



FVST kontaktperson	Johanne Bischoff Kappelgaard
Dato for henvendelse	27-04-2023
FVST Journalnummer	2023-15-25-00636

Sendes til funktionspostkassen vet-myn@sund.ku.dk. Ved kort svarfrist (under 24 timer) skrives "HASTER" i e-mailens emnefelt, og DK-VET kontaktes pr telefon.

Bestilling vedr.

▸ Neomycin-resistens i *E. coli* i grise

Beskrivelse af bestilling (opgaveformulering, formål, afgrænsning)

På baggrund af den øgede forekomst af neomycin-resistens i hæmolytisk *Escherichia coli* fra svin observeret i forbindelse med resistens-overvågningen under den veterinære myndighedsaftale ønsker Fødevarestyrelsen svar på nedenstående spørgsmål.

- 1) Til hvilke infektioner anvendes neomycin til behandling af fravænningsgrise (VetStat aldersgruppe 56)

Ifølge "Medicin til dyr" (Tilgået 22. maj 2023; https://medicintildyr.dk/?category_ids=c700243e-828c-423b-b477-7f233db01e5d&category_ids=a3b4ee9b-a60e-47c5-af02-2bdda995b50b)

findes der kun ét registreret neomycinprodukt til grise. Det drejer sig om Neomay, pulver til anvendelse i drikkevand/mælk (500.000 IE/g). Ifølge SPC'et kan produktet anvendes til fravænnede grise og slagtesvin. Den eneste terapeutiske indikation er behandling af infektion i mave-/tarmkanalen forårsaget af *E. coli* modtagelige for neomycin. Dosering foretages i drikkevand med 25.000 IE neomycin pr. kg kropsvægt pr. dag i 3 - 4 på hinanden følgende dage, svarende til 5 g af veterinærlægemidlet pr. 100 kg kropsvægt pr. dag i 3 - 4 dage.

Da der ikke foretages laboriemæssig undersøgelse af alle diarréudbrud før behandling iværksættes, må det forventes, at indikationen i praksis ofte vil være fravænningsdiarre uanset ætiologi. Dvs. at også fravænningsdiarré forårsaget af f.eks. rotavirus, *Salmonella*, diætetiske årsager eller kombinationer af disse, i visse tilfælde vil blive behandlet med neomycin. I den forbindelse har ny forskning vist at hæmolytiske *E. coli* kun er involveret i ca. halvdelen af de udbrud af fravænningsdiarré, der forekommer i danske besætninger.

- 2) Hvilke andre antibiotika udover neomycin anvendes i Danmark til behandling af infektioner forårsaget af hæmolytiske *E. coli* i grise?

Ifølge FVST's antibiotikavejledning fra 2018 kan der som førstevalg, udover neomycin, anvendes amoxicillin/clavulansyre, ampicillin, spectinomycin, TMP-sulfa og streptomycin til behandling af *E. coli* enteritis, dvs. uagtet om infektionerne er forårsaget af hæmolytiske eller nonhæmolytiske stammer.

Desuden nævnes, at gentamicin, apramycin og tetracyclin kan anvendes som alternative antibiotika (andetvalg), hvis *E. coli* er resistent overfor alle førstevalg.

Amoxicillin med eller uden clavulansyre findes i 16 dansk registrerede produkter, heraf 7 til oral indgift og 9 til injektion. I visse tilfælde er SPC-indikationen dog luftvejsinfektion og dermed ikke *E. coli*. Der findes ikke dansk registrerede produkter med ampicillin til grise. Spectinomycin findes i 4 produkter til grise, heraf 2 til oral indgift. I alle tilfælde findes produktet i kombination med lincomycin og indikationerne er overvejende luftvejslidelser. Sulfadoxin-TMP findes i 2 produkter til injektion, og sulfamethoxazol-TMP i ét produkt til oral indgift mod luftvejslidelse. Dihydrostreptomycin findes kun i ét injektionsprodukt i kombination med penicillin. Apramycin findes i to produkter til oral anvendelse.

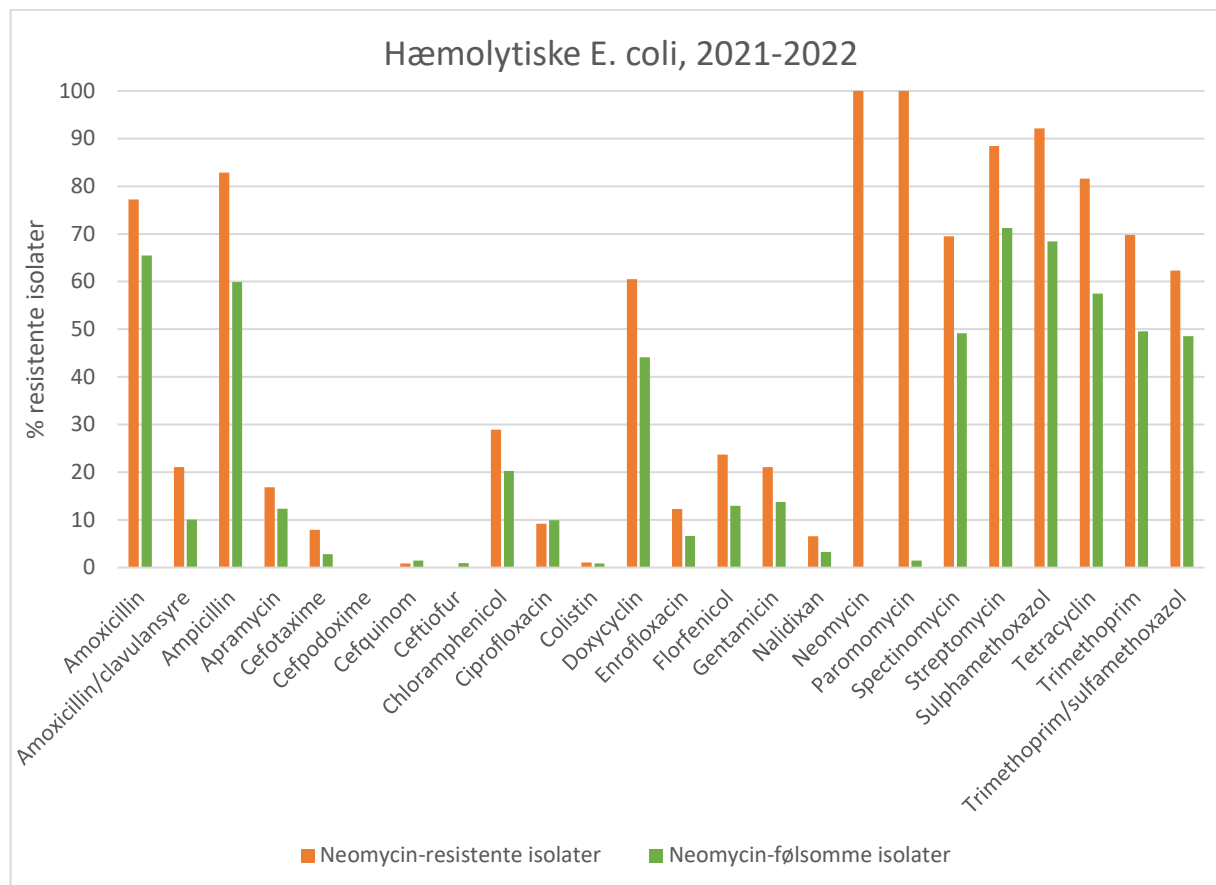
Til trods for at gentamicin nævnes i antibiotikavejledningen, findes der ifølge Medicin til dyr ingen præparater med dette stof registreret til grise i Danmark. Oxytetracyclin findes i ét produkt til oral indgift og 8 produkter til injektion. Doxycyclin findes i 5 produkter til oral indgift, heraf tre mod luftvejsinfektioner. Clortetracyclin er dansk registreret i ét produkt til oral indgift mod luftvejsinfektion. Colistin står i den danske antibiotikavejledning nævnt under gruppe 3 antibiotika, der helt bør undgås til behandling af grise. Det findes heller ikke registreret til dyr på det danske marked. Bemærk at colistin dog ikke er forbudt i henhold til EU lovgivning, men det står nævnt på AMEG/EMA's liste som et gruppe B antibiotikum ("Restrict"), det vil sige at det kun bør anvendes når en resistensundersøgelse indikerer at alternativer ikke kan anvendes med effekt (Tilgået 1. juni 2023; https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/infographic-categorisation-antibiotics-use-animals-prudent-responsible-use_en.pdf)

- 3) Er de neomycin-resistente stammer også resistente overfor andre antibiotika, der er relevante for behandling af grise? Og i så fald, ses der også en stigning i resistens overfor disse antibiotika?

Nedenstående tabel fra Subramani et al., 2023, viser resistensdata for 325 kliniske *E. coli* isolater fra grise fra forskellige danske besætninger i 2020. Som det kan ses, er proportionen af resistens overfor alle andre klinisk relevante antibiotika til grise (undtagen spectinomycin) signifikant højere i gruppen af neomycinresistente isolater sammenlignet med de neomycinfølsomme (indikeret med et blå "d" i tabellen).

Antimi-crobial	R ^a (%)		
	All isolates	Neo-R isolates	Neo-S isolates
AMC	21.8	33.8 ^d	18.8 ^d
AMP	68.9	87.7 ^d	64.2 ^d
APR	11.1	20.0 ^d	8.8 ^d
CHL	29.3	43.1 ^d	25.8 ^d
CIP	0.0	0.0	0.0
CN	14.5	24.6 ^d	11.9 ^d
COL	0.6	1.5	0.4
CTX	1.5	0.0	1.9
FFN	40.6	52.3 ^d	37.7 ^d
NAL	4.3	9.2 ^d	3.0 ^d
NEO	20.0	–	–
SMX	73.8	89.2 ^d	70.0 ^d
SPE	53.5	63.1	51.2
STR	77.5	90.8 ^d	74.2 ^d
TE	65.0	76.9 ^d	61.9 ^d
TMP	64.3	80.0 ^d	60.4 ^d

Resistensdata udelukkende for **hæmolytiske** kliniske *E. coli* isolater fra 2021 og 2022 (se diagram herunder) indikerer, at tendensen fortsat er et højere niveau af resistens i neomycinresistente isolater sammenlignet med neomycinfølsomme isolater. Bemærk at de her viste niveauer af resistens for hhv 2020 og 2021/22 ikke nødvendigvis kan sammenlignes, da tabellen ovenfor (2020) viser data for både hæmolytiske og nonhæmolytiske isolater, mens diagrammet herunder (2021/22) viser data kun for hæmolytiske isolater. Desuden har SEGES laboratoriet for nyligt indført ændringer i grænseværdier til definition af resistens i grise patogener. Mere sammenlignelige resistensdata for de nævnte årstal vil blive tilgængelige i DANMAP 2022.



- 4) Anses neomycin-resistens som mere problematisk i forhold til behandling af grise end andre resistenser, som allerede findes i *E. coli* i grise (f.eks. streptomycin-resistens)?

Neomycin er særligt hensigtsmæssigt for behandling af diarré hos smågrise, da det ikke absorberes fra tarmkanalen, og dermed opnår høje koncentrationer i tarminholdet. Dette kan anses som en form for "lokalbehandling", som foruden høje koncentrationer i tarmen mindsker risiko for bivirkninger og selektion af resistente bakterier i andre dele af kroppen. En klinisk relevant resistens mod neomycin vil derfor være problematisk. Streptomycin anvendes ikke til behandling af grise med fravænningsdiarré, så resistens mod dette antibiotikum vil ikke være et klinisk problem i forhold til behandling af denne indikation. I forhold til andre antibiotika registreret til behandling af tarminfektioner i grise (f.eks. amoxicillin-clavulansyre), så findes der umiddelbart ikke studier, som sammenligner effekten i grise af disse antibiotika mod neomycin. Hvis det antages, at de har samme kliniske effekt som neomycin, vil resistens overfor disse antibiotika også vurderes som problematisk i betragtning af det ringe udvalg af antibiotika registreret til tarminfektioner i grise. Det faktum at neomycinresistente isolater oftere er resistente overfor andre klinisk relevante antibiotika end neomycinfølsomme isolater (se punkt 3), kan umiddelbart bruges som argument for at neomycinresistens er mere problematisk. Vi ved dog ikke endnu om lignende ses for andre antibiotika. Det kan for eksempel ikke udelukkes at amoxicillin-clavulansyre resistente isolater er mere resistente overfor alternative antibiotika end amoxicillin-clavulansyre følsomme isolater.

- 5) Fødevarestyrelsen har fået oplyst, at grisedyrlæger oplever, at neomycin-resistens ”hurtigt forsvinder”. Kan det videnskabeligt bekræftes og i så fald, hvad er tidshorizonten og mekanismen bag?

Der findes efter vores kendskab ikke studier, som kan bekræfte dette videnskabeligt. Historisk viser data fra Danmark dog, at forekomsten af neomycinresistens i *E. coli* fra grise er meget afhængig af forbruget af neomycin. Det kan blandt andet ses ud fra, at der efter en periode på ca. 10 år uden neomycin på det danske marked kun var 7% neomycinresistente *E. coli* fra grise i 2016. Efterfølgende er resistensniveauet steget markant i takt med at neomycin er tilbage på markedet, og særligt udpræget i 2022 efter at forbruget samme år blev markant forøget. I forlængelse af dette blev en signifikant association for nylig fundet mellem neomycinforbrug og -resistens i kliniske *E. coli* fra grise (Subramani et al., 2023a). Associationen fandtes for niveauet af neomycinforbruget i de seneste 3 måneder inden dyrkning af *E. coli*, men ikke for de seneste 12 måneder. Dette kan indikere, at vinduet for selektion af resistens er relativt kort og at neomycinresistente isolater udkonkurreres af -følsomme isolater når forbruget aftager. Dette kan – i teorien – forklare grisedyrlægers oplevelse af at neomycinresistens ”hurtigt forsvinder”, men studier, som også undersøger klinisk effekt i relation til resistens, er nødvendige for at bekræfte dette.

Det skal tilføjes, at nuværende grænseværdier til definition af neomycinresistens ikke er specifikke for tarminfektioner. Dette kan medføre uoverensstemmelse mellem hvad der observeres klinisk og hvorvidt bakterien er følsom eller resistent. Med andre ord er der en vis sandsynlighed for at selv neomycinresistente bakterier kan bekæmpes med neomycin, og dette kan i teorien medvirke til en oplevelse af at neomycinresistens ”hurtigt forsvinder”.

- 6) I tillæg til spørgsmål 5, er spørgsmålet da også relevant i forhold til andre antibiotika, der bruges til behandling af infektioner forårsaget af hæmolytiske *E. coli* i grise?

Et mindre studie udført på én besætning i Danmark i 2018 viste tendenser mod at nylig brug af florfenicol (ikke registreret til *E. coli* infektioner hos svin) eller trimethoprim førte til et øget niveau af resistens i *E. coli* i de følgende 3 måneder, mens ophør af neomycinforbrug førte til et tilsvarende fald i samme periode (Bækbo og Haugegaard, 2020). Det blev konkluderet, at resistensforholdene hos *E. coli* derfor så ud til at kunne ændres relativt hurtigt inden for en besætning, afhængig af antibiotikaforbrug. Data fra dette studie var dog begrænset til mellem 5 og 15 isolater per prøvetagning, så konklusionen fra studiet er ikke stærk. Helt generelt er det desuden vigtigt at bemærke, at en association mellem forbrug og resistens ikke nødvendigvis kan overføres 1:1 fra ét antibiotikum til et andet.

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

Neomycin anvendes ikke i den humane behandling, da stoffet grundet sine farmakodynamiske og -kinetiske egenskaber er uegnet til behandling af humane infektioner.

I danske *E. coli* isolater fra grise er fundet to neomycinresistensgener, *aph(3')-Ia* og *aph(3')-Ib*. Foruden neomycinresistens koder disse gener for resistens overfor kanamycin og paromomycin. Heller ikke disse to aminoglycosider anvendes humant i Danmark, og der forventes derfor ikke at være nogen risiko forbundet med krydsresistens. Som det kan ses i tabellen under svaret til spørgsmål 3, er neomycinresistente *E. coli* kun meget sjældent resistente overfor de kritisk vigtige

antibiotika 3/4 gen. cefalosporiner, fluorkinoloner og colistin. Samtidig er der på 8 sekventerede plasmider med neomycinresistensgener ikke fundet resistens overfor andre humane vigtige antibiotika, med undtagelse af et plasmid med genet *aac(3)-IIId*, der koder for gentamicinresistens (Subramani et al., 2023b). Gentamicin bruges i Danmark som et vigtigt middel, der gives som engangsdosis i den akutte behandling af kritisk syge mennesker. Klinisk betydende gentamicinresistens er ikke beskrevet i forhold til dette. Sammenholdt med en formentlig lav risiko for zoonotisk overførsel og efterfølgende udvikling af infektion associeret med neomycinresistente isolater/plasmider fra grise, vurderes det at konsekvenserne af neomycinresistens for human sundhed er negligerbare.

- 8) Er der observeret apramycin-resistens i de hæmolytiske *E. coli*, der er indsamlet fra grise i forbindelse med resistens-overvågningen under den veterinære myndighedsaftale, og i så fald, hvordan har resistensforekomsten udviklet sig i 2022?

Resistensdata fra hæmolytiske *E. coli* testet for apramycin i perioden fra 2016-2022 viser en stabil forekomst på omkring 10% resistens, dog med en stigning til knap 17% i 2022 (Tabel 1). Der bør noteres at MIC-værdierne for apramycin blev tolket med en vilkårlig grænseværdi på 32mg/L (Yang et al., 2020), idet der hverken findes ECOFF fra EUCAST eller kliniske grænseværdier fra CLSI for dette antibiotikum.

Tabel 1. Forekomst af resistens overfor apramycin i hæmolytiske *E. coli* stammer fra grise i Danmark

	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Apramycin (R >32mg/L) (%)	10,0%	8,2%	12,9%	11,9%	12,0%	9,9%	16,9%
Antal isolater testet	321	256	264	252	250	242	296

Fra sekvensbaseret overvågning blev der i 2021 og 2022 sekventeret henholdsvis 102 og 108 hæmolytiske *E. coli* stammer. Resultaterne viser at alle 32 apramycinresistente stammer, som er sekventerede (hvorfra 9 er fra 2021 og 23 er fra 2022), bærer på *aac(3)-IV* genet. Dette resistensgen er ikke blevet fundet i de apramycinfølsomme stammer, hvilket er i 100% overensstemmelse med den påviste fænotype. *aac(3)-IV* genet koder for en bredspektret aminotransferase kendt som forårsagende resistens overfor flere aminoglycosider, herunder apramycin, tobramycin og gentamicin (Magalhaes og Blanchard, 2005). Af denne grund må forventes, at krydsresistens mod gentamicin og tobramycin forekommer i de isolater, som bærer *aac(3)-IV*. En tidligere publikation af et dansk studie har også vist, at apramycinbehandling af grise kan selekttere for resistens overfor gentamicin og andre antibiotika når resistensgener forekommer i det samme plasmid (Herrero-Fresno et al, 2016).

Endvidere er der fundet genet *aac(3)-IIId* i tre hæmolytiske *E. coli* stammer. Disse stammer er dog fundet apramycinfølsomme ved resistensbestemmelse (MIC på ≥ 4 mg/L og 8), og ingen andre gener relateret til apramycinresistens er blevet detekteret i sekvenserne.

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

Apramycin er ikke indregistreret til systemisk behandling af humane infektioner i Danmark og en fremtidig registrering og markedsføring af apramycin til human behandling i Danmark forventes ikke indenfor de næste 5 år. Internationalt har apramycin været foreslået som en potentiel kandidat til behandling af specifikke infektioner med carbapenem-resistente bakterier (Aranza-Climent et al., 2022). Grundet aktuelle lave resistensniveauer samt mulighed for anvendelse af andre, alternative antibiotika, vurderes dette ikke aktuelt i Danmark. Stoffet skal desuden først gennemgå kliniske studier med henblik på efficacy og anvendelighed.

Referencer:

Aranzana-Climent V, Hughes D, Cao S, Tomczak M, Urbas M, Zabicka D, Lundberg CV, Hansen J, Lindberg J, Hobbie SN, Friberg LE. Translational *in vitro* and *in vivo* PKPD modelling for apramycin against Gram-negative lung pathogens to facilitate prediction of human efficacious dose in pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2022. Oct;28(10):1367-1374.

Bækbo P, Haugegaard S. 2020. Diagnostiske undersøgelser af fravænningsdiarré med fokus på *E. coli*. Erfaring nr 2005 udgivet af SEGES: https://svineproduktion.dk/publikationer/kilder/lu_erfa/2020/2005.

Chaslus-Dancla E, Martel JL, Carlier C, Lafont JP, Courvalin P (1986) Emergence of aminoglycoside 3-*N*-acetyltransferase IV in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* isolated from animals in France. 1986. *Antimicrob Agents Chemother* 29:239–243

Fødevarestyrelsen. 2018. Vejledning om ordinerings af antibiotika til svin. Miljø- og Fødevarerministeriet. https://foedevarestyrelsen.dk/Media/638193236606138944/FVST_Antibiotikavejledning_april_2018_4si_det.pdf

Herrero-Fresno A, Zachariassen C, Hansen MH, Nielsen A, Hendriksen RS, Nielsen SS, Olsen JE. Apramycin treatment affects selection and spread of a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain able to colonize the human gut in the intestinal microbiota of pigs. *Vet Res.* 2016. Jan 7;47:12.

Magalhaes ML, Blanchard JS. The kinetic mechanism of AAC3-IV aminoglycoside acetyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 2005. Dec 13;44(49):16275-83.

Subramani P, Pirollo M, Haugegaard S, Skarbye AP, Conrady B, Pedersen KS, Guardabassi L, Damborg P. Neomycin resistance in clinical *Escherichia coli* from Danish weaner pigs is associated with recent neomycin use and presence of F4 or F18 fimbriae. *Prev Vet Med.* 2023. Mar;212:105852.

Subramani P, Menichincheri G, Pirollo M, Arcari G, Kudirkiene E, Polani R, Carattoli A, Damborg P, Guardabassi L. Genetic background of neomycin resistance in clinical *Escherichia coli* isolated from Danish pig farms. Under review in *Applied and environmental Microbiology*.

Yang Y, Xiao T, Li J, Cheng P, Li F, Yu H, Liu R, Muhammad I, Zhang X. Wild-type cutoff for Apramycin against *Escherichia coli*. *BMC Vet Res.* 2020. Aug 26;16(1):309.

Baggrund/kontekst for bestilling (hvorfor, til brug for hvad)

› Fødevarestyrelsen ønsker svar på en række spørgsmål på baggrund af en henvendelse fra DK-VET om en øget forekomst af neomycin-resistens i hæmolytisk *Escherichia coli* fra grise observeret i forbindelse med resistensovervågningen under den veterinære myndighedsaftale.

I andet halvår, og især i sidste kvartal, af 2022 har antibiotikaforbruget til fravænningsgrise været stigende og dette på trods af en reduktion i produktionsomfanget. Der er set en mindre stigning i forbruget af aminoglykosidet apramycin, men særligt forbruget af aminoglykosidet neomycin er steget betydeligt.

Fødevarestyrelsen formoder, at udviklingen i antibiotikaforbruget til fravænningsgrise skyldes den nylige tilbagetrækning af markedsføringstilladelser for veterinære lægemidler, der indeholder medicinsk zink. Medicinsk zink har været anvendt til kontrol af fravænningsdiarre i griseproduktionen. Til trods for at erhvervet, universiteter og myndigheder i perioden op til tilbagetrækningen har arbejdet for at finde alternative løsninger, har behovet for antibiotika været stigende efter ophøret.

Fødevarestyrelsen ønsker med spørgsmålene til DK-VET en dybere forståelse for neomycin-resistens, og hvilke konsekvenser den observerede neomycin-resistens kan have for både grises og menneskers sundhed. I tillæg til dette ønsker Fødevarestyrelsen undersøgt, om der også er sket en stigning i apramycin-resistensen og i så fald, hvor stor stigning der er tale om, og hvilken betydningen dette kan have for menneskers sundhed.

Form og omfang af bestilling (kort svar, notat, rapport, mødedeltagelse m.v.)

› Der ønskes et notat med svar på de enkelte spørgsmål.

Svarfrist

› 1. juli 2023

Sprog

› Dansk

Evt. bemærkninger (historik, relaterede bestillinger osv.)

›

Evt. andre universiteter/institutioner inddraget i samme bestilling (hvilke, kontaktpersoner)

›

Evt. anmodning og begrundelse for udsættelse af offentliggørelse af besvarelsen (sæt ét kryds)

Nej

7 dage af hensyn til forberedelse af myndighedens beredskab (gælder ved alle COVID-19-besvarelser)