



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Masteroppgave 2016 60 stp  
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap  
Fakultetet for veterinærmedisin og biovitenskap

## **Konjugativ overføring av IncK og IncI1 plasmider med *bla*<sub>CMY-2</sub> til *Escherichia coli* og *Serratia* spp. under forhold relevante for kyllingproduksjonen**

Conjugative transfer of IncK and IncI1 plasmids  
harbouring *bla*<sub>CMY-2</sub> to *Escherichia coli* and *Serratia*  
spp. under conditions relevant to the broiler  
production

Hanna Karin Ilag  
Mastergrad i Mikrobiologi

## FORORD

Denne oppgaven utgjør 60 studiepoeng og er skrevet som en avsluttende del av mastergradsstudiet i mikrobiologi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap, Fakultetet for veterinærmedisin og biovitenskap.

Arbeidet med masteroppgaven ble utført fra august 2015 til mai 2016, hovedsakelig ved Nofima, Avdeling for trygg og holdbar mat, Ås. En del av arbeidet ble utført ved Veterinærinstituttet på Adamstuen i Oslo. Masteroppgaven ble gjennomført i prosjektet “Emerging antimicrobial resistance in the food chain: Epidemiology and preventive measures against ESBL producing *Escherichia coli*”. Prosjektet er finansiert av Norges forskningsråd med bidrag fra Animalia (prosjektnummer 225165/E40) og er et samarbeid mellom Veterinærinstituttet, Nofima og Animalia.

Deler av laboratoriearbeidet ble utført i samarbeid med PhD student Solveig Sølverød Mo, Seksjon for bakteriologi - fisk og dyr ved Veterinærinstituttet, som også har fungert som veileder. Tusen takk for et veldig godt samarbeid på laboratoriet og for gode innspill i skriveprosessen. Jeg vil også rette en stor takk til min hovedveileder forsker Even Heir og forsker Solveig Langsrud ved Trygg og holdbar mat, Nofima for gode tilbakemeldinger og konstruktiv kritikk i skriveprosessen, og for alltid å være tilgjengelige for spørsmål underveis. Tusen takk til hovedveileder førsteamanuensis Hilde Marit Østlie ved NMBU for gode forslag og gjennomlesing av oppgaven. Til slutt en stor takk til senioringeniør Anette Wold Åsli ved Trygg og holdbar mat, Nofima for god veiledning på laboratoriet, og forsker Marianne Sunde, Seksjon for bakteriologi - fisk og dyr ved Veterinærinstituttet for gode tips underveis.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2016

Hanna Karin Ilag

## SAMMENDRAG

Antibiotikaresistens er et økende problem på verdensbasis og utgjør en alvorlig trussel mot folkehelsen. AmpC  $\beta$ -laktamase (AmpC)-produserende *Escherichia coli* har blitt hyppig påvist i produksjonskjeden for slaktekylling. Genet *bla*<sub>CMY-2</sub> som koder for AmpC er lokalisert på plasmider og gir resistens mot cefalosporiner som regnes som kritiske for behandlingen av humane infeksjoner. Plasmidene kan spres til andre bakterier ved horisontal genoverføring, i tillegg til at de persisterer i produksjonskjeden uten seleksjonspress fra cefalosporinantibiotika.

Målet med denne oppgaven var derfor å se på bakterienes evne til å overføre AmpC resistensplasmider av typen IncK og IncI1, med høy forekomst i norsk kyllingproduksjon. Overføring av plasmidene ble utført ved konjugasjonsforsøk både innen og mellom *E. coli* og miljøbakterien *Serratia*, under forhold som er relevante for matproduksjonen. Både *E. coli* og *Serratia* spp. transkonjuganter oppnådd i forsøkene ble inkludert som donor av IncK plasmidet, mens *E. coli* ble brukt som donor av IncI1 plasmidet. Konjugasjonsforsøkene ble utført i biofilm, buljong og på agar ved 12, 25 og 30°C (*Serratia* spp.) eller 37°C (*E. coli*). Uttak ble utført ved flere tidspunkt mellom 4 og 168 timer. Evnen til å overføre IncK plasmidet hos *E. coli* og *Serratia* spp. transkonjuganter ble også sammenlignet ved konjugasjon i buljong.

IncK plasmidet ble overført til *E. coli* og *Serratia* spp. med både *E. coli* og *Serratia* spp. transkonjugant som donor. IncI1 plasmidet ble overført til *E. coli*. Begge plasmidene ble overført ved 25 og 30/37°C i biofilm og buljong. Ved konjugasjonsforsøk hvor det ble observert transkonjuganter, ble IncK og IncI plasmidet overført til resipient innen 72 timer i buljong, og mellom 24 og 168 timer i biofilm ved 25°C. Generelt sett ble plasmidene overført ved et tidligere tidspunkt i buljong enn i biofilm ved 25 og 30/37°C. Ingen transkonjuganter ble observert ved 12°C. *Serratia marcescens* og *Serratia proteamaculans* overførte IncK plasmidet i stor grad til *E. coli* i buljong. Resistenstesting viste at oppnådde transkonjuganter uttrykte en økt minste hemmende konsentrasjon (MIC)-verdi for antibiotika som AmpC har en enzymatisk aktivitet mot.

Disse funnene indikerer at IncK plasmidet kan overføres innen arten *E. coli* og mellom *Serratia* spp. og *E. coli*, og at IncI1 plasmidet kan overføres mellom ulike *E. coli* under forhold relevante for kyllingproduksjonen. *Serratia* spp. kan dermed være en mulig bidragsyter i den horisontale spredningen av IncK plasmider og til persistens av denne type plasmider i miljøer der disse bakteriene forekommer.

## ABSTRACT

Antibiotic resistance is an emerging problem worldwide and constitutes a serious threat to human health care. AmpC  $\beta$ -lactamase (AmpC)-producing *Escherichia coli* has frequently been detected in the broiler production chain. The gene *bla*<sub>CMY-2</sub> encoding AmpC is located on plasmids and confer resistance to cephalosporins considered critical for treatment of human infections. The plasmids can disseminate to other bacteria by horizontal gene transfer, in addition to their persistence in the production chain without any selection pressure from cephalosporin antibiotics.

The aim of this study was therefore to investigate the ability of bacteria to transfer the AmpC resistance plasmids IncK and IncII, with a high prevalence in the Norwegian broiler production. Plasmid transfer was performed by conjugation both within and between *E. coli* and the environmental bacteria *Serratia*, under conditions relevant to the food production. Both *E. coli* and *Serratia* species transconjugants obtained in the experiments were included as donors of the IncK plasmid, whereas *E. coli* was used as donor of the IncII plasmid. Conjugations were performed in biofilms, by broth mating and colony mating at 12, 25 and 30°C (*Serratia* spp.) or 37°C (*E. coli*). Samples were taken at several time-points ranging from 4-168 hours. Also, the ability of *E. coli* and *Serratia* spp. transconjugants to transfer the IncK plasmid was compared by broth mating.

The IncK plasmid was transferred to *E. coli* and *Serratia* spp. with both *E. coli* and *Serratia* spp. transconjugants as donor. The IncII plasmid was transferred to *E. coli*. Both plasmids were transferred at 25 and 30/37°C in biofilm and broth. In conjugation experiments where transconjugants were observed, the IncK and IncII plasmid transferred to the recipient within 72 hours by broth mating, and between 24 and 168 hours in biofilm at 25°C. In general, plasmids were transferred at an earlier time-point by broth mating than in biofilm at 25 and 30/37°C. No transconjugants were observed at 12°C. *Serratia marcescens* and *Serratia proteamaculans* transferred the IncK plasmid to *E. coli* at a great extent by broth mating. Susceptibility testing showed that transconjugants expressed an increased minimum inhibitory concentration (MIC) against antibiotics at which AmpC is enzymatically active.

These findings indicate that IncK plasmids have the ability to transfer within the species *E. coli* and between *Serratia* spp. and *E. coli*, and that the IncII plasmid can be transferred between different *E. coli*, under conditions relevant to the broiler production. *Serratia* spp. appears to be a possible contributor to the horizontal dissemination of IncK plasmids and the persistence of these plasmids in environments where these bacteria occur.

## INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD.....	I
SAMMENDRAG .....	II
ABSTRACT .....	III
1. INNLEDNING .....	1
1.1 Bakgrunn: AmpC-produserende <i>E. coli</i> i norsk kyllingproduksjon .....	1
1.2 Antibiotikaresistens .....	2
1.2.1 Resistensmekanismer .....	2
1.2.2 Overføring av resistens.....	2
1.2.3 Plasmider .....	3
1.3 ESBL/AmpC .....	4
1.3.1 Hva er ESBL/AmpC?.....	4
1.3.2 ESBL/AmpC produserende bakterier.....	5
1.3.3 Fra ESBL til AmpC.....	5
1.4 Antibiotikaresistens i matkjeden .....	6
1.4.1 Spredning av resistens i matkjeden .....	6
1.4.2 Biofilm.....	7
1.5 Målet med forsøkene .....	9
2. MATERIALER OG METODER .....	10
2.1 Bakteriestammer.....	10
2.2 Innledende forsøk.....	12
2.2.1 Test av selektive medier for differensiering av donator og resipientstammer.....	12
2.2.2 Undersøkelse av evnen til å danne biofilm hos donator og resipient .....	14
2.2.3 Multiplex PCR for fylogenetisk gruppering av <i>E. coli</i> .....	14
2.2.4 Høsting av biofilm.....	16
2.3 Kartlegging av evne til å være resipient .....	16
2.4 Konjugasjon ved ulike temperaturer .....	17
2.4.1 Konjugasjon i biofilm.....	17
2.4.2 Konjugasjon i buljong .....	18
2.4.3 Konjugasjon på agar .....	19
2.5 Kvantitativ bestemmelse av konjugasjon .....	19
2.6 Verifisering av transkonjuganter .....	19
2.6.1 Real-time PCR.....	20
2.6.2 Multiplex PCR for fylogenetisk gruppering av <i>E. coli</i> .....	21
2.6.3 MALDI-TOF .....	21
2.7 Resistensbestemmelse .....	21

3. RESULTAT.....	23
3.1 Innledende forsøk.....	23
3.1.1 Test av selektive medier for differensiering av donator og resipientstammer.....	23
3.1.2 Undersøkelse av evnen til å danne biofilm hos donator og resipient.....	23
3.1.3 Multiplex PCR for fylogenetisk gruppering av <i>E. coli</i> .....	23
3.1.4 Høsting av biofilm.....	24
3.2. Kartlegging av evne til å være resipient med <i>E. coli</i> som donator av IncK og IncII plasmider ...	25
3.3 Konjugasjon i biofilm, buljong og på agar med <i>E. coli</i> som donator.....	26
3.3.1 Pilotforsøk - overføring av IncK og IncII plasmidet til <i>E. coli</i> i biofilm.....	26
3.3.2 Overføring av IncK og IncII plasmidet til <i>E. coli</i> .....	26
3.3.3 Overføring av IncK og IncII plasmidet til EHEC.....	30
3.3.4 Overføring av IncK plasmidet til <i>S. marcescens</i> .....	32
3.4 Kartlegging av evne til å være resipient med <i>S. marcescens</i> transkonjugant som donator av IncK plasmidet.....	34
3.5 Konjugasjon i biofilm, buljong og på agar med <i>S. marcescens</i> transkonjugant som donator.....	35
3.5.1 Overføring av IncK plasmidet til <i>E. coli</i> .....	35
3.5.2 Overføring av IncK plasmidet til <i>S. proteamaculans</i> .....	38
3.6 Oppsummering av konjugasjon i biofilm, buljong og på agar.....	40
3.7 Kartlegging av evne til å være resipient med <i>S. proteamaculans</i> transkonjugant som donator av IncK plasmidet.....	42
3.8 Kvantitativ bestemmelse av konjugasjon.....	42
3.9 Resistensbestemmelse.....	43
3.10 Potensielle spredningsveier for IncK og IncII plasmidet.....	45
4. DISKUSJON.....	46
5. LITTERATURLISTE.....	57
VEDLEGG.....	66

## 1. INNLEDNING

Spredning av antibiotikaresistens utgjør en alvorlig trussel mot folkehelsen. Fra naturens side er mange bakterier resistente mot ulike typer antibiotika, men økt forbruk og til dels misbruk av antibiotika både hos mennesker og dyr, har bidratt til en økning av resistens mot antimikrobielle midler (WHO 2015). Antibiotikaresistens kan medføre manglende behandlingsalternativer ved alvorlige infeksjoner (Pitout & Laupland 2008), og som en konsekvens er det estimert at dette fører til 25.000 dødsfall per år i den europeiske union (WHO 2015).

Antibiotikaresistens hos noen bakteriearter er mer alvorlig enn hos andre, dette gjelder spesielt penicillinresistente *Streptococcus pneumoniae*, methicillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomycinresistente *Enterococcus* spp. (VRE) og cefalosporin- (ESBL/AmpC), aminoglykosid- og fluorokinolonresistente enterobakterier (som *Escherichia coli* og *Klebsiella* spp.) (Steinbakk et al. 2014).

Cefalosporiner er en gruppe kritisk viktige antibiotika som ofte benyttes i empirisk behandling av alvorlige sykdommer (Pitout & Laupland 2008), og resistens mot denne typen antibiotika er derfor ekstra bekymringsverdig. Bakterier som produserer enzymer av typen ekstendert spektrum  $\beta$ -laktamase (ESBL) eller AmpC  $\beta$ -laktamase (AmpC) er en av hovedårsakene til at viktige cefalosporiner ikke fungerer (Pitout & Laupland 2008). Gener som koder for ESBL/AmpC spres effektivt ved horisontal genoverføring og er en viktig bidragsyter til en økende cefalosporinresistens (Davies & Davies 2010).

Plasmid-mediert AmpC ble først rapportert i 1988 (Bauernfeind et al. 1989), og det har i flere land i Europa blitt påvist en høy forekomst av AmpC-produserende *E. coli* hos fjørfe (Dierikx et al. 2013a; Laube et al. 2013; Seiffert et al. 2013).

I 2000 startet et overvåkningsprogram for antibiotikaresistens hos bakterier isolert fra mat, fôr og dyr i Norge, NORM-VET ([www.vetinst.no/Publikasjoner/NORM-NORM-VET](http://www.vetinst.no/Publikasjoner/NORM-NORM-VET)), og i 2006 ble en ESBL-produserende *E. coli* isolert fra avføring hos en slaktekylling. Dette var første gang ESBL-produserende *E. coli* ble funnet i et matproduserende dyr i Norge (NORM/NORM-VET 2006-2007; Sunde et al. 2009).

### 1.1 Bakgrunn: AmpC-produserende *E. coli* i norsk kyllingproduksjon

Norge importerer egg til klekking fra Sverige som blir foreldredyr, og i noen tilfeller importers også besteforeldredyr fra Skottland (Nortura 2016) til den norske

produksjonspyramiden for slaktekylling (Mo et al. 2014). I en studie utført av Mo et al. (2014) fant de at det i Norge var AmpC-produserende *E. coli* i alle trinn av produksjonspyramiden; besteforeldreflokker, foreldreflokker, slaktekylling og kyllingfileter. I 2011-2012 varierte funn av AmpC-produserende *E. coli* mellom 8 og 43%, med høyest forekomst hos slaktekylling, uten noen form for seleksjonspress fra antibiotikabruk. De cefalosporinresistente *E. coli* isolatene i studien var AmpC-produserende, og alle (n=203) bortsett fra 15 (som hadde mutasjon i *ampC* promoter og attenuator region) var bærere av det plasmid-medierte *bla*<sub>CMY-2</sub>-genet (Mo et al. 2014). Resistensgenet ble i all hovedsak funnet på IncK og IncII plasmider (Mo et al. 2016). Funn av resistente bakterier i produksjonsdyr- og matkjeden kan gi grunn til bekymring fordi bakteriene kan være en kilde til at resistensgener kan erverves hos mennesker og overføres til humanpatogene bakterier (Doi et al. 2010; Voets et al. 2013). Potensialet for spredning til humanpatogene bakterier vil sannsynligvis øke ved økt forekomst av cefalosporinresistente kommensale *E. coli* og andre apatogene bakterier.

## 1.2 Antibiotikaresistens

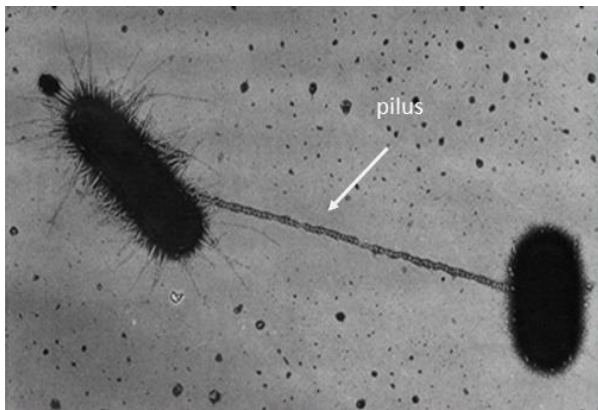
### 1.2.1 Resistensmekanismer

Bakteriers antibiotikaresistens kan være både ervervet og iboende. Iboende resistens nedarves vertikalt og utgjør ingen risiko hos apatogene bakterier. Både mutasjoner og opptak av gener som gir antibiotikaresistens kategoriseres som ervervet resistens. Ervervet resistens utgjør en potensielt større risiko enn iboende resistens fordi den kan spres ved horisontal genoverføring (Capita & Alonso-Calleja 2013; Mathur & Singh 2005).

### 1.2.2 Overføring av resistens

Horisontal spredning av gener kan skje ved konjugasjon, transformasjon og transduksjon. Under transformasjon tar bakteriecellen opp ekstracellulært/nakent DNA fra omgivelsene, med opprinnelse fra lyserte eller levende bakterieceller (Norman et al. 2009; Thomas & Nielsen 2005). Transduksjon er overføring av DNA til bakterier via bakteriofager som overfører sitt eget og eventuelt bakterielt DNA til den nye verten (Norman et al. 2009; Verraes et al. 2013). I motsetning til transformasjon og transduksjon krever konjugasjon direkte kontakt mellom donor (giver av plasmidet) og resipient (mottager av plasmidet) for å få overført DNA. Direkte kontakt oppnås ved at det dannes en pilus som kobler de to cellene sammen (Figur 1) slik at transposoner eller plasmider sammen med proteiner kodet av donor, kan overføres til resipienten (Norman et al. 2009; Thomas & Nielsen 2005). For å kunne





Figur 1. Konjugering mellom to *E.coli*. Bildet er tatt fra <https://www.nlm.nih.gov/exhibition/fromdnatobeer/exhibit/ion-tinkering-with-DNA.html>

overføre genetiske elementer til en ny bakterie, benytter donor seg av et type IV sekresjonssystem. Relaxase som er en del av relaxosomet bindes kovalent til plasmidet i donorcellen, og det dannes et kutt i plasmidet ved *oriT* («origin of transfer»). Enkelt-trådet DNA av plasmidet dannes, og festet til relaxase overføres det ved type IV sekresjonssystem og pilus til resipientcellen (Christie 2001).

Ifølge Thomas og Nielsen (2005) er det resipient som begrenser overføring av plasmider ved konjugasjon ved å hindre plasmidene i å bli overført eller etablert i den nye cellen.

Konjugering blir ansett som den mest effektive måten å spre gener som koder for antibiotikaresistens mellom bakterier (Davies & Davies 2010; Mathur & Singh 2005; Verraes et al. 2013), og forekommer både innen samme bakterieart og mellom forskjellige arter og slekter (Kruse & Sørnum 1994).

### 1.2.3 Plasmider

Plasmider er ekstrakromosomalt dobbelt-trådet DNA som kan replikeres uavhengig av det kromosomale arvematerialet. Et plasmid er ikke essensielt for verten og det inneholder få gener, men under gitte forhold kan genene på plasmidet være til fordel for verten (Carattoli 2009; Willey et al. 2012). Tilstedeværelse av plasmider har også vist seg å fremme dannelsen av biofilm (Ghigo 2001; Molin & Tolker-Nielsen 2003). Plasmider med resistensgener mot antibiotika spres effektivt ved horisontal genoverføring (Sidjabat et al. 2014), og ved hjelp av plasmid-mediert konjugasjon kan bakterier tilpasse seg nye omgivelser (Johnson & Nolan 2009a) hvor de for eksempel blir utsatt for antibiotika. Plasmider er ekstrakromosomale genetiske elementer som er gode til å tilpasse seg verten. For å unngå at en bakteriestamme som har tatt opp plasmidet skal kvitte seg med det, har mange av plasmidene gener som koder for toksin-antitoksin faktorer som dreper datterceller som ikke nedarver plasmidet ved celledeling (Carattoli 2009; Sørensen et al. 2005). Toksinene som dannes er mer stabile enn antitoksinene, og derfor vil tap av plasmidet føre til en rask degradering av antitoksinet slik at det ikke lenger kan motvirke toksinet (Unterholzner et al. 2013). Opprettholdelse av plasmidet fører derfor til at antitoksinet motvirker toksinet og plasmidet vil dermed persistere i den nye verten og dens datterceller. Et lavt antall kopier av plasmidet gir et lavere energiforbruk hos

bakteriecellen, og vil også være av betydning for om plasmidet kan opprettholdes i bakterien (Koraimann & Wagner 2014).

Identifikasjon og klassifisering av plasmider er basert på et klassifiseringsskjema utviklet av Hedges og Datta i 1971. Utgangspunktet for klassifiseringen er stabiliteten til plasmider under konjugasjon og kalles plasmid inkompatibilitet. Inkompatibilitet defineres av Carattoli (2009) som en «manglende evne til at to beslektede plasmider kan nedarves stabilt i samme cellelinje». Plasmidets replikasjonsmekanisme bestemmer om et plasmid kan eksistere sammen med et annet plasmid i en bakteriecelle. Plasmider av samme inkompatibilitetsgruppe (Inc-gruppe) har samme replikasjonsmekanisme, og kan dermed ikke ko-eksistere i samme bakterie (Carattoli et al. 2005; Johnson & Nolan 2009b). Hos *Enterobacteriaceae* har man til nå funnet 27 ulike Inc-grupper. Både IncK og IncII er blant de Inc-gruppene som forekommer oftest hos *Enterobacteriaceae* (Carattoli 2009), og de er begge kjente bærere av *bla<sub>CMY-2</sub>* (Börjesson et al. 2013; Carattoli 2009; Cejas et al. 2012; Dierikx et al. 2013a; Voets et al. 2013).

## 1.3 ESBL/AmpC

### 1.3.1 Hva er ESBL/AmpC?

Cefalosporinresistens er vanligvis mediert av enzymer som bryter ned antibiotika (Zhao & Hu 2013).

ESBL er en gruppe enzymer som kan hydrolysere 3. generasjons cefalosporiner (oxyimino-cefalosporiner som cefotaksim), 4. generasjons cefalosporiner (som cefepim), penicilliner og monobaktam (aztreonam) (Bush 2013; Pfeifer 2010; Thomson 2001). ESBL-produserende bakterier er sensitive for cefamyciner og i tillegg hemmes enzymene av  $\beta$ -laktamase inhibitorer som klavulansyre og tazobactam (Gutkind et al. 2013; Philippon et al. 2002).

AmpC enzymene hydrolyserer penicilliner, 3. generasjons cefalosporiner og cefamyciner (som cefoksitin og cefotetan). Den enzymatiske aktiviteten mot monobaktam og 4. generasjons cefalosporiner er lav. Mens ESBL hemmes av  $\beta$ -laktamase inhibitorer som klavulansyre, inhiberes AmpC bedre av kloxacillin, oxacillin og aztreonam, (Jacoby 2009). I utgangspunktet gir ikke AmpC resistens mot karbapenemer (som meropenem og imipenem), men hos bakteriestammer med en nedsatt permeabilitet i yttermembranen kan enzymet føre til resistens (Philippon et al. 2002).

ESBL/AmpC kan klassifiseres utfra funksjonelle eller molekylære egenskaper. ESBL deles inn i fire molekylære klasser (A, B, C og D) eller tre funksjonelle grupper (1, 2 og 3) med tilhørende undergrupper. AmpC tilhører klasse C basert på den molekylære klassifisering og gruppe 1 eller 1e basert på den funksjonelle grupperingen (Bush 2013). Giske et al. (2009) kom med et nytt forenklet forslag til klassifisering i 2009 hvor plasmid-mediert AmpC klasse C klassifiseres som ESBL<sub>M-C</sub>, og ESBL klassifiseres som ESBL<sub>A</sub>. I denne oppgaven benevnes ESBL<sub>M-C</sub> som AmpC og ESBL<sub>A</sub> som ESBL.

### 1.3.2 ESBL/AmpC produserende bakterier

Bakterier som produserer ESBL/AmpC tilhører stort sett familien *Enterobacteriaceae* (Brolund 2014; Dhillon & Clark 2011), og i denne oppgaven har to bakterieslekter innen denne familien blitt brukt.

Bakterien *E. coli* er en fakultativ anaerob Gram negativ stav (Willey et al. 2012) som finnes i tarmen hos mennesker og dyr som en del av den kommensale bakteriefloraen (Beloin et al. 2008). Den kan også være en humanpatogen bakterie som blant annet kan gi urinveisinfeksjon og sepsis, samt tarminfeksjoner (Sidjabat et al. 2014). Hos fjørfe kan patogene *E. coli* føre til colibacillose (infeksjon som følges av sepsis og død) (Blanco et al. 1997). Kommensale *E. coli* brukes som indikatorbakterie i overvåkning av resistens (NORM-VET) ) fordi den blir sett på som en representant for den Gram negative kommensale tarmfloraen (EFSA 2008). Optimal veksttemperatur for *E. coli* er 37°C, og den kan vokse mellom 7 og 48°C (Granum et al. 2014).

*Serratia* spp. er en fakultativ anaerob Gram negativ stavbakterie (Hejazi & Falkiner 1997) som finnes i naturen, hovedsakelig i jord, vann og på planter. *Serratia* kan forekomme hos fjørfe, og for mennesker er den en opportunistisk patogen (Grimont & Grimont 2006) som kan føre til nosokomiale sykdommer, som for eksempel urinveisinfeksjon, ekstern otitt og sepsis (Engelkirk & Duben-Engelkirk 2008). Optimal veksttemperatur for *Serratia* spp. er 30°C (Grimont & Grimont 2006). *Serratia* spp. kan ha evnen til å overleve desinfeksjonsmidler og antiseptiske midler (Hejazi & Falkiner 1997; Langsrud et al. 2003; Marrie & Costerton 1981; Parment et al. 1986).

### 1.3.3 Fra ESBL til AmpC

Plasmid-mediert ESBL har sitt opphav fra punktmutasjoner i genene som koder for de mest utbredte bredspektrede  $\beta$ -laktamasene TEM og SHV, som en følge av overforbruk av

ekstendert  $\beta$ -laktamase antibiotika (Gutkind et al. 2013; Thomson 2001). Som et resultat av videre overforbruk av disse antimikrobielle midlene, ble AmpC-bærende plasmider funnet på slutten av 1980-tallet (Gutkind et al. 2013; Philippon et al. 2002).

Kromosomalt AmpC finnes hos mange Gram negative bakterier som for eksempel *E. coli*, *Serratia marcescens* og *Citrobacter freundii*, hvor det blir lavt uttrykt (Jacoby 2009).

Kromosomalt AmpC finnes derimot ikke hos *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. og *Proteus mirabilis* (Philippon et al. 2002). Ulike typer  $\beta$ -laktam antibiotika, spesielt cefoksitin og imipenem er faktorer som kan indusere kromosomalt AmpC (Jacoby 2009). Hos *E. coli* kan derimot ikke kromosomalt AmpC induseres, men høyere uttrykk av enzymet ses ved mutasjoner i promoter- eller attenuator-regionen (Gutkind et al. 2013; Tracz et al. 2007).

Overproduksjonen av kromosomalt AmpC fører til resistens hos bakterien ovenfor de nevnte  $\beta$ -laktam antibiotika (Gutkind et al. 2013).

Plasmid-mediert AmpC har oppstått som en følge av overføring av kromosomale AmpC-gener til plasmider. De fleste plasmid-medierte AmpC enzymene kan i motsetning til de fleste kromosomale, ikke induseres (Jacoby 2009; Thomson 2001). Enzymene deles inn i familier basert på ulikheter i aminosyresekvensen (Jacoby 2009): ACC, ACT, CFE, CMY, DHA, FOX, LAT, MIR og MOX (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>). Det finnes ulike alleler innen familiene, og CMY-2 er det plasmid-medierte AmpC genet som på verdensbasis er mest utbredt, både geografisk og i antall (Gutkind et al. 2013; Philippon et al. 2002). CMY-2 ble først isolert fra *Klebsiella pneumoniae* og stammer sannsynligvis fra det kromosomale AmpC-genet hos *C. freundii* (Jacoby 2009).

## 1.4 Antibiotikaresistens i matkjeden

### 1.4.1 Spredning av resistens i matkjeden

Et økt forbruk og til dels misbruk av antibiotika hos både mennesker og dyr har bidratt til økt resistens mot antibiotika. Et viktig skritt på veien for å begrense en videre resistensutvikling, vil være å jobbe for et forsvarlig bruk av antibiotika innen matproduksjon (Capita & Alonso-Calleja 2013).

I Norge benyttes svært lave mengder antibiotika terapeutisk på dyr i matproduksjonen sammenlignet med andre land i Europa (Refsum 2015; VKM 2015). Cefalosporiner blir ikke benyttet i norsk matproduksjon (NORM/NORM-VET 2014), men til tross for dette er en liten andel av *E. coli* stammene isolert fra norsk kylling allikevel cefalosporinresistente.

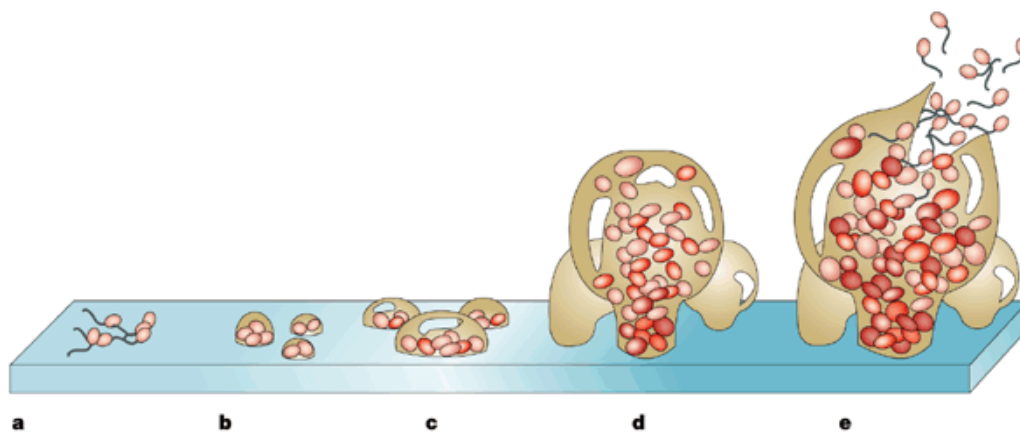
Import av levende dyr og mat er en viktig bidragsyter til innførsel av antibiotikaresistente bakterier til Norge (NORM/NORM-VET 2006 ; Sunde et al. 2009). De resistente bakteriene kan overføres til mennesker, som igjen kan spre disse bakteriene videre til andre mennesker og dyr (VKM 2015). Hvor mye matproduksjonen er med på å bidra til en økende antibiotikaresistens er usikkert, og derfor er overvåkningsprogrammer et viktig tiltak for å følge med på utviklingen (Capita & Alonso-Calleja 2013).

Mat kan kontamineres med antibiotikaresistente bakterier under slaktning ved fekal kontaminering, i produksjonslokalet, eller hjemme på kjøkkenbenken (Verraes et al. 2013). Det vil derfor være av stor betydning å forhindre spredning av resistente bakterier i primær matproduksjon, ved prosessering og preparering av mat (Capita & Alonso-Calleja 2013). Biofilm utgjør et stort reservoar av bakterier som kan kontaminere mat (Shi & Zhu 2009), og har i næringsmiddelindustrien blitt assosiert med matbårne infeksjoner og forringelse av matkvaliteten (Chmielewski & Frank 2003). Overføring av genetisk materiale, deriblant resistensgener, kan forekomme mellom bakterier i biofilm (Davey & O'toole 2000; Sørensen et al. 2005). Det vil derfor være viktig å hindre dannelse av biofilm, slik at bakteriene ikke blir en tilbakevendende årsak til kontaminering i produksjonskjeden (Srey et al. 2013).

#### 1.4.2 Biofilm

I naturen lever de fleste bakterier i en biofilm festet til en overflate (Davey & O'toole 2000). En biofilm består av bakterieceller organisert i et strukturert samfunn, omgitt av en selvprodusert ekstracellulær matriks (Dunne 2002). Den ekstracellulære matriks som omslutter biofilmen består hovedsakelig av polysakkarider (Donlan 2002) i tillegg til blant annet proteiner, nukleinsyrer og lipider/fosfolipider (Beloin et al. 2008), og den gir bakteriene i biofilmen en bedre beskyttelse mot miljøet rundt (Donlan 2002; Srey et al. 2013). En eller flere ulike bakteriearter og andre mikroorganismer kan leve sammen i en biofilm (Davey & O'toole 2000) hvor de kan danne et enkelt lag eller en tredimensjonal struktur (Shi & Zhu 2009).

Biofilmdannelse er en dynamisk prosess som starter ved at bakterieceller fester seg til en overflate, aktivt eller passivt (Figur 2). En biofilm kan dannes på overflater som plastikk, glass, metall, tre og matprodukter (Srey et al. 2013). Om bakteriene kan feste seg til overflaten er avhengig av egenskapene til overflaten (ladning, tekstur), cellenes hydrofobisitet, fimbrier, flageller og produksjon av ekstracellulært matriks, pH, temperatur, næring (Donlan 2002; Srey et al. 2013) og bakteriestamme (Dunne 2002).



Figur 2. Utviklingen av biofilm i fem trinn (a-e). a) bakteriene fester seg reversibelt til en overflate, b) bakteriene er irreversibelt festet til overflaten, c) mikrokolonier dannes, d) biofilmen modnes og det dannes en organisert struktur, e) bakterieceller kan løsne fra biofilmen og gå tilbake til sin planktoniske form. Bildet er tatt fra Davies (2003).

I det første stadiet vil det kun bli dannet en liten mengde ekstracellulært matriks og bakteriecellene kan løsne fra overflaten (Srey et al. 2013). I neste trinn dannes det ekstracellulært matriks som irreversibelt fester bakteriecellene til overflaten (Dunne 2002). Bakteriecellene sitter nå så godt festet til overflaten at for å få de fjernet må det benyttes fysisk kraft eller kjemiske løsninger som for eksempel enzymer (Srey et al. 2013). Når mikrokolonier etter hvert dannes, produseres mer ekstracellulært matriks som gjør at bakteriene sitter bedre fast til underlaget samtidig som de beskyttes fra miljøet rundt (Srey et al. 2013). Under modningen utvikler biofilmen en organisert struktur som sikrer næring og oksygen til celler inne i biofilmen, og fjerning av avfall (Davey & O'toole 2000; Dunne 2002). I dette stadiet vil bakteriene i biofilmen uttrykke fysiologiske egenskaper som skiller dem fra planktoniske bakterier (Beloin et al. 2008). Bakteriene vil uttrykke ulike gener ut fra deres plassering i biofilmen i forhold til miljøets pH, oksygenforhold, og tilgang på næringsstoffer (Jefferson 2004). Kommunikasjon mellom bakteriene foregår ved quorum sensing hvor de fleste Gram negative bakterier skiller ut *N*-acyl-homoserine lactone (AHL) som signalmolekyl (Van Houdt & Michiels 2010). Quorum sensing påvirker hvilke gener som skal uttrykkes (Jefferson 2004), blant annet gener som er involvert i utvikling av biofilm og utskillelse av antimikrobielle forbindelser (Van Houdt & Michiels 2010). I det siste trinnet i utviklingen av en biofilm kan bakterieceller gå tilbake til å bli planktoniske celler. Ytre forandringer, enzymatisk degradering, frigjøring av ekstracellulært matriks eller liten tilgang på næringsstoffer kan være årsaker til at bakterier løsner fra biofilmen (Srey et al. 2013).

En biofilm vil kunne gi flere fordeler for bakteriene som er en del av biofilmen. Den vil som tidligere nevnt til en viss grad beskytte bakteriene fra miljøet rundt, vannkanalene som omgir mikrokoloniene bidrar til økt tilgang på næringsstoffer og fjerner avfall, i tillegg til at bakteriene kan tilegne seg nye genetiske egenskaper som for eksempel antibiotikaresistens (Davey & O'toole 2000). Flere studier har påvist overføring av plasmider i biofilm (Król et al. 2013; Molin & Tolker-Nielsen 2003). En biofilm vil også gjøre bakteriene mer resistente mot vask og desinfeksjonsmidler (Shi & Zhu 2009; Srey et al. 2013), noe som fører til problemer for næringsmiddelindustrien.

### 1.5 Målet med forsøkene

Plasmid-mediert AmpC forekommer hos *E. coli* i norsk kyllingproduksjon til tross for minimal bruk av antibiotika (Mo et al. 2014; VKM 2015). Den opprinnelige introduksjonen var sannsynligvis gjennom import av besteforeldre/foreldredyr (Sunde et al. 2009), men undersøkelser gjort i 2014 og 2015 tydet på at svært få av de importerte kyllingene nå er positive (Animalia 2016). Andre faktorer må derfor være av betydning ettersom AmpC-produserende *E. coli* persisterer i norsk kyllingproduksjon (NORM/NORM-VET 2014 2015).

Forekomsten av cefalosporinresistens opprettholdes i slaktekyllingproduksjonen selv med begrenset vertikal spredning fra foreldreflokkene. Ifølge Mo (2016) virker hygiene og biosikkerhet (dårlige desinfeksjonsrutiner og mye persontrafikk i kyllinghuset) å være viktige årsaker. Det vil derfor være viktig å få kjennskap til om miljøbakterier som er mer robuste mot vask og desinfeksjon kan fungere som reservoar for spredning og opprettholdelse av AmpC-resistens i matkjeden. For å etterligne forholdene i produksjonskjeden ble forsøkene i denne studien utført ved 12°C (nedskjæring- og foredlingsbedrifter), 25°C (kyllinghus og slakteri) og 30/37°C (optimale forhold for bakteriene), i biofilm, buljong og på agar. Biofilm og buljong er de to modellsystemene som kan relateres til forhold i kyllingproduksjonen. Biofilm kan forekomme på slakterier, i produksjonsmiljøer og kyllinghus på utstyr og overflater uten tilstrekkelig renhold. Forhold som kan sammenlignes med buljong kan være væske/kyllingsaft som opptrer ved slaktning og foredling, i tillegg til mer næringsfattige suspensjoner rundt drikkestasjoner i kyllinghus og fuktige områder som oppstår ved renhold.

Målet med denne oppgaven var å se på bakterienes evne til å overføre *bla*<sub>CMY-2</sub> bærende IncK og IncII plasmider med høy forekomst i norsk fjørfeproduksjon, både innen og mellom *E. coli* og miljøbakterien *Serratia* spp., under forhold som er relevante for matproduksjonen.

## 2. MATERIALER OG METODER

### 2.1 Bakteriestammer

Bakteriestammene (n=45) kom fra Veterinærinstituttet (*E. coli*) og Nofima (*Serratia* spp. og *E. coli*), i tillegg til en *E. coli* stamme tilsendt fra T. Romeo, University of Florida (Jackson et al. 2002) og er gitt i Tabell 1. AmpC-produserende *E. coli* isolater og transkonjuganter av *S. marcescens* og *Serratia proteamaculans*, oppnådd i denne studien, ble benyttet som donorer, mens nalidiksinsyre-, rifampicin-, og kanamycin-resistente stammer av *E. coli* og *Serratia* spp. ble benyttet som potensielle resipienter (heretter kalt resipienter).

Tabell 1. Donor- og resipientstammer. Resipientstammer benyttet ved konjugasjon i biofilm, buljong og på agar er listet opp øverst i tabellen, mens resipientstammer benyttet i kartleggingen av potensielle resipienter er listet opp nederst. Kun relevante antibiotika er tatt med under resistensmønstre.

Donor/ resipient	Stamme-id	Bakteriestamme	Kilde	IncK/ IncI1	Resistensmønster <sup>1</sup>
<b>Donor</b>	(2012-01) 1292	<i>E. coli</i> , AmpC	Kyllingkjøtt (VI <sup>2</sup> )	IncK <sup>3</sup>	Ctx <sup>R</sup> , Nal <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup> , Kan <sup>S</sup>
<b>Donor</b>	(2012-01) 2798	<i>E. coli</i> , AmpC	Kyllingkjøtt (VI)	IncI1	Ctx <sup>R</sup> , Nal <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup> , Kan <sup>S</sup>
<b>Donor</b>	(2014-01) 1043	<i>E. coli</i> , AmpC	Kyllingkjøtt (VI)	IncK	Ctx <sup>R</sup> , Nal <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup>
<b>Donor (TK <sup>4</sup>)</b>	MF 3306 (TK)	<i>S. marcescens</i>	TK fra konjugasjon i biofilm	IncK	Ctx <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Donor (TK <sup>4</sup>)</b>	MF 3307 (TK)	<i>S. marcescens</i>	TK fra konjugasjon i biofilm	IncK	Ctx <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Donor (TK <sup>4</sup>)</b>	MF 5685 (TK)	<i>S. proteamaculans</i>	TK fra konjugasjon på agar	IncK	Ctx <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>6</sup>
<b>Resipient</b>	(2011-01) 6927-5	<i>E. coli</i>	Kylling, avføring, indikator (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient</b>	(2014-01) 1268	<i>E. coli</i>	Kylling, avføring, indikator (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient</b>	(2009-01) 3064-2	<i>E. coli</i>	Kylling, avføring, indikator (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient</b>	MF 3578	<i>EHEC</i> <sup>7</sup> O103	Morrrpølse, 2006 utbrudd (VI)	-	Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b>	TRMG1655 <i>csrA</i>	<i>E. coli</i>	Jackson et al. (2002)	ikke utført	Ctx <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>
<b>Resipient</b>	MF 3306	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b>	MF 3307	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b>	MF 5685	<i>S. proteamaculans</i>	Kyllingfilet (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>6</sup>
<b>Resipient <sup>8</sup></b>	(2012-01) 1553	<i>E. coli</i>	Kyllingkjøtt (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient <sup>8</sup></b>	(2012-01) 6154	<i>E. coli</i>	Kyllingkjøtt (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient <sup>8</sup></b>	(2012-01) 706	<i>E. coli</i>	Kyllingkjøtt (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient <sup>8</sup></b>	(2012-01) 7079	<i>E. coli</i>	Kyllingkjøtt (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient <sup>8</sup></b>	(2011-01) 3460-5	<i>E. coli</i>	Kylling, avføring (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>



<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	(2011-01) 1173	<i>E. coli</i>	Fjørfe, sepsis (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	(2014-01) 1450	<i>E. coli</i>	Kylling, avføring (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	(2014-01) 1667	<i>E. coli</i>	Kylling, avføring (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	(2014-01) 2362	<i>E. coli</i>	Kylling, avføring (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	(2014-01) 4922	<i>E. coli</i>	Kylling, avføring (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	(2014-01) 5792	<i>E. coli</i>	Kylling, avføring (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	(2009-01) 4064-1	<i>E. coli</i>	Kylling, avføring (VI)	-	Ctx <sup>S</sup> , Nal <sup>R</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 2892	<i>EHEC</i> O157:H7	Utbrudd hamburger (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3574	<i>EHEC</i> O157:H7	Utbrudd hamburger (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>6</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3381	<i>EHEC</i> O157	(Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3375	<i>EHEC</i> O145	(Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3566	<i>EHEC</i> O145	(Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>6</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3194	<i>E. coli</i>	(Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>6</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 2602	<i>S. marcescens</i>	ATCC 13880 (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3308	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3304	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3309	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>6</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3298	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3299	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3300	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 2336	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3301	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3302	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3303	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3305	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3297	<i>S. marcescens</i>	Fotbad (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 3612	<i>Serratia</i> sp.	Slakteri (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 5676	<i>S. liquefaciens</i> <sup>9</sup>	Kyllingfilet (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>6</sup>
<b>Resipient</b> <sup>8</sup>	MF 5682	<i>S. proteamaculans</i>	Kyllingfilet (Nofima)	-	Ctx <sup>S</sup> , Rif <sup>R</sup> <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Cefotaksim (Ctx), nalidiksinsyre (Nal), rifampicin (Rif), kanamycin (Kan). Opphevet R indikerer resistent, opphevet S indikerer sensitiv.

<sup>2</sup> Veterinærinstituttet

<sup>3</sup> pNVI1292 (Mo et al. 2016)

<sup>4</sup> TK = transkonjugant oppnådd i denne studien

<sup>5</sup> ≥16 mg/L

<sup>6</sup> ≥ 100 mg/L

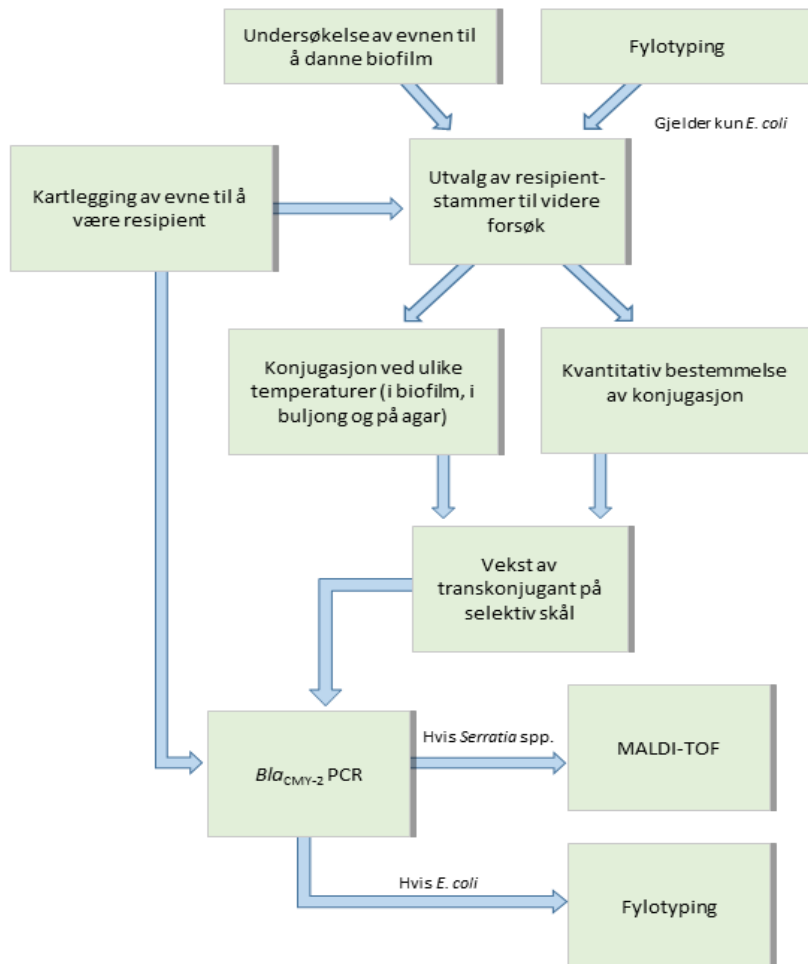
<sup>7</sup> EHEC = enterohemorragisk *E. coli*

<sup>8</sup> Bakteriestammer benyttet i kartleggingen av potensielle resipienter

<sup>9</sup> *Serratia liquefaciens*

## 2.2 Innledende forsøk

Før bakteriestammer til konjugasjonsforsøk kunne velges ut, ble det utført innledende forsøk. Gangen i metodene er visualisert i Figur 3.



Figur 3. Flytskjema for metoder brukt i studien.

### 2.2.1 Test av selektive medier for differensiering av donor og resipientstammer

For å finne ut hvordan transkonjugant, donor og resipient kunne skilles fra hverandre, ble tre *E. coli* donorer og alle resipienter platet ut på syv eller åtte ulike selektive medier: MacConkey (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England), Violet Red Bile Agar (VRBA, Difco, Detroit, MI, USA), Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Oxoid LTD), brilliance™ *E.coli*/coliform medium (Oxoid LTD), Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid LTD) tilsatt 16 mg/L rifampicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Pseudomonas Agar Base med CFC (CFC, cephalotin, cetrylmethylammonium-bromid og natrium fucidate, Oxoid LTD) tilsatt 10 mL 85% glycerin (Merck, Darmstadt, Tyskland), og Mueller Hinton (MH, Difco, Sparks, MD, USA) tilsatt 0.5 mg/L cefotaksim (Duchefa, Haarlem, Nederland) og/eller MH tilsatt 1,0

mg/L cefotaksim. Mediene ble laget i henhold til opplysninger gitt av produsent ved å veie opp angitt mengde og tilsette destillert vann før autoklivering. Tilsetning av antibiotika ble gjort etter avkjøling til 50°C. Bakteriene ble inkubert ved 30°C over natt før avlesning. Bakteriestammene ble plattet ut på MH tilsatt cefotaksim med ulik konsentrasjon (mg/L) med utgangspunkt i kjente epidemiologiske «cut-off» (ECOFF) for *E. coli* og *Serratia* spp. (EUCAST 2015a). TSA tilsatt 16 mg/L rifampicin ble benyttet fordi de fleste *S. marcescens* ifølge en studie utført av Stock et al. (2003) har en minste hemmende konsentrasjon (MIC) for rifampicin på 32-64 mg/L. De resterende *Serratia* spp. som ikke vokste på TSA tilsatt 16 mg/L ble gjort rifampicin-resistente ( $\geq 100$  mg/L) av laboratorieingeniør ved å utsette bakteriene for en gradvis økende konsentrasjon av rifampicin (TSA tilsatt 50 og 100 mg/L rifampicin).

Kjente resistensprofiler (Tabell 1) og vekst på selektive skåler som beskrevet over, ga grunnlaget for hvilke medier som ble valgt. Tabell 2 viser hvilke MH-medier som ble benyttet til de ulike kombinasjonene av donor og resipient.

Tabell 2. Antibiotika tilsatt Mueller Hinton agar for å selektere fram transkonjugant (TK), donor og/eller resipient ved konjugasjon i biofilm, i buljong og på agar for de ulike kombinasjonene av donor og resipient. Ved konjugasjon i buljong og på agar ble kun transkonjuganter selektert.

Donor → resipient	Selektivitet <sup>1</sup>		
	Transkonjugant (TK)	Donor og TK	Resipient og TK
<i>E. coli</i> → <i>E. coli</i> (Nal <sup>R</sup> )	0,5 mg/L Ctx + 20 mg/L Nal	0,5 mg/L Ctx	20 mg/L Nal
<i>E. coli</i> → <i>E. coli</i> (Rif <sup>R</sup> )	0,5 mg/L Ctx + 100 mg/L Rif	0,5 mg/L Ctx	100 mg/L Rif
<i>E. coli</i> → <i>E. coli</i> (Kan <sup>R</sup> )	0,5 mg/L Ctx + 100 mg/L Kan <sup>2</sup>	0,5 mg/L Ctx	100 mg/L Kan
<i>E. coli</i> → <i>Serratia</i> spp. (Rif <sup>R</sup> )	1,0 mg/L Ctx + 16 eller 100 mg/L Rif	1,0 mg/L Ctx	16 eller 100 mg/L Rif
<i>Serratia</i> spp. TK → <i>E. coli</i> (Nal <sup>R</sup> )	0,5 mg/L Ctx + 20 mg/L Nal <sup>3</sup>	0,5 mg/L Ctx	20 mg/L Nal
<i>S. marcescens</i> TK → <i>Serratia</i> spp. (Rif <sup>R</sup> )	1,0 mg/L Ctx + 100 mg/L Rif	1,0 mg/L Ctx	100 mg/L Rif
<i>S. proteamaculans</i> TK → <i>Serratia</i> spp. (Nal <sup>R</sup> )	1,0 mg/L Ctx + 30 mg/L Nal		

<sup>1</sup> cefotaksim (Ctx), nalidiksinsyre (Nal), rifampicin (Rif), kanamycin (Kan)

<sup>2</sup> Invitrogen, Paisley, U.K.

<sup>3</sup> 1,0 mg/L Ctx og 30 mg/L Nal benyttet istedenfor 0,5 mg/L Ctx og 20 mg/L Nal med *S. proteamaculans* transkonjugant 5685 som donor

For nalidiksinsyre-resistente *E. coli* ble 20 mg/L nalidiksinsyre benyttet fordi ECOFF for *E. coli* og nalidiksinsyre er 16 mg/L (EUCAST 2015b).

For å beregne av antall kolonidannende enheter (kde) av hhv donor og resipient ble antall kde av transkonjugant (skåler med to antibiotika) trukket fra kde på skålene med enkeltantibiotikum (se Tabell 2).

### 2.2.2 Undersøkelse av evnen til å danne biofilm hos donor og resipient

Evne til å danne biofilm på stålkupong ble undersøkt for fem stammer. Hver bakteriestamme ble inokulert i Luria-Bertani-buljong (LB-buljong Oxoid LTD med og uten 1% NaCl (Merck), og inkubert over natt ved 30°C ved 100 rpm. Deretter ble 1 mL bakteriekultur fra LB-buljong med og uten 1% NaCl tilsatt henholdsvis 9 mL LB-buljong med og uten 1% NaCl i et autoklavert glassrør. En autoklavert stålkupong (AISI 304) på 75x22 mm ble plassert i glassrør for inkubering ved 25°C i tre dager og ved 12°C i fem dager. Biofilmdannelse i luft-væske fasen på stålkupong ble vurdert og gradert makroskopisk. Ingen synlig dannelse av biofilm fikk tallverdien null (0), mens dannelse av biofilm ble gradert fra 1-3, fra svak til en god biofilm. Stålkupongene ble skylt forsiktig med destillert vann før de ble farget med 0,1% krystallfiolett (Merck) i 30 minutter, hvorpå de ble vurdert og gradert på samme måte som før fargingen (Nesse et al. 2014). Under avlesning av stålkuponger ble det observert en god korrelasjon i biofilmdannelse mellom stålkupong og glassrøret den sto i, og en høyere gradering av biofilmdannelse i LB-buljong uten 1% NaCl. Resterende stammer (n=40) ble derfor kun testet for evne til å danne biofilm i glassrør i LB-buljong uten 1% NaCl. En 1 µL podeøse med bakterier ble inokulert i LB-buljong uten 1% NaCl og inkubert ved 12°C i fem dager, og 25°C i tre dager. Biofilmdannelse på glasset ble vurdert makroskopisk, og gradert på samme måte som nevnt over.

### 2.2.3 Multiplex PCR for fylogenetisk gruppering av *E. coli*

*E. coli* kan deles inn i fire fylogenetiske grupper; A, B1, B2 eller D, utfra kombinasjonen av tilstedeværelse eller fravær av genene *gadA*, *chuA* og *yjaA*, og DNA-sekvensen TSPE4.C2 (Doumith et al. 2012). Donorer og resipienter av *E. coli* ble satt opp på multiplex PCR for fylogenetisk gruppering for å kunne velge resipienter med en annen fylotype enn donor til konjugasjonsforsøk.

Bakteriekoloni fra TSA ble overført med en steril pipettespiss til 100 µL autoklavert destillert vann i eppendorfrør. Eppendorfrøret ble satt i varmeblokk (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Tyskland) på 96°C i 15 minutter før sentrifugering i 5 minutter ved 13.000 rpm

(Biofuge fresco, Heraeus, Osterode, Tyskland). DNA ble frosset ned ved -20 °C for oppbevaring før PCR-kjøring. Mastermiks som besto av 12.5 µL 2x Qiagen Multiplex PCR mix (Qiagen GmbH, Hilden, Tyskland), 0.5 µL 10 µM primermix (Invitrogen) og 10 µL milliQ vann, ble blandet og tilsatt hver brønn i PCR strips (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) sammen med 2 µL DNA templat. Primersekvensene som ble benyttet er listet opp i Tabell 3. I oppsettet ble det tatt med både positiv (amplikon fra *E. coli* 2003500827, fylotype B2 (Sunde et al. 2015)) og negativ (kun mastermiks) kontroll.

Tabell 3 Primersekvenser brukt til multiplex PCR for fylogenetisk gruppering av *E. coli*. Referanse Doumith et al. (2012).

Primer	Sekvens (5'-3')
<i>gadA</i> forward	GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG
<i>gadA</i> reverse	GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC
<i>chuA</i> forward	ATGATCATCGCGGCGTGCTG
<i>chuA</i> reverse	AAACGCGCTCGCGCCTAAT
<i>yjaA</i> forward	TGTTTCGCGATCTTGAAAGCAAACGT
<i>yjaA</i> reverse	ACCTGTGACAAACCGCCCTCA
TSPE4.C2 forward	GCGGGTGAGACAGAAACGCG
TSPE4.C2 reverse	TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG

PCR stripsene ble sentrifugert i noen sekunder for å spinne ned prøvemateriale og mastermiks i brønnene, før de ble plassert i SureCycler 8800 (Agilent Technologies). Programmet som ble benyttet besto av seks ulike trinn, gitt i Tabell 4. Trinn 2 til trinn 4 ble repetert i 30 sykler.

Tabell 4. PCR program brukt ved multiplex PCR for fylogenetisk gruppering av *E. coli*. Trinn 2 til trinn 4 ble repetert i 30 sykler.

Trinn	Temperatur	Tid
1	95°C	15 min
2	95°C	30 sek
3	60°C	30 sek
4	72°C	30 sek
5	72°C	5 min
6	8°C	Uendelig

Deretter ble 10 µL av de ulike prøvene blandet med 2.5 µL 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) før prøvene ble kjørt på en 1% agarosegel tilsatt GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) med 10x TBE buffer i 30 minutter (Veterinærinstituttet 2013b). Bilde av agarosegelen ble tatt med ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) og tilstedeværelse eller fravær av bånd i gelen tilsvarende genene *gadA*, *chuA* og *yjaA*, og DNA-sekvensen TSPE4.C2, ble lest av.

#### 2.2.4 Høsting av biofilm

Fire metoder for bestemmelse av celletall i biofilm ble testet. Biofilm av resipientstammer ble etablert på stålkupong som beskrevet i kapittel 2.2.2. Kun LB-buljong uten 1% NaCl ble brukt, og glassrør ble byttet ut med sterile 50 mL sentrifugerør av plast. Stålkupongene ble inkubert i tre dager ved 25°C (Nesse et al. 2014). Etter tre dagers inkubering ble en stålkupong fra hver av resipientstammene plassert i glassrør med 15 mL autoklavert peptonvann, og en nylonsvab (FLOQSwabs, Copan, Brescia, Italia) ble brukt for å fjerne biofilm fra stålkupong. Glassrør med bakteriesuspensjon, stålkupong og nylonsvab ble sonikert i 15 minutter ved 42 kHz ± 6% (Branson 3510, Branson Ultrasonics, Danbury, USA) før 50 µL ble platet ut på TSA. Bakteriesuspensjon, stålkupong og nylonsvab ble så overført til et 50 mL sentrifugerør tilsatt glasskuler, og vortexet i 2 min før utplating på TSA. Et nytt sett med en stålkupong fra hver resipientstamme ble så svabret med nylonsvab for å løsne biofilmen i 15 mL autoklavert peptonvann, før det ble vortexet med glasskuler i 2 min (med stålkupong og nylonsvab i sentrifugerøret) og 50 µL ble platet ut på TSA (Krol et al. 2011). Resten av suspensjonen ble overført fra sentrifugerøret til sterilt glassrør og sonikert i 15 minutter før utplating på TSA. Forsøket ble utført en gang per bakteriestamme. Etter høsting av biofilm ble stålkupongene farget med 0,1% krystallfiolett og vurdert makroskopisk for å bekrefte at biofilm hadde blitt fjernet.

#### 2.3 Kartlegging av evne til å være resipient

Resipientstammene ble testet med tanke på om de hadde evnen til å ta opp IncK og IncII plasmidene fra *E. coli* donor og IncK plasmidet fra *Serratia* spp. transkonjugant (oppnådd i forsøk i denne studien). Dette ble gjort for å finne hvilke stammer som kunne brukes ved konjugasjonsforsøk, og for å se på potensialet IncK og IncII plasmidene hadde til å spre seg.

Med *S. marcescens* transkonjugant som donor ble kun *E. coli* resipienter som hadde vist seg å ta opp IncK plasmidet fra *E. coli* donor 1292, med unntak av enterohemorragisk *E. coli* (EHEC), i tillegg til rifampicin-resistente ( $\geq 100$  mg/L) *Serratia* spp. benyttet som resipienter. Med *S. proteamaculans* transkonjugant som donor, ble *Serratia* spp. resipienter gjort nalidiksinsyre-resistente ( $\geq 50$  mg/L) ved å utsette de for en gradvis høyere konsentrasjon av nalidiksinsyre (1,0 – 10 – 20 – 30 – 50 mg/L), slik at transkonjugant kunne selekteres. Nalidiksinsyre MIC for *S. proteamaculans* transkonjugant ble undersøkt ved å tilsette en 1  $\mu$ L podeøse av bakteriestammen til LB-buljong uten 1% NaCl tilsatt nalidiksinsyre i en to-folds fortynningsrekke (0,5 – 256 mg/L). Av *E. coli* stammer ble kun de som ble tatt med i kartleggingen med *S. marcescens* transkonjugant som donor, tatt med som resipienter. Konjugasjon på agar ble utført ved at kolonimateriale tatt med podeøse fra resipient og donor, ble blandet på TSA og inkubert ved 30°C i 4, 24 og/eller 48 timer. Kolonimateriale tatt med podeøse fra bakterieblandingen ble etter endt inkubering platet ut på selektiv skål (Tabell 2). Selektiv skål ble inkubert ved 30°C (*Serratia* spp.) eller ved 37°C (*E. coli*) i ett døgn før avlesning. Transkonjuganter fra forsøk hvor bakteriestammer av samme art ble brukt som både donor og resipient, ble kun verifisert ved *bla*<sub>CMY-2</sub> real-time PCR. For videre forsøk (med unntak av pilot-forsøk) ble *E. coli* og *Serratia* spp. resipienter valgt utfra henholdsvis annen fylotype og art enn donor.

## 2.4 Konjugasjon ved ulike temperaturer

For å sammenlikne konjugasjon i ulike modellsystemer ble det satt opp parallelle konjugasjonsforsøk i biofilm, buljong og på agarskåler. Antall donorer, resipienter (kun biofilm) og transkonjuganter ble undersøkt ved ulike temperaturer og etter ulike inkubasjonstider.

### 2.4.1 Konjugasjon i biofilm

Biofilm av resipient ble etablert på stålkupong ved 12, 25 og 30/37°C som beskrevet i kapittel 2.2.2. Biofilm av resipient etablert ved 30°C (biofilm med *Serratia* spp. som donor og/eller resipient) og 37°C (biofilm med kun *E. coli*) ble inkubert i tre dager basert på Nesse et al. (2014) (med unntak av 37°C biofilm under pilotforsøket som kun ble inkubert i to dager). Etter inkubering ble stålkupong med biofilm skylt forsiktig med autoklavert peptonvann for å fjerne løse celler, og overført til sentrifugerør (50 mL) med 10 mL LB-buljong uten 1% NaCl med donor (Krol et al. 2011), som hadde blitt pre-inkubert i tre dager ved 12 eller 25°C. Buljong som skulle inkuberes ved 30/37°C ble pre-inkubert ved 25°C og temperert ved

30/37°C i en time før stålkupong ble tilsatt. Stålkupong ble inkubert videre i opprinnelig temperatur med uttak etter 4, 24 og 48 timer (ved 30 og 37°C) og etter 24, 48, 72, 96 og 168 timer (ved 12 og 25°C). Ved høsting av biofilm ble stålkupong skylt forsiktig med autoklavert peptonvann for å fjerne løse celler, og overført til glassrør med 15 mL autoklavert peptonvann. Biofilmen ble løsnet ved bruk av nylonsvab. Glassrør med nylonsvab, peptonvann og stålkupong ble sonikert i 15 minutter før 50 µL av bakteriesløsningen ble platet ut på selektive skåler for transkonjugant, donor og resipient (Tabell 2).

Biofilmforsøkene ble satt opp som to (kun med EHEC 3578 som resipient) eller tre paralleller. Stålkupong med etablert biofilm av resipient og donor som skulle inkuberes i 96 og 168 timer, ble etter 72 timers inkubering overført til 10 mL ny LB-buljong uten 1% NaCl slik at bakteriene skulle få tilført ny næring (Krol et al. 2011).

Nedre deteksjonsgrense for transkonjugant, donor og resipient var 300 kde per uttak.

#### 2.4.2 Konjugasjon i buljong

En koloni av donor og resipient tilsatt LB-buljong med 1% NaCl i autoklavert glassrør ble pre-inkubert ved 12 eller 25°C i tre dager. Buljonger som skulle inkuberes ved 30/37°C ble pre-inkubert ved 25°C og temperert ved 30/37°C i en time før blanding av donor og resipient. Donor og resipient ble blandet ved å overføre 1 mL buljong med donor og 1 mL buljong med resipient til 4 mL LB-buljong med 1% NaCl i glassrør (Sunde & Sørum 2001). LB-buljong med 1% NaCl ble inkubert ved 12, 25 og 30°C (*Serratia* spp.) eller 37°C (kun *E. coli*). Uttak ble ved 12 og 25°C utført etter 24, 48, 72, 96 og 168 timer, og ved 30 eller 37°C etter 4, 24 og 48 timer. Ved hvert uttak ble 100 µL fra buljong platet ut på en selektiv skål (Tabell 2) for å finne transkonjuganter. Overføring av Inc plasmidet ble grovt kvantifisert og gradert fra «+» til «+++», se Tabell 5. Ingen observert overføring av Inc plasmidet ble angitt som «-».

Tabell 5. Grov kvantifisering av antall kolonier av transkonjugant på selektiv skål ved konjugasjon i buljong, gradert fra «+» til «+++».

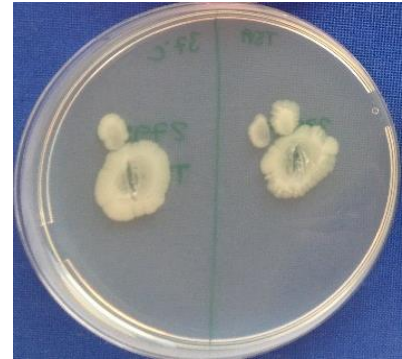
Gradering	Antall kolonier av transkonjugant
+	1-99
++	100-299
+++	≥ 300



Etter 72 timer ble 1 mL av buljongen overført til 5 mL ny LB-buljong med 1% NaCl slik at bakteriene fikk tilgang på ny næring.

### 2.4.3 Konjugasjon på agar

Kolonier med donor og resipientstamme ble plattet ut på TSA og pre-inkubert ved 25°C i tre dager. Agarskåler til forsøk ved 12 og 30/37°C ble temperert ved henholdsvis 12 eller 30/37°C i en time før blanding av donor og resipient. Konjugasjon på agarskål ble utført ved å blande donor og resipient på TSA før agarskålene ble inkubert ved 12, 25 og 30°C (*Serratia* spp.) eller 37°C (kun *E. coli*) (Figur 4). Etter 4, 24 og 48 timer ved 30 eller 37°C, og etter 24, 48, 72, 96 og 168 timer ved 12 og 25°C, ble bakteriekolonier tatt med podeøse plattet ut på en selektiv skål (Tabell 2) for å finne transkonjuganter. Vekst på selektiv skål ble ikke kvantifisert, men angitt som overføring av Inc plasmidet (+) eller som ingen observert overføring av Inc plasmidet (-).



Figur 4. Konjugasjon på agar hvor donor og resipient har blitt blandet på TSA og inkubert ved angitt temperatur.

## 2.5 Kvantitativ bestemmelse av konjugasjon

For å kunne sammenligne evnen til å overføre IncK plasmidet ble fire donorer (*E. coli* og *Serratia* spp. transkonjugant) med IncK plasmidet og tre ulike *E. coli* resipienter tatt med i forsøket.

Forsøket ble utført i buljong som beskrevet i kapittel 2.4.2. LB-buljong med 1% NaCl ble inkubert ved 30°C, og forsøket ble satt opp som tre paralleller. Uttakene ble gjort etter 4, 24 og 48 timer ved å plate ut 50 eller 100 µL på selektiv skål (Tabell 2) i en fortynningsrekke. For å kunne sammenligne evnen til å overføre IncK plasmidet, ble antall kde/mL av donor og resipient i de tre parallellene kvantifisert før de ble blandet.

## 2.6 Verifisering av transkonjuganter

All verifisering av transkonjuganter og resistensbestemmelse av villtype og transkonjugant, ble utført ved Veterinærinstituttet, Oslo.

Verifisering av *E. coli* og *Serratia* spp. transkonjuganter ble utført ved å påvise *bla*<sub>CMY-2</sub> genet, i tillegg til fylotyping og MALDI-TOF for henholdsvis *E. coli* og *Serratia* spp..

### 2.6.1 Real-time PCR

Real-time PCR ble satt opp for å påvise *bla<sub>CMY-2</sub>* genet (Veterinærinstituttet 2013a). DNA ble høstet på samme måte som beskrevet under multiplex PCR. Deretter ble 19 µL mastermiks og 1 µL DNA templat overført til en PCR plate (96 Well Polypropylene Plate, Agilent Technologies). Mastermiks besto av følgende og ble pipettert i brønnene før DNA-templatet ble tilsatt; 10 µL 2x Brilliant III Master Mix (Agilent Technologies), 1 µL 20x qPCR assay (Schmidt et al. 2015) og 8 µL milliQ vann. Primersekvensene er listet opp i Tabell 6. I oppsettet ble det tatt med både positiv (*bla<sub>CMY-2</sub>* positiv *E. coli*, intern kontroll på Veterinærinstituttet) og negativ (kun mastermiks) kontroll.

Tabell 6. Primere benyttet til real-time PCR for å påvise *bla<sub>CMY-2</sub>* genet (Schmidt et al. 2015)

Primer	Sekvens (5'-3')
<i>FW3_CMY-2_Lahey</i>	AGACGTTTAACGGCGTGTTG
<i>RV4_CMY-2_Lahey</i>	TAAGTGCAGCAGGCGGATAC
<i>PR_CMY-2_Lahey</i>	TATCGCCCGCGGCGAAAT

PCR platen ble sentrifugert i noen sekunder for å spinne ned prøvemateriale og mastermiks i brønnene. Real-time-PCR ble utført ved bruk av Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies). PCR-programmet besto av tre ulike trinn og er gitt i Tabell 7. Trinn 2 til trinn 3 ble repetert i 35 sykler.

Tabell 7. PCR program brukt ved real-time PCR ved påvisning av *bla<sub>CMY-2</sub>* genet. Trinn 2 til trinn 3 ble repetert i 35 sykler.

Trinn	Temperatur	Tid
1	95°C	3 min
2	95°C	10 sek
3	60°C	30 sek

Resultatene ble overført til programmet MxPro-Mx3005P (Agilent Technologies) hvor en eventuell Ct-verdi ble angitt, og resultatene avlest.

### 2.6.2 Multiplex PCR for fylogenetisk gruppering av *E. coli*

I tillegg til å verifisere *E. coli* transkonjuganter ved hjelp av *bla*<sub>CMY-2</sub> real-time PCR, ble det utført en multiplex PCR for fylogenetisk gruppering av *E. coli*, både når *E. coli* og *Serratia* spp. transkonjugant ble brukt som donor. PCR-oppsett ble utført som tidligere beskrevet (kapittel 2.2.3).

### 2.6.3 MALDI-TOF

For å kunne verifisere transkonjuganter av *Serratia* spp. ble de i tillegg til real-time PCR for påvisning av *bla*<sub>CMY-2</sub> genet, identifisert ved bruk av MALDI-TOF microflex (matrix-assisted



Figur 5. Stålplate for avsetning av prøvemateriale for analysing i MALDI-TOF microflex (The guardian 2014)

laser desorption-ionization time-of-flight, (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Tyskland) som benytter massespektrometri for å identifisere bakterier. Prøvene ble preparert ved å overføre en liten mengde bakterier fra TSA med en steril tannpirker, og avsette de på en avgrenset sirkel på en stålplate (Figur 5). Etter at bakteriene hadde tørket ble 1 µL matrix (Bruker) tilsatt før stålplaten ble satt inn i MALDI-TOF for

analysing. Under analyseringen skyter en laser på prøvene og fragmentene som dannes separeres etter størrelse og ladning i et vakuum. Spekteret som dannes av cellene sammenlignes med kjente spektrere, for identifikasjon av bakterien (Veterinærinstituttet 2014). Noen av toppene i massespekteret er karakteristiske for enkelte arter og slekter (Carbonnelle et al. 2011).

## 2.7 Resistensbestemmelse

Resistensbestemmelse ved MIC ble undersøkt for villtype av resipient og transkonjugant ved bruk av Sensititre TREK EUVSEC og EUVSEC2 – ESBL/AmpC (Thermo Scientific, East Grinstead, UK) i henhold til leverandørens anvisninger. Noen kolonier av den aktuelle bakteriestammen dyrket på TSA ble overført med en 1 µL pøse til 5 mL fysiologisk saltvann (Veterinærinstituttet, Oslo, Norge). Løsningen ble vortexet og korrigert til 0,5 McFarland i et densitometer (DEN-1, Biosan, Riga, Latvia). Deretter ble 20 µL av suspensjonen overført til 10 mL MH buljong (Thermo Scientific), før Sensititre AIM™ (Thermo Scientific) fordelte 50µL fra løsningen til hver brønn på Sensititre TREK EUVSEC og EUVSEC2 – ESBL/AmpC. Platene ble dekket med en plastfilm og inkubert ved 35°C i 18-

20 timer. Som en kontroll på renhet av bakteriestammen og for å se om omtrent riktig konsentrasjon av bakteriestammen hadde blitt tilsatt, ble 10 µL fra bakteriesuspensjonen i fysiologisk saltvann platet ut på en blodskål og inkubert sammen med resistensplatene. Det ble også satt opp tre ulike kontroller: AmpC positiv *E. coli*, ESBL positiv *E. coli* og en AmpC/ESBL negativ *E. coli*. Sensititre TREK platene ble lest av ved hjelp av et avlesningsspeil hvor det ble sett etter vekst eller ikke vekst i hver brønn. Vekst ble observert som bunnfall eller som blakking av buljongen i brønnen (Veterinærinstituttet 2009).

## 3. RESULTAT

### 3.1 Innledende forsøk

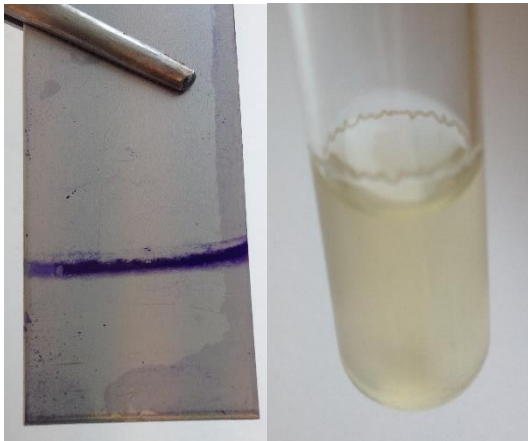
#### 3.1.1 Test av selektive medier for differensiering av donor og resipientstammer

Bakteriestammene (n=44) ble platet ut på syv eller åtte selektive medier.

MacConkey, VRBA, VRBGA, CFC og brilliance™ *E. coli*/coliform medium klarte ikke å differensiere donor og resipient godt nok (Vedlegg 1).

AmpC-produserende *E. coli* donorer vokste godt på MH tilsatt 0.5 mg/L cefotaksim, men på TSA tilsatt 16 mg/L rifampicin var det ingen vekst av donor. Ingen av *E. coli* og kun en av *Serratia* spp. resipientene vokste på MH tilsatt 0,5 mg/L eller 1,0 mg/L cefotaksim. På TSA tilsatt 16 mg/L rifampicin vokste ingen av *E. coli* resipientene, bortsett fra de som var oppgitt som rifampicin-resistente ( $\geq 100$  mg/L). Det var 16 *Serratia* spp. resipienter som vokste på TSA tilsatt 16 mg/L rifampicin, og de tre *Serratia* spp. som ikke vokste, ble gjort rifampicin-resistente ( $\geq 100$  mg/L) av laboratorieingeniør. Disse resultatene sammen med kjente resistensprofiler (Tabell 1) ga grunnlaget for hvilke antibiotika som kunne benyttes for å selektere fram transkonjugant, donor og resipient (Tabell 2).

#### 3.1.2 Undersøkelse av evnen til å danne biofilm hos donor og resipient



Figur 6. Makroskopisk synlig biofilm på stålakupong farget med 0,1% krystallfiolett til venstre, og biofilm på glassrør til høyre.

Bakteriestammene (n=45) ble undersøkt for å se på deres evne til å danne biofilm ved 12 og 25°C på stålakupong eller i glassrør (se Figur 6). Alle stammene som ble testet dannet biofilm ved 25°C. Ved 12°C var det ti av bakteriestammene som ikke dannet noen makroskopisk synlig biofilm (Vedlegg 2). Kun resipientstammer med en god evne til å danne biofilm (gradering 2-3) ble valgt ut til konjugasjonsforsøk i biofilm, buljong og på agar.

#### 3.1.3 Multiplex PCR for fylogenetisk gruppering av *E. coli*

Donorer (n=3) og resipienter (n=13) av *E. coli* ble undersøkt for hvilken fylogenetisk gruppe de tilhørte. Donor og resipientstammene tilhørte gruppe A, B1 eller D, hvor syv av

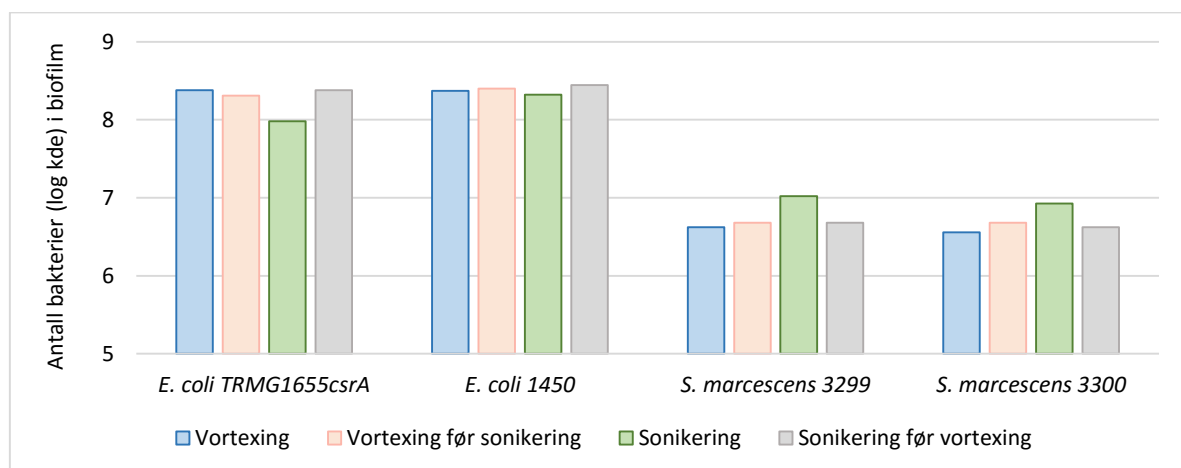
resipientstammene var gruppe D (resultat ikke vist). Til konjugasjonsforsøk i biofilm, buljong og på agar ble det valgt ulike fylotype for donor og resipient (med unntak av pilotforsøk), se Tabell 8.

Tabell 8. Fylogenetisk gruppering av *E. coli* til konjugasjonsforsøk. Tilstedeværelse (+) eller fravær (-) av genene *gadA*, *chuA* og *yjaA*, og DNA-sekvensen TSPE4.C2 avgjorde hvilken fylogenetisk gruppe *E. coli* isolatene tilhørte (Doumith et al. 2012).

Donor/ resipient	Bakteriestamme	Fylogenetisk gruppe	<i>gadA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2
Donor	<i>E. coli</i> 1292, IncK	D	+	+	-	+
Donor	<i>E. coli</i> 2798, IncII	A	+	-	+	-
Resipient	<i>E. coli</i> 6927-5	B1	+	-	-	+
Resipient	<i>E. coli</i> 1268	B1	+	-	-	+
Resipient	<i>E. coli</i> 3064-2	A	+	-	+	-
Resipient	EHEC 3578	B1	+	-	-	+
Resipient	<i>E. coli</i> TRMG 1655 <i>csrA</i>	A	+	-	+	-

### 3.1.4 Høsting av biofilm

Det ble valgt ut fire resipientstammer for å teste hvordan biofilmen skulle høstes; to *E. coli* (TRMG 1655*csrA* og 1450) og to *S. marcescens* (3299 og 3300). Antall bakterier (log kde) i biofilm ble beregnet og det var ikke noen store forskjeller i de fire ulike metodene som ble prøvd ut (Figur 7).



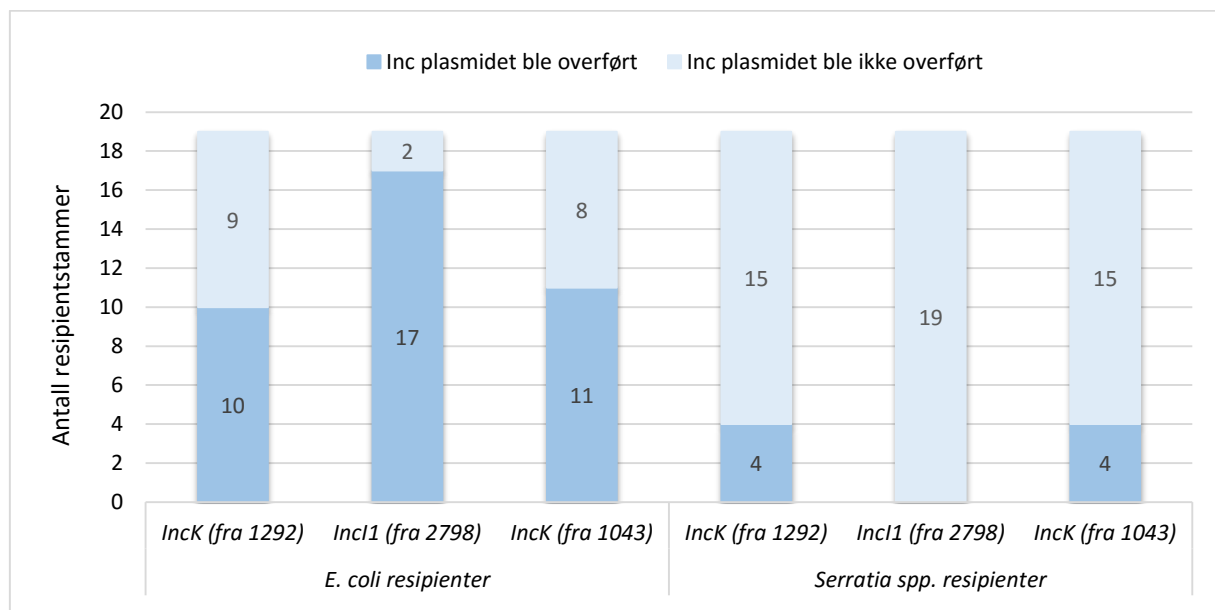
Figur 7. Antall bakterier (log kde) i biofilm av to *E. coli* og to *S. marcescens* resipientstammer, høstet ved fire ulike metoder fra stålkupong. Forsøket ble utført en gang.

Sonikering uten vortexing ble valgt for høsting av biofilm fordi denne metoden ville gjøre arbeidet rundt høsting av biofilm enklere. Farging av stålkupongene med 1% krystallfiolett etter høsting, viste at all synlig biofilm ble fjernet.

### 3.2. Kartlegging av evne til å være resipient med *E. coli* som donor av IncK og IncI1 plasmider

Det ble undersøkt om resipientstammene (n=38) hadde evnen til å ta opp IncK og IncI1 plasmider fra donorene *E. coli* 1043 (IncK), *E. coli* 1292 (IncK) og *E. coli* 2798 (IncI1) ved konjugasjon på agar.

Plasmidene lot seg overføre til flere *E. coli* enn *Serratia* spp. resipienter. IncK plasmidet fra *E. coli* 1292, IncI1 plasmidet fra *E. coli* 2798 og IncK plasmidet fra *E. coli* 1043 ble overført til henholdsvis 53, 89 og 58% av *E. coli* resipientene (se Figur 8). IncI1 plasmidet lot seg overføre til flere *E. coli* resipienter enn IncK plasmidene (fra både *E. coli* donor 1292 og 1043), og alle *E. coli* resipienter som tok opp IncK plasmidene tok også opp IncI1 plasmidet.



Figur 8. Antall *E. coli* og *Serratia* spp. resipienter (henholdsvis til venstre og høyre) som tok opp/ikke tok opp IncK og/eller IncI1 plasmidet fra *E. coli* donor 1292, 2798 og 1043 under konjugasjon på agar. Totalt 19 *E. coli* (hvorav fire EHEC stammer) og 19 *Serratia* spp. resipienter ble testet mot de tre *E. coli* donorene.

Kun 21% av *Serratia* spp. stammene fikk overført IncK plasmidet, både fra *E. coli* 1292 og 1043. Ingen av *Serratia* spp. stammene tok opp IncI1 plasmidet fra *E. coli* 2798. En oversikt over hvilke resipientstammer som tok opp IncK og IncI1 plasmidene er vist i Vedlegg 3.

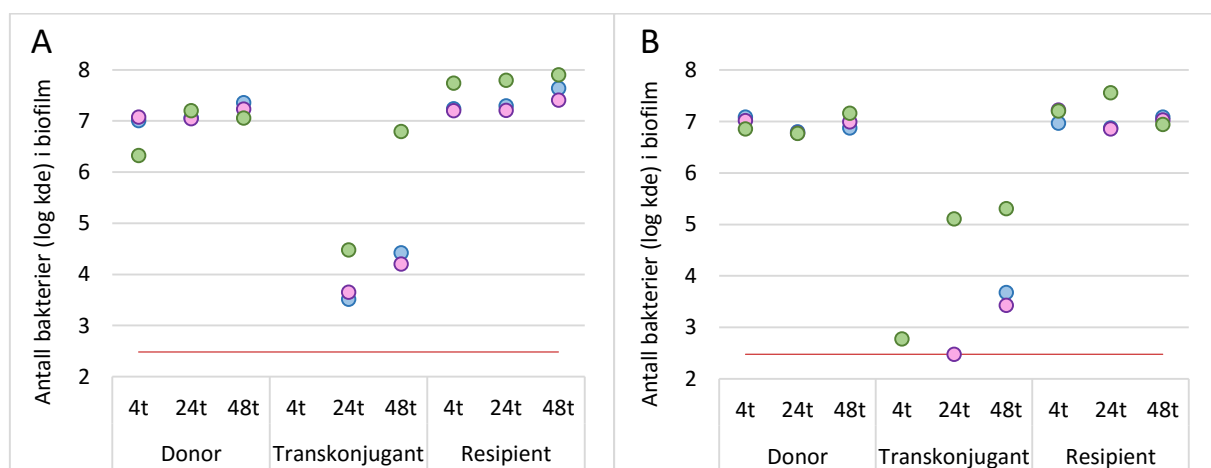
### 3.3 Konjugasjon i biofilm, buljong og på agar med *E. coli* som donor

#### 3.3.1 Pilotforsøk - overføring av IncK og IncII plasmidet til *E. coli* i biofilm

I pilotforsøket for biofilm ble det benyttet to donorer, *E. coli* 1292 med IncK plasmidet og *E. coli* 2798 med IncII plasmidet. Resipienten *E. coli* TRMG1655*csrA* ble valgt til pilotforsøket fordi den var god til å danne biofilm og den har gitt transkonjuganter i forsøk utført tidligere (Krol et al. 2011). Både IncK og IncII plasmidet ble overført i biofilm etter 4, 24 og 48 timer ved 37°C, hvor maksimalt antall transkonjuganter etter 24 timer var 5,9 og 5,2 log med henholdsvis IncK og IncII plasmidet. Ved 25°C ble plasmidene overført etter 72, 96 og 168 timer, hvor maksimalt antall transkonjuganter etter 168 timer var 4,0 og 4,1 log med henholdsvis IncK og IncII plasmidet. *bla*<sub>CMY-2</sub>-genet ble påvist hos transkonjuganter ved alle uttak ved bruk av real-time PCR. Transkonjuganter ble kun verifisert med real-time PCR for *bla*<sub>CMY-2</sub> ettersom *E. coli* donor 2798 og resipient TRMG1655*csrA* begge var fylotype A. Pilotforsøket viste at biofilmpoppsettet fungerte, dermed kunne bakteriestammer isolert fra næringsmiddelindustrien (hovedsakelig fjørfe) brukes i videre forsøk for å se på muligheten for spredning av IncK og IncII plasmidet i biofilm.

#### 3.3.2 Overføring av IncK og IncII plasmidet til *E. coli*

Donorene *E. coli* 1292 og *E. coli* 2798 med henholdsvis IncK og IncII plasmidet, og *E. coli* 6927-5 resipient ble benyttet i dette biofilmforsøket. Både IncK og IncII plasmidet ble overført i biofilm ved 25 og 37°C (Figur 9, 10 og 11).



Figur 9. Antall bakterier (log kde) av donator, transkonjugant og resipient i biofilm inkubert ved 37°C, plottet mot tid. Som donator av IncK plasmidet ble A) *E. coli* 1292 brukt, og som donator av IncII plasmidet ble B) *E. coli* 2798 brukt. Resipient var *E. coli* 6927-5. De tre parallellene ved hvert uttak (4, 24 og 48 timer) er differensiert i figuren med ulik farge for hver parallell. Nedre deteksjonsgrense er markert ved 2,5 log kde, og paralleller med ingen observerte transkonjuganter er ikke markert.

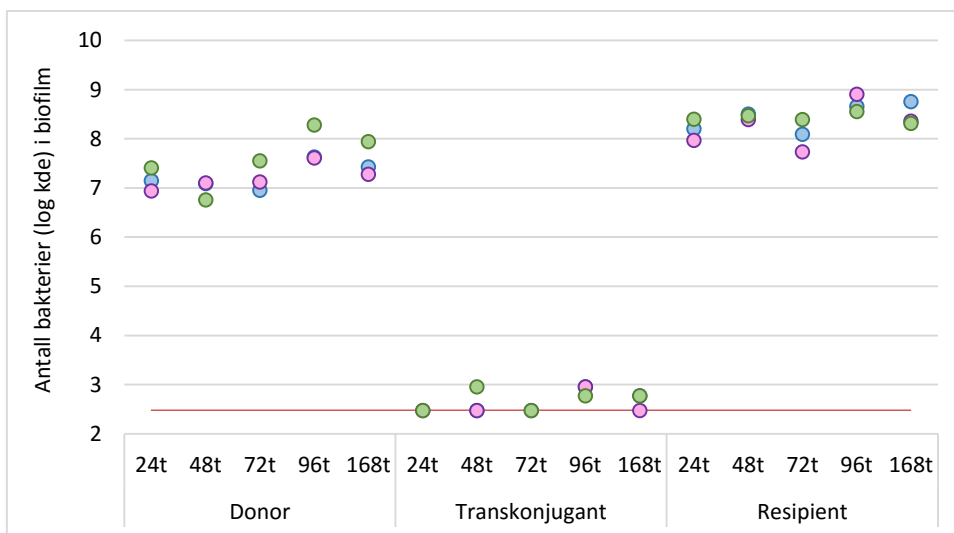


IncK plasmidet fra *E. coli* 1292 ble overført til resipient etter 24 og 48 timer ved 37°C (Figur 9a). Det var variasjon i antall kde av transkonjugant ved de tre parallelle uttakene fra 3,5 til 4,5 log kde etter 24 timer og fra 4,2 til 6,8 log kde etter 48 timer.

IncI1 plasmidet fra *E. coli* donor 2798 ble overført til resipient etter 4, 24 og 48 timer (Figur 9b). I dette biofilmforsøket var det også variasjon i antall kde av transkonjugant ved de tre parallelle uttakene, med størst variasjon etter 24 timer (fra ingen observerte transkonjuganter til 5,1 log kde). Antall bakterier (log kde) i biofilm har i figurene blitt framstilt som enkelt-punkter for hvert parallelle uttak, fordi det i alle biofilmforsøk var noen uttak uten observerte transkonjuganter i en eller flere av parallellene.

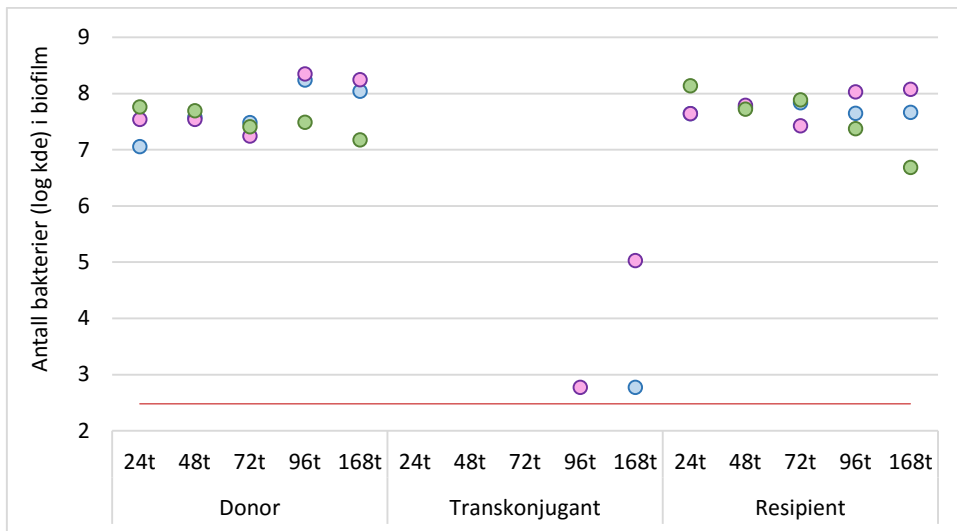
Ved 25°C ble både IncK og IncI1 plasmidet overført til *E. coli* 6927-5 resipient, men i mindre grad enn ved 37°C.

Transkonjuganter med IncK plasmidet kunne ses etter 24 timer og videre også ved alle uttak. Antall transkonjuganter holdt seg på et jevnt lavt nivå gjennom hele forsøket (se Figur 10).



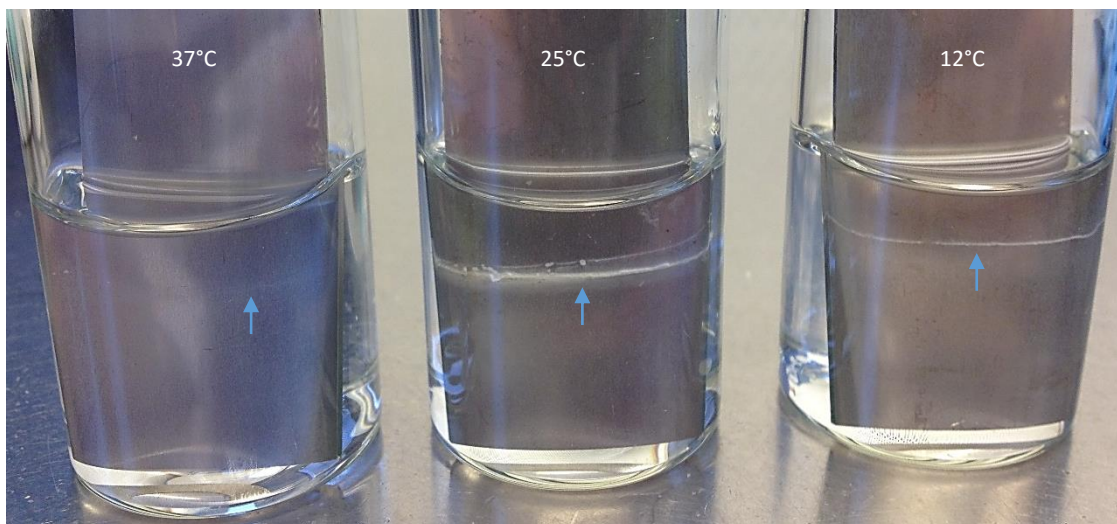
Figur 10. Antall bakterier (log kde) av donor, transkonjugant og resipient i biofilm inkubert ved 25°C, plottet mot tid. Som donor av IncK plasmidet ble *E. coli* 1292 brukt og *E. coli* 6927-5 ble brukt som resipient. De tre parallellene ved hvert uttak (24, 48, 72, 96 og 168 timer) er differensiert i figuren med ulik farge for hver parallell. Nedre deteksjonsgrense er markert ved 2,5 log kde, og paralleller med ingen observerte transkonjuganter er ikke markert.

Med *E. coli* 2798 som donor ble det først observert transkonjuganter med IncI1 plasmidet ved 25°C etter 96 timer (Figur 11). I uttakene som ble gjort ved 168 timer, var det stor variasjon i antall transkonjuganter i de tre parallellene (fra ingen observerte transkonjuganter til 5,0 log kde).



Figur 11. Antall bakterier (log kde) av donor, transkonjugant og resipient i biofilm inkubert ved 25°C, plottet mot tid. Som donor av *Incl1* plasmidet ble *E. coli* 2798 brukt og *E. coli* 6927-5 ble brukt som resipient. De tre parallellene ved hvert uttak (24, 48, 72, 96 og 168 timer) er differensiert i figuren med ulik farge for hver parallell. Nedre deteksjonsgrense er markert ved 2,5 log kde, og paralleller med ingen observerte transkonjuganter er ikke markert.

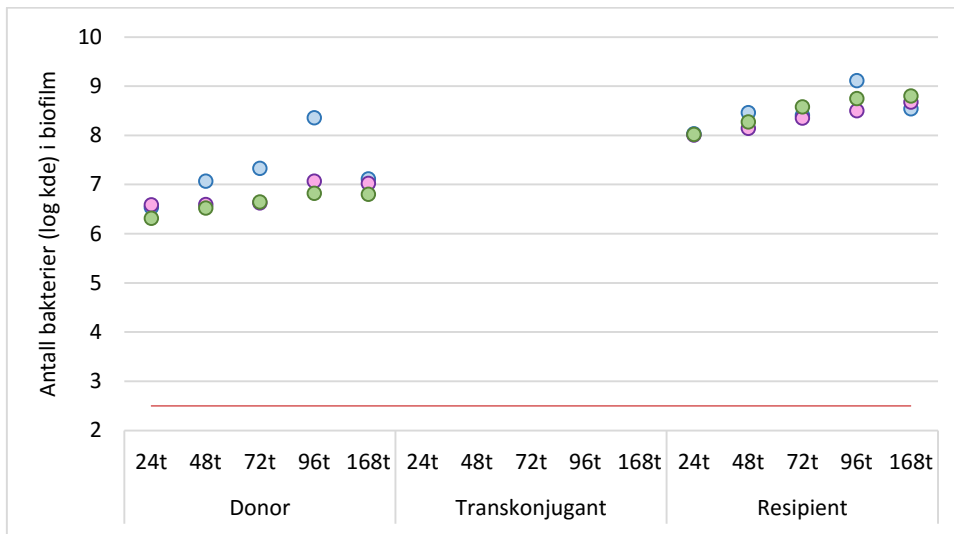
Ved høsting av biofilm var det en makroskopisk synlig forskjell i utseendet til biofilmene som hadde blitt inkubert ved 12, 25 og 37°C (Figur 12). Gjennomsnittlig totalt celledtall for biofilm med *E. coli* 1292 som donor og *E. coli* 6927-5 som resipient, var henholdsvis 8,3 log, 8,5 log og 7,8 log ved 12, 25 og 37°C.



Figur 12. Biofilmdannelse på stålkupong med *E. coli* 1292 som donor av *Inck* plasmidet og *E. coli* 6927-5 som resipient. Biofilmene på bildet ble inkubert ved henholdsvis 37, 25 og 12°C (fra venstre) i 48 timer. Bildet viser en synlig makroskopisk forskjell i biofilmenes utseende. Biofilmen dannet i luftvæske-fasen på de enkelte stålkuponger er markert med pil.

Det ble ikke observert noen transkonjuganter i biofilm inkubert ved 12°C med *E. coli* 1292 som donor og *E. coli* 6927-5 som resipient. Både donor og resipient holdt seg på et stabilt

høyt nivå ut inkubasjonstiden med henholdsvis ca 6,5 og 8 log kde allerede etter 24 timer (Figur 13).



Figur 13. Antall bakterier (log kde) av donor, transkonjugant og resipient i biofilm inkubert ved 12°C, plottet mot tid. Som donor av IncK plasmidet ble *E. coli* 1292 brukt og *E. coli* 6927-5 ble brukt som resipient. De tre parallellene ved hvert uttak (24, 48, 72, 96 og 168 timer) er differensiert i figuren med ulike farger for hver parallell. Nedre deteksjonsgrense er markert ved 2,5 log kde, og paralleller med ingen observerte transkonjuganter er ikke markert.

Biofilmer ved de andre kombinasjonene av donorer og resipienter i denne studien inkubert ved 12°C (resultat ikke vist) hadde også et stabilt høyt nivå av både donor og resipient gjennom hele inkubasjonstiden, hvor antall donorer og resipienter lå mellom henholdsvis 5 og 7 log kde, og 7 og 9 log kde ved uttak etter 24 timer.

Med *E. coli* 1292 som donor ble IncK plasmidet overført til *E. coli* resipient 6927-5 ved alle uttak ved både 25 og 37°C ved konjugasjon i buljong og på agar. Konjugasjon i buljong og på agar ga samme resultat som biofilmforsøket bortsett fra at det etter 4 timer ved 37°C kun ble dannet transkonjuganter ved konjugasjon i buljong og på agar (se Tabell 9).

Tabell 9. Konjugasjon i buljong og på agar satt opp parallelt med biofilmforsøk med *E. coli* 1292 som donor av IncK plasmidet og *E. coli* 6927-5 som resipient. Overføring av IncK plasmidet i buljong ble grovt kvantifisert fra + til +++ eller angitt som ingen observert overføring (-), mens på agar ble overføring av IncK plasmidet eller ingen observert overføring angitt som henholdsvis + eller -. Ingen tegn = ingen uttak.

<i>E. coli</i> 1292, IncK → <i>E. coli</i> 6927-5		4 timer	24 timer	48 timer	72 timer	96 timer	168 timer
Konjugasjon i buljong	37°C	++	+++	+++			
	25°C		+++	+++	+++	+++	+++
Kolonimating	37°C	+	+	+			
	25°C		+	+	+	+	+

IncI1 plasmidet fra *E. coli* 2798 ble overført til *E. coli* resipient 6927-5 ved konjugasjon i buljong ved alle uttak ved både 25 og 37°C i, se Tabell 10. Ved konjugasjon på agar ble plasmidet overført til resipient i alle uttak ved 37°C, mens det ved 25°C først ble observert transkonjuganter etter 72 timer. Disse forsøkene ga samme resultat som biofilmforsøket ved 37°C. Ved 25°C ble det observert transkonjuganter i tidligere uttak ved konjugasjon i buljong og på agar enn i biofilm hvor det ble observert vekst av transkonjugant først etter 96 timer.

Tabell 10. Konjugasjon i buljong og på agar satt opp parallelt med biofilmforsøk, med *E. coli* 2798 som donor av IncI1 plasmidet og *E. coli* 6927-5 som resipient. Overføring av IncI1 plasmidet i buljong ble grovt kvantifisert fra + til +++ eller angitt som ingen observert overføring (-), mens på agar ble overføring av IncI1 plasmidet eller ingen observert overføring angitt som henholdsvis + eller -. Ingen tegn = ingen uttak.

<i>E. coli</i> 2798, IncI1 → <i>E. coli</i> 6927-5		4 timer	24 timer	48 timer	72 timer	96 timer	168 timer
<b>Konjugasjon i buljong</b>	<b>37°C</b>	+	+++	+++			
	<b>25°C</b>		+	++	++	++	+++
<b>Konjugasjon på agar</b>	<b>37°C</b>	+	+	+			
	<b>25°C</b>		-	-	+	+	+

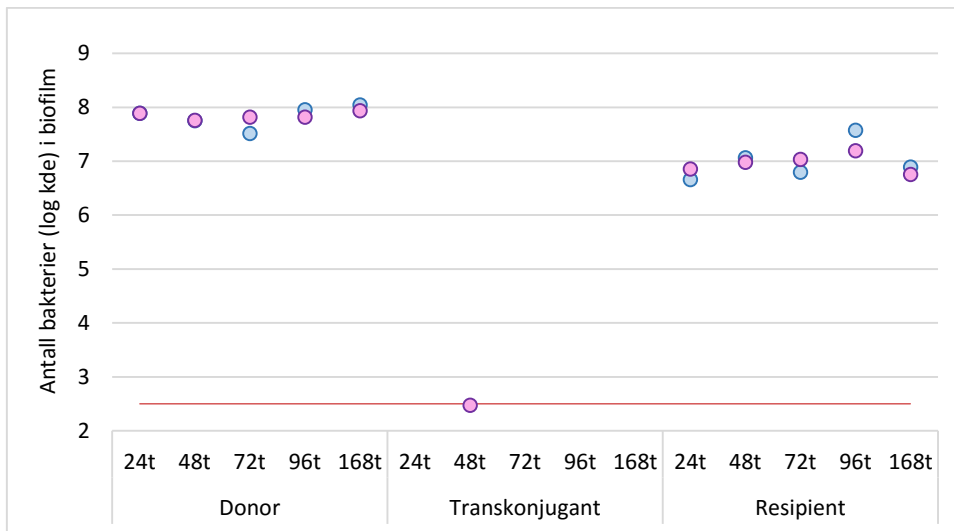
Det var ingen observert overføring av IncK eller IncI1 plasmidet til *E. coli* resipient 6927-5 ved 12°C i konjugasjonsforsøk i biofilm, buljong eller på agar (resultat ikke vist).

### 3.3.3 Overføring av IncK og IncI1 plasmidet til EHEC

I biofilmforsøk med EHEC 3578 som resipient ble *E. coli* 1292 og 2798 benyttet som donorer av henholdsvis IncK og IncI1 plasmidet.

Det ble ikke observert overføring av IncK plasmidet fra *E. coli* donor 1292 til EHEC 3578 verken i biofilm, buljong eller på agar ved 12, 25 og 37°C (resultat ikke vist). Antall donorer og resipienter lå på et stabilt høyt nivå i biofilmene inkubert ved 12, 25 og 37°C.

IncI1 plasmidet fra *E. coli* donor 2798 ble i lav grad overført til resipient EHEC 3578 etter 48 timer ved 25°C (Figur 14). Antall transkonjuganter etter 48 timer lå på deteksjonsgrensen i en av de to parallellene, og ved senere uttak ble det ikke observert noen transkonjuganter. Antall donorer og resipienter var stabilt høyt gjennom hele forsøket, og log kde av donor var høyere enn log kde av resipient gjennom hele inkubasjonstiden.



Figur 14. Antall bakterier (log kde) av donor, transkonjugant og resipient i biofilm inkubert ved 25°C, plottet mot tid. Som donor av IncI1 plasmidet ble *E. coli* 2798 brukt og EHEC 3578 ble brukt som resipient. De to parallellene ved hvert uttak (24, 48, 72, 96 og 168 timer) er differensiert i figuren med ulik farge for hver parallell. Nedre deteksjonsgrense er markert ved 2,5 log kde, og paralleller med ingen observerte transkonjuganter er ikke markert.

Det ble ikke dannet noen transkonjuganter ved 12 eller 37°C i biofilm (resultater ikke vist).

Ved disse temperaturene lå også antall donorer og resipienter på et stabilt høyt nivå gjennom forsøket.

Resultatene fra konjugasjon i buljong og på agar viste at IncI1 plasmidet kun ble overført til EHEC 3578 ved 37°C, se Tabell 11. IncI1 plasmidet ble overført til EHEC-stammen etter 24 og 48 timer ved konjugasjon i buljong, og etter 4, 24 og 48 timer ved konjugasjon på agar. Disse resultatene var forskjellig fra biofilmforsøkene hvor det kun ble observert overføring av plasmidet ved 25°C etter 48 timer.

Tabell 11. Konjugasjon i buljong og på agar satt opp parallelt med biofilmforsøk, med *E. coli* 2798 som donor av IncI1 plasmidet og EHEC 3578 som resipient. Overføring av IncI1 plasmidet i buljong ble grovt kvantifisert fra + til +++ eller angitt som ingen observert overføring (-), mens på agar ble overføring av IncI1 plasmidet eller ingen observert overføring angitt som henholdsvis + eller -. Ingen tegn = ingen uttak.

<i>E. coli</i> 2798, IncI1 → <i>EHEC</i> 3578		4 timer	24 timer	48 timer	72 timer	96 timer	168 timer
Konjugasjon i buljong	37°C	-	+++	+++			
	25°C		-	-	-	-	-
Konjugasjon på agar	37°C	+	+	+			
	25°C		-	-	-	-	-

Det var ingen observert overføring av IncI1 plasmidet til EHEC resipient 3578 ved 12°C i konjugasjonsforsøk i buljong eller på agar (resultat ikke vist).

### 3.3.4 Overføring av IncK plasmidet til *S. marcescens*

I biofilmforsøket med *E. coli* 1292 som donor og *S. marcescens* 3306 som resipient, ble det ikke dannet noen transkonjuganter med IncK plasmidet, verken ved 12, 25 eller 30°C. Donor og resipient lå på et stabilt høyt nivå gjennom forsøket, men med en nedgang i antall resipienter etter 96 timer ved 12 og 25°C (resultat ikke vist).

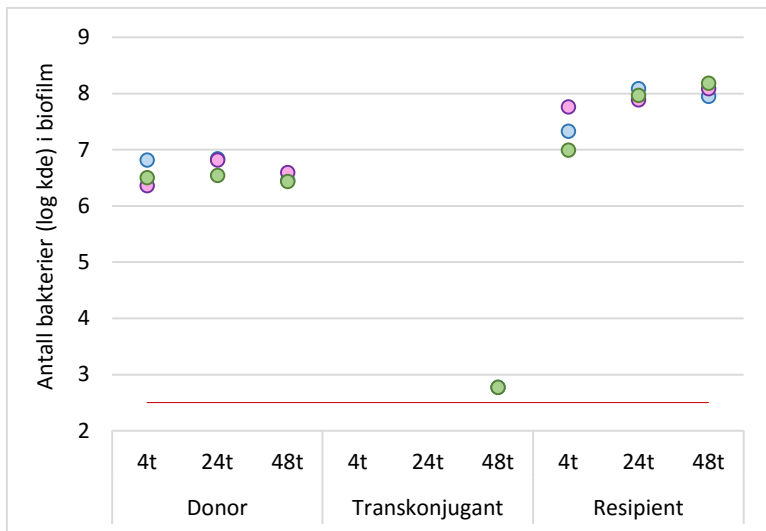
Ved konjugasjon i buljong og på agar, satt opp parallelt med biofilmforsøket, ble IncK plasmidet overført til *S. marcescens* 3306 ved både 25 og 30°C, unntatt ved 30°C på agar (Tabell 12). Det vokste få kolonier på den selektive skåla for transkonjuganter, noe som tilsa en lav grad av overføring av IncK plasmidet. Det ble ikke observert noen transkonjuganter ved 12°C (resultat ikke vist).

Tabell 12. Konjugasjon i buljong og på agar satt opp parallelt med biofilmforsøk med *E. coli* 1292 som donor av IncK plasmidet og *S. marcescens* 3306 som resipient. Overføring av IncK plasmidet i buljong ble grovt kvantifisert fra + til +++ eller angitt som ingen observert overføring (-), mens på agar ble overføring av IncK plasmidet eller ingen observert overføring angitt som henholdsvis + eller -. Ingen tegn = ingen uttak.

<i>E. coli</i> 1292, IncK → <i>S. marcescens</i> 3306		4 timer	24 timer	48 timer	72 timer	96 timer	168 timer
Konjugasjon i buljong	30°C	+	+	+			
	25°C		-	-	+	-	+
Konjugasjon på agar	30°C	-	-	-			
	25°C		+	-	-	-	-

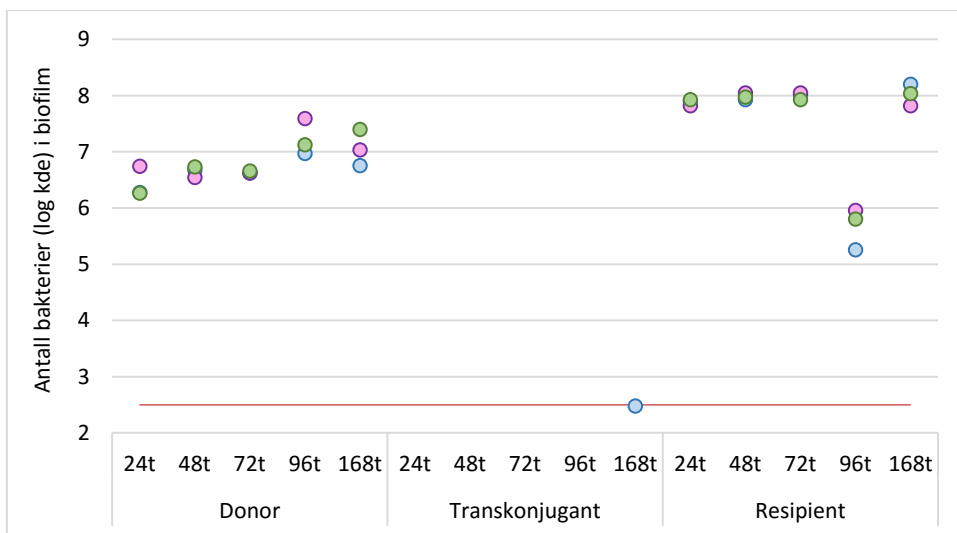
I biofilmforsøket med *E. coli* 1292 som donor og *S. marcescens* 3307 som resipient, ble IncK plasmidet overført til *S. marcescens* ved 25 og 30°C. IncK plasmidet ble i lav grad overført mot slutten av inkubasjonstiden for oppsettet ved både 25 og 30°C, etter henholdsvis 168 og 48 timer.

Ved 30°C ble det observert to kolonier av transkonjugant i to av tre paralleller etter 48 timer. Antall kde av donor og resipient holdt seg på et stabilt høyt nivå gjennom forsøket (Figur 15).



Figur 15. Antall bakterier (log kde) av donor, transkonjugant og resipient i biofilm inkubert ved 30°C, plottet mot tid. Som donor av *IncK* plasmidet ble *E. coli* 1292 brukt og *S. marcescens* 3307 ble brukt som resipient. De tre parallellene ved hvert uttak (24, 48, 72, 96 og 168 timer) er differensiert i figuren med ulik farge for hver parallell. Nedre deteksjonsgrense er markert ved 2,5 log kde, og paralleller med ingen observerte transkonjuganter er ikke markert.

Ved 25°C ble det observert en koloni av transkonjugant i en av tre paralleller etter 168 timer (Figur 16). Etter 96 timer var det en nedgang i antall kde av resipient før antall kde steg igjen ved 168 timer. Ved de andre uttakene holdt donor og resipient seg på et stabilt høyt nivå.



Figur 16. Antall bakterier (log kde) av donor, transkonjugant og resipient i biofilm inkubert ved 25°C, plottet mot tid. Som donor av *IncK* plasmidet ble *E. coli* 1292 brukt og *S. marcescens* 3307 ble brukt som resipient. De tre parallellene ved hvert uttak (24, 48, 72, 96 og 168 timer) er differensiert i figuren med ulik farge for hver parallell. Nedre deteksjonsgrense er markert ved 2,5 log kde, og paralleller med ingen observerte transkonjuganter er ikke markert.

I biofilm inkubert ved 12°C ble det ikke observert noen transkonjuganter. Antall donorer og resipienter lå på et stabilt høyt nivå, men med en nedgang i antall resipienter etter 96 timer (resultat ikke vist).

IncK plasmidet ble i konjugasjonsforsøk i buljong og på agar overført ved både 25 og 30°C. Det ble observert transkonjuganter ved alle uttak bortsett fra uttak utført ved 25°C etter 96 timer (se Tabell 13).

Tabell 13. Konjugasjon i buljong og på agar satt opp parallelt med biofilmforsøk med *E. coli* 1292 som donor av IncK plasmidet og *S. marcescens* 3307 som resipient. Overføring av IncK plasmidet i buljong ble grovt kvantifisert fra + til +++ eller angitt som ingen observert overføring (-), mens på agar ble overføring av IncK plasmidet eller ingen observert overføring angitt som henholdsvis + eller -. Ingen tegn = ingen uttak.

<i>E. coli</i> 1292, IncK → <i>S. marcescens</i> 3307		4 timer	24 timer	48 timer	72 timer	96 timer	168 timer
Konjugasjon i buljong	30°C	++	++	++			
	25°C		++	++	+	-	++
Konjugasjon på agar	30°C	+	+	+			
	25°C		+	+	+	-	+

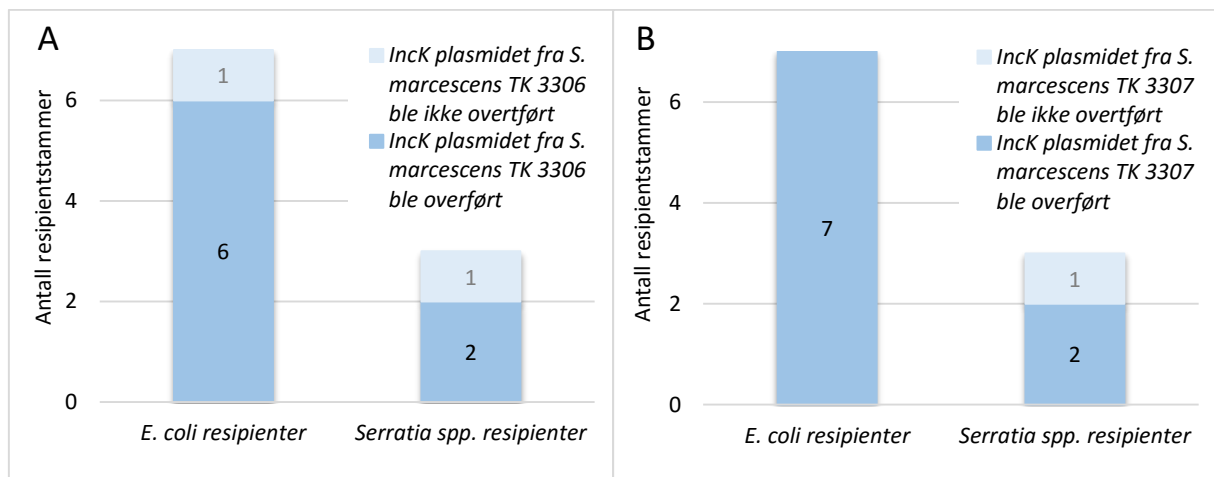
Det ble ikke observert overføring av IncK plasmidet til *S. marcescens* resipient 3307 ved 12°C i konjugasjonsforsøk i biofilm, buljong eller på agar (resultat ikke vist).

### 3.4 Kartlegging av evne til å være resipient med *S. marcescens* transkonjugant som donor av IncK plasmidet

Ettersom *S. marcescens* 3306 og 3307 tok opp IncK plasmidet ved konjugasjon i biofilm og/eller ved konjugasjon i buljong og på agar, ble det testet om *S. marcescens* transkonjugant (TK) kunne overføre plasmidet videre til utvalgte *E. coli* og *Serratia* spp.

IncK plasmidet fra *S. marcescens* TK 3306 lot seg overføre til 86% av *E. coli* resipientene, og til 67% av *Serratia* spp. resipientene (Figur 17). *S. marcescens* TK 3307 overførte IncK plasmidet til alle *E. coli* resipientene og til 67% av *Serratia* spp. resipientene.





Figur 17. Antall *E. coli* og *Serratia spp.* resipienter som tok opp IncK plasmidet med A) *S. marcescens* transkonjugant 3306 og B) *S. marcescens* transkonjugant 3307 som donor ved konjugasjon på agar. Totalt syv *E. coli* og tre *Serratia spp.* resipienter ble testet for deres evne til å ta opp IncK plasmidet fra *S. marcescens* transkonjuganter.

Det var de samme to *Serratia spp.* stammene som tok opp IncK plasmidet fra både *S. marcescens* TK 3306 og 3307. En oversikt over hvilke resipientstammer som tok opp IncK plasmidet er vist i Vedlegg 3.

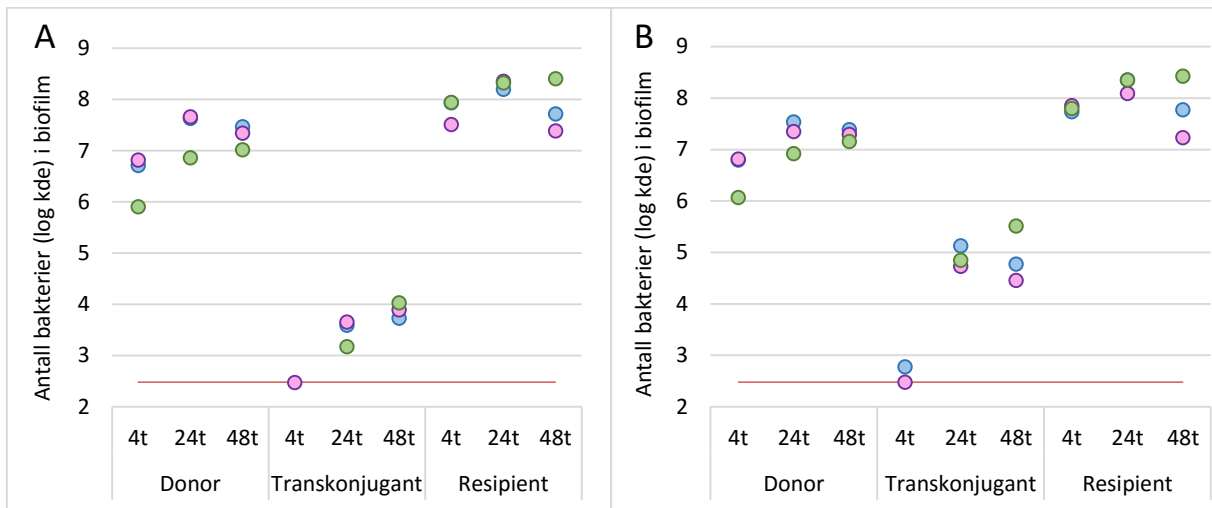
### 3.5 Konjugasjon i biofilm, buljong og på agar med *S. marcescens* transkonjugant som donor

#### 3.5.1 Overføring av IncK plasmidet til *E. coli*

I dette biofilmforsøket ble både *S. marcescens* TK 3306 og 3307 benyttet som donor, og *E. coli* 6927-5 som resipient.

IncK plasmidet ble overført i biofilm ved 25 og 37°C (Figur 18, 19 og 20).

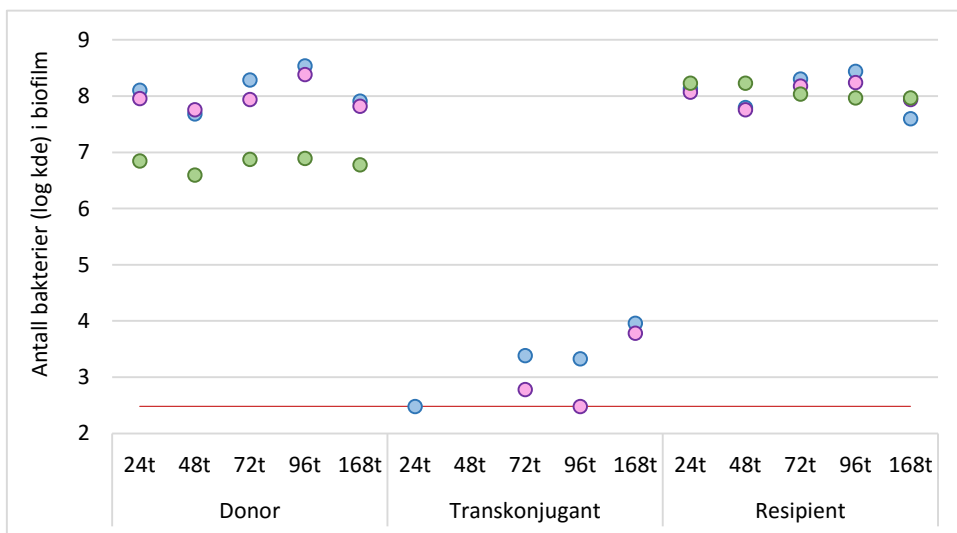
Figur 18a viser overføring av IncK plasmidet fra *S. marcescens* TK 3306 til *E. coli* resipient 6927-5 etter 4, 24 og 48 timer ved 30°C. Antall transkonjuganter økte gjennom hele forsøket. IncK plasmidet fra *S. marcescens* TK 3307 ble overført til *E. coli* resipient 6927-5 etter 4, 24 og 48 timer ved 30°C (Figur 18b). Det var størst variasjon i parallellene etter 48 timer, og antall transkonjuganter varierte mellom 4,5 og 5,5 log kde.



Figur 18. Antall bakterier (log kde) av donor, transkonjugant og resipient i biofilm inkubert ved 30°C, plottet mot tid. Som donor av IncK plasmidet ble A) *S. marcescens* transkonjugant 3306 og B) *S. marcescens* transkonjugant 3307 brukt. Resipient var *E. coli* 6927-5. De tre parallellene ved hvert uttak (4, 24 og 48 timer) er differensiert i figuren med ulik farge for hver parallell. Nedre deteksjonsgrense er markert ved 2,5 log kde, og paralleller med ingen observerte transkonjuganter er ikke markert.

I biofilm inkubert ved 25°C, ble IncK plasmidet fra både *S. marcescens* TK 3306 og 3307 overført til *E. coli* 6927-5 resipient.

Med *S. marcescens* TK 3306 som donor var det oppvekst av transkonjuganter ved uttak etter 24, 72, 96 og 168 timer (se Figur 19).

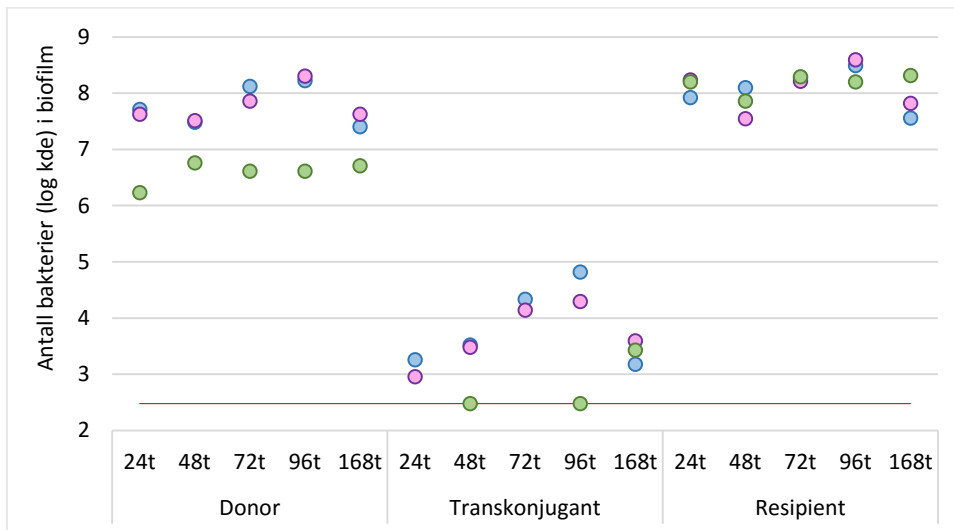


Figur 19. Antall bakterier (log kde) av donor, transkonjugant og resipient i biofilm inkubert ved 25°C, plottet mot tid. Som donor av IncK plasmidet ble *S. marcescens* transkonjugant 3306 brukt som donor og *E. coli* 6927-5 ble brukt som resipient. De tre parallellene ved hvert uttak (24, 48, 72, 96 og 168 timer) er differensiert i figuren med ulik farge for hver parallell. Nedre deteksjonsgrense er markert ved 2,5 log kde, og paralleller med ingen observerte transkonjuganter er ikke markert.

I uttaket som ble utført ved 24 timer vokste det kun en koloni av transkonjugant i det ene av tre parallelle uttak, noe som tilsier at antall transkonjuganter lå rundt deteksjonsgrensen. Etter

48 timer ble det ikke observert noen transkonjuganter. Ved uttak etter 72 timer og ut inkubasjonstiden var det oppvekst av transkonjuganter, og antall kde av transkonjugant var høyest etter 168 timer med 4 log kde.

Biofilmforsøk inkubert ved 25°C med *S. marcescens* TK 3307 som donor, ga oppvekst av transkonjuganter på den selektive skåla etter 24 timer og i de påfølgende uttakene (Figur 20).



Figur 20. Antall bakterier (log kde) av donor, transkonjugant og resipient i biofilm inkubert ved 25°C, plottet mot tid. Som donor av IncK plasmidet ble *S. marcescens* transkonjugant 3307 brukt og *E. coli* 6927-5 ble brukt som resipient. De tre parallellene ved hvert uttak (24, 48, 72, 96 og 168 timer) er differensiert i figuren med ulik farge for hver parallell. Nedre deteksjonsgrense er markert ved 2,5 log kde, og paralleller med ingen observerte transkonjuganter er ikke markert.

Det var størst variasjon i antall transkonjuganter i de tre parallellene i uttakene etter 72 og 96 timer. Ved 72 timer varierte antall transkonjuganter fra ingen observerte transkonjuganter til 4,3 log kde, og ved 96 timer lå antall transkonjuganter mellom 2,5 og 4,8 log kde. I to av parallellene økte antall kde av transkonjugant, donor og resipient fram til 96 timer, før antallet sank ved 168 timer (paralleller merket med blå og lilla farge i Figur 20).

Ved konjugasjon i buljong og på agar ble IncK plasmidet overført fra *S. marcescens* TK 3306 til *E. coli* resipient 6927-5 i alle uttak ved både 25 og 37°C (Tabell 14). Disse forsøkene ga samme resultat som konjugasjonsforsøket i biofilm, med unntak av at det etter 48 timer ved 25°C ikke ble observert noen transkonjuganter i biofilm.

Tabell 14. Konjugasjon i buljong og på agar satt opp parallelt med biofilmforsøk med *S. marcescens* transkonjugant (TK) 3306 som donor av IncK plasmidet og *E. coli* 6927-5 som resipient. Overføring av IncK plasmidet i buljong ble grovt kvantifisert fra + til +++ eller angitt som ingen observert overføring (-), mens på agar ble overføring av IncK plasmidet eller ingen observert overføring angitt som henholdsvis + eller -. Ingen tegn = ingen uttak.

<i>S. marcescens</i> TK 3306, IncK → <i>E. coli</i> 6927-5		4 timer	24 timer	48 timer	72 timer	96 timer	168 timer
Konjugasjon i buljong	30°C	+	+++	+++			
	25°C		+	+	+	+	+
Konjugasjon på agar	30°C	+	+	+			
	25°C		+	+	+	+	+

IncK plasmidet fra *S. marcescens* TK 3307 ble overført til *E. coli* resipient 6927-5 ved alle uttak både ved 25 og 37°C ved konjugasjon i buljong og på agar, se Tabell 15. Disse forsøkene ga samme resultat som biofilmforsøket.

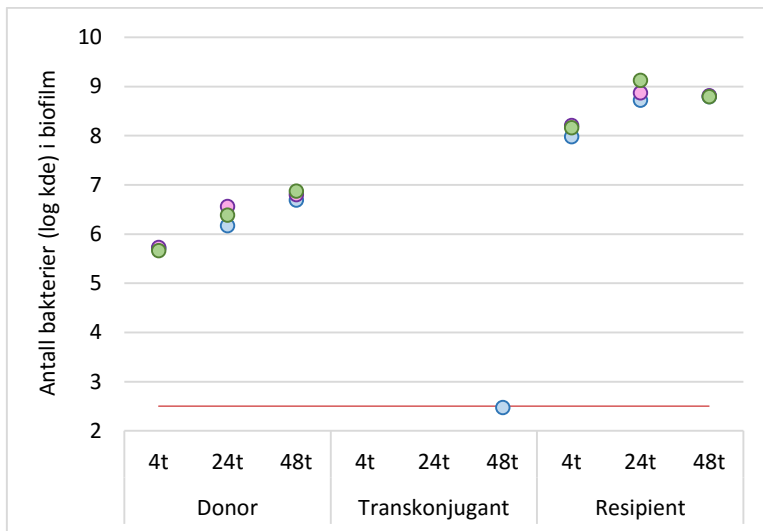
Tabell 15. Konjugasjon i buljong og på agar satt opp parallelt med biofilmforsøk med *S. marcescens* transkonjugant (TK) 3307 som donor av IncK plasmidet og *E. coli* 6927-5 som resipient. Overføring av IncK plasmidet i buljong ble grovt kvantifisert fra + til +++ eller angitt som ingen observert overføring (-), mens på agar ble overføring av IncK plasmidet eller ingen observert overføring angitt som henholdsvis + eller -. Ingen tegn = ingen uttak.

<i>S. marcescens</i> TK 3307, IncK → <i>E. coli</i> 6927-5		4 timer	24 timer	48 timer	72 timer	96 timer	168 timer
Konjugasjon i buljong	30°C	+	+++	+++			
	25°C		++	++	++	++	+++
Konjugasjon på agar	30°C	+	+	+			
	25°C		+	+	+	+	+

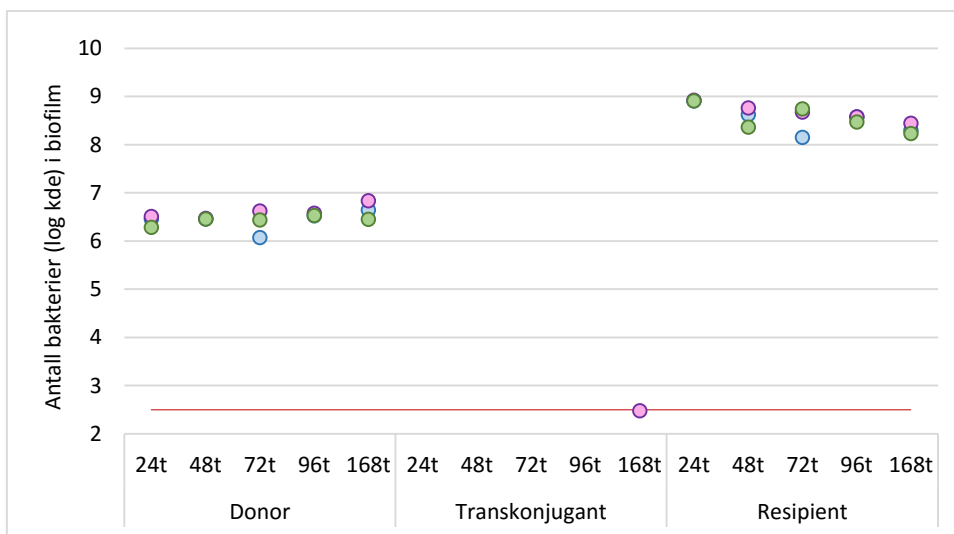
Det ble ikke observert overføring av IncK plasmidet til *E. coli* resipient 6927-5 ved 12°C i konjugasjonsforsøk i biofilm, buljong eller på agar (resultat ikke vist).

### 3.5.2 Overføring av IncK plasmidet til *S. proteamaculans*

Her ble *S. marcescens* TK 3307 brukt som donor og *S. proteamaculans* 5685 som resipient. IncK plasmidet fra *S. marcescens* TK 3307 ble overført ved både 25 og 30°C i biofilm (Figur 21 og 22). IncK plasmidet ble overført mot slutten av inkubasjonstiden ved både 25 og 30°C, etter henholdsvis 168 og 48 timer. Kun en koloni av transkonjugant vokste på den selektive skåla i en av tre paralleller ved både 25 og 37°C. Antall kde av donor og resipient holdt seg på et stabilt høyt nivå gjennom forsøket ved begge temperaturer.



Figur 21. Antall bakterier (log kde) av donor, transkonjugant og resipient i biofilm inkubert ved 30°C, plottet mot tid. Som donor av IncK plasmidet ble *S. marcescens* transkonjugant 3307 brukt og *S. proteamaculans* 5685 ble brukt som resipient. De tre parallellene ved hvert uttak (24, 48, 72, 96 og 168 timer) er differensiert i figuren med ulik farge for hver parallell. Nedre deteksjonsgrense er markert ved 2,5 log kde, og paralleller med ingen observerte transkonjuganter er ikke markert.



Figur 22. Antall bakterier (log kde) av donor, transkonjugant og resipient i biofilm inkubert ved 25°C, plottet mot tid. Som donor av IncK plasmidet ble *S. marcescens* transkonjugant 3307 brukt og *S. proteamaculans* 5685 ble brukt som resipient. De tre parallellene ved hvert uttak (24, 48, 72, 96 og 168 timer) er differensiert i figuren med ulik farge for hver parallell. Nedre deteksjonsgrense er markert ved 2,5 log kde, og paralleller med ingen observerte transkonjuganter er ikke markert.

IncK plasmidet fra *S. marcescens* TK ble overført til *S. proteamaculans* ved konjugasjon i buljong og på agar etter 4, 24 og 48 timer ved 30°C. Ved 25°C ble plasmidet kun overført etter 48 timer ved konjugasjon i buljong. Ved konjugasjon på agar som ble utført ved 25°C, ble det ikke observert noen transkonjuganter (se Tabell 16). Vekst av få transkonjuganter på selektiv agar antydte en lav grad av overføring av plasmidet.

Tabell 16. Konjugasjon i buljong og på agar satt opp parallelt med biofilmforsøk med *S. marcescens* transkonjugant (TK) 3307 som donor av IncK plasmidet og *S. proteamaculans* 5685 som resipient. Overføring av IncK plasmidet i buljong ble grovt kvantifisert fra + til +++ eller angitt som ingen observert overføring (-), mens på agar ble overføring av IncK plasmidet eller ingen observert overføring angitt som henholdsvis + eller -. Ingen tegn = ingen uttak.

<i>S. marcescens</i> TK 3307, IncK → <i>S. proteamaculans</i> 5685		4 timer	24 timer	48 timer	72 timer	96 timer	168 timer
Konjugasjon i	30°C	+	+	+			
buljong	25°C		-	+	-	-	-
Konjugasjon på	30°C	+	+	+			
agar	25°C		-	-	-	-	-

Det var ingen observert overføring av IncK plasmidet til *S. proteamaculans* resipient 5685 ved 12°C i konjugasjonsforsøk i biofilm, buljong eller på agar (resultat ikke vist).

### 3.6 Oppsummering av konjugasjon i biofilm, buljong og på agar

Konjugasjon i biofilm ga stort sett de samme resultatene som konjugasjon i buljong og på agar, men ofte med funn av transkonjuganter ved et tidligere tidspunkt ved konjugasjon i buljong og på agar enn i biofilm. I biofilmforsøk hvor det ble observert transkonjuganter ble det i tilsvarende konjugasjonsforsøk i buljong- og/eller på agar også observert transkonjuganter ved både 25 og 30/37°C for alle kombinasjoner av donor og resipient. Ett unntak var oppsettet med *E. coli* 2798 som donor og EHEC 3578 som resipient. I forsøket med *E. coli* 1292 som donor og *S. marcescens* 3306 som resipient ble IncK plasmidet kun overført ved konjugasjon i buljong og på agar, og ikke i biofilm.

Maksimal overføringsfrekvens (antall transkonjuganter (T)/antall resipienter (R)) ved 25 og 30/37°C i biofilm er angitt i Tabell 17. De tre høyeste overføringsfrekvensene ble oppnådd med donor-resipient parene *E. coli* 2798 → *E. coli* 6927-5, *E. coli* 1292 → *E. coli* 6927-5 og *S. marcescens* TK 3307 → *E. coli* 6927-5 med en maksimal overføringsfrekvens på henholdsvis  $2 \times 10^{-2}$ ,  $8 \times 10^{-2}$  og  $1 \times 10^{-3}$  ved 30/37°C etter 48 timer. Ved 25°C ble høyest overføringsfrekvens oppnådd med donor-resipient parene *S. marcescens* TK 3306 → *E. coli* 6927-5, *E. coli* 2798 → *E. coli* 6927-5 og *S. marcescens* TK 3307 → *E. coli* 6927-5 med en maksimal overføringsfrekvens på henholdsvis  $2 \times 10^{-4}$ ,  $9 \times 10^{-4}$  og  $6 \times 10^{-5}$ , og etter 168 timer.

Tabell 17. Maksimal overføringsfrekvens i biofilm ved 25 og 30°C (*Serratia* spp.) eller 37°C (*E. coli*).  
 Overføringsfrekvensen = antall transkonjuganter (T)/antall resipienter (R). Den parallellen som ga høyest overføringsfrekvens står oppgitt i Tabellen og er merket med grønt. Der hvor det ikke ble observert noen transkonjuganter har verdien blitt angitt som lavere enn deteksjonsgrensen delt på laveste antall resipienter (av de to/tre parallellene)

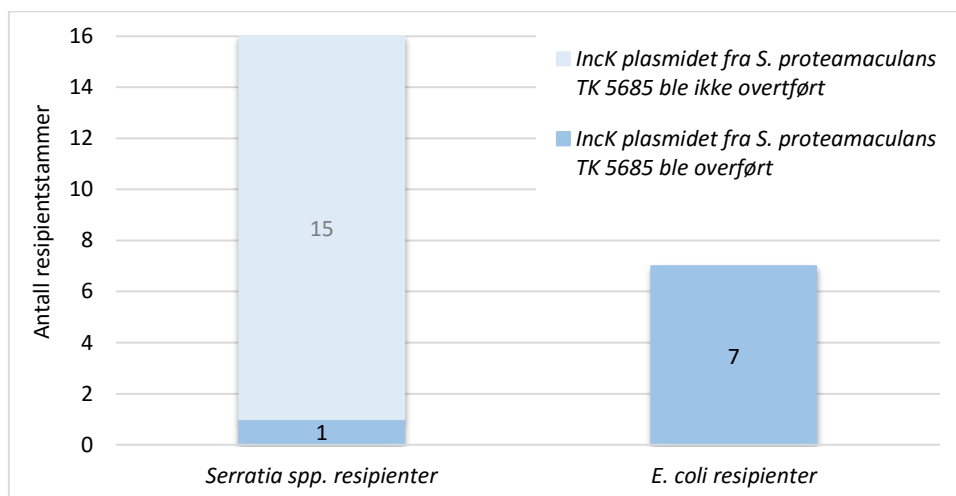
Donor → resipient	Tid (timer)	Overføringsfrekvens T/R ved 30/37°C	Overføringsfrekvens T/R ved 25°C
<i>E. coli</i> 1292, IncK → <i>E. coli</i> 6927-5	4	< 2 x 10 <sup>-5</sup>	
	24	5 x 10 <sup>-4</sup>	3 x 10 <sup>-6</sup>
	48	8 x 10 <sup>-2</sup>	3 x 10 <sup>-6</sup>
	72		2 x 10 <sup>-6</sup>
	96		2 x 10 <sup>-6</sup>
	168		3 x 10 <sup>-6</sup>
<i>E. coli</i> 2798, IncII → <i>E. coli</i> 6927-5	4	4 x 10 <sup>-5</sup>	
	24	4 x 10 <sup>-3</sup>	< 7 x 10 <sup>-6</sup>
	48	2 x 10 <sup>-2</sup>	< 6 x 10 <sup>-6</sup>
	72		< 1 x 10 <sup>-5</sup>
	96		6 x 10 <sup>-6</sup>
	168		9 x 10 <sup>-4</sup>
<i>E. coli</i> 1292, IncK → EHEC 3578	4	< 2 x 10 <sup>-5</sup>	< 2 x 10 <sup>-5</sup>
	24	< 4 x 10 <sup>-5</sup>	< 7 x 10 <sup>-6</sup>
	48	< 2 x 10 <sup>-5</sup>	< 9 x 10 <sup>-6</sup>
	72		< 2 x 10 <sup>-5</sup>
	96		< 2 x 10 <sup>-5</sup>
	168		< 3 x 10 <sup>-5</sup>
<i>E. coli</i> 2798, IncII → EHEC 3578	4	< 4 x 10 <sup>-5</sup>	< 7 x 10 <sup>-5</sup>
	24	< 1 x 10 <sup>-4</sup>	3 x 10 <sup>-5</sup>
	48	< 2 x 10 <sup>-4</sup>	< 5 x 10 <sup>-5</sup>
	72		< 2 x 10 <sup>-5</sup>
	96		< 5 x 10 <sup>-5</sup>
	168		
<i>E. coli</i> 1292, IncK → <i>S. marcescens</i> 3306	4	< 6 x 10 <sup>-5</sup>	< 1 x 10 <sup>-5</sup>
	24	< 8 x 10 <sup>-6</sup>	< 2 x 10 <sup>-5</sup>
	48	< 7 x 10 <sup>-6</sup>	< 1 x 10 <sup>-5</sup>
	72		< 1 x 10 <sup>-3</sup>
	96		< 2 x 10 <sup>-5</sup>
	168		
<i>E. coli</i> 1292, IncK → <i>S. marcescens</i> 3307	4	< 3 x 10 <sup>-5</sup>	< 5 x 10 <sup>-6</sup>
	24	< 4 x 10 <sup>-6</sup>	< 4 x 10 <sup>-6</sup>
	48	7 x 10 <sup>-6</sup>	< 4 x 10 <sup>-6</sup>
	72		< 2 x 10 <sup>-3</sup>
	96		2 x 10 <sup>-6</sup>
	168		
<i>S. marcescens</i> TK <sup>1</sup> 3306, IncK → <i>E. coli</i> 6927-5	4	9 x 10 <sup>-6</sup>	2 x 10 <sup>-6</sup>
	24	2 x 10 <sup>-5</sup>	< 5 x 10 <sup>-6</sup>
	48	3 x 10 <sup>-4</sup>	1 x 10 <sup>-5</sup>
	72		8 x 10 <sup>-6</sup>
	96		2 x 10 <sup>-4</sup>
	168		
<i>S. marcescens</i> TK 3307, IncK → <i>E. coli</i> 6927-5	4	1 x 10 <sup>-5</sup>	2 x 10 <sup>-5</sup>
	24	3 x 10 <sup>-4</sup>	9 x 10 <sup>-5</sup>
	48	1 x 10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-4</sup>
	72		2 x 10 <sup>-4</sup>
	96		6 x 10 <sup>-5</sup>
	168		
<i>S. marcescens</i> TK 3307, IncK → <i>S. proteamaculans</i> 5685	4	< 3 x 10 <sup>-6</sup>	< 4 x 10 <sup>-7</sup>
	24	< 6 x 10 <sup>-7</sup>	< 1 x 10 <sup>-6</sup>
	48	5 x 10 <sup>-7</sup>	< 2 x 10 <sup>-6</sup>
	72		< 1 x 10 <sup>-6</sup>
	96		1 x 10 <sup>-6</sup>
	168		

<sup>1</sup> TK = transkonjugant

### 3.7 Kartlegging av evne til å være resipient med *S. proteamaculans* transkonjugant som donor av IncK plasmidet

LB-buljong tilsatt nalidiksinsyre i en fortynningsrekke viste at MIC nalidiksinsyre for *S. proteamaculans* var på  $\leq 16$  mg/L.

IncK plasmidet ble overført fra *S. proteamaculans* TK 5685 til alle de syv *E. coli* resipientene som var med i forsøket, som ved tidligere konjugasjon på agar tok opp IncK plasmidet fra *E. coli* donor 1292 og *S. marcescens* TK 3307. Av *Serratia* spp. resipientstammene var det kun 6% som tok opp IncK plasmidet, se Figur 23.



Figur 23. Antall *E. coli* og *Serratia* spp. resipienter som fikk/ikke fikk overført IncK plasmidet fra donor *S. proteamaculans* transkonjugant (TK) 5685 ved konjugasjon på agar. Totalt syv *E. coli* og 16 *Serratia* spp. resipienter ble testet for opptak av IncK plasmidet fra *S. proteamaculans* TK.

*Serratia* spp. resipienten som tok opp IncK plasmidet var *S. marcescens* 3307, som også tok opp IncK plasmidet fra *E. coli* donor 1292. En oversikt over hvilke resipientstammer som tok opp IncK plasmidet fra *S. proteamaculans* TK 5685 er vist i Vedlegg 3.

### 3.8 Kvantitativ bestemmelse av konjugasjon

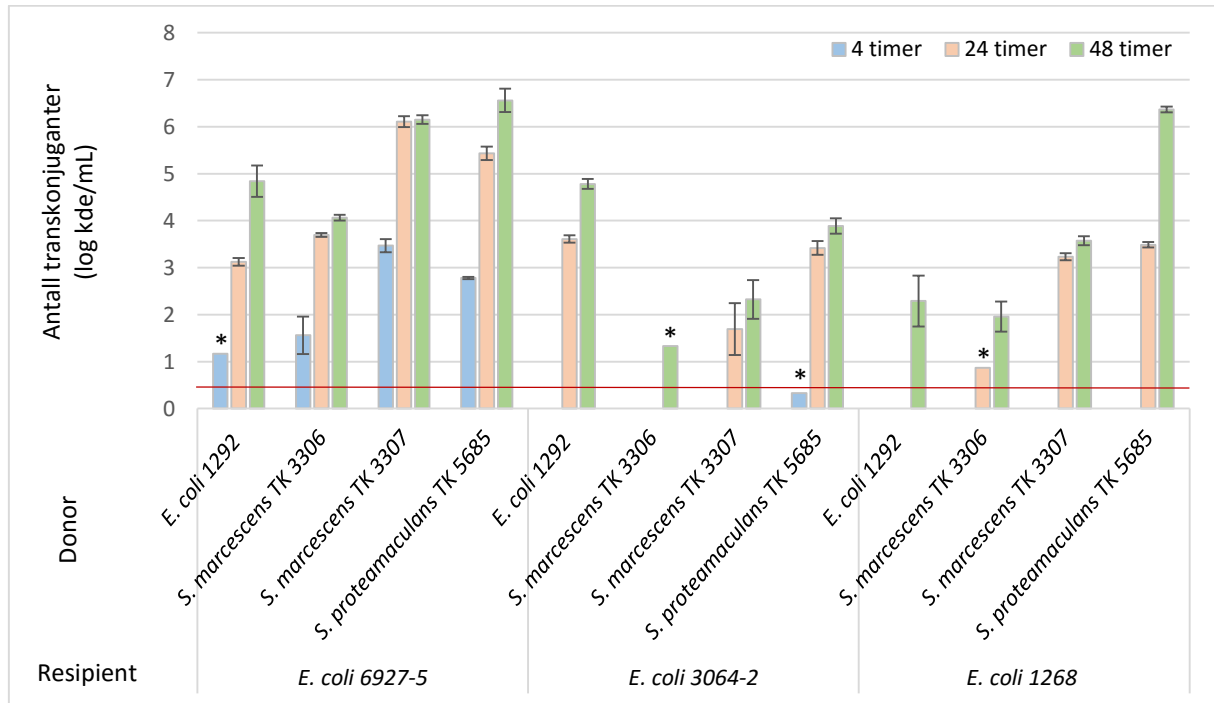
Donorer med IncK plasmidet (n=4) ble sammenlignet med tanke på deres evne til å overføre IncK plasmidet til *E. coli* resipienter (n=3), ved konjugasjon i buljong.

Overnattkultur av alle donor- og resipientstammer (tre paralleller av hver stamme) ble kvantifisert rett før blanding av donor og resipient, og lå i området 8,7-8,8 log kde/mL.

Uttak fra 12 donor-resipientpar (tre paralleller) ble utført etter 4, 24 og 48 timer og resultatene er vist i Figur 24. Etter 4 timer overførte de fire donorene IncK plasmidet til



*E. coli* 6927-5, mens kun donor *S. proteamaculans* TK 5685 overførte IncK plasmidet til *E. coli* 3064-2. Det ble ikke observert noen overføring av IncK plasmidet til *E. coli* 1268 etter 4 timer. Etter 48 timer hadde det blitt dannet transkonjuganter hos alle donor-resipientpar.



Figur 24. Antall transkonjuganter (log kde/mL) av *E. coli* 6927-5, *E. coli* 3064-2 og *E. coli* 1268, som har tatt opp IncK plasmidet fra donorene *E. coli* 1292, *S. marcescens* TK 3306, *S. marcescens* TK 3307 og *S. proteamaculans* TK 5685. Nedre deteksjonsgrense er markert ved 0,43 log. For uttak etter 4 timer med donorene *S. marcescens* TK 3306 og *S. proteamaculans* TK 5685 var deteksjonsgrensen 0,33 log. Uttak hvor antall transkonjuganter i en eller to av de tre parallellene lå under deteksjonsgrensen er merket med \* og er angitt uten standardavvik.

Med *E. coli* 6927-5 som resipient ble det dannet flest antall transkonjuganter (kde/mL) med *S. marcescens* TK 3307 og *S. proteamaculans* TK 5685 som donor (henholdsvis 6,2 og 6,6 log kde/mL) etter 48 timer. Donorene *E. coli* 1292 og *S. proteamaculans* TK 5685 ga flest transkonjuganter per mL med *E. coli* 3064-2 som resipient (henholdsvis 4,8 og 3,9 log kde/mL) etter 48 timer, mens *S. marcescens* TK 3307 og *S. proteamaculans* TK 5685 hadde den beste evnen til å overføre IncK plasmidet til *E. coli* 1268 resipient (henholdsvis 3,6 og 6,4 log kde/mL) etter 48 timer.

### 3.9 Resistensbestemmelse

Resistensbestemmelse ble utført på villtype og transkonjugant av resipientstamme, se Tabell 18 og 19.

Tabell 18. MIC verdier for villtype og transkonjugant (TK) av resipientstamme bestemt ved Sensititre® TREK EUVSEC2 – ESBL/AmpC. Cefoksitin: FOX, ertapenem: ETP, imipenem: IMI, meropenem: MERO, ceftazidim: TAZ, ceftazidim/klavulansyre: T/C, cefotaksim: FOT, cefotaksim/klavulansyre: F/C, cefepim: FEP, temocilin: TRM

EUVSEC2 - ESBL/AmpC	MIC mg/L									
	FOX	ETP	IMI	MERO	TAZ	T/C	FOT	F/C	FEP	TRM
<i>E. coli</i> 6927-5	4	≤0,015	≤0,12	≤0,03	≤0,25	≤0,12/ 4	≤0,25	≤0,06/ 4	≤0,06	4
<i>E. coli</i> 6927-5 TK (IncK)	32	0,03	≤0,12	≤0,03	8	4/4	4	4/4	0,12	4
<i>E. coli</i> 6927-5 TK (IncII)	64	0,03	≤0,12	≤0,03	16	8/4	8	4/4	0,25	4
<i>S. marcescens</i> 3306	16	≤0,015	0,5	0,06	≤0,25	0,5/4	≤0,25	≤0,06/ 4	≤0,06	8
<i>S. marcescens</i> 3306 TK (IncK)	32	0,03	0,5	0,06	8	8/4	4	4/4	0,25	8
<i>S. marcescens</i> 3307	8	≤0,015	0,5	≤0,03	≤0,25	≤0,12/ 4	≤0,25	≤0,06/ 4	≤0,06	8
<i>S. marcescens</i> 3307 TK (IncK)	32	0,06	0,5	0,06	8	8/4	4	8/4	0,25	8
<i>S. proteamaculans</i> 5685	4	≤0,015	0,25	≤0,03	≤0,25	≤0,12/ 4	≤0,25	≤0,06/ 4	≤0,06	4
<i>S. proteamaculans</i> 5685 TK (IncK)	64	≤0,015	0,25	≤0,03	2	1/4	8	4/4	0,12	4

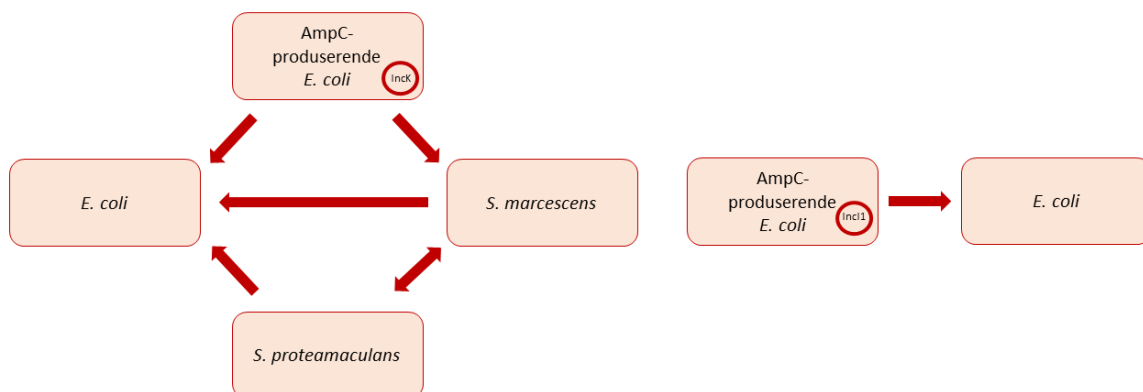
Alle transkonjuganter fikk forhøyede cefoksitin, ceftazidim, cefotaksim og cefepim MIC-verdier i forhold til villtype. MIC-verdien til både cefotaksim og ceftazidim hos transkonjugant sammenlignet med villtype ble forhøyet i kombinasjon med klavulansyre. Villtype *E. coli* 6927-5 var allerede ampicillin-resistent før den tok opp IncK eller IncII plasmidet, mens ampicillin MIC for *Serratia* spp. transkonjuganter steg til  $\geq 64$  mg/L. Meropenem og imipenem (karbapenemer) MIC ble ikke endret etter at IncK eller IncII plasmidet ble tatt opp av resipient. Det ble ikke utført resistensbestemmelse på villtype og transkonjugant av EHEC 3578 på grunn av sikkerhetsmessige hensyn.

Tabell 19. MIC verdier for villtype og transkonjugant (TK) av resipientstamme bestemt ved Sensititre® TREK EUVSEC. Sulfametoksazol: SMX, trimetoprim: TMP, ciprofloksacin: CIP, tetracyclin: TET, azitromycin: AZI, nalidiksinsyre: NAL, kloramfenikol: CHL, tigecyklin: TGC, colistin: COL, ampicillin: AMP, gentamicin: GEN.

EUVSEC	MIC mg/L										
	SMX	TMP	CIP	TET	AZI	NAL	CHL	TGC	COL	AMP	GEN
<i>E. coli</i> 6927-5	>1024	>32	0,25	≤2	4	>128	≤8	≤0,25	≤1	>64	1
<i>E. coli</i> 6927-5 TK (IncK)	>1024	>32	0,25	≤2	4	>128	≤8	≤0,25	≤1	>64	1
<i>E. coli</i> 6927-5 TK (IncI1)	>1024	>32	0,5	≤2	4	>128	≤8	≤0,25	≤1	>64	1
<i>S. marcescens</i> 3306	≤8	≤0,25	0,06	64	16	≤4	≤8	0,5	>16	16	≤0,5
<i>S. marcescens</i> 3306 TK (IncK)	≤8	≤0,25	0,06	32	8	≤4	≤8	0,5	>16	>64	1
<i>S. marcescens</i> 3307	≤8	≤0,25	0,06	64	32	≤4	≤8	0,5	>16	8	≤0,5
<i>S. marcescens</i> 3307 TK (IncK)	≤8	≤0,25	0,06	64	32	≤4	≤8	0,5	>16	>64	≤0,5
<i>S. proteamaculans</i> 5685	≤8	≤0,25	≤0,015	≤2	4	≤4	≤8	≤0,25	16	2	≤0,5
<i>S. proteamaculans</i> 5685 TK (IncK)	≤8	≤0,25	≤0,015	≤2	≤2	≤4	≤8	≤0,25	16	64	≤0,5

### 3.10 Potensielle spredningsveier for IncK og IncI1 plasmidet

I denne oppgaven ble IncK og IncI1 plasmidet overført til *E. coli* og/eller *Serratia* spp. ved kartleggingsforsøk og konjugasjonsforsøk utført i biofilm, buljong og/eller på agar ved 25 og/eller 30/37°C. Potensielle spredningsveier for de to plasmidene er oppsummert i Figur 25.



Figur 25. Overføring av IncK og IncI1 plasmidet med  $bla_{CMY-2}$ , henholdsvis til venstre og høyre, innen og/eller mellom bakteriearter påvist i biofilm, buljong og/eller på agar ved 25 og 30/37°C. Den røde ringen viser plasmidet i opprinnelig vert.

## 4. DISKUSJON

AmpC-produserende *E. coli* danner  $\beta$ -laktamaser som kan bryte ned viktige cefalosporinantibiotika. Disse stammene blir ansett som et problem i produksjonskjeden for fjørfe fordi mange isolater er bærere av plasmid-mediert AmpC som kan overføres til andre bakterier ved horisontal genoverføring (Dierikx et al. 2013a; Laube et al. 2013; Mo et al. 2014; Nilsson et al. 2014; Seiffert et al. 2013). Det vil derfor være viktig med økt kunnskap om overføring av plasmid-mediert AmpC både innen og mellom bakteriearter, under betingelser som er relevant for produksjonskjeden for fjørfe.

Bakteriestammene i denne studien ble valgt med tanke på at miljøbakterier kan være et mulig reservoar for og en kilde til videre spredning av plasmider som medierer cefalosporinresistens i fjørfeproduksjonen. *Escherichia coli* ble inkludert fordi AmpC-produserende *E. coli* hyppig blir påvist i produksjonskjeden for slaktekylling, i tillegg til at de kan ha en potensiell humanklinisk relevans.

I konjugasjonsforsøk ble *E. coli* med opprinnelse fra kyllingkjøtt benyttet som donor av resistensplasmider. Plasmidene var bærere av genet *bla*<sub>CMY-2</sub> og tilhørte to ulike inkompatibilitetsgrupper, IncK og Inc11. Både *E. coli* og *Serratia* spp., hovedsakelig fra fjørfe og miljøprøver, ble valgt ut som resipienter for å se på potensiell overføring innen og mellom bakteriearter. *Serratia* spp. blir ofte funnet i miljøer relatert til produksjonskjeden for kylling (Sæde et al. 2013; Turtura et al. 1990), de kan ha evnen til å overleve renhold (Langsrud et al. 2003; Parment et al. 1986; Willingham et al. 1996), samt at de tilhører samme familie som *E. coli*. Disse faktorene ga grunnlaget for en teori om at *Serratia* spp. kunne fungere som resipient av plasmid-mediert AmpC, og som en mulig donor for videre spredning.

Bakterier kan inneha evnen til å danne biofilm, og alle bakteriene som ble inkludert i denne studien produserte biofilm under betingelsene som ble benyttet. En biofilm vil sikre nærkontakt mellom bakterieceller som må være tilstede for at genetisk materiale skal kunne utveksles (Sørensen et al. 2005). Flere studier har vist at overføring av plasmider ved konjugasjon forekommer i biofilm (Hausner & Wuertz 1999; Krol et al. 2011; Król et al. 2013; Molin & Tolker-Nielsen 2003).

Dette ser ut til å være første gang *E. coli* og *Serratia* spp. har blitt inkludert i en studie hvor det har blitt utført konjugasjonsforsøk i biofilm ved ulike temperaturer.

Test av selektive medier som en del av innledende forsøk ble utført for å finne medier som enkelt klarte å differensiere transkonjugant, donor og resipient. Medier hvor

bakteriestammene skulle skilles morfologisk ble for usikkert, fordi fargen mediene ga bakteriekoloniene differensierte for lite mellom de ulike bakterieartene. Mueller Hinton-agar tilsatt antibiotika ga en enklere avlesning i konjugasjonsforsøkene. Ulempen med denne metoden er potensiell vekst av resistente mutanter, slik at transkonjugasjon bør verifiseres med andre metoder. Videre ble evnen til å danne biofilm og høsting av biofilm evaluert for å finne robuste metoder til bruk i konjugasjonsforsøkene.

Konjugasjonsforsøk i biofilm ble utført på stålkuponger. Rustfritt stål benyttes ofte i næringsmiddelindustrien blant annet på grunn av at det er robust, bakteriologiske nøytralt og enkelt å rengjøre (Van Meervenne et al. 2014). Samtidig gir denne typen overflater bakterier muligheten til å feste seg og danne biofilm (Shi & Zhu 2009). Evnen bakteriestammene hadde til å danne biofilm ble derfor undersøkt på stålkuponger som en del av innledende forsøk. I forsøket ble det observert en tilnærmet lik biofilmdannelse på stålkupongene og det sterile glassrøret som stålkupongen sto oppi. Dette stemte også godt overens med tidligere funn (Nesse et al. 2014), hvor de fant en god korrelasjon mellom biofilmdannelse på stålkupong og glass. Det ble derfor besluttet at stammene i denne oppgaven kunne undersøkes med tanke på evne til biofilmdannelse i glassrør fordi dette ville være arbeidsbesparende.

I kartleggingen av mulige resipienter og spredningspotensialet til IncK og IncII plasmidene viste *Serratia* spp. seg å kunne være mellomvert for IncK plasmider. IncK plasmider ble overført til både *E. coli* og *Serratia* spp., mens IncII plasmidet kun ble overført til *E. coli*. Transkonjugantene *S. marcescens* og *S. proteamaculans* fungerte som vert for IncK plasmidet, og de hadde evnen til å overføre det videre til *E. coli* og andre *Serratia*-stammer (totalt 19 stammer). Et begrenset stammeutvalg åpner opp muligheten for at andre *Serratia* spp. også kan fungere som vert for IncK plasmidet, men dette må undersøkes nærmere. De *Serratia* spp. resipientene som ble testet i denne studien tok ikke opp IncII, noe som kan tyde på at *Serratia* spp. har ulik evne til å ta opp forskjellige konjugative AmpC plasmider. Men med det begrensede stammeutvalget kan det ikke utelukkes at andre *Serratia* kan fungere som vert for denne typen plasmider. Både IncK og IncII plasmidene ble overført til EHEC. Dette viste at disse plasmidene har potensiale til å bli overført til ulike *E. coli* inkludert potensielt humanpatogene, matbårne varianter. IncII plasmidet ble overført til flere *E. coli* resipienter enn IncK og så dermed ut til å ha et større spredningspotensiale innen *E. coli*.

Disse funnene kan indikere at IncII plasmidet tas opp av flere *E. coli* resipienter, mens IncK har større potensiale for overføring mellom ulike bakterieslekter. Andre bakterieslekter og -arter innen *Enterobacteriaceae* som er relevante for fjørfeproduksjonen kan i framtidige

studier undersøkes med tanke på om de kan være resipienter og eventuelt donorer av IncK og IncII plasmider. Ifølge Mo et al. (2016) ble det fra tarm hos friske kyllinger funnet like mange AmpC-produserende *E. coli* med IncK som IncII plasmider, mens *E. coli* stammer med IncK plasmider utgjorde den største andelen på kyllingkjøtt. Dette tyder på at det er gode forhold for både IncK og IncII plasmider til å persistere i produksjonskjeden for norsk kylling, og under de rette forholdene bli overført videre til andre resipienter. Funn av en overvekt av *E. coli* med IncK plasmider på kyllingkjøtt kan skyldes at denne typen plasmider under forholdene på slakteri/foredling har bedre betingelser enn IncII. Mo et al. (2016) fant at IncK plasmidet hos *E. coli* 1292 brukt i denne studien, har gener som koder for plasmid-stabilitetssystemene *reIBE/stbDE* og *pndAC*. Stabilitetssystemene sikrer at datterceller som ikke nedarver IncK plasmidet ved celledeling blir drept. Systemet kan også bidra til en langvarig stabilitet av IncK plasmidet i en vert ved å forhindre opprettholdelse av andre plasmider som tilhører samme inkompatibilitetsgruppe. Disse stabilitetssystemene kan også være en av årsakene til at IncK i stor grad finnes og opprettholdes i norsk kylling og kyllingkjøtt til tross for svært lavt forbruk av antibiotika i produksjonen.

Sverige og Danmark får slaktekylling fra samme importrute som Norge. Studier utført i disse landene har vist at *bla<sub>CMY-2</sub>* genet også der befinner seg på IncII og/eller IncK plasmider (Agersø et al. 2014; Börjesson et al. 2013). I tillegg er IncK plasmidet hos *E. coli* 1292 svært likt et IncK plasmid i Nederland (Mo et al. 2016). Dette tyder på at denne type plasmider er gode til å opprettholdes i kyllingproduksjonen.

Med *E. coli* som donator ble IncII plasmidet kun overført til andre *E. coli*, mens IncK plasmidet trolig vil kunne spres mer effektivt til *E. coli* enn til *S. marcescens*.

IncII plasmidet ble overført fra *E. coli* til *E. coli* (inkludert overføring til EHEC serogruppe O103) i miljømodeller relevante for kyllingproduksjonen ved 25 og 37°C. Kun resultatene fra konjugasjon i biofilm og buljong diskuteres videre siden disse er mest relevante for produksjonskjeden.

IncII plasmidet hadde et stort spredningspotensiale til kommensale *E. coli* resipienter i både biofilm og buljong. Flere andre studier har påvist overføring av IncII plasmider til *E. coli* i buljong (Händel et al. 2015; Sidjabat et al. 2014). Resultatene viste at overføring av plasmider mellom *E. coli* i miljøer relevante for produksjonskjeden kan forekomme ved et tidligere tidspunkt i suspensjoner enn i en biofilm. Resultatene fra konjugasjon i buljong kan kanskje overføres til muligheten for konjugasjon i kyllingsaft med tanke på næringsinnhold. At konjugasjon kan forekomme i mer næringsfattige suspensjoner kan heller ikke utelukkes. En

studie utført av Dahlberg et al. (1998) viste at konjugasjon forekom i saltvann uten tilsatt næring.

Enterohemorragisk *E. coli* er en humanpatogen bakterie som ble inkludert i konjugasjonsforsøk i biofilm, buljong og på agar for å se om plasmidene i tillegg kunne overføres til denne typen *E. coli*. Potensialet for overføring av IncI1 plasmidet til EHEC i biofilm viste seg å være lavt, men med økt overføringsfrekvens i buljong ved 37°C enn ved øvrige testede betingelser. Overføring av IncI1 plasmidet til humanpatogen EHEC vil føre til resistens mot 3. generasjons cefalosporiner. En EHEC-infeksjon behandles ikke med antibiotika da antibiotika, og spesielt  $\beta$ -laktamer bør unngås fordi de induserer en økt frigjøring og/eller produksjon av shigatoksin, og dermed større sannsynlighet for å utvikle sykdommen hemolytisk-uremisk syndrom (HUS) (Goldwater & Bettelheim 2012; Smith et al. 2012). Muligheten for at EHEC kan være en vert for plasmidet og overføre det videre til andre bakteriestammer kan ikke ses bort ifra, og potensialet til EHEC som donor av IncI1 må eventuelt undersøkes.

IncK plasmidet ble overført direkte fra *E. coli* donor til *E. coli* resipient eller via miljøbakterien *S. marcescens* transkonjugant ved både 25 og 30/37°C. IncK plasmidet ble også overført mellom ulike arter av *Serratia*. Plasmidet viste seg dermed å ha et stort potensiale for spredning av cefalosporinresistens innen og mellom bakteriearter. Denne horisontale spredningsveien kan derfor være et viktig bidrag i opprettholdelsen av IncK i produksjonskjeden for kylling. Andre studier har også funnet at *Serratia* spp. kan overføre resistensplasmider til *E. coli* (Cai et al. 2008; Ito et al. 1995; Mendez et al. 1982; Zhang et al. 2007). I biofilmforsøkene med *E. coli* som donor ble IncK overført i lav grad til *Serratia* spp. mot slutten av inkubasjonstiden. Dette tyder på at *Serratia* spp. ikke tok opp IncK plasmidet så lett, men at overføring fant sted etter en gitt tid. Som donor av IncK plasmidet overførte *S. marcescens* transkonjugant plasmidet videre, med en lavere overføringsfrekvens til *S. proteamaculans* enn til *E. coli*. *Serratia marcescens* transkonjugant var god til å overføre IncK plasmidet til *E. coli*, og ved 25°C ble IncK overført med en høyere overføringsfrekvens (T/R) med *S. marcescens* transkonjugant som donor enn med *E. coli* som donor. Dermed så *E. coli* ut til å være en god mottaker av resistensplasmidene uavhengig av donor, mens *Serratia* spp. som ikke tok opp IncK i like stor grad, var god til å overføre plasmidet videre til andre bakterier.

Konjugasjon forekom ved tidligere tidspunkter i buljong enn i biofilm for noen kombinasjoner av donor og resipient. Det vil for disse kombinasjonen være en større mulighet

for overføring av resistensplasmidene i suspensjon enn i biofilm ute i produksjonsmiljøene. En tidligere plasmidoverføring mellom donor og resipient kan komme av at disse bakteriekombinasjonene hadde bedre betingelser i buljong enn i biofilm. Konjugasjon i buljong vil øke sjansen for tilfeldig kontakt mellom donor og resipient i forhold til biofilm (Händel et al. 2015), men til tross for dette har det blitt funnet en konjugasjonsrate som er lik i buljong og biofilm (Hausner & Wuertz 1999). Økte muligheter for donorer og resipienter til å interagere med hverandre kan dermed være en årsak til at transkonjuganter ble observert tidligere i buljong enn i biofilm i noen av forsøkene.

En rask overføring av IncK plasmider i buljong ved 25°C kan åpne opp muligheten for at en slik overføring kan forekomme under slakting.

Resultatene fra overføringen av IncK og IncII fra *E. coli* til *E. coli* resipient (6927-5) i buljong kan indikere at IncK plasmidet ble overført raskere og i større grad enn IncII ved 25°C. Resultatene er kun grovt kvantifisert, så denne antagelsen må ses på med forsiktighet. I tillegg er dette det eneste forsøket hvor både IncK og IncII plasmidet ble overført til samme resipient. Hvis det er slik at IncK plasmidet generelt blir overført i større grad og ved et tidligere tidspunkt til *E. coli* enn IncII plasmidet, så kan det kanskje være en del av forklaringen på hvorfor *E. coli* med IncK plasmider dominerer på kyllingkjøtt i Norge. En studie fra Nederland viste at *E. coli* med IncK plasmider (91%) dominerte over IncII plasmider (9%) på kyllingkjøtt (Voets et al. 2013).

Under den automatiserte slakteprosessen er muligheten for kontaminering fra tarm tilstede. I prøver tatt fra tarm til norsk kylling, var fordelingen tilnærmet lik mellom *E. coli* med IncK og IncII plasmider. Hvorfor eventuelt stort sett bare *E. coli* med IncK fra tarm skulle overleve på kyllingkjøtt er vanskelig å si uten noe mer forskning på dette området. Miljøbakterier som *Serratia* spp. finnes på kyllingkjøtt (Säde et al. 2013). Denne studien har vist at *S. marcescens* kan være en vert for IncK plasmidet i tillegg til at *S. marcescens* overførte plasmidet til *E. coli* på et tidlig tidspunkt ved 25°C. Dette kan indikere at *Serratia* spp. kan spille en rolle i hvorfor IncK plasmidet dominerer i *E. coli* på kyllingkjøtt.

Muligheten for at både IncK og IncII plasmider kan persistere i miljøet i norske kyllinghus og slakteri hos *E. coli* og/eller andre miljøbakterier kan ikke utelukkes. Studien har vist at *Serratia* spp. kan fungere som vert for IncK plasmidet og overføre plasmidet videre til andre bakteriearter, hvis miljøet de lever i forblir upåvirket av vask og desinfeksjon. *Serratia* spp. har i flere studier vist seg å kunne overleve og vokse i miljøer hvor de blir utsatt for desinfeksjonsmidler (Langsrud et al. 2003; Willingham et al. 1996). Man kan derfor spekulere



i at *Serratia* spp. som bærer av resistensplasmider har forutsetninger for å overleve vask og desinfeksjonsrutiner. Flere studier har konkludert med at miljørelaterte faktorer er en viktig årsak til at AmpC-produserende *E. coli* persisterer i produksjonskjeden for kylling (Agersø et al. 2014; Dierikx et al. 2013a; Dierikx et al. 2013b; Laube et al. 2013; Nilsson et al. 2014). I en undersøkelse utført av Nilsson et al. (2014) ble det ikke funnet noen AmpC-produserende *E. coli* isolater i prøver tatt fra tomme kyllinghus mellom to innsett. En forklaring på persistens av resistensplasmider kan være at disse forblir i miljøet hos bakteriearter som *Serratia* spp. under vask og desinfeksjon, før de overføres til *E. coli* ved nye innsett av slaktekylling. Det vil derfor i framtidige studier være av interesse å se om andre bakteriearter i tillegg til *E. coli*, kan være tilstede som bærere av resistensplasmider i tomme kyllinghus samt i øvrige deler av produksjonskjeden for norsk fjørfe.

Inc11 plasmidet ble i denne studien kun overført til andre *E. coli*. En studie utført i Nederland viste at AmpC-produserende *E. coli* ble funnet i kyllinghus selv etter vask og desinfeksjon (Dierikx et al. 2013b). En annen studie utført av Capita et al. (2014) fant at *E. coli* i biofilm utsatt for subletale konsentrasjoner av biocider som benyttes i matindustrien, fikk økt toleranse mot biocider i tillegg til at de kunne utvikle resistens mot ulike typer antibiotika. Det kan derfor være en mulighet for at *E. coli* kan klare å overleve vask og desinfeksjon som del av en biofilm som beskytter bakteriene. For dårlig vask og desinfeksjon av utstyr og overflater kan også være en årsak til overlevelse av AmpC-produserende bakterier.

I de fleste biofilmforsøkene økte antall transkonjuganter med tid. Król et al. (2013) fant også at en lengre inkubasjonstid ga et høyere antall transkonjuganter fordi antall donorer som festet seg til biofilmen økte med tiden. I biofilmforsøk hvor det ble observert transkonjuganter i tidlige uttak, kan transkonjuganter isolert mot slutten av inkubasjonstiden ha oppstått som en følge av plasmidoverføring fra opprinnelig donor, plasmidoverføring fra transkonjugant, eller vekst av transkonjugant. En studie utført av Seoane et al. (2011) viste at plasmidet først ble overført fra opprinnelig donor til resipient, før transkonjugant overførte plasmidet videre i mikrokolonier under vekst. Som en konsekvens vil trolig de første uttakene vise den reelle overføringen fra opprinnelig donor til resipient. På en annen side så er det totalt antall AmpC-produserende bakterier som er av betydning for kyllingproduksjonen, i tillegg til deres potensiale til å persistere i miljøet og overføre plasmidet videre. Andre studier har derimot vist at etter at donor har kommet i kontakt med en mikrokoloni med resipienter, har kun det ytterste laget med resipienter i mikrokolonien tatt opp plasmidet. Transkonjugantene i disse

studiene var ikke så gode til å overføre plasmidet videre til andre resipienter (Christensen et al. 1998; Haagensen et al. 2002).

Temperatur så ut til å spille en viktig rolle for muligheten og graden av overføring av IncK og IncII plasmidet. Ved 12°C ble det ikke observert noen transkonjuganter verken i biofilm, buljong eller på agar i noen av kombinasjonene av donor og resipient. Det var også en lavere overføringsfrekvens (T/R) ved 25°C enn 30/37°C som er optimal temperatur for *Serratia* spp. og *E. coli*. På grunn av deteksjonsgrensen kan man ikke med sikkerhet si at det ikke har forekommet en lav grad av overføring ved 12°C. Dette gjaldt også ved de andre temperaturene hvor det ikke ble observert noen transkonjuganter. En forlenget inkubasjonstid kunne kanskje ha ført til at det ble dannet transkonjuganter ved 12°C (Van Meervenne et al. 2015). Flere studier har vist at lav temperatur gir redusert konjugasjonsfrekvens (Alonso et al. 2005; Richaume et al. 1989; Van Meervenne et al. 2015). Fernandez-Astorga et al. (1992) fant også lavere overføringsfrekvens ved lavere temperaturer, men at resistensplasmidene ble overført fra *E. coli* til *E. coli* i buljong helt ned til 8°C.

Temperatur påvirket celletall i biofilm. For å få etablert en biofilm av resipient ble stålkuponger ved 12°C inkubert to dager lenger enn ved de andre temperaturene. Gjennom hele inkubasjonstiden lå antall kolonier av resipient mellom 7 og 9 log. Antall resipientbakterier lå dermed på et forholdsvis likt nivå for de tre temperaturene som ble benyttet. Nivået av donor varierte mer med temperatur. Gjennom hele inkubasjonstiden lå antall donorbakterier mellom 5 og 7 log kde ved 12°C, mellom 6 og 9 log kde ved 25°C, og mellom 6 og 8 log kde ved 30/37°C for alle kombinasjoner av donorer og resipienter. Et lavere antall kde av donor ved 12°C skyldtes nok lavere veksthastighet ved suboptimal temperatur i forhold til de to andre inkubasjonstemperaturene. I de fleste biofilmforsøk så det ut til at donor måtte opp på et nivå rundt 7 log kde for at det skulle dannes transkonjuganter. Men det aktuelle plasmidet ble ikke overført hver gang antall donorceller oversteg 7 log kde. Händel et al. (2015) fant i sin studie at maksimalt antall transkonjuganter ble dannet ved en total celletetthet på 7,86 log celler/mL hvor forholdet mellom tilsatt donor og resipient var 1/1. Studier utført i buljong har antydnet at forholdet mellom donor og resipient (D/R) har noe å si for antall transkonjuganter som dannes. Fernandez-Astorga et al. (1992) så i sin studie at maksimalt antall transkonjuganter ble oppnådd ved å benytte en D/R ratio mellom 1 og 10, mens Gauthier et al. (1985) fikk høyest overføringsfrekvens der hvor forholdet D/R var 1/1. Om forholdet mellom donorer og resipienter har betydning for konjugasjonsfrekvensen i biofilm er usikkert, men resultatene viste at antall donorer er viktig for å få overført plasmidet.

Antall donorer kan derfor ha vært en av årsakene til at det ikke ble observert transkonjuganter ved 12°C. Resultatene tyder på at flere faktorer spiller inn siden de ikke forklarer hvorfor det ved 30/37°C ble dannet flere transkonjuganter enn ved 25°C, hvor antall donorer lå omtrent på samme nivå.

Biofilmer inkubert ved lavere temperaturer, spesielt 25°C, så ut til å danne mer ekstracellulært matriks. Biofilmene viste en makroskopisk forskjell i utseendet ved de ulike temperaturene, hvor biofilm inkubert ved 25°C så ut til å bestå av mest biofilm-matriks. Det totale celledallet viste at biofilm inkubert ved 25°C i 48 timer ikke alltid hadde høyest celledtall, og det var generelt sett ingen stor variasjon i bakterieantallet (differanse på ~ 0 til 0,8 log kde) mellom biofilmene inkubert ved ulik temperatur. Dette stemte godt overens med White-Ziegler et al. (2008) som fant at genuttrykket til flere gener involvert i dannelsen av biofilm hos *E.coli* økte ved lav temperatur (23°C).

I biofilm med *E. coli* donor 1292 og *E. coli* resipient 6927-5 inkubert ved 25°C holdt antall celler seg på et stabilt høyt nivå (8,2-8,8 log kde etter 24, 48, 72, 96 og 168 timer), mens makroskopisk sett så biofilmen ut til å øke i størrelse. Hvis mengden ekstracellulært matriks øker over tid, vil det kunne bli vanskeligere for nye donorer av IncK plasmidet å komme til potensielle resipienter. Flere studier har vist at bakterieceller i de dypere lagene i biofilmen ikke får overført plasmider i like stor grad (Król et al. 2013; Seoane et al. 2011). Dette kan være en årsak til at antall transkonjuganter ved noen biofilmforsøk ikke øker over tid. Krol et al. (2011) så også at en lav grad av overføring av plasmider forekom i tykke biofilmer hvor donor og resipient kan være fysisk skilt i ulike populasjoner.

Det ble dannet få transkonjuganter i noen av biofilmforsøkene. I biofilm med *E. coli* donor 1292 og *S. marcescens* resipient 3306 og 3307 inkubert ved 12 og 25°C, løsnet deler av biofilmen ved høsting av biofilm fra stålkupong etter 96 timer. Som et resultat av biofilmløsningen, sank antall resipienter fra uttak etter 72 til 96 timer, mens antall donorer steg fra uttak etter 72 til 96 timer. I biofilm med *S. marcescens* 3307 som resipient inkubert ved 25°C, sank antall resipienter fra 8,0 til 5,8 log kde (>100 fold reduksjon). Dette stemte godt overens med en studie utført av Rice et al. (2005) hvor de så at store deler av *S. marcescens* biofilm inkubert ved romtemperatur løsnet etter 75-80 timer som en følge av quorum-sensing og næringsforholdene. Biofilmene i denne oppgaven fikk ikke ny næring før etter 72 timer, og dette kan ha vært en av årsakene til at store deler av *S. marcescens* løsnet etter 96 timer. En stor nedgang i antall resipienter i tillegg til en økning av antall donorer kan antyde at biofilmen besto av mikrokolonier bestående kun av donor eller resipient.

Mikrokolonier dannet av kun donor eller resipient vil gi en liten grad av nærkontakt mellom donor og resipient og et ikke-homogent miljø (Sørensen et al. 2005). Denne strukturen kan dermed være en årsak til en lavere grad av overføring i biofilm. Forsøk utført av Krol et al. (2011) viste en lav grad av plasmidoverføring i biofilm hvor det ble dannet ulike lag eller mikrokolonier av donor eller resipient. Krol et al. (2011) foreslo også at en lav grad av konjugering i slike biofilmer kan forekomme ved at få resipient beveger seg inn i en mikrokoloni av donorer, eller i kontaktflaten mellom mikrokolonier av donor og resipient.

Bakterier som kan ta opp plasmider kan i ulik grad ha evnen til å overføre disse videre. Det ble derfor sett på hvor gode *E. coli*, *S. marcescens* og *S. proteamaculans* som donorer av IncK plasmidet, var til å overføre plasmidet til tre *E. coli* resipienter. *Serratia* spp. viste seg å ha et stort potensiale til å overføre IncK plasmidet til *E. coli*. Generelt ga donorene *S. marcescens* (3307) og *S. proteamaculans* flest transkonjuganter, bortsett fra i forsøk med *E. coli* 3064-2 som resipient. Det så ut til at resipient påvirket graden av overføring ettersom antall transkonjuganter som ble dannet varierte mellom de ulike resipientene, noe som stemte overens med Thomas og Nielsen (2005). Men det så også ut til at donor påvirket graden av overføring, fordi overføring til samme resipient ga ulikt antall transkonjuganter for de ulike donorene. Król et al. (2013) fant i sin studie at en økt overføringsfrekvens ble oppnådd med økt evne hos donor til å feste seg til resipient. Andre faktorer som hvor ofte og hvordan kontakten mellom donor og resipient var (Seoane et al. 2011), kan også ha spilt en rolle ettersom det var variasjoner i antall transkonjuganter for de ulike donor og resipient-parene. Funnene i dette forsøket stemte godt overens med biofilmforsøkene hvor *S. marcescens* som donor av IncK plasmidet ga høyest maksimal overføringsfrekvens (T/R) ved 25°C. IncK plasmidet fra *S. proteamaculans* som donor ble ikke forsøkt overført til resipient i biofilm, og kan dermed ikke sammenlignes.

En svakhet med forsøket i forhold til relevans for produksjonskjeden for slaktekylling, var at det ble satt opp ved 30°C, og ikke ved 25°C. På en annen side så har alle konjugasjonsforsøk i buljong i denne studien med *E. coli* som resipient vist at IncK ble overført ved både 25 og 30/37°C, men med en antatt lavere grad av overføring ved 25 enn 30/37°C.

Alle transkonjugantene viste et resistensmønster som tydet på AmpC-produksjon. Både villtype av resipient og transkonjugant ble undersøkt med tanke på endringer i resistensmønsteret. Transkonjugantene ble resistente mot cefotaksim, ceftazidim, cefoksitin og ampicillin. Det ble ikke oppnådd en synergistisk effekt med klavulansyre.

Transkonjugantene fikk en svakt forhøyet MIC for cefepim som er et 4. generasjons

cefalosporin, uten at den forhøyede MIC-verdien gjorde transkonjugantene resistente mot cefepim (EUCAST 2016). En svakt forhøyet MIC for cefepim ble observert fordi den enzymatiske aktiviteten til AmpC er lav mot 4. generasjons cefalosporiner (Jacoby 2009). Genet *bla<sub>CMY-2</sub>* ga ikke resistens mot noen andre antimikrobielle midler som det ble testet for.

Ulike metodiske faktorer under forsøkene kan ha påvirket resultatene som ble oppnådd. Biofilm ble dannet i luft-væske fasen på stålkupong inkubert i sentrifugerør tilsatt LB-buljong uten 1% NaCl under hele inkubasjonstiden. Det kan derfor ikke utelukkes at selve konjugasjonen forekom i buljongen, før eventuelt transkonjugant gikk inn i biofilmen. Men første funn av transkonjuganter i biofilm etter en lang inkubasjonstid, hvor det i tilsvarende forsøk var oppvekst av transkonjuganter i buljong etter kort tid, kan tyde på at konjugasjonen har skjedd i selve biofilmen og ikke i buljongen. Forsøket med *E. coli* 1292 som donor og *S. marcescens* 3306 som resipient viste kun oppvekst av transkonjuganter i buljong og ikke i biofilm. Dette understøtter påstanden om at konjugeringen har skjedd i biofilm, men det kan heller ikke utelukkes at plasmidoverføring i tillegg kan ha skjedd i buljong. Buljongen kunne eventuelt ha blitt tilsatt antibiotikum som donor var resistent mot, slik det ble gjort i en studie utført av Solheim et al. (2013), for å sikre at konjugeringen ikke skulle forekomme i buljong. I konjugasjonsforsøkene med *Serratia* spp. som resipient, var det oppvekst av falske positive *Serratia* spp. transkonjuganter på den selektive skålen som inneholdt MH tilsatt 1,0 mg/L cefotaksim og 16 eller 100 mg/L rifampicin. I innledende forsøk hvor medier ble testet for å kunne differensiere donor og resipient, var det ingen av *Serratia* spp. stammene som ble brukt i senere konjugasjonsforsøk, som vokste på MH tilsatt 1,0 mg/L cefotaksim. Kromosomal AmpC hos *S. marcescens* kan induseres av ulike typer antibiotika, og cefotaksim er et antibiotikum som kan føre til en svak induksjon av enzymet (Jacoby 2009). Etersom *Serratia* spp. ikke vokste på MH tilsatt 1,0 mg/L cefotaksim i innledende forsøk, kan det se ut til at rifampicin kan ha induisert kromosomalt AmpC hos *Serratia* spp. resipienter som ikke hadde tatt opp IncK plasmidet.

I pilotforsøket som ble utført for å se om metoden for biofilmforsøk fungerte, ble både IncK og IncII plasmidet overført til resipient. Vekst av bakteriekolonier på selektiv skål kan ha vært mutert donor og ikke reelle transkonjuganter ettersom de kun ble verifisert med real-time *bla<sub>CMY-2</sub>* PCR. Fordi det var oppvekst av et stort antall transkonjuganter med IncK og IncII plasmidet (henholdsvis 5,9 og 5,2 log kde etter 24 timer ved 37°C og 4,0 og 4,1 log kde etter

168 timer ved 25°C), ble muligheten for at alle koloniene på den selektive skålen skulle være falske positive vurdert som lite sannsynlig.

Denne studien viste at *E. coli* og *Serratia* spp. kan overføre IncK plasmidet til både *E. coli* og *Serratia* spp. Det ble også vist at *E. coli* kan overføre IncI1 plasmidet til andre *E. coli*. Dette indikerer at både IncK og IncI1 plasmidet har gode forutsetninger for å kunne overføres videre til andre bakterier under forhold som kan være relevante for deler av kyllingproduksjonen. Denne oppgaven har vist at *Serratia* spp. kan være en bidragsyter i den horisontale spredningen av IncK plasmidet og til persistens av denne type plasmider i miljøer der denne bakterien forekommer i kyllingproduksjonen.

I tillegg til en økt forståelse for hvilke bakteriearter som kan operere som vert og donor av IncK og IncI1 plasmider, vil det også være av interesse å se på i hvilken grad oppnådde transkonjuganter klarer å opprettholde resistensplasmidene i fravær av seleksjonspress under betingelser relevante for kyllingproduksjonen. Dette vil øke kunnskapen om hvorfor og hvordan IncK og IncI1 plasmider persisterer i den norske kyllingproduksjonen uten seleksjonspress fra antibiotikabruk.

## 5. LITTERATURLISTE

- Agersø, Y., Jensen, J. D., Hasman, H. & Pedersen, K. (2014). Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* clones and plasmids from parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11 (9): 740-746.
- Alonso, G., Baptista, K., Ngo, T. & Taylor, D. E. (2005). Transcriptional organization of the temperature-sensitive transfer system from the IncHI1 plasmid R27. *Microbiology*, 151 (11): 3563-3573.
- Animalia. (2016). *Fortsatt nedgang i forekomst av resistente bakterier hos fjørfe*. Animalia.no. Tilgjengelig fra: <http://animalia.no/Listesider/Aktuelt-og-fagstoff/Fortsatt-nedgang-i-forekomst-av-resistente-bakterier-hos-fjorfe/> (lest 11.04.2016).
- Bauernfeind, A., Schweighart, S. & Chong, Y. (1989). Extended broad spectrum  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection*, 17 (5): 316-321.
- Beloin, C., Roux, A. & Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* Biofilms. I: Romeo, T. (red.) Current Topics in Microbiology and Immunology, b. 322 *Bacterial Biofilms*, s. 249-289: Springer Berlin Heidelberg.
- Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A. & Blanco, J. (1997). Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (8): 2184-2185.
- Brolund, A. (2014). Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. *Infect Ecol Epidemiol*, 4.
- Bush, K. (2013). The ABCD's of  $\beta$ -lactamase nomenclature. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19 (4): 549-559.
- Börjesson, S., Jernberg, C., Brolund, A., Edquist, P., Finn, M., Landén, A., Olsson-Liljequist, B., Tegmark Wisell, K., Bengtsson, B. & Englund, S. (2013). Characterization of plasmid-mediated AmpC-producing *E. coli* from Swedish broilers and association with human clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 19 (7): E309-E311.
- Cai, J. C., Zhou, H. W., Zhang, R. & Chen, G.-X. (2008). Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (6): 2014-2018.
- Capita, R. & Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53 (1): 11-48.

- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A. & Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (4): 1268-1280.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L. & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63 (3): 219-28.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (6): 2227-38.
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J.-L., Ferroni, A., Gutmann, L. & Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, 44 (1): 104-109.
- Cejas, D., Fernandez Canigia, L., Quinteros, M., Giovanakis, M., Vay, C., Lascialandare, S., Mutti, D., Pagniez, G., Almuzara, M. & Gutkind, G. (2012). Plasmid-encoded AmpC (pAmpC) in *Enterobacteriaceae*: epidemiology of microorganisms and resistance markers. *Revista Argentina de Microbiología*, 44 (3): 182-186.
- Chmielewski, R. A. N. & Frank, J. F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2 (1): 22-32.
- Christensen, B. B., Sternberg, C., Andersen, J. B., Eberl, L., Møller, S., Givskov, M. & Molin, S. (1998). Establishment of New Genetic Traits in a Microbial Biofilm Community. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (6): 2247-2255.
- Christie, P. J. (2001). Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular Microbiology*, 40 (2): 294-305.
- Dahlberg, C., Bergström, M. & Hermansson, M. (1998). In situ detection of high levels of horizontal plasmid transfer in marine bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (7): 2670-2675.
- Davey, M. E. & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4): 847-867.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2 (2): 114-122.
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74 (3): 417-433.
- Dhillon, R. H.-P. & Clark, J. (2011). ESBLs: a clear and present danger? *Critical Care Research and Practice*, 2012.



- Dierikx, C., van der Goot, J., Fabri, T., van Essen-Zandbergen, A., Smith, H. & Mevius, D. (2013a). Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68 (1): 60-67.
- Dierikx, C., van der Goot, J. A., Smith, H. E., Kant, A. & Mevius, D. J. (2013b). Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PLoS ONE*, 8 (11): e79005.
- Doi, Y., Paterson, D. L., Egea, P., Pascual, A., López-Cerero, L., Navarro, M. D., Adams-Haduch, J. M., Qureshi, Z. A., Sidjabat, H. E. & Rodríguez-Baño, J. (2010). Extended-spectrum and CMY-type  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (1): 33-38.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9).
- Doumith, M., Day, M. J., Hope, R., Wain, J. & Woodford, N. (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (9): 3108-10.
- Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2): 155-166.
- EFSA. (2008). Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. . The EFSA Journal 141:1-44.
- Engelkirk, P. G. & Duben-Engelkirk, J. L. (2008). *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology*: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- EUCAST. (2015a). *Antimicrobial wild type distributions of microorganisms*. Tilgjengelig fra:
- EUCAST. (2015b). *Nalidixic Acid / Escherichia coli International MIC Distribution*. Tilgjengelig fra: <http://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?Id=2480> (lest 14.12.2015).
- EUCAST. (2016). *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. 6.0, 2016 utg. Tilgjengelig fra: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_6.0\\_Breakpoint\\_table.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf) (lest 28.04.2016).
- Fernandez-Astorga, A., Muela, A., Cisterna, R., Iriberry, J. & Barcina, I. (1992). Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (1): 392-398.
- Gauthier, M. J., Cauvin, F. & Breittmayer, J.-P. (1985). Influence of salts and temperature on the transfer of mercury resistance from a marine pseudomonad to *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (1): 38-40.

- Ghigo, J. M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412 (6845): 442-5.
- Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. L., Canton, R. & Walsh, T. R. (2009). Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63 (1): 1-4.
- Goldwater, P. N. & Bettelheim, K. A. (2012). Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). *BMC Medicine*, 10 (1): 1-8.
- Granum, P. E., Gjerde, B., Kapperud, G., Myrmel, M., Nesbakken, T., Rørvik, L. M., Skjerve, E., Tranulis, M. & Wasteson, Y. (2014). *Matforgiftning. Næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*. Kristiansand: Høyskoleforlaget AS.
- Grimont, F. & Grimont, P. A. (2006). The genus *Serratia*. I: *The Prokaryotes*, s. 219-244: Springer.
- The guardian of public health*. (2014). Tilgjengelig fra:  
<http://content.govdelivery.com/accounts/MIDCH/bulletins/c5c13d> (lest 17.03.2016).
- Gutkind, G. O., Di Conza, J., Power, P. & Radice, M. (2013).  $\beta$ -lactamase-mediated resistance: A biochemical, epidemiological and genetic overview. *Current Pharmaceutical Design*, 19 (2): 164-208.
- Haagensen, J. A. J., Hansen, S. K., Johansen, T. & Molin, S. (2002). In situ detection of horizontal transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology*, 42 (2): 261-268.
- Hausner, M. & Wuertz, S. (1999). High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (8): 3710-3713.
- Hejazi, A. & Falkiner, F. R. (1997). *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*, 46 (11): 903-912.
- Händel, N., Otte, S., Jonker, M., Brul, S. & ter Kuile, B. H. (2015). Factors that affect transfer of the IncI1 beta-lactam resistance plasmid pESBL-283 between *E. coli* strains. *PLoS ONE*, 10 (4): e0123039.
- Ito, H., Arakawa, Y., Ohsuka, S., Wacharotayankun, R., Kato, N. & Ohta, M. (1995). Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (4): 824-829.
- Jackson, D. W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J. W., Hart, M. E. & Romeo, T. (2002). Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184 (1): 290-301.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (1): 161-182.
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236 (2): 163-73.

- Johnson, T. J. & Nolan, L. K. (2009a). Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73 (4): 750-774.
- Johnson, T. J. & Nolan, L. K. (2009b). Plasmid replicon typing. *Methods in Molecular Biology*, 551: 27-35.
- Koraimann, G. & Wagner, M. A. (2014). Social behavior and decision making in bacterial conjugation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4: 54.
- Krol, J. E., Nguyen, H. D., Rogers, L. M., Beyenal, H., Krone, S. M. & Top, E. M. (2011). Increased transfer of a multidrug resistance plasmid in *Escherichia coli* biofilms at the air-liquid interface. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (15): 5079-88.
- Król, J. E., Wojtowicz, A. J., Rogers, L. M., Heuer, H., Smalla, K., Krone, S. M. & Top, E. M. (2013). Invasion of *E. coli* biofilms by antibiotic resistance plasmids. *Plasmid*, 70 (1): 110-119.
- Kruse, H. & Sørum, H. (1994). Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (11): 4015-4021.
- Langsrud, S., Møretrø, T. & Sundheim, G. (2003). Characterization of *Serratia marcescens* surviving in disinfecting footbaths. *Journal of Applied Microbiology*, 95 (1): 186-195.
- Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., Käsbohrer, A., Kreienbrock, L. & Roesler, U. (2013). Longitudinal Monitoring of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase/AmpC-Producing *Escherichia coli* at German Broiler Chicken Fattening Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (16): 4815-4820.
- Marrie, T. J. & Costerton, J. W. (1981). Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Applied and Environmental Microbiology*, 42 (6): 1093-1102.
- Mathur, S. & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105 (3): 281-295.
- Mendez, F., Mendoza, M. C., Llana, J. & Hardisson, C. (1982). Transfer of drug-resistance plasmids by conjugation from nosocomial strains of *Serratia marcescens* to *Escherichia coli* in biological fluids of human origin. *Journal of Hospital Infection*, 3 (3): 285IN4291-290292.
- Mo, S. S., Norström, M., Slettemeås, J. S., Løvland, A., Urdahl, A. M. & Sunde, M. (2014). Emergence of AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production chain in a country with a low antimicrobial usage profile. *Veterinary Microbiology*, 171 (3–4): 315-320.
- Mo, S. S. (2016). *Personlig kommunikasjon med PhD student Solveig Sølverød Mo*. Oslo (05.04.2016).
- Mo, S. S., Slettemeås, J. S., Berg, E. S., Norstrom, M. & Sunde, M. (2016). Plasmid and Host Strain Characteristics of *Escherichia coli* Resistant to Extended-Spectrum Cephalosporins in the Norwegian Broiler Production. *PLoS ONE*, 11 (4): e0154019.

- Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (3): 255-261.
- Nesse, L. L., Sekse, C., Berg, K., Johannesen, K. C., Solheim, H., Vestby, L. K. & Urdahl, A. M. (2014). Potentially pathogenic *Escherichia coli* can form a biofilm under conditions relevant to the food production chain. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (7): 2042-9.
- Nilsson, O., Börjesson, S., Landén, A. & Bengtsson, B. (2014). Vertical transmission of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated AmpC (pAmpC) through the broiler production pyramid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69 (6): 1497-1500.
- NORM/NORM-VET 2006. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. (2007). Tromsø / Oslo
- NORM/NORM-VET 2014. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. (2015). Tromsø/Oslo.
- Norman, A., Hansen, L. H. & Sørensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364 (1527): 2275-2289.
- Nortura. (2016). *Fjørfehold i Norge*. Tilgjengelig fra: <http://www.nortura.no/naturlig-kvalitet-fra-norske-bonder/kyllinghold/> (lest 10.04.2016).
- Parment, P. A., Rønnerstam, R. & Walder, M. (1986). Persistence of *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens* and *E. coli* in solutions for contact lenses. *Acta Ophthalmologica*, 64 (4): 456-462.
- Pfeifer, Y. (2010). ESBL, AmpC and carbapenemases: emergence, dissemination and diagnostics of beta-lactamase-producing Gram-negative pathogens. *Laboratoriumsmedizin-Journal of Laboratory Medicine*, 34 (4): 205-215.
- Philippon, A., Arlet, G. & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (1): 1-11.
- Pitout, J. D. & Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 8 (3): 159-166.
- Refsum, T. (2015). *Antibiotikabehandling i norsk fjørfeproduksjon. Go' mørning*. Tilgjengelig fra: <http://www.animalia.no/upload/Filer%20til%20nedlasting/Go%20mørning/2015/GM%204-15%20web.pdf> (lest 05.05.2016).
- Rice, S., Koh, K., Queck, S., Labbate, M., Lam, K. & Kjelleberg, S. (2005). Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *Journal of Bacteriology*, 187 (10): 3477-3485.

- Richaume, A., Angle, J. S. & Sadowsky, M. J. (1989). Influence of soil variables on in situ plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Rhizobium fredii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (7): 1730-1734.
- Schmidt, G. V., Møllerup, A., Christiansen, L. E., Stahl, M., Olsen, J. E. & Angen, O. (2015). Sampling and Pooling Methods for Capturing Herd Level Antibiotic Resistance in Swine Feces using qPCR and CFU Approaches. *PLoS ONE*, 10 (6): e0131672.
- Seiffert, S. N., Tinguely, R., Lupo, A., Neuwirth, C., Perreten, V. & Endimiani, A. (2013). High prevalence of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* in poultry meat in Switzerland: emergence of CMY-2-and VEB-6-possessing *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57 (12): 6406-6408.
- Seoane, J., Yankelevich, T., Dechesne, A., Merkey, B., Sternberg, C. & Smets, B. F. (2011). An individual-based approach to explain plasmid invasion in bacterial populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 75 (1): 17-27.
- Shi, X. & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20 (9): 407-413.
- Sidjabat, H. E., Seah, K. Y., Coleman, L., Sartor, A., Derrington, P., Heney, C., Faoagali, J., Nimmo, G. R. & Paterson, D. L. (2014). Expansive spread of IncI1 plasmids carrying blaCMY-2 amongst *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44 (3): 203-8.
- Smith, K. E., Wilker, P. R., Reiter, P. L., Hedican, E. B., Bender, J. B. & Hedberg, C. W. (2012). Antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157 infection and the risk of hemolytic uremic syndrome, Minnesota. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 31 (1): 37-41.
- Solheim, H., Sekse, C., Urdahl, A., Wasteson, Y. & Nesse, L. (2013). Biofilm as an environment for dissemination of stx genes by transduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (3): 896-900.
- Srey, S., Jahid, I. K. & Ha, S.-D. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, 31 (2): 572-585.
- Steinbakk, M., Sunde, M., Urdal, A. M., Barkbu, K. N., Sørum, H., Lunestad, B.-T., Bonhorst, J. Ø., Nielsen, K. M., Lindbæk, M. & Bjørnholt, J. V. (2014). Antibiotikaresistens - kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak. Tilgjengelig fra: <http://www.fhi.no/dokumenter/35ed0e4c20.pdf> (lest 10.04.2016).
- Stock, I., Grueger, T. & Wiedemann, B. (2003). Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens* sensu stricto, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22 (1): 35-47.
- Sunde, M. & Sørum, H. (2001). Self-transmissible multidrug resistance plasmids in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of healthy swine. *Microbial Drug Resistance*, 7 (2): 191-196.

- Sunde, M., Tharaldsen, H., Slette-meås, J. S., Norström, M., Carattoli, A. & Bjorland, J. (2009). *Escherichia coli* of animal origin in Norway contains a blaTEM-20-carrying plasmid closely related to blaTEM-20 and blaTEM-52 plasmids from other European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63 (1): 215-216.
- Sunde, M., Simonsen, G. S., Slette-meås, J. S., Böckerman, I. & Norström, M. (2015). Integron, Plasmid and Host Strain Characteristics of *Escherichia coli* from Humans and Food Included in the Norwegian Antimicrobial Resistance Monitoring Programs. *PLoS ONE*, 10 (6): e0128797.
- Säde, E., Murros, A. & Björkroth, J. (2013). Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. *Food Microbiology*, 34 (2): 252-258.
- Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N. & Wuertz, S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature Reviews Microbiology*, 3 (9): 700-710.
- Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3 (9): 711-721.
- Thomson, K. S. (2001). Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerging Infectious Diseases*, 7 (2): 333-6.
- Tracz, D. M., Boyd, D. A., Hizon, R., Bryce, E., McGeer, A., Ofner-Agostini, M., Simor, A. E., Paton, S. & Mulvey, M. R. (2007). ampC gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 270 (2): 265-271.
- Turtura, G. C., Massa, S. & Ghazvinizadeh, H. (1990). Antibiotic resistance among coliform bacteria isolated from carcasses of commercially slaughtered chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 11 (3): 351-354.
- Unterholzner, S. J., Poppenberger, B. & Rozhon, W. (2013). Toxin-antitoxin systems. *Mobile Genetic Elements*, 3 (5): e26219.
- Van Houdt, R. & Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109 (4): 1117-1131.
- Van Meervenne, E., De Weirdt, R., Van Coillie, E., Devlieghere, F., Herman, L. & Boon, N. (2014). Biofilm models for the food industry: hot spots for plasmid transfer? *Pathogens and Disease*, 70 (3): 332-338.
- Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Van Weyenberg, S., Boon, N., Herman, L. & Devlieghere, F. (2015). Low Temperature and Modified Atmosphere: Hurdles for Antibiotic Resistance Transfer? *Journal of Food Protection*®, 78 (12): 2191-2199.
- Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaezen, M.-A., Van Huffel, X., Imberechts, H. & Dierick, K. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10 (7): 2643-2669.

- Veterinærinstituttet. (2009). *Bakterier, resistensbestemmelse - MIC ved Sensititre TREK*. Oslo: Seksjon for bakteriologi, fisk og dyr. 5 s.
- Veterinærinstituttet. (2013a). *blaCMY-2 Real-time PCR*. Oslo: Seksjon for bakteriologi, fisk og dyr. 1 s.
- Veterinærinstituttet. (2013b). *Multiplex PCR for inndeling av Escherichia coli i de fylogenetiske gruppene A, B1, B2 og D*. Oslo: Seksjon for bakteriologi, fisk og dyr. 4 s.
- Veterinærinstituttet. (2014). *Identifikasjon av bakterier og sopp med MALDI Biotyper (MALDI-TOF)*. Oslo: Seksjon for bakteriologi, fisk og dyr. 5 s.
- VKM. (2015). Assessment of antimicrobial resistance in the food chains in Norway. Scientific Opinion of the Panel on microbiological hazards of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. Oslo, Norway.
- Voets, G. M., Fluit, A. C., Scharringa, J., Schapendonk, C., van den Munckhof, T., Leverstein-van Hall, M. A. & Stuart, J. C. (2013). Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes and plasmid types in *E. coli* isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 167 (3): 359-362.
- White-Ziegler, C. A., Um, S., Pérez, N. M., Berns, A. L., Malhowski, A. J. & Young, S. (2008). Low temperature (23 °C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, 154 (1): 148-166.
- WHO. (2015). *Antibiotic resistance* Tilgjengelig fra: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/> (lest 08.04.2016).
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J. & Prescott, L. M. (2012). *Prescott's principles of microbiology*. New York: McGraw-Hill.
- Willinghan, E. M., Sander, J. E., Thayer, S. G. & Wilson, J. L. (1996). Investigation of bacterial resistance to hatchery disinfectants. *Avian Diseases*: 510-515.
- Zhang, R., Zhou, H. W., Cai, J. C. & Chen, G.-X. (2007). Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from Hangzhou, China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (3): 574-576.
- Zhao, W.-H. & Hu, Z.-Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39 (1): 79-101.

## VEDLEGG 1

Tabell 20. Test av selektive medier for differensiering av donor og resipientstammer. De tre donorstammene er listet opp øverst i tabellen og er merket med hvilket plasmid de innehar. Resterende bakteriestammer er resipienter. Vekst av bakteriestamme på de ulike agarskålene er angitt med farge mediet ga koloniene, eller som vekst (+) eller ikke vekst (-). IU = ikke utført.

Bakteriestamme	Mac Conkey	VRBA	VRBGA	Brilliance™ <i>E. coli</i> / coliform medium	CFC	TSA tilsatt 16 mg/L Rif <sup>1</sup>	MH tilsatt 0,5 mg/L Ctx <sup>2</sup>	MH tilsatt 1,0 mg/L Ctx
<i>E. coli</i> 1292, IncK	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	+	-	+	IU
<i>E. coli</i> 2798, IncII	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	+	-	+	IU
<i>E. coli</i> 1043, IncK	Rosa	Rosa	Lillarosa	Lilla	+	-	+	IU
<i>E. coli</i> 1553	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 6154	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 706	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 7079	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 3460-5	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 6927-5	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 1173	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 1268	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 1450	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 1667	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 2362	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 4922	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 5792	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 3064-2	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
<i>E. coli</i> 4064-1	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
EHEC 2892	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
EHEC 3574	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	+	-	IU
EHEC 3381	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
EHEC 3375	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
EHEC 3566	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	+	-	IU
<i>E. coli</i> 3194	Rosa	Rosa	Lillarosa	Mørk lilla	-	-	-	IU
EHEC 3578	IU	IU	IU	IU	IU	+	-	IU
<i>E. coli</i> TRMGcsrA	Rosa	Rosa	Lillarosa	Lilla	-	IU	-	IU
<i>S. marcescens</i> 2602	Mørk rosa	Mørk rosa	Mørk rosa	Mørk rosa/lilla	+	+	-	-
<i>S. marcescens</i> 3308	-	Rosa	-	Lilla	-	+	+	-
<i>S. marcescens</i> 3304	Gulrosa	Gulrosa	Lillagul	Hvit/ svakt lilla	+	+	+	-
<i>S. marcescens</i> 3309	-	-	Lilla	Hvit/ svakt lilla	+	-	+	-
<i>S. marcescens</i> 3298	Rosa	Lys rosa	Lillagul	Lys lilla/rosa	+	+	+	-
<i>S. marcescens</i> 3299	Rosa	Lys rosa	Lillagul	Lys lilla/rosa	+	+	+	-
<i>S. marcescens</i> 3300	Rosa	Lys rosa	Lillagul	Lys lilla/rosa	+	+	-	-
<i>S. marcescens</i> 2336	Rosa	Lys rosa	Lillagul	Lys lilla/rosa	+	+	-	-
<i>S. marcescens</i> 3306	Rosa	Lys rosa	Lillagul	Lys lilla/rosa	+	+	-	-
<i>S. marcescens</i> 3301	Lys rosa	Lys rosa	Lillagul	Lys lilla/rosa	+	+	-	-
<i>S. marcescens</i> 3307	Rosa	Lys rosa	Lillagul	Lys lilla/rosa	+	+	-	-
<i>S. marcescens</i> 3302	Rosa	Lys rosa	Lillagul	Lys lilla/rosa	+	+	-	-
<i>S. marcescens</i> 3303	Lys rosa	Lys rosa	Lillagul	Lys lilla/rosa	+	+	+	-
<i>S. marcescens</i> 3305	Lys rosa	Lys rosa	Lillagul	Hvit/ svakt lilla	+	+	+	-



<i>S. marcescens</i> 3297	Lys rosa	Lys rosa	Lillagul	Hvit/ svakt lilla	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp. 3612	Lys rosa	Lys rosa	Lillagul	Lys lilla/rosa	+	+	+	-
<i>S. liquefaciens</i> 5676	Lys rosa	Lys rosa	Lillagul	Lys lilla/rosa	+	-	-	-
<i>S. proteamaculans</i> 5682	Lys rosa	Lys rosa	Lillagul	Lys lilla/rosa	+	+	+	-
<i>S. proteamaculans</i> 5685	Lys rosa	Lys rosa	Lillagul	Lys lilla/rosa	+	-	-	-

<sup>1</sup> Rifampicin

<sup>2</sup> Cefotaksim

## VEDLEGG 2

Tabell 21. Evnen til å danne biofilm på stålkupong eller glass inkubert i LB-buljong uten 1% NaCl.

Stålkupong eller glassrør ble inkubert ved 12°C i fem dager eller ved 25°C i tre dager. Ingen synlig dannelse av biofilm fikk tallverdien null (0), mens dannelse av biofilm ble gradert fra 1-3, fra svak til en god biofilm.

\*= utført på stålkupong.

Donor/resipient	Bakteriestamme	12°C	25°C
<i>Donor</i>	<i>E. coli</i> 1292, <i>IncK</i>	2 *	3 *
<i>Donor</i>	<i>E. coli</i> 2798, <i>IncII</i>	0	2
<i>Donor</i>	<i>E. coli</i> 1043, <i>IncK</i>	0	3
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 1553	1 *	1 *
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 6154	1	2
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 706	1	2
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 7079	2	2
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 3460-5	2 *	2 *
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 6927-5	2	2
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 1173	2	2
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 1268	3	2
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 1450	2	3
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 1667	2	3
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 2362	2	2
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 4922	2	3
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 5792	1	3
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 3064-2	2	3
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 4064-1	3	3
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> TRMGcsrA	0	3
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 2892	0	3
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 3574	0	2
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 3381	0	3
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 3375	0	3
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 3566	0	3
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 3194	0	3
<i>Resipient</i>	<i>E. coli</i> 3578	0	2
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 2602	2 *	1 *
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 3308	2 *	1 *
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 3304	2	2
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 3309	1	2
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 3298	2	3
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 3299	3	3
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 3300	2	3
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 2336	2	3
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 3306	2	2
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 3301	2	3
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 3307	2	2
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 3302	2	3
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 3303	2	2
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 3305	1	2
<i>Resipient</i>	<i>S. marcescens</i> 3297	1	3
<i>Resipient</i>	<i>Serratia</i> sp. 3612	3	3
<i>Resipient</i>	<i>S. liquefaciens</i> 5676	3	2
<i>Resipient</i>	<i>S. proteamaculans</i> 5682	2	1
<i>Resipient</i>	<i>S. proteamaculans</i> 5685	2	2

### VEDLEGG 3

Tabell 22. Kartlegging av evne til å være resipient med *E. coli* og *Serratia* spp. som donor av IncK og/eller IncI1 plasmid. Vekst av transkonjuganter er angitt i tabellen med + og ingen vekst av transkonjuganter er angitt med -. IU = ikke utført.

Recipientstamme	Donorstamme					
	<i>E. coli</i> 1292, IncK	<i>E. coli</i> 2798, IncI1	<i>E. coli</i> 1043, IncK	<i>S. marcescens</i> TK <sup>1</sup> 3306, IncK	<i>S. marcescens</i> TK 3307, IncK	<i>S. proteamaculans</i> TK 5685, IncK
<i>E. coli</i> 1553	-	-	-	IU	IU	IU
<i>E. coli</i> 6154	-	+	-	IU	IU	IU
<i>E. coli</i> 706	-	+	-	IU	IU	IU
<i>E. coli</i> 7079	-	-	-	IU	IU	IU
<i>E. coli</i> 3460-5	-	+	-	IU	IU	IU
<i>E. coli</i> 6927-5	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 1173	-	+	-	IU	IU	IU
<i>E. coli</i> 1268	+	+	+	-	+	+
<i>E. coli</i> 1450	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 1667	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 2362	-	+	+	IU	IU	IU
<i>E. coli</i> 4922	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 5792	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 3064-2	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 4064-1	-	+	-	IU	IU	IU
EHEC 3574	+	+	+	IU	IU	IU
EHEC 3566	+	+	+	IU	IU	IU
<i>E. coli</i> 3194	+	+	+	IU	IU	IU
EHEC 3578	- <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	IU	IU	IU
<i>S. marcescens</i> 2602	-	-	-	IU	IU	-
<i>S. marcescens</i> 3308	-	-	-	IU	IU	-
<i>S. marcescens</i> 3304	-	-	-	IU	IU	-
<i>S. marcescens</i> 3309	+	-	+	+	+	-
<i>S. marcescens</i> 3298	-	-	-	IU	IU	-
<i>S. marcescens</i> 3299	-	-	-	IU	IU	-
<i>S. marcescens</i> 3300	-	-	-	IU	IU	-
<i>S. marcescens</i> 2336	-	-	-	IU	IU	-
<i>S. marcescens</i> 3306	+	-	+	IU	IU	-
<i>S. marcescens</i> 3301	-	-	-	IU	IU	-
<i>S. marcescens</i> 3307	+	-	+	IU	IU	+
<i>S. marcescens</i> 3302	-	-	-	IU	IU	-
<i>S. marcescens</i> 3303	-	-	-	IU	IU	-
<i>S. marcescens</i> 3305	-	-	-	IU	IU	-
<i>S. marcescens</i> 3297	-	-	-	IU	IU	IU
<i>Serratia</i> sp. 3612	-	-	-	IU	IU	IU
<i>S. liquefaciens</i> 5676	-	-	-	-	-	-
<i>S. proteamaculans</i> 5682	-	-	-	IU	IU	IU
<i>S. proteamaculans</i> 5685	+	-	+	+	+	IU

<sup>1</sup> TK = transkonjugant

<sup>2</sup> Ikke verifisert med PCR



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway