

Udarbejdet af	Henrik Christensen
Øvrige deltagere	Lisbeth Høier Olsen
Kontaktperson i FVST	Johanne Bischoff Kappelgaard (jobcl@fvst.dk)

Dato for henvendelse	Dato for svarfrist	Dato for afsendelse	Versionsnummer
18.03.2023	Snarest mulig		

Journalnummer/sagsnummer	FVST	KU	SSI
	2023-15-25-00641	061-0343/23-3680	23/01992

## Besvarelse vedr.

### ▸ Risikovurdering ved overslæb af antibiotika mellem batches ved produktion af foderlægemidler

#### Bestilling

- Det ønskes vurderet, i hvor høj grad overslæb af antibiotika mellem forskellige batches af foderlægemidler,
- medfører øget risiko for udvikling af resistente bakterier i foder og/eller dyr,
  - kan medføre interaktioner mellem antibiotika der kan have indvirkning på deres effekt samt eventuelle risici for dyrs og menneskers helbred.

#### Svar

- **Vurdering af i hvor høj grad overslæb af antibiotika mellem forskellige batches af foderlægemidler medfører øget risiko for udvikling af resistente bakterier i foder og/eller dyr samt kan medføre interaktioner mellem antibiotika der kan have indvirkning på deres effekt samt eventuelle risici for dyrs og menneskers helbred.**

Området foderlægemidler er beskrevet i Europa-Parlamentets og rådets forordning (EU 2019). Artikel 17 definerer Anvendelse af foderlægemidler, stk. 2. "Dyreholdere må kun anvende foderlægemidler i overensstemmelse med dyrlægerecepten på foderlægemidler og skal træffe foranstaltninger for at undgå krydskontaminering og sikre, at kun de i dyrlægerecepten på foderlægemidler identificerede dyr får foderlægemidler." samme forordning definerer "Foderlægemidler er en homogen blanding af foderstoffer og veterinærlægemidler."

**Tabel 1. Ansøgers forventede doser i medicinholdigt foder, forventet overslæb samt Limit of quantification (LOQ).**

Active substance	Minimum dose (mg/kg)	Threshold (1%) (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Florfenicol	1000-4000	10-40	50
Oxolinic acid	1250-3750	12,5-37,50	50
Sulfadiazine/Trimethoprim	1500-6000	15-60	500

Vurderingen tager udgangspunkt i informationerne fra Tabel 1. Den angivne Limit of quantification (LOQ) synes meget høj. LOQ og Limit of detection (LOD) er for nyligt i en undersøgelse blevet bestemt til hhv. 30 og 75 µg/kg for rester af fluoroquinoloner, sulfonamider, tetracycliner og trimethoprim (Jank et al.

2018). Metoderne bygger på væskechromatografi, massespektrometri og elektrospay ionisation (LC-ESI-MS/MS). Det er således muligt at måle med langt lavere LOQ end der anføres i oplægget fra ansøger (50 og 500 mg/kg) (Tabel 1). I det følgende antages at disse målemetoder er tilgængelige. I tabellen er angivet Minimum dose, som det medicin-tilblandede slutfoder kan indeholde. De angivne værdier for florfenicol (1000-4000 mg/kg) i slutfodersynes meget høje i forhold til anbefalede iblandingsforhold. I produktresumeeet for Florocol Vet premix (Lægemedelstyrelsen 2020), som er markedsført til behandling af regnbueørred, anbefales en tilsætningsprocent på 0,5 % eller 5 kg premix/ton foder; dog kan der anvendes et lavere iblandingsforhold, hvis en større mængde foder er nødvendig for at dække fodringsbehovet. Der står at koncentrationen af medicineret premix i foderet bør være  $\geq 0,04$  % eller 0,4 kg premix/ton foder. Vi læser at minimum dosis på den baggrund kan være:  $400\text{g}/1000\text{kg}=0,4\text{g}/\text{kg}$  dvs  $400\text{mg}/\text{kg}$ . Premix består af 50% aktivt stof (1 g premix indeholder 500 mg florfenicol), dvs minimum 200 mg florfenicol/kg foder, 1% af dette er 2 mg. Det anbefalede blandingsforhold i produktresumeeet er  $5\text{kg}/1000\text{kg} = 5000\text{g}/1000\text{kg} = 5\text{g}/\text{kg} = 5000\text{mg}$  premix/kg, dvs  $2500\text{mg}$  florfenicol/kg foder.

Ved at sammenligne det forventede overslæb på 1% fra et parti medicinbehandlet foder til et parti, som er fri for medicin, vil måling af disse niveauer være mulig ved anvendelsen af tilgængelige metoder. Det forventede overslæb på 1% er en ad hoc værdi, som anvendes i mangel af publicerede data. Der foreslås yderligere målinger af konkrete overslæb for bedre at kunne udføre en risikovurdering.

For at kunne vurdere risikoen for udvikling af resistente bakterier i foder og/eller dyr har vi anvendt en undersøgelse, som for nyligt er udført af EFSA (European Food Safety Authority) på foranledning af Europa-Kommissionen. EFSA udførte et omfattende litteraturstudie af 24 antimikrobielle aktive stoffer anvendt til foderlægemidler samt en bedømmelse af krydskontaminering imellem foderlægemidler og foder uden lægemidler (EFSA 2021a). For at kunne udføre risikovurderingen blev der udviklet en Feed Antimicrobial Resistance Selection Concentration (FARSC) model, som kunne beregne de koncentrationer af antimikrobielle stoffer i foder under hvilke, der ikke kunne forudsiges at være en risiko for dyr eller mennesker ved at anvende foderet. Modellen blev dernæst anvendt på publicerede videnskabelige undersøgelser. Disse omfattede svin, drøvtyggere, fjerkræ, kaniner, finnefisk og heste. Det blev foreslået, at der kunne ekstrapoleres fra et antimikrobisk stof til et anden, hvis de var inden for samme klasse af antibiotika og havde samme MIC (minimal inhibitory concentration).

**Florfenicol.** Florfenicol er et bredspektret antibiotikum, som virker overfor Gram-negative og Gram positive bakterier herunder nogle anaerobe bakterier. Det hæmmer bakteriernes proteinsyntese ved at binde sig til 50S delen af ribosomet, og påvirker aktiviteten af peptidyltransferase enzymet. Florfenicol er markedsført i Danmark til behandling af svin, får og kvæg (herunder kalve) med luftvejsinfektioner, hunde med otitis eksterna (øredråber/gel) samt regnbueørred med furunkulose forårsaget af florfenicol-følsomme *Aeromonas salmonicida* i ferskvandsdambrug. Det er kun til regnbueørred at lægemidlet markedsført som et premix til opblanding i foder. Et lægemiddel er markedsført til opladning i drikkevand til svin. Anden anvendelse i foder (hvis det forekommer) sker under brug af kaskade reglen i Danmark. FARSC for florfenicol er beregnet til at varierer fra 0.95 til  $182.29 \times 10^{-3}$  mg/kg færdigblandet foder (EFSA 2021b). Den store variation skyldes forskellige størrelsesordener for biotilgængelighed imellem arter og usikkerhed i forhold til den gastrointestinale eliminering af stoffet efter optagelse over tarmepitel. Sandsynligheden for at florfenicol under den laveste FARSC koncentration under de anførte grænseværdier kan føre til opblomstring og/eller selektion for resistente bakterier i tarmen og/eller rumen blev vurderet til at være ekstremt lav. En vækstfremmende effekt blev forudsagt over 10 – 20 mg/kg florfenicol tilsat med færdigblandet foder for tilapia og for rejer tilsvarende 3000 mg/kg. Beregningen var imidlertid statistisk usikker. Der er påvist negativ påvirkning af produktionsmål for tilapia og channel catfish indenfor grænserne af 750 til 3750 mg florfenicol/kg færdigblandet foder. Men disse beregninger var imidlertid også statistiske usikre (EFSA 2021b).

**Oxolinsyre (eng. oxolinic acid).** Dette antibiotikum er et kinolon, som hæmmer bakteriens DNA replikation og transkription. Det markedsføres ikke længere i Danmark som lægemiddel til dyr (udgået 2021 ifølge [www.medicinpriser.dk](http://www.medicinpriser.dk)). Hvis det anvendes i Danmark er det under kaskadereglen. Det

anvendes mod Gram negative bakterier herunder mange sygdomsfremkaldende bakterier for fisk og det anvendes udbredt til aquakultur. Det var på grundlag af litteraturstudier ikke muligt at beregne FARSC som følge af manglende data. Der var heller ikke tilstrækkelige data til at kunne vurdere en vækstfremmende effekt. Der var ikke tilgængelige data for de sammenlignelige stoffer quinolon og flumequine (EFSA 2021c).

**Sulfadiazin (eng. sulfadiazine).** Sulfadiazin er et sulfonamid. Sulfonamider hæmmer bakteriers folsyre syntese, og dermed bakteriers vækst. Bakterier danner folsyre ud fra para-amino-benzosyre (PABA). Sulfonamider ligner PABA, og hæmmer folsyre syntesen kompetitivt ved at være et "falsk substrat". Folsyre er nødvendigt for bakteriers syntese af blandt andet puriner og visse aminosyrer. Sulfonamider markedsføres til flere dyrearter i Danmark, men kun i kombination med trimethoprim (se separat vurdering herunder). Ingen af lægemidlerne er markedsført som premix til opblanding i foder. Sulfadiazin markedsføres i Danmark som oralt pasta til heste (udgået til andre arter i 2022 ifølge [www.medicinpriser.dk](http://www.medicinpriser.dk)) primært mod luftvejs- gastrointestinale og urogenitaleinfektioner samt sårinfektioner. Et lægemiddel (sulfamethoxazol/trimethoprim) er markedsført til svin og kyllinger med luftvejsinfektioner som en opløsning til opblanding i drikkevand. Hvis sulfonamider, herunder sulfadiazin, anvendes som foderlægemiddel til dyr, så anvendes det under kaskadereglen i Danmark. Sulfonamider absorberes hurtigt fra mavetarmkanalen og metaboliseres hovedsageligt i leveren og udskilles via nyrerne. Som følge af manglende data var det ikke muligt at beregne FARSC. Der blev identificeret vækstfremmende effekt for tre sulfonamides herunder sulfamethazine for lam til opfodning (55 mg sulfamethazine/kg færdigt foder) og regnbueørred (4600-9200 mg sulfamethazine/kg færdigt foder). Beregningen var imidlertid statistisk usikker (EFSA 2021d).

**Trimethoprim.** Trimethoprim (TMP) hæmmer bakteriers folsyre syntese, som sulfonamider, men ved at hæmme enzymet dihydrofolatreduktase. Som nævnt ovenfor så er folsyre nødvendigt for bakterielsyntese af blandt andet puriner og visse aminosyrer. Trimethoprim anvendes sammen med sulfonamider ud fra, at der er en gensidig potensering af virkningen imellem de to antibiotika. Sulfonamider og trimethoprim er hver for sig beskrevet bakteriostatisk, men sammen baktericide. Kombinationen anvendes til de fleste dyrearter, og virkningen er bredspektrert imod Gram negative og Gram positive bakterier. FARSC blev bestemt til  $0.32-44.57 \times 10^{-3}$  mg/kg færdigt foder med ekstrem lille sandsynlighed for at berige og/eller selektere for resistente bakterier i tarmen og vommen under disse koncentrationer. Det kunne ikke bestemmes om stoffet havde en vækstfremmende virkning pga. manglende publicerede data (EFSA 2021e).

Tabel 2. Opsummering af FARSC (Feed Antimicrobial Resistance Selection Concentration) og/eller vækstfremning ud fra litteraturstudier publiceret af EFSA.

Antibiotika	Grænse under hvilken risikoen for dyr og mennesker vurderes lille iforhold til selektion for resistente bakterier (bestemt ved FARSC model)	Vækstfremning
Florfenicol	$0.95-182.29 \times 10^{-3}$ mg/kg færdigblandet slutfoder	10-20 mg/kg tilapia, 3000 mg/kg rejer
Oxolinsyre	ND	ND
Sulfadiazin	ND	55 mg/kg lam, 4600-9200 mg/kg regnbueørred
Trimethoprim	$0.32-44.57 \times 10^{-3}$ mg/kg færdigblandet slutfoder	ND

ND, ikke tilstrækkelige data til at kunne vurdere

Sammenligning imellem forventet overslæb (Tabel 1) og de forventede risici (Tabel 2) viser, at for florfenicol ligger den FARSC bestemte grænse for risiko for udvikling af resistente bakterier i foder og/eller dyr langt under det forventede overslæb. Det formodes, at det forventede overslæb vil udgøre en risiko for udvikling af resistente bakterier i foder og/eller dyr. Selv med den højeste grænse på 0.182 mg/kg synes det forventede overslæb på 10-40 mg/kg færdigt foder urealistisk højt i en risikosammenhæng.

For trimethoprim viser en sammenligning imellem forventet overslæb (Tabel 1) og de forventede risici (Tabel 2), at den FARSC bestemte grænse for risiko for udvikling af resistente bakterier i foder og/eller dyr ligger langt under det forventede overslæb. Det formodes, at det forventede overslæb vil udgøre en risiko for udvikling af resistente bakterier i foder og/eller dyr. Selv med den højeste grænse på 0.045 mg/kg færdigt foder, synes det forventede overslæb på 15-60 mg/kg færdigt foder urealistisk højt i en risikosammenhæng.

For oxolinsyre og sulfadiazin var FARSC grænseværdier ikke til rådighed, og der kan ikke konkluderes. Der bør tages forholdsregler overfor disse tilsætningsstoffer, da kontaminering ikke er acceptabelt.

For florfenicol og sulfadiazin vurderes der at være risiko for at kunne overføre væksthæmmende effekter ved hhv. 10-20 og 55 mg/kg færdigt foder (Tabel 2). For de to stoffer er bestemmelserne imidlertid usikre. De anførte 1% overslæb med hhv. 10-40 og 15-60 mg/kg færdigt foder (Tabel 1). For florfenicol og sulfadiazin ligger grænseværdierne således på tærsklen til at udgøre en risiko. For oxolinsyre og trimethoprim fandtes ikke et tilstrækkeligt datagrundlag til at udføre en risikoanalyse. Samlet set vurderer vi risikoen for væksthæmning at være lille.

Der er begrænset litteratur om lægemiddelinteraktioner mellem de angivne antimikrobielle midler (florfenicol, oxolinsyre, sulfadiazin og trimethoprim). Det er beskrevet at bakteriostatisk virkende antimikrobielle midler kan modvirke effekten af visse baktericidt virkende midler, da sidstnævnte generelt er mest effektive over for bakterier i vækst. Oxolinsyre er beskrevet baktericid, hvorimod effekten af florfenicol, samt sulfadiazin og trimethoprim i monoterapi, er beskrevet bakteriostatisk, hvilket kan tyde på at interaktioner mellem de angivne antimikrobielle lægemidler kan forekomme. Dog menes bakteriostatisk midler ikke at have betydning for effekten af fluorokinoloner. (Lode et al. 1998; Riviere and Papich 2018). Fluorokinoloner tilhører samme baktericide gruppe som oxolinsyre (kinoloner). Vi vurderer, at der ikke er tilstrækkeligt datagrundlag til udføre en risikoanalyse i forhold til farmakologiske interaktioner mellem de angivne antibiotika i de anførte koncentrationer. Samlet set vurderer vi, at risikoen er lille.

### Opsummering af konklusioner:

Ved produktion af foder uden medicin efterfølgende produktion af medicinholdigt foder vurderes der at være en risiko for at overføre antibiotika, som kan selektere for resistens af risiko for dyr og mennesker. Dette gælder de vurderede stoffer florfenicol og trimethoprim. For de to andre stoffer oxolinsyre og sulfadiazin foreligger der ikke tilstrækkelige data til at foretage en risikovurdering. For stofferne florfenicol og sulfadiazin vurderes risikoen for væksthæmning at være lille ud fra de anførte værdier af overslæb fra medicinholdigt foder til foder som er fri for medicin. For de to andre stoffer oxolinsyre og trimethoprim foreligger der ikke tilstrækkelige data til at foretage en risikovurdering. Risikoanalysen har antaget at 1% af medicinholdigt foder kan overføres til foder uden medicin, og denne antagelse er usikker og bør følges op af flere konkrete undersøgelser. Der er begrænset viden om farmakologiske interaktioner mellem de 4 angivne antibiotika. Risikoen for farmakologiske interaktioner mellem de 4 angivne vurderes til at være lav på baggrund af manglende rapporteringer i litteraturen, men denne antagelse er usikker og bør følges op af konkrete undersøgelser.

## Litteratur

EFSA 2021a. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) et al. Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 1: Methodology, general data gaps and uncertainties. EFSA J. 2021, 19, 6852.

EFSA 2021b. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) et al. Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 7: Amphenicols: florfenicol and thiamphenicol. EFSA J. 2021, 19, 6859.

EFSA 2021c. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) et al. Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 10: Quinolones: flumequine and oxolinic acid. EFSA J. 2021, 19, 6862.

EFSA 2021d. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) et al. Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 11: Sulfonamides. EFSA J. 2021, 19, 6863.

EFSA 2021e. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) et al. 2021. Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 13: Diaminopyrimidines: trimethoprim. EFSA J. 2021, 19, 6865.

EU 2019. 2019/4 af 11. december 2018 om fremstilling, markedsføring og anvendelse af foderlægemidler, ændring af Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 183/2005 og ophævelse af Rådets direktiv 90/167/EØF.

Jank L, Martins MT, Arsand JB, Ferrão MF, Hoff RB, Barreto F, Pizzolato TM. An LC-ESI-MS/MS method for residues of fluoroquinolones, sulfonamides, tetracyclines and trimethoprim in feedingstuffs: validation and surveillance. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2018 Oct;35(10):1975-1989. doi: 10.1080/19440049.2018.1508895.

Lode H, Borner K, Koeppe P. Pharmacodynamics of fluoroquinolones. Clin Infect Dis. 1998 Jul;27(1):33-9. doi: 10.1086/514623.

Lægemiddelstyrelsen. 2020. Produktresumé for Florocol Vet., premix til foderlægemiddel. 7 sider.  
Riviere JE, Papich MG. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Wiley Blackwell, 2ed, 2018.