

Udarbejdet af	Jesper Larsen (SSI), Lina Maria Cavaco (SSI), Ute Wolff Sönksen (SSI), Mikkel Lindegaard (SSI), Louis Roer (SSI), Astrid Rasmussen (SSI), Peter Panduro Damborg (KU), Luca Guardabassi (KU), Ken Steen Pedersen (KU), Jens Peter Nielsen (KU)
Øvrige deltagere	Charlotte Mark Salomonsen (L&F), Vibe Dalhoff Andersen (DTU)
Kontaktperson i FVST	Helene Rugbjerg og Frederik Fabricius

Dato for henvendelse	Dato for svarfrist	Dato for afsendelse	Versionsnummer
25-11-2024	01-03-2025		4

Journalnummer/sagsnummer	FVST	KU	SSI
	2024-15-25-00904	061-0437/24-3680	24/08655

## Besvarelse vedr.

### ▸ Apramycin og gentamicin-resistens i *E. coli* hos grise

#### Bestilling

▸ Med henvisning til DANMAP rapporten for 2023 og kapitel 9 om resistens i dyrepatogener, er der en øget forekomst af gentamicinresistens gener i hæmolytisk *E. coli* isolater. I rapporten kædes denne stigning sammen med en øget apramycin-resistens, da forbruget af gentamicin til grise er lavt. Således ønsker Fødevarestyrelsen svar på nedenstående spørgsmål.

- 1) Hvilke konsekvenser har den øgede resistens mod apramycin og gentamicin for de fremtidige behandlingsmuligheder ved colidiarre hos grise?
- 2) Findes der evidens for, hvor lang tid resistens mod henholdsvis apramycin og gentamicin persisterer i *E. coli*, og hvor hurtigt forsvinder den i så fald?
- 3) Hvor meget bruges apramycin og gentamicin i human medicin og hvilke konsekvenser/effekter forventes det at have i forhold til human sundhed, at resistensen er steget i grisepopulationen?
- 4) Er der observeret anden apramycin-afledte resistens i hæmolytisk *E. coli*, og i så fald, hvilken indflydelse kan dette have på behandlingsmulighederne i både dyr og mennesker?

#### Svar

▸ Herunder findes svar på ovenstående spørgsmål.

- 1) Hvilke konsekvenser har den øgede resistens mod apramycin og gentamicin for de fremtidige behandlingsmuligheder ved colidiarre hos grise?

Tabel 1 viser en liste over de antibiotika, som kan bruges til *E. coli*-diarre hos grise ifølge deres markedsføringstilladelse. Desuden viser Tabel 1 de tilhørende epidemiologisk cutoffs (ECOFFs), tentative ECOFFs og kliniske breakpoints i grise og mennesker for *E. coli*. Der findes ikke ECOFFs, tentative ECOFFs eller kliniske breakpoints i grise og mennesker for spectinomycin/lincomycin, benzylpenicillin/dihydrostreptomycin, trimethoprim/sulfadiazin, trimethoprim/sulfadoxin og

oxytetracyclin, så i stedet vises dem for spectinomycin, streptomycin, trimethoprim/sulfamethoxazol og tetracyclin.

**Tabel 1. Liste over antibiotika der er godkendt til behandling af *E. coli*-diarre hos fravænningsgrise**

Antibiotika-klasse	Stof	R > (µg/ml)			
		VET-LAB	(T)ECOFF	CLST-VET01S	CLSI-M100
Aminocyclitol/lincosamider	Spectinomycin/lincomycin <sup>a</sup>				
	Spectinomycin	64	64	-	-
Aminoglykosider	Apramycin	8	-	-	-
	Gentamicin	2	2	-	4
	Neomycin	8	8	-	-
	Paromomycin	8	-	-	-
Penicilliner/aminoglykosider	Benzylpenicillin/dihydrostreptomycin <sup>b</sup>				
	Streptomycin	16	16	-	-
Penicilliner	Amoxicillin	8	8	-	-
Penicilliner/β-laktamase-inhibitorer	Amoxicillin/clavulansyre	8/4	(8)	-	16/8
Folsyre-hæmmere	Trimethoprim/sulfadiazin <sup>c</sup>				
	Trimethoprim/sulfadoxin <sup>c</sup>				
	Trimethoprim	-	2	-	-
	Trimethoprim/sulfamethoxazol	0,5/9,5	0,5	-	2/38
Makrolider	Tylosin	-	-	-	-
Quinoloner	Enrofloxacin	0,125	0,125	-	-
Tetracycliner	Doxycyclin	4	4	-	8
	Oxytetracyclin <sup>d</sup>				
	Tetracyclin	8	8	-	8

<sup>a</sup> Der findes ikke (T)ECOFFs eller kliniske breakpoints for spectinomycin/lincomycin eller lincomycin alene, så i stedet vises dem for spectinomycin.

<sup>b</sup> Der findes ikke (T)ECOFFs eller kliniske breakpoints for benzylpenicillin/dihydrostreptomycin, hverken i kombination eller alene, så i stedet vises dem for streptomycin.

<sup>c</sup> Der findes ikke (T)ECOFFs eller kliniske breakpoints for sulfadiazin og sulfadoxin, hverken i kombination med trimethoprim eller alene, så i stedet vises dem for trimethoprim og trimethoprim/sulfamethoxazol.

<sup>d</sup> Der findes ikke (T)ECOFFs eller kliniske breakpoints for oxytetracyclin, så i stedet vises dem for tetracyclin.

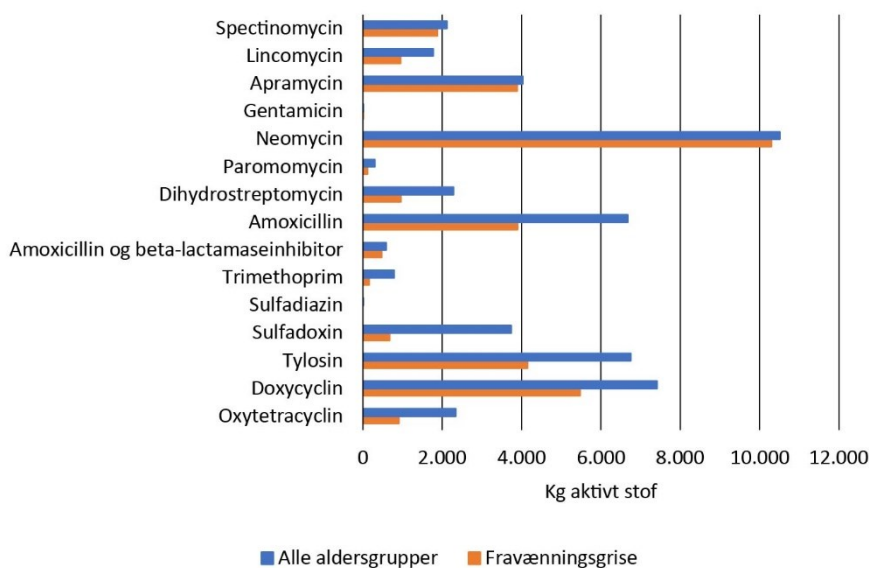
Forkortelse: R, resistent; VET-LAB, Veterinært Laboratorium, (T)ECOIFF, (tentativ) epidemiologisk cutoff; CLSI-VET01S, kliniske breakpoints i grise fra Clinical & Laboratory Standards Institute; CLSI-M100, kliniske breakpoints i mennesker fra Clinical & Laboratory Standards Institute.

Det skal bemærkes, at forbruget af enrofloxacin er negligerbart, da det siden 2002 reelt set har været forbudt at anvende fluoroquinoloner i den danske svineproduktion, medmindre en MIC-analyse viser, at andre registrerede antibiotika ikke er anvendelige.

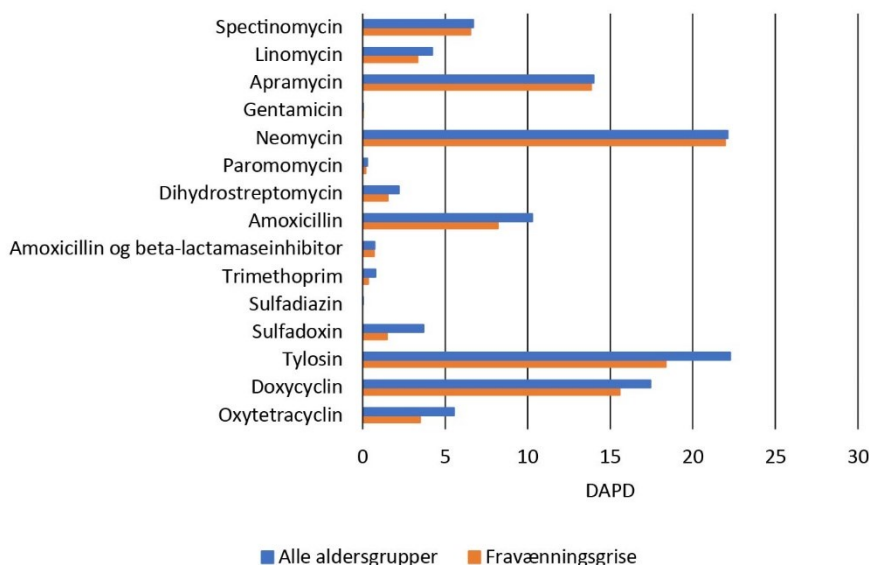
Veterinært Laboratorium under Landbrug & Fødevarer har desuden colistin, florfenicol, cefquinom og cefpodoxime med i deres resistenspanel for *E. coli*-diarre, selvom de ikke er markedsførte med den indikation og således kun kan anvendes, når der ikke findes et egnet lægemiddel godkendt til den pågældende dyreart og indikation (jf. kaskadereglen).

Figur 1 viser forbruget af hvert af de godkendte antibiotika i 2023 ([DANMAP 2023](#)). Det skal bemærkes, at opgørelsen overvejende er baseret på enkeltpræparater (for eksempel vises forbruget af spectinomycin og lincomycin hver for sig), mens benzylpenicillin og enrofloxacin slet ikke er med i opgørelsen.

**Figur 1a. Forbrug af godkendte antibiotika i kg aktivt stof, 2023**



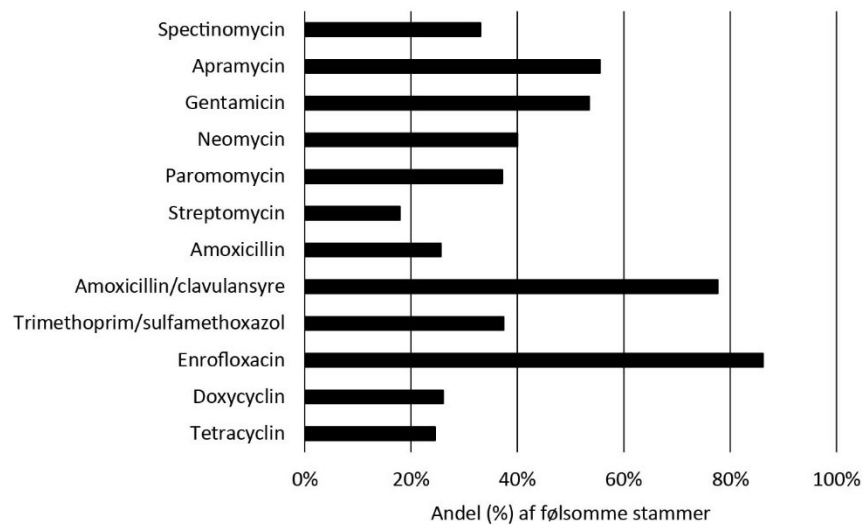
Figur 1b. Forbrug af godkendte antibiotika i DAPD, 2023



De følgende figurer er baseret på hæmolytiske *E. coli*, der blev identificeret i kliniske prøver indsendt af dyrlæger til Veterinært Laboratorium i løbet af 2024, da de er den primære årsag til diarre hos fravænningsgrise (n=245). Størstedelen af prøverne er således udtaget fra klimastalden (72%). Andelen af hæmolytiske *E. coli*, der er følsomme overfor hvert af de godkendte antibiotika, er baseret på de grænseværdier, som Veterinært Laboratorium bruger til resistensbestemmelse af *E. coli* (tabel 1).

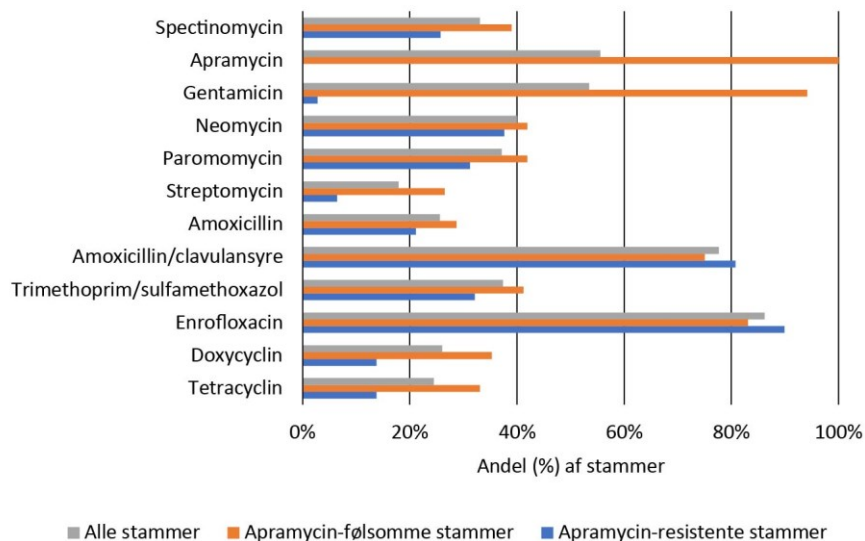
Figur 2 viser andelen af hæmolytiske *E. coli*, der er følsomme overfor hvert af de godkendte antibiotika på nær tylosin, da dette stof ikke er en del af det panel, som Veterinært Laboratorium bruger til resistensbestemmelse af *E. coli*.

Figur 2. Andel (%) af hæmolytiske *E. coli* fra grise der udviser følsomhed overfor hvert af de godkendte antibiotika, 2024



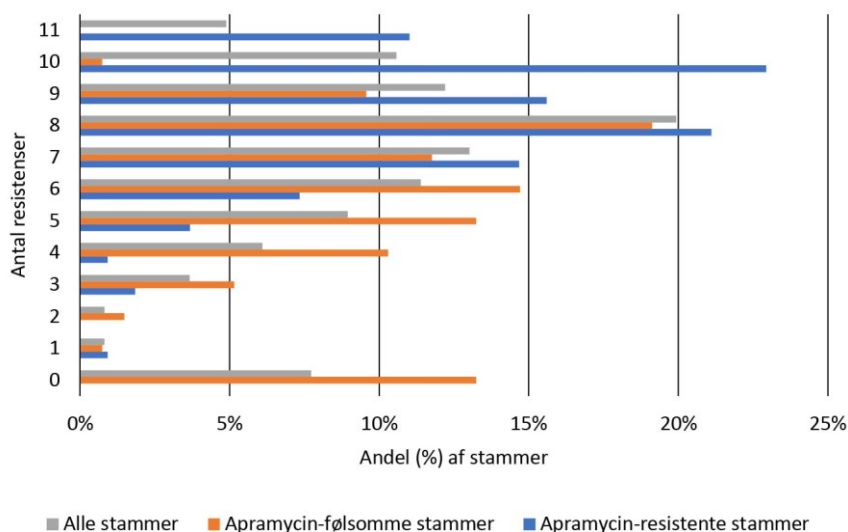
Figur 3 viser andelen af henholdsvis apramycin-resistente og apramycin-følsomme hæmolytiske *E. coli*, der udviser følsomhed overfor alternative antibiotika, der er godkendt til behandling af *E. coli*-diarre hos fravænningsgrise.

**Figur 3. Andel (%) af hæmolytiske *E. coli* fra grise der udviser følsomhed overfor hvert af de godkendte antibiotika, 2024**



Figur 4 viser andelen af hæmolytiske *E. coli* fra grise i 2024, der udviser resistens overfor forskellige antal af de godkendte antibiotika. Det skal bemærkes, at enrofloxacin ikke er med i figuren, da dette stof reelt ikke kan bruges ifølge lovgivningen.

**Figur 4. Andel (%) af hæmolytiske *E. coli* fra grise der udviser resistens overfor forskellige antal af de godkendte antibiotika, 2024**



Af figur 3 fremgår det, at der fortsat findes alternative antibiotika, der er virksomme overfor apramycin-resistente hæmolytiske *E. coli*. Dog viser figur 4, at størstedelen af stammerne er resistente overfor de fleste af de godkendte antibiotika. For eksempel er 11% af alle de hæmolytiske *E. coli* kun følsomme overfor ét af de godkendte antibiotika, mens yderligere 5% er resistente overfor alle de godkendte antibiotika. De tilsvarende tal for de apramycin-resistente stammer er henholdsvis 23% og 11%, mens de tilsvarende tal for de apramycin-følsomme stammer er henholdsvis 1% og 0%.

I de senere år, har vi observeret en kraftig stigning i både neomycin- og gentamicin-resistens blandt hæmolytiske *E. coli* fra grise ([DANMAP 2022](#); [DANMAP 2023](#)). Som det kan ses i tabel 2 er der ikke nogen tydelig sammenhæng mellem apramycin- og neomycin-resistens, mens der til gengæld er en høj korrelation mellem apramycin- og gentamicin-resistens. Denne forskel beror på, at apramycin-resistens primært skyldes tilstedeværelsen af *aac(3)-IVa*, som også koder for gentamicin-resistens men ikke for neomycin-resistens ([DANMAP 2023](#)). Det skal nævnes, at dette gen tidligere blev kaldt *aac(3)-IV* på grund af en fejlnotering i ResFinder-databasen. I modsætning til apramycin og neomycin, bruges der næsten ikke noget gentamicin i den danske griseproduktion (figur 1). I stedet kan den høje forekomst af gentamicin-resistens blandt hæmolytiske *E. coli* forklares med det relativt høje forbrug af apramycin.

**Tabel 2. Sammenhæng mellem apramycin-, neomycin- og gentamicin-resistens blandt hæmolytiske *E. coli* fra grise, 2024**

		Apramycin	
		Følsom	Resistent
Neomycin	Følsom	57	41
	Resistent	79	68
Gentamicin	Følsom	128	3
	Resistent	8	106

Vi har tidligere udført Illumina-baseret helgenomsekventering af hæmolytiske *E. coli* isoleret fra grise i perioden 2021 til 2023 ([DANMAP 2023](#)). Sekvensanalyse af de 22 stammer fra 2023, som bar *aac(3)-IVa*, viste, at de tilhører 11 forskellige multilocus-sekvenstyper (ST), nemlig ST10 (n=2), ST42 (n=3), ST48 (n=4), ST90 (n=1), ST100 (n=3), ST155 (n=1), ST224 (n=2), ST683 (n=1), ST772 (n=1), ST3524 (n=3) og ST4379 (n=1). Denne store diversitet tyder på, at *aac(3)-IVa* sidder på et eller flere plasmider, der kan overføres mellem forskellige *E. coli*-kloner. Nanopore-baseret

helgenomsekventering af tre stammer tilhørende ST10, ST48 og ST100 konfirmerede, at *aac(3)-IVa* sidder på tæt beslægtede ≈250-kb IncHI2 plasmider. Tabel 3 viser, hvilket andre resistensgener, der blev fundet i de tre plasmider.

**Tabel 3. Oversigt over resistensgener i IncHI2 plasmider.**

Karakteristika	Stamme		
	ST10	ST48	ST100
Inkompatibilitetsgruppe	IncHI2	IncHI2	IncHI2
Størrelse (kb)	253,7	253,0	242,1
Aminoglykosider (fænotype)			
<i>aac(3)-IVa</i> (apramycin, gentamicin, dibekacin, netilmicin, sisomicin, tobramycin)	+	+	+
<i>aadA2</i> (spectinomycin, streptomycin)	+	-	-
<i>aph(3')-Ia</i> (kanamycin, neomycin, lividomycin, paromomycin, ribostamycin)	+	-	-
<i>aph(3'')-Ib</i> (streptomycin)	+	+	+
<i>aph(4)-Ia</i> (hygromycin)	-	+	+
<i>aph(6)-Id</i> (streptomycin)	+	+	+
Beta-laktamer			
<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> (amoxicillin, ampicillin, cephalothin, piperacillin, ticarcillin)	+	-	-
Folsyre-hæmmere			
<i>dfrA12</i> (trimethoprim)	+	-	-
Fenikoler			
<i>floR</i> (chloramphenicol, florfenicol)	+	-	-
Sulfonamider			
<i>sul1</i> (sulfamethoxazol)	+	-	-
<i>sul2</i> (sulfamethoxazol)	+	-	-
Tetracykliner			
<i>tet(A)</i> (tetracyklin)	+		
<i>tet(B)</i> (tetracyklin)	+	+	+

Det er værd at bemærke, at plasmiderne også indeholder gener, der koder for resistens overfor andre antibiotika, der er godkendt til behandling af *E. coli*-diarre hos fravænningsgrise, herunder både aminoglykosider (neomycin, spectinomycin og streptomycin), folsyre-hæmmere (trimethoprim), sulfonamider (sulfamethoxazol) og tetracykliner (tetracyklin).

Konsekvenserne af den øgede resistens mod apramycin og gentamicin er, at der er tiltagende begrænsede muligheder til behandling af *E. coli*-diarre i grise. Dette er bekymrende i betragtning af de høje niveauer af resistens mod neomycin og andre af de antibiotika, som i dag anvendes til behandling af *E. coli*-diarre i grise. Det er særligt bekymrende, at 11% af alle de hæmolytiske *E. coli* kun er følsomme overfor ét af de godkendte antibiotika, og at yderligere 5% er resistente overfor alle de godkendte antibiotika. Det skal dog bemærkes, at der endnu ikke findes kliniske grænseværdier til tarminfektioner i grise. Derfor kan vi ikke sige med sikkerhed, om resistens reelt giver behandlingssvigt.

- 2) Findes der evidens for, hvor lang tid resistens mod henholdsvis apramycin og gentamicin persisterer i *E. coli*, og hvor hurtigt forsvinder den i så fald?

Der findes overordnet set ikke god evidens for, hvor længe apramycin- og gentamicin-resistens persisterer i *E. coli*. I et dansk studie fra 2016 blev grise inokuleret med en *E. coli*-stamme med *aac(3)-IVa* ([Herrero-Fresno et al. 2016](#)). Dette gen er den primære årsag til den nylige signifikante stigning i apramycin- og gentamicinresistens i *E. coli* fra grise ([DANMAP 2023](#)). Studiet viste, at inokulering efterfulgt af 2 dages apramycin-behandling medførte et signifikant øget antal af stammen i fæces mellem 2 og 6 dage efter behandlingen, sammenlignet med inokulering uden apramycin-behandling. I begge grupper (med og uden behandling) kunne stammen dog ikke længere detekteres i fæces fra 3 dage efter endt behandling. Selvom undersøgelsen viser en kortvarig selektiv effekt af apramycin, er det vanskeligt at drage generelle

konklusioner om persistens. Den hurtige forsvinden af den inokulerede apramycin-resistente stamme i fraværet af selektivt pres kan skyldes dens eksogene oprindelse (fra en anden vært) og den konkurrence, stammen mødte fra kommensale bakterier i de modtagende grise. Et ældre studie fra human medicin har vist, at incidensen af gentamicin-resistens i *E. coli* faldt signifikant fra 14% til 9.2% i løbet af et år, hvor brugen af gentamicin var næsten udfaset ([Young et al. 1985](#)). Studiet viste dog ikke hvilket gen, som var årsag til denne resistens. Konklusionen er, at det er forventeligt, at resistens-niveauet vil falde efter ophørt brug af apramycin, men omfanget og hastigheden af dette fald forbliver usikre baseret på den nuværende videnskabelige viden.

På KU er vi i færd med at undersøge den selektive effekt af apramycin- og neomycin-behandling af grise i et farmforsøg. Studiet vil ved hjælp af metagenomics kvantificere mængden af bakterier og resistensgener i fravænningsgrise før behandling, umiddelbart efter behandling og cirka 3-4 uger efter endt behandling. Vi forventer altså i løbet af 2025 eller 2026 at kunne bidrage med data til at besvare spørgsmålet. Yderligere målrettede studier frem til, og eventuelt efter, slagtning vil dog være relevante for bedre at kunne vurdere risikoen for mennesker.

- 3) Hvor meget bruges apramycin og gentamicin i human medicin og hvilke konsekvenser/effekter forventes det at have i forhold til human sundhed, at resistensen er steget i grisepopulationen?

Besvarelsen på dette spørgsmål tager primært højde for, i hvilket omfang aminoglykosider, herunder gentamicin og beslægtede antibiotika, anvendes til human brug i Danmark. Besvarelsen omfatter således ikke anvendelse i andre lande i verden. Apramycin anvendes udelukkende i veterinærmedicin og indgår derfor ikke i denne besvarelse.

Ifølge WHO's ATC-nomenklatur inddeles aminoglykosider til human brug i "streptomyciner" og "andre aminoglykosider". Streptomyciner er ikke indregistreret til human brug i det Europæiske Lægemiddelagentur og bruges heller ikke i Danmark. Aminoglykosider omfatter en række forskellige, tæt beslægtede antibiotika, hvoraf gentamicin (J01GB03), tobramycin (J01GB01) og amikacin (J01GB06) anvendes i Danmark. Gentamicin bruges parenteralt som førstevalg i kombination med et  $\beta$ -laktam til behandling af sepsis forårsaget af *E. coli* og andre Gram-negative bakterier. Amikacin bruges ligeledes til sepsisbehandling, dog kun i tilfælde af alvorlig infektion med en carbapenemase-producerende bakterie, mens tobramycin hovedsageligt bruges som inhalationspulver til behandling af kronisk lungeinfektion hos patienter med cystisk fibrose. Derudover findes gentamicin i perleform til lokal behandling af hofteproteseinfektioner, mens tobramycin findes i topikale øremidler til behandling af kronisk øregangsinfektion. I 2023 var forbruget for de tre antibiotika på danske sygehuse: Tobramycin, 7.216 DDD; gentamicin, 71.112 DDD; og amikacin, 1.843 DDD (upublicerede data).

Tabel 4 viser oversigten over alle aminoglykosider indregistreret til human brug i Europa ([WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology](#)) samt deres anvendelse i Danmark.

**Tabel 4. Liste over aminoglykosider som er indregistreret til human brug i Europa samt deres anvendelse i Danmark<sup>a</sup>**

ATC-kode	Navn	Administrationsrute	Indikation
J01 GA	Streptomyciner		
J01 GA01	Streptomycin	Parenteral	
J01 GA02	Streptoduocin	Parenteral	
J01 GB	Andre aminoglykosider		
J01GB01	Tobramycin	Inhalationspulver Inhalationsopløsning Parenteral	Komplicerede pneumonier hos kronisk lungesygge Komplicerede pneumonier hos kronisk lungesygge



J01GB03	Gentamicin	Parenteral Topikal	Førstevalg ved sepsis og endokarditis (kombineret med $\beta$ -laktam) Kronisk øregangbetændelse og proteser til store led (primært hofte)
J01GB04	Kanamycin	Parenteral	
J01GB05	Neomycin	Parenteral	
J01GB06	Amikacin	Inhalationsopløsning Parenteral	Pneumoni hos kronisk lungesygge
J01GB07	Netilmicin	Oral Parenteral	
J01GB08	Sisomicin	Parenteral	
J01GB09	Dibekacin	Parenteral	
J01GB10	Ribostamycin	Parenteral	
J01GB11	Isepamicin	Parenteral	
J01GB12	Arbekacin	Parenteral	
J01GB13	Bekanamycin	Parenteral	
J01GB14	Plazomicin	Parenteral	

<sup>a</sup> Antibiotika, der ikke anvendes i Danmark, er markeret med rødt.

Da gentamicin udgør førstevalg ved behandling af sepsis forårsaget af *E. coli* og andre Gram-negative bakterier, er det vigtigt, at det samlede resistensniveau i *E. coli* fra bloddyrkninger bevares på et lavt niveau. Niveaulet af gentamicin-resistens i *E. coli* isoleret fra invasive infektioner har været kontinuerligt faldende i det sidste årti, fra 7,2% i 2014 til 4,4% i 2023, mens niveaulet af gentamicin-resistens i *E. coli* isoleret fra urin på de danske hospitaler faldt fra 4,9% til 4,5% i den tilsvarende periode ([DANMAP 2023](#)). I 2024 var niveaulet af gentamicin-resistens i *E. coli* isoleret fra invasive infektioner og urin på de danske hospitaler henholdsvis 4,4% og 4,9% (upublicerede data).

Dette tyder på, at det stigende niveau af gentamicin-resistens i hæmolytiske *E. coli* fra grise ikke har medført en tilsvarende stigning i *E. coli* fra mennesker. Tilsvarende har tidligere analyser af ESBL-producerende *E. coli* fra dyr og mennesker vist, at der sker meget lidt spredning af *E. coli* og ESBL-gener mellem dyr og mennesker ([DANMAP 2023](#)). Dog er der en teoretisk mulighed for, at den stigende forekomst gentamicin-resistens i hæmolytiske *E. coli* fra grise hæmolytiske *E. coli* fra grise på sigt kan give flere infektioner hos mennesker. Desuden kan der i den menneskelige tarm ske udveksling af resistensgener, for eksempel via plasmider, mellem hæmolytiske *E. coli* fra grise og *E. coli* eller andre Gram-negative bakterier fra mennesker, hvilket på længere sigt kan føre til øget gentamicin-resistens i den humane tarmflora. Derfor er det vigtigt at følge niveaulet af gentamicin-resistens i *E. coli* fra mennesker meget nøje de næste år.

- 4) Er der observeret anden apramycin-afledte resistens i hæmolytiske *E. coli*, og i så fald, hvilken indflydelse kan dette have på behandlingsmulighederne i både dyr og mennesker?

Som beskrevet ovenfor er størstedelen af de apramycin-resistente hæmolytiske *E. coli* fra grise resistens overfor de fleste af de antibiotika, der er godkendt til behandling af *E. coli*-diarre, ligesom. Dette kan til dels forklares med, at *aac(3)-IVa* sidder sammen med andre gener, der koder for resistens overfor flere af disse antibiotika, herunder neomycin, spectinomycin og streptomycin, trimethoprim, sulfamethoxazol og tetracyclin.

Det er svært at udtale sig om, hvorvidt medfølgende plasmidbåren co-resistens overfor andre antibiotika i hæmolytiske *E. coli* fra grise udgør en trussel for den humane behandling af sepsis forårsaget af *E. coli* eller andre Gram-negative bakterier. Af de antibiotika, der er anført i tabel 3, bruges kun trimethoprim, sulfamethoxazol og tetracyclin til behandling af human sygdom i Danmark. Trimethoprim og sulfamethoxazol hører med til udvalget af antibiotika, der kan bruges til behandling af urinvejsinfektioner. Dog er førstevalget til behandling af urinvejsinfektioner et  $\beta$ -laktam, nemlig pivmecillinam, og både trimethoprim og sulfamethoxazol bruges hovedsageligt hos yngre kvinder til behandling af ukompliceret blærebetændelse, hvor en eventuel





resistensudvikling næppe ville få alvorlige konsekvenser. Tetracyclin finder sin hovedanvendelse i behandling af hud-, sår- og underlivsinfektioner og bruges kun i yderst sjældne tilfælde til behandling af humane *E. coli*-infektioner. Betydningen af plasmidbåren co-resistens vurderes således i dette tilfælde at være negligerbar.

---