



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap

# **Effekt av antibiotika i spädningvätska för spermier på mikrofloran i cervikala delen av soggans vagina**

**The effects of antibiotics in semen extender on the microbial flora of the caudal cervix of the sow**

*Cecilia Kellerman*

*Uppsala  
2019*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*



# Effekt av antibiotika i spädningssväska för spermier på mikrofloran i cervikala delen av soggans vagina

## The effects of antibiotics in semen extender on the microbial flora of the caudal cervix of the sow

*Cecilia Kellerman*

**Handledare:** Jane Morrell, institutionen för kliniska vetenskaper

**Biträdande handledare:** Ingrid Hansson och Lise-Lotte Fernström, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, Lena Eliasson-Selling, Gård & Djurhälsan

**Examinator:** Margareta Wallgren, institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0869

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2019

**Elektronisk publicering:** <https://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** antibiotikaresistens, artificiell insemination, cervix, spädningssväska, sogg, vagina, normalflora

**Key words:** antimicrobial resistance, artificial insemination, cervix, microbial flora, semen extender, sow, vagina

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper



## SAMMANFATTNING

Artificiell insemination med färsk sperma är den vanligaste reproduktionstekniken inom grisuppfödningen i många delar av världen. Vid framställning av semindoser späds ejakulatet med särskilda spädningvätskor innehållande antibiotika som tillsätts för att undvika att de bakterier som kontaminerat ejakulatet under samling och framställning växer till under lagringen och skadar spermierna och orsakar infektion eller nedsatt fertilitet hos suggan. Studiens syfte var att undersöka vilka bakterier som normalt finns i vagina hos gyltor och suggor och om det förekommer någon minskad sensitivitet för antibiotika hos den bakteriella normalfloran till följd av exponeringen av antibiotika.

För att undersöka huruvida antibiotika som tillsätts till spädningvätskan inom artificiell insemination påverkar den mikrobiella normalfloran hos hongrisar provtogs 30 suggor och 30 gyltor från tre gårdar i Mellansverige under hösten 2018. Vaginalproven togs med hjälp av sterila skyddade provtagningspinnar. Proven analyserades genom direktodling på nötblodagar, blåagar, mannitolsaltagar, COBA och MRS-agar. Påvisade bakterier renodlades på blodagar och artbestämdes sedan med hjälp av Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS. Totalt artbestämdes 280 isolat, 72,9 % av isolaten tillhörde tre genera: *Staphylococcus*, *Streptococcus* och *Corynebacterium*.

Resistensundersökning av utvalda bakterier visade ingen tydlig skillnad mellan de två grupperna av djur. För samtliga resistensundersökta bakterier kunde en mer eller mindre stor spridning av känslighet för någon eller några antibiotika ses hos både suggor och gyltor. Hos samtliga *Staphylococcus* spp. sågs en svag tendens till minskad känslighet för penicillin hos suggor i jämförelse med gyltor men djurantalet i grupperna var litet så skillnaderna var inte signifikanta.

## SUMMARY

Use of artificial insemination with fresh semen is the most common reproduction method for breeding pigs in many parts of the world. During semen processing the ejaculate is extended and antibiotics are added to control bacterial contamination that otherwise damages the spermatozoa and could result in an infection or reduced fertility in the sow. The purpose of this study was to investigate the normal bacterial flora of the vagina in gilts and sows and to see if there is an increased resistance to antibiotics among the bacteria due to the exposure to antibiotics in semen extenders.

Samples were taken from 30 sows and 30 gilts on three farms in the middle of Sweden during the autumn of 2018. The vaginal samples were taken with guarded swabs. The samples were analyzed by culturing on bovine blood agar, blue agar, mannitol salt agar, COBA and MRS agar. Detected bacteria were identified by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS. A total number of 280 isolates was identified: 72,9 % of those belonged to three genera: *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Corynebacterium*.

There was no significant difference in the resistance of the bacteria in the two groups although there was a tendency for decreased sensitivity to penicillin among all of the tested *Staphylococcus* spp. of the sows compared to the gilts. However, due to the small number of animals, it was not possible to draw a conclusion from these results. All of the tested bacteria showed a varying degree of sensitivity to different antibiotics regardless of which group of sows they came from.

## INNEHÅLL

INLEDNING	1
Syfte	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
Artificiell insemination i Sverige	2
Framställning av inseminationsdoser	2
Samling av sperma från galt	2
Kylning, spädning och paketering	3
Spädningsvätskan	4
Tillsats av antibiotika	5
Bakteriers påverkan på spermier	5
Normalflora i vagina och cervix hos sugor	6
Utveckling och spridning av antibiotikaresistens	6
Mutationer	7
Plasmidöverförd resistens	7
Konjugation	7
Transduktion	8
Transposoner	8
Alternativ till antibiotika i spädningsvätska	8
Single Layer Centrifugation	8
Cationic antimicrobial peptides	9
MATERIAL OCH METODER	10
Studiepopulation	10
Inklusionskriterier	10
Provtagningsmetod	10
Analysmetod och material	11
Resistensundersökning	11
RESULTAT	12
Isolerade bakterier	12
Resistensbestämning	14
DISKUSSION	18
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING	20
Kan seminering orsaka antibiotikaresistens?	20
Hur blir bakterier resistenta mot antibiotika?	20
Hur genomfördes försöket?	21
Resultat	21
TACK	22
REFERENSER	23

## FÖRKORTNINGAR

AI	Artificiell Insemination
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
BTS	Beltsville Thawing Solution
CAMHB	Katjonsjusterad Müller Hinton-buljong
CFU	Colony-Forming Units
COBA	Colistin Oxolinic Blood Agar
DNA	Deoxyribonukleinsyra
ECOFF	Epidemiological cut-off values
EU	Europeiska Unionen
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MRS	deMan Rogosa Sharpe
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Natriumklorid
PBP2A	Penicillin binding protein 2A
RNA	Ribonukleinsyra
SLC	Single Layer Centrifugation
SPF	Specific Pathogen Free



## INLEDNING

Artificiell insemination med färsk sperma är sedan flera decennier en mycket vanlig reproduktionsteknik inom grisuppfödningen i stora delar av världen (Knox, 2016). Tekniken gör det möjligt att hålla ett större antal suggor i grupp som kan insemineras samtidigt för att kunna sektionera, effektivisera och resursplanera uppfödningen. En annan fördel är snabbare avelsframsteg så att värdefulla avelsgaltar kan användas för insemination av fler suggor genom spädning av ejakulaten.

Vid samling av sperma från galtar är det i det närmaste oundvikligt att ejakulatet kontamineras med bakterier trots noggranna hygienrutiner. Det kan vara bakterier från galten, personalen eller från t.ex. luft och ventilationssystem som kontaminerar ejakulatet under framställningen av den färdiga semindosen (Althouse, 2008). Många bakterier trivs också i den miljö som spermier förvaras i och tillsätts inte antibiotika konkurrerar de om samma näringsämnen. Bakterier har en negativ effekt på spermier t.ex. i form av förkortad livslängd, sänkt motilitet och akrosomskador (Althouse *et al.*, 2000; Bussalleu *et al.*, 2011). Detta resulterar i sämre dräktighetsresultat, därför tillsätts antibiotika till spädningssvätskan för att förhindra tillväxt av bakterierna. Det kan dock förekomma att resistenta bakterier överlever och växer till i semindoserna trots tillsats av antibiotika (Althouse & Lu, 2005; Kuster & Althouse, 2016).

Fokus har tidigare lagts på galtarna och vilka bakterier som förekommer i ejakulatet och i de färdiga semindoserna (Althouse & Lu, 2005; Kuster & Althouse, 2016) men det saknas kunskap om hur användningen av antibiotika i spädningssvätskan påverkar hondjuren som insemineras. Vilka bakterier finns i vagina och cervix hos hongrisar? Förekommer antibiotikaresistens hos den mikrobiella normalfloran i den cervikala delen av vagina på suggor som en följd av upprepade inseminationer i jämförelse med gyltor som aldrig har blivit inseminerade?

Det är allmänt känt att bakteriers utveckling av resistens mot antibiotika är ett hot mot både människors och djurs hälsa och all användning av antibiotika bör ifrågasättas och prioriteras till de områden där inget alternativ i dagsläget finns för att bromsa resistensutvecklingen.

### Syfte

Syftet med studien var att undersöka och jämföra förekomsten av bakterier i vagina och cervix hos gyltor och hos suggor som grisat minst tre gånger samt att resistensundersöka påvisade bakterier för att få en uppfattning om resistenta bakterier förekommer oftare hos suggor som semineras minst tre gånger jämfört med gyltor som aldrig har inseminerats.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Artificiell insemination i Sverige

Artificiell insemination, AI, med färsk sperma är den vanligaste reproduktionstekniken inom grisproduktionen i Sverige och används till en stor andel av suggorna i landet. Under 2017 såldes ca 700 000 semindoser från galtstationerna i Sverige (Svenska Köttföretagen AB, 2018a). I Sverige finns för tillfället två galtstationer där galtar hålls för samling av sperma för distribution till gårdar runt om i landet (Jordbruksverket, 2017). Verksamheten kräver tillstånd från jordbruksverket (SFS 1985:343) och regleras av Jordbruksverkets föreskrifter (SJVFS 2000:72). I föreskrifterna finns beskrivet det mesta från att personer som arbetar i verksamheten skall ha godkänd utbildning för respektive område till provtagnings- och karantänsrutiner för insättning av nya galtar i verksamheten. Galtar som används för samling av sperma till AI står under noggrann kontroll och genomgår ett omfattande provtagningsprogram inför och under sin tid på galtstationen för att i möjligaste mån undvika spridning av patogener via sperma, men det finns även risk att icke patogena bakterier kan spridas och dessa upptäcks inte bland de provtagningar som utförs i samband med insättning och under vistelsen på galtstationerna.

Fördelarna med AI är många. Tekniken har möjliggjort den produktionsform vi ser idag med ”allt in- allt ut-principen” där grunden är att alla grisar i en avdelning är lika gamla och smitta från äldre till yngre grisar undviks under förutsättning att avdelningar är sektionerade och att det finns väl etablerade interna smittskyddsregler som följs av alla som är involverade i produktionen. Resurser kan fördelas genom t.ex. ökad tillsyn av djuren vid tiden för förlossning. Avdelningen kan sedan, i och med att grisarna är jämngamla, efter en tid tömmas helt, rengöras och desinficeras innan nästa omgång grisar flyttar in. Det har resulterat i ett minskat smittryck och därmed friskare grisar. För att åstadkomma detta krävs att en större grupp av suggor blir dräktiga samtidigt och följaktligen grisar ungefär samtidigt, vilket är praktiskt möjligt tack vare AI.

Ytterligare en fördel med AI är snabbare avelsframsteg. Värdefulla avelsgaltar kan användas för insemination av fler suggor. Antalet spermier i ett ejakulat från en galt varierar mellan ungefär 60 till 120 miljarder spermier (Flowers, 2008) och kan spädas och användas för framställning av 20–45 semindoser innehållande vardera 2,3–3,0 miljarder spermier (Knox, 2016).

### Framställning av inseminationsdoser

#### *Samling av sperma från galt*

Vid samling av sperma får galten bestiga en fantom med form och höjd som påminner om ett hondjur och samlingen utförs för hand av utbildad personal (SJVFS 2000:72). Att samla ett ejakulat från en galt tar cirka femton minuter och det är mycket viktigt att undvika att det kommer med smuts eller urin i sperman under samlingens gång.

Personen som ska samla ejakulatet håller med behandlad hand om penis och undviker att sperman sköljer över handen, sperman samlas i en plastpåse i en behållare som håller 30°C.

Öppningen täcks med en silduk för att skilja bort det geléartade sekretet från bulbo-urethralkörtlarna (Noakes *et al.*, 2001).

Hygien är mycket viktig för att i möjligaste mån undvika bakteriekontamination. Efter samling försluts plastpåsen med sperman och märks upp med galtens identitet, ras och vem som utfört samlingen. Dosen placeras sedan i en förvärmad termos och fraktas med rörpost till laboratoriet. Spermadosen vägs och prov tas för kontroll av spermietäthet för att kunna beräkna hur mycket spädningssväska som kan tillsättas och därmed hur många inseminationsdoser ejakulatet räcker till.

En färdig inseminationsdos (Figur 1), har en volym av 80 ml och innehåller totalt mellan 2,3 och 3,0 miljarder spermier. Olika spädningssväskeor ger olika hållbarhet. Spermernas utseende och motilitet kontrolleras i mikroskop och ett prov från varje batch kontrolleras dagligen så länge dosernas hållbarhet garanteras (Svenska Köttföretagen AB, 2018b).

Galtens ejakulat är uppdelat i tre fraktioner som skiljs åt i utseende och densitet. Den första fraktionen kommer huvudsakligen från prostata och är relativt genomskinlig med lågt spermieinnehåll. Den andra och spermierika fraktionen kommer från bitestiklarna. Fraktionen blir successivt vitare till färgen, ju vitare ejakulat desto färre spermier vilket beror på att sädesblåsorna börjar att tömma sig. I den tredje fraktionen finns få spermier och innehåller istället sekret från sädesblåsorna men också från prostata och bulbo-urethralkörtlar, det sistnämnda känns igen genom sin klistriga konsistens (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009). Galtar har stor ejakulatvolym, i genomsnitt cirka 250 ml, i jämförelse med t.ex. hingstar och tjurar vars ejakulatvolym är cirka 60 respektive 4 ml (Noakes *et al.*, 2001).

Vid samling undviks i möjligaste mån den första fraktionen då den i regel är rikligt kontaminerad med celldebris, urin och smegma från preputiet (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009). Vid naturlig betäckning deponeras i samband med ejakulationen sperma inklusive bakterier i cervix hos hondjuret men tack vare hondjurets lokalt förhöjda immunologiska beredskap under östrus i form av neutrofiler och lymfocyter utvecklas i regel ingen sjukdom (Kaeoket *et al.*, 2001).

### **Kylning, spädning och paketering**

Efter samling börjar arbetet med att kyla, späda och paketera inseminationsdoserna. Spermerna behöver kylas för att sänka deras metabolism och försätta dem i ett slags vilostadium för att förlänga deras livslängd (Althouse, 2008). Galt spermier är känsliga för köldchock och det är därför viktigt att inte kylningen går för fort för att behålla livsdugligheten och därmed befruktningssugligheten hos spermerna (Johnson *et al.*, 2000). Alltför snabb nedkylning påverkar spermerna negativt på flera sätt. Akrosomen som sitter på spermiehuvudet och behövs för att spermien ska kunna penetrera ägget vid befruktningen, skadas om spermien utsätts för snabb kylning (Pursel *et al.*, 1973). Andra organeller som ofta skadas vid köldchock är plasmamembranet och mitokondrierna. En effekt av detta är nedsatt rörelseförmåga och motilitet (Yi *et al.*, 2008).

Ejakulatet primärspäds 1:1 vid 30°C och därefter bestäms spermiekoncentrationen. När ejakulatet sedan svalnat till 22–24°C sker den slutliga spädningen med spädningsvätska som håller samma temperatur (+/- 2°C) som ejakulatet för att undvika köldchock (Dalin *et al.*, 2009). Vid spädning 1:6 eller mer direkt efter samling har det visats att spermier är mer känsliga för köldchock. Om ejakulatet primärspäds upp till 1:2 och sedan inkuberas under några timmar i 30°C utvecklar spermier en viss resistens mot köldchock (Pursel *et al.*, 1973). Inkuberings-tiden i Pursel's försök var 1, 3 respektive 5 timmar och med längre inkubering före hastig nedkyllning sågs en högre andel spermier med normala akrosomer och bättre motilitet.

Efter den slutliga spädningen paketeras sperman i förpackningar innehållande 80 ml per dos. Den slutliga förvaringstemperaturen fram tills insemination rekommenderas vara 17–20°C (Svenska Köttföretagen AB & Gård & Djurhälsan, 2017).



Figur 1. Färdig inseminationsdos. (Foto: Isabella Lundgren.)

### **Spädningsvätskan**

Spädningsvätskan ska förutom att öka volymen även förse spermier med näring, skydda mot skador i samband med nedkyllning och samtidigt hålla pH stabilt. Det finns olika fabrikat med varierande innehåll och egenskaper beroende på hur lång tid spermier ska hållas befruktningssugliga.

Färsk sperma har från början ett pH mellan 7,2 och 7,5. Om pH-värdet sjunker minskar spermernas motilitet och metabolism gradvis (Johnson *et al.*, 2000).

Spädningsvätskan fungerar som ett bra näringssubstrat för spermier men även för eventuella bakterier som kontaminerat semindosen, utan tillsats av antibiotika kan de växa (Althouse *et al.*, 2000). Tillsatsen av antibiotika är reglerad i Jordbruksverkets föreskrifter om seminverksamhet med svin i kapitel 3, 3§. Det anges vilka och vilken mängd antibiotika som ska tillsättas för export till andra länder inom EU, i det fallet handlar det om streptomycin, penicillin, lincomycin och spectinomycin eller motsvarande för likvärdig effekt mot leptospira och mycoplasma. För användning av sperma nationellt krävs tillsats av antibiotika som förhindrar bakterietillväxt men valet av antibiotika kan revideras efter behov (SJVFS 2000:72). På galtstationen förs journal avseende vilken spädningsvätska som används, typ av antibiotika eller kemoterapeutika och denna arkiveras under minst tre år.

I Sverige används idag spädningsvätskorna Beltsville Thawing Solution (BTS) och NutriXcell + vilket ger en spermieöverlevnad på 3 respektive 5 dygn. Till spädningsvätskan

tillsätts alltid antibiotika. För att undvika toxisk effekt på spermerna tillsätts ofta låga koncentrationer av antibiotika men av olika sorter (Johnson *et al.*, 2000).

### **Tillsats av antibiotika**

Som tidigare nämnts är tillsats av antibiotika reglerat i föreskrifter hos Jordbruksverket (SJVFS 2000:72). Det krävs tillsats av antibiotika ”vars effekt mot leptospira och mycoplasma minst är likvärdig med effekten av 500 µg streptomycin per ml, 500 IE penicillin per ml, 150 µg lincomycin per ml och 300 µg spectinomycin per ml slutlig spädning” för galt sperma avsedd för export inom EU. Vanliga antibiotika som tillsätts till spädningssvåtskor för användning till galt sperma är, förutom de ovan nämnda, gentamicin, neomycin, amoxicillin, tylosin, polymixin och enrofloxacin (Althouse, 2008). Information om vilken mängd och typ av antibiotika som för tillfället anses tillräcklig för att förhindra bakteriell tillväxt i galt sperma som ska användas i Sverige är svårt att få reda på eftersom företaget inte har någon skyldighet att tillhandahålla den informationen. Enligt uppgifter från galtstationen i Hudaryd kommer näring och antibiotika tillsammans i pulverform och på galtstationen tillsätts enbart vatten (Gylling, J., Svenska Köttföretagen AB, pers. medd., 2018-11-14).

Enligt en uppskattning från 2011 används årligen 4 miljoner liter antibiotikainnehållande spädningssvåtska i Europa inom grisnäringen. Beräkningarna utgår ifrån att det finns 14 miljoner suggor som årligen producerar 2,3 kullar vardera (Morrell & Wallgren, 2014). Globalt används med stor sannolikhet betydligt mer.

### **Bakteriers påverkan på spermier**

Bakteriell tillväxt i inseminationsdoser är inte önskvärt av många anledningar. Förutom det uppenbara att bakterier potentiellt skulle kunna orsaka sjukdom och nedsatt fertilitet hos hondjuren, har bakteriell tillväxt även negativa effekter på spermerna. Det förstnämnda är beroende av vilken typ av bakterie som är inblandad medan den negativa effekten på spermerna i första hand avgörs av antalet bakterier (Althouse *et al.*, 2000) men även till viss del av vilken bakterieart (Sone, 1990). *E. coli* hade mer negativ effekt på spermieöverlevnaden än vad t.ex. *Streptococcus* spp. och *Staphylococcus* spp. hade.

Antalet bakterier i ett färskt ejakulat från galt som samlats enligt traditionell metod varierar mycket beroende på teknik och hygien hos den som samlar men är i genomsnitt 27 000 bakterier/ml (Sone, 1990). I den färdigspädda seminvätskan kan bakterierna indelas i två grupper utifrån deras ursprung: från djuret inklusive människan eller från övriga källor. Bakterier ur den förstnämnda gruppen kommer ofta från galtens preputium, avföring, hud/borst, andningsvägar eller från personen som samlat ejakulatet medan bakterier från den andra gruppen härstammar från omgivningen via vatten och vattenledningar, diskhoar, strömmaterial, luft- och ventilationssystem (Althouse, 2008).

De negativa effekter som förekomst av bakterier i semindoser har på spermerna har visats vara nedsatt motilitet och livslängd, spermieagglutination, membran- och akrosomskador (Monga & Roberts, 1994; Althouse *et al.*, 2000; Bussalleu *et al.*, 2011). Bakterierna konkurrerar med spermerna om näring och producerar metaboliska biprodukter som kan skada spermerna

(Althouse, 2008). Okontrollerad bakterietillväxt kan resultera i reproduktionsstörningar i form av omlöp, vaginala flytningar, endometrit, fosterdöd och minskad kullstorlek hos hondjuren som insemineras (Althouse *et al.*, 2000; Maes *et al.*, 2008; Maroto Martín *et al.*, 2010). Kylning av sperma för att sänka spermernas metabolism kan i vissa fall innebära en fördel för bakterier som till skillnad från spermier kan anpassa sig och till och med fortsätta att tillväxa (Althouse, 2008).

### **Normalflora i vagina och cervix hos suggor**

Det finns få studier som beskriver den normala bakteriefloran i cervix hos suggor, en studie som utfördes i Kina jämför bakteriefloran mellan friska suggor och suggor med endometrit (Wang *et al.*, 2017). Hos bägge grupperna var bakterier ur fylum *Firmicutes* vanligast, dit hör bland andra *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. och *Lactobacillus* spp. Därefter kom bakterier ur fylum *Proteobacteria* dit *E. coli* hör. I denna studie ingick dock endast 4 suggor ur respektive grupp. Proverna togs med hjälp av en skyddad provtagningsvabb i form av ett metallrör som fördes in genom vagina varvid en provtagnings svabb roterades ut ur röret och tillbaka igen innan röret drogs ut.

Den mikrobiella normalfloran i främre vagina hos suggor under olika stadier av reproduktionscykeln studerades i Queensland (Bara *et al.*, 1993). 23 suggor från en SPF-besättning (specific pathogen free) ingick i studien och de provtogs med hjälp av skyddade provtagningsvabbar vid nio tillfällen vardera under reproduktionscykeln. Första provet togs en vecka före förlossning, andra provet samma dag som förlossning, därefter togs prov en gång i veckan fram till avvänjning, ett prov dagen efter betäckning och slutligen två och tre veckor efter betäckning. Prov räknades som negativt om färre än åtta kolonier växte ut vid odling. Totalt togs 203 prover och från 75 av dessa isolerades bakterier. Mest bakterier påvisades i samband med grisning och minst antal bakterier tre veckor efter betäckning. Totalt påvisades 142 isolat av många olika genera, 83,7 % av dessa representerades av följande fem genera: *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. och *Micrococcus* spp.

### **Utveckling och spridning av antibiotikaresistens**

Bakterier har funnits på jorden under cirka 3–3,5 miljarder år (Bennett, 2008). De har under den tiden blivit bra på att anpassa och skydda sig mot omgivningen för sin överlevnad.

Antibiotikaresistens hos bakterier är ett ökande problem bland både människor och djur och resulterar i svårbehandlade infektioner. År 2016 beräknades ca 700 000 människor dö av infektioner orsakade av antibiotikaresistenta bakterier och om inget görs för att bromsa utvecklingen beräknas 10 miljoner människor dö årligen år 2050 (amr-review.org, 2016).

Resistensen kan vara antingen naturlig eller förvärvad. Den medfödda resistensen finns kodad i bakteriens arvsanlag, det kan t.ex. involvera cellväggens uppbyggnad, effluxpumpar som gör att antibiotikan transporteras ut ur bakterien eller produktion av enzymer som inaktiverar antibiotikan (Quinn, 2011). Förvärvad resistens kan åstadkommas på olika sätt. Den kan uppstå till följd av mutationer, överföring av genetiskt material via plasmider, makrofager som bär på resistensgener eller transposoner som hoppar mellan bakterier. När bakteriepopulationer

exponeras för antibiotika selekteras de bakterier som är resistenta mot substansen fram och får bättre förutsättningar att föröka sig med minskad konkurrens. Gener som bär på resistens kan spridas mellan bakterier av samma art men även mellan olika arter.

### **Mutationer**

Mutationer i redan existerande genetiskt material i bakterien är ett av de olika scenarier som kan resultera i antibiotikaresistens. Inga nya gener tillförs utan det som sker är förändringar i bakteriens eget DNA (Bennett, 2008). Spontana kromosomala mutationer, som ger upphov till en dottercell med den mutationen, sker i ungefär en av tio miljoner bakterier (Rang & Dale, 2011). Om mutationen ifråga givit upphov till resistens mot antibiotika kommer behandling med antibiotika att selektera fram de förändrade bakterierna. I regel klarar individens eget immunförsvar av att hantera den kraftigt reducerade bakteriepopulationen. Dessutom har ofta muterade bakterier minskad patogenicitet. Det är förstas betydligt mer allvarligt om den primära infektionen orsakas av redan resistenta bakterier.

### **Plasmidöverförd resistens**

Plasmider är extrakromosomalt genetiskt material bestående av cirkulärt, dubbelsträngat DNA lokaliserat i cellens cytoplasma och kan innehålla ett stort antal gener varav en del av dessa gener kan koda för antibiotikaresistens. Plasmider kan replikeras oberoende av den kromosomala aktiviteten. I en och samma cell kan det finnas flera kopior av en plasmid men även olika typer av plasmider (Rang & Dale, 2011).

Det är oklart hur dessa gener har uppstått men det har visats att hos methicillinresistenta *Staphylococcus aureus*, MRSA, har *mecA*-genen som kodar för PBP2A (penicillin binding protein 2A) ursprungligen uppstått hos en annan *Staphylococcus*-art, *S. sciuri*, som sedan överförts till *S. aureus* (Couto *et al.*, 1996). PBP2A har kraftigt minskad affinitet för penicillin och det leder till att penicillinet inte lyckas inhibera cellväggssyntesen, vilket är verkningsmekanismen för penicillin. *S. sciuri* är en vanlig hudbakterie hos många av våra husdjur och hypotesen är att *mecA*-genen uppstått under lång tid under selektivt tryck av penicillin vid profylaktiskt bruk. *MecA*-genen är dock nedreglerad, tyst, och *S. sciuri* är därför generellt känslig för penicillin. Vid uppreglering av genen uppvisar *S. sciuri* resistens mot methicillin och andra betalaktamer (Couto *et al.*, 2003).

### **Konjugation**

Konjugation innebär att två celler kopplas ihop med hjälp av sexpilus med direktkontakt mellan cellernas cytoplasma varvid utbyte av kromosomalt eller extrakromosomalt genetiskt material sker. Förmågan att kunna konjugera finns kodad i vissa plasmider och den egenskapen kan därmed spridas mellan olika bakterier inom samma art men även mellan olika arter. Plasmider som bär på resistensgener har ofta förmåga att konjugera och det är den huvudsakliga vägen för spridning av resistens mellan bakterier (Rang & Dale, 2011).

Som exempel har *S. aureus* genom konjugation erhållit genetiskt material från *Enterococcus* spp. som bär på resistens mot vancomycin (Noble *et al.*, 1992). Vancomycin är ett få alternativ

som står till buds vid svåra MRSA-infektioner. Resistensgenen är kodad i en transposon som är integrerad i en konjugerande plasmid i *Enterococcus* spp. (Arthur *et al.*, 1993).

### **Transduktion**

Vid transduktion överförs genetiskt material med hjälp av virus som infekterar bakterier, s.k. bakteriofager. De är relativt värdspecifika eftersom de binder till specifika receptorer på bakteriens yta och injicerar genetiskt material in i bakteriens cytoplasma. Bakteriofagens genom består av enkel- eller dubbelsträngat DNA eller RNA (Quinn, 2011). Bakteriofager indelas efter deras sätt att replikeras i virulenta fager och termofager. Många bakterier har termofager integrerade i sina kromosomer som s.k. profager eller fria som plasmider (Rohde *et al.*, 2018; Quinn, 2011).

### **Transposoner**

Transposoner är bitar av DNA som med hjälp av enzymer, transposaser, kan byta från en plats i en DNA-molekyl till en annan plats på samma molekyl eller en annan DNA-molekyl (Lambert, 2007).

Till skillnad från plasmider kan inte transposoner replikera sig självständigt men kan integreras i en plasmid replikeras genom att med hjälp av transposaser överföra delar av sitt genetiska material till en annan plasmid. Eftersom transposoner kan bära på resistensgener innebär de en stor risk för spridning av antibiotikaresistens mellan bakterier (Rang & Dale, 2011).

### **Alternativ till antibiotika i spädningvätska**

Lagring och distribution av sperma kräver förutsättningar som gynnar spermernas överlevnad och befruktningsskicklighet. I de förutsättningarna ingår förutom lämplig näring och buffrande egenskaper i spädningvätskan även att reducera kontamination under framställning av inseminationsdoser och att förhindra eventuell bakteriell tillväxt.

### **Single Layer Centrifugation**

Single Layer Centrifugation, SLC, är en metod som går ut på att direkt efter samling separera spermerna från bakterierna som kontaminerat ejakulatet (Morrell & Wallgren, 2011). Studien visade att det går att framställa semindoser som inte innehåller några bakterier alternativt reducerat antal bakterier utan hjälp av antibiotika. Det är fortfarande mycket viktigt att iaktta noggrann hygien vid samling av sperma, att separationen sker direkt efter samlingen och att återkontamination efter centrifugering undviks.

För att genomföra separationen användes i Morell & Wallgrens studie en kolloid (Androcoll™-P; JM Morrell, SLU, Sverige) som är speciellt framtagen för galt sperma, bestående av glycidoxypropyltrimetoxysilane-täckt kiseldioxid i saltlösning. Ejakulat från tio galtar primärspäddes med BTS utan antibiotika och pipetterades försiktigt ovanpå kolloid i ett rör som sedan centrifugerades under 20 minuter varpå spermiedelen av ejakulatet kunde erhållas efter att ha passerat genom kolloiden. I försöket späddes spermiedelen med BTS utan antibiotika-tillsats och lagrades sedan i 16–18°C. Prov togs för bakterieodling och spermieundersökning



direkt efter spädning och sedan efter 24 timmars lagring. Bakterierna räknades och typades och spermernas motilitet undersöktes.

Nio av tio av de ocentrifugerade proverna innehöll bakterier vid första odlingen direkt efter samling, antalet bakterier hade mer än fördubblats efter 24 timmar. Fem av tio av de centrifugerade proverna innehöll inga bakterier vid de två odlingarna. Fyra prover hade lindrig växt av bakterier vid första odlingen som i de flesta av fallen inte hade ökat efter 24 timmar.

Spermiemotiliteten påverkades inte av passagen genom kolloiden (Morrell & Wallgren, 2011).

### ***Cationic antimicrobial peptides***

Antimikrobiella peptider är polypeptider med upp till 100 aminosyror uppbyggda på olika sätt som har visat sig direkt interagera med lipider i bakteriers cellmembran och på så vis destabiliseras membranet för att snabbt döda bakterien (Lohner & Blondelle, 2005). Schulze *et al.* undersökte om antimikrobiella peptider går att använda i färsk sperma istället för vanligen använda antibiotika. I studien jämfördes effekten av antimikrobiella peptider med effekten av gentamicin som är ett vanligt antibiotikum i spädningssvätskor inom AI (Schulze *et al.*, 2014). Schulze *et al.* fann att vissa cykliska hexapeptider (c-WFW och c-WWW) i låg koncentration gav jämförbara resultat med gentamicin gällande spermiekvalitet, motilitet och dräktighetsresultat.

## MATERIAL OCH METODER

### Studiepopulation

Studien pågick under hösten 2018 och sammanlagt ingick 60 till synes kliniskt friska djur från tre konventionella gårdar i Mellansverige med >350 suggor i produktion. Djuren var korsningar mellan Yorkshire och Lantras. På respektive gård provtogs tio gyltor som aldrig blivit inseminerade och tio suggor som avvant minst tre kullar (fördelat kull 3–7). Provtagningen gjordes i samband med ståbrunst, innan inseminering. Samtliga tre gårdar beställde sina inseminationsdoser från samma galtstation.

Provtagningen har godkänts och utförts enligt villkoren för Gård & Djurhälsans tillstånd att använda försöksdjur.

### Inklusionskriterier

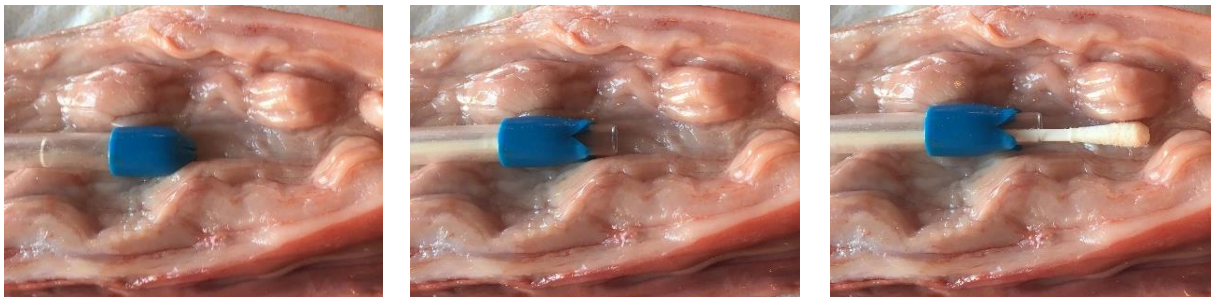
Grupp 1: gyltor som deltog i studien var könsmogna och klara för betäckning och fick inte vara inseminerade tidigare, d.v.s. inte löpt om.

Grupp 2: suggor som deltog i studien hade avvant minst tre kullar till följd av insemination.

Inget djur hade behandlats med antibiotika under de senaste 5 veckorna innan provtagning och hade inte heller några vaginala flytningar vid provtagningstillfället.

### Provtagningsmetod

Metod för provtagning testades på hela könsorgan från slaktade djur (suggor och slaktgrisar) innan provtagning utfördes på levande djur för att få rutin för handhavande av provtagningsutrustning och för att få en känsla av hur långt in pinnen behövde föras hos de olika ålderskategorierna.



Figur 1. Provtagningskateter i cervix på slaktorgan. Av bilderna framgår hur provtagningen gick till för att undvika kontamination av bakterier utifrån. (Foto: Lena Eliasson-Selling.)

Vulva torkades av med torrt papper, blygden särades och den sterila, skyddade provtagningspinnen fördes försiktigt in, initialt i kraniodorsal riktning för att undvika urethra, för att sedan riktas mer kranialt tills ett svagt motstånd alternativt pulvini cervicales, som är framträdande under brunst, kunde kännas. Därefter fördes topsen ut i två steg, roterades ett flertal gånger och fördes sedan tillbaka i skyddat läge igen varefter pinnen drogs ut ur vagina (figur 2). Det inre plaströret med topsen drogs bakåt ut ur det yttre röret och förslöts med medföljande lock.

Provtagningsstoppen placerades sedan inom 30 minuter efter provtagning i Amies kolade transportmedium (Copan Diagnostics Inc.) och förvarades i rumstemperatur till odlingen påbörjades.

### **Analysmetod och material**

De bakterier som förväntades att påvisas var *E. coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. och *Lactobacillus* spp. De odlingsmedier som därför valdes var nötblodagar, blåagar, mannitol-saltagar (selektiv agar för *Staphylococcus* spp.), COBA (selektiv agar för *Streptococcus* spp.) och MRS-agar (selektiv agar för *Lactobacillus* spp.). Samtliga prover analyserades genom direktodling på odlingsmedier inom 6 timmar efter provtagning.

Nötblodagar, blåagar och mannitolsaltagar inkuberades i 37°C i 24 + 24 timmar. COBA inkuberades i CO<sub>2</sub>-skåp i 37°C i 24 + 24 timmar. MRS-agar inkuberades anaerozt i 25°C i fem dygn innan avläsning. Påvisades bakterier renodlades de på hästblodagar vilka inkuberades i 37°C i 24 + 24 timmar innan typning.

Typning av påvisade bakteriestammar utfördes med hjälp av Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Typning av en del av de grampositiva bakterierna underlättades med hjälp av användning av 0,1 µl myrsyra (70 %) som applicerades på respektive bakterieyta på MALDI TOF-skivan och fick torka innan 0,1 µl matrix applicerades.

Två isolat från varje påvisad ( $\geq 2,00$  på MALDI-TOF MS) bakteriespecies per prov sparades i frys i kryorör med BHI och glycerol.

### **Resistensundersökning**

Påvisade isolat som skulle resistensundersökas togs från frysen och odlades på nötblodagar och inkuberades i 37°C i 24 timmar, därefter gjordes renodling från en enskild koloni som inkuberades i 37°C i 24 timmar. Bakteriematerial från 3–5 kolonier från varje renodling av respektive isolat löstes upp i 5 ml katjonsjusterad Müller Hinton-buljong, CAMHB. Buljonglösningen inkuberades under 1 timme och 50 minuter för *E. coli*, 4 timmar för *Staphylococcus* spp. och 3,5 timmar för *Streptococcus suis*. i 36°C. Därefter överfördes 10 µl (8 µl för *S. suis*) av lösningen till 10 ml CAMHB. Lösningen inokulerades i mikrotiterplattor, 50 µl i varje brunn. Inokulatets täthet kontrollerades genom att 10 µl av inokulatet fördes över till 10 ml 0,9 % NaCl-lösning. Från denna spädning togs 100 µl och spreds över en nötblodagarplatta. Efter inkubering i 36°C i 18 timmar kontrollerades att 20–80 colony-forming units (CFU) kunde räknas. Efter inkubering i 36°C i 18 timmar lästes MIC som den lägsta koncentrationen som hämmade synlig växt.

Den epidemiologiska brytpunkten (ECOFF) som användes för bestämning av resistens är framtagen av Europeiska kommittén för test av antibiotikaresistens (EUCAST, 2018).

För kvalitetskontroll användes kontrollstammar. *E. coli* ATCC 25922 för gramnegativa bakterier och *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 för *Staphylococcus* spp. och *Streptococcus* spp.

## RESULTAT

### Isolerade bakterier

Bakterier isolerades från samtliga 60 provtagna djur. Totalt artbestämdes 280 bakterieisolat av 48 olika arter. Från suggor artbestämdes 132 isolat och från gyltor 148 isolat. Samtliga bakterier tillhörde något av följande tre fylum: *Firmicutes* (174 isolat), *Actinobacteria* (82 isolat) och *Proteobacteria* (24 isolat). 72,9 % av isolaten tillhörde tre genera: *Staphylococcus*, *Streptococcus* och *Corynebacterium* (Tabell 1).

Tabell 1. Fördelning av isolat för respektive grupp och totalt

Bakterie Genus alt. art	Fylum	Grupp		
		Antal isolat hos båda grupperna totalt.	Antal isolat inom gruppen suggor.	Antal isolat inom gruppen gyltor.
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Firmicutes</i>	85	42	43
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Firmicutes</i>	69	34	35
<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Actinobacteria</i>	50	24	26
<i>Actinomyces</i>	<i>Actinobacteria</i>	19	4	15
<i>Actinobacillus rossii</i>	<i>Proteobacteria</i>	13	6	7
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Firmicutes</i>	13	7	6
<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteobacteria</i>	7	3	4
<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Actinobacteria</i>	6	1	5
<i>Rothia nasimurium</i>	<i>Actinobacteria</i>	6	1	5
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Firmicutes</i>	3	2	1
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Firmicutes</i>	2	2	-
<i>Pasteurella</i> spp.	<i>Proteobacteria</i>	2	2	-
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Firmicutes</i>	1	1	-
<i>Globicatella sanguinis</i>	<i>Firmicutes</i>	1	1	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Proteobacteria</i>	1	1	-
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteobacteria</i>	1	1	-
<i>Trueperella abortusis</i>	<i>Actinobacteria</i>	1	-	1

Arter inom genus *Staphylococcus* isolerades i 55 av 60 prover och var fördelade på 12 olika arter (Tabell 2). Bakterier ur genus *Streptococcus* isolerades i 49 av 60 prover och var fördelade på 8 olika arter (Tabell 3). *Corynebacterium* spp. isolerades i 40 av 60 prover och var fördelade på 8 olika arter (Tabell 4).

Tabell 2. Artfördelning inom genus *Staphylococcus*, antal isolat

Art	Gård 1		Gård 2		Gård 3		Totalt
	Suggor	Gyltor	Suggor	Gyltor	Suggor	Gyltor	
<i>S. lentus</i>	8	4	1	5	1	1	<b>20</b>
<i>S. sciuri</i>	-	1	4	3	5	4	<b>17</b>
<i>S. chromogenes</i>	-	2	2	3	2	7	<b>16</b>
<i>S. rostri</i>	1	-	2	2	4	1	<b>10</b>
<i>S. epidermidis</i>	2	1	1	1	-	-	<b>5</b>
<i>S. equorum</i>	1	2	-	1	-	-	<b>4</b>
<i>S. gallinarum</i>	-	-	-	-	3	1	<b>4</b>
<i>S. xylosum</i>	1	-	1	-	-	1	<b>3</b>
<i>S. hominis</i>	1	-	-	-	-	1	<b>2</b>
<i>S. simulans</i>	1	1	-	-	-	-	<b>2</b>
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	1	-	-	<b>1</b>
<i>S. hyicus</i>	1	-	-	-	-	-	<b>1</b>

Tabell 3. Artfördelning inom genus *Streptococcus*, antal isolat

Art	Gård 1		Gård 2		Gård 3		Totalt
	Suggor	Gyltor	Suggor	Gyltor	Suggor	Gyltor	
<i>S. thoraltensis</i>	3	5	7	4	2	7	<b>28</b>
<i>S. suis</i>	4	4	4	8	3	1	<b>24</b>
<i>S. hyovaginalis</i>	1	-	3	1	3	2	<b>10</b>
<i>S. orisratti</i>	1	-	1	-	-	-	<b>2</b>
<i>S. pluranimalium</i>	-	-	-	1	1	-	<b>2</b>
<i>S. canis</i>	-	-	1	-	-	-	<b>1</b>
<i>S. dysgalactiae</i>	-	-	-	1	-	-	<b>1</b>
<i>S. hyointestinalis</i>	-	1	-	-	-	-	<b>1</b>

Tabell 4. Artfördelning inom genus *Corynebacterium*, antal isolat

Art	Gård 1		Gård 2		Gård 3		Totalt
	Suggor	Gyltor	Suggor	Gyltor	Suggor	Gyltor	
<i>C. xerosis</i>	6	6	-	6	6	3	<b>27</b>
<i>C. freneyi</i>	3	1	6	3	-	2	<b>15</b>
<i>C. glucuronolyticum</i>	-	-	1	2	-	-	<b>3</b>
<i>C. auricosum</i>	-	-	1	-	-	-	<b>1</b>
<i>C. casei</i>	-	1	-	-	-	-	<b>1</b>
<i>C. confusum</i>	-	1	-	-	-	-	<b>1</b>
<i>C. glutamicum</i>	1	-	-	-	-	-	<b>1</b>
<i>C. stationis</i>	-	1	-	-	-	-	<b>1</b>

*Bacillus* spp. isolerades i 12 av 60 prover fördelade på 3 olika arter (Tabell 5). *Micrococcus* spp. isolerades i 6 av 60 prover, *Enterococcus* spp. isolerades i 3 av 60 prover och *Pasteurella* spp. isolerades i 2 av 60 prover (Tabell 6).

Tabell 5. Artfördelning inom genus *Bacillus*, antal isolat

Art	Gård 1		Gård 2		Gård 3		Totalt
	Suggor	Gyltor	Suggor	Gyltor	Suggor	Gyltor	
<i>B. licheniformis</i>	-	-	1	-	5	2	<b>8</b>
<i>B. pumilus</i>	-	-	-	1	1	2	<b>4</b>
<i>B. flexus</i>	-	-	-	-	-	1	<b>1</b>

Tabell 6. Artfördelning inom genus *Micrococcus*, *Enterococcus* och *Pasteurella*, antal isolat

Art	Gård 1		Gård 2		Gård 3		Totalt
	Suggor	Gyltor	Suggor	Gyltor	Suggor	Gyltor	
<i>M. luteus</i>	-	1	-	3	-	1	<b>5</b>
<i>M. tereus</i>	-	-	-	1	-	-	<b>1</b>
<i>E. aquimarinus</i>	-	-	-	-	1	-	<b>1</b>
<i>E. avium</i>	-	-	-	-	1	-	<b>1</b>
<i>E. cecorum</i>	-	-	-	1	-	-	<b>1</b>
<i>P. mairii</i>	1	-	-	-	-	-	<b>1</b>
<i>P. aerogenes</i>	-	-	1	-	-	-	<b>1</b>

## Resistensbestämning

Resistensundersökning utfördes på *E. coli*, *S. sciuri*, *S. chromogenes*, *S. lentus*, *S. rostri*, *S. suis*, *S. hyovaginalis* och *S. thoralensis*.

Resistensbestämningen av *S. hyovaginalis* och *S. thoralensis* gick inte att tolka eftersom de bakterierna inte växte tillräckligt bra och gav för låga värden vid kontroll av inokulatets täthet. Efter elva timmars förkultivering av *S. hyovaginalis* och sedan spädning enligt instruktion kunde endast en CFU påvisas. *S. thoralensis* förkultiverades i sju timmar men efter spädning kunde endast sju CFU påvisas.

Resultaten av resistensundersökningarna framgår av tabellerna nedan (Tabell 7 - 12). ECOFF-värden är markerade med lodrät linje för respektive antibiotikum alternativt närbesläktat antibiotikum/bakterie där värden för aktuellt antibiotikum saknades i EUCASTs tabell (EUCAST, 2018). Där inget annat anges i tabell 8 - 11 redovisas ECOFF-värden för koagulasnegativa *Staphylococcus* spp. För *Streptococcus suis* (Tabell 12) redovisas ECOFF-värden för alfa-hemolytiska *Streptococcus* spp. där inget annat anges.

Tabell 7. MIC för *Escherichia coli*

	µg/ml	≤0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	≥64
Suggor (N=3)	Ampicillin				66,7%		33,3%				
Gyltor (N=4)					75,0%		25,0%				
Suggor (N=3)	Cefotaxime	100,0%									
Gyltor (N=4)		100,0%									
Suggor (N=3)	Amoxicillin/ (klavulansyra)**					100,0%					
Gyltor (N=4)						100,0%					
Suggor (N=3)	Colistin			66,7%				33,3%			
Gyltor (N=4)				75,0%			25,0%				
Suggor (N=3)	Nitrofurantoin						33,3%		66,7%		
Gyltor (N=4)								25,0%		75,0%	
Suggor (N=3)	Trimetoprim/ (sulfametoxazol)*		100,0%								
Gyltor (N=4)			100,0%								
Suggor (N=3)	Gentamicin				100,0%						
Gyltor (N=4)					100,0%						
Suggor (N=3)	Streptomycin						66,7%		33,3%		
Gyltor (N=4)								50,0%		50,0%	
Suggor (N=3)	Neomycin					100,0%					
Gyltor (N=4)						100,0%					
Suggor (N=3)	Tetracyklin				66,7%		33,3%				
Gyltor (N=4)					100,0%						
Suggor (N=3)	Enrofloxacin	100,0%									
Gyltor (N=4)		100,0%									

\* anger koncentrationen för trimetoprim, testad i förhållandet 1/19 trimetoprim/sulfametoxazol.

\*\* anger koncentrationen för amoxicillin, testad i förhållandet 2/1 amoxicillin/klavulansyra.

Vitt område visar vilka koncentrationer (µg/ml) som testats.

Tabell 8. MIC för *Staphylococcus chromogenes*

	µg/ml	≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	≥64
Suggor (N=4)	Penicillin <sup>2</sup>	25,0%			50,0%			25,0%					
Gyltor (N=12)		83,3%				8,3%			8,3%				
Suggor (N=4)	Cefalotin <sup>2</sup>				100,0%								
Gyltor (N=12)					100,0%								
Suggor (N=4)	Oxacillin					100,0%							
Gyltor (N=12)				66,7%		33,3%							
Suggor (N=4)	Cefoxitin <sup>2</sup>					100,0%							
Gyltor (N=12)						83,3%	16,7%						
Suggor (N=4)	Enrofloxacin <sup>1</sup>			100,0%									
Gyltor (N=12)				100,0%									
Suggor (N=4)	Fusidinsyra				100,0%								
Gyltor (N=12)					100,0%								
Suggor (N=4)	Erytromycin				100,0%								
Gyltor (N=12)					91,7%				8,3%				
Suggor (N=4)	Klindamycin				100,0%								
Gyltor (N=12)					91,7%		8,3%						
Suggor (N=4)	Gentamicin					100,0%							
Gyltor (N=12)						91,7%		8,3%					
Suggor (N=4)	Nitrofurantoin <sup>2</sup>									100,0%			
Gyltor (N=12)										100,0%			
Suggor (N=4)	Tetracyklin			100,0%									
Gyltor (N=12)				91,7%		8,3%							
Suggor (N=4)	Trimetoprim/ (sulfametoxazol)*			75,0%		25,0%							
Gyltor (N=12)				75,0%		25,0%							

\*anger koncentrationen för trimetoprim, testad i förhållandet 1/19 trimetoprim/sulfametoxazol.

<sup>1</sup> ECOFF-värde för ciprofloxacin anges. <sup>2</sup> ECOFF-värde för *S. aureus* anges.

Vitt område visar vilka koncentrationer (µg/ml) som testats.

Tabell 9. MIC för *Staphylococcus lentus*

	µg/ml	≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	≥64
Suggor (N=10)	Penicillin <sup>2</sup>	10,0%	60,0%	20,0%				10,0%					
Gyltor (N=10)			80,0%	20,0%									
Suggor (N=10)	Cefalotin <sup>2</sup>					100,0%							
Gyltor (N=10)						100,0%							
Suggor (N=10)	Oxacillin					30,0%	40,0%	30,0%					
Gyltor (N=10)						10,0%	90,0%						
Suggor (N=10)	Cefoxitin <sup>2</sup>						30,0%	60,0%	10,0%				
Gyltor (N=10)								50,0%	50,0%				
Suggor (N=10)	Enrofloxacin <sup>1</sup>			90,0%		10,0%							
Gyltor (N=10)				100,0%									
Suggor (N=10)	Fusidinsyra				10,0%		60,0%	30,0%					
Gyltor (N=10)								60,0%	40,0%				
Suggor (N=10)	Erytromycin				90,0%					10,0%			
Gyltor (N=10)						80,0%		10,0%		10,0%			
Suggor (N=10)	Klindamycin				10,0%		50,0%	30,0%	10,0%				
Gyltor (N=10)						10,0%	10,0%	70,0%		10,0%			
Suggor (N=10)	Gentamicin					90,0%			10,0%				
Gyltor (N=10)						90,0%					10,0%		
Suggor (N=10)	Nitrofurantoin <sup>2</sup>									100,0%			
Gyltor (N=10)										100,0%			
Suggor (N=10)	Tetracyklin			100,0%									
Gyltor (N=10)				70,0%		10,0%					20,0%		
Suggor (N=10)	Trimetoprim/ (sulfametoxazol)*			60,0%		20,0%	10,0%	10,0%					
Gyltor (N=10)				100,0%									

\*anger koncentrationen för trimetoprim, testad i förhållandet 1/19 trimetoprim/sulfametoxazol.

<sup>1</sup> ECOFF-värde för ciprofloxacin anges. <sup>2</sup> ECOFF-värde för *S. aureus* anges.

Vitt område visar vilka koncentrationer (µg/ml) som testats.

Tabell 10. MIC för *Staphylococcus rostri*

	µg/ml	≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	≥64
Suggor (N=7)	Penicillin <sup>2</sup>	57,1%	14,3%		14,3%			14,3%					
Gyltor (N=3)			33,3%		66,7%								
Suggor (N=7)	Cefalotin <sup>2</sup>					100,0%							
Gyltor (N=3)						100,0%							
Suggor (N=7)	Oxacillin			100,0%									
Gyltor (N=3)				100,0%									
Suggor (N=7)	Cefoxitin <sup>2</sup>					57,1%	42,9%						
Gyltor (N=3)					33,3%		33,3%	33,3%					
Suggor (N=7)	Enrofloxacin <sup>1</sup>					71,4%	28,6%						
Gyltor (N=3)					100,0%								
Suggor (N=7)	Fusidinsyra				100,0%								
Gyltor (N=3)					100,0%								
Suggor (N=7)	Erytromycin				100,0%								
Gyltor (N=3)					100,0%								
Suggor (N=7)	Klindamycin				100,0%								
Gyltor (N=3)					100,0%								
Suggor (N=7)	Gentamicin					100,0%							
Gyltor (N=3)						100,0%							
Suggor (N=7)	Nitrofurantoin <sup>2</sup>									100,0%			
Gyltor (N=3)										100,0%			
Suggor (N=7)	Tetracyklin			28,6%		28,6%		28,6%	14,3%				
Gyltor (N=3)				33,3%					66,7%				
Suggor (N=7)	Trimetoprim/ (sulfametoxazol)*					14,3%		14,3%	42,9%				
Gyltor (N=3)				33,3%					66,7%				

\*anger koncentrationen för trimetoprim, testad i förhållandet 1/19 trimetoprim/sulfametoxazol.

<sup>1</sup> ECOFF-värde för ciprofloxacin anges. <sup>2</sup> ECOFF-värde för *S. aureus* anges.

Vitt område visar vilka koncentrationer (µg/ml) som testats.



Tabell 11. MIC för *Staphylococcus sciuri*

µg/ml	≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	≥64
Suggor (N=9) Gyltor (N=8)	Penicillin <sup>2</sup>	33,3%	66,7%									
Suggor (N=9) Gyltor (N=8)	Cefalotin <sup>2</sup>				100,0%							
Suggor (N=9) Gyltor (N=8)	Oxacillin				77,8%		22,2%					
Suggor (N=9) Gyltor (N=8)	Cefoxitin <sup>2</sup>						66,7%	33,3%				
Suggor (N=9) Gyltor (N=8)	Enrofloxacin <sup>1</sup>		44,4%		55,6%							
Suggor (N=9) Gyltor (N=8)	Fusidinsyra			12,5%			33,3%	66,7%				
Suggor (N=9) Gyltor (N=8)	Erytromycin			100,0%								
Suggor (N=9) Gyltor (N=8)	Klindamycin			88,9%		11,1%						
Suggor (N=9) Gyltor (N=8)	Gentamicin				100,0%							
Suggor (N=9) Gyltor (N=8)	Nitrofurantoin <sup>2</sup>								100,0%			
Suggor (N=9) Gyltor (N=8)	Tetracyklin		88,9%		11,1%							
Suggor (N=9) Gyltor (N=8)	Trimetoprim/ (sulfametoxazol)*		88,9%		11,1%							

\*anger koncentrationen för trimetoprim, testad i förhållandet 1/19 trimetoprim/sulfametoxazol.

<sup>1</sup> ECOFF-värde för ciprofloxacin anges. <sup>2</sup> ECOFF-värde för *S. aureus* anges.

Vitt område visar vilka koncentrationer (µg/ml) som testats.

Tabell 12. MIC för *Streptococcus suis*

µg/ml	≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	≥64
Suggor (N=7) Gyltor (N=6)	Penicillin	14,3%	42,9%	42,9%								
Suggor (N=7) Gyltor (N=6)	Cefalotin <sup>3</sup>				100,0%							
Suggor (N=7) Gyltor (N=6)	Oxacillin <sup>1</sup>		100,0%									
Suggor (N=7) Gyltor (N=6)	Cefoxitin** <sup>1</sup>					28,6%	14,3%	57,1%				
Suggor (N=7) Gyltor (N=6)	Enrofloxacin <sup>3</sup>		28,6%		71,4%							
Suggor (N=7) Gyltor (N=6)	Fusidinsyra <sup>2</sup>						14,3%	85,7%				
Suggor (N=7) Gyltor (N=6)	Erytromycin			71,4%		14,3%		14,3%				
Suggor (N=7) Gyltor (N=6)	Klindamycin			100,0%								
Suggor (N=7) Gyltor (N=6)	Gentamicin <sup>3</sup>				85,7%		14,3%					
Suggor (N=7) Gyltor (N=6)	Nitrofurantoin <sup>4</sup>								57,1%			42,9%
Suggor (N=7) Gyltor (N=6)	Tetracyklin					28,6%	14,3%		57,1%			
Suggor (N=7) Gyltor (N=6)	Trimetoprim/ (sulfametoxazol)* <sup>2</sup>		42,9%		57,1%							

\* anger koncentrationen för trimetoprim, testad i förhållandet 1/19 trimetoprim/sulfametoxazol.

\*\* ECOFF-värde för cefaclor anges. <sup>1</sup> ECOFF-värden för *S. pneumoniae* anges. <sup>2</sup> ECOFF-värde för *S. pyogenes* anges.

<sup>3</sup> inget ECOFF-värde finns angivet. <sup>4</sup> ECOFF-värde för *S. agalactiae* anges.

Vitt område visar vilka koncentrationer (µg/ml) som testats.

## DISKUSSION

Studiens syfte var att undersöka hur den normala vaginala bakteriefloran ser ut hos suggor och gyltor och om det förekommer antibiotikaresistens hos bakterierna till följd av insemination eftersom semindoser innehåller antibiotika för att förhindra bakteriell tillväxt.

I denna studie isolerades till stor del *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. och *Corynebacterium* spp. från djuren, i likhet med studien i Queensland (Bara *et al.*, 1993). Däremot isolerades betydligt färre antal *E. coli* vilket kan bero på tidpunkten för provtagning då flest bakterier i studien av Bara *et al.* isolerades i samband med förlossning och betäckning då den vaginala miljön utsätts för omgivningsbakterier såsom *E. coli* medan proverna för denna studie togs precis innan betäckning och för suggorna cirka fem veckor efter förlossning då livmoder, cervix och vagina haft tid att rena sig. Hygienförhållanden spelar också en viktig roll. Djuren i denna studie gick lösgående i halmbäddar med mycket bra hygien medan de i studien i Queensland stod uppstallade i individuella bås utan möjlighet att gå undan från avföringen. En annan orsak kan vara hur långt in i vagina eller cervix som proverna togs. *E. coli* bör påvisas i större utsträckning om provet tas i de yttre delarna av vagina och minska längre in.

Att så få *E. coli* isolerades (7 av 60 prover) kan även indikera att rengöring av vulva med endast torrt papper innan provtagning är tillräckligt för att erhålla ett "rent" prov under förutsättning att en ledad "skyddad" provtagningspinne används. Ytterligare rengöring bör övervägas vid sämre hygienförhållanden.

Hos gyltor var bakterier ur fylum *Actinobacteria* vanligare än hos suggor med 32,2 % av totala antalet isolerade bakterier hos gyltor respektive 22,2 % hos suggor. Det var främst *Actinomyces hyovaginalis* som stod för skillnaden och påträffades i ungefär lika hög grad på de olika gårdarna. I övrigt sågs ingen stor skillnad med avseende på vilka arter av bakterier som isolerades från gyltor respektive suggor med undantag för att det hos suggor påträffades fler arter men endast hos enstaka individer.

Eftersom *Lactobacillus* spp. förekommer i den vaginala bakteriefloran hos ett flertal djurarter såsom kor (Wang *et al.*, 2013), hästar (Fraga *et al.*, 2008) och även människor (Sobel, 1999) förväntades att det även skulle påträffas *Lactobacillus* spp. i vaginala normalfloran hos grisar men i denna studie kunde inga isolat ur detta genus isoleras. Hos en gylta typades en bakterie som *Lactobacillus delbrueckii* men med endast 1,79 på MALDI-TOF MS och isolatet sparades därför inte. Resultatet kan dock indikera att *Lactobacillus* spp. förekommer i vagina även hos gris men att förutsättningarna, trots selektiv odling för just *Lactobacillus* spp., inte var de rätta då även det isolatet växte långsamt. Kanske skulle fler *Lactobacillus* spp. påvisats om proven hade tagits mer kaudalt i vagina istället för i cervix.

Resultaten från resistensbestämningarna visade inte på några tydliga skillnader mellan suggor och gyltor som ger anledning att misstänka resistensutveckling till följd av insemination med antibiotikainnehållande vätska då det för vissa bakterier krävdes högre koncentrationer av antibiotika för att hämma växt hos gyltor än hos suggor som t.ex. tetracyklin för *S. lentus* (Tabell 10). Exempel finns även för det motsatta förhållandet, t.ex. för penicillin hos *S. sciuri* (Tabell 12) och *S. chromogenes* (Tabell 9) där isolaten från suggor i större utsträckning krävde högre

koncentrationer av antibiotika för att hämma växt. Det låga antalet djur och fördelningen av individer i varje grupp vid undersökningarna gör det dock svårt att se ett mönster och gör därför tolkningen osäker. Det skulle vara intressant att se en studie med större antal djur och där gruppen suggor även är indelad efter kullnummer för att kunna se en eventuellt minskande sensitivitet mot antibiotika med stigande kullnummer. I denna studie noterades kullnummer för varje sugga men något tydlig tendens av en sådan indelning gick inte att se med ett så litet antal djur.

För samtliga resistensundersökta bakterier kan en mer eller mindre stor spridning av känslighet för någon eller några antibiotika ses hos både suggor och gyltor. Hos samtliga *Staphylococcus* spp. ses en svag tendens till minskad känslighet för penicillin hos suggor i jämförelse med gyltor men grupperna är som sagt små och några signifikanta skillnader kan inte ses. Många av de undersökta bakteriernas MIC-värde för olika antibiotika låg utanför, oftast under, det intervall som testades i denna studie. Det hade varit intressant att gå vidare och testa fler koncentrationer av antibiotika för att kunna se spridningen av MIC för bakterier inom djurgrupperna men tid för att genomföra sådana undersökningar rymdes inte inom ramarna för detta arbete.

Efter insemination sker ofta ett visst återflöde då en del av vätskan rinner ut ur vagina (Knox, 2016). Det rör sig förvisso inte om några stora volymer men det sker relativt ofta. I och med det utsätts även bakterier i den omgivande miljön för antibiotika med risk för resistensutveckling. En studie för att undersöka det skulle vara intressant men komplicerad att genomföra för att kunna dra slutsatser gällande orsak och verkan med tanke på att det finns fler faktorer som kan påverka resultatet.

Faktum kvarstår att bakteriers utveckling av resistens mot antibiotika är ett allvarligt hot mot människors och djurs hälsa och att användning av antibiotika i ett icke terapeutiskt syfte är kontroversiellt och direkt olämpligt. Vi vet att användning antibiotika selekterar fram resistent bakterier och att det finns risk för att resistensen sprids till andra bakterier som kan ha högre patogenicitet. Ämnet är högaktuellt och EU har under de senaste femton åren arbetat hårt med att bromsa utvecklingen av resistens hos bakterier och förra året antogs en ny handlingsplan mot utvecklingen av antibiotikaresistens som bl.a. innebär att det från år 2022 kommer att vara förbjudet att ge djur antimikrobiella medel i förebyggande eller tillväxtfrämjande syfte, något som varit förbjudet i Sverige sedan 1986.

AI har möjliggjort en uppfödning av grisar i omgångsproduktion med ett lägre smittryck och minskad antibiotikaanvändning som följd. Det vore i nuläget olyckligt för grisproduktionen om antibiotikaanvändningen inom AI påverkas av den nya lagstiftningen innan alternativ till antibiotika finns färdiga att tillgå i den omfattning som krävs. Med den kunskap vi har idag om hur antibiotikaresistens uppkommer och sprids är det förvånansvärt de alternativ till antibiotikaanvändning inom AI som finns (Morrell & Wallgren, 2011; Schulze *et al.*, 2014) inte har fått större genomslag och resurser att ytterligare förbättras och effektiviseras så att användningen av antibiotika inom AI kan upphöra.

## **POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING**

### **Kan seminering orsaka antibiotikaresistens?**

Antibiotikaresistens är ett verkligt hot mot både människors och djurs hälsa. Vi tar idag fortfarande för givet att det finns antibiotika som hjälper den dag vi eller våra djur blir sjuka men det är tyvärr ingen självklarhet längre. För att bromsa utvecklingen måste alla användningsområden för antibiotika ses över och antibiotika bör endast användas där inget alternativ finns. Ett av dessa områden är framställning av semindoser. Vid samling av sperma från galtar kommer det alltid med bakterier trots noggranna hygienrutiner. Sperman späds sedan med en näringslösning som skyddar spermier och skapar bra förutsättningar för dem att överleva och behålla sin befruktningsevne. Näringslösningen är tyvärr även bra för bakterierna vilket innebär att de kan föröka sig och konkurrera med och försämra miljön för spermier som då förlorar sin befruktningsevne. För att undvika att det sker tillsätts antibiotika i näringslösningen.

De färdiga semindoserna innehåller spermier, näringslösning och antibiotika till en sammanlagd volym av 80 ml. När suggan är i brunst "töms" dosen i livmoderhalsen där det normalt finns ett stort antal bakterier som då översköjs av den antibiotikainnehållande vätskan. Vilka bakterier finns i området? Hur påverkas bakterierna av antibiotikan? Förekommer antibiotikaresistens bland de normalt förekommande bakterierna i livmoderhalsen till följd av seminering?

### **Hur blir bakterier resistent mot antibiotika?**

Bakterier har funnits på jorden i mer än 3 miljarder år och kan snabbt anpassa sig till nya levnadsvillkor för att överleva. Under 1940-talet började människan använda sig av antibiotika för att bota sjukdomar men det tog inte många år förrän de första resistent bakterierna dök upp. Bakterier finns överallt och förökar sig snabbt och de som är bäst anpassade till omgivningen lever vidare, allt enligt Darwins evolutionslära.

Bakterier har olika sätt att utveckla antibiotikaresistens. Vissa bakterier är naturligt resistent och är i grunden uppbyggda på ett sätt som gör att antibiotika inte fungerar mot dem. Ett exempel är att antibiotika som fungerar genom att angripa bakteriens cellvägg inte fungerar mot bakterier som naturligt inte har någon cellvägg. Dessa egenskaper finns i bakteriens arvsanlag.

Förvärvad antibiotikaresistens kan bero på olika saker. Bakterier förökar sig snabbt och ibland händer det att något går fel, att det uppstår en mutation i generna när de ska kopieras. Om den förändringen orsakar resistens så kommer behandling med antibiotika resultera i att endast de bakterier som är resistent överlever och får fritt spelrum att föröka sig utan konkurrens.

Antibiotikaresistens kan även "smitta" mellan bakterier av samma art men även mellan bakterier av olika arter. Bakterierna kopplar ihop sig med varandra och överför gener som orsakar resistens. Det finns även virus som angriper bakterier och sprider antibiotikaresistens mellan bakterierna.

## **Hur genomfördes försöket?**

Djuren som provtogs indelades i två grupper: gyltor som aldrig blivit seminerade och suggor som avvant minst tre kullar, för att senare kunna jämföras med varandra. Totalt togs 60 prover från tre olika gårdar, 30 gyltor och 30 suggor. Proven togs med hjälp av en lång bomullspinne som fördes in i vagina och roterades mot livmoderhalsens vägg.

Bomullspinnarna ströks sedan ut på bakterieodlingsplattor och de bakterier som växte från varje prov artbestämdes och sparades för att sedan resistensundersökas.

## **Resultat**

Vid artbestämning av bakterierna som påträffats såg det relativt lika ut hos både suggor och gyltor med avseende på antal och vilka arter av bakterier som hittades. Vanligast var olika arter av stafylokocker och streptokocker.

Vid resistensbestämning av bakterierna framkom inte någon tydlig skillnad mellan suggor och gyltor. Bakteriernas känslighet för olika antibiotika varierade, en liten tendens till minskad känslighet för penicillin sågs dock för stafylokocker hos suggor men det gick inte att dra några statistiskt signifikanta slutsatser på grund av att antalet djur i grupperna var för lågt.

## **TACK**

Jag vill rikta ett stort tack till de gårdar som ställde upp, för deras entusiasm och den hjälp som erbjöds under provtagningens gång, utan dem hade studien inte varit möjlig att genomföra.

Ett stort tack till stiftelsen Michael Forsgrens stipendiefond och C August Carlssons stipendiefond för att ekonomiskt möjliggjort studien.

Slutligen vill jag tacka mina handledare Jane Morrell, Ingrid Hansson, Lena Eliasson-Selling och Lise-Lotte Fernström för deras uppmuntran under arbetets gång och för allt stöd under arbetet på laboratoriet.

## REFERENSER

- Althouse, G. (2008). Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(supplement), 374-378.
- Althouse, G.C., Kuster, C.E., Clark, S.G. & Weisiger, R.M. (2000). Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, 53(5), 1167-76.
- Althouse, G.C. & Lu, K.G. (2005). Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, 63(2), 573-584.
- amr-review.org (2016). The review on antimicrobial resistance. 2016. *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*. Chaired by Jim O'Neill. In. [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf).
- Arthur, M., Molinas, C., Depardieu, F. & Courvalin, P. (1993). Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *The Journal of Bacteriology*, 175(1), 117.
- Bara, M.R., McGowan, M.R., O'Boyle, D. & Cameron, R.D.A. (1993). A study of the microbial flora of the anterior vagina of normal sows during different stages of the reproductive cycle [pigs]. *Australian Veterinary Journal*, (7), 256-259.
- Bennett, P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153 Suppl 1: pp. S347-S357.
- Bussalleu, E., Yeste, M., Sepúlveda, L., Torner, E., Pinart, E. & Bonet, S. (2011). Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic *E. coli* on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 127(3), 176-182.
- Couto, I., de Lencastre, H., Severina, E., Kloos, W., Webster, J.A., Hubner, R.J., Sanches, I.S. & Tomasz, A. (1996). Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microbial Drug Resistance*, 2(4), 377-91.
- Couto, I., Wu, S.W., Tomasz, A. & de Lencastre, H. (2003). Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the species. *Journal of Bacteriology*, 185(2), 645-653.
- Dalin, A-M., Einarsson S., Hultén F., Kindahl H., Magnusson U., Persson A., Rodriguez-Martinez H., Söderquist L., Wallgren M., Razdan P. (2009). *Kompedium i reproduktion, förlossning och juverfunktion hos gris*. 4:e upplagan. Institutionen för kliniska vetenskaper, avdelningen för reproduktion, Sveriges lantbruksuniversitet.
- EUCAST, European committee on antimicrobial susceptibility testing (2018). *MIC and zone diameter distributions and ECOFFs*. Tillgänglig: <https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=init> [2018-12-11]
- Flowers, W.L. (2008). Genetic and phenotypic variation in reproductive traits of AI boars. *Theriogenology*, 70(8), 1297-1303.
- Fraga, M., Perelmuter, K., Delucchi, L., Cidade, E. & Zunino, P. (2008). Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 93(1), 71-78.
- Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P. & Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 143-172.

- Jordbruksverket (2017). *Seminstationer för svin*. Tillgänglig: [www.jordbruksverket.se/download/18.72e5f95412548d58c2c80003122/1509980751144/Porcine%20semen%20collection%20centres.pdf](http://www.jordbruksverket.se/download/18.72e5f95412548d58c2c80003122/1509980751144/Porcine%20semen%20collection%20centres.pdf) [2018-09-24]
- Kaeoket, K., Persson, E. & Dalin, A.M. (2001). The sow endometrium at different stages of the oestrous cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. *Animal Reproduction Science*, 65(1-2), 95-114.
- Knox, R.V. (2016). Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, 85(1), 83-93.
- Kuster, C.E. & Althouse, G.C. (2016). The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. *Theriogenology*, 85(1), 21-26.
- Lambert, M. (2007). Molecular biosafety-safety advance: transposon gene delivery systems. *Applied Biosafety*, 2007;12:196-7.
- Lohner, K. & Blondelle, S.E. (2005). Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in the design of novel peptide antibiotics. *Combinatorial Chemistry High Throughput Screening*, 8(3), 241-56.
- Maes, D., Nauwynck, H., Rijsselaere, T., Mateusen, B., Vyt, P., de Kruif, A. & Van Soom, A. (2008). Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology*, 70(8), 1337-1345.
- Maroto Martín, L.O., Muñoz, E.C., De Cupere, F., Van Driessche, E., Echemendia-Blanco, D., Rodríguez, J.M.M. & Beeckmans, S. (2010). Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal Reproduction Science*, 120(1), 95-104.
- Monga, M. & Roberts, J.A. (1994). Spermagglutination by bacteria: Receptor-specific interactions. *Journal of Andrology*, 15(2), 151-156.
- Morrell, J.M. & Wallgren, M. (2011). Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Animal Reproduction Science*, 123(1-2), 64-69.
- Morrell, J.M. & Wallgren, M. (2014). Alternatives to antibiotics in semen extenders: a review. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 3(4), 934.
- Noakes, D.E., Parkinson, T.J. & England, G.C.W. (2001). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8. ed. London: W.B. Saunders.
- Noble, W.C., Virani, Z. & Cree, R.G. (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 72(2), 195-8.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. & Schulman, L.L. (1973). Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 37(2), 528.
- Quinn, P.J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2. ed. Chichester : Wiley-Blackwell.
- Rang, H.P. & Dale, M.M. (2011). *Rang and Dale's Pharmacology*. 7. ed. Edinburgh : Churchill Livingstone.



- Rodriguez-Martinez, H., Kvist, U., Saravia, F., Wallgren, M., Johannisson, A., Sanz, L., Pena, F.J., Martinez, E.A., Roca, J., Vazquez, J.M. & Calvete, J.J. (2009). The physiological roles of the boar ejaculate. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 66, 1-21.
- Rohde, C., Wittmann, J. & Kutter, E. (2018). Bacteriophages: A therapy concept against multi-drug-resistant bacteria. *Surgical Infections (Larchmt)*, 19(8), 737-744.
- Schulze, M., Junkes, C., Mueller, P., Speck, S., Ruediger, K., Dathe, M. & Mueller, K. (2014). Effects of cationic antimicrobial peptides on liquid-preserved boar spermatozoa. *PLoS One*, 9(6), e100490. doi:10.1371/journal.pone.0100490.
- SFS 1985:343. *Förordning om kontroll av husdjur m.m.* Stockholm: Jordbruksdepartementet.
- SJVFS 2000:72. *Föreskrifter om ändring i Statens jordbruksverks föreskrifter (SJVFS 1999:112) om seminverksamhet med svin.* Saknr M 25. Jönköping: Statens jordbruksverk.
- Sobel, J.D. (1999). Is there a protective role for vaginal flora? *Current Infectious Disease Reports*, 1(4), 379-383.
- Sone, M. (1990). Investigations on the control of bacteria in boar semen. *The Japanese Journal of Animal Reproduction*, 36(5), 23P-29P.
- Svenska Köttföretagen AB (2018a). *Seminförsäljning*.  
Tillgänglig: <https://www.kottforetagen.se/statistik-seminforsaljning.html> [2018-10-05]
- Svenska Köttföretagen AB (2018b). *Från karantän till semindos - så här går det till*.  
Tillgänglig: <https://www.kottforetagen.se/fran-karantaen-till-semindos-sa-haer-gar-det-till.html> [2018-09-24].
- Svenska Köttföretagen AB & Gård & Djurhälsan (2017). *Suggan Sallys bästa semintips*. [Broschyr].  
Tillgänglig: <https://www.kottforetagen.se/suggan-sallys-baesta-semintips.html> [2018-11-06].  
(2017-04-14)
- Wang, J., Li, C., Nesengani, L.T., Gong, Y., Zhang, S. & Lu, W. (2017). Characterization of vaginal microbiota of endometritis and healthy sows using high-throughput pyrosequencing of 16S rRNA gene. *Microbial Pathogenesis*, 111, 325-330.
- Wang, Y., Ametaj, B.N., Ambrose, D.J. & Ganzle, M.G. (2013). Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*. *BMC Microbiology*, 13, 19.
- Yi, Y., Li, Z., Kim, E., Song, E., Kim, H., Cong, P., Lee, J. & Park, C.S. (2008). Comparison of motility, acrosome, viability and ATP of boar sperm with or without cold shock resistance in liquid semen at 17 degrees C and 4 degrees C, and frozen-thawed semen. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(2), 190-197.