest

For å finne drapeseffekten av BC i suspensjon, ble det utført en suspensjonstest. For å finne en egnet konsentrasjon av BC, ble det utført et forforsøk hvor ulike konsentrasjoner (10, 20, 30 ppm) av BC ble testet på en utvalgt stamme (MF 4624).

Ut fra resultatene fra forforsøket ble konsentrasjonen 10 ppm BC valgt til suspensjonstest av åtte stammer (4563, 4624, 4993, 4675, 4562, 5370, 4994, 4545). Utvalget ble gjort slik at det ble testet sporadiske og persistente stammer, med lav og høy MIC, og som var positive for *qacH* og *bcrABC*. Overnattkultur av alle stammene ble tillaget ved å overføre noen kolonier fra dyrkede BHI-skåler til 3 ml TSB, og inkubere rørene ved 30 °C over natt. På testdagen ble overnattkulturen fortynnet 10 ganger i peptonvann (1 ml til 9 ml). Videre ble 0,5 ml av fortynnet bakteriesuspensjon (ca. $2-3 \times 10^8$ CFU/ml) overført til 4,5 ml 10 ppm BC eller dH₂O (kontroll), før forsiktig risting for å blande godt. Etter 5 minutter ble 0,5 ml av denne løsningen overført til 4,5 ml Dey/Engley Neutralizing Broth (D/E, Difco™, Becton, Dickinson and Company), og platet ut på Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid) skåler ved bruk av en automatisk platespreder (Whitley automatic spiral plater, Don Whitley Scientific, Shipley, UK). Skålene ble inkubert ved 30 °C i to døgn. Avlesing av skåler ble utført med automatisk koloniteller (ACOLyte, Synbiosis, Cambridge, UK). Det ble gjort tre gjentak av dette forsøket.

3.5. Biofilmdannelse på stål

3.5.1. Forforsøk biofilmdannelse

Biofilmdannelse for 13 stammer (tabell 3.1) ble testet på stålkuponger for å vurdere hvilke stammer som danner biofilm, samt danne et grunnlag for hvilke stammer man skulle gå videre med til desinfeksjonsforsøk på biofilm. Prosedyre beskrevet i avsnitt 3.5.2. og 3.5.3. Det ble ikke gjort gjentak av forsøket.

3.5.2 Dyrkning av biofilm

Biofilmdannelse på stål av fem ulike stammer (4563, 4624, 4993, 4675, 4562) av *L.monocytogenes* ble undersøkt. Stammene var på forhånd dyrket på BHI-skåler, og kolonier fra disse skålene ble dyrket over natt i rør med 3 ml TSB. Dagen etter ble overnattekulturen til hver stamme fortynnet 1000x i TSB+YE (40 µl i 40 ml), og 5 ml av denne bakteriesuspensjonen (ca. $2-3 \times 10^6$ CFU/ml) ble så tilsatt til 6-brønns cellekulturplater (FALCON® Multiwell™, Becton Dickinson Labware) med steriliserte, rustfrie stålkuponger (AISI 304, 2x2 cm), én kupong i hver brønn. Brettene ble inkubert 3 timer ved 30 °C for at bakteriene skulle feste seg. Etter endt inkubasjon ble suspensjonen pipettert av, og for å vaske kupongene ble 5 ml sterilt destillert vann (dH₂O) tilsatt og pipettert av igjen, før kupongene ble overført til en ny 6-brønns cellekulturplate. 3 ml TSB+YE ble tilsatt, og biofilm ble dyrket i 48 t ved 30 °C. Etter de 48 timene ble suspensjonen pipettert av, 3 ml sterilt dH₂O tilsatt og etter forsiktig bevegelse (slik at kuponger ble vasket i vannet) ble vannet pipettert av.

3.5.3. Kvantifisering av biofilmdannelse

De vaskede kupongene ble så overført til brede glassrør (56 ml, Ø3 cm), som inneholdt 6 ml peptonvann. Rørene ble sonikert i et sonikeringskar (Branson ultrasonic cleaner, Branson Ultrasonics, Danbury, US) 10 minutter ved 40 kHz ved romtemperatur, og peptonvannet fra disse rørene ble platet ut på TSA skåler med WASP etter sonikeringen. TSA skålene ble inkubert 48 t ved 30 °C, og lest av med automatisk koloniteller. Det ble gjort tre gjentak av forsøket.

3.6. Desinfeksjonsforsøk på biofilm på stål

Et forforsøk hvor drapeseffekten av 50, 100 og 200 ppm BC på biofilm av MF 4624 ble undersøkt, for å vurdere hvilken konsentrasjon BC man skulle bruke i et videre desinfeksjonsforsøk på biofilm på stål. I tillegg ble det for å optimalisere desinfeksjonsforsøk på biofilm, utført et kontrollforsøk med biofilm på stålkuponger, hvor effekten av antall vasketrinn, sonikering og risting under biofilmdannelse av MF 4624 ble undersøkt. Detaljer kan sees i vedlegg 1.

Stammene som ble testet for biofilmdannelse, ble testet i et desinfeksjonsforsøk på biofilm på stål, hvor utfra resultatene til forforsøket, drapeseffekten av 50 ppm BC ble undersøkt. Dyrkning av biofilm på stålkuponger ble utført som beskrevet i avsnitt 4.5.2. To kuponger med biofilm ble overført til 6 ml 50 ppm BC, og to av kupongene til 6 ml sterilt destillert vann (dH₂O) (kontroll). Etter 5 minutter ble kupongene overført til 6 ml D/E, mens den gjenværende suspensjonen med BC/ dH₂O, ble tilsatt 34 ml D/E. Kupongene i 6 ml D/E ble sonikert i 10 min ved 40 kHz ved romtemperatur, og fortykning og utplating på TSA skåler med WASP ble gjort fra både sonikeringsrørene og den gjenværende suspensjonen tilsatt D/E. TSA skålene ble inkubert i 48 t ved 30 °C, før de ble lest av med automatisk koloniteller. Det ble gjort tre gjentak av forsøket.

Ved et av gjentakene ble kuponger med biofilm før sonikering, og sonikerte kuponger eksponert for BC og dH₂O, mikroskopert. Det ble tilsatt 100 µl 0,01 % acridine orange (AO, Sigma-Aldrich) på kupongene mens de var i brettet, og som ble vasket av med destillert vann etter 15 min. Kupongene ble mikroskopert med fluorescensmikroskop (Leica DM6000 B, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), og bilder ble tatt med Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, USA).

3.7. Statistikk

MINITAB™ (versjon 16, Minitab Inc.) ble brukt til alle statistiske analyser, utenom Fisher's Exact Test (<http://research.microsoft.com/en-us/um/redmond/projects/mscompbio/fisherexacttest/>), som ble brukt til analyse av MIC-verdier mot toleranse og persistens. Det ble brukt et signifikantnivå på 5 % ($p < 0,05$). Diagrammer ble laget i Excel.

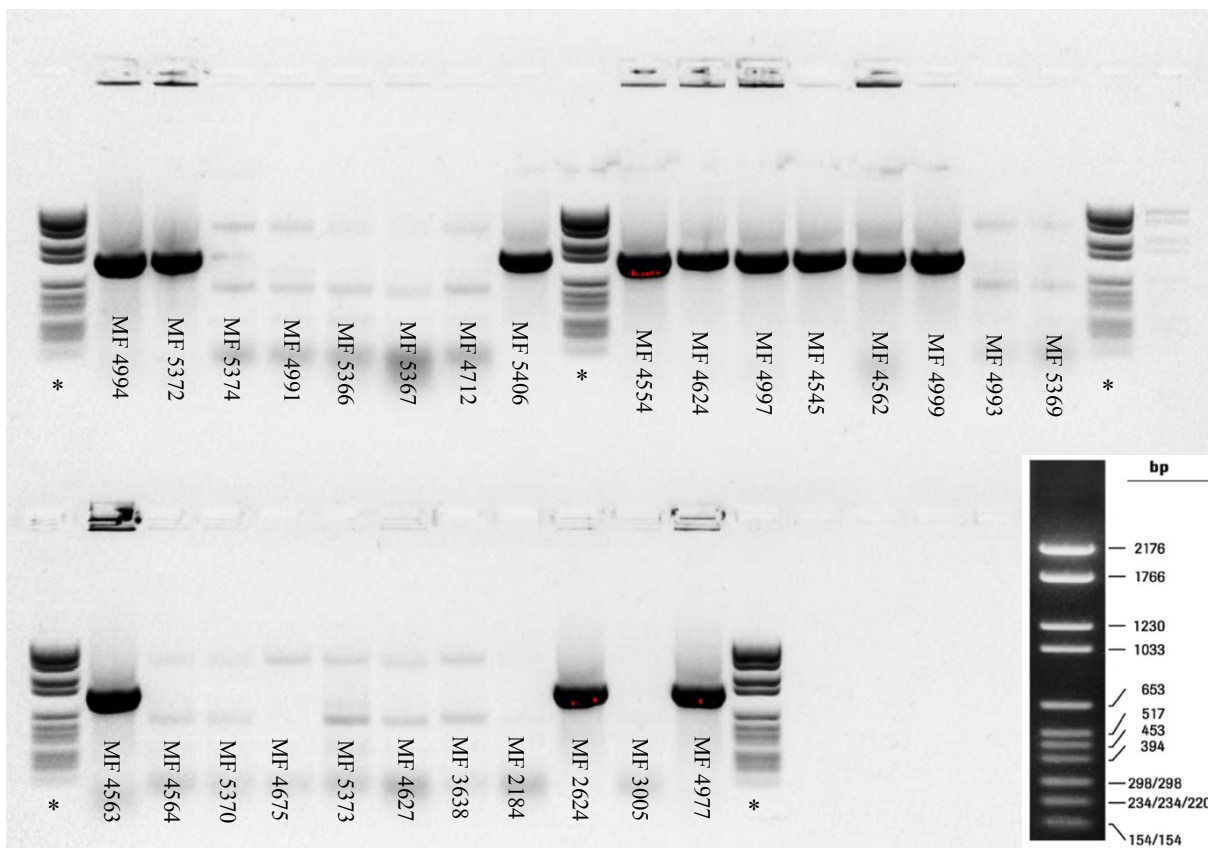
4.0 Resultater

4.1. Forekomst av *bapL*, *bcrABC* og *qacH*

PCR ble utført på 27 ulike stammer av *L. monocytogenes*, og produktet kjørt på gel.

4.1.1. *bapL*

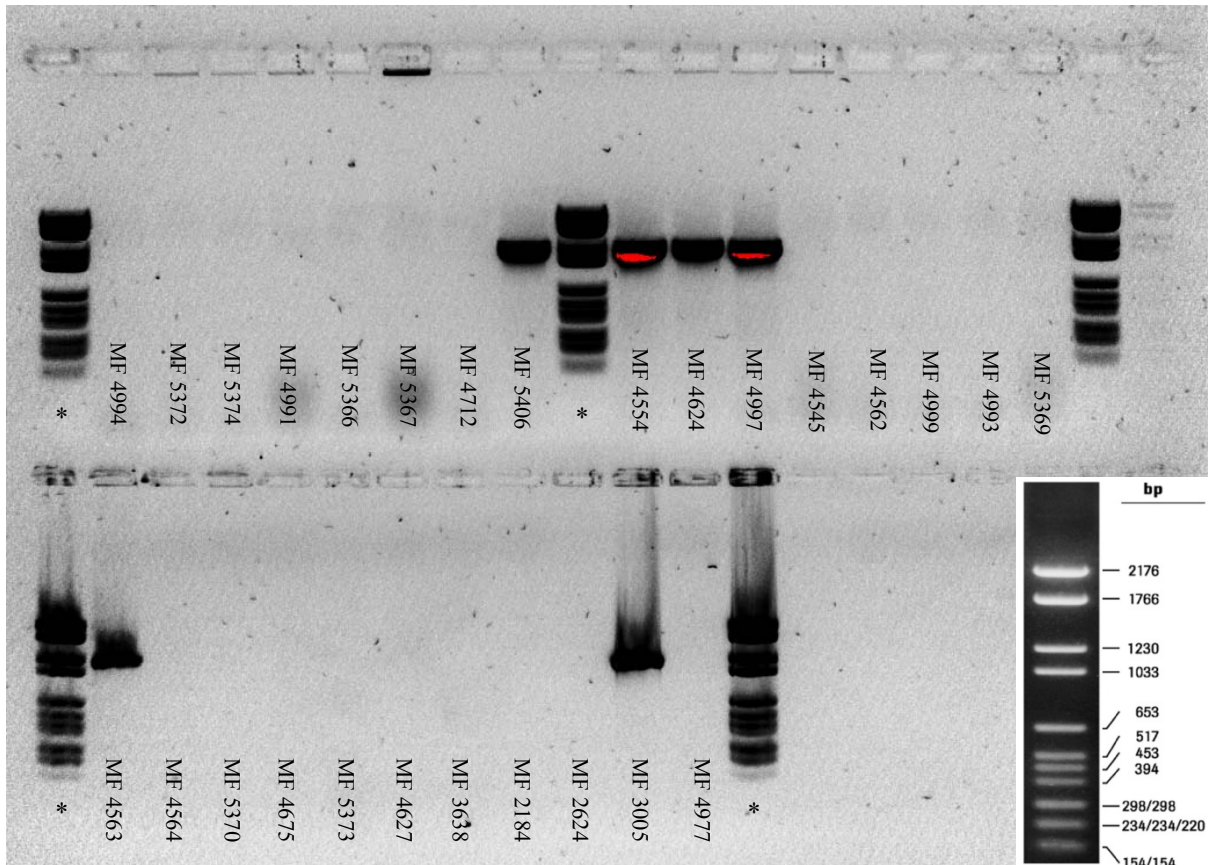
Av 27 stammer gav 12 stammer bånd på gel, inkludert positiv kontroll for *bapL*, alle med en størrelse på ca. 900 bp (figur 4.1). Disse antas derfor å inneha *bapL*. Genet *bapL* knyttes til biofilmdannelse hos *L. monocytogenes*.



Figur 4.1 Gelbilde PCR produkt til 27 stammer av *Listeria monocytogenes* hvor primere for *bapL* genet ble brukt. Bånd viser til tilstedeværelse av gen. Positiv kontroll er stamme MF 2624. Brønner markert med * inneholder en størrelsesmarkør med DNA-fragmenter av kjent størrelse.

4.1.2. *bcrABC*

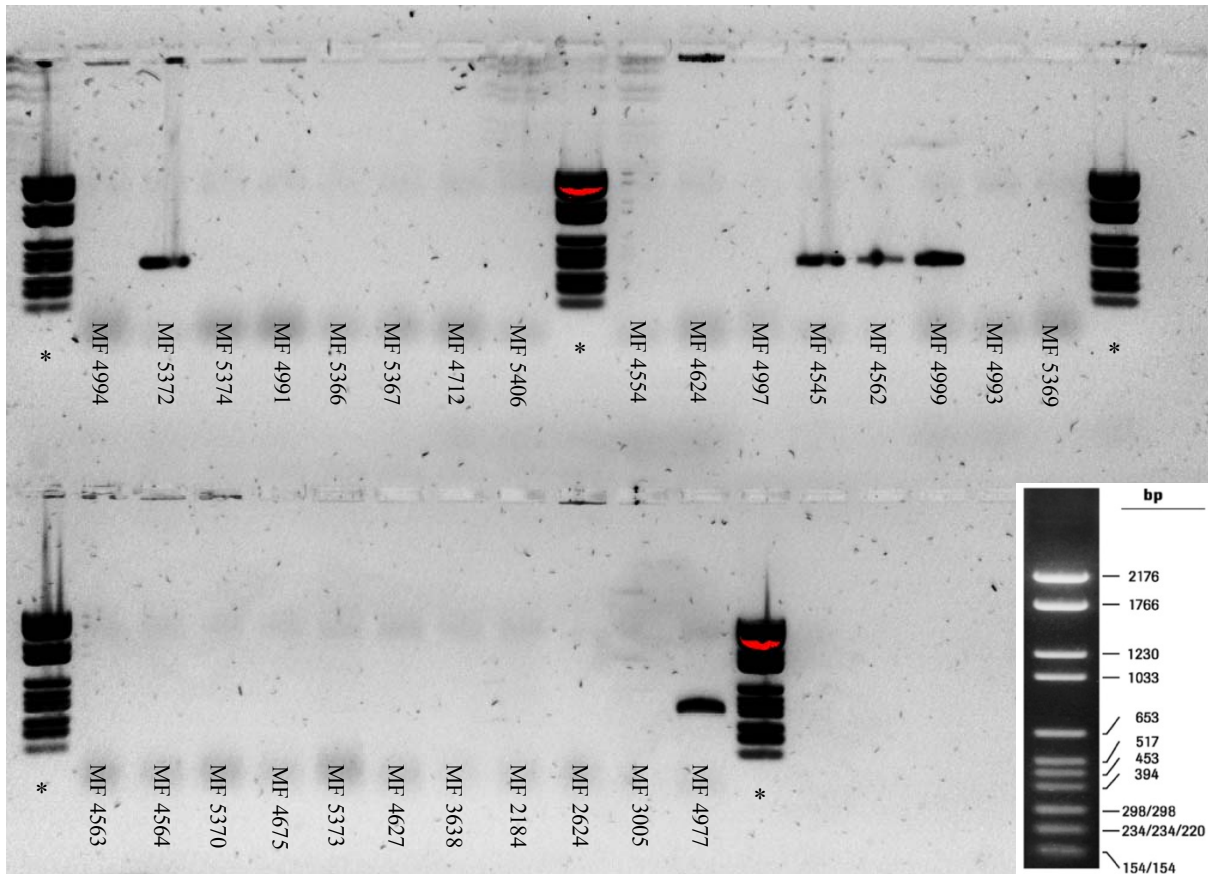
Av 27 stammer gav 6 stammer bånd på gel, inkludert positiv kontroll for *bcrABC*, alle med en størrelse på ca. 1100 bp (figur 4.2). Disse antas derfor å inneha *bcrABC*. Genkassetten *bcrABC* knyttes til resistens mot kvartære ammoniumforbindelser hos *L. monocytogenes*. Stamme MF 4993 ble ved ett av to gjentak positiv for *bcrABC*.



Figur 4.2 Gelbilde PCR produkt til 27 stammer av *Listeria monocytogenes* hvor primere for *bcrABC* genkassetten ble brukt. Bånd viser til tilstedeværelse av gen. Positiv kontroll er stamme MF 3005. Brønner markert med * inneholder en størrelsesmarkør med DNA-fragmenter av kjent størrelse.

4.1.3. *qacH*

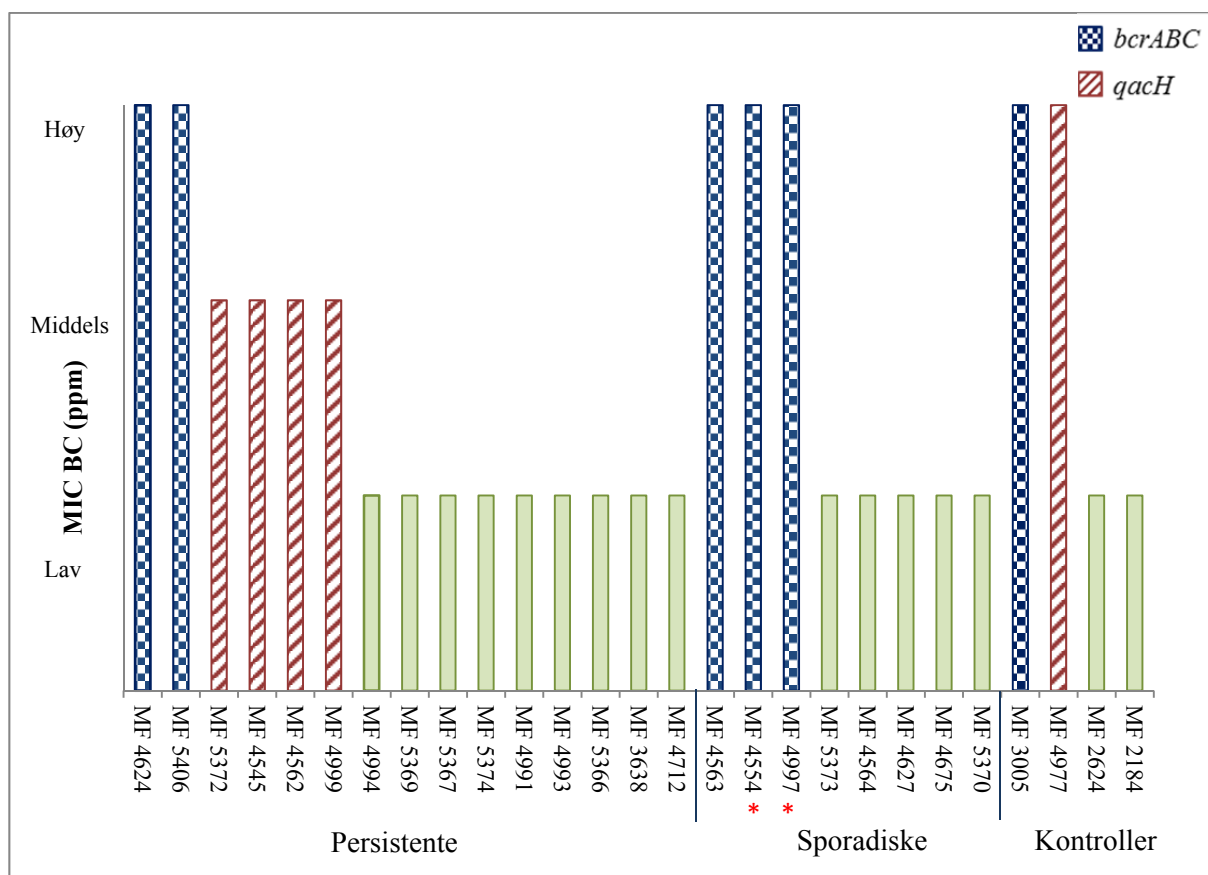
Av 27 stammer gav 5 stammer bånd på gel, inkludert positiv kontroll for *qacH*, alle med en størrelse på ca. 450 bp (figur 4.3). Disse antas derfor å inneha *qacH*. Genet *qacH* knyttes til resistens mot kvartære ammoniumforbindelser hos *L. monocytogenes*. Stamme MF 5373 ble ved ett av fire gjentak positiv for *qacH*, og MF 4999 ble ved ett av fire gjentak negativ for *qacH*.



Figur 4.3 Gelbilde PCR produkt til 27 stammer av *Listeria monocytogenes* hvor primere for *qacH* genet ble brukt. Bånd viser til tilstedeværelse av gen. Positiv kontroll er stamme MF 4977. Brønner markert med * inneholder en størrelsesmarkør med DNA-fragmenter av kjent størrelse.

4.2. Minste hemmende konsentrasjon (MIC) av benzalkoniumklorid (BC)

Det ble undersøkt hvilken konsentrasjon av benzalkoniumklorid (BC) som hemmet veksten til de 27 ulike stammene. Sju stammer hadde høy toleranse ($MIC \geq 8$ ppm BC), fire hadde middels toleranse (MIC 5-6 ppm BC), og resterende seksten stammer lav toleranse ($MIC \leq 4$ ppm BC) (figur 4.4). Det var en signifikant sammenheng mellom toleranse og påvisning av *qacH/bcrABC* (Fishers exact test; høy/middels toleranse vs *qacH/bcrABC*, $p=0,000$). Fem av de seks høytolerante stammene hadde i tillegg *bapL* (ikke vist). 14 av 16 lavtolerante stammer hadde ingen av de undersøkte genene (*qacH*, *bcrABC* eller *bapL*), mens to hadde *qacH*. Det var ingen statistisk sammenheng mellom persistens og forekomst av *qacH/bcrABC*, eller persistens og toleranse.



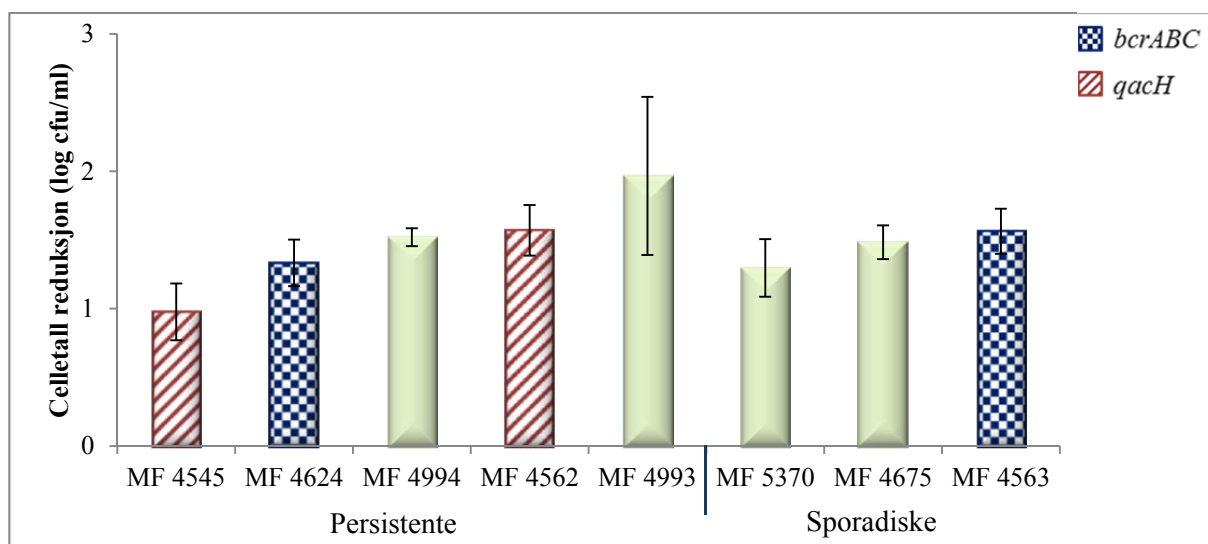
Figur 4.4 Minste hemmende konsentrasjon (MIC) av benzalkoniumklorid (BC) for vekst for 27 stammer av *Listeria monocytogenes*. Stammene med med lav, middels og høy MIC, hadde MIC verdier på henholdsvis 2-4, 5-6 og 8-10 ppm BC. Alle stammer tilhørte samme MIC-gruppe i alle fire gjentak. Det er angitt om stammene er persistente og sporadiske, eller kontroller for PCR, samt om stammene var positive for *bcrABC* eller *qacH* gener. *Stammene ble kategorisert som sporadisk, men det er mulig at disse stammene er persistente.

4.3. Suspensjonstest

Det ble gjort et forforsøk med stamme MF 4624 for å bestemme hvilken konsentrasjon BC som skulle brukes til suspensjonstest. Stammen MF 4624 ble valgt da stammen var positiv for *bcrABC*, og hadde høy toleranse for BC utfra MIC verdier. Konsentrasjonene 10, 20, 30 ppm BC ble testet. Ingen gjentak ble gjort av forsøket. Resultatet viste et gjennomsnittlig celledtall på 6,26 log cfu/ml på kontroll, og en log reduksjon ved 10, 20 og 30 ppm BC, på henholdsvis 2,09, 5,53 og 5,78 cfu/ml.

Det ble valgt 10 ppm BC i gjentak og det ble valgt åtte stammer (4563, 4624, 4993, 4675, 4562, 5370, 4994, 4545) utfra stammens toleranse for BC (MIC-verdier), om stammene var persistente/sporadiske og forekomst av *bcrABC* og *qacH* hos stammene.

Det var under 1 log verdi forskjell mellom den minst og mest tolerante stammen (figur 4.5). Det var ingen statistisk signifikant sammenheng mellom forekomst av *qacH* eller *bcrABC* og toleranse for BC i suspensjon. Sporadiske stammer var ikke statistisk signifikant mer eller mindre tolerante for BC i suspensjon enn persistente stammer.



Figur 4.5 Drapeseffekt av 10 ppm benzalkoniumklorid på 8 stammer av *Listeria monocytogenes* i suspensjon. Verdiene er angitt som gjennomsnitt av tre gjentak med standardavvik. Stammene er sortert etter om de er persistente eller sporadiske. Det er angitt om stammene var positive for *bcrABC* eller *qacH* gener.

4.4. Biofilmdannelse på stål

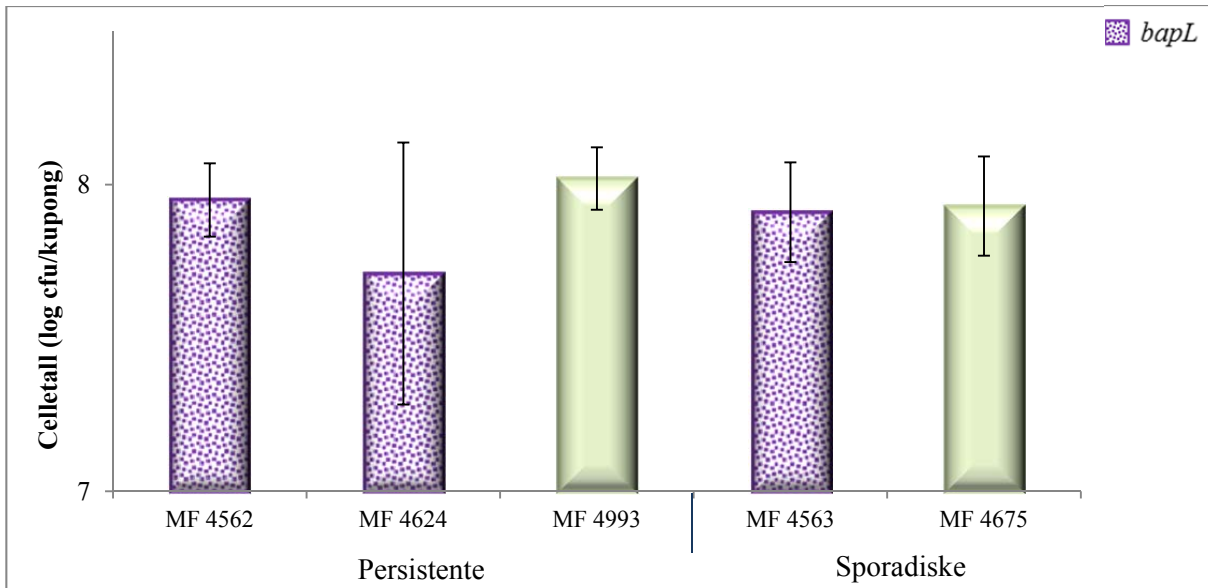
Et forforsøk av biofilmdannelse på stålkuponger ble utført, for å finne gode biofilmdannere. Tretten ulike stammer ble valgt (tabell 4.1). Utvalget ble gjort slik at det ble valgt både persistente og sporadiske stammer, stammer med og uten *bapL* og *qacH/bcrABC*.

Tabell 4.1 Biofilmdannelse av 13 ulike stammer av *Listeria monocytogenes* på stålkuponger. Verdiene er angitt som gjennomsnitt av to kuponger.

Stamme	Celletall (log cfu/kupong)
MF 4712	8,0
MF 4564	8,1
MF 4675	8,2
MF 4627	8,2
MF 5373	8,2
MF 5370	8,2
MF 4554	8,2
MF 4994	8,3
MF 4563	8,3
MF 5374	8,3
MF 4562	8,4
MF 4624	8,4
MF 4993	8,4

Fem stammer (4562, 4624, 4993, 4675, 4563) ble valgt ut for videre arbeid innen biofilmdannelse. Utvalget ble gjort slik at det ble valgt både persistente og sporadiske stammer, stammer med og uten *bapL*.

Gjennomsnittlige celletall varierte fra 7,7 og 8,0 log cfu/kupong (figur 4.6). Det var ingen statistisk signifikant sammenheng mellom biofilmdannelse og forekomst av *bapL*. Sporadiske stammer hadde ikke signifikant høyere eller lavere biofilmdannelse enn persistente stammer.



Figur 4.6 Biofilmdannelse av fem ulike stammer av *Listeria monocytogenes* etter 2 døgn dyrking ved 30 °C på stålkuponger. Verdiene er angitt som gjennomsnitt av tre gjentak med standardavvik. Stammene er sortert etter om de er persistente eller sporadiske. Det er angitt om stammene var positive for *bapL* gen.

4.5. Desinfeksjonsforsøk på biofilm

For å bestemme hvilken konsentrasjon av BC som skulle brukes til desinfeksjonsforsøk på biofilm, ble ulike konsentrasjoner av BC testet på biofilm av stamme MF 4624 (tabell 4.2). Konsentrasjonene var 50, 100 og 200 ppm BC.

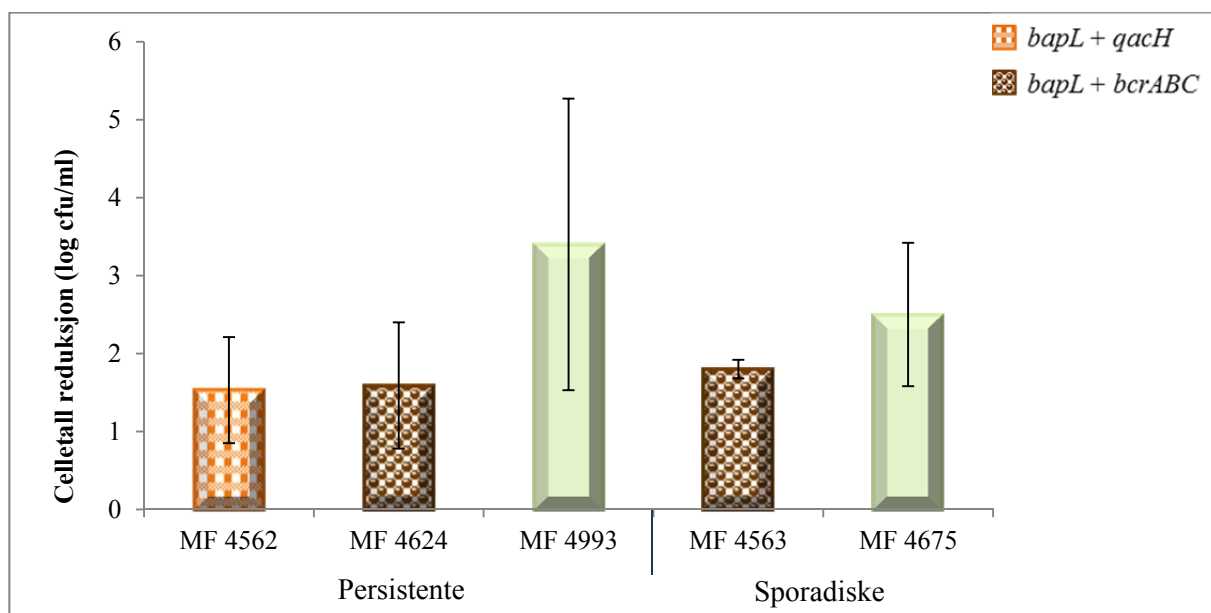
Tabell 4.2 Drapeseffekt av ulike konsentrasjoner av benzalkoniumklorid på celler av *Listeria monocytogenes* MF 4624 i biofilm. Biofilm ble dyrket 2 døgn ved 30 °C på stålkuponger. Verdiene er resultat fra en parallell/kupong.

Konsentrasjon BC (ppm)	Celle tall på kupong (log cfu/kupong)	Celle tall i gjenværende suspensjon (log cfu/ml)
0 (kontroll)	6,00	4,33
50	3,02	2,74
100	2,15	1,53
200	1,78	<1

50 ppm BC ble valgt til videre arbeid. Drapeseffekt ble undersøkt på de fem stammene av *L. monocytogenes* som ble undersøkt for biofilmdannelse.

Stammene som var negative for både *bapL*, *bcrABC* og *qacH*, viste størst log reduksjon, og derav lavest toleranse for BC, mens stammene som var mest tolerante for BC var positive for *bapL* i tillegg til *qacH* eller *bcrABC* (figur 4.7).

Stammer med *bapL* og *qacH*, eller *bapL* og *bcrABC* hadde en høyere overlevelse etter eksponering for BC i biofilm ($p=0,018$), enn stammer uten *bapL* og *qacH/bcrABC*. I og med at alle stammer som var positive for *bapL*, også var positive for *bcrABC* eller *qacH*, var det ikke mulig å teste effekt av *bapL* separat. Det var ingen statistisk signifikant sammenheng mellom forekomst av *qacH* eller *bcrABC* enkeltvis og overlevelse etter eksponering av BC i biofilm. Det var ingen forskjell i toleranse for BC mellom persistente og sporadiske stammer.

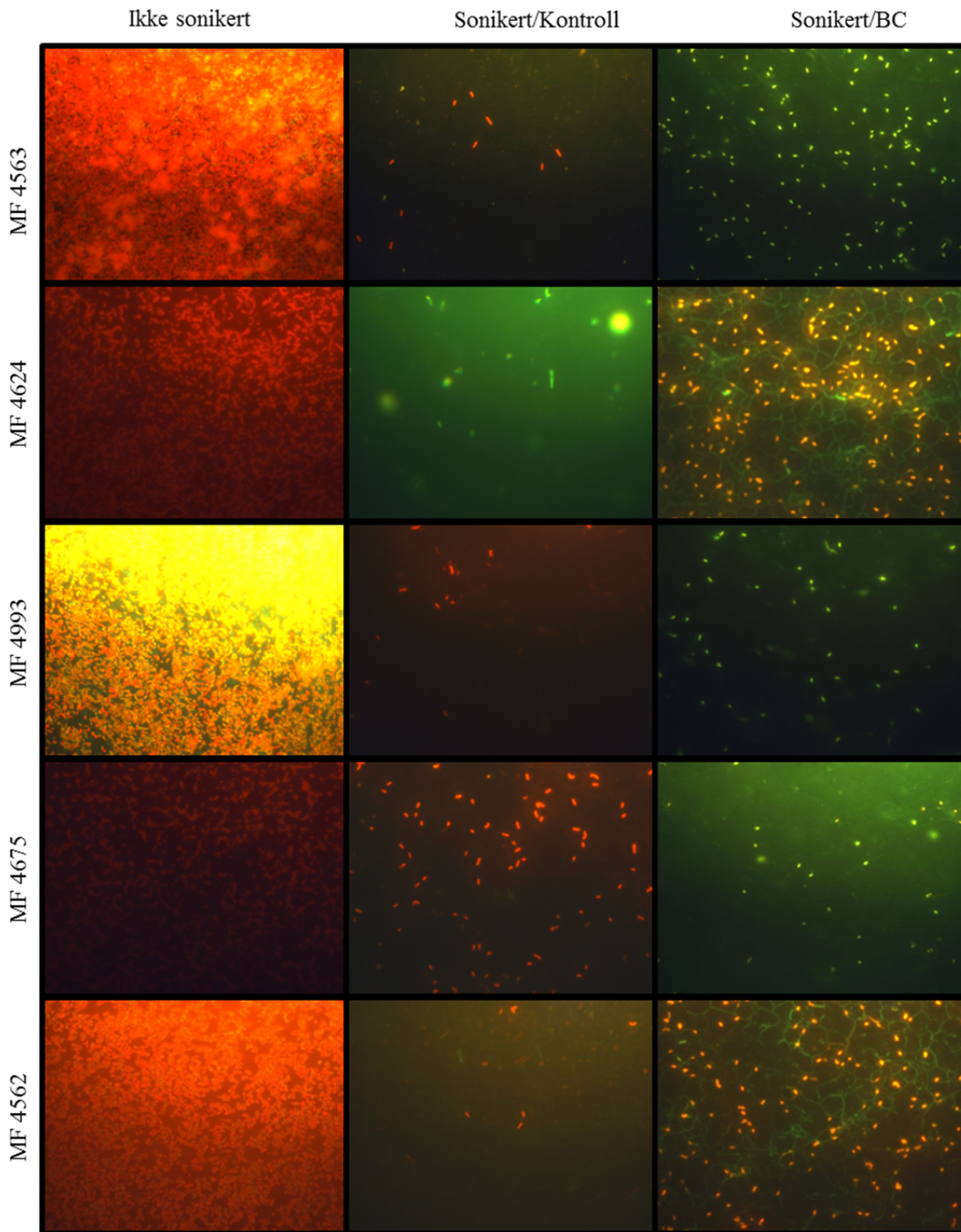


Figur 4.7 Drapeseffekt av 50 ppm benzalkoniumklorid på celler av fem ulike stammer av *Listeria monocytogenes* i biofilm. Biofilm var dyrket 2 døgn ved 30 °C på stålkuponger. Verdiene er angitt som gjennomsnitt av tre gjentak med standardavvik. Stammene er sortert etter om de er persistente eller sporadiske. Det er angitt om stammene var positive for *qacH/ bcrABC* og *bapL* gen.

4.6. Mikroskopi av biofilm fra desinfeksjonsforsøk

Sonikering ble brukt som metode for å løsne celler i biofilm. Metoden ble undersøkt ved mikroskopi. Effekt av BC på celler i biofilm ble også undersøkt ved mikroskopi.

Ved samtlige kuponger var det signifikant færre celler etter sonikeringsprosedyre og behandling med dH₂O og BC. Etter sonikering var det mindre celler på kontrollkupongene sammenliknet med kuponger behandlet med BC ved samtlige stammer, med unntak av MF 4675, hvor det omvendte var tilfelle (figur 4.8).

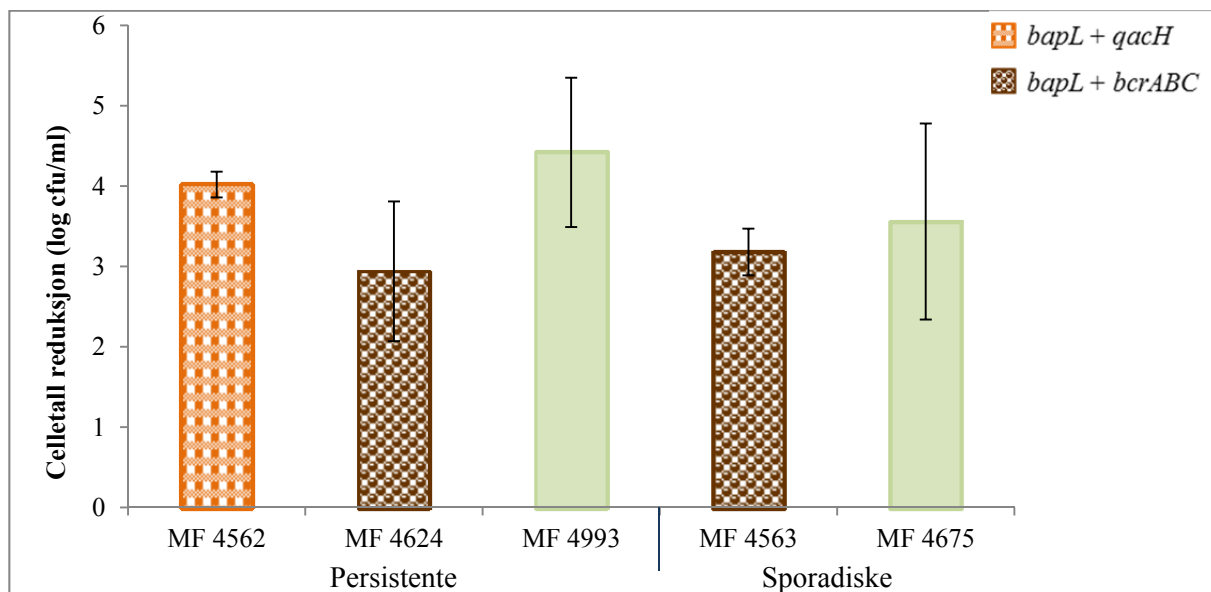


Figur 4.8 Representative mikroskopibilder av stålkuponger. Biofilm av 5 stammer av *Listeria monocytogenes* før sonikering, og etter sonikering etter behandling med enten dH₂O (kontroll) eller benzalkoniumklorid.

4.7. Drapeseffekt av BC på celler i gjenværende suspensjon fra biofilmforsøk

Under desinfeksjonsforsøket ble stålkuponger med biofilm eksponert for suspensjon med 50 ppm BC eller dH₂O (kontroll). Drapeseffekt på celler i den gjenværende suspensjonen fra biofilmforsøk ble undersøkt.

Det var liten forskjell i overlevelse mellom de fem stammene (figur 4.9). Det var høyere reduksjon av celtall etter desinfeksjon for den gjenværende suspensjonen, enn for biofilm/kupong. Det var ingen statistisk signifikant sammenheng mellom forekomst *bapL* og *qacH*, eller *bapL* og *bcrABC*, og drapeseffekt i gjenværende suspensjon. Persistente stammer hadde heller ikke ulik toleranse for BC enn sporadiske. Det var ingen statistisk korrelasjon mellom drapeseffekt i gjenværende suspensjon og suspensjonstest (10 ppm BC), eller drapeseffekt på celler i biofilm på stålkupong ($p=0,063$ og $0,224$).



Figur 4.9 Drapeseffekt av 50 ppm benzalkoniumklorid på celler i gjenværende suspensjon fra desinfeksjonsforsøk på biofilm av 5 ulike stammer av *Listeria monocytogenes* på stålkuponger. Verdiene er angitt som gjennomsnitt av tre gjentak med standardavvik. Stammene er sortert etter om de er persistente eller sporadiske. Det er angitt om stammene var positive for *qacH/bcrABC* og *bapL* gen.

5. Diskusjon

Resultatene fra minste hemmende konsentrasjon av BC (MIC-test) tyder på at forhøyet toleranse for benzalkoniumklorid (BC) hos *Listeria monocytogenes* kan forklares av *qacH* eller *bcrABC*, som er gener knyttet til resistens mot kvartære ammoniumforbindelser (QAC). Samtlige stammer positive for enten *bcrABC* eller *qacH*, hadde middels (BC MIC 5-6 ppm) eller høy (BC MIC 8-10 ppm) toleranse, mens stammer uten *qacH* eller *bcrABC* hadde lav toleranse (BC MIC 2-4 ppm). Tidligere studier har vist forhøyet toleranse for BC hos *L. monocytogenes* stammer positive for *qacH* (Muller et al. 2013) og *bcrABC* (Dutta et al. 2013; Elhanafi et al. 2010). Av 91 *L. monocytogenes* stammer, fant Muller et al. (2013) *qacH* i 10 av stammer isolert fra matproduksjonsmiljøer og råvarer. Stammer med *qacH* hadde signifikant høyere toleranse for BC enn stammer uten *qacH* (BC MIC $28,5 \pm 4,7$ ppm mot $14 \pm 3,2$ ppm). I tillegg fant de at *L. monocytogenes* mutanter, hvor *qacH* genet var fjernet, hadde lavere toleranse enn villtype stammer (BC MIC 15 ppm mot 30 ppm). Studien viste også et avvik; en *L. monocytogenes* stamme med *qacH* viste lav toleranse for BC (BC MIC 15 ppm), hvor årsak til avviket forble ukjent. Dutta et al. (2013), fant at *L. monocytogenes* stammer isolert i næringsmiddelindustrien positive for *bcrABC* gen var høytolerante for BC (BC MIC 30-40 ppm, agarfortynningsmetode), mens stammer uten *bcrABC* var lavtolerante for BC (BC MIC <10 ppm, agarfortynningsmetode). Selv om resultatet fra MIC test i dette forsøket viste en sammenheng mellom toleranse for BC og forekomst av *qacH* og *bcrABC*, samt at resultatene støttes av tidligere studier, kan man ikke utelukke at andre mekanismer enn *qacH* og *bcrABC* gen kan bidra til forhøyet toleranse for BC, da det var brukt et begrenset antall stammer i MIC-testen.

MIC-test viste at *L. monocytogenes* stammer positive for *bcrABC* var mer tolerante for BC (BC MIC 8-10 ppm) enn stammer positive for *qacH* (4 av 5 stammer BC MIC 5-6 ppm, 1 stamme BC MIC 8-10 ppm). Ingen av stammene var positive for begge genene. Som eneste publisasjon hvor forekomst av både *bcrABC* og *qacH* er undersøkt, fant Muller et al. (2013) at av 91 *L. monocytogenes* stammer var 5 stammer positive for *bcrABC* og 10 stammer positive for *qacH*, men ingen stammer var positive for begge genene. Tilstedeværelse av *bcrABC* hos *L. monocytogenes* stammer er ikke i tidligere studier vist å være vesentlig mer tolerante for BC enn stammer med tilstedeværelse av for *qacH* (Dutta et al. 2013; Elhanafi et al. 2010; Muller et al. 2013). Genene *bcrABC* er hovedsakelig lokalisert på plasmider, og kun noen stammer er vist å ha genet organisert kromosomalt (Dutta et al. 2013), mens *qacH* er kun funnet integrert

kromosomalt (Muller et al. 2013). Disse genene er lokalisert på transposoner, og de koder for proteiner (QacH og BcrBC) kjent for å kunne pumpe ut QAC (Elhanafi et al. 2010; Muller et al. 2013). Proteinene BcrB og BcrC, og QacH viser henholdsvis 50 og 53 % aminosyresekvensidentitet, og transkripsjonell regulator TetR (*qacH*) og BcrA 38 %. Ellers er det ikke funnet flere likheter mellom *bcrABC* og *qacH* (Muller et al. 2013). Siden *bcrABC* koder for to proteiner som kan pumpe ut QAC, mens *qacH* kun koder kun for ett slikt protein, kan dette kanskje bety at BcrABC har andre proteinegenskaper, og mulig også en mer effektiv membranpumpe. Videre arbeid innen *qacH* og *bcrABC* kan innebære og undersøke MIC av ulike desinfeksjonsmidler og ved ulike betingelser (medium, temperatur) for *L. monocytogenes* stammer positive for *qacH* og *bcrABC*, for å se om *qacH* og *bcrABC* gir toleranse ved ulike mekanismer, og om genene påvirker toleranse ulikt for ulike desinfeksjonsmidler.

Standardisering av metoder er viktig for å kunne sammenlikne og validere resultater fra ulike studier. Ulike studier bruker også ulike metoder for å bestemme BC MIC hos *L. monocytogenes*. Noen bruker mikrotitermetode til MIC bestemmelsen (Aase et al. 2000) (som brukt i dette forsøket), mens andre bruker agarfortynningsmetode (Dutta et al. 2013; Elhanafi et al. 2010; Muller et al. 2013), noe som gjør det vanskelig å sammenlikne resultater og karakterisering av toleranse for BC. Agarfortynningsmetode vil ved MIC-test gi høyere verdier enn mikrotitermetode. I tillegg vil betingelser som tid, temperatur og medium benyttet ved MIC-test også kunne påvirke resultatene. Hvor isolater hentes fra vil sannsynligvis også påvirke både andelen stammer tolerante for BC og forekomst av *qacH* og *bcrABC*. For eksempel så kan dette være påvirket av hvor i et produksjonslokale stammene isoleres fra (maskiner, sluk, råvarer osv.), hvilken type næringsmiddelindustri som undersøkes, samt variasjoner mellom matproduksjonslokaler innen samme næringsmiddelindustri. Av 27 *L. monocytogenes* stammer, ble 26 % karakterisert som høytolerante for BC, 14 % som middels tolerante og 60 % som lavtolerante. Antall høytolerante *L. monocytogenes* stammer isolert fra næringsmiddelindustrien er i tidligere studier vist å være 10 % (Aase et al. 2000), 16 % (Heir et al. 2004) og 50 % (Dutta et al. 2013). Andelen isolerte *L. monocytogenes* høytolerant for BC spriker mye, derfor er det vanskelig å si om resultatene fra dette forsøket er representative. Ulike studier karakteriserer stammene som høy- og lavtolerante ulikt med hensyn på BC MIC; Aase et al. (2000) har for eksempel generelt lavere toleransenivåer enn i dette forsøket. Toleranse kan også være satt ut i fra BC MIC verdier hos stammer med enten *qacH* og *bcrABC*, hvis disse stammene viser høyere toleranse med hensyn på BC MIC verdier enn stammer uten et av disse genene. Det var ingen

sammenheng mellom toleranse for BC basert på MIC test og overlevelse i drapstest i suspensjon (10 ppm BC og 50 ppm BC). MIC verdier korrelerer ikke nødvendigvis alltid med toleranse vist for det samme desinfeksjonsmiddelet ved drapstester (Langsrud 1998), slik at man må være forsiktig med å trekke konklusjoner angående toleranse for BC kun basert på MIC verdier. MIC test ble utført ved 30 °C, og 10 ppm BC var høyeste konsentrasjon testet. I næringsmiddelindustrien brukes det en konsentrasjon på mellom 200 og 1000 ppm BC (Møretrø 2014), og desinfisering foregår oftest ved lavere temperaturer (≤ 20 °C). Muller et al. (2013) fremhever også at bruk av desinfeksjonsmidler i riktig brukerkonsentrasjon, effektivt vil inaktivere *L. monocytogenes*. Likevel er resultatene i deres studie med hensyn til BC MIC verdier viktige for matproduksjonsmiljøer, da for eksempel feil dosering eller nisjer hvor desinfeksjonsmiddel vanskelig kommer til, eller biofilmer kan dannes kan gi lavere dosering eller for lav effekt av desinfeksjonsmiddelet. MIC test kan også være en passende metode for screening av mange stammer, hvor man kan finne korrelasjon mellom ulike stammer og for eksempel toleranse for BC.

Det ble ikke funnet noen sammenheng mellom toleranse for BC basert på MIC test og persistens. En slik sammenheng hos *L. monocytogenes* er tidligere vist av Lunden et al. (2003), mens Heir et al. (2004) fant ingen sammenheng mellom BC toleranse og persistens. Lunden et al. (2003) fant at en *L. monocytogenes* stamme isolert fra en matproduksjonsfabrikk som var høytolerant for BC (BC MIC 5 ppm) var persistent, mens en stamme som var lavtolerant for BC (BC MIC 0,63 ppm) var sporadisk. Heir et al. (2004) fant at 18 % av stammer isolert fra næringsmiddelindustri var høytolerante for BC, men da noen stammer karakterisert som sporadiske var lavtolerante for BC, ble det konkludert med at det sannsynligvis er andre faktorer som er involvert i persistens. Da kun 27 stammer ble undersøkt i dette forsøket, kan man ikke utelukke en sammenheng mellom toleranse for BC i MIC test og persistens hos *L. monocytogenes*.

Resultatene viste at *L. monocytogenes* har høyere toleranse for BC i biofilm enn i suspensjon. Ved forforsøk var det nesten totaldrap på stamme MF 4624 (positiv for *bcrABC*, BC MIC 8-10 ppm) ved 30 ppm BC i suspensjon, og det var ved fem stammer kun noe lavere overlevelse av celler i biofilm som ble eksponert for 50 ppm BC sammenliknet med celler i suspensjon som ble eksponert for 10 ppm BC. Tidligere studier bekrefter at *L. monocytogenes* har høyere toleranse for BC i biofilm (Nakamura et al. 2013). Nakamura et al. (2013) fant at EC50 av BC (den

konsentrasjonen av BC hvor den fysiologiske aktiviteten til *L. monocytogenes* er 50 % av dens maksimale aktivitet), var 150 ganger høyere ved en persistent stamme kontra en sporadisk i biofilm, men når målt i planktonisk tilstand (suspensjonstest), var EC50 for den persistente stammen kun 2,2 ganger høyere enn den sporadiske. I forsøket var det ingen sammenheng mellom overlevelse i suspensjon og i biofilm etter eksponering for BC; dette støttes av Chae og Schraft (2000) som viser at *L. monocytogenes* stammer vokser ulikt i biofilm sammenliknet med planktoniske celler. Nakamura et al. (2013) viser i sin studie av *L. monocytogenes* stammer isolert fra fiskefabrikk, at toleransen for BC varierer mer mellom stammene i biofilm enn i suspensjon. Dette er i tråd med resultatene fra dette forsøket, da det var større variasjon i log reduksjon mellom stammene i biofilm (ca. 1,5-3 log ved 50 ppm) enn ved suspensjon (ca. 1,3-2 log ved 10 ppm). På grunn av dette er drapstester i suspensjon sannsynligvis ikke en relevant metode for å vurdere *L. monocytogenes* stammers toleranse for BC, spesielt hvis forekomst av *L. monocytogenes* i produksjonsmiljøet er forbundet med *L. monocytogenes* i biofilm.

Under desinfeksjonsforsøk på biofilm, løsnet noen celler fra biofilmen på stålkupong i BC-løsningen (50 ppm). Disse løsnede cellene hadde en høyere log reduksjon enn når samme stammer i suspensjon ble eksponert for 10 ppm BC i suspensjonstest, men ved forforsøk til suspensjonstest var det nesten totaldrap ved den ene stammen (MF 4624) ved 30 ppm BC i suspensjon. Det var ikke vesentlig forskjell på celletall i gjenværende suspensjon og suspensjonstest (sammenlikning av kontroll verdier fra begge testene). Dette antyder at *L. monocytogenes* tålte høyere konsentrasjon av BC etter de var løsnet fra biofilm. Disse cellene hadde løsnet fra biofilm under eller etter desinfeksjon, og det er mulig at disse cellene overlevde bedre fordi de var omsluttet av ekstracellulære polymere substanser (EPS) eller fordi de løsnet i klumper. Det er også mulig at cellene viste fenotypiske forandringer, som ble induert under biofilmdannelse og i biofilmen, noe som gjorde de mer motstandsdyktige mot BC. Mekanismer knyttet til dette blir gjennomgått lenger ut i diskusjonen. Ved videre arbeid kunne det vært interessant å løsne celler fra biofilm ved sonikering, for deretter å eksponere cellene for BC. Da ville man fått bedre innsikt om cellene har høyere toleranse på grunn av egenskaper i selve biofilmen, eller på grunn av egenskaper hos cellene selv. Pan et al. (2006) undersøkte biofilm av *L. monocytogenes* sin toleranse for peroksid, en type desinfeksjonsmiddel. Studien viste at celler de løsnet fra biofilm på peroksid behandlet stålkupong ikke var mer tolerante for desinfeksjonsmiddel enn celler fra kontrollkuponger behandlet med vann, selv om biofilm eksponert for peroksid utviklet forhøyet toleranse for desinfeksjonsmiddelet. Resultatene deres

indikerer at økt toleranse for desinfeksjonsmiddel i biofilm skyldes egenskaper til EPS og ikke en iboende egenskap i cellene i biofilmen.

Resultatene fra desinfeksjonsforsøk på biofilm viste at toleranse for BC i biofilm kan forklares av stammens forekomst av resistensgenene (*qacH/bcrABC*) eller *bapL*. Stammer positive for *bapL + qacH* eller *bapL + bcrABC* viste høyere overlevelse i biofilm etter eksponering for 50 ppm BC. Ingen publiserte studier som undersøker toleranse for QAC/BC i biofilm og gener knyttet til toleranse for QAC, som *qacH* og/eller *bcrABC*, eller *bapL* er funnet. Dette vanskeliggjør validering av resultater fra dette forsøket. Det finnes flere kjente mekanismer for økt BC toleranse i biofilm; hvilende celler i indre lag som blir beskyttet og får næring av celler i ytre lag (som oftest dør), EPS som binder og inaktiverer desinfeksjonsmiddel, og oppregulering og nedregulering av visse gener (Langsrud 1998; Smith et al. 2009). Ingen stammer var positive for kun *bapL*, eller kun *bcrABC* eller *qacH*, slik at man ikke kan vite om det var *bapL* eller resistensgenene (*qacH* eller *bcrABC*) som bidro til økt overlevelse. Det var ingen signifikant forskjell på overlevelse mellom stammer positive for *qacH* eller *bcrABC*, noe som kan bety at disse genene bidrar enten like mye eller like lite til overlevelse i biofilm etter eksponering for BC. Ved videre arbeid, bør det i tillegg testes stammer som kun har *bapL*, *qacH* eller *bcrABC* genene, for å finne hvilke gener som bidrar mest til økt overlevelse ved eksponering av BC i biofilm. Det bør også testes flere stammer av samme genkombinasjon, for å øke sikkerheten til resultatene.

Biofilmdannelse kan påvirkes av *bapL* (Jordan et al. 2008), men i dette forsøket ble det ikke funnet noen sammenheng mellom biofilmdannelse og *bapL*. Dette støttes delvis av Jordan et al. (2008), som fant at BapL proteinet kan bidra til overflatefesting hos *L. monocytogenes*, men ikke som eneste mekanisme. Hos *Staphylococcus aureus* bidrar Bap proteinet til primær festing til abiotiske overflater, samt det neste steget i biofilmdannelse, hvor intercellulær festing spiller en viktig rolle (Cucarella et al. 2001). For å undersøke proteinets innflytelse på festing til abiotiske overflater, konstruerte Jordan et al. (2008) *bapL*-mutanter av *L. monocytogenes*. Resultatet viste at BapL kan bidra til overflatefesting, men at det ikke er et essensielt krav for alle *L. monocytogenes* stammer, da flere BapL-negative feltisolater viste evne til adheering til abiotiske overflater tilsvarende som *bapL*-positive stammer. De antyder at siden sannsynligvis *L. monocytogenes* ikke produserer tykk ekstracellulært polysakkaridmatriks, kan BapL virke som

en del av den klebende matriksen. Det er ikke publisert andre studier om *bapL* og biofilmdannelse hos *L. monocytogenes*. Da forsøket ikke viste sammenheng mellom biofilmdannelse og *bapL*, kan dette, som tidligere en studie bekrefter (Jordan et al. 2008), antyde at det er andre mekanismer involvert i biofilmdannelse. Slike mekanismer kan være oppregulering av gener knyttet til biofilmdannelse, som *flaA*, og *agr* gener, knyttet til henholdsvis flageller og celle-til-celle kommunikasjon (Renier et al. 2011). Adhering av *L. monocytogenes* til overflater har vært knyttet til hydrofile interaksjoner, tilstedeværelse av flageller, fibriller, og syntese av eksopolysakkarider (Lado & Yousef 2007). Videre arbeid med undersøkelse av *bapL* genet og biofilmdannelse bør innebære og bruke ulike dyrkningsbetingelser av biofilm, som temperatur og medium, for å undersøke om endringer i betingelser påvirker effekten av BapL.

Ingen sammenheng mellom biofilmdannelse og persistens ble vist i forsøket. Sammenheng mellom persistens og biofilmdannelse er vist tidligere (Borucki et al. 2003; Lunden et al. 2000), mens andre ikke har funnet noen sammenheng (Djordjevic et al. 2002). Nakamura et al. (2013) fant at den totale mengden EPS var høyere i den persistente stammens biofilm kontra den sporadiske. Forfatterne av studien antyder at persistente stammer produserer større mengder biofilm og EPS enn de sporadiske stammene, noe som gir de persistente stammene høyere resistens mot desinfeksjonsmidler. I en studie av Lunden et al. (2000), fant man at persistente stammer av *L. monocytogenes* hadde flere celler festet til overflate etter 2 timer inkubasjon ved 25 °C, sammenliknet med ikke-persistente stammer. Men ved lengre inkubasjonstid (72 timer), utlignet nivået seg mellom de persistente og ikke-persistente stammene, noe som demonstrerer at persistente stammer viser større evne til initial festing ved korte kontakttider (Lunden et al. 2000).

Persistens er et begrep som går igjen i flere studier, og det er blitt demonstrert at langvarig kontaminasjon i produksjonsanlegg i næringsmiddelindustrien er et typisk fenomen for *L. monocytogenes*. Det er mulig at noen *L. monocytogenes* stammer som er bedre enn andre stammer til å tilpasse seg visse miljøforhold, blir selektert, og videre forårsaker persistent kontaminasjon i matproduksjonsmiljø (Autio et al. 2003). En studie av Autio et al. (2003) viste at persistent kontaminasjon til en viss grad er knyttet til visse stammer, men de fant også at to genotyper av *L. monocytogenes* var sporadisk i en fabrikk, og persistent i en annen. Dette

indikerer at flere faktorer påvirker en stammes eventuelt persistens egenskaper, som kvantitet av innkommende stammer til miljøet, og miljøfaktorer som egnede nisjer, hygienisk nivå og effektivitet av desinfeksjon i et produksjonsmiljø i næringsmiddelindustrien (Autio et al. 2003). Hvor stammer isoleres fra vil sannsynligvis påvirke andelen persistente stammer identifisert; hvis mange stammer isoleres fra nisjer/områder i produksjonsmiljø assosiert med biofilm, eller fra produksjonsfabrikker med kjente problemer med persistens, kan dette følgelig påvirke andelen persistente stammer i en studie, og gi et skjevt bilde på virkeligheten. Av 23 stammer som på forhånd var undersøkt for persistens, var 65 % klassifisert som persistente og 35 % klassifisert som sporadiske. Det er begrenset med kvantitative undersøkelser av forekomst av persistente *L. monocytogenes* stammer. Autio et al. (2003) fant at av 55 *L. monocytogenes* stammer isolert fra produksjonsmiljø ved 11 ulike fabrikker, var 31 % av stammene persistente og 69 % av stammer sporadiske.

Det var liten variasjon mellom de fem stammene sin evne å danne biofilm (log 7,7-8,0 cfu/kupong) etter to døgn. Chae og Schraft (2000) fant også små variasjoner i sine resultater fra biofilmdannelse av fem *L. monocytogenes* stammer etter ett døgn. Men samme studie viser også at grad av biofilmdannelse ble mer variert mellom stammene jo eldre biofilmen ble (etter 2-4 dager). Borucki et al. (2003) viser i sin studie at det er signifikant variasjon i biofilmdannelse etter to døgn mellom 80 stammer av *L. monocytogenes*. For videre arbeid bør man undersøke biofilmdannelse etter 1-4 døgn. Dyrkningsbetingelser for biofilm bør også varieres ved videre arbeid, som for eksempel temperatur, da Djordjevic et al. (2002) fant at biofilmdannelse hos *L. monocytogenes* var mye større ved 32 °C enn 20 °C.

Borucki et al. (2003) viser i sin studie at i hvert fall noen *L. monocytogenes* stammer danner klassisk biofilm, men Ferreira et al. (2014) fremhever at få studier har sterke beviser for at *L. monocytogenes* danner en klassisk biofilm (festing av planktoniske celler etterfulgt av produksjon av EPS), eller om *L. monocytogenes* kun viser sterk adsorpsjon av celler til overflater. For å undersøke dette nærmere, menes det at det bør brukes bedre metoder for undersøkelse av biofilmdannelse av *L. monocytogenes*, som bruk av scanning elektron mikroskop (SEM), istedenfor metoder som kvantifisering av biofilm, og bruk av krystallfiolett til farging av festede celler (Ferreira et al. 2014). Mikroskopering av biofilm av *L. monocytogenes* (48 t 30 °C) viste et tynt lag av celler, relativt homogent fordelt, med noen områder på

stålkupong med tykkere lag. Dette er i tråd med tidligere funn; strukturen til *L. monocytogenes* biofilm er beskrevet i en oversiktsartikkel av da Silva og De Martinis (2013) som et homogent lag av celler, mikrokolonier og nettverk av knyttede kjeder. Biofilm produsert av *L. monocytogenes* kan variere i mengde og struktur, som vist av Borucki et al. (2003). I studien til Borucki et al. (2003) viste mikroskopi av biofilm (40 t 30 °C), at *L. monocytogenes* stammer som produserte mye biofilm, lagde en tett, tredimensjonal sammensetning av celler med godt fordelte kanaler og porer på stål og polyvinylklorid (PVC), mens *L. monocytogenes* stammer som produserte lite biofilm, produserte kun spredte aggregater av celler på stål, og hovedsakelig festede enkeltceller på PVC. Utfra studien til Borucki et al. (2003) kan det antas at de fem *L. monocytogenes* stammene undersøkt i dette forsøket ikke var gode biofilmdannere ved de valgte betingelsene.

Listeria monocytogenes og EPS hos bakterien sin betydning er ikke helt forstått enda. Ulike mikroskoperingsteknikker er blitt anvendt for å karakterisere EPS hos *L. monocytogenes*, som for eksempel ved ulike fargemetoder ved fluorescensmikroskopi, hvor ulike typer karbohydrater farges (Borucki et al. 2003). Dette ble ikke gjort i dette forsøket, men kunne vært interessant og undersøkt, for å se om det var noen forskjell mellom stammens EPS produksjon, og eventuell sammenheng med *bapL* og persistens. Lite er kjent om *L. monocytogenes* EPS komposisjon (da Silva & De Martinis 2013), men det antas at *L. monocytogenes* produserer en type ekstracellulært karbohydrat liknende matriks i biofilm (Borucki et al. 2003). I sin oversiktsartikkel, oppsummerer da Silva og De Martinis (2013) at EPS hos *L. monocytogenes* består av polysakkarider, ekstracellulært DNA og proteiner. Borucki et al. (2003) viser i sin studie at *L. monocytogenes* stammer som produserer mye biofilm, også produserer vesentlig mer EPS enn *L. monocytogenes* stammer som produserer lite biofilm.

Biofilmdannelse i dette forsøket ble kun undersøkt på monokulturer av stammer. I de fleste produksjonsanlegg, vil eventuell biofilm som er tilstede være kompleks, og bestå av flere arter som danner et samfunn, hvor bakteriene antagelig oppfører seg annerledes sammenliknet med laboratorieforhold (Rodriguez-Lozano 2009). Dette kan medføre at resultatene fra biofilmdannelse og desinfeksjonsforsøk på biofilm ikke kan overføres direkte til forhold i næringsmiddelindustrien.

Ulike studier bruker ulike metoder for å kvantifisere overlevelse av *L. monocytogenes* i biofilm i desinfeksjonstester, samt for biofilmdannelse; måling av OD ved biofilm i PVC mikrotiterplate (Djordjevic et al. 2002; Møretrø et al. 2013; Nakamura et al. 2013), utplating av løsnede celler fra stål (Pan et al. 2006), eller indirekte konduktometri istedenfor utplating (Gram et al. 2007), noe som gir lite standardiserte resultater. I noen studier blir også cellene/ biofilmen på overflater tørket (Møretrø et al. 2013), noe som medfører at cellene sannsynligvis tåler en høyere konsentrasjon av desinfeksjonsmiddel/BC, og gjør sammenlikning av drapeseffekt av BC fra ulike studier enda vanskeligere.

Det kan brukes ulike metoder for å løsne cellene, som svabring, sonikering og vortexing med glasskuler (Pan et al. 2006). Pan et al. (2006) indikerer at sonikering og vortexing med glasskuler, kan skade cellene under løsning fra overflate, og er vanskelige å validere. Metodene er kanskje heller ikke effektive nok til å løsne alle cellene, noe som gjør sammenlikning av resultatene fra utplating med det faktiske antallet festede bakterier, vanskelig (da Silva & De Martinis 2013).

For å validere at celler løsnet fullstendig under sonikering, ble kuponger med biofilm mikroskopert (48 t 30 °C) både før og etter sonikering. Alle sonikerte kuponger hadde fortsatt fastsittende celler, men sonikerte kuponger hadde tydelig færre celler enn kuponger som ikke ble sonikert. Sonikerte kuponger med biofilm eksponert for BC (50 ppm BC, 5 min) viste flere celler per kupong sammenliknet med kontrollkupong (dH₂O, 5 min). Ved mikroskopering kan akridin orange (AO) brukes til å skille mellom døde og levende celler. AO kan derfor brukes for å vurdere effekten av biocider/desinfeksjonsmidler på for eksempel rustfritt stål (Lewandowski 2009). Når bundet til dobbeltrådet DNA avgir AO grønn fluorescens, og man antar døde celler, og oransje fluorescens når bundet til enkeltrådet RNA, og man antar levende celler. Men dette er ikke alltid riktig, da det er avhengig av konsentrasjonen av AO inne i cellen. For eksempel da levende celler kan være «grønne» på grunn av cellemembran som er tett, mens døde celler kan være «oransje» på grunn av lekkasje i cellemembran (Adams & Moss 2008). Fra mikroskoperingen kunne man på sonikerte kuponger behandlet med dH₂O, se rødfargede celler, mens de samme kupongene behandlet med BC viste grønnfargede celler. Kun ved en kontrollkupong (behandlet med dH₂O) ble det observert grønne celler, men 3 av 5 kuponger behandlet med BC viste grønne celler. Resultatene var i tråd med forventningene; at det var flere

levende celler på kuponger med biofilm kun eksponert for vann. Da dette kun var en observasjon, kan man ikke trekke noen konklusjoner angående effekt av BC på celler i biofilm kun basert på mikroskopibildene.

6. Konklusjon

- Proteinene QacH og BcrABC kan bidra til økt toleranse for BC hos *L. monocytogenes* i suspensjon
- Proteinet Bap og/eller QacH/BcrABC kan bidra til økt toleranse for BC hos *L. monocytogenes* i biofilm.
- Toleranse for BC og persistens i næringsmiddelindustrien skyldes sannsynligvis en kombinasjon av ulike faktorer; *L. monocytogenes* sin evne til å danne og leve i biofilm, naturlig eller ervervet toleranse for QAC, og utilstrekkelig vask og desinfeksjon av produksjonsmiljø.

7. Referanser

Aarnisalo, K., Lundén, J., Korkeala, H. & Wirtanen, G. (2007). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. *LWT - Food Science and Technology*, 40 (6): 1041-1048.

Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S. & Rorvik, L. M. (2000). Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 62 (1-2): 57-63.

Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008). *Food microbiology*. Cambridge: RSC Publ. 463 s.: s.374.

Andersen, F. W., Lange, H., Nygård, K., Vold, L., Wester, A. L. & Kapperud, G. (2013). Årsrapport • Næringsmiddelbårne infeksjoner i 2012. Oslo, Norway.

Autio, T., Keto-Timonen, R., Lunden, J., Bjorkroth, J. & Korkeala, H. (2003). Characterisation of persistent and sporadic *Listeria monocytogenes* strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Systematic and Applied Microbiology*, 26 (4): 539-545.

Bay, D. C., Rommens, K. L. & Turner, R. J. (2008). Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys Acta*, 1778 (9): 1814-1838.

Best, M., Kennedy, M. E. & Coates, F. (1990). Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* spp. *Appl Environ Microbiol*, 56 (2): 377-380.

Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F. & Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (12): 7336-7342.

Carpentier, B. & Cerf, O. (2011). Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises: a review. *Int J Food Microbiol*, 145 (1): 1-8.

Chae, M. S. & Schraft, H. (2000). Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *Int J Food Microbiol*, 62 (1-2): 103-111.

Cloete, E. & Molobela, I. (2009). Biofilms in the food and beverage industries: an introduction. I: Fratamico, P. M., Annous, B. A. & Gunther IV, N. W. (red.) *Biofilms in the food and beverage industries*, s. 3-42. Cambridge: Woodhead.

Costerton, J. W. (2007). *The biofilm primer*. Berlin ; New York: Springer. 199 s.: s.179.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. & Penades, J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183 (9): 2888-2896.

da Silva, E. P. & De Martinis, E. C. (2013). Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97 (3): 957-968.

den Bakker, H. C., Cummings, C. A., Ferreira, V., Vatta, P., Orsi, R. H., Degoricija, L., Barker, M., Petrauskene, O., Furtado, M. R. & Wiedmann, M. (2010). Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics*, 11: 688.

Djordjevic, D., Wiedmann, M. & McLandsborough, L. A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (6): 2950-2958.

Doyle, M. P. & Beuchat, L. R. (2007). *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington: ASM Press. 1038 s.: s.14, s.457-492.

Dutta, V., Elhanafi, D. & Kathariou, S. (2013). Conservation and distribution of the benzalkonium chloride resistance cassette *bcrABC* in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (19): 6067-6074.

Elhanafi, D., Dutta, V. & Kathariou, S. (2010). Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *Listeria monocytogenes* strain from the 1998-1999 outbreak. *Appl Environ Microbiol*, 76 (24): 8231-8238.

Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P. & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*, 77 (1): 150-170.

Fugett, E., Fortes, E., Nnoka, C. & Wiedmann, M. (2006). International life sciences institute north America *Listeria monocytogenes* strain collection: Development of standard *Listeria monocytogenes* strain sets for research and validation studies. *Journal of Food Protection*, 69 (12): 2929-2938.

Gilbert, P. & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99 (4): 703-715.

Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gyomose, P. & Vogel, B. F. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18 (10): 1165-1171.

Granum, P. E. (2007). *Matforgiftning: næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*. Kristiansand: Høyskoleforl. 406 s.: s.223-235.

Grinstead, D. (2009). Cleaning and sanitation in food processing environments for the prevention of biofilm formation, and biofilm removal. I: Fratamico, P. M., Annous, B. A. & Gunther IV, N. W. (red.) *Biofilms in the food and beverage industries*, s. 331-359. Cambridge: Woodhead.

Heir, E., Sundheim, G. & Holck, A. L. (1995). Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827. *J Appl Bacteriol*, 79 (2): 149-56.

Heir, E., Sundheim, G. & Holck, A. L. (1998). The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. *FEMS Microbiol Lett*, 163 (1): 49-56.

Heir, E., Lindstedt, B. A., Rotterud, O. J., Vardund, T., Kapperud, G. & Nesbakken, T. (2004). Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. *International Journal of Food Microbiology*, 96 (1): 85-96.

- Hellström, S. (2011). *Contamination routes and control of Listeria monocytogenes in food production*. Helsinki: Hellström S. 67 s.: s.7-12.
- Jordan, S. J., Perni, S., Glenn, S., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Tenreiro, R. P., Chambel, L., Barata, B., Zilhao, I., et al. (2008). *Listeria monocytogenes* biofilm-associated protein (BapL) may contribute to surface attachment of *L. monocytogenes* but is absent from many field isolates. *Appl Environ Microbiol*, 74 (17): 5451-5456.
- Kastbjerg, V. G., Larsen, M. H., Gram, L. & Ingmer, H. (2010). Influence of sublethal concentrations of common disinfectants on expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 76 (1): 303-309.
- Kjelleberg, S. & Givskov, M. (2007). *The biofilm mode of Life: Mechanisms and adaptations*: Horizon Bioscience. 248 s.: s.5-23.
- Lado, B. H. & Yousef, A. E. (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. I: Ryser, E. T. & Marth, E. H. (red.) *Food Science and Technology, Listeria, listeriosis, and food safety.*, s. 157-213. Boca Raton: CRC Press.
- Langsrud, S. (1998). *Resistance to disinfectants used in the food processing industry, with emphasis on resistance to benzalkonium chloride*, b. 1998:11. Ås: Department of Biotechnological Sciences, Agricultural University of Norway. 112 s.
- Lewandowski, Z. (2009). Methods for imaging and quantifying the structure of biofilms in food processing and other environments. I: Fratamico, P. M., Annous, B. A. & Gunther IV, N. W. (red.) *Biofilms in the food and beverage industries*, s. 99-131. Cambridge: Woodhead.
- Lindstedt, B. A., Tham, W., Danielsson-Tham, M. L., Vardund, T., Helmersson, S. & Kapperud, G. (2008). Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *Journal of Microbiological Methods*, 72 (2): 141-148.
- Lunden, J., Autio, T., Markkula, A., Hellstrom, S. & Korkeala, H. (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 82 (3): 265-272.

- Lunden, J. M., Miettinen, M. K., Autio, T. J. & Korkeala, H. J. (2000). Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection*, 63 (9): 1204-1207.
- Lunden, J. M., Autio, T. J. & Korkeala, H. J. (2002). Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *Journal of Food Protection*, 65 (7): 1129-1133.
- Malley, T. J. V., Stasiewicz, M. J., Grohn, Y. T., Roof, S., Warchocki, S., Nightingale, K. & Wiedmann, M. (2013). Implementation of statistical tools to support identification and management of persistent *Listeria monocytogenes* contamination in smoked fish processing plants. *Journal of Food Protection*, 76 (5): 796-811.
- Martin, S. & Feng, H. (2009). Novel methods for biofilm control and removal from food processing equipment. I: Fratamico, P. M., Annous, B. A. & Gunther IV, N. W. (red.) *Biofilms in the food and beverage industries*, s. 359-372. Cambridge: Woodhead.
- Muller, A., Rychli, K., Muhterem-Uyar, M., Zaiser, A., Stessl, B., Guinane, C. M., Cotter, P. D., Wagner, M. & Schmitz-Esser, S. (2013). Tn6188 - a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS One*, 8 (10): e76835.
- Møretrø, T., Langsrud, S. & Heir, E. (2013). Bacteria on meat abattoir process surfaces after sanitation: Characterisation of survival properties of *Listeria monocytogenes* and the commensal bacterial flora. *Advances in Microbiology*, 03 (03): 255-264.
- Møretrø, T. (2014). *Personlig kommunikasjon med Trond Møretrø ved Nofima Ås*. Ås (05.05.2014).
- Nakamura, H., Takakura, K., Sone, Y., Itano, Y. & Nishikawa, Y. (2013). Biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* isolated from a fish processing plant. *J Food Prot*, 76 (7): 1179-1186.
- Painter, J. & Slutsker, L. (2007). Listeriosis in humans. I: Ryser, E. T. & Marth, E. H. (red.) *Food Science and Technology, Listeria, listeriosis, and food safety*, s. 85-109. Boca Raton: CRC Press.

- Pan, Y., Breidt, F. & Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (12): 7711-7717.
- Renier, S., Hebraud, M. & Desvaux, M. (2011). Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environmental Microbiology*, 13 (4): 835-850.
- Roberts, A. P., Mullany, P. & Wilson, M. (2001). [6] Gene transfer in bacterial biofilms. I: Doyle, R. J. (red.) b. Volume 336 *Methods in Enzymology*, s. 60-65: Academic Press.
- Rocourt, J. & Buchrieser, C. (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*. I: Ryser, E. T. & Marth, E. H. (red.) Food Science and Technology, *Listeria, listeriosis, and food Safety*, s. 1-20. Boca Raton: CRC Press.
- Rodriguez-Lozano, A. (2009). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* and transfer to foods. I: Fratamico, P. M., Annous, B. A. & Gunther IV, N. W. (red.) *Biofilm in the food and beverage industries*, s. 200-226. Cambridge: Woodhead.
- Russell, A. D., Hugo, W. B., Ayliffe, G. A. J., Fraise, A. P., Lambert, P. A. & Maillard, J.-Y. (2004). *Russell, Hugo & Ayliffe's principles and practice of disinfection, preservation & sterilization*. 4. utg. Oxford: Blackwell Publ. 678 s.: s.35, s.132.
- Salazar, J. K., Wu, Z. C., Yang, W. X., Freitag, N. E., Tortorello, M. L., Wang, H. & Zhang, W. (2013). Roles of a novel Crp/Fnr family transcription factor Lmo0753 in soil survival, biofilm production and surface attachment to fresh produce of *Listeria monocytogenes*. *Plos One*, 8 (9): e75736.
- Sauders, B. D. & Wiedmann, M. (2007). Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. I: Ryser, E. T. & Marth, E. H. (red.) Food Science and Technology, *Listeria, listeriosis, and food Safety*, s. 21-53. Boca Raton: CRC Press.
- Smith, J., Fratamico, P. M. & Uhlich, G. (2009). Molecular mechanisms involved in biofilm formation by food-associated bacteria. I: Fratamico, P. M., Annous, B. A. & Gunther IV, N. W. (red.) *Biofilms in the food and beverage industries*, s. 42-98. Cambridge: Woodhead.

Soumet, C., Ragimbeau, C. & Maris, P. (2005). Screening of benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* strains isolated during cold smoked fish production. *Lett Appl Microbiol*, 41 (3): 291-296.

Sundheim, G. (1999). *Renhold i næringsmiddelindustrien*. Ås: Matforsk. 104 s.

To, M. S., Favrin, S., Romanova, N. & Griffiths, M. W. (2002). Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (11): 5258-5264.

Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (3): 584.

Wessels, S. & Ingmer, H. (2013). Modes of action of three disinfectant active substances: a review. *Regul Toxicol Pharmacol*, 67 (3): 456-467.

8. Vedlegg I Forforsøk og kontrollforsøk

8.1. Kontrollforsøk minste hemmende konsentrasjon (MIC test)

Minste hemmende konsentrasjon (MIC) av benzalkoniumklorid (BC) etter et døgn ekstra inkubasjon, ble undersøkt for å se om vekst virkelig var stoppet etter 20 timer (tabell 8.1). Sammenlikning av MIC verdier etter 20 og 44 timer inkubasjon ved 30 °C, med verdier fra 4.gjentak. Prosedyre som i avsnitt 3.3.

Tabell 8.1 Minste hemmende konsentrasjon av benzalkoniumklorid på 27 stammer av *Listeria monocytogenes* etter 20 og 44 timers inkubasjon.

Stamme	MIK BK (ppm)	
	20 timer	44 timer
MF 2184	2,5	4
MF 3638	2,5	4
MF 4712	2,5	>4
MF 5370	2,5	>4
MF 4564	3	3,5
MF 4627	3	>4
MF 4675	3	>4
MF 4991	3	4
MF 4993	3	>4
MF 4994	3	3,5
MF 5373	3	>4
MF 5374	3	>4
MF 5366	3	>4
MF 5367	3	>4
MF 5369	3	4
MF 2624	3,5	3,5
MF 4545	5	8
MF 4562	5	8
MF 4999	5	8
MF 5372	5	8
MF 3005	8	>10
MF 4554	8	>10
MF 4977	8	9
MF 4997	8	>10
MF 5406	8	10
MF 4563	10	>10
MF 4624	10	>10

8.2. Kontrollforsøk desinfeksjonsforsøk biofilm på stål

Alle kontrollforsøkene ble utført på stamme MF 4624.

8.2.1. Effekt av risting

Effekten av risting under inkubering (2 døgn 30 °C) på biofilmdannelse ble undersøkt. Prosedyre ellers lik som i avsnitt 3.5.2. og 3.5.3. Biofilmdannelse på kupong hvor dyrking foregikk uten risting og med risting kan sees i tabell 8.2.

Tabell 8.2 Biofilmdannelse av *Listeria monocytogenes* stamme etter dyrkning 2 døgn ved 30 °C, uten og med risting under dyrkingen. Verdier er angitt som gjennomsnitt av to paralleller.

Variabel	Celletall (log cfu/kupong)
Uten risting	8,36
Med risting	7,71

Ved dette kontrollforsøket ble brett med stålkuponger inkubert 48 t på vippebrett (hastighet 20). Sammenliknet med biofilm hvor brettet ikke ble inkubert på vippebrett, kan det ut i fra resultatene fra utplating av sonikert kupong, virke som det enten løsnet flere bakterier fra stålkupongen under sonikeringen, eller at det festet seg flere på stålkupongen under inkubasjon med vippebrett enn ved prosedyre uten vippebrett. Mikroskoperingen viste at det var en god del flere bakterier på ikke-ristet biofilm.

8.2.2. Effekt av vask

Effekt av antall vasketrinn på kupong med biofilm ble også undersøkt. Prosedyre lik som 3.5.2. og 3.5.3., med avvik kun på antall vasketrinn i 3.5.2. på kupong etter 2 døgn inkubasjon ved 30 °C. Formålet med vasking av kupongene er å fjerne alle bakterier som ikke har festet seg på stålkupong. Ved dette kontrollforsøket ble både en, to og tre omganger med vask av kupong testet. Vaskevannet ble platet ut på TSA skåler, samt fra sonikerte kuponger (fra peptonvannet tabell 8.3).

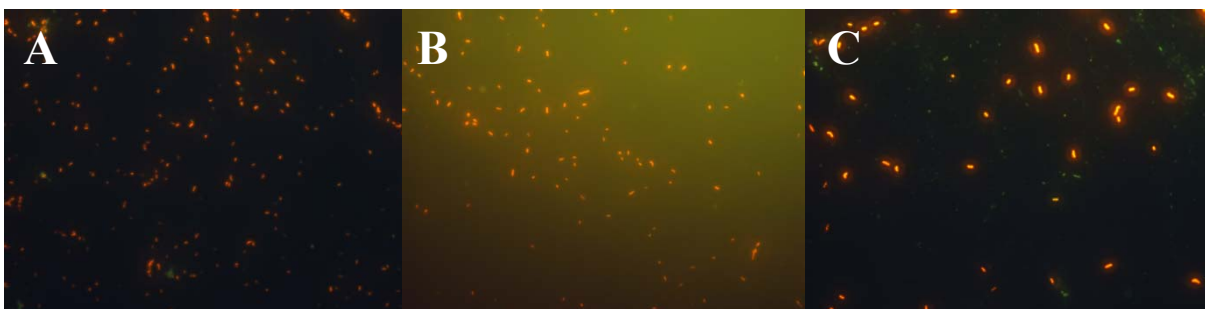
Prosedyre vasketrinn:

- Kupong A vaskes 1 gang som i avsnitt 3.5.2. Utplating fra oppsamlet vaskevann. Kupong til nytt rør med peptonvann. Sonikering og utplating
- Kupong B. Vaskes 2 ganger som tidligere. Utplating fra begge vaskevann. Kupong til nytt rør med peptonvann. Sonikering og utplating.
- Kupong C. Vaskes 2 ganger som B, og legges så i 6ml vaskevann i 5 min. Utplating fra alle vaskevann. Sonikering og utplating

Tabell 8.3 Biofilmdannelse av *Listeria monocytogenes* stamme etter dyrkning 2 døgn ved 30 °C, og ved ulike vasketrinn. Verdier er angitt som gjennomsnitt av to paralleller.

Behandling	Celletall (log cfu/kupong)
1xvask + sonikering (A)	6,79
2xvask + sonikering (B)	7,06
3xvask + sonikering (C)	5,91

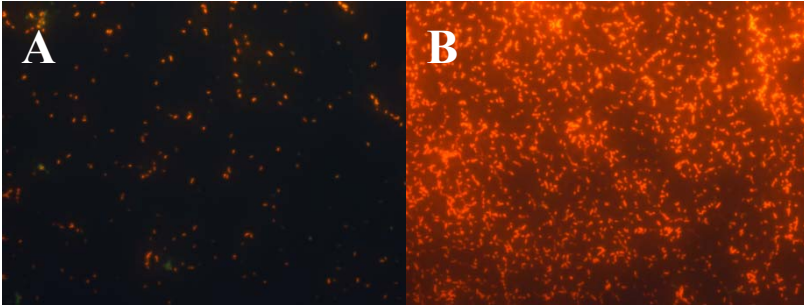
Resultatene fra utplating av vaskevannet viste at det var flest bakterier i første vaskevann, og minst i det tredje vaskevannet, hvor det nesten var 1 log mindre bakterier i tredje vaskevann. Utplating av de sonikerte kupongene, viste også nesten 1 log mindre bakterier på kupong vasket 3 ganger sammenliknet med kupong vasket en gang, men liten forskjell mellom en og to vask. Mikroskopi av de sonikerte kupongene viste flest celler på kupong vasket en gang, og minst celler på kupong vasket tre ganger (figur 8.1).



Figur 8.1 Representative mikroskopibilder av sonikerte ståluponger med biofilm av MF 4624 utsatt for ett (A), to (B) og tre (C) vasketeg.

8.2.3. Effekt av sonikering

Formålet med sonikering er å løsne biofilmen fra stålkupongen, slik at man kan plate ut bakteriene i biofilmen, og kvantifisere dem. Ved mikroskopi kan man gjøre en omtrentlig vurdering om hvor mange bakterier som sitter igjen på kupong, for eksempel etter sonikering (figur 8.2).



Figur 8.2 Representative mikroskopibilder av stålkupong med biofilm av MF 4624, før (A) og etter (B) sonikering.

Fra kontrollforsøket ble kuponger som hadde fått samme behandling (som vask, desinfeksjon), men hvor den ene var ikke-sonikert, mens den andre kupongen ble sonikert, mikroskopert. Ved ikke-sonikert kupong som kun hadde gjennomgått 1 vask, så man veldig mange celler i mikroskopet, sammenliknet med tilsvarende sonikert kupong, hvor det var vesentlig færre celler, men fortsatt en del igjen.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no