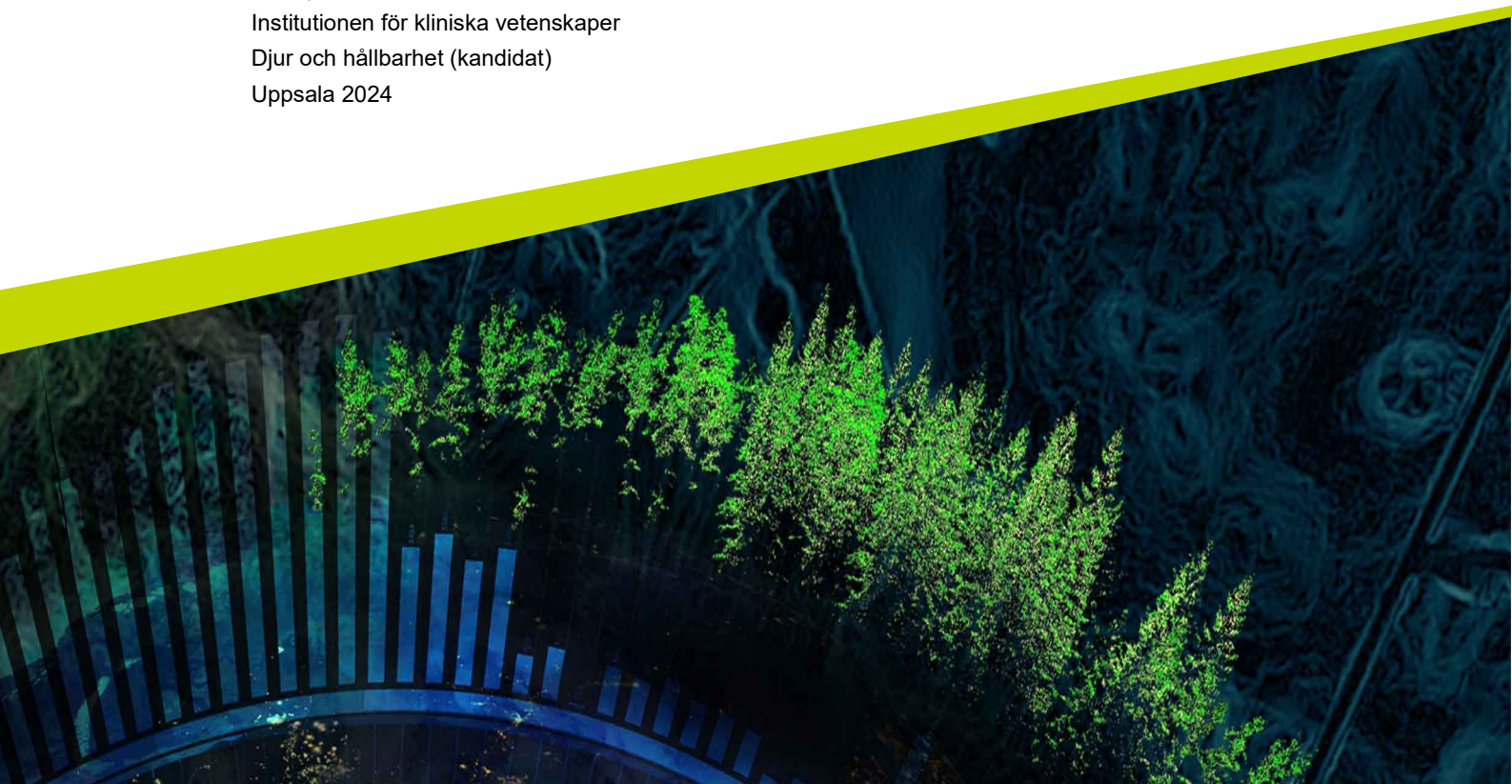




Resistensundersökning av bakterier isolerade från tjursperma

Alva Gustafsson

Självständigt arbete • 15 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Institutionen för kliniska vetenskaper
Djur och hållbarhet (kandidat)
Uppsala 2024



Resistensundersökning av bakterier isolerade från tjursperma

Antimicrobial resistance test of bacteria isolated from bull semen

Alva Gustafsson

Handledare: Aleksandar Cojkic, Sveriges lantbruksuniversitet, Kliniska vetenskaper

Bitr. handledare: Ingrid Hansson, Sveriges lantbruksuniversitet, Husdjurens biovetenskaper

Examinator: Jane M. Morrell, Sveriges lantbruksuniversitet, Kliniska vetenskaper

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i Husdjursvetenskap

Kurskod: EX0865

Program/utbildning: Djur och hållbarhet (kandidat)

Kursansvarig inst.: Institutionen för tillämpad husdjursvetenskap och välfärd

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2024

Upphovsrätt: Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.

Nyckelord: Antibiotika, tjurar, sperma, resistens

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

Sammanfattning

Antimikrobiell resistens är en växande global hälsorisk, delvis orsakad av icke-terapeutisk användning av antibiotika, inklusive tillsatsen av antimikrobiella medel i semindoserna av tjursperma. Denna studie syftar till att undersöka antimikrobiell resistens hos bakterier isolerade från tjursperma, med särskilt fokus på de antibiotika som rekommenderas i EU:s lagstiftning för tjursperma i den internationella handeln. Totalt resistensundersöktes 40 bakteriestammar från fyra bakteriearter: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Corynebacterium xerosis* och *Proteus mirabilis* med hjälp av dilutionsmetoden med vilken den minsta hämmande koncentrationen av antibiotika kunde bestämmas. Resistensundersökningen visade att flera isolat uppvisade fenotypisk resistens mot specifika antibiotika. När det gäller *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* och *Corynebacterium xerosis* var 90%, 20% respektive 30% av isolaten resistent mot klindamycin, som är vanligt använt i veterinärmedicin. Samtliga stammar av *Proteus mirabilis* var känsliga för gentamicin som är vanligt förekommande i semindoser. Resultaten från denna studie understryker behovet av ytterligare forskning för att förstå effekterna av antibiotika i semindoser och betonar vikten av att noggrant övervaka användningen av antibiotika i semindoser för att skydda både djur och folkhälsan.

Nyckelord: Antibiotika, tjurar, sperma, resistens

Abstract

Antimicrobial resistance is a growing global health risk, partly caused by non-therapeutic use of antibiotics, including the addition of antimicrobial agents in the semen extenders. This study aims to investigate antimicrobial resistance in bacteria isolated from bull semen, with a particular focus on the antibiotics recommended in EU legislation for semen for international trade. A total of 40 bacterial strains from four species: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Corynebacterium xerosis* and *Proteus mirabilis* was tested for resistance using the microdilution method, which determined the minimum inhibitory concentration of antibiotics. The resistance investigation revealed that several isolates exhibited phenotypic resistance to specific antibiotics. Thus, resistance to clindamycin, which is commonly used in veterinary medicine, was seen in 90%, 20% and 30% of isolates of *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* and *Corynebacterium xerosis* respectively. However, all isolates of *Proteus mirabilis* were susceptible to gentamicin, commonly added to semen extender. The results of this study underscore the need for further research to understand the effects of antibiotics on bacteria in semen extender and emphasise the importance of closely monitoring the

use of antibiotics in semen extenders to protect both animal and public health.
Keywords: Antibiotics, bulls, semen, resistance

Innehåll

Figurförteckning	6
Tabellförteckning	7
Förkortningar	8
1. Introduktion	9
1.1 Syfte	10
1.2 Hypotes	11
2. Material och metod	12
2.1 Studiepopulation	12
2.2 Material	12
2.3 Renodling och bakterieidentifiering	12
2.4 Resistensundersökning	13
3. Resultat	15
4. Diskussion	20
4.1 Slutsats	22
Referenser	23
Tack	27

Figurförteckning

Figur 1. Avläsning av mikrotiterplatta	14
--	----

Tabellförteckning

<i>Tabell 1 Minst hämmande koncentration (MIC) (mg/L) för 10 isolat av Bacillus licheniformis</i>	16
<i>Tabell 2 Minst hämmande koncentration (MIC) (mg/L) för 10 isolat av Bacillus pumilus</i> .	17
<i>Tabell 3 Minst hämmande koncentration (MIC) (mg/L) för 10 isolat av Corynebacterium xerosis</i>	18
<i>Tabell 4 Minst hämmande koncentration (MIC) (mg/L) för 10 isolaten av Proteus mirabilis</i>	19

Förkortningar

AMR	Antimikrobiell resistens
EU	Europeiska unionen
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry
MIC	Minst hämmande koncentration
SLC	Enkelskiftscentrifugering

1. Introduktion

Antimikrobiell resistens (AMR) är ett växande globalt problem och är en av nutidens främsta hälsorisker (WHO 2021). Det aktuella problemet beror delvis på grund av den icke-terapeutiska användningen av antibiotika, som sker inom sjukvården men även inom veterinärmedicinen och jordbruket (Llor & Bjerrum 2014). Ett exempel på detta inom veterinärmedicin är tillsatsen av antimikrobiella medel i spädningssväska i semindoser av tjursperma.

I semidoserna finns en risk för att oönskade bakterier, vilka ingår i den normala bakteriefloran i tjurarnas könsorgan kontaminerar sperman, vilket påverkar fertiliteten negativt (Cojkic et al. 2021). Bakteriekontaminering kan även ske från människor som jobbar med tjurar i samband med spermainsamlingen och från laboratorieutrustning (Sannat et al. 2015). Bakterier kan orsaka reproduktionssjukdomar och sänkt spermakvalitet (Morrell et al. 2022) eftersom bakterierna kan konkurrera med spermerna om näringsresurser och avge metaboliska biprodukter, såsom toxiner som direkt kan orsaka skador på spermerna (Althouse 2008). González-Marín et al. (2011) påvisade ett ökande bakterieantal och en snabbare bakterietillväxt i sperman kan orsaka skador på spermernas DNA, vilket kan påverka äggens kvalitet och senare befruktning (Givens & Marley 2008). För att motverka dessa risker tillsätts antibiotika till spädningssväsken i semidoserna.

Europeiska unionens (EU) direktiv reglerar användningen av antibiotika i spädningssväsken och i samband med export av tjursperma inom EU krävs enligt Kommissionens delegerade förordning (EU) 2021/880 (u.å) tillsats av antibiotika som ska verka effektivt mot framför allt *Campylobakter*, *Leptospira* och *Mycoplasma*. När antibiotika används, i små doser för ändamål som inte är terapeutiska, finns det en risk för ökad AMR. Under de senaste åren har det skett en ökning av resistens hos bakterier som förekommer i tjursperma mot en mängd olika antimikrobiella medel som tillsätts i spädningssväsken (Schulze et al. 2020). Kilburn et al. (2013) undersökte resistens hos bakterier isolerade från tjursperma och resultatet visade att vissa bakterier var resistenta mot flera olika antibiotika. I en annan studie fann Malaluang et al. (2023) att tillsatsen av antibiotika i sperman

även medför en potentiell risk för att bakterier i vagina hos mottagande ston också kan utveckla resistens.

Med ökande AMR blir det alltmer nödvändigt att undersöka och utvärdera olika alternativ till antibiotikan i spädningssvetskan. Detta har specifikt uppmärksammats inom andrologin och olika alternativ har diskuterats ingående av Morrell & Wallgren (2014). En framstående metod är fysisk avlägsnande av bakterier med hjälp av enkelskiftscentrifugering (SLC), som ett adekvat alternativ till användningen av antimikrobiella medel eftersom flera bakterier har kunnat avlägsnas helt med hjälp av SLC. I studien av Cojkic et al. (2024) isolerades sperma från tio olika tjurar, och *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Corynebacterium xerosis* och *Proteus mirabilis* kunde inte påvisas vid konventionell bakterieodling efter SLC behandling. Dessa bakterier är vanligt förekommande i olika miljöer, bland annat har *Bacillus licheniformis* identifierats i ensilage (Cabell 2007) och *Proteus mirabilis* är en vanligt förekommande i miljöer som kontaminerats med gödsel (Hawkey et al. 1986). Ingen av bakterierna anses vara patogener hos nötkreatur men *Bacillus licheniformis* har tidigare identifierats som en faktor bakom sena aborter hos nötkreatur (Cabell 2007).

När bakterier i tjursperma utsätts för antibiotika på ett icke terapeutiskt sätt finns en risk för utveckling av AMR. Eventuell resistensutveckling hos *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Corynebacterium xerosis* och *Proteus mirabilis* kan vara naturlig eller förvärvad resistens. Naturlig resistens innebär att en bakterie är resistent mot ett antibiotika, på grund av sina naturliga egenskaper medan förvärvad resistens innebär att en bakterie, som från början var känslig för ett visst antibiotikum, har utvecklat resistens efter exponering av antimikrobiell medel eller via överföring mellan resistensmekanismer mellan olika bakterier (*VetBact* u.å.a). I denna studie gjordes resistensundersökning av totalt 40 bakteriestammar från tio tjurar, tio olika stammar av fyra bakteriearter, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Corynebacterium xerosis* och *Proteus mirabilis*.

1.1 Syfte

Syftet med studien var att undersöka antimikrobiell resistens hos bakterier isolerade från tjursperma. De antibiotika som ingår i studien, spektinomycin, penicillin, streptomycin, gentamicin och tylosin, valdes då de tillhör de antibiotika som enligt EUs lagstiftning rekommenderas att användas i spädningssvetskan i semindoser för tjurar.

1.2 Hypotes

Hypotesen är att bakterier inom samma släkten förväntas vara resistent mot samma antimikrobiella substanser. Medan olika bakteriearter från olika genus inte förväntas ha liknande nivåer av minsta hämmande koncentrationer och inte vara resistent mot samma antibiotika.

2. Material och metod

2.1 Studiepopulation

Studien pågick under Mars till April 2024. Bakterierna i undersökningen har isolerats från spermaprover i en tidigare studie på SLU (Cojkic et al. 2024). Sperman var insamlad i Skara, Sverige från totalt tio tjurar, i åldern ett till fyra år, av raserna Holstein Friesian och svensk röd boskap. Efter bakteriell analys av spermaproverna och renodling av påvisade bakterier förvarades de i Brain Herat Infusion (BHI) med 15% glycerol i -80 °C tills resistensundersökning påbörjades

2.2 Material

Totalt användes 40 bakteriestammar från fyra bakteriearter: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilis*, *Corynebacterium xerosis* och *Proteus mirabilis*.

2.3 Renodling och bakterieidentifiering

De isolerade bakteriestammarna togs från frysen (-80 °C) och odlades på nötblodagar i $37 \pm 1^\circ\text{C}$ och 5% koldioxidmiljö i 24 timmar. Därefter genomfördes en renodling på nötblodagar från en enskild koloni som inkuberades i $37 \pm 1^\circ\text{C}$ och 5% koldioxidmiljö.

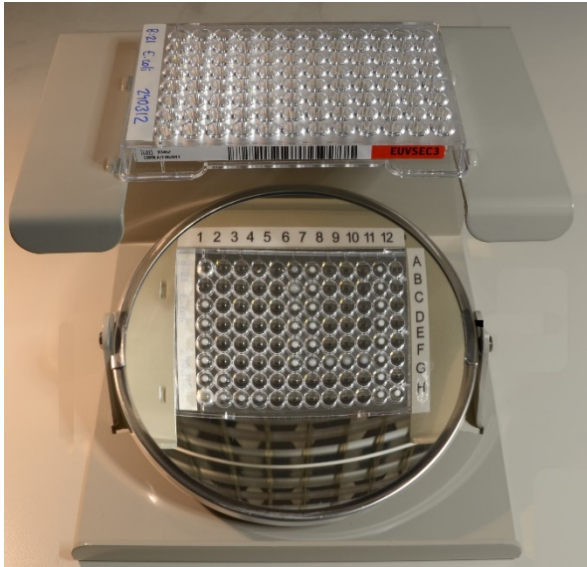
Bakterierna identifierades till artnivå med hjälp av Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Mald-systemets mjukvara använder en databas för att jämföra och poängsätta okända bakterieprover. Ett poängvärde mellan 0,000 och 1,699 indikerar ingen matchning i databasen. Värden mellan 1,700 och 1,999 tyder på att bakterien tillhör ett specifikt släkte, men inte specifik art, medan ett värde mellan 2,000 och 3,000 indikerar hög sannolikhet för korrekt identifiering på både släkte och art nivå (*VetBact* u.å.b). Om kolonierna inte identifierades vid första försöket genomfördes ett ytterligare försök.

2.4 Resistensundersökning

Resistensundersökningen genomfördes med hjälp av dilutionsmetoden där minst hämmande koncentration (MIC) av antibiotika bestäms. Metoden innebär att bakterien odlas i mikrotiterplattor med agar innehållande olika koncentrationer av antibiotika och utfördes enligt instruktioner från European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2024a). Mikrotiterplattorna som användes för renodlade bakterier var Thermo Scientific™ *Sensititre™* AVIAN1F (*Sensititre™ Avian AVIAN1F Vet AST Plate* u.å.)

Från varje renodling av respektive agarplatta togs 3-5 kolonier vilka löstes upp i 5 ml demineraliserat vatten. Suspensionen justerades till en turbiditet på 0,5 McFarland ekvivalenter. Därefter överfördes 10 µl av lösningen till 11 ml katjoniserade Müller Hinton lösning. Lösningen inokulerades i mikrotiterplattor, 50 µl i varje brunn och förseglades med en plastfilm. Mikrotiterplattorna inkuberades i $37 \pm 1^\circ\text{C}$ i 18-24 timmar. En renhetskontroll utfördes på varje prov, där varje färdig blandad lösning spreds på en nötblodagar platta och inkuberades i $37 \pm 1^\circ\text{C}$ i 24 timmar. Ett koncentrationstest utfördes för varje bakterieart där 100 µl av en färdig blandad lösning spreds på en nötblodagar platta och inkuberades i $37 \pm 1^\circ\text{C}$ i 24 timmar.

Efter inkubering kontrollerades först växt i den positiva kontrollen därefter observerades bakterietillväxt i samtliga mikrotiterbrunnar och MIC lästes av som den lägsta koncentrationen av antibiotika som hämmade synlig tillväxt (Figur 1). För att avgöra antibiotikaresistens användes epidemiologiska brytpunkten (ECOFF) värden från Breakpoint tabeller for interpretation of MICs and zone diameters (EUCAST 2024b). I de fall då ECOFF saknades för bakterie och testade antibiotika bedömdes inte känsligheten.



Figur 1. Efter inkubering avläses först tillväxtkontrollen (brunn F12, G12 och H12) för kontroll att bakterierna växt i de brunnar som inte innehåller antibiotika. Därefter avläses växt eller inte växt i de olika brunnarna med antibiotika. I den brunn med den lägsta koncentration av antibiotika där ingen växt ses vid närvaro av respektive antibiotika anges som MIC uttryckt i mg/L eller µg/ml. (Vetbact, 2024)

3. Resultat

Totalt artbestämdes och resistensundersöktes 40 bakterieisolat av fyra olika bakteriearter, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Corynebacterium xerosis* och *Proteus mirabilis*. Samtliga isolat av *Bacillus licheniformis* och *Bacillus pumilus* gick att identifiera med hjälp av MALDI-TOF MS och visade score värden mellan 1,88 och 2,23. Av de presumtiva *Corynebacterium xerosis* hade tre av tio isolat ett scorevärde större än 2,0 vid typning med MALDI-TOF MS. För resterande sju isolat föreslogs *Corynebacterium xerosis* som mest sannolikt på art nivå av MALDI-TOF MS. Alla isolat tillhörande *Proteus mirabilis* hade ett scorevärde över 2,0 vid identifiering med hjälp av MALD-TOF MS

Resultaten av resistensundersökningen av *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Corynebacterium xerosis* och *Proteus mirabilis* framgår i tabellerna (Tabell 1-4). För *Bacillus licheniformis* (Tabell 1) och *Bacillus pumilus* (Tabell 2), visade 40% respektive 30% av isolaten fenotypisk resistens mot erytromycin och 90% respektive 20% av isolaten resistens mot klindamycin. Dessutom visade 30% av isolaten av *Corynebacterium xerosis* (Tabell 3) fenotypisk resistens mot tetracyclin och 30% av isolaten fenotypisk resistens mot klindamycin. För *Proteus mirabilis* (Tabell 4) var alla isolat känslighet mot enrofloxacin, gentamicin och amoxicillin.

För resterande antibiotika kunde inte bakteriernas känslighet bestämmas eftersom inga brytpunkter, ECOFF, för resistens fanns beskrivna i EUCAST.

Tabell 1 Minst hämmande koncentration (MIC) (mg/L) för 10 isolat av *Bacillus licheniformis*. Resultaten visas som procentandelar. Vita områden anger de utspädningar som undersökts för respektive antibiotika. Gråa områden markerar intervallet som ligger bortom de spädningar som testats. MIC värden som är lika med eller mindre än den minsta testade koncentrationen redovisas som den minsta koncentrationen som testats. MIC värden som är lika med eller större än den störst testade koncentrationen redovisas som den största koncentrationen som testats. Epidemiologiska brytpunkten (ECOFF) är markerat med en fetstil svart vertikal linje.

Resistens	0,5/9,5	1/19	2/38	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	2,5	4	5	8	16	20	32	64	128	256	512	1024	
Enrofloxacin					100																	
Gentamicin							100															
Ceftiofur						50	30	20														
Neomycin									90	10												
Erytromycin	40					60		10		30												
Oxytetracyklin						70	10				20											
Tetracyklin						70	10	10			10											
Amoxicillin						90	10															
Spektinomycin													90	10								
Sulfadimetoxin																90	10					
Trimetoprim	90	10																				
Florfenikol								100														
Sulfatiazol																80	10	10				
Penicillin				40	20		10	10	20													
Streptomycin													90	10								
Novobiocin							20	10	70													
Tylosin tartrat										90		10										
Klindamycin	90						10				90											

Tabell 2 Minst hämmande koncentration (MIC) (mg/L) för 10 isolat av *Bacillus pumilus*. Resultaten visas som procentandelar. Vita områden anger de utspädningar som undersökts för respektive antibiotika. Gråa områden markerar intervallet som ligger bortom de spädningar som testats. MIC värden som är lika med eller mindre än den minsta testade koncentrationen redovisas som den minsta koncentrationen som testats. MIC värden som är lika med eller större än den störst testade koncentrationen redovisas som den största koncentrationen som testats. Epidemiologiska brytpunkten (ECOFF) är markerat med en fetstil vertikal linje.

	Resistens	0,5/9,5	1/19	2/38	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	2,5	4	5	8	16	20	32	64	128	256	512	1024
Enrofloxacin					90	10																
Gentamicin							100															
Ceftiofur						60	20	10	10													
Neomycin									90		10											
Erytromycin	30				40	30		20	10													
Oxytetracyklin						70	10				10	10										
Tetracyklin						90					10											
Amoxicillin						90									10							
Spektinomycin													50	50								
Sulfadimetoxin																70	20	10				
Trimetoprim		100																				
Florfenikol									50	20			10									
Sulfatiazol																60	10	30				
Penicillin					70				20	10												
Streptomycin														80				10		10		
Novobiocin								20	40	20		20										
Tylosin tartrat											100											
Klindamycin	20							80	10			10										

Tabell 3 Minst hämmande koncentration (MIC) (mg/L) för 10 isolat av *Corynebacterium xerosis*. Resultaten visas som procentandelar. Vita områden anger de utspädningar som undersökts för respektive antibiotika. Gråa områden markerar intervallet som ligger bortom de spädningar som testats. MIC värden som är lika med eller mindre än den minsta testade koncentrationen redovisas som den minsta koncentrationen som testats. MIC värden som är lika med eller större än den störst testade koncentrationen redovisas som den största koncentrationen som testats. Epidemiologiska brytpunkten (ECOFF) är markerat med en fetstil vertikal linje.

Resistens	0,5/9,5	1/19	2/38	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	2,5	4	8	16	20	32	64	128	256	512	1024
Enrofloxacin								60	40											
Gentamicin							100													
Ceftiofur					90	10														
Neomycin									50		10	20	10	10						
Erytromycin				30		10	10	20			30									
Oxytetracyklin							30	40	10		10	10								
Tetracyklin	30						10	40	20		10	20								
Amoxicillin						100														
Spektinomycin												80			20					
Sulfadimetoxin															20	30	50			
Trimetoprim	60		40																	
Florfenikol									90		10									
Sulfatiazol															60	10	10	20		
Penicillin				100																
Streptomycin													100							
Novobiocin								100												
Tylosin tartrat										100										
Klindamycin	30						70	30												

Tabell 4 Minst hämmande koncentration (MIC) (mg/L) för 10 isolat av *Proteus mirabilis*. Resultaten visas som procentandelar. Vita områden anger de utspädningar som undersökts för respektive antibiotika. Gråa områden markerar intervallet som ligger bortom de spädningar som testats. MIC värden som är lika med eller mindre än den minsta testade koncentrationen redovisas som den minsta koncentrationen som testats. MIC värden som är lika med eller större än den störst testade koncentrationen redovisas som den största koncentrationen som testats. Epidemiologiska brytpunkten (ECOFF) är markerat med en fetstil vertikal linje.

	Resistens	0,5/9,5	1/19	2/38	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	2,5	4	5	8	16	20	32	64	128	256	512	1024
Enrofloxacin	0					60	40			 												
Gentamicin	0							40	60	 												
Ceftiofur							100															
Neomycin									50		40		10									
Erytromycin											100											
Oxytetracyklin													100									
Tetracyklin													100									
Amoxicillin	0							90	10						 							
Spektinomycin																	80	20				
Sulfadimetoxin																	60	30	10			
Trimetoprim		100																				
Florfenikol											30		70									
Sulfatiazol																	90	10				
Penicillin									10	80				10								
Streptomycin														70	10		20					
Novobiocin												100										
Tylosin tartrat																	100					
Klindamycin												100										

4. Diskussion

Syftet med denna studie var att undersöka antimikrobiell resistens hos bakterier från tjursperma. Resultaten av resistensundersökningen visade att flera av de isolerade bakterierna uppvisade fenotypisk resistens mot vissa antibiotika. När det gäller *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* och *Corynebacterium xerosis* var 90%, 20% respektive 30% av isolaten resistent mot klindamycin. Dessutom var 40% respektive 30% av isolaten av *Bacillus licheniformis* och *Bacillus pumilus* resistent mot erytromycin. För *Corynebacterium xerosis* var 30% av isolaten resistent mot erytromycin. Å andra sidan var samtliga isolat *Proteus mirabilis* känslig för enrofloxacin, amoxicillin och gentamicin.

Undersökta bakterier klassificeras som icke patogena bakterier som förekommer i djurens miljö och få studier har genomförts för att utvärdera bakteriernas känslighet mot antibiotika som används vid tillsats i spädningssväska. Resultaten av denna studie är av betydelse för förståelsen av antibiotikaresistens inom nötkreatursreproduktion. Att isolat av *Bacillus licheniformis* och *Bacillus pumilus* uppvisade fenotypisk resistens mot klindamycin korrelerar med tidigare resistensundersökning på isolerade bakterier från tjursperma (Webb et al. 2023). Liknande händelse har observerats av Soriano et al. (1995), som fann att alla testade isolat av *Corynebacterium xerosis* uppvisade resistens mot klindamycin. Däremot kunde ingen fenotypisk resistens påvisas för *Proteus mirabilis* i denna studie, till skillnad mot andra studier som har visat att de ofta är resistent mot olika antibiotika (Hamilton et al. 2018). Att MIC värden för de olika antibiotika gentemot *Proteus mirabilis* var lägre i denna studie jämfört med andra studier kan bero på att användningen av antibiotika till nötkreatur är betydligt lägre i Sverige jämfört med länder utanför Norden (European Medicines Agency (2023), tack vare en strikt Svensk antibiotikapolitik).

Ett annat fokus i denna studie var på de antibiotika som enligt EUs lagstiftning rekommenderas att användas i spädningssväska vid semin av nötkreatur, spektinomycin, penicillin, streptomycin, gentamicin och tylosin (Kommissionens delegerande förordning (EU) 2021/880 u.å.). Gloria et al. (2014) observerade att gentamicin, tylosin, spektinomycin och linkomycin inte hämmade bakterietillväxten i tjursperma. För de flesta antibiotika gick det inte att bedöma

känsligheten då brytpunkten för känslighet vs resistens saknades, men särskilt noterbart var *Proteus mirabilis* känslighet mot gentamicin, vilket är en rekommenderad antibiotika i semindoser hos nötkreatur (Santos & Silva 2020). I en studie av Moreira et al. (2022) visades gentamicin, i kombination med andra antibiotika, vara effektivt mot oönskade bakterier i semindoser. Gentamicin bör ändå användas försiktigt på grund av risk för pådrivandet av resistensutveckling och nefrotoxicitet (Morin et al. 1980). Även om resultaten i denna studie inte visade att någon bakterie var resistent mot antibiotika som är rekommenderade att använda i spädningsvätskan till semindoserna för nötkreatur, finns det tidigare studier som undersökt detta. I en studie av Adimpong et al. (2012) var alla testade isolat av *Bacillus licheniformis* resistent mot streptomycin. Även *Corynebacterium xerosis* och *Proteus mirabilis* har påvisat resistent mot streptomycin och gentamicin, som rekommenderas till semidoser för tjursperma (Lortholary et al. 1993; Wong et al. 2013). Det är anmärkningsvärt att vissa bakterieisolat var resistent mot klindamycin, erytromycin och tetracyklin. Trots att EU inte direkt rekommenderar dessa antibiotika kan det tillsättas om de motsvarar likvärdig effekt som rekommenderade antibiotikablandningar (Kommissionens delegerande förordning (EU) 2021/880 u.å.) I flera länder är det även vanligt att man använder bredspektrum antibiotika i semindoser till nötkreatur (Bruun et al. 2003; Diana et al. 2020). Resultatet kan ses som extra viktigt för klindamycin eftersom antibiotikan används frekvent inom veterinärmedicin (Rich et al. 2005) och för tetracyklin som tidigare beskrivits som välfungerande mot grampositiva bakterier (Grossman 2016).

En svaghet i denna studie är att de epidemiologiska brytpunkterna (ECOFF) som används för att bedöma om bakterierna är känslig alternativt resistent saknas för de flesta av de testade antibiotika (EUCAST 2024b). Detta gör det svårt att bedöma bakteriernas känslighet. Isolat från alla bakterier har växt i den högst testade koncentrationen av flera olika antibiotika. Framför allt har flera isolat av *Proteus mirabilis* växt i den högst testade koncentrationen för vanliga antibiotika i semidoser till nötkreatur, såsom spektinomycin och tylosin, vilket understryker vikten av fortsatt forskning och framtagande av ECOFF. I denna studie undersöktes inte genetiska mekanismer för resistens, vilket skulle kunna ge insikt i resistensmekanismerna hos de undersökta bakterierna. Till exempel har genen *emr* som är associerad med resistens mot erytromycin tidigare rapporterats hos *Bacillus* spp, däribland för *Bacillus licheniformis* (Adimpong et al. 2012; Agersø et al. 2019).

Resultaten av resistensundersökning utgör viktiga aspekter, bakterierna i studien klassificeras som omgivningsflora och normalflora i preputitet hos tjurar och det finns begränsad forskning om dessa bakterier. *Bacillus licheniformis* har associerats

med sen abort hos nötkreatur i tidigare forskning (Cabell 2007). I en annan studie av Nieminen et al. (2007) påvisades närvaron av värmetåliga *Bacillus licheniformis* och *Bacillus pumilus* i mjölkprover från kor med subklinisk mastit, där *Bacillus pumilus* även noterades för dess toxiska effekt på sperma. Även *Corynebacterium xerosis* har påvisats i mjölkprover från kor med juverinfektioner (Gonçalves et al. 2014). *Proteus mirabilis* är en vanlig opportunist hos människor och hundar och kan orsaka både urinvägsinfektion och otit (Coker et al. 2000; Kwon et al. 2022). Trots begränsad forskning om dess påverkan på nötkreatur, har bakterien påvisats och även i urin, hos nötkreatur i Japan (Abe et al. 2017) där *Proteus mirabilis* orsakade allvarliga inflammationer i njurarna och urinblåsan hos de drabbade djuren.

Resistensutveckling hos opportunisterna och patogena bakterier är ett allvarligt hot mot djur och människor. Antibiotikatillsats i semidoser kan leda till ökad bakterieresistens för nötkreatur eftersom antibiotika i miljön kan driva på utvecklingen av resistens (Schulze et al. 2020). Tidigare studier på bakterier från tjursperma har visat resistens mot olika antibiotika (Kilburn et al. 2013) som tidigare betraktas som fördelaktiga i spädningssvetskan (Andrabi et al. 2001). I en annan studie utförd på SLU visade att antibiotika i semidoser av hingstsperma kan påverka stons bakterieflora i vagina och ge upphov till resistent bakterier. Det har även påvisats att stons vaginala bakterieresistens kan påverkas av antibiotika i semidoser (Malaluang et al. 2023). Det finns även en risk att antibiotika som används till nötkreatur utsöndras från urinen och gödsel från dessa djur, vilket i sin tur kan leda till spridning av resistent bakterier i miljön (Martinez 2009). Det indikerar att mer forskning behövs för att förstå effekterna av antibiotika i semidoser för AMR.

4.1 Slutsats

I studien av antimikrobiell resistens hos bakterier från tjursperma framkom att flera isolat visade fenotypisk resistens mot olika antibiotika, vilket har betydelse för nötkreatursproduktionen. Däremot visade *Proteus mirabilis* känslighet för flera antibiotika, inklusive gentamicin, vilket är en vanligt rekommenderad antibiotika i semidoser. Dessa resultat understryker behovet av ytterligare forskning för att förstå effekten av antibiotika i spädningssvetska för utveckling av AMR. Resultatet indikerar även att antibiotikaanvändningen i spädningssvetskan bör ses över, vilket kan ses som en nödvändighet för både djur och folkhälsan.

Referenser

- Abe, T., Iizuka, A., Kojima, H., Kimura, K., Shibahara, T. & Haritani, M. (2017). Necrotizing suppurative nephritis in a Japanese black feedlot steer due to *Proteus mirabilis* infection. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79 (4), 709–713. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0636>
- Adimpong, D.B., Sorensen, K.I., Thorsen, L., Stuer-lauridsen, B., Abdelgadir, W.S., Nielsen, D.S., Derkx, P.M.F. & Jespersen, L. (2012a). Antimicrobial Susceptibility of *Bacillus* Strains Isolated from Primary Starters for African Traditional Bread Production and Characterization of the Bacitracin Operon and Bacitracin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (22), 7903–7914. <https://doi.org/10.1128/AEM.00730-12>
- Agersø, Y., Bjerre, K., Brockmann, E., Johansen, E., Nielsen, B., Siezen, R., Stuer-Lauridsen, B., Wels, M. & Zeidan, A.A. (2019). Putative antibiotic resistance genes present in extant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome. *PloS one*, 14 (1), e0210363–e0210363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210363>
- Althouse, G. (2008). Sanitary Procedures for the Production of Extended Semen. *Reproduction In Domestic Animals*, 43 (s2), 374–378. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01187.x>
- Andrabi, S.M.H., Ahmad, N., Abbas, A. & Anzar, M. (National A.R.C. (2001). Effect of two different antibiotic combinations on fertility of frozen buffalo and Sahiwal bull semen. *Pakistan Veterinary Journal*, 21 (4)
- Bruun, J., Ersbøll, A.K. & Bennedsgaard, T.W. (2003). Antibiotic Consumption in Danish Dairy Cows – Is There a ”Standard” Treatment for Mastitis? *Acta veterinaria scandinavica*, 44 (Suppl 1), P7–P7. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-44-S1-P7>
- Cabell, E. (2007). Bovine abortion: aetiology and investigations. *In Practice*, 29 (8), 455–463. <https://doi.org/10.1136/inpract.29.8.455>
- Cojkic, A., Hansson, I., Johannisson, A., Axner, E. & Morrell, J.M. (2024). Single layer centrifugation as a method for bacterial reduction in bull semen for assisted reproduction. *Veterinary Research Communications*, 48 (1), 39–48. <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10178-y>
- Cojkic, A., Niazi, A., Guo, Y., Hallap, T., Padrik, P. & Morrell, J.M. (2021). Identification of Bull Semen Microbiome by 16S Sequencing and Possible Relationships with Fertility. *Microorganisms (Basel)*, 9 (12), 2431–. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122431>
- Coker, C., Poore, C.A., Xin LI & Mobley, H.L.T. (2000). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes and infection*, 2 (12), 1497–1505. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01304-6](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01304-6)
- Diana, A., Santinello, M., Penasa, M., Scali, F., Magni, E., Alborali, G.L., Bertocchi, L. & De Marchi, M. (2020). Use of antimicrobials in beef cattle: an observational study in the north of Italy. *Preventive veterinary medicine*, 181, 105032–105032. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105032>
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2024a). *Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method*. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_doc

- uments/2024_manuals/Manual_v_12.0_EUCAST_Disk_Test_2024.pdf [2024-04-21]
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2024b). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_14.0_Breakpoint_Tables.pdf [2024-04-22]
- European Medicines Agency (EU body or agency) (2023). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2022: trends from 2010 to 2022: thirteenth ESVAC report*. Publications Office of the European Union. <https://data.europa.eu/doi/10.2809/895656> [2024-05-14]
- Givens, M.D. & Marley, M.S.D. (2008). Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. *Theriogenology*, 70 (3), 504–507. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.033>
- Gloria, A., Contri, A., Wegher, L., Vignola, G., Dellamaria, D. & Carluccio, A. (2014). The effects of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen–thawed bull semen. *Animal reproduction science*, 150 (1–2), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.012>
- Gonçalves, J.L., Tomazi, T., Barreiro, J.R., Braga, P.A. de C., Ferreira, C.R., Araújo Junior, J.P., Eberlin, M.N. & Santos, M.V. dos (2014). Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Veterinary microbiology*, 173 (1–2), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.028>
- González-Marín, C., Roy, R., López-Fernández, C., Diez, B., Carabaño, M.J., Fernández, J.L., Kjelland, M.E., Moreno, J.F. & Gosálvez, J. (2011). Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: A kinetic experimental approach. *Animal Reproduction Science*, 123 (3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.11.014>
- Grossman, T.H. (2016). Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6 (4), a025387. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>
- Hamilton, A.L., Kamm, M.A., Ng, S.C. & Morrison, M. (2018). *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 31 (3). <https://doi.org/10.1128/cmr.00085-17>
- Hawkey, P.M., Penner, J.L., Linton, A.H., Hawkey, C.A., Crisp, L.J. & Hinton, M. (1986). Speciation, serotyping, antimicrobial sensitivity and plasmid content of *Proteaceae* from the environment of calf-rearing units in South West England. *The Journal of hygiene*, 97 (3), 405–417. <https://doi.org/10.1017/S0022172400063592>
- Kilburn, C., Rooks, D.J., McCarthy, A.J. & Murray, R.D. (2013). Antimicrobial Resistance in Some Gram-Negative Bacteria Isolated from the Bovine Ejaculate. *Reproduction in domestic animals*, 48 (3), 525–528. <https://doi.org/10.1111/rda.12127>
- Kommissionens delegerade förordning (EU) 2021/880 av den 5 mars 2021 om ändring av delegerade förordning (EU) 2016/429 vad gäller spårbarhets- och djurhälsokrav och krav på utfärdande av djurhälsointyg för förflyttning av avelsmaterial från vissa hållna landlevande djur inom unionen (EUT L 194/1, 2.6.2021).
[Publications Office \(europa.eu\)](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32021R0880)
- Kwon, J., Yang, M.-H., Ko, H.-J., Kim, S.-G., Park, C. & Park, S.-C. (2022). Antimicrobial Resistance and Virulence Factors of *Proteus mirabilis* Isolated from Dog with Chronic Otitis Externa. *Pathogens (Basel)*, 11 (10), 1215-. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101215>
- Llor, C. & Bjerrum, L. (2014). Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 5 (6), 229–241. <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>

- Lortholary, O., Buu-Hoï, A., Fagon, J.Y., Pierre, J., Slama, M., Gutmann, L. & Acar, J.F. (1993). Mediastinitis Due to Multiply Resistant *Corynebacterium xerosis*. *Clinical infectious diseases*, 16 (1), 172–172. <https://doi.org/10.1093/clinids/16.1.172>
- Malaluang, P., Wilén, E., Frosth, S., Lindahl, J.F., Hansson, I. & Morrell, J.M. (2023). Antimicrobial Resistance in Vaginal Bacteria in Inseminated Mares. *Pathogens (Basel)*, 12 (3), 375-. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030375>
- Martinez, J.L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution (1987)*, 157 (11), 2893–2902. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.051>
- Moreira, S.S.J., Santos, C.S., Castelo, T.S., Bezerra, L.G.P., Praxedes, É.C.G., Matos, T.M., Souza-Junior, J.B.F., Feijó, F.M.C., Comizzoli, P. & Silva, A.R. (2022). Investigating the need for antibiotic supplementation to the extender used for semen cryopreservation in collared peccaries. *Frontiers in veterinary science*, 9, 954921–954921. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.954921>
- Morin, J.P., Viotte, G., Vandewalle, A., Hoof, F.V., Tulkens, P. & Fillastre, J.P. (1980). Gentamicin-induced nephrotoxicity: A cell biology approach. *Kidney International*, 18 (5), 583–590. <https://doi.org/10.1038/ki.1980.176>
- Morrell, J., Malaluang, P., Cojkic, A. & Hansson, I. (2022). Alternatives to antibiotics in semen extenders used for artificial insemination. I: *The Global Antimicrobial Resistance Epidemic: Innovative Approaches and Cutting-Edge Solutions*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104226>
- Morrell, J.M. & Wallgren, M. (2014). Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders: A Review. *Pathogens*, 3 (4), 934–946. <https://doi.org/10.3390/pathogens3040934>
- Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A.-M., Ali-Vehmas, T., Seppälä, A., Priha, O. & Salkinoja-Salonen, M. (2007). Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Veterinary microbiology*, 124 (3), 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.015>
- Rich, M., Deighton, L. & Roberts, L. (2005). Clindamycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Veterinary Microbiology*, 111 (3), 237–240. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.09.011>
- Sannat, C., Nair, A., Sahu, S.B., Sahasrabudhe, S.A., Kumar, A., Gupta, A.K. & Shende, R.K. (2015). Critical sources of bacterial contamination and adoption of standard sanitary protocol during semen collection and processing in Semen Station. *Veterinary World*, 8 (5), 631–635. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.631-635>
- Santos, C.S. & Silva, A.R. (2020). Current and alternative trends in antibacterial agents used in mammalian semen technology. *Animal reproduction*, 17 (1), e20190111–e20190111. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0111>
- Schulze, M., Nitsche-Melkus, E., Hensel, B., Jung, M. & Jakop, U. (2020). Antibiotics and their alternatives in Artificial Breeding in livestock. *Animal reproduction science*, 220, 106284–106284. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106284>
- Sensititre™ Avian AVIANIF Vet AST Plate* (u.å.). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AVIAN1F> [2024-04-26]
- Soriano, F., Zapardiel, J. & Nieto, E. (1995). Antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species and other non-spore-forming gram-positive bacilli to 18 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (1), 208–214. <https://doi.org/10.1128/aac.39.1.208>
- VetBact* (u.å.a). <https://www.vetbact.org/index.php?LANG=sv&displayextinfo=106> [2024-05-10]
- VetBact* (u.å.b). <https://vetbact.org/index.php?displayextinfo=102&vbsearchstring=MALDI-TOF> [2024-03-28]
- Vetbact (2024). Mikrotiterplatta (fotografi). Vetbact.org [2024-05-10]
- Webb, E.M., Holman, D.B., Schmidt, K.N., Crouse, M.S., Dahlen, C.R., Cushman, R.A., Snider, A.P., McCarthy, K.L. & Amat, S. (2023). A Longitudinal Characterization

- of the Seminal Microbiota and Antibiotic Resistance in Yearling Beef Bulls Subjected to Different Rates of Gain. *Microbiology spectrum*, 11 (2), e0518022–e0518022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.05180-22>
- WHO (2021). *2021 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: An Overview And Analysis*. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/354545/9789240047655-eng.pdf?sequence=1> [2024-05-10]
- Wong, M.H.Y., Wan, H.Y. & Chen, S. (2013). Characterization of Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Isolated from Chicken Carcasses. *Foodborne pathogens and disease*, 10 (2), 177–181. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1303>

Tack

Jag vill rikta ett stort tack till min handledare Aleksander Cojkic, för all hjälp och uppmuntran jag har fått under resans gång. Jag vill även passa på att rikta ett tack till Ingrid Hansson, för all vägledning och stöd under labbarbetet. Till sist vill jag även rikta ett tack till min examinator Jane Morrell för att ha velat examinera mig och mitt arbete.

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Du hittar en länk till SLU:s publiceringsavtal på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.