

**ANTIBIOTIKARESISTENS HOS  
STARTKULTUR-BAKTERIER I  
MEIERIPRODUKTER OG SPEKEPØLSER  
Omfang og helserisiko**

RF-1999/343

Vår referanse: <b>824744</b>	Forfattere <b>Ragnhild Wiik og Anne-Kirsten Katla</b>	Versjonsnr. / dato: <b>Vers. 1 / 10.04.2000</b>
Ant. sider: <b>43 + vedlegg</b>	Faglig kvalitetssikrer: <b>Gro Johnsen</b>	Gradering: <b>Åpen</b>
	Andre vesentlige bidragsytere på prosjektet: <b>Katrine Borgen, Grethe Kjeilen og Yngvild Wasteson</b>	
ISBN: <b>82-490-0031-5</b>	Oppdragsgiver: <b>Norges forskningsråd</b>	
Forskningsprogram: <b>Bioproduksjon og foredling</b>	Prosjekttittel: <b>Antibiotikaresistens hos bakterier som tilsettes næringsmidler - Omfang og helserisiko</b>	

Emne:

Hovedmålet med dette arbeidet er å undersøke hvorvidt næringsmidler som er tilsatt industrielle bakteriekulturer bidrar til spredning av antibiotikaresistens til humanpatogene bakterier. Muligheten for at resistente bakterier i modnede/fermenterte næringsmidler kan utgjøre en spredningskilde for resistens, har fått liten forskningsmessig oppmerksomhet.

Emne-ord: Fermenterte næringsmidler, startkultur-bakterier, antibiotikaresistens, risikovurdering

RF - Rogalandforskning er sertifisert etter et kvalitetssystem basert på NS - EN ISO 9001



Prosjektleder  
Ragnhild Wiik



for RF - Rogalandforskning  
Kåre Netland

## Innhold

1	INNLEDNING.....	1
1.1	Bakgrunn og problemstilling.....	1
1.2	Målsetning.....	2
2	OPPBYGNING AV RAPPORTEN .....	3
3	TEORI - ANTIBIOTIKARESISTENS OG STARTKULTURER .....	4
3.1	Antibiotika.....	4
3.2	Antibiotikaresistens og overførbarhet .....	4
3.3	Hvorfor er resistens mot vancomycin spesielt viktig? .....	5
3.4	Startkulturer.....	6
4	MATERIAL OG METODE .....	8
4.1	Intervju .....	8
4.2	Antibiotikaresistensbestemmelse .....	8
4.2.1	Prøvematerial: startkulturer og næringsmidler.....	8
4.2.2	Medier .....	9
4.2.3	Isolering og verifisering av bakterier.....	10
4.2.4	Metode for resistensundersøkelse .....	10
4.2.5	Utvalg av antibiotika .....	12
4.3	Genetiske studier .....	13
4.3.1	Testing for VanA-genet.....	13
4.3.2	Overføringsstudier.....	13
5	RESULTATER FRA INTERVJUENE .....	14
5.1	Næringsmidler hvor startkulturer benyttes .....	14
5.2	Hvem produserer startkulturene som brukes i Norge og ellers i verden? .....	15
5.3	Hvilke bakterier inngår i startkulturene?.....	15
5.4	Antall stammer i en startkultur .....	16
5.5	I hvilken grad benyttes probiotika-kulturer? .....	17
5.6	Bakteriekonsentrasjoner i det ferdige produkt .....	17
5.7	Hva vet informantene om antibiotikaresistens hos de bakteriene de benytter? .....	18
5.8	Oppfattes antibiotikaresistens i startkulturer som et viktig område? .....	19
5.9	Er det noen grunn til å tro at fermenterte næringsmidler fra utlandet inneholder mer resistente bakteriestammer enn norske produkt? .....	20
5.10	Lovverk .....	21

6	RESULTATER FRA LABORATORIET.....	22
6.1	Bakteriekonsentrasjoner i næringsmidlene .....	22
6.2	Pålitelighet av resultatene.....	22
6.3	Resistens hos spekepølsebakterier.....	23
6.4	Bakterier brukt i meieriprodukter.....	25
6.4.1	Bakterier isolert fra importerte oster .....	26
6.4.2	Bakterier isolert fra tarmflorastabiliserende preparater.....	27
6.5	Resultat fra genetiske studier .....	28
6.5.1	VanA-genet .....	28
6.5.2	Overførbarhet av tetracyclinresistens .....	28
7	DISKUSJON.....	29
7.1	Naturlig eller overførbar.....	29
8	KONKLUSJONER.....	32
9	REFERANSER.....	33
10	VEDLEGG .....	36
Vedlegg 1	Oversikt over prøvematerialet som er undersøkt	
Vedlegg 2	Sammenligning mellom referansemedium og benyttede medier	
Vedlegg 3	Medier og løsninger	
Vedlegg 4	Tilpasning av agardiffusjonsmetoden for melkesyrebakterier	
Vedlegg 5	Grenseverdier for gruppering av bakterier på bakgrunn av hemmings- sonestørrelser	
Vedlegg 6	Beregning av usikkerhet i hemmingssonestørrelse	
Vedlegg 7A	Resultater fra antibiotikaresistensundersøkelsen, hemmings- sonestørrelser	
Vedlegg 7B	Resultater fra antibiotikaresistensundersøkelsen, R-I-S inndeling	

## Sammendrag

Hovedmålet med dette arbeidet er å undersøke hvorvidt næringsmidler som er tilsatt industrielle bakteriekulturer (startkulturer) bidrar til spredning av antibiotikaresistens til humanpatogene bakterier. Antibiotikaresistens er i ferd med å bre om seg. Det store antibiotikaforbruket anses for å være den viktigste bidragende faktor. Muligheten for at resistente bakterier i modnede/fermenterte næringsmidler kan utgjøre en spredningskilde for resistens, har fått liten forskningsmessig oppmerksomhet. Vi har kartlagt antibiotikaresistens hos bakterier i syrnede melkeprodukter, modnede oster, spekepølser og tarmflorastabiliserende tabletter kjøpt på apotek. Startkulturer er også undersøkt direkte. Både norske og utenlandske produkter er innbefattet. Vi utviklet en egnet agardiffusjonsmetode for kartlegging av resistens hos de aktuelle bakteriene. Vi innhentet opplysninger om startkulturer gjennom intervju/samtaler med næringsmiddel- og startkulturprodusenter. Intervjuene viste at disse aktørene har vært lite opptatt av antibiotikaresistens hos bakterier i startkulturer. Vi har imidlertid registrert økt bevissthet rundt dette temaet blant de intervjuede firma i prosjektperioden (1997 - 2000). Det norske lovverk berører overhodet ikke antibiotikaresistens i bakterielle startkulturer. Ved multiresistens eller ved resistens av spesiell betydning (vancomycinresistens) har vi undersøkt/vurdert overførbarheten av resistensgenene bl.a. ved PCR-metode og overføringsstudier. Våre resultat tyder på at det meste av påvist resistens i norskproduserte fermenterte/modnede matvarer er av en natur som er vanskelig overførbar, dvs. at vi anser risikoen for overføring til andre bakterier som liten. Påvist vancomycin-resistens, dvs. i en del *Lactobacillus*- og *Leuconostoc*-stammer, var ikke forankret i VanA-genet, dvs. vancomycin-resistensen var mest sannsynlig ikke overførbar. Multiresistensen hos bakterier i importerte oster og ikke minst i tarmstabiliserende preparater var mer omfattende enn hos bakterier i norskproduserte produkt. Dette betyr både at forholdsvis flere stammer var multiresistente og at resistensen omfattet flere antibiotika. Prosjektet er et samarbeidsprosjekt mellom Rogalandsforskning og Næringsmiddeltilsynet for Midt-Rogaland. Også Veterinærmiljøene er involvert.

## Summary

The objective is to investigate if bacteria in fermented foods contribute to the spread of antibiotic resistance to bacteria pathogenic to humans. Multiple resistance among bacteria is increasing. Excessive use of antibiotics is assumed to be the main cause of the increasing resistance. The possibility that bacteria in industrial starter cultures may be a source of transferable antibiotic resistance has gained little attention. In the present project, we have investigated the antibiotic resistance of bacteria in fermented dairy food products and smoked sausages. Starter cultures and respective food products have been tested. Both Norwegian and foreign products are included. In addition, we tested two products containing intestinal stabilizing bacteria. Agar diffusion was our principal method for determination of resistance. We had to modify the standard method in order to make it suitable for lactic acid bacteria. Information about the starter cultures was obtained by interviewing producers of fermented foods and starter cultures. Routines for control of antibiotic resistance in starter cultures were stressed. The producers were not very concerned about such routines in practice. During the project period (1997 -2000), however, we have observed increased focus among the participating companies on this subject. The Norwegian legislation does not say anything about antibiotic resistance in bacterial starter cultures. By multiple antibiotic resistance or resistance of special relevance (vancomycin), the potential for transfer of the corresponding resistance genes was evaluated. Our studies indicate that the observed resistance in bacterial starter cultures in Norwegian foods hardly is transferable to other bacteria. Observed resistance against vancomycin, i. e. in several strains of *Lactobacillus* and *Leuconostoc*, was considered as not transferable (the VanA gene was not detected by the PCR method). Multiple resistance was more extensive in imported cheeses and intestinal stabilizing products than in Norwegian fermented foods; i.e. comparatively more strains were multiple resistant and the resistance included more antibiotics. The project is a co-operation between Rogaland Research and the Regional Food Control Authority. Additionally, the National Veterinary Environments have participated.

## **Forord**

Bakterielle startkulturer brukes i de fleste norske meieri- og spekepølseprodukter. Dette betyr at nordmenn spiser en mengde levende bakterier daglig. Muligheten for at resistente bakterier i startkulturer kan utgjøre en spredningskilde for resistens har fått liten eller ingen forskningsmessig oppmerksomhet. Bakgrunnen for dette prosjektet er at vi ikke visste hvorvidt disse bakteriene er antibiotikaresistente. Vi visste imidlertid at antibiotikaresistens kan overføres mellom bakterier selv ved fravær av antibiotikapåtrykk.

Prosjektet er et samarbeidsprosjekt mellom Rogalandsforskning (RF) og Næringsmiddeltilsynet for Midt-Rogaland (NMR). Prosjektleder er Ragnhild Wiik ved RF (nå ansatt ved Teknologisk Institutt, avd. Stavanger). Den fenotypiske resistenstesting av stammene er utført av Anne-Kirsten Katla ved NMT. Gro Johnsen ved NMT har kvalitetssikret resistenstesting.

De genetiske studiene er utført av Katrine Borgen, Jostein Bjorland og Yngvild Wasteson fra Norges Veterinærhøgskole, i samarbeid med Marit Sørum og Hilde Kruse fra Veterinærinstituttet.

Takk til Grethe Kjeilen ved RF for å ha bidratt til innsamling og rapportering av informasjon ang. vancomycin-resistens hos melkesyrebakterier.

Sandnes, 10. april 2000

Ragnhild Wiik  
Prosjektleder

# 1 Innledning

## 1.1 Bakgrunn og problemstilling

Formålet med dette prosjektet er å studere om næringsmidler som er tilsatt industrielle bakteriekulturer bidrar til spredning av antibiotikaresistens til humanpatogene bakterier.

Vi er vitne til at mange typer antibiotika er i ferd med å miste sin virkning mot bakterielle infeksjonssykdommer (Wiik og Karlsen, 1997). Den grunnleggende årsaken til dette er at bakterier er i stand til å utvikle motstandsdyktighet (resistens) overfor antibiotika samt til å overføre resistensen til andre bakterier. Videre fører det store og globalt økende forbruket av antibiotika til at resistensen brer om seg (Cassell, 1995). I tillegg bidrar sosiale og teknologiske forhold til økende forekomst av antibiotikaresistens. Eksempelvis vil store ansamlinger av mennesker i skoler, sykehus, arbeidsplasser mm. samt stor reisevirksomhet bidra til spredning av bakterier og dermed også av antibiotikaresistens.

Det store antibiotikaforbruket ansees for å være den viktigste årsaken til stadig økende resistensutbredelse. Bruk av antibiotika medfører seleksjon av resistente bakterier i henhold til Darwins evolusjonsteori. Når en bakterie først er blitt resistent, kan den overføre sin resistens til andre bakterier selv uten antibiotikapåtrykk (Kruse og Sørum, 1994; Brock et al., 1994). Dette betyr at bakterier kan bli resistente uten at de utsettes for antibiotika; det er tilstrekkelig at de kommer i kontakt med andre bakterier som er resistente. Det at antibiotikaresistens kan overføres mellom bakterier selv ved fravær av antibiotikapåtrykk, er utgangspunktet for dette prosjektet.

Det er stort sett sykdomsframkallende bakterier som har vært i fokus når det gjelder antibiotikaresistens, spesielt bakterier isolert fra sykehuspasienter (Salyers, 1999). Vi vet lite om hva som skjer av resistensoverføringer blant apatogene bakterier i både sykehus og i vårt miljø forøvrig. Det er mulig at bakterier som bidrar til at det dukker opp multiresistente patogener ikke blir studert med hensyn til antibiotikaresistens. En stadig økende datamengde tyder på at bakterier i mat og bakterier i fordøyelseskanalen utveksler resistensgener med hverandre og med patogene bakterier (Salyers, 1999).

Vi har undersøkt antibiotikaresistens hos bakterier som tilsettes næringsmidler i form av startkulturer. Kun bakterielle startkulturer og tilsvarende næringsmidler er undersøkt. Bakterielle startkulturer inneholder ofte melkesyrebakterier, men også stafylokokker og andre bakterietyper benyttes. Hensikten med en startkultur er at bakterielle omsetningsprosesser skal bidra til ønsket smak, aroma, konsistens og holdbarhet. Det ferdige næringsmidlet inneholder et høyt antall levende bakterier; gjerne i størrelsesorden  $10^7$  pr. ml eller gram.



I Norge benyttes startkulturer stort sett bare i meieriprodukter og spekepølser. Til gjengjeld er de fleste av denne typen næringsmidler tilsatt startkulturer. Disse modnede eller fermenterte næringsmidlene spises uten å ha vært varmebehandlet etter bakterietilsetning, noe som gjør at konsumenten får i seg betydelige mengder levende bakterier. Disse bakteriene regnes for å være positive for helsen. I dette prosjektet har vi imidlertid fokusert på muligheten for at bakterier i startkulturer kan besitte overførbare antibiotikaresistens. Dette fordi de i så fall direkte eller indirekte kan overføre sin resistens til sykdomsframkallende bakterier i vårt fordøyelses- og luftveissystem.

Muligheten for at resistente bakterier i modnede/fermenterte næringsmidler kan utgjøre en spredningskilde for antibiotikaresistens har fått liten oppmerksomhet. Imidlertid fokuseres det mye på helserisikoen ved å spise genmodifiserte planter inneholdende markørgenger som koder for antibiotikaresistens. Risikoen består her av at resistensgenene skal overføres til bakterier ved transformasjon. Slik vi ser det, er helserisikoen forbundet med bruk av markørgener som koder for antibiotikaresistens mindre enn risikoen ved eventuell tilstedeværelse av overførbare antibiotikaresistens i industrielle bakteriekulturer brukt i matvarer.

Problemstillingen i dette prosjektet er i hvilket omfang det brukes antibiotikaresistente bakterier i industriell produksjon av norske, fermenterte/modnede næringsmidler.

## **1.2 Målsetning**

Hovedmålet med prosjektet er følgende:

Å avklare hvorvidt næringsmidler som er tilsatt industrielle bakteriekulturer bidrar til spredning av antibiotikaresistens til sykdomsframkallende bakterier. Vi har fokusert på næringsmidler som omsettes på det norske markedet.

For å nå målsetningen har vi besvart følgende spørsmål:

1. Hvilke næringsmidler er tilsatt bakterielle startkulturer?
2. Hvilke bakterieslekter/-arter benyttes i de aktuelle næringsmidlene?
3. Hvilke bakterieslekter/-arter er evt. resistente?
4. Hvilke antibiotika er bakteriene resistente mot?
5. I hvilken grad er de multiresistente?
6. I hvilken grad anser vi evt. antibiotikaresistens for å være overførbare?
7. Hvorvidt gjør produsenter av startkulturer og tilsvarende næringsmidler noe for å forhindre antibiotikaresistens hos bakterier i henholdsvis startkulturer og næringsmidler?

## 2 Oppbygning av rapporten

Vi benyttet intervju for å klarlegge produsentenes holdninger og strategi angående antibiotikaresistens.

Fenotypisk resistens og overførbarhet av resistensgener er bestemt ved laboratoriestudier. Vurdering av overførbarhet er også basert på litteraturdata. De fleste intervjuene ble gjennomført før vi startet med laboratorieforskningene. De intervjuede næringsmiddelprodusenter gav oss informasjon om sine startkulturer som vi fikk tilsendt for kartlegging av antibiotikaresistens.

Denne rapporten består av en innledende del, en teoridel, metodebeskrivelse, resultater, diskusjon og konklusjoner. Hovedsakelig litteraturdata, men også noe informasjon fra intervjuene inngår i teorikapitlet. I både metode- og resultatdelen presenterer vi først intervju og deretter laboratorieforskning.

### **3 Teori - antibiotikaresistens og startkulturer**

I dette kapitlet vil vi presentere litteraturdata og noe intervjudata. Intervjudataene omhandler startkulturene. Hensikten er å gi en faglig bakgrunn for prosjektet. Vi ønsker også å få fram hvorfor vår problemstilling er viktig.

#### **3.1 Antibiotika**

Kjemoterapeutika er kjemiske forbindelser som benyttes til å kurere infeksjonssykdommer. Antibiotika utgjør en spesiell klasse innen kjemoterapeutika, og kjennetegnes ved at de er naturlige produkter. Et antibiotikum er i utgangspunktet definert som en kjemisk forbindelse produsert av en mikroorganisme og som dreper eller hemmer veksten av andre mikroorganismer (Brock *et al.*, 1994). I dag modifiseres mange antibiotika kjemisk eller det produseres syntetiske midler med tilsvarende effekt som antibiotika. Vi har i dette arbeidet brukt begrepet 'antibiotika' som fellesbetegnelse for både naturlige, semisyntetiske og syntetiske kjemoterapeutika mot bakterielle infeksjoner.

Ulike hovedtyper av bakterier har i utgangspunktet ulik sensitivitet overfor mange antibiotika. Gram-positive bakterier har tradisjonelt vist seg å være mer sensitive enn gram-negative bakterier. Et antibiotikum som virker både mot gram-positive og gram-negative bakterier kalles bredspektret. Et smalspektret antibiotikum virker bare mot en enkelt bakteriegruppe. De mest smalspektrede virker kun mot en eller svært få bakteriearter (Brock *et al.*, 1994). Ved bruk av bredspektrede antibiotika er det ikke så viktig med en eksakt diagnose, noe som kan gjøre det fristende å bruke slike antibiotika. Eksempler på bredspektrede antibiotika er tetracykliner og kloramfenikol. For at smalspektrede antibiotika skal ha helbredende effekt, er det viktig å stille en sikrere diagnose. Det bør primært satses på bruk av smalspektrede antibiotika for å unngå utvikling av resistens mot bredspektrede antibiotika. Bruk av bredspektrede antibiotika kan være avgjørende når det ikke er tid til å stille en sikker diagnose eller til å bestemme bakterienes resistensmønster før kuren må startes.

#### **3.2 Antibiotikaresistens og overførbarhet**

Madigan *et al.* (1997) definerer antibiotikaresistens slik: "The acquired ability of a microorganism to grow in the presence of an antibiotic to which the microorganism is usually sensitive". Definisjonen omfatter kun ervervet resistens. Antibiotikaresistens hos bakterier klassifiseres imidlertid ofte som enten en ervervet eller en naturlig forekommende egenskap (Brock *et al.*, 1994; Godfrey og Bryan, 1984; Kruse, 1994; Prescott *et al.*, 1988; Wiik og Karlsen, 1997). Naturlig resistens er definert som en artstypisk egenskap ved en bakterie som motvirker effekten av et antibiotikum (Godfrey og Bryan, 1984; Kruse 1994; Wiik og Karlsen, 1997).

En ofte nevnt årsak til naturlig resistens er at den ytre celle-membranen hos gram-negative bakterier er slik at en del antibiotika ikke kan trenge gjennom (Godfrey og Bryan, 1984). Gram-positive bakterier har ikke en slik ytre cellemembran.

En forskjell mellom ervervet og naturlig resistens er at det alltid vil finnes et konkret gen knyttet til ervervet resistens, mens spesifikke resistensgener kan mangle ved naturlig resistens. Av naturlig og ervervet resistens, er det kun ervervet resistens som ansees som overførbar. Det er også den overførbare resistensen som innebærer størst helserisiko. Slik resistens kan spres til en rekke ulike bakterier. Det at resistens kan overføres mellom bakterier øker også sannsynligheten for at én og samme bakteriestamme kan bli resistent mot mange eller i prinsippet alle terapeutisk relevante antibiotika.

Det at en bakteriestamme er samtidig resistent mot flere antibiotika kalles multiresistens. Det finnes ingen klar grense for hvor mange antibiotika en stamme må være resistent mot for å bli kalt multiresistent. Vi har tidligere skrevet at en stamme må være resistent mot minst 3 grupper av antibiotika for å kunne kalles multiresistent (Wiik og Karlsen, 1997). Bager *et al.* (1997) skriver at multiresistens betyr resistens mot minst 4 grupper antimikrobielle midler. I dette prosjektet betyr multiresistens resistens mot minst 3 grupper av antibiotika.

Vi bruker begrepet resistens om både ervervet og naturlig resistens i denne rapporten. Vi vurderer i hvert tilfelle hvorvidt resistensen overførbar. I de tilfeller hvor vi vurderer resistensen som naturlig, anser vi resistensen som ikke-overførbar. Dette betyr at en bakteriestamme kan være multiresistent uten at den utgjør en kilde for spredning av resistens.

### **3.3 Hvorfor er resistens mot vancomycin spesielt viktig?**

Vancomycin er et antimikrobielt middel som produseres av *Nocardia orientalis* (tidligere *Streptomyces orientalis*).

Vancomycin er et svært viktig antibiotikum ved behandling av infeksjoner med bl.a. *Staphylococcus aureus* (Levy, 1998). *S. aureus*, "sykehusbakterien" forårsaker mange alvorlige infeksjoner, tidvis med dødelig utgang. *S. aureus* er ofte multiresistent mot en rekke vanlig brukte antibiotika, men ikke mot vancomycin. Det er bl.a. derfor vancomycin har en så viktig rolle i behandling av slike infeksjoner. Vancomycin er også svært viktig i behandling av infeksjoner med enterokokker. Vancomycin-resistente enterokokker blir mer og mer utbredt og forårsaker et økende antall alvorlige infeksjoner hos mennesker. Enterokokker har en rekke naturlige resistensmekanismer (Stosor *et al.* 1996). Dette, i tillegg til at enterokokker lett tar opp resistensgener, gjør at det er få effektive antibiotika som kan benyttes ved enterokokk-infeksjoner.

Det finnes ulike typer vancomycin-resistens (Billot-Klein *et al.*, 1994; Handwerger *et al.*, 1994; Stosor *et al.*, 1996; Tynkkynen *et al.*, 1998); både overførbar og det man mener er naturlig. I dette prosjektet tester vi om vancomycinresistente stammer inneholder VanA-genet. VanA-genet koder for overførbar vancomycinresistens.

Gram-negative bakterier er generelt resistente overfor vancomycin. For å virke må vancomycin trenge gjennom bakteriecellens ytre lag. Vancomycin er et stort molekyl, og det antas at porene i den ytre cellemembranen hos gram-negative bakterier er for små til at vancomycin kan komme gjennom. Det hevdes også at flere arter av melkesyrebakterier er naturlig resistente overfor vancomycin (Handwerger *et al.*, 1994; Isolini *et al.*, 1990; Tynkkynen *et al.*, 1998). Resistensen sies her å være kromosombundet og ikke overførbar (Tynkkynen *et al.*, 1998).

### 3.4 Startkulturer

En startkultur består av mikroorganismer som tilsettes næringsmidler for å bidra til ønsket smak, aroma, konsistens og holdbarhet. Mikroorganismene tilsettes næringsmidlet på et bestemt punkt i produksjonsprosessen. De formerer seg og påvirker næringsmidlets beskaffenhet. Slike næringsmidler kalles fermenterte næringsmidler. Fermenterte næringsmidler utgjør på verdensbasis ca. 1/3 av vårt matinntak (Campbell-Platt, 1994). I dette prosjektet har vi kun innbefattet startkulturer som består av bakterier. I Norge er det bare meieriprodukter (ost, kulturmelk, yoghurt osv.) og spekepølser som tilsettes startkulturer. Bortsett fra i ost, er det kun bakterielle startkulturer som benyttes. Oster lages ved å benytte enten bakterier eller sopp eller en kombinasjon av disse typer mikroorganismer.

Fra produsentens side foreligger startkulturene ofte som frysetørkede bakteriekonsentrat (pulver).

Startkulturene inneholder ulike bakterier avhengig av hvilke næringsmiddeltyper det dreier seg om. Eksempelvis brukes andre bakterier til ost enn til spekepølser. Felles for bakteriene i startkulturene er at de oftest tilhører gruppen melkesyrebakterier.

Melkesyrebakteriene omfatter slektene *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* og *Pediococcus*. Disse bakteriene er utelukkende fermentative, dvs. at de ikke har evne til respirasjon. En fermentativ bakterie bryter bare delvis ned organiske molekyler. Når det gjelder melkesyrebakterier, er sluttproduktet enten bare melkesyre eller hovedsakelig melkesyre. I Norge benyttes følgende melkesyrebakterier i startkulturer: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* og *Pediococcus*, dvs. samtlige melkesyrebakterieslekter bortsett fra *Enterococcus*. *Enterococcus* er imidlertid representert i tarmflorastabiliserende produkter (se nedenfor).

Fermenterte meieriprodukter med levende melkesyrebakterier er vurdert som trygge med hensyn til infeksjonssykdommer (Campbell-Platt, 1994; Gasser, 1994; Saxelin *et al.*, 1996). Vi vil understreke at antibiotikaresistens ikke er tatt med i de refererte trygghetsvurderingene. Selv om de bakterier som brukes i fermenterte næringsmidler er trygge med hensyn til infeksjoner, er det ikke utelukket at disse bakteriene kan fungere som en spredningskilde for antibiotikaresistens.

Mikroorganismer som spesifikt benyttes for å fremme helse hos mennesker eller dyr benevnes 'probiotika'. Strategien er at probiotika skal utkonkurrere sykdomsfremkallende mikroorganismer. Probiotika i form av tablett selges i Norge (tarmflorastabiliserende produkter). Disse tablettene inneholder i stor grad de samme bakterieslekter som fermenterte næringsmidler. I tillegg er slekten *Enterococcus* representert i denne typen tablett. Vi har inkludert to typer tarmflorastabiliserende tablett i vår undersøkelse.

## 4 Material og metode

### 4.1 Intervju

Vi intervjuet 3 produsenter av startkulturer og 10 produsenter av fermenterte næringsmidler. Avtale om konfidensialitet ble inngått med de intervjuede firma. Representantene fra startkulturfirmaene hadde stillinger av type produksjefefer. Representantene fra næringsmiddelbedriftene hadde stillinger av type kvalitetsledere, produksjonssjefer og avdelingsledere. Vi har en klar oppfatning av at vi intervjuet de personene som hadde mest kunnskap om startkulturer innen de respektive firma. Med to unntak, ble samtlige intervju foretatt over telefon. Intervjuene ble foretatt ved bruk av intervjuguide. Hvert intervju varte i 1-1,5 time.

Hensikten med intervjuene var å klarlegge firmaenes strategi og kunnskap med hensyn til antibiotikaresistens hos de bakteriene som tilsettes næringsmidlene. Vi har klarlagt:

- om produsenter av startkulturer eller næringsmidler gjør/har gjort noe i forhold til resistens
- om de har tenkt over risikoen for at startkulturer evt. kan bidra til spredning av resistens

I tillegg innhentet vi informasjon om:

- kulturenes sammensetning, bl.a. hvilke bakterie-arter og evt. -underarter som inngår
- hvilke type næringsmidler det dreier seg om
- salgs-/bruksomfanget av startkulturer og fermenterte næringsmidler
- hva bakteriene gjør og hvordan fermenteringsprosessen foregår

Samtlige punkter nevnt ovenfor er relevante for vurdering av helserisiko ved antibiotikaresistens hos bakterier i startkulturer.

De intervjuede bedriftene representerer dagens bruk av startkulturer i Norge.

### 4.2 Antibiotikaresistensbestemmelse

#### 4.2.1 Prøvematerial: startkulturer og næringsmidler

Til sammen 32 startkulturer ble undersøkt. 16 av startkulturene benyttes i fermenterte meieriprodukter som ost, surmelk og yoghurt, mens 16 brukes i spekepølser. De undersøkte startkulturer benyttes i næringsmidler med stort bruksomfang i Norge. Våre startkulturer er representative for dagens bruk av slike i Norge. De undersøkte startkulturer til tilsendt fra norske næringsmiddelprodusenter med unntak av 2 som ble

sendt fra en svensk næringsmiddelprodusent. Fem av startkulturene er norskprodusert, for øvrig er det 15 danskproduserte, 11 tyskproduserte og 1 finskprodusert startkultur.

I de fleste tilfeller inneholdt den enkelte startkultur 1 bakterieart pr. slekt; 1 - 2 slekter var representert pr. startkultur. I noen av meieriproduktene inngikk flere underarter av én og samme art. Hvert bakterieisolat ble undersøkt for følsomhet overfor et utvalg antibiotika (tab. 3).

I tillegg til å isolere bakterier direkte fra startkulturer, ble en del av dem også isolert fra næringsmidlene de inngår i. Det ble totalt undersøkt 18 næringsmidler, 9 meieriprodukter og 9 spekepølser. Én enhet av hvert næringsmiddel ble undersøkt uten gjentak.

Av importerte næringsmidler ble det undersøkt 4 danskproduserte oster. To tarmflorastabiliserende (probiotiske) produkter ble også undersøkt. Det ene produktet er produsert i Danmark, det andre er norskprodusert.

Til sammen testet vi 117 bakterieisolater for resistensegenskaper. Vedlegg 1 gir en nærmere beskrivelse av prøvematerialet som er undersøkt i prosjektet.

#### 4.2.2 Medier

##### Medier for isolering av startkulturbakterier

I intervjuene oppgav næringsmiddelprodusentene hvilke bakterieslekter/-arter som inngikk i startkulturene og ca. antall levende celler/g. På bakgrunn av opplysninger og anbefalinger fra startkultur- og næringsmiddelprodusentene ble det valgt ut medier (til en viss grad selektive) og inkubasjonsbetingelser for isolering av bakteriene (tab. 1).

**Tabell 1.** Dyrkningsmedier og inkuberingsbetingelser for isolering av startkulturbakterier

Bakterieslekt	Dyrkningsmedium <sup>1)</sup>	Inkuberingsbetingelser
<i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i>	MRS pH 5.4	30°C, anaerobt, 2 døgn
<i>Staphylococcus</i>	PCA	30°C, aerobt, 2 døgn
<i>Lactococcus</i> <i>Streptococcus</i>	M17 agar	30°C, aerobt, 2 døgn
<i>Leuconostoc</i>	Mayeux' medium	20°C, aerobt, 5 døgn
<i>Propionibacterium</i>	Na-laktatagar	30°C, aerobt, 9 døgn
<i>Bifidobacterium</i>	MRS m/NNL	30°C, anaerobt, 3 døgn

<sup>1)</sup>: Dyrkningsmediene er beskrevet i vedlegg 3.



## **Medier for undersøkelse av antibiotikaresistens**

De isolerte melkesyrebakteriene vokste dårlig eller ikke i det hele tatt på referansemediet Mueller Hinton Agar (MHA) (vedlegg 3) som agardiffusjonsmetoden er standardisert for. Modifisert MHA (MHA++) (vedlegg 3) som anbefales av Valladao og Sandine (1994), ble benyttet for de bakteriene som vokste på dette. De resterende bakteriene ble testet på melkesyrebakterie-mediene M17 og MRS 5.4 (vedlegg 3). Referanseorganismene *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* og *Pseudomonas aeruginosa* vokste på MHA og MHA++, men ikke på M17 og MRS 5.4. Ingen bakterier vokste på alle de fire mediene, men flere isolat vokste på 2 eller 3 av mediene. Vi har gjennomført undersøkelser som sammenligner hemmingssonene på referansemediet med de andre mediene (vedlegg 2).

Framgangsmåten for tillaging av medier og løsninger som er benyttet i undersøkelsen er beskrevet i vedlegg 3.

### **4.2.3 Isolering og verifisering av bakterier**

Bakterier ble isolert direkte fra startkulturer og fra næringsmidler. Det ble sådd ut fra 1:10-fortynninger av startkulturene på skåler med selektive medier. Inkuberingsbetingelsene var som beskrevet i tabell 1. For næringsmidlene var det aktuelt å bestemme hvilke konsentrasjoner bakteriene var tilstede i. Det ble derfor sådd ut fra fortynningsserier av disse prøvene.

Bakteriene ble isolert, gramfarget og mikroskopert. Katalasetest ble utført for å skille enkelte bakterieslekter. Isolatene ble slektsbestemt på bakgrunn av isoleringsmedium, de nevnte diagnostiske tester og startkulturproducentenes opplysninger.

Parallelt med at isolatene ble resistensbestemt, ble noen kolonier frosset ned for eventuelt gjentak av resistensbestemmelsen og/eller nærmere undersøkelse. Bakteriene ble frosset ned ved -20°C, i fortynningsvann tilsatt 15% glycerol.

### **4.2.4 Metode for resistensundersøkelse**

#### **Valg av metode**

Agarfortynnings- og agardiffusjonsmetoden for resistensbestemmelse ble prøvd ut for å bestemme hvilken som ville være best egnet til våre undersøkelser. I førstnevnte metode blandes ulike fortynninger av antibiotika med temperert agar som helles i skåler, og bakteriesuspensjonen plates ut på agaroverflaten (Ericsson og Sherris, 1971). Den laveste antibiotikakonsentrasjonen som gir fullstendig hemming av bakterieveksten angis som bakteriens MIC-verdi (minimum inhibitory concentration). Ved agardiffusjonsmetoden svabres agaroverflaten med bakteriesuspensjonen og antibiotika i tablettform appliseres oppå (Casals og Pringler, 1991). Grad av vekst inntil antibiotikatablettene angir bakteriens følsomhet overfor antibiotikaene.

Innstøpningsmetoden er delvis kvantitativ, og har lavere deteksjonsgrense enn agardiffusjonsmetoden. Våre innledende forsøk viste god overensstemmelse mellom resultatene fra de to metodene. Da agardiffusjonsmetoden er den minst arbeidskrevende, og det i vårt kartleggingsarbeid ikke var nødvendig å foreta en kvantitativ bestemmelse av bakterienes følsomhet overfor antibiotika, ble denne valgt til resistensbestemmelse av bakterieisolatene.

Fra hvert bakterieisolat ble kolonier slemmet opp i fortynningsvann til en turbiditet tilsvarende 0,5 McFahrland (D'Amato og Hochstein, 1982). Suspensjonene ble overført til aktuelle agarskåler ved hjelp av bomullssvaber. Skålene tørket i 15 min ved 30°C før påføring av antibiotikatabletter. Hemmingssonediameteren ble målt etter 2 døgn inkubasjon ved 30°C. For tilpasning av metoden til melkesyrebakterier, se vedlegg 4.

### MIC-bestemmelser for stammer utvalgt til genetiske studier

MIC-verdier (Minimum Inhibitory Concentration-verdier) til de bakterieisolatene som ble valgt ut til genetiske undersøkelser ble bestemt ved Etester (Etest Manual, 1997). MIC-verdier ble kun bestemt for de antibiotika som gav resistens ved bruk av agardiffusjonsmetoden.

En Etest benyttes for kvantitativ bestemmelse av mikroorganismers følsomhet overfor antibiotika. Selve testen består av en plaststrimmel med en gradient av et antibiotikum på undersiden. Strimmelen legges på en agarskål som er svabret med den aktuelle mikroorganismen. Antibiotikumet diffunderer ut i agaren hvorpå en stabil konsentrasjonsgradient av antibiotikumenet dannes under strimmelen. Ved inkubering dannes en symmetrisk, elliptisk hemmingssone sentrert om strimmelen. På oversiden av Etest-strimmelen er det angitt en konsentrasjonsskala ( $\mu\text{g/ml}$ ) som tilsvarende antibiotikakonsentrasjonen på undersiden. MIC er den verdien der ellipsen krysser Etest-strimmelen.

Det ble laget til et inokulum med turbiditet tilsvarende 2 McFahrland for hvert av de utvalgte bakterieisolat. Inokulumet ble svabret på overflaten av en agarskål. Skålene tørket i 15 min ved 30°C før påføring av Etest-strimler. Dyrkningsmedium og inkuberingsbetingelser er angitt i tabell 2. Etter inkubering ble bakterieisolatets MIC for de ulike antibiotikaene lest av.

**Tabell 2.** Dyrkningsmedier og inkuberingsbetingelser for bakterier valgt ut for MIC-testing.

Bakterieslekt	Dyrkningsmedium <sup>1)</sup>	Inkuberingsbetingelser
<i>Lactobacillus, Bifidobacterium</i>	MRS pH 5,4	30°C, anaerobt, 2 døgn
<i>Lactococcus</i>	M17 agar	30°C, aerobt, 2 døgn
<i>Leuconostoc, Staphylococcus, Enterococcus</i>	MHA++	30°C, aerobt, 2 døgn

<sup>1)</sup>: Dyrkningsmediene er beskrevet i vedlegg 3.

#### 4.2.5 Utvalg av antibiotika

Neo-Sensitabs antibiotikatabletter (A/S Rosco, Taastrup, Danmark) ble benyttet i undersøkelsen av antibiotikaresistens.

Antibiotikaene ble valgt ut etter følgende kriterier:

1. De er terapeutisk relevante.
2. De dekker ulike grupper antibiotika.

En oversikt over benyttede antibiotika er gitt i tabell 3.

**Tabell 3.** Oversikt over benyttede antibiotika. Bortsett fra Vancomycin, er disse antibiotikaene mer eller mindre bredspektrede. Vancomycin virker kun mot gram-positive bakterier og bakterier uten cellevegg.

Antibiotika <sup>1)</sup>	Konsentrasjon (µg/tablett)	Gruppe	Virkning
Ampicillin	33	β-lactamer	Hemmer celleveggsyntese
Cefotaxim	30	Cephalosporiner	Hemmer celleveggsyntese
Chloramphenicol	10	Ikke spesiell gruppe	Hemmer proteinsyntese
Ciprofloxacin	10	Kinoloner	Hemmer DNA-syntese
Erythromycin	78	Makrolider	Hemmer proteinsyntese
Gentamicin	40	Aminoglykosider	Hemmer proteinsyntese
Penicillin	5	β-lactamer	Hemmer celleveggsyntese
Tetracyclin	80 og 10	Tetracycliner	Hemmer proteinsyntese
Trimetoprim/sulfa	5,2/240	Ikke spesiell gruppe	Hemmer folsyremetabolisme
Vancomycin	70	Glykopeptider	Hemmer celleveggsyntese

<sup>1)</sup>: Samtlige bakterieisolat (117) ble undersøkt for følsomhet overfor de 7 antibiotikaene ampicillin, cefotaxim, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, tetracyclin (80 µg) og vancomycin. I tillegg ble 65 av isolatene undersøkt for følsomhet overfor chloramphenicol, penicillin og trimetoprim/sulfa samt en lavere konsentrasjon av tetracyclin (10 µg).

Bakteriene ble karakterisert som resistente (R), intermediære (I) eller sensitive (S) overfor det enkelte antibiotikum (Neo-Sensitabs User's Guide, 1998). Grenseverdier (mm) for inndeling i de 3 kategoriene er angitt i vedlegg 5. For chloramphenicol (10 µg) og tetracyclin (10 µg) er slike grenseverdier ikke oppgitt.

## 4.3 Genetiske studier

### 4.3.1 Testing for VanA-genet

Elleve vancomycinresistente bakteriestammer fra slektene *Lactobacillus* og *Leuconostoc* ble testet for tilstedeværelse av VanA-genet. PCR-metode (Clark *et al.*, 1993) ble benyttet. Med unntak av to bakteriestammer fra importert ost, var stammene isolert fra startkulturer til ost (2), yoghurt (1) og spekepølse (6).

### 4.3.2 Overføringsstudier

**Bakteriestammer:** Følgende stammer av *Staphylococcus carnosus* isolert fra spekepølse ble testet:

SS-25 (fra startkultur): resistent overfor tetracyklin, MIC-verdi > 256 µg/ml.

NS-17 (fra spekepølse): sensitiv overfor alle testede antibiotika.

**Plasmidprofilering:** Det ble isolert plasmider fra SS-25 og NS-17. Plasmidinnholdet ble kuttet med restriksjonsenzymene *EcoRI* og *HaeIII*. Hele og kuttete plasmider ble separert ved gelelektroforese, farget med etidiumbromid og visualisert ved fotografering under UV-lys.

**PCR-analyser:** Det ble utført PCR analyse for deteksjon av tetracyklinresistensgenene *tetK*, *tetL* og *tetM* av SS-25 og NS-17.

**Overføringsstudier:** NS-17 ble gjort rifampicinresistent (MIC > 400 µg/ml) ved passasjeutsæd på PCA-skåler med rifampicinkonsentrasjoner fra 5 µg/ml til 400 µg/ml.

Overføringsstudier ble gjennomført ved å blande renkulturer av NS-17<sup>Rif</sup> og SS-25<sup>Tet</sup> i BHI buljong ved 37°C og 20°C, med og uten risting i to døgn. Det ble selektert for eventuelle transkonjuganter ved dyrkning på PCA-skåler med rifampicin (400 µg/ml) og tetracyklin (50 µg/ml). Potensielle transkonjuganter bekreftes ved PCR-analyse og plasmidprofilering som ovenfor.

## 5 Resultater fra intervjuene

I dette og påfølgende kapittel presenterer vi resultatene fra henholdsvis intervjuene og resistensundersøkelsene i laboratoriet.

### 5.1 Næringsmidler hvor startkulturer benyttes

I Norge finnes det to hovedgrupper av næringsmidler hvor startkulturer benyttes:

1. Meieriprodukter
2. Spekepølser

Det fleste meieriprodukter i Norge er tilsatt startkulturer. Det vil si at nærmest alle ostetyper, alle surmelksprodukter inkludert yoghurt og rømme samt smør er tilsatt startkulturer. Produkter hvor startkulturer er tilsatt, kalles fermenterte produkter eller modnede produkter. Søtmelk, fløte og ulike typer brunost er ikke tilsatt startkulturer. Fermenterte meieriprodukter som smaker forskjellig er ofte tilsatt ulike startkulturer. Ulike produkt kan imidlertid ha ulik smak til tross for bruk av samme startkultur. Et eksempel er ulike smaksvarianter av Litago-yoghurt. Her er det 'syltetøyet' som gir ulik smak.

Det finnes i Norge to fermenterte meieriprodukter som inneholder probiotikakulturer. Dette er produktene Cultura og Biola.

Alle intervjuede spekepølseprodusenter, bortsett fra én, tilsatte startkulturer til sine spekepølser. Bakterier inngår også i spekepølsene til det ene unntaket, men de baserte seg her på en såkalt 'huskultur'. Eksempler på spekepølser er fårepølse, salami og morrpølse. Den eneste spekematen som ikke er tilsatt startkultur, er spekeskinker inkludert fenalår.

Ingen spekepølser produsert i Norge er tilsatt probiotika. Et av de intervjuede startkulturfirmaene i Tyskland fortalte imidlertid at de har søkt om patent på en probiotika-stamme beregnet for spekepølser. Stammen tilhører slekten *Lactobacillus*.

Det finnes tablett som selges på apotek som inneholder bakterier i form av probiotika. Slike tablett er kategorisert som handelsvarer, ikke legemidler. Dette betyr at de sorterer under Næringsmiddeltilsynet. Vi har inkludert to slike produkt i vår undersøkelse. Helsekostprodukter er ikke innbefattet i dette prosjektet. Vi antar at start-/probiotikakulturer er representert i slike produkter.

Bakterielle startkulturer benyttes også til sekundær fermentering vin. Dette kalles malolaktisk fermentering, noe som betyr at epletsyre omdannes til melkesyre. Rødvin går alltid gjennom malolaktisk fermentering. I noen land, som f. eks. Sveits, går også hvitvin gjennom denne prosessen. Dette fører til at vinens surhet reduseres (R. Teien, Vinmonopolet, pers. med.). Normalt starter malolaktisk fermentering av seg selv, men bakterielle kulturer benyttes i et visst omfang. Sekundær fermentering ved bruk av

bakterielle startkulturer ble tatt i bruk på 1970-tallet og økte i 1980-årene (spesielt i USA). I Europa ble sekundær fermentering ved bruk av startkulturer tillatt i sept. 1990.

Bruk av bakterielle startkulturer er spesielt aktuelt når det er så kaldt under vinmodningen at den malolaktiske fermenteringen vanskelig blir igangsatt naturlig. Vi intervjuet ett av startkulturfirmaene om malolaktisk fermentering. De produserer bakteriekulturer for vin, men uttrykker at salget av slike kulturer ikke er så høyt som ønskelig. Representanten for startkulturfirmaet fortalte at bakteriearten *Leuconostoc oenos* brukes til malolaktisk fermentering. Representanten antok at det ikke var levende bakterier i den ferdige vinen. I følge Nielsen og Richelieu (1999) har bakterien som brukes i vin nå fått navnet *Oenococcus oeni*.

## 5.2 Hvem produserer startkulturene som brukes i Norge og ellers i verden?

De aller fleste av startkulturene som benyttes i Norge i dag, er produsert av utenlandske firma.

Startkulturene som benyttes i norske meierieprodukter kommer hovedsakelig fra de danske firmaene Christian Hansen og Visby Tønder ApS. Disse firmaene selger startkulturer til hele verden. Christian Hansen karakteriserer seg selv som ledende på startkulturer innen meieriindustrien. Firmaet Texel nevnes ofte som et eksempel på store firma som produserer startkulturer. Startkulturer fra Texel forekom nærmest aldri i vårt material.

Vi intervjuet 4 store norske spekepølseprodusenter, én mellomstor og 2 mindre. Seks av disse 7 produsentene bruker startkulturer i spekepølseproduksjonen. Også noen av spekepølseprodusentene får startkulturer fra Chr. Hansen og Visby. Det er vanlig at spekepølseprodusentene får sine kulturer fra de tyske firmaene Gewürzmüller og Raps via norske importfirma (f. eks. A. B. Korneliussen og Landteknikk). To av spekepølseprodusentene benytter også norskproduserte startkulturer.

Alle de intervjuede startkulturfirmaene oppgav at de solgte sine produkter til hele verden. Firmaet som produserer startkulturer for spekepølser oppgav imidlertid at de solgte lite til Asia. Dette ble forklart med at det der brukes andre typer fermenterte matvarer.

## 5.3 Hvilke bakterier inngår i startkulturene?

Felles for de fleste startkulturene i vårt material, er at de inneholder melkesyrebakterier. Dette gjelder både meieriprodukter og spekepølser.

I oster, smør, surmelk og rømme er de vanligste bakteriene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Dette er mesofile startkulturer, dvs. bakteriene vokser best ved temperaturer mellom 18 og 32 °C. Oppsummert kan vi si at det hovedsakelig er

to bakteriearter som benyttes i den type meieriprodukter som er nevnt ovenfor, dvs. *Lactococcus lactis* og *Leuconostoc mesenteroides*.

I yoghurt brukes bakteriene *Streptococcus thermophilus* og *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (også benevnt *Lactobacillus bulgaricus* av meieriene). Disse bakteriene er termofile, og vokser best ved temperaturer mellom 37 og 45 °C. For å kunne kalles yoghurt, må *S. thermophilus* og *L. delbrueckii* inngå. I tillegg kan også andre bakterier inngå, slik som *Lactobacillus acidophilus*.

I meieriprodukter er det nesten bare melkesyrebakterier (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* og *Leuconostoc*) som benyttes i startkulturene. Vi vil poengtere at også andre typer bakterier benyttes til utvalgte produkter. Eksempler er her *Bifidobacterium* (probiotika) og *Propionibacterium* (Jarlsberg ost).

Alle spekepølser og nesten alle fermenterte meieriprodukter inneholder melkesyre-bakterier. Det brukes imidlertid andre typer melkesyrebakterier i spekepølser enn i meieriprodukter. Slekten *Lactobacillus* brukes i spekepølser. Artene er her ofte *Lactobacillus sake*, *L. curvatus* og *L. plantarum*. *Lactobacillus* brukes også i yoghurt, men artene er ikke de samme som i spekepølser. I norske meieriprodukter er ofte melkesyrebakteriene *Lactococcus* og *Leuconostoc* representert.

Til forskjell fra fermenterte meieriprodukter, er norske spekepølser nærmest alltid tilsatt andre bakterier i tillegg til *Lactobacillus*-bakterier. Pølseprodusentene kaller ofte disse andre for “mikrokokker”. Med ‘mikrokokker’ mener de *Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus*, *Pediococcus pentasaceus* eller en *Micrococcus*-art som vi ikke fant i de vanligste opplagsverkene (Bergey’s manual of systematic bacteriology, 1986; Bergey’s manual of determinative bacteriology, 1994).

Når det gjelder tradisjonelle næringsmidler, benyttes i Norge probiotikakulturer kun i surmelks- og yoghurtprodukter. Følgende probiotika-bakterier er benyttet i norske produkter: *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus acidophilus* og *L. rhamnosus* (benevnt *Lactobacillus* GG). Probiotiske produkter inneholder gjerne andre bakterier enn bare probiotiske. Eksempelvis vil ‘probiotisk’ yoghurt også være tilsatt tradisjonelle yoghurt-bakterier som *Streptococcus thermophilus* og *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

## 5.4 Antall stammer i en startkultur

En startkultur kan være definert eller udefinert. En definert startkultur inneholder kun definerte bakteriestammer, dvs. slike som er identifisert til stamme-nivå. En udefinert startkultur inneholder stammer som kun er identifisert til arts-eller underartsnivå.

To bakteriearter var vanligvis representert i én og samme startkultur (vedlegg 1). Innenfor hver art er opp til 3 underarter representert; eksempelvis inngikk tre underarter av *Lactococcus lactis* i flere av startkulturene for meieriprodukter.

Definerte meierikulturer inneholder vanligvis 2-4 bakteriestammer (maksimalt 10). Det svenske meieriet som inngår i undersøkelsen fortalte at de bare hadde ett produkt som kun inneholdt én stamme. Dette var et probiotika-produkt. Spekepølsekulturer

(definerte) som benyttes i Norge inneholder vanligvis 2 stammer fra henholdsvis slektene *Lactobacillus* og *Staphylococcus*.

Et eksempel på en udefinert kultur, er en kultur som består av underartene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *diacetylactis* og *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Innen hver av disse underartene er det et ukjent antall stammer. En av startkulturprodusentene sa følgende: “En udefinert startkultur kan bestå av kanskje 100, kanskje 1000 stammer.”

Meierieprodukter som ost og surmelk er tilsatt udefinerte startkulturer, mens yoghurt og probiotika-produkt tilsettes definerte kulturer. Nesten alle startkulturer for spekepølser er definerte. Konklusjonen er at tradisjonelle meierikulturer er udefinerte, mens spekepølser oftest er tilsatt definerte kulturer. I intervjuet sa en av startkulturprodusentene at de produserer omtrent like mye av definerte og udefinerte kulturer, og at de ønsker å fortsette med begge typene. “De udefinerte kulturene er mer robuste enn de definerte, f. eks. er fagresistensen større.” Han framhevet at det er en tendens mot å foretrekke definerte kulturer. “Definerte kulturer bidrar til økt kontroll med fermenteringsprosess og -produkt, f. eks. huller i osten. Meieriene ønsker å definere sin produktkvalitet.” Problemet med definerte kulturer er at “det kan være vanskelig å få noen få bakteriestammer til å gjøre det samme som mange gjør”. Vi fikk også opplyst at definerte kulturer er dyrere enn udefinerte.

Antall ulike startkulturer produsert av det enkelte firma varierte fra ca. 10 til 200. Én og samme bakterie kan gå igjen i flere startkulturer; det er kombinasjonen av bakterier som gjør en startkultur unik.

## 5.5 I hvilken grad benyttes probiotika-kulturer?

I Norge brukes probiotika-kulturer primært i meieriprodukter. Dette gjelder noen få surmelks- og yoghurtprodukter. Her til lands brukes ikke probiotikakulturer i pølser. En av startkulturprodusentene fortalte imidlertid at de hadde søkt patent på en probiotisk stamme beregnet for spekepølser.

Det vi kan kalle probiotikakulturer selges også på apotek. Disse foreligger i form av tabletter. Vi har undersøkt resistens til bakterier i 2 slike produkt.

## 5.6 Bakteriekonsentrasjoner i det ferdige produkt

Et av de norske meieriene oppgav at det var ca.  $10^8$  cfu/ml i flytende meieriprodukt og ca.  $10^7$  cfu/g i faste produkt. Det svenske meieriet oppgav bakteriekonsentrasjoner på  $5 \times 10^8$ - $10^9$  cfu/ml for surmelk og “kanskje  $10^8$  cfu/g for ost”. Fordi bakteriekonsentrasjoner avhenger av type produkt og dets alder, konkluderer vi med at norsk og svensk meieri gav overensstemmende opplysninger om bakteriekonsentrasjoner i sine produkt.



Spekepølseprodusentene var generelt usikre på bakteriekonsentrasjonene i de ferdige produktene. Noen svarte at konsentrasjonene varierte mye, og spesielt fra pølsetype til pølsetype. Andre svarte at de aldri hadde testet bakteriekonsentrasjonen i ferdig pølse. To av 7 pølseprodusenter oppgav at konsentrasjonene lå mellom  $10^7$  og  $10^8$  cfu pr. gram. En tredje oppgav konsentrasjoner fra  $3 \times 10^6$  til  $10^8$  cfu pr. gram. Produsentene gav ulike opplysninger med hensyn til hvilken bakteriegruppe som dominerer i det endelige produktet. En av produsentene sa: “Stikkontroll viser at melkesyrebakteriene er i flertall. Disse har en tendens til å leve lenge.” En annen sa: “*Lactobacillus* er lite aktiv i sluttproduktet. Antar at *Staphylococcus* dominerer i den ferdige pølse.” Et av firmaene hadde målt bakterielle konsentrasjoner i både hakken og etter røyking (før tørking): Det ble benyttet 3 bakteriestammer, dvs. to *Lactobacillus*-stammer og én *Staphylococcus*-stamme. I hakken lå konsentrasjonene av samtlige tre rundt  $5 \times 10^5$  cfu/g. I den røykte pølsen var konsentrasjonene av *Staphylococcus*- og den ene *Lactobacillus*-stammen hver ca.  $5 \times 10^5$  cfu/g, mens den andre *Lactobacillus*-stammen var kommet opp i  $5 \times 10^8$  cfu/g.

Konklusjonen er at det varierte sterkt hvor mye produsenter av næringsmidler visste om bakteriekonsentrasjonene i sine produkt. Meieriansatte virket sikrere enn produsenter av spekepølser.

## 5.7 Hva vet informantene om antibiotikaresistens hos de bakteriene de benytter?

De fleste bedriftene vi kontaktet var positive til å la seg intervju om temaet ‘antibiotikaresistens hos bakterier som inngår i startkulturer’. Samtlige av de kontaktede norske næringsmiddelprodusentene lot seg intervju. Som referanser til de norske næringsmiddelprodusentene kontaktet vi et svensk og et dansk firma. Det svenske meieriet ble med i undersøkelsen. Det danske firmaet ønsket ikke å være med, men opplyste at de benyttet startkulturer fra anerkjente startkulturprodusenter som Chr. Hansen as, Visby og Texel. Av 6 kontaktede startkulturfirma, viste 3 liten interesse for eller var motvillige til intervju (ble ikke intervjuet). De tre øvrige viste positiv interesse, og ble intervjuet. To av de 4 firmaene som ikke ønsket å være med (én næringsmiddelprodusent og én startkulturprodusent), grunngav dette med at de var skeptiske til den negative publisitet undersøkelsen kunne skape om deres produkter.

Informantene var i utgangspunktet lite opptatt av antibiotikaresistens i startkulturene. Spesielt gjaldt dette spekepølseprodusentene. Ingen av disse visste noe om antibiotikaresistensen til de bakteriestammene de benyttet. De målte aldri resistens, og søkte heller ikke informasjon på dette området. En representativ kommentar var: “Aldri vært diskutert.” Et mindretall av spekepølseprodusentene visste heller ikke navnet på de bakteriene de tilsatte spekepølsene.

De intervjuede meieriene hadde en del kunnskap om antibiotikaresistens i sin alminnelighet. De hadde imidlertid lite spesifikk kunnskap om resistensen til bakteriene i benyttede startkulturer/probiotiske kulturer. Et av de norske meieriene oppgav at de “måler resistens på noe”. Informanten sa: “Vi er opptatt av at resistensen ikke må være overførbart.” Informanten sa også at de hadde “relativt lite resultater foreløpig”. “Undersøkelser er på gang.” Det ble også påpekt at meieriet hadde en god dialog med

sine starkulturprodusenter med hensyn til bakterienes resistens. Det andre norske meieriet målte ikke på resistens. De hadde heller ikke diskutert antibiotikaresistens internt i meieriet eller med startkulturprodusentene. Heller ikke det svenske meieriet hadde målt antibiotikaresistens hos bakteriene i startkulturene. Temaet var ikke tatt opp med produsentene av startkulturer.

Kunnskap om antibiotikaresistens knyttet til startkulturer var størst i firmaene som produserer startkulturer. Samtlige 3 firma oppgav at de hadde testet eller var i ferd med å teste en del av sine stammer. Vår oppfatning var at testingen hadde svært ulikt omfang i de ulike firmaene. Det første firmaet undersøkte kun unntaksvis antibiotikaresistens. *Enterococcus faecium* ble nevnt som eksempel. Ellers oppgav de å være orientert om antibiotikaresistens hos sine bakterier gjennom litteraturen. Det andre firmaet sa at de hadde et prosjekt hvor de undersøkte antibiotikaresistens hos sine bakterier. Prosjektet var ikke avsluttet. Informanten fortalte at resultatene var lovende uten at dette ble konkretisert. De benyttet agardiffusjonsmetoden. Det tredje firmaet hadde undersøkt antibiotikaresistens både til egne stammer og en del stammer til konkurrenter. Vi fikk tilsendt resultatene som dokumentasjon. Disse resultatene var ikke direkte sammenlignbare med våre resultat.

Vi fikk i liten grad svar på om bakteriene som brukes i startkulturer og probiotikakulturer er multiresistente. Spekepølseprodusentene sa rett ut at de ikke visste noe om antibiotikaresistens hos sine kulturer. Heller ikke meieriene lot til å ha konkret viten om de benyttede kulturer. Kun ett av startkulturfirmaene kunne dokumentere at de hadde undersøkt resistens både hos sine egne og konkurrentenes stammer (se Diskusjon).

## **5.8 Oppfattes antibiotikaresistens i startkulturer som et viktig område?**

Resistensegenskaper er ikke tatt hensyn til ved utvelgelse av bakteriestammer for start- og probiotikakulturer. Resistensegenskapene til bakteriene var stort sett ukjente. Likevel mente de fleste informantene at problematikken knyttet til antibiotikaresistens er viktig. Informantene oppgav ulike årsaker til hvorfor antibiotikaresistens er viktig. Vi vil nedenfor gjengi ulike forklaringer:

Startkulturprodusentene:

“Antibiotikaresistens er viktig i den grad opinionen er opptatt av dette. Resistens er relevant når det dreier seg om overførbart resistens.”

“Vi har fulgt problematikken. Ble opptatt av dette for mange år siden. Det vil kanskje bli mer aktuelt i framtiden enn fram til nå. Det må bli et krav før vi vil gå inn på omfattende testing.”

“Antibiotikaresistens er relevant. Det er viktig å skille mellom naturlig og overførbart resistens. Grunnen til at vi tester for resistens er å gi selgeren argumenter. Hvis selgeren får beskjed om at startkulturen ikke virker, kan han forklare dette med at kjøttet trolig inneholder antibiotikarester og at startkulturbakteriene er sensitive.”

Spekepølseprodusentene svarte følgende på spørsmålet om antibiotikaresistens er viktig:

“Har ikke tenkt på det før. Skulle vi få *det* inn i produktet, vil det ikke påvirke dette direkte, men evt. de sjukdomsframkallende bakteriene.”

“Har ikke vært et tema før du snakket om det.”

“Har ikke gjort det. Tror ikke vi har tenkt i de baner.”

“Ja, hvis *det* er der, vil det være uhyre viktig.”

Meieriene svarte følgende på spørsmålet om antibiotikaresistens er viktig:

“Antibiotikaresistens er viktig på samme nivå som andre helse spørsmål.”

“Ja, veldig viktig. Er oppmerksom på dette. Anser ikke risikoen som så stor. Det er antibiotikaforbruket som er stort.”

“Ja, det er viktig å sikre at produktet ikke medfører risiko for konsumentene.”

Oppsummert oppgav de fleste at antibiotikaresistens er viktig med hensyn til startkulturer. Unntak var her de fleste av spekepølse-produsentene som ikke hadde tenkt på antibiotikaresistens som et aktuelt område. En av startkulturprodusentene oppgav en annen grunn enn helseperspektivet for at de undersøkte antibiotikaresistens. Firmaet undersøkte resistensmønstrene til startkulturene for å gi sine selgere argumenter hvis de fikk klager på at bakteriene ikke vokste opp. Antibiotikasensitive bakterier vil ikke vokse opp hvis det er rester av respektive antibiotika i kjøttet som skal bli spekepølse.

## **5.9 Er det noen grunn til å tro at fermenterte næringsmidler fra utlandet inneholder mer resistente bakteriestammer enn norske produkt?**

På spørsmålet ovenfor fikk vi tre kategorier svar som nedenfor er representert med sitater:

1. “Tror ikke at det er forskjell med hensyn til startkulturene. Startkulturene er i stor grad internasjonale.”
2. “Ja, i utgangspunktet vil jeg tippe det. Ikke i startkulturene, men i de bakteriene som følger kjøttet. Det brukes mer antibiotika på dyr i andre land. De medfølgende bakteriene vil være i fåtall, men kan evt. overføre sin resistens til bakteriene i startkulturene.”
3. “Har ikke formening om dette.”

## 5.10 Lovverk

Finnes det et lovverk som regulerer bruk av startkulturer/probiotiske kulturer? Ingen av de intervjuede personer kjente til et slik lovverk, og trodde heller ikke at det finnes. Vi kontaktet Statens næringsmiddeltilsyn i Oslo (SNT), og fikk bekreftet mangelen på norsk lovverk som regulerer bruk av startkulturer. SNT visste ikke om andre land har et slikt lovverk.

Vi fant at Danmark har et lovverk som regulerer bruk av startkulturer (Sundhedsministeriets bekendtgørelse nr. 1055 af 18. december 1995, bilag 4). Det skal her gis tekniske data som f. eks. formål og nytte ved kulturen. Kulturen skal også bl. a. dokumenteres i form av navngiving av hver enkelt stamme, renhet og evt. dannelselse av giftige eller antibiotiske forbindelser. Krav til dokumentasjon av bakteriestammens antibiotikaresistens-mønster er ikke innbefattet.

Vi vil kommentere at det danske kravet til startkulturer er langt 'mildere' enn det norske kravet til mikroorganismer som skal settes ut. I henhold til 'Produktkontrolloven, Forskrift om deklarerings og merking av mikrobiologiske produkter av 01.02.98' skal produsenter/importører av mikrobiologiske produkter for åpen bruk bl. a. dokumentere hvorvidt bakteriestammer er resistente overfor spesifiserte antibiotika. Det er nærmest et paradoks at bakterier som settes ut på f. eks. en oljetilsølt strand skal deklarerer med hensyn til antibiotikaresistens, mens det ikke finnes et spesifikt lovverk som setter krav til bakterier som tilsettes næringsmidler.

## 6 Resultater fra laboratoriet

### 6.1 Bakteriekonsentrasjoner i næringsmidlene

Bakteriene isolert fra spekepølsene fantes i tettheter fra  $10^2$  til  $10^7$  cfu/g produkt, der de fleste lå på  $10^6$ /g. For meieriproduktene var tetthetene noe høyere, mellom  $10^5$ - $10^9$  cfu/g, de fleste lå på  $10^7$  cfu/g.

Bakteriekonsentrasjonene målt i laboratoriet er i rimelig god overensstemmelse med opplysninger gitt av næringsmiddelprodusentene.

### 6.2 Pålitelighet av resultatene

Ingen av de undersøkte isolatene vokste på referansemediet Mueller Hinton Agar (MHA). Ved testing av referansestammer, fant vi imidlertid at de benyttede medier viste hemmingssoner som i de fleste tilfellene ikke skilte seg signifikant fra tilsvarende soner på MHA (vedlegg 2). Ved resistenstesting mot ciprofloxacin, gentamicin, tetracyklin (80µg) og penicillin på MRS 5.4. ble det påvist signifikant forskjellige hemmingssoner sammenlignet med dem på MHA. I vedlegg 7A er de hemmingssonene som er avlest på MRS 5.4 for disse antibiotikaene avmerket.

En fullstendig oversikt over resultatene fra antibiotikaresistensundersøkelsen, med hemmingssonestørrelser og karakterisering som resistent (R), intermediær (I) eller sensitiv (S), er samlet i vedlegg 7A og 7B. Resultatene er oppsummert i tekst og tabeller nedenfor.

Usikkerheten i avlesningen av hemmingssonene er satt til +/-2mm (vedlegg 6). I vedlegg 7B, der sonestørrelsene er omsatt til R, I eller S-betegnelser, er det tatt hensyn til denne usikkerheten, noe som medførte at enkelte isolater ble plassert som både R og I, både S og I eller i alle 3 gruppene. I inneværende kapittel angis resultatene i form av R, I eller S, der I/R, R/I og R betegnes som R, R-I-S og S-I-R betegnes som I, og I/S, S/I og S betegnes som S. Den første bokstaven angir isolatets følsomhet ut fra den avleste sonestørrelsen.

For 11 av isolatene ble følsomhet overfor antibiotika testet ved både agardiffusjons- og MIC-metoden. Resultatene samsvarte godt (tabell 4), noe som støtter påliteligheten av agardiffusjonsmetoden.

**Tabell 4.** MIC-verdier for startkultur- og probiotikabakterier.

Isolatnr.	Bakterieslekt	MIC-verdier ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>1)</sup>								
		CI	CE <sup>2)</sup>	EM	GM (lav)	PG (lav) <sup>3)</sup>	SU	TC	TR	VA
SS-5	<i>Lactobacillus</i>	>32	8		32					>256
SS-25	<i>Staphylococcus</i>							256		
SM-12	<i>Lactococcus</i>	32								
SM-15	<i>Lactobacillus</i>	>32			>256					
SM-18	<i>Lactobacillus</i>	>32								
SM-19	<i>Lactobacillus</i>				24					>256
SM-24	<i>Leuconostoc</i>	>32								>256
Im-8	<i>Leuconostoc</i>	>32				0,38	>256		>32	>256
Im-19	<i>Lactobacillus</i>			1.5	24		>256		>32	>256
Pr-3	<i>Bifidobacterium</i>			24	>256		>256		>32	
Pr-4	<i>Enterococcus</i>	1,5	256	12	24	6				

<sup>1)</sup> Forklaring på forkortelser på antibiotika: CI=ciprofloxacin, CE=cefotaxim, EM=erythromycin, GM=gentamicin, PG=benzylpenicillin, SU=sulphadiazin, TC=tetracyclin, TR=trimetoprim, VA=vancomycin

<sup>2)</sup> Cefotaxim ble benyttet ved agardiffusjonsmetoden

<sup>3)</sup> Penicillin (lav) ble benyttet ved agardiffusjonsmetoden

### 6.3 Resistens hos spekepølsebakterier

Vi undersøkte 25 bakterieisolater fra startkulturer til spekepølser. Herav var det 9 *Staphylococcus*-isolater, 14 *Lactobacillus*-isolater, 1 *Pediococcus*-isolat og 1 *Micrococcus*-isolat.

Det ble undersøkt 17 bakterieisolater fra spekepølser. Herav var det 6 *Staphylococcus*-isolater, 10 *Lactobacillus*-isolater og 1 *Pediococcus*-isolat.

Antall undersøkte bakterier fra hver bakterieslekt samt andel resistente bakterier mot de ulike antibiotika er gitt i tabell 5.

**Tabell 5.** Antall undersøkte bakterier fra hver av de ulike bakterieslektene som inngikk i henholdsvis startkulturene til spekepølse og selve spekepølsene samt antall resistente isolater innen hver slekt.

Bakterieslekt	Prøvematerial	Antall undersøkte isolater	Antall resistente isolater								
			Amp	Cefo	Cipr	Ery	Gen	Tet 80	Van	Pen	Trim/sulf
<i>Lactobacillus</i>	Startkultur	14	0	7	11	0	8	0	11	- <sup>1)</sup>	-
	Næringsmiddel	10	0	0	10	0	9	0	10	2	8
<i>Staphylococcus</i>	Startkultur	9	0	0	0	0	0	2	0	-	-
	Næringsmiddel	6	0	0	0	0	0	1	0	2	0
<i>Pediococcus</i>	Startkult	1	0	0	1	0	0	0	1	-	-
	Næringsmiddel	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1
<i>Microoccus</i>	Startkultur	1	0	0	0	0	0	0	0	-	-

<sup>1)</sup>: Ingen av startkulturbakteriene ble undersøkt med hensyn til pencillin, trimetoprim/sulfa, tetracyclin (lav) og chloramphenicol. Isolatene fra spekepølse ble testet for resistens mot samtlige antibiotika. Vi har ikke inkludert tetracyclin (lav) og Chloramphenicol i tabellen fordi grenseverdier for resistens ikke er oppgitt. Resultatene for isolat fra spekepølse var her:

Tetracyclin(lav): 1 isolat ≤15mm, 6 isolater 15-25mm, 10 isolater ≥25mm

Chloramphenicol: 1 isolat ≤15mm, 16 isolater ≥25mm

Ingen av *Lactobacillus*-stammene var sensitive overfor vancomycin. De fleste var resistente, mens noen få kom ut som intermediære (vedlegg 7). *Staphylococcus*-stammene var alle sensitive overfor vancomycin.

Grenseverdier for chloramphenicol (10 µg) og tetracyclin (10 µg) er ikke oppgitt. Vi påviste generelt relativt store soner på skåler med disse antibiotikaene (tab. 5), dvs. lite resistens. To *Staphylococcus*-isolat fra spekepølse var imidlertid resistente overfor tetracyclin (også høy konsentrasjon). Ett av disse isolatene gikk videre til genetiske overføringsstudier og plasmidundersøkelse.

Vi fant at 8 av 25 undersøkte stammer fra startkulturene var multiresistente, dvs. resistente mot minst 3 antibiotika som hvert representerer en separat antibiotikagruppe. Alle de multiresistente stammene tilhørte slekten *Lactobacillus*. De 8 multiresistente stammene viste omtrent samme resistensmønster. Alle var resistente overfor ciprofloxacin, gentamicin og vancomycin. I tillegg var tre av stammene også resistente overfor cefotaxim. De resistente stammene var fordelt på artene *L. curvatus*, *L. sake*, *L. plantarum* og *L. farcinus*.

Ti av 17 isolat fra spekepølsene var multiresistente. Alle multiresistente isolat fra spekepølsener tilhørte slekten *Lactobacillus*. I likhet med de multiresistente startkulturbakteriene, var alle 10 isolatene resistente mot ciprofloxacin, gentamicin og vancomycin. Ingen viste imidlertid resistens overfor cefotaxim. Stammene fra spekepølsener ble til forskjell fra startkulturbakteriene testet med hensyn til penicillin, lav

konsentrasjon av tetracyclin, pencillin og trimetoprim/sulfa. Flesteparten av de multiresistente stammene viste resistens overfor trimetoprim/sulfa. Én stamme (*Pediococcus*-stamme) viste i tillegg moderat resistens overfor penicillin.

Oppsummert var resistens mot ciprofloxacin, gentamicin og vancomycin typisk for de stammene som var multiresistente. Kun *Lactobacillus*-stammer var multiresistente.

## 6.4 Bakterier brukt i meieriprodukter

Det ble undersøkt 25 bakterieisolater fra startkulturer til meieriprodukter. Herav var det 8 *Lactococcus*-isolater, 8 *Leuconostoc*-isolater, 6 *Lactobacillus*-isolater, 2 *Streptococcus*-isolater og 1 *Bifidobacterium*-isolat.

Vi undersøkte 14 bakterieisolater fra meieriprodukter. Herav var det 6 *Lactococcus*-isolater, 5 *Lactobacillus*-isolater, 2 *Streptococcus*-isolater og 1 *Propionibacterium*-isolat.

Antall undersøkte bakterier fra hver bakterieslekt samt andel resistente bakterier mot de ulike antibiotika er gitt i tabell 6.

**Tabell 6.** Antall undersøkte bakterier fra hver av de ulike bakterieslektene som inngikk i henholdsvis startkulturer til meieriprodukter og meieriprodukter, og antall resistente isolater innen hver slekt.

Bakterieslekt	Prøvematerial	Antall undersøkte isolater	Antall resistente isolater								
			Amp	Cefo	Cipr	Ery	Gen	Tet 80	Van	Pen	Trim/sulf
<i>Lactococcus</i>	startkultur	8	0	0	1	0	0	0	0	- <sup>1)</sup>	-
	meieriprodukt	6	0	0	1	0	0	0	0	0	3
<i>Leuconostoc</i>	startkultur	8	0	0	1	0	0	0	5	-	-
<i>Lactobacillus</i>	startkultur	6	0	0	5	0	3	0	1	-	-
	meieriprodukt	5	0	0	4	0	4	0	3	0 <sup>2)</sup>	3 <sup>2)</sup>
<i>Streptococcus</i>	startkultur	2	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	meieriprodukt	2	0	0	0	0	0	0	0	-	-
<i>Bifidobacterium</i>	startkultur	1	0	0	0	0	0	0	0	-	-
<i>Propionibacterium</i>	meieriprodukt	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>1)</sup>: Ingen av startkulturbakteriene ble undersøkt med hensyn til pencillin, trimetoprim/sulfa, tetracyclin (lav) og chloramphenicol. Isolatene fra selve meieriproduktene ble testet for resistens mot samtlige antibiotika. Vi har ikke inkludert tetracyclin (lav) og Chloramphenicol i tabellen fordi grenseverdier for resistens ikke er oppgitt. Resultatene for isolat fra meieriprodukter var her:

Tetracyclin(lav): 12 isolater  $\geq 25$  (totalt undersøkt 12 isolater)

Chloramphenicol: 1 isolat 15-25mm, 11 isolater  $\geq 25$  (totalt undersøkt 12 isolater)

<sup>2)</sup>: Kun 4 isolater undersøkt.



Ingen isolater fra de undersøkte startkulturer var multiresistente. *Leuconostoc*-stammene var stort sett kun resistente overfor vancomycin (ett unntak var her ikke resistent overfor vancomycin). I motsetning til *Lactobacillus*-stammer brukt i spekepølsekulturer, var *Lactobacillus*-stammer i meierikulturer stort sett sensitive overfor vancomycin (ett unntak) (vedlegg 7). Vi vil poengtere at meieri- og spekepølseindustrien ikke bruker de samme *Lactobacillus*-artene.

Vi fant 4 (av 14) multiresistente stammer i meieriproduktene (vedlegg 7). Samtlige tilhørte slekten *Lactobacillus*. Bakteriestammene var isolert fra yoghurt og ost. De viste stort sett resistens overfor ciprofloxacin (ett unntak), gentamicin (én intermediær), vancomycin (ett unntak) og trimetoprim/sulfa. De observerte resistensmønstre har stor likhet med mønstrene til multiresistente spekepølsebakterier. Ikke alle *Lactobacillus*-isolatene var resistente overfor vancomycin. Resistens mot ciprofloxacin og gentamicin var utbredt blant *Lactobacillus*-isolatene, men også her var det flere unntak.

En årsak til at vi kun fant multiresistente isolat i selve meieriproduktene og ikke i startkulturene, kan være at startkulturbakteriene ble testet for resistens mot færre antibiotika.

Oppsummert fant vi at slekten *Lactobacillus* stort sett var resistent overfor ciprofloxacin og gentamicin. Det varierte om *Lactobacillus*-isolatene var resistente mot vancomycin. *Leuconostoc*-stammene var kun resistente overfor vancomycin. *Lactococcus*-stammene var stort sett sensitive overfor de valgte antibiotika.

#### 6.4.1 Bakterier isolert fra importerte oster

Vi undersøkte 30 bakterieisolater fra importerte oster. Bakterienes slektstilhørighet er ikke kjent. Antall resistente stammer pr. antibiotikum er gitt i tabell 7.

**Tabell 7.** Bakterier fra importerte oster. Antall resistente stammer pr. antibiotikum.

Antibiotikum <sup>1)</sup>	Antall resistente stammer av 30
Ampicillin	0
Cefotaxim	1
Ciprofloxacin	8
Erythromycin	2
Gentamicin	3
Tetracyclin (høy)	0
Vancomycin	19
Penicillin	9
Trimetoprim/sulfa	16

<sup>1)</sup>Vi har ikke inkludert tetracyklin (lav) og chloramphenicol i tabellen fordi grenseverdier for resistens ikke er oppgitt. Resultatene var her:

Tetracyklin(lav): 16 isolater 15-25 mm, 14 isolater  $\geq$  25 mm

Chloramphenicol: 7 isolater 15-25mm, 23 isolater  $\geq$ 25

Ti av 30 isolat fra importerte oster var multiresistente. Vi fant også her multiresistens mot ciprofloxacin, gentamicin, vancomycin og trimetoprim/sulfa, dvs. likt med en del *Lactobacillus*-isolat fra norskproduserte produkt. Isolat fra importerte oster var imidlertid generelt mer resistente enn norskproduserte meieri- og spekepølseprodukt. Dette betyr både at forholdsvis mange stammer var multiresistente og at multiresistensen omfattet flere antibiotika. Vi observerte resistens mot både erythromycin og penicillin i de importerte ostene (vedlegg 7).

#### 6.4.2 Bakterier isolert fra tarmflorastabiliserende preparater

Det ble undersøkt til sammen 6 bakterieisolater fra preparatene Idoform og Paraghurt. Vi antar artene *Enterococcus faecium* (tidl. *Streptococcus faecium*), *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus* og *Lactobacillus bulgaricus* var representert blant disse isolatene. Antall resistente stammer pr. antibiotikum er gitt i tabell 8.

**Tabell 8.** Antall resistente stammer pr. antibiotikum isolert fra tarmflorastabiliserende preparater

Antibiotikum	Antall resistente stammer av 6
Ampicillin	0
Cefotaxim	3
Ciprofloxacin	4
Erythromycin	4
Gentamicin	6
Tetracyclin (høy)	0
Vancomycin	0
Penicillin	3
Trimetoprim/sulfa	2

Vi har ikke inkludert tetracyclin (lav) og Chloramphenicol i tabellen fordi grenseverdier for resistens ikke er oppgitt. Resultatene var her:

Tetracyclin(lav): 1 isolat 15-25 mm, 5 isolater  $\geq 25$

Chloramphenicol: 1 isolat 15-25mm, 5  $\geq 25$

Ingen av stammene var resistente overfor vancomycin.

Fem av de 6 undersøkte isolatene var multiresistente, dvs. resistente mot 3-5 antibiotika. Resistens mot ciprofloxacin, cefotaxim, erythromycin, gentamicin, penicillin og trimetoprim/sulfa var til sammen representert hos de multiresistente stammene.

## 6.5 Resultat fra genetiske studier

### 6.5.1 VanA-genet

De 11 utvalgte vancomycinresistente stammene fra slektene *Lactobacillus* og *Leuconostoc* var negative for VanA-genet.

### 6.5.2 Overførbarhet av tetracyclinresistens

**Plasmidprofilering.** Både stamme NS-17 (fra spekepølse) og stamme SS-25 (fra spekepølse-startkultur) inneholdt plasmider, men disse var innbyrdes forskjellige. Plasmidprofilen til SS-25 viste ingen likhet med kjente plasmidprofiler fra tetracyclinresistente *Staphylococcus* spp. isolert fra mastitt hos storfe.

**PCR-analyser.** SS-25 var positiv i PCR analyse for *tetK* genet, men negativ for *tetL* og *tetM* genene. NS-17 var negativ for alle de tre genene.

**Overføringsstudier.** Under de anvendte betingelser kunne det ikke påvises overføring av *tetK* fra SS-25 til NS-17.

## 7 Diskusjon

Diskusjonen omhandler helserisikoen ved inntak av næringsmidler som er tilsatt bakterielle startkulturer. Vi fokuserer på det norske marked.

'The Nordic Committee for Veterinary Scientific Cooperation' hadde høsten 1997 et symposium (NKVet symposium) hvor fokus var antibiotikaresistens. Et sentralt tema var: "Antibiotic resistance in veterinary medicine - the influence on human medicine". Det ble her nærmest utelukkende fokusert på patogene bakterier som problematiske. Dette gjaldt både foredrag, 'work-shop', postere og pausesamtaler. Næringsmidler ble tatt opp som et medium for overføring av antibiotikaresistens til humanpatogene bakterier. Det var imidlertid de bakteriene som ikke skal være i næringsmidler det ble snakket om, slik som *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Escherichia coli* og *Salmonella typhimurium*. Disse bakteriene er enten patogene og/eller de er indikatorbakterier. Det pågår prosjekter i både Danmark (Bager *et al.*, 1997) og Norge (Wasteson, pers. med.) for å kartlegge antibiotikaresistens hos slike bakterier. Vi hørte ikke noen nevne bakterielle startkulturer som mulige overførere av antibiotikaresistens til humanpatogene bakterier.

Fermenterte næringsmidler utgjør globalt ca. 1/3 av vårt kosthold (Campbell-Platt, 1994). Intervjuene viste at alle meieriprodukter bortsett fra noen få som søtmelk, fløte og ulike typer brunost er tilsatt mikrobielle kulturer, først og fremst bakteriekulturer. Alle norske spekepølser inneholder bakterier, de aller fleste i form av startkultur-bakterier. Dette er ensbetydende med at vi kontinuerlig spiser/drikker store mengder levende bakterier.

### 7.1 Naturlig eller overførbar

De intervjuede startkulturprodusentene uttrykte at overførbar resistens ikke er noe problem i forbindelse med de bakteriene som inngår i startkulturer. De understreket at melkesyrebakterier er særdeles trygge. "I den grad disse bakteriene er resistente, gjelder det naturlig resistens." Som eksempel trakk samtlige fram naturlig vancomycinresistens hos melkesyrebakterier. Sikkerheten ved bruk av melkesyrebakterier ble også framhevet av en forsker som ble karakterisert som ekspert på slike bakterier. Det er imidlertid ingen grunn til å utelukke melkesyrebakterier som kilde til spredning av antibiotikaresistens. De kan ta imot og videregående gener for antibiotikaresistens på tilsvarende måte som andre bakterier (Delbos *et al.*, 1992; Sozzi og Smiley, 1980; Vescovo *et al.*, 1982).

Et viktig spørsmål er hvorvidt påvist resistens er naturlig eller ikke. Den påviste resistens hos *Lactobacillus*-isolatene mot trimetoprim-sulfa kan skyldes naturlig resistens mot både trimetoprim og sulfonamider (Katla *et al.*, 1999). Ellers var det også utbredt resistens mot ciprofloxacin og gentamicin hos *Lactobacillus*-isolatene. Det er uklart hvorvidt denne resistensen er naturlig (Katla *et al.*, 1999; Vescovo *et al.*, 1982).

Våre resultat viste at melkesyrebakterier ikke på langt nær alltid er resistente overfor vancomycin. Eksempelvis fant vi både resistente og sensitive isolat innen slekten *Lactobacillus*. De fleste *Leuconostoc*- og *Pediococcus*-stammer samt noen *Lactobacillus*-arter er beskrevet som naturlig resistente overfor vancomycin (Handwerker et al., 1994; Isolini et al., 1990; Tynkkynen et al., 1994). Resistensmekanismen er ikke blitt systematisk undersøkt, kanskje fordi disse bakteriene er vurdert som lite interessante i forbindelse med sykdom. Så langt har en imidlertid ikke kunnet påvise spesifikke vancomycinresistensgener i vancomycinresistente melkesyrebakterier. Det er heller ikke påvist at antatt naturlig vancomycinresistente melkesyrebakterier har overført vancomycinresistens til andre arter (Tynkkynen et al., 1998).

Melkesyrebakterier og stafylokokker utgjør hovedgruppene av bakterier som tilsettes norske fermenterte produkter. Vårt spørsmål er hvorvidt eventuelle resistensgener fra startkulturbakterier kan overføres til andre bakterier vi kommer i berøring med. Overføring av resistensplasmider mellom både fjernt og nært beslektede bakterier er påvist under en rekke laboratoriebetingelser (Brisson-Nöel et al., 1988; Naik et al., 1994). Lin *et al.* (1996) fant stor likhet mellom plasmid-bundne gener for kloramfenikol-resistens i henholdsvis *Lactobacillus reuteri* og *Staphylococcus aureus*. Forfatterne konkluderer med en sannsynlig overføring av kloramfenikolresistens til *L. reuteri*. Cocconcelli *et al.* (1985) påviste overføring av plasmider med antibiotikaresistens fra *Lactobacillus acidophilus* og *L. reuteri* til *Streptococcus lactis*. Vi fant ikke overføring av *tetK*-genet mellom to *Staphylococcus*-stammer i vårt material. Dette negative resultatet kan ikke uten videre overføres til naturlige forhold. Ulike miljøfaktorer og samspillet mellom dem bidrar til at det er vanskelig å anslå omfanget av genoverføringer i naturlige miljø på grunnlag av laboratorieforsøk (Wiik og Karlsen, 1997). Det er også mulig at de valgte laboratoriebetingelser ikke var optimale for overføring. Konklusjonen er at vi vet lite om overførbarheten til den påviste tetracyclinresistens i 2 av våre *Staphylococcus*-stammer.

De ovenfor refererte studier er utført *in vitro*, det vil her si utenfor dyr eller mennesker. Morelli *et al.* (1988) demonstrerte overføring av plasmidbundet resistens *in vivo*, det vil her si i fordøyelseskanalen til mus. Resistensen ble overført fra *Lactobacillus reuteri* til *Enterococcus faecalis*. Reddy et al. (1994) utførte tester som viste at *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* og *L. lactis* subsp. *cremoris* isolert fra råmelk var resistente mot langt flere antibiotika enn de samme underarter fra fermenterte melkeprodukter og industrielle kultursamlinger. Forfatterne foreslår at dette kan skyldes at industrielle bakteriestammer har vært dyrket under antibiotikafrie betingelser, mens stammene fra råmelk har vært utsatt for antibiotikarester i melk eller at de kan ha mottatt resistensgenene fra andre bakterier i melka. Resultatene fra vårt prosjekt viste at bakteriestammer som pr. i dag brukes i norske fermenterte matvarer i liten grad er resistente. Litteraturdata tilsier imidlertid at det ikke er noe i veien for at denne typen bakterier kan erverve omfattende resistens. De samme bakterieslektene som inngår i startkulturer, er også naturlig tilstede eller kan overleve i tarmkanalen til mennesker (Saxelin et al., 1996). Dette tilsier at det er viktig at antibiotikaresistens hos industrielle bakteriestammer rutinemessig kontrolleres slik at resistens ikke overføres til bakterier i vårt fordøyelses- eller luftveissystem.

Bakteriestammene fra importerte oster viste i stor grad liknende resistensmønstre som stammer fra norskproduserte oster. Multiresistensen innbefattet vanligvis ciprofloxacin, gentamicin, vancomycin og trimethoprim/sulfa. Resistens mot erythromycin og penicillin var imidlertid representert i de importerte ostene. I vår undersøkelse er multiresistens ensbetydende med at bakterieisolatet er resistent mot 3 eller 4 antibiotika, i ett tilfelle mot 5 antibiotika. Stammen som var resistent overfor 5 antibiotika var isolert fra en importert ost. Ett av totalt 6 isolat fra norskproduserte oster var multiresistent mens 10 av 30 isolat fra importerte oster var multiresistente. Resultatene fra dette prosjektet og fra arbeidet til Katla et al. (1999) viser at norskproduserte fermenterte næringsmidler er forholdsvis trygge med hensyn til innhold antibiotikaresistente bakterier. Importerte fermenterte næringsmidler bør undersøkes nærmere med hensyn til innhold av antibiotikaresistente bakterier. Ikke fordi våre resultater tyder på stor risiko, men fordi vi ikke har undersøkt importerte næringsmidler systematisk og omfattende.

Bortsett fra én stamme, var stammene fra de tarmstabiliserende tablettene multiresistente. Basert på innholdsdeklarasjon og vår egen identifikasjon, antar vi at isolatene var fordelt på slektene *Bifidobacterium*, *Enterococcus* og *Streptococcus*. De resistente stammene viste generelt andre resistensmønstre enn startkulturbakteriene. Resistens mot ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin og penicillin eller trimetoprim/sulfa forekom gjerne i én og samme stamme. Vi undersøkte ikke hvorvidt resistensen var overførbar. Dette skyldtes at metoder for å studere overførbarhet av gener i startkulturbakterier er lite utprøvet. Fokus har vært på patogene bakterier. Vi anbefaler at forekomst og overførbarhet av resistens hos bakterier som tilsettes tarmflora-stabiliserende tabletter og liknende produkter undersøkes nøye. Mange av oss tar tarmstabiliserende tabletter når vi drar på utenlandstur. Strengt tatt kan disse tablettene bidra til at det oppstår multiresistente patogener. Med andre ord: Det kan ikke utelukkes at multiresistente bakterier som vi tar med oss fra utlandet får deler av sin resistens fra bakterier i tarmflorastabiliserende preparater.

## 8 Konklusjoner

- Aktører innen fermenterte næringsmidler har vært lite opptatt av antibiotikaresistens i bakterielle startkulturer. Vi har imidlertid observert økt fokus blant de involverte firma på dette viktige området i løpet av prosjektperioden (1997-2000).
- Det norske lovverket regulerer i liten grad hvilke bakterier som tilsettes næringsmidlene. Antibiotikaresistens i bakterielle startkulturer og tilsvarende næringsmidler er overhodet ikke berørt. Så langt vi har undersøkt, har heller ikke andre land lovverk som regulerer antibiotikaresistens hos startkultur bakterier.
- Det meste av påvist resistens i isolat fra startkulturer brukt i norske produkt er trolig lite overførbare. Med andre ord: Vi vurderer det slik at det er lav risiko for at bakterier tilsatt norske næringsmidler utgjør en spredningskilde for antibiotikaresistens til sykdomsframkallende bakterier.
- Multiresistensen hos bakterier i importerte oster og ikke minst i tarmflora-stabiliserende preparater var mer omfattende enn hos bakterier i norskproduserte, fermenterte næringsmidler. 'Mer omfattende' betyr både at forholdsvis flere stammer var multiresistente og at resistensen omfattet flere antibiotika.
- Det er viktig å ha kontroll med antibiotikaresistens hos bakterier i fermenterte næringsmidler og tarmflora-stabiliserende preparater. Resistensomfanget bør absolutt undersøkes med jevne mellomrom. Overførbarehet av påvist resistens bør undersøkes nærmere.

## 9 Referanser

- Akcelik, M. 1991.** Plamid mediated antibiotic resistance in *Streptococcus lactis*. Drugs-Tr. J. of Biology 15:181-189.
- Bager, F., J. Boel og T. L. Sørensen. 1997.** Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Danmap. ISSN 1397-078X.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ninth edition. 1994.** Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, eight edition. 1986.** Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Billot-Klein, D., Gutmann, L., Sablè, S., Guittet, E., Van Heijenoort, J. 1994.** Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level Vancomycin resistant VanB-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus apentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Enterococcus gallinarum*. Journal of Bacteriology. Apr.: 2398-2405.
- Brisson-Nöel, A., M. Arthur og P. Courvalin. 1998.** Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170:1739-1745.
- Brock, T. D., M. T. Madigan, J. M. Martinko og J. Parker. 1994.** Biology of microorganisms, Seventh edition, 909 s. Prentice-Hall International, Inc. USA.
- Campbell-Platt, G. 1994.** Fermented foods - a world perspective. Food Research International 27:253-257.
- Casals, J. B. og N. Pringler. 1991.** Antibacterial/antifungal sensitivity testing using Neo-Sensitabs, 9<sup>th</sup> ed. Rosco, Taastrup, Denmark.
- Clark, N.C., R. C. Cooksey, B. C. Hill, J. M. Swenson og F. C. Tenover. 1993.** Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. 37:2311-2317.
- Campbell-Platt, G. 1994.** Fermented foods - a world perspective. Food Research International 27:253-257.
- Cassell, G. 1995.** ASM task force urges broad program on antimicrobial resistance. ASM News 61:116-120.
- Cocconcelli, P. S, L. Morelli og M. Vescovo. 1985.** Conjugal transfer of antibiotic resistances from *Lactobacillus* to *Streptococcus lactis*. Microbiologie - Aliments - Nutrition 3:163-165.
- D'Amato R. F. og L. Hochstein. 1982.** Evaluation of a rapid inoculum preparation method for agar disk diffusion susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. 15:282-285.



- Delbos, F., G. de Céspedes, A. Derbise og T. Horaud. 1992.** Spread of chromosomal genetic elements and antibiotic resistance genes in group A, B, C and G Streptococci. Proceedings of the XI Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases Siena, September 10-14, 1990.
- Ericsson, H. M. og J. C. Sherris. 1971.** Antibiotic susceptibility testing. Report of an International Collaborative Study. Acta Path. Microbiol. Scand. Sec. No. 217.
- Gasser, F. 1994.** Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. Bulletin De L Institut Pasteur 92: 45-67.
- Godfrey, A. J. og L. E. Bryan. 1984.** Intrinsic resistance and whole cell factors contributing to antibiotic resistance, s. 113-145. I L. E. Bryan (red.) Antimicrobial drug resistance. Academic Press, Inc. USA.
- Handwerger, S., M. J. Pucci, K. J. Volk, J. Liu og M. S. Lee. 1994.** Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. J. Bacteriol. 176:260-264.
- Isolini, D., G. M., et al. 1990.** Selektivmedien sum nachweis von obligat und fakultativen heterofermentativen laktobazillen. Schweiz.. Milchw. Forschung 19:57-59.
- Katla, A. K., G. Kjeilen og H. Berland. 1999.** Startkulturbakterier i meieriprodukter-antibiotikafølsomhet, produktomfang, regelverk. Oppdragsgiver: Statens Næringsmiddeltilsyn (SNT).
- Kruse, H. og H. Sørum. 1994.** Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. Appl. Environ. Microbiol. 60:4015-4021.
- Levy, S. B. 1998.** The challenge of antibiotic resistance. Scientific American, Feature articles. 0398.
- Lin, C-F., Z-F. Fung, C-L. Wu og T-C. Chung. 1996.** Molecular characterization of a plasmid-borne (pTC82) chloramphenicol resistance determinant (*cat-TC*) from *Lactobacillus reuteri* G4. Plasmid 36: 116-124.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko og J. Parker. 1997.** Brock, Biology of microorganisms. Eighth edition. Prentice-Hall International, Inc. USA.
- Morelli, L., P. G. Sarra og V. Bottazzi. 1988.** *In vivo* transfer of pAMβ1 from *Lactobacillus reuteri* to *Enterococcus faecalis*. Journal of Applied Bacteriology 65:371-375.
- Naik, G. A., L. N. Bhat, B. A. Chopade og J. M. Lynch. 1994.** Transfer of broad-host-range antibiotic resistance plasmids in soil microcosms. Current Microbiology 28:209-215.
- NCCLS. 1997.** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. M2-A6, 6<sup>th</sup> Ed.

- Neo-Sensitabs User's Guide. 1998.** Susceptibility testing. 10<sup>th</sup> ed. Rosco, Taastrup, Denmark.
- Nielsen, J. C. og M. Richelieu. 1999.** Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. Appl. Environ. Microbiol. 65:740-745.
- Prescott, J. F. og J. D. Baggot. 1988.** Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Blackwell Scientific Publications, Boston.
- Reddy, V. P., M. M. H. Khan, V. Purushothaman og P. N. Ramnath. 1994.** A survey of antibiotic resistance in lactococci. Indian J. Dairy Sci. 47:237-239.
- Salyers, A. 1999.** Beware the commensals! Their role in antibiotic resistance spread may be greater than we think. ASM News 65:459-460.
- Saxelin, M., H. Rautelin, S. Salminen og P. H. Mäkelä. 1996.** Safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains. Infectious Diseases in Clinical Practice 5:331-335.
- Sozzi, T. og M. B. Smiley. 1980.** Antibiotic resistances of yogurt starter cultures *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Appl. Environ. Microbiol. 40:862-865.
- Stosor, V., Noskin, G. A., Peterson, L. R. 1996.** The management and prevention of Vancomycin-resistant enterococci. Infect. Med. 6: 487-488,493-498.
- Tynkkynen, S., K. V. Singh, P. Varmanen. 1998.** Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. International Journal of Food Microbiology 41:195-204.
- Valladao, M. og W. E. Sandine. 1994.** Standardized Method for Determining the Effect of Various Antibiotics on Lactococcal Cultures. J. Food Protection 57:235-239.
- Vescovo, M., L. Morelli og V. Bottazzi. 1982.** Drug resistance plasmids in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri*. Appl. Environ. Microbiol. 43:50-56. (1997). "Commission directive 97/6/EC of 30, January 1997 amending council directive 70/524/EEC concerning additives in feeding stuffs." Official Journal of the European Communities 35: 11-3.
- Wiik, R. og J. E. Karlsen. 1997.** Miljøkonsekvenser og helserisiko ved utsetting av antibiotikaresistente bakterier. Utgiver: Statens forurensningstilsyn (SFT). ISBN-nr 82-7655-053-3.

## 10 Vedlegg

- Vedlegg 1      Oversikt over prøvematerialet som er undersøkt
- Vedlegg 2      Sammenligning mellom referansemedium og benyttede medier
- Vedlegg 3      Medier og løsninger
- Vedlegg 4      Tilpasning av agardiffusjonsmetoden for melkesyrebakterier
- Vedlegg 5      Grenseverdier for gruppering av bakterier på bakgrunn av hemmings-  
sonestørrelser
- Vedlegg 6      Beregning av usikkerhet i hemmingssonestørrelse
- Vedlegg 7A     Resultater fra antibiotikaresistensundersøkelsen, hemmingssonestørrelser
- Vedlegg 7B     Resultater fra antibiotikaresistensundersøkelsen, R-I-S inndeling

## Vedlegg 1. Oversikt over prøvematerialet som er undersøkt

Tabellen angir bakteriearter og i noen tilfeller underarter i de undersøkte startkulturer, tilhørende næringsmiddelgruppe samt isolatnummer som er benyttet i forsøkene. Representanter fra alle bakterieslektene i startkulturene er undersøkt. En del startkultur-bakterier vokste ikke fram fra næringsmidlene, og er derfor ikke undersøkt. Startkultur-bakterier er undersøkt fra de av næringsmidlene der det er oppgitt isolatnummer. Startkulturene er nummerert; riktig benevnelse er ikke oppgitt.

Sammensetning startkulturer	Isolatnr.	Næringsmiddel	Isolatnr.
<b>1S:</b> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Micrococcus violagabriella</i>	SS-1 SS-2	Spekepølse	
<b>2S:</b> <i>Pediococcus pentasaceus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	SS-3 SS-4	Spekepølse	NS-1 NS-2
<b>3S:</b> <i>Lactobacillus curvatus</i> LAB <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Staphylococcus xylosus?</i>	SS-5 SS-6	Spekepølse	NS-3 NS-4
<b>4S:</b> <i>Lactobacillus sake</i> <i>Staphylococcus carnosus</i>	SS-7 SS-8	Spekepølse	
<b>5S:</b> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Staphylococcus carnosus</i>	SS-9 SS-10	Spekepølse	
<b>6S:</b> <i>Lactobacillus plantarum</i>	SS-11	Spekepølse	NS-5
<b>7S:</b> <i>Lactobacillus sake</i>	SS-12	Spekepølse	NS-6
<b>8S:</b> <i>Lactobacillus</i> (art ukjent for oss)	SS-13	Spekepølse	NS-7
<b>9S:</b> <i>Lactobacillus</i> (art ukjent for oss)	SS-14	Spekepølse	
<b>10S:</b> <i>Staphylococcus carnosus</i>	SS-15	Spekepølse	
<b>11S:</b> <i>Lactobacillus farcimus</i>	SS-16	Spekepølse	NS-8
<b>12S:</b> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Staphylococcus carnosus</i>	SS-17 SS-18		NS-9 NS-10
<i>Lactobacillus farciminis</i> (13S.)		Spekepølse	NS-11
<i>Lactobacillus plantarum</i> (14S)			NS-12
<i>Staphylococcus carnosus</i> (14S)			NS-13
<b>13S:</b> <i>Lactobacillus farcimus</i>	SS-19		
<b>14S:</b> <i>Lactobacillus sake</i> <i>Staphylococcus carnosus</i>	SS-20 SS-21	Spekepølse	NS-14 NS-15
<b>15S:</b> <i>Lactobacillus sp.</i> <i>Staphylococcus carnosus</i>	SS-22 SS-23	Spekepølse	NS-16 NS-17
<b>16S:</b> <i>Lactobacillus sp.</i> <i>Staphylococcus carnosus</i>	SS-24 SS-25	Spekepølse	
<b>1M:</b> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i>	SM-1 SM-2	Yoghurt	NM-1 NM-2

Sammensetning startkulturer	Isolatnr.	Næringsmiddel	Isolatnr.
<b>2M:</b> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i>	SM-3	Ost	
<i>Propioniibacterium shermanii</i> (kun næringsmiddel)	SM-4		
<b>3M:</b> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i>	SM-5	Ost	NM-3
	SM-6		
<b>4M:</b> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i>	SM-7	Surmelk	NM-4/NM-5
	SM-8		
<b>5M:</b> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i>	SM-9	Ost	NM-6
	SM-10		
<b>6M:</b> <i>Lactobacillus helveticus</i>	SM-11		NM-6
<b>7M:</b> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	SM-12	Ost	NM-8
<b>8M:</b> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i>	SM-13		
	SM-14		
<b>9M:</b> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	SM-15	Surmelk	
<b>10M:</b> <i>Bifidobacterium bifidum</i>	SM-16		
<b>11M:</b> <i>Streptococcus salvarius</i> subsp <i>thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i>	SM-17	Yoghurt	NM-9 NM-10/NM-11
	SM-18		
<b>12M:</b> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	SM-19		NM-12
<b>13M:</b> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i>	SM-20	Ost	
	SM-21		
<b>14M:</b> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i>	SM-22	Ost	NM-13
	SM-23		
<b>15M:</b> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i>	SM-24	Ost	
<b>16M:</b> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i>	SM-25	Yoghurt	

Sammensetning startkulturer	Isolatnr.	Næringsmiddel	Isolatnr.
Ikke kjent		Importert ost	Im-1-9
Ikke kjent		Importert ost	Im-10-18
Ikke kjent		Importert ost	Im-19-23
Ikke kjent		Importert ost	Im-24-30
<b>1P:</b> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Bifidobacterium longum</i>		Preparat	Pr-1 Pr-2
<b>2P:</b> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Bifidobacterium longum</i>		Preparat	Pr-3 Pr-4
<b>3P:</b> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>		Preparat	Pr-5 Pr-6

SS=Startkultur spekepølse, NS=Næringsmiddel spekepølse, SM=Startkultur meieriprodukt,  
 NM=Næringsmiddel meieriprodukt, Im=Importert ost, Pr=Preparat

## Vedlegg 2. Sammenligning mellom referansemedium og benyttede medier

Vi har undersøkt om det er signifikante forskjeller i hemmingssoner som funksjon av vekstmedium, dvs. om referansemediet Mueller Hinton Agar (MHA) gir andre hemmingssoner enn andre medier ved bruk av agardiffusjonsmetoden. Dette er gjort ved å teste en bakteriesuspensjon fra ett og samme bakterieisolat på mediene som skal sammenlignes. Variansanalyser er utført på resultater fra mellom 5 og 33 bakterieisolater, avhengig av hvilke antibiotika og medier som er brukt.

Mellom MHA og MHA++ er sammenligning utført med referanseorganismene *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 og *Pseudomonas aeruginosa* 27853. Vi har undersøkt bakterienes følsomhet overfor ampicillin, ciprofloxacin, cefotaxim, erythromycin, gentamicin, tetracyclin-80µg, tetracyclin-10µg, vancomycin, chloramphenicol, penicillin og trimetoprim/sulfa. Variansanalysen er basert på 30 målinger, og er vist i tabell 1 med 95% konfidensintervall. Det fremgår av tabellen at vi ikke har funnet signifikante forskjeller i hemmingssonestørrelsen mellom disse to mediene for noen av de undersøkte antibiotikaene.

**Tabell 1:** Sammenligning av hemmingssonestørrelser ved bruk av mediene MHA og MHA++.

Antibiotikum	Medium	Antall målinger	Gjennomsnittlig hemmingssonestørrelse (mm)	Variasjonsbredde (mm)	Signifikant forskjellige avlesninger
Ampicillin	MHA	30	21,6	17,4 - 25,8	Nei
	MHA++	30	22,4	18,2 - 26,5	
Ciprofloxacin	MHA	30	27,8	25,5 - 30,2	Nei
	MHA++	30	28,7	26,3 - 31,1	
Cefotaxim	MHA	30	26,7	24,9 - 28,6	Nei
	MHA++	30	28,8	27,0 - 30,6	
Erythromycin	MHA	30	22,7	19,7 - 25,7	Nei
	MHA++	30	22,5	19,5 - 25,5	
Gentamicin	MHA	30	30,1	29,4 - 31,0	Nei
	MHA++	30	29,2	28,5 - 30,0	
Tetracyclin, 80µg	MHA	30	21,7	20,0 - 23,4	Nei
	MHA++	30	23,6	21,9 - 25,3	
Vancomycin	MHA	30	13,0	10,8 - 15,2	Nei
	MHA++	30	13,2	11,0 - 15,4	
Tetracyclin, 10µg	MHA	30	15,2	13,4 - 17,0	Nei
	MHA++	30	16,3	14,5 - 18,1	
Chloramphenicol	MHA	30	15,8	13,8 - 17,7	Nei
	MHA++	30	16,5	14,6 - 18,5	
Penicillin	MHA	30	15,1	11,5 - 18,7	Nei
	MHA++	30	16,5	12,9 - 20,1	
Trimetoprim/sulfa	MHA	30	25,5	21,9 - 29,2	Nei
	MHA++	30	26,1	22,4 - 29,7	

Mellom MHA++ og MRS 5.4 er sammenligning utført med et tilfeldig utvalg bakterieisolater isolert i prosjektet. Vi har undersøkt isolatenes følsomhet overfor ampicillin, ciprofloxacin, cefotaxim, erythromycin, gentamicin, tetracyclin-80µg, tetracyclin-10µg, vancomycin, chloramphenicol, penicillin og trimetoprim/sulfa. Variansanalysen er basert på mellom 16 og 33 målinger. Sammenligningen er vist i tabell 2 med 95% konfidensintervall. Det fremgår av tabellen at vi ikke har funnet signifikante forskjeller i hemmingssonestørrelsen mellom disse to mediene for ampicillin, cefotaxim, erythromycin, tetracyclin-10µg, vancomycin, chloramphenicol eller trimetoprim/sulfa. Vi fant signifikant forskjellige hemmingssoner ved testing av ciprofloxacin, gentamicin, tetracyclin-80µg og penicillin.

**Tabell 2:** Sammenligning i hemmingssonestørrelser ved bruk av mediene MHA++ og MRS 5.4.

Antibiotikum	Medium	Antall målinger	Gjennomsnittlig hemmingssone størrelse (mm)	Variasjonsbredde (mm)	Signifikant forskjellige avlesninger
Ampicillin	MRS 5.4	32	42,3	38,9 - 45,7	Nei
	MHA++	33	38,9	35,5 - 42,3	
Ciprofloxacin	MRS 5.4	33	13,4	11,1 - 15,7	Ja
	MHA++	32	19,3	17,0 - 21,7	
Cefotaxim	MRS 5.4	32	37,4	33,5 - 41,3	Nei
	MHA++	30	29,8	25,8 - 33,9	
Erythromycin	MRS 5.4	32	35,6	32,3 - 38,8	Nei
	MHA++	30	37,8	34,4 - 41,1	
Gentamicin	MRS 5.4	33	19,4	16,1 - 22,8	Ja
	MHA++	32	29,2	25,8 - 32,6	
Tetracyclin, 80µg	MRS 5.4	33	37,7	35,0 - 40,3	Ja
	MHA++	32	32,3	29,6 - 34,9	
Vancomycin	MRS 5.4	33	23,3	19,4 - 27,1	Nei
	MHA++	32	18,9	15,0 - 22,8	
Tetracyclin, 10µg	MRS 5.4	17	15,7	11,2 - 20,1	Nei
	MHA++	17	13,2	8,8 - 17,7	
Chloramphenicol	MRS 5.4	17	30,9	28,2 - 33,6	Nei
	MHA++	16	27,9	25,1 - 30,7	
Penicillin	MRS 5.4	17	35,2	31,8 - 38,5	Ja
	MHA++	16	27,1	23,7 - 30,6	
Trimetoprim/sulfa	MRS 5.4	17	20,2	14,7 - 25,8	Nei
	MHA++	16	20,1	14,3 - 25,8	

Mellom MHA++ og M17 er sammenligning utført med et tilfeldig utvalg bakterieisolater isolert i prosjektet. Vi har undersøkt for følsomhet overfor ampicillin, ciprofloxacin, cefotaxim, erythromycin, gentamicin, tetracyclin-80µg, tetracyclin-10µg, vancomycin, chloramphenicol, penicillin og trimetoprim/sulfa. Variansanalysen er basert på mellom 5 og 23 målinger. Sammenligningen er vist i tabell 3 med 95% konfidensintervall. Det fremgår av tabellen at vi ikke har funnet signifikante forskjeller i hemmingssonestørrelsen mellom disse to mediene for noen av de undersøkte antibiotikaene.



**Tabell 3:** Sammenligning i hemmingsonestørrelser ved bruk av mediene MHA++ og M17.

Antibiotikum	Medium	Antall målinger	Gjennomsnittlig hemmingssone størrelse (mm)	Variasjonsbredde (mm)	Signifikant forskjellige avlesninger
Ampicillin	M17	23	40,7	38,4 - 43,1	Nei
	MHA++	23	39,8	37,5 - 42,2	
Ciprofloxacin	M17	23	25,3	23,0 - 27,6	Nei
	MHA++	23	23,3	21,0 - 25,5	
Cefotaxim	M17	23	34,2	31,0 - 37,4	Nei
	MHA++	23	32,8	29,6 - 36,0	
Erythromycin	M17	23	37,8	34,8 - 40,8	Nei
	MHA++	23	36,2	33,2 - 39,2	
Gentamicin	M17	23	30,4	28,5 - 32,3	Nei
	MHA++	23	29,5	27,6 - 31,4	
Tetracyclin, 80µg	M17	23	33,6	31,2 - 36,0	Nei
	MHA++	23	32,7	30,2 - 35,1	
Vancomycin	M17	23	25,5	24,1 - 27,0	Nei
	MHA++	23	24,9	23,4 - 26,3	
Tetracyclin, 10µg	M17	5	19,2	8,4 - 30,0	Nei
	MHA++	5	20,4	9,6 - 31,2	
Chloramphenicol	M17	5	25,6	20,4 - 30,8	Nei
	MHA++	5	29,4	24,2 - 34,6	
Penicillin	M17	5	26,4	21,5 - 31,3	Nei
	MHA++	5	32,2	27,3 - 37,1	
Trimetoprim/sulfa	M17	5	14,8	3,0 - 26,6	Nei
	MHA++	5	25,6	13,8 - 37,4	

### Konklusjon

Vi har ikke funnet signifikant forskjell i sonestørrelser for noen av de undersøkte antibiotika ved sammenligning mellom referansemediet Mueller Hinton Agar (MHA) og Mueller Hinton Agar som er tilsatt glukose og gjærekstrakt (MHA++). Der isolatene vokser på MHA++ er resultatene fra dette mediet benyttet. Der det ikke foreligger resultater fra MHA++ er resultatene fra M17 eller MRS 5.4 benyttet. Vi har ikke funnet signifikante forskjeller i hemmingssoner for noen av de undersøkte antibiotika ved sammenligning mellom MHA++ og M17. Vi har ikke funnet signifikante forskjeller i hemmingssoner mellom MHA++ og MRS 5.4 for ampicillin, cefotaxim, erythromycin, tetracyclin-10µg, vancomycin, chloramphenicol eller trimetoprim/sulfa. Vi fant signifikant forskjellige hemmingssoner ved testing av ciprofloxacin, gentamicin, tetracyclin-80µg og penicillin. I vedlegg 7A er hemmingssonene som er avlest på MRS 5.4-mediet for disse antibiotikaene avmerket.

### **Vedlegg 3. Medier og løsninger**

#### **de Man, Rogosa, Sharpe Agar, pH 5,4 (MRS 5.4)**

62 g medium (Oxoid, CM361) løses i 1000 ml destillert vann og varmes på magnetrører til alt er oppløst. pH justeres med eddiksyre, slik at pH etter autoklaving blir 5,4. Mediet fordeles på flasker med 200 ml i hver, før autoklaving ved 121°C i 15 minutter. Oppbevares ved 4°C.

#### **M17 agar**

48,25 g medium (Oxoid, CM785) løses i 950 ml destillert vann og varmes på magnetrører til alt er oppløst. pH etter autoklaving skal være  $6,9 \pm 0,1$ . Mediet fordeles på flasker med 190 ml i hver, før autoklaving ved 121°C i 15 minutter. Oppbevares ved 4°C.

Før bruk smeltes 190 ml medium i mikrobølgeovn og avkjøles i vannbad til ca. 50°C. 10 ml steril laktoseløsning (temperert) tilsettes.

#### **Laktoseløsning**

10 g laktose løses i 100 ml destillert vann. Løsningen autoklaveres ved 121°C i 15 minutter. Oppbevares ved 4°C.

#### **Mayeux' medium**

Trypton	10g
Gjærekstrakt	5g
Sukrose	100g
Glukose	5g
Natrium citrat dihydrat	1g
Gelatin	2,5g
Agar	15g
Destillert vann	1000ml

Ingrediensene løses i 1000 ml vann og varmes på magnetrører til alt er oppløst. Mediet fordeles på flasker med 200 ml i hver, før autoklaving ved 121°C i 15 minutter. Oppbevares ved 4°C.

Før bruk smeltes 200 ml medium i mikrobølgeovn og avkjøles i vannbad til ca. 50°C. 1,5 ml steril natriumazidløsning (temperert) tilsettes.

#### **Natriumazidløsning**

1 g natriumazid løses i 100 ml destillert vann. Autoklaveres ved 121°C i 15 minutter. Oppbevares ved 4°C.

### **Plate Count Agar (PCA)**

23,5 g medium (Difco, 0479-17) løses i 1000 ml destillert vann og varmes på magnetrører til alt er oppløst. pH etter autoklaving skal være  $7,0\pm 0,2$ . Mediet fordeles på flasker med 200 ml i hver, før autoklaving ved  $121^{\circ}\text{C}$  i 15 minutter. Oppbevares ved  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **Na-Laktatagar**

Pepton	20g
Gjærekstrakt	5g
Natriumlaktat (50%)	16ml
Agar	12g

Ingrediensene løses i 1000 ml destillert vann, og varmes på magnetrører til alt er oppløst. pH justeres med 1M NaOH eller 1M HCL, slik at pH etter autoklaving blir  $7,0\pm 0,1$ . Mediet fordeles på flasker med 200 ml i hver, før autoklaving ved  $121^{\circ}\text{C}$  i 15 minutter. Oppbevares ved  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **MRS m/NNL**

62 g medium (Oxoid, CM361) løses i 1000 ml destillert vann og varmes på magnetrører til alt er oppløst. pH etter autoklaving skal være  $6,2\pm 0,2$ . Mediet fordeles på flasker med 190 ml i hver, før autoklaving ved  $121^{\circ}\text{C}$  i 15 minutter. Oppbevares ved  $4^{\circ}\text{C}$ .

Før bruk smeltes 190 ml medium i mikrobølgeovn og avkjøles i vannbad til ca.  $50^{\circ}\text{C}$ . 10 ml steril NNL-løsning (temperert) tilsettes.

### **NNL-løsning**

LiCl	6,000g
Nalidixinsyre	0,030g
Neomycinsulfat	0,200g

Stoffene løses i destillert vann i en 100 ml målekolbe. pH justeres til 7,2-7,5 med 0,1N NaOH. Volumet justeres til 100 ml med destillert vann. Løsningen sterilfiltreres. Oppbevares ved  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **Mueller Hinton Agar (MHA)**

38 g medium (Difco, 0252-17-6) løses i 1000 ml destillert vann og varmes på magnetrører til alt er oppløst. pH etter autoklaving skal være  $7,3\pm 0,1$ . Mediet fordeles på flasker med 200 ml i hver, før autoklaving ved  $121^{\circ}\text{C}$  i 15 minutter. Oppbevares ved  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **Mueller Hinton Agar med tilsetninger (MHA++)**

38 g medium (Difco, 0252-17-6), 5g glukose og 5g gjærekstrakt løses i 1000 ml destillert vann og varmes på magnetrører til alt er oppløst. pH etter autoklaving skal være  $7,3\pm 0,1$ . Mediet fordeles på flasker med 200 ml i hver, før autoklaving ved  $121^{\circ}\text{C}$  i 15 minutter. Oppbevares ved  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Fortynningsvann**

9,5 g Maximum Recovery Diluent (Difco, 1879-17) løses i 1000 ml destillert vann og varmes på magnetrører til alt er oppløst. pH justeres slik at den etter autoklaving blir  $7,0 \pm 0,2$ . Autoklaveres ved  $121^{\circ}\text{C}$  i 15 minutter. Oppbevares ved  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Hydrogenperoksid**

10 % løsning av hydrogenperoksid. Autoklaveres ikke. Oppbevares mørkt og kjølig ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

**Gramfargingsreagenser (kit)**

Primary Stain: Gram Crystal Violet (Difco 3329-75)

Mordant: Stabilized Gram Iodine (Difco 3342-75)

Decolorizer/counterstain: 3-Step-Safranin-S (Difco 3335-75)

## **Vedlegg 4. Tilpasning av agardiffusjonsmetoden for melkesyrebakterier**

Direkte koloni-suspensering (D'Amato og Hochstein, 1982) ble benyttet ved tillaging av inokulum. Denne metoden er funnet likeverdig med NCCLS-metoden (NCCLS, 1997), men mindre tidkrevende.

Ved direkte koloni-suspensering, angir metoden at koloniene ikke bør være eldre enn 18-24 timer. Melkesyrebakterier trenger generelt mer enn 1 døgns inkubasjonstid for å vokse fram, noen opptil 1 uke. De fleste bakterieisolatene ble testet 2-3 døgn etter utsåing. For enkelte isolater tok det inntil 10 døgn fra utsåing til testing.

Melkesyrebakterienes langsomme vekst medførte også at noen av isolatene ble lest av etter mer enn 2 døgns inkubering ved bruk av agardiffusjonsmetoden.

Turbiditeten til inokulumet skal i henhold til metoden tilsvare turbiditeten til 0,5 McFarland-standarden ( $=0,126$ ). Turbiditeten ble justert på øyemål, før agarskålene ble svabret og antibiotikatabletter applisert. Deretter ble turbiditeten målt spektrofotometrisk som absorbansen til bakteriesuspensjonen målt ved 625 nm. Absorbansen til isolatene lå mellom 0,04 og 0,522.

Størrelsen på hemmingssonene er målt for ulike tettheter av samme bakterieisolat. Det er ikke funnet signifikante forskjeller i sonestørrelsene ved små og middels store hemmingssoner. Ved store hemmingssoner ( $>23\text{mm}$ ) ser det ut til at bakterietettheten influerer signifikant på hemmingssonestørrelsen. En variasjon i sonestørrelsen i dette størrelsesområdet medfører ikke at isolatet karakteriseres som noe annet enn sensitivt.

## Vedlegg 5. Grenseverdier for gruppering av bakterier på bakgrunn av hemmingssonestørrelser

Tabellen gir en oversikt over grenseverdiene for inndeling i sensitive (S), intermediære (I) eller resistente (R) bakterier på bakgrunn av diameteren på hemmingssoner rundt den enkelte antibiotikatablett (Neo-Sensitabs User's Guide, 1998).

Antibiotikum	Hemmingssone i mm		
	Sensitiv (S)	Intermediær (I)	Resistent (R)
Ampicillin (33 µg)	≥ 20	19 - 17	≤ 16
Cefotaxim (30 µg)	≥ 23	22 - 20	≤ 19
Ciprofloxacin (10 µg)	≥ 20	19 - 17	≤ 16
Erythromycin (78 µg)	≥ 26	25 - 19	≤ 18
Gentamicin (40 µg)	≥ 23	22 - 20	≤ 19
Tetracyclin (80 µg)	≥ 23	22 - 20	≤ 19
Vancomycin (70 µg)	≥ 16	15 - 14	≤ 13
Trimetoprim+Sulfa (5.2 + 240 µg)	≥ 28	27 - 24	≤ 23
Penicillin Low (5 µg)	≥ 26	25 - 23	≤ 22

For chloramphenicol og lav tetracyclin konsentrasjon (10µg) er det ikke oppgitt grenseverdier for inndeling i R, I og S.

## Vedlegg 6. Beregning av usikkerhet i hemmingssonestørrelse

### Prinsipp

Vi har bestemt usikkerheten i hemmingssonestørrelsen som et anslag utfra variasjonen i et empirisk material.

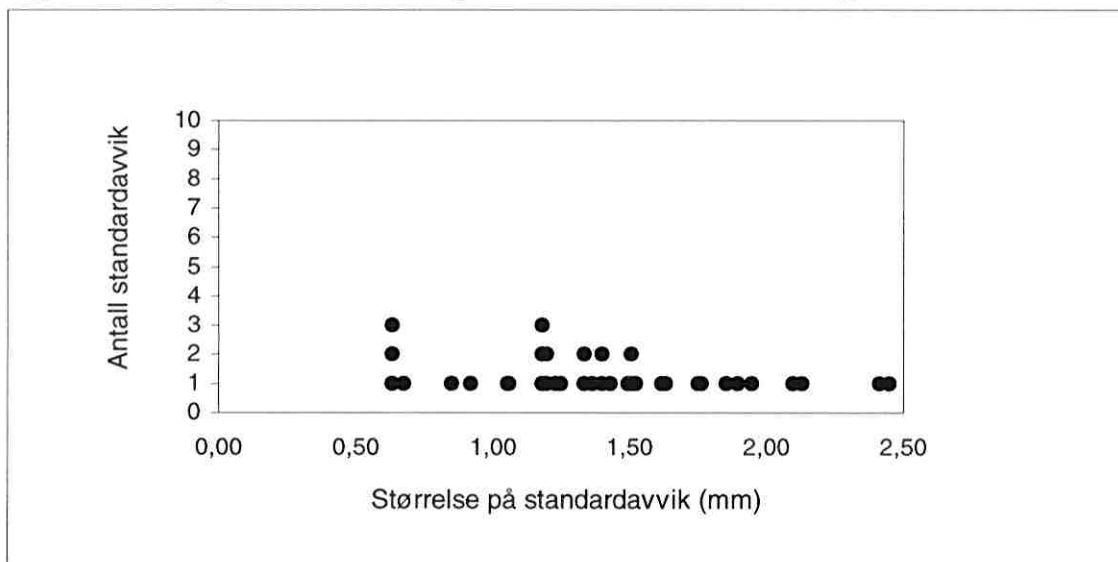
### Gjennomføring

For hvert av 9 antibiotika (ampicillin, ciprofloxacin, cefotaxim, erythromycin, gentamicin, tetracyclin-80 $\mu$ g, vancomycin, trimetoprim/sulfa, penicillin) har vi undersøkt 4 bakterie-suspensjoner med 10 gjentak. Dette gir 36 resultatsett à 10 enkeltresultat. For hvert resultatsett har vi beregnet standardavvik (n=10).

### Resultat

Fordelingen av standardavvikene for de 36 resultatsettene er vist som dot-diagram i figur 1. Utfra figur 1 ser en at de fleste standardavvik (32 av 36) er lavere enn 2mm.

**Figur1:** Dot-diagram over fordeling av standardavvik til hemmingssoner.



### Diskusjon

Ved å velge en usikkerhet på  $\pm 2$  mm vil en være rimelig sikker på å fange opp variasjonen i metoden, såfremt den gjennomførte testen er rimelig representativ.

### Konklusjon

Vi har utfra et anslag basert på et empirisk materiale satt usikkerheten i hemmingssonestørrelsen til  $\pm 2$  mm.

Vedlegg 7A. Resultater fra antibiotikaresistensundersøkelsen, hemmingssonestørrelser

Isolatnr.	Bakterie	Følsomhet overfor antibiotika (mm hemmingssonene)	Amp	Cipr	Ceto	Ery	Gen	Tet80	Van	Pen	Trim+sulf	Tet10	Chlor
SS-1	Lactobacill	33	9	23	34	26	30	9					
SS-2	Microococ	39	21	28	34	30	34	24					
SS-3	Pedilococ	31	9	22	32	21	21	9					
SS-4	Staphylococ	32	24	30	28	30	34	19					
SS-5	Lactobacill	32	14	17	32	19	28	12					
SS-6	Staphylococ	40	31	26	34	32	38	26					
SS-7	Lactobacill	28	17	13	30	19	30	12					
SS-8	Staphylococ	40	30	28	34	32	36	27					
SS-9	Lactobacill	26	9	28	36	23	26	9					
SS-10	Staphylococ	40	31	28	28	29	32	24					
SS-11	Lactobacill	27	9	30	34	24	26	9					
SS-12	Lactobacill	34	19	17	36	22	32	14					
SS-13	Lactobacill	33	21	19	38	21	34	15					
SS-14	Lactobacill	30	23	16	38	21	34	14					
SS-15	Staphylococ	36	28	22	31	28	32	21					
SS-16	Lactobacill	38	15*	32	38	16*	38*	9					
SS-17	Lactobacill	30	9	28	31	24	30	9					
SS-18	Staphylococ	40	26	26	32	26	32	22					
SS-19	Lactobacill	44	14*	33	36	19*	39*	13					
SS-20	Lactobacill	29	17	12	33	19	30	11					
SS-21	Staphylococ	38	31	25	32	33	33	26					
SS-22	Lactobacill	29	16	16	35	20	30	9					
SS-23	Staphylococ	32	25	25	30	30	12	26					
SS-24	Lactobacill	38	15*	31	36	18*	37*	9					
SS-25	Staphylococ	32	20	30	36	36	9	21					
NS-1	Pedilococ	28	9*	28	31	11*	29*	9					
NS-2	Staphylococ	36	24	35	40	38	32	25					
NS-3	Lactobacill	42	12*	36	36	18*	38*	9					
NS-4	Staphylococ	46	36	28	48	44	38	32					
NS-5	Lactobacill	42	9*	38	30	9*	28*	9					



Isolatnr.	Bakterie	Følsomhet overfor antibiotika (mm hemmingssone)										
		Amp	Cipr	Ceto	Ery	Gen	Tet80	Van	Pen	Trim+sulf	Tet10	Chlor
NS-6	Lactobacill	42	16*	36	39	23*	42*	11	34*	9	34	36
NS-7	Lactobacill	38	13*	27	36	14*	36*	9	30*	9	28	30
NS-8	Lactobacill	44	9*	44	34	12*	30*	9	24*	28	23	26
NS-9	Lactobacill	45	9*	40	32	12*	32*	9	22*	25	20	26
NS-10	Staphylococc	47	28	25	40	40	32	29	40	44	26	28
NS-11	Lactobacill	41	13*	34	40	18*	40*	9	36*	12	32	32
NS-12	Lactobacill	42	14*	31	41	17*	40*	9	32*	14	32	30
NS-13	Staphylococc	40	32	30	44	40	32	25	28	48	26	14
NS-14	Lactobacill	38	15*	31	36	17*	36*	9	30*	9	28	31
NS-15	Staphylococc	32	22	28	36	38	9	21	23	40	9	27
NS-16	Lactobacill	36	9*	28	34	11*	32*	9	28*	9	28	25
NS-17	Staphylococc	42	34	27	44	45	35	29	34	44	22	32
SM-1	Streptococc	44	21	38	40	23	35	29				
SM-2	Lactobacill	64	9	42	42	16	38	36				
SM-3	Lactococc	38	19	36	34	28	36	26				
SM-4	Leuconostoc	32	24	30	44	35	32	9				
SM-5	Lactococc	38	20	34	34	26	34	27				
SM-6	Leuconostoc	32	23	28	32	36	28	9				
SM-7	Lactococc	38	23	36	33	24	34	27				
SM-8	Leuconostoc	48	24	41	50	34	36	9				
SM-9	Lactococc	35	21	34	33	25	34	27				
SM-10	Leuconostoc	46	23	42	43	31	46	35				
SM-11	Lactobacill	70	12*	64	54	20*	61*	46				
SM-12	Lactococc	36	16	32	31	24	34	24				
SM-13	Lactococc	47	25	42	35	28	40	32				
SM-14	Leuconostoc	36	22	24	40	35	34	9				
SM-15	Lactobacill	65	9*	53	47	22/13*	42*	43				
SM-16	Bifidobacterium	54	22	50	54	22	46	40				
SM-17	Streptococc	40	28	52	42	24	36	34				
SM-18	Lactobacill	46	9*	46	42	24/38*	48*	40				
SM-19	Lactobacill	38	24*	33	46	14*	48*	9				
SM-20	Lactococc	46	18	40	40	32	36	27				
SM-21	Leuconostoc	38	19	34	35	27	36	28				

Isolatnr.	Bakterie	Følsomhet overfor antibiotika (mm hemmingssone)	Amp	Cipr	Cefo	Ery	Gen	Tet80	Van	Pen	Trim+sulf	Tet10	Chlor
SM-22	Lactococc		38	17	36	36	31	28	28				
SM-23	Leuconostoc		52	28	48	48	40	44	38				
SM-24	Leuconostoc		42	14	38	38	21	40	9				
SM-25	Lactobacill		58	9*	48	50	25*	48*	38				
NM-1	Streptococc		44	24	42	38	24	35	28				
NM-2	Lactobacill			9*			17*	40*					
NM-3	Lactococc		39	20	42	41	30	41	30	32	26	31	27
NM-4	Lactococc		46	21	44	44	36	47	30	32	23	34	34
NM-5	Lactococc		64	31	46	64	47	50	38	48	48	50	44
NM-6	Lactococc		42	20	42	39	28	38	27	32	28	32	31
NM-7	Lactobacill		48	11*	44	38	21*	36*	9	38*	22	31	32
NM-8	Lactococc		40	16	36	37	26	34	25	26	9	30	24
NM-9	Streptococc		52	28	52	46	26	44	32	44	36	36	34
NM-10	Lactobacill		42	16*	28	44	19*	46*	9	44*	36	30	34
NM-11	Lactobacill		62	9*	48	42	11*	56*	19	53*	21	41	40
NM-12	Lactobacill		38	20*	26	44	13*	46*	9	36*	9	32	32
NM-13	Lactococc		48	24	46	48	28	40	32	34	18	34	26
NM-14	Propionibacterium		49	23	50	51	41	46	29	32	44	36	33
Im-1			38	28	34	36	40	22	9	30*	26	28	28
Im-2			52	9*	34	44	29*	40*	9	50	9	21	38
Im-3			48	28	42	44	23	42	32	30	22	24	30
Im-4			54	19	56	58	38	30	9	42	40	20	35
Im-5			64	9*	36	42	27*	42*	9	40*	9	30	34
Im-6			67	45	36	42	62	40	9	44	9	23	40
Im-7			54	21*	52	46	26*	41*	9	48*	32	34	36
Im-8			28	15	16	36	32	28	9	20	9	18	21
Im-9			38	19	20	34	22	27	9	22	9	16	21
Im-10			36	30	38	50	36	29	9	31	9	18	30
Im-11			50	28	50	55	38	30	9	38	47	22	38
Im-12			39	13	39	41	32	32	26	28	28	23	26
Im-13			58	32	54	67	34	32	9	40	49	25	40
Im-14			60	30	44	37	64	38	9	44	9	19	38

Isolatnr.	Bakterie	Følsomhet overfor antibiotika (mm hemmingssone)	Amp	Cipr	Cefo	Ery	Gen	Tet80	Van	Pen	Trim+sulf	Tet10	Chlor
Im-15			57	38	58	68	50	35	9	36	43	28	36
Im-16			36	18	24	34	24	30	9	22	9	18	22
Im-17			38	19	28	34	25	26	9	20	9	20	24
Im-18			33	13	30	30	19	31	24	22	28	28	23
Im-19			46	19*	34	9	20*	48*	9	40*	9	42	38
Im-20			52	20	40	48	26	30	34	38	18	20	30
Im-21			48	24	44	46	30	40	38	32	32	28	31
Im-22				20			24	38		40	26	22	26
Im-23			33	25	20	9	29	38	9	20	15	28	26
Im-24			36	17	34	36	26	34	22	24	26	28	26
Im-25			36	16	34	36	25	32	24	25	24	26	22
Im-26			42	24	27	50	44	32	9	30	9	22	29
Im-27			37	18	36	38	26	35	24	22	28	28	26
Im-28			36	20	36	38	28	33	24	22	31	28	28
Im-29			41	18	30	42	26	30	9	23	9	24	26
Im-30			32	14	32	30	19	33	23	24	31	26	22
Pr-1	Enterococ		24	20	9	22	21	32	26	9	35	27	26
Pr-2	Bifodobacterium		44	17*	32	22	15*	50*	32	36*	30	42	37
Pr-3	Bifodobacterium		48	19*	28	18	14*	50*	32	34*	20	44	31
Pr-4	Enterococcus		24	17	9	19	21	33	26	12	38	25	24
Pr-5			48	15*	39	20	12*	50*	32	36*	20	39	38
Pr-6			26	14	9	19	17	34	27	13	28	24	26
Amp=ampicillin (33µg), Cipr=ciprofloxacin (10µg), Cefo=cefotaxim (30µg), Ery=erythromycin (78µg), Gen=gentamicin (40µg), Tet80=tetracyclin (80µg), Van=vancomycin (70µg)													
Pen=penicillin (5µg), Trim/sulf=trimetoprim(5.2µg)/sulphonamid(240µg), Chlor=chloramphenicol(10µg), Tet10=tetracyklin(10µg)													
SS=Startkultur spekepølse, NS=Næringsmiddel spekepølse, SM=Startkultur melierprodukt, NM=Næringsmiddel melierprodukt, Im=Importert ost, Pr=Preparat													
Usikkerheten i avlesningene av hemmingssonene ligger på +/- 2 mm den verdien som er oppgitt i tabellen													
* Signifikant forskjellige hemmingssonestørrelser mellom MRS 5.4 og MHA++.													

Vedlegg 7B. Resultater fra antibiotikaresistensundersøkelsen, R-I-S inndeling

Isolatnr.	Bakterie	Følsomhet overfor antibiotika (R-I-S)	Amp	Cipr	Cefo	Ery	Gen	Tet80	Van	Pen	Trim+sulf
SS-1	Lactobacill	S	R	S/I	S	S	S	R			
SS-2	Micrococc	S	S/I	S	S	S	S	S			
SS-3	Pediococc	S	R	S/I	S	R-I-S	R-I-S	R			
SS-4	Staphylococc	S	S	S	S	S	S	S			
SS-5	Lactobacill	S	R	R	R	R/I	S	R/I			
SS-6	Staphylococc	S	S	S	S	S	S	S			
SS-7	Lactobacill	S	I/R	R	S	R/I	S	R/I			
SS-8	Staphylococc	S	S	S	S	S	S	S			
SS-9	Lactobacill	S	R	S	S	R/I	S	R			
SS-10	Staphylococc	S	S	S	S	S	S	S			
SS-11	Lactobacill	S	R	S	S	S/I	S	R			
SS-12	Lactobacill	S	I/S	R	S	I/S	S	R-I-S			
SS-13	Lactobacill	S	S/I	R/I	S	R-I-S	S	R-I-S			
SS-14	Lactobacill	S	S	R	S	R-I-S	S	R-I-S			
SS-15	Staphylococc	S	S	I/S	S	S	S	S			
SS-16	Lactobacill	S	R/I*	S	S	R*	S*	R			
SS-17	Lactobacill	S	R	S	S	S/I	S	R			
SS-18	Staphylococc	S	S	S	S	S	S	S			
SS-19	Lactobacill	S	R*	S	S	R/I*	S*	R/I			
SS-20	Lactobacill	S	I/R	R	S	R/I	S	R			
SS-21	Staphylococc	S	S	S	S	S	S	S			
SS-22	Lactobacill	S	R/I	R	S	I/R	S	R			
SS-23	Staphylococc	S	S	S	S	S	R	S			
SS-24	Lactobacill	S	R/I*	S	S	R/I*	S*	R			
SS-25	Staphylococc	S	S/I	S	S	S	R	S			
NS-1	Pediococc	S	R*	S	S	R*	S*	R			
NS-2	Staphylococc	S	S	S	S	S	S	S			
NS-3	Lactobacill	S	R*	S	S	R/I*	S*	R			
NS-4	Staphylococc	S	S	S	S	S	S	S			
NS-5	Lactobacill	S	R*	S	S	R*	S*	R			

Isolatnr.	Bakterie	Følsomhet overfor antibiotika (R-I-S)	Amp	Cipr	Cefo	Ery	Gen	Tet80	Van	Pen	Trim+sulf
NS-6	Lactobacill	S	R/I*	S	S	S/I*	S*	R	S*	R	
NS-7	Lactobacill	S	R*	S	S	R*	S*	R	S*	R	
NS-8	Lactobacill	S	R*	S	S	R*	S*	R	I/S*	S/I	
NS-9	Lactobacill	S	R*	S	S	R*	S*	R	R/I*	I/R	
NS-10	Staphylococc	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
NS-11	Lactobacill	S	R*	S	S	R/I*	S*	R	S*	R	
NS-12	Lactobacill	S	R*	S	S	R*	S*	R	S*	R	
NS-13	Staphylococc	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
NS-14	Lactobacill	S	R/I*	S	S	R*	S*	R	S*	R	
NS-15	Staphylococc	S	S	S	S	S	R	S	I/R	S	
NS-16	Lactobacill	S	R*	S	S	R*	S*	R	S*	R	
NS-17	Staphylococc	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
SM-1	Streptococc	S	S/I	S	S	S/I	S	S	S		
SM-2	Lactobacill	S	R	S	S	R	S	S	S		
SM-3	Lactococc	S	I/S	S	S	S	S	S	S		
SM-4	Leuconostoc	S	S	S	S	S	S	R	S		
SM-5	Lactococc	S	S/I	S	S	S	S	S	S		
SM-6	Leuconostoc	S	S	S	S	S	S	R	S		
SM-7	Lactococc	S	S	S	S	S/I	S	S	S		
SM-8	Leuconostoc	S	S	S	S	S	S	R	S		
SM-9	Lactococc	S	S/I	S	S	S	S	S	S		
SM-10	Leuconostoc	S	S	S	S	S	S	S	S		
SM-11	Lactobacill	S	R*	S	S	I/R*	S*	S	S		
SM-12	Lactococc	S	R	S	S	S/I	S	S	S		
SM-13	Lactococc	S	S	S	S	S	S	S	S		
SM-14	Leuconostoc	S	S	S	S	S	S	R	S		
SM-15	Lactobacill	S	R*	S	S	S/I-R*	S*	S	S		
SM-16	Bifidobacterium	S	S	S	S	I/S	S	S	S		
SM-17	Streptococc	S	S	S	S	S/I	S	S	S		
SM-18	Lactobacill	S	R*	S	S	S/I-S*	S*	S	S		
SM-19	Lactobacill	S	S*	S	S	R*	S*	R	S		
SM-20	Lactococc	S	S-I-R	S	S	S	S	S	S		
SM-21	Leuconostoc	S	I/S	S	S	S	S	S	S		

Isolatnr.	Bakterie	Følsomhet overfor antibiotika (R-I-S)	Amp	Cipr	Cefo	Ery	Gen	Tet80	Van	Pen	Trim+sulf
SM-22	Lactococc	S	S	I/R	S	S	S	S	S		
SM-23	Leuconostoc	S	S	S	S	S	S	S	S		
SM-24	Leuconostoc	S	R	R	S	R-I-S	S	S	R		
SM-25	Lactobacill	S	R*	R*	S	S*	S*	S*	S		
NM-1	Streptococc	S	S	S	S	S/I	S	S	S		
NM-2	Lactobacill	S	R	R	S	R	S	S	S		
NM-3	Lactococc	S	S/I	S/I	S	S	S	S	S	S	I/S
NM-4	Lactococc	S	S/I	S/I	S	S	S	S	S	S	R/I
NM-5	Lactococc	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NM-6	Lactococc	S	S/I	S/I	S	S	S	S	S	S	S/I
NM-7	Lactobacill	S	R	R	S	R-I-S	S	S	R	S	R/I
NM-8	Lactococc	S	R/I	R/I	S	S	S	S	S	S/I	R
NM-9	Streptococc	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NM-10	Lactobacill	S	R/I	R/I	S	R/I	S	S	R	S	S
NM-11	Lactobacill	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R
NM-12	Lactobacill	S	S/I	S/I	S	R	S	S	R	S	R
NM-13	Lactococc	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
NM-14	Propionibacterium	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Im-1		S	S	S	S	S	S	I/S	R	S*	I/S
Im-2		S	R*	R*	S	S*	S*	S*	R	S	R
Im-3		S	S	S	S	S/I	S	S	S	S	R/I
Im-4		S	I/S	I/S	S	S	S	S	R	S	S
Im-5		S	R*	R*	S	S*	S*	S*	R	S*	R
Im-6		S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
Im-7		S	S/I*	S/I*	S	S*	S*	S*	R	S*	S
Im-8		S	R/I	R/I	S	S	S	S	R	R	R
Im-9		S	I/S	I/S	S	I/S	S	S	R	R/I	R
Im-10		S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
Im-11		S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Im-12		S	R	R	S	S	S	S	S	S	S/I
Im-13		S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Im-14		S	S	S	S	S	S	S	R	S	R

Isolatnr.	Bakterie	Følsomhet overfor antibiotika (R-I-S)	Amp	Cipr	Cefo	Ery	Gen	Tet80	Van	Pen	Trim+sulf
Im-15		S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Im-16		S	R-I-S	S	S	S/I	S	S	R	R/I	R
Im-17		S	I/S	S	S	S	S	S	R	R	R
Im-18		S	R	S	S	R/I	S	S	S	R/I	S
Im-19		S	I/S*	S	R	I/R*	S*	R	R	S*	R
Im-20		S	S/I	S	S	S	S	S	S	S	R
Im-21		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Im-22			S/I			S/I	S	S		S	I/S
Im-23		S	S	R		R	S	S	R	R	R
Im-24		S	I/R	S	S	S	S	S	S	R-I-S	I/S
Im-25		S	R/I	S	S	S	S	S	S	I/S	R/I
Im-26		S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
Im-27		S	R-I-S	S	S	S	S	S	S	R/I	S/I
Im-28		S	S/I	S	S	S	S	S	S	R/I	S
Im-29		S	R-I-S	S	S	S	S	S	R	I/R	R
Im-30		S	R	S	S	R/I	S	S	S	R-I-S	S
Pr-1	Enterococc	S	I/S	R	I	R/I	S	S	S	R	S
Pr-2	Bifidobacterium	S	R/I*	S	I	R*	S*	S	S	S*	S
Pr-3	Bifidobacterium	S	I/S*	S	R/I	R*	S*	S	S	S*	R
Pr-4	Enterococcus	S	R/I	R	R/I	R/I	S	S	S	R	S
Pr-5		S	R/I*	S	R/I	R*	S*	S	S	S*	R
Pr-6		S	R	R	R/I	R	S	S	R	R	I/S
Amp=ampicillin (33µg), Cipr=ciprofloxacin (10µg), Cefo=cetotaxim (30µg), Ery=erythromycin (78µg), Gen=gentamicin (40µg), Tet80=tetracyclin (80µg), Van=vancomycin (70µg)											
Pen=penicillin (5µg), Tim/sulf=trimetoprim(5.2µg)/sulphonamid(240µg).											
SS=Stærkultur spekepølse, NS=Næringsmiddel spekepølse, SM=Stærkultur meieriprodukt, NM=Næringsmiddel meieriprodukt, Im=Importert ost, Pr=Preparat											
Bakterieisolatens følsomhet overfor antibiotikaene er angitt som R (resistent), I (intermediær) eller S (sensitiv).											
Grenseverdier for inndeling i R, I og S er ikke oppgitt for tetracyclin (10µg) og chloramphenicol(10µg).											
Pga usikkerheten i avlesningene av hemmingssonene på +/-2mm kunne et isolat i noen tilfeller plasseres i flere av disse kategoriene (angitt som R/I, I/R, S/I, I/S, R-I-S el. S-I-R).											
Den første bokstaven angir isolatets følsomhet ut fra den avleste mm-verdien.											
* Signifikant forskjellige hemmingssonestørrelser mellom MRS 5.4 og MHAA++.											