

Identifikation af AMR-trusler i den danske svineindustri samt mangler i nuværende overvågning

*Hovedansvarlig: John
Elmerdahl Olsen (Professor,
KU)*

April, 2021



DK-VET rapport April, 2021

Statusrapport angående løbenummer I3RG4, referencenummer I3FP4, milepæl 1.1. "Identifikation af AMR-trusler i den danske svineindustri samt mangler i nuværende overvågning"

Udarbejdet af Peter Damborg

Faglig kvalitetssikring er forestået af John Elmerdahl Olsen

Udarbejdet i henhold til den veterinære myndighedsaftale mellem Miljø- og Fødevareministeriet og Københavns Universitet i samarbejde med Statens Serum Institut; Dansk veterinær Konsortium (DK-VET).

Statusrapport angående løbenummer I3RG4, referencenummer I3FP4

Journalnummer KU-VET 061-0211/21-3680

Projektperiode 01-01-2020 – 31-12-2020

Udgivet af Dansk Veterinærkonsortium

Resumé

Indeværende rapport beskriver aktiviteter i det veterinære myndighedsprojekt "Identifikation af AMR-trusler i den danske svineindustri samt mangler i nuværende overvågning" løbnummer I3RG4, referencenummer I3FP4.

Der er i projektet foretaget en pilotundersøgelse af overensstemmelse mellem resistens bestemt ved fænotypisk metode og resistens forudsagt på grundlag af information i helgenomsekvenser af danske enterotoxigene *E. coli* isolater fra fravænningsgrise, og der er fundet en god overensstemmelse. Dette bekræfter at helgenomsekventering kan anvendes i overvågningen, med den fordel at der samtidig opnås information om hvilke kloner af resistente bakterier, der cirkulerer i produktionsdyr,

Der er i pilotundersøgelsen, baseret på 90 *E. coli* isolater fra fravænningsdiarre hos grise, fundet fravær af resistens mod de mest kritiske resistenser af human betydning. Der således ikke fundet ETEC med resistens mod 3. generations cefalosporiner, carbapenemer, colistin og ciprofloxacin. Et mindre antal isolater (8/90) var nalidixinresistente, hvilket er første trin i udvikling af ciprofloxacin resistens.

Der er truffet aftaler med erhvervet og DTU om format for fremtidig overvågning af resistens i danske dyrepopulationer baseret på fænotypisk og genotypiske metoder. Der arbejdes på at opnå de nødvendige juridiske dokumenter for samarbejde om isolater fra SEGES laboratorium, Kjellerup.

I samarbejde med DTU og erhvervet arbejdes endvidere på at optimere metoder til resistensundersøgelse i form af at tilvejebringe et bedre testpanel med mere klinisk relevante antibiotika og flere korrekte breakpoints.

Med henblik på at kunne sammenligne resistensdata på tværs af lande er der endvidere udført arbejde i regi af EU-JAMRAI med harmonisering af metoder til rapportering.

Indholdsfortegnelse

Resumé	3
Indholdsfortegnelse	4
Formål og afgrænsning	5
Baggrund, relevans og perspektiv	5
Metode	6
Resultater	7
Diskussion	9
Konklusion	10
Litteraturliste	10

Formål og afgrænsning

Videnskabelige formål:

Projektet har som videnskabeligt formål at identificere og karakterisere antibiotikaresistens (AMR) af klinisk og zoonotisk relevans i den danske svineproduktion, samt at identificere mangler i nuværende overvågning.

Samfundsmæssigt formål:

Samfundsmæssigt har projektet til formål at etablere ny viden som grundlag for bedre at kunne forstå og måle AMR, der kan påvirke effekten af antibiotikabehandling i grise og mennesker. Projektet kan altså i sig selv ikke medvirke til at modvirke AMR og spredning af dette, men det kan skabe en nyttig basisviden og metoder, som kan give et bedre rationale for på sigt at udvikle interventioner mod truslen fra AMR.

Projektet udføres af KU i samarbejde med SSI, SEGES laboratorium i Kjellerup (herfra blot kaldet "SEGES-lab") og DTU. Projektet overlapper med andre igangværende projekter, dels fra Veterinær Myndighedsbetjening og dels finansieret af andre bevillingsgivere som EU og Svineafgiftsfonden.

Baggrund, relevans og perspektiv

Relevans og perspektivering

Antibiotikaresistens er et stigende problem i såvel human som veterinært regi. Den danske svinebranche er ofte i særligt fokus på grund af dens enorme omfang og deraf relativt store forbrug af veterinære antibiotika i forhold til andre dyrearter i Danmark. På trods af et mindre fald i antibiotikaforbruget til svin i Danmark over de seneste år (DANMAP, 2019), så er der stadig forekomst af AMR, særligt af potentiel zoonotisk relevans. Her kan f.eks. nævnes den udbredte forekomst af MRSA i omkring 9 ud af 10 besætninger, men også andre bakterier som *Campylobacter*, *Salmonella* og *E. coli* kan have vigtige resistenstyper. I de senere år er der internationalt set opstået nye resistenstyper i produktionsdyr, som f.eks. karbapenem- og colistinresistente Enterobacteriaceae. Disse bakterier er på nuværende tidspunkt ikke en bekymring for den danske svineproduktion, men deres eksistens kan heller ikke helt udelukkes grundet metoderne til sporing af dem. Samtidig er nogle af disse resistenstyper blandt de vigtigste humane, da flere af resistensgenerne befinder sig på mobile genetiske elementer og derfor kan spredes på tværs af kloner.

For at kunne håndtere og bremse forekomsten af AMR er det vigtigt at have et godt basalt kendskab til forekomsten af resistente bakterier. I Danmark offentliggør industrien selv forekomst af AMR i svin (www.seges.dk), og disse data offentliggøres og diskuteres også andre steder som f.eks. i overvågningssystemet DANMAP. Der kan dog gøres mere for dels at detektere AMR i svin og dels at analysere resistente bakterier. En øgning af indsatsen på disse fronter kan give det perspektiv, at der opstår et bedre kendskab til forekomsten af AMR og spredningen af denne. Disse oplysninger kan herefter bruges til at forebygge AMR og til at designe interventioner til at modvirke effekten af AMR i dyr og mennesker.

Metode

Metode og data

Projektet var i sin oprindelige form første del af et kapacitetsudviklingsprojekt, der udføres som et 3 årigt PhD projekt med det formål at studere AMR i kliniske isolater fra danske grise og at udvikle og afprøve en hurtigmetode til at diagnosticere antibiotika-behandlingskrævende infektioner med enterotoksogene *E. coli* (ETEC). Med tilkomst af opgave med at formulere et egentligt overvågningsprogram for veterinært relevante patogene bakterier, har opgaven været løst i tæt samarbejde med den arbejdsgruppe, der varetager denne opgave.

Ifølge vores plan givet til Fødevarestyrelsen vil vi opnå ovenstående mål på to overordnede måder:

1. Der foretages en systematisk gennemgang af eksisterende danske overvågningsdata for AMR i svin via resistensdata samt bakterieisolater opbevaret hos SEGES-lab med henblik på at opspore nyopstået resistens i klinisk eller zoonotisk relevante agens samt at identificere huller i den eksisterende overvågning. Endvidere gives forslag til optimering af tests, der udføres hos SEGES.
2. På baggrund af resultater fra "1" fra resistensovervågningen skal der foretages aktiv overvågning og opsporing af nye resistenstyper.

I forhold til pkt 1 er anvendt følgende metoder

1. Ny detaljeret overvågning af AMR i danske svin. Der blev i 2020 etableret et samarbejde mellem KU (tovholder Peter Damborg) og SSI (tovholder Jesper Larsen), som fra og med 2021 vil analysere og publicere resistensopgørelser fra SEGES Laboratorium i Kjellerup samt løbende vil få tilsendt isolater med henblik på sekventering og dybdegående analyse af resistens. Udvalgte enterotoxigene *E. coli* (ETEC) isolater fra 2020 og tidligere er allerede blevet sekventeret som pilotundersøgelse, og fra 2021 vil isolater tilhørende forskellige svinepatogene bakteriearter blive sekventeret. Foruden analyse af resistens i isolaterne, herunder sammenhæng mellem fæno- og genotypiske resistensdata, vil sekvensdata blive brugt til andre formål som f.eks. i) undersøge om særligt virulente stammer cirkulerer i Danmark, ii) undersøge om særlige kloner spredes i Danmark og evt importeres fra udlandet, og iii) forsøge at forstå en sammenhæng mellem resistens/virulens og metadata som f.eks. antibiotikaforbrug, geografisk lokalisering og køb/salg af grise. Sidstnævnte punkt er det mest udfordrende, og der vil derfor blive etableret en juridisk holdbar løsning på tværs af KU/SSI/SEGES-lab for at få adgang til sådanne metadata med samtidig minimering af risiko for aktindsigt. Desuden skal etableres en samarbejdsaftale om forhold som økonomi, praktiske forhold om forsendelse af isolater, og mulighed for medforfatterskaber på publikationer.
- Internationalt samarbejde om overvågning af AMR. KU og SSI er en del af et større EU projekt kaldet EU-JAMRAI (joint action on antimicrobial resistance and healthcare-associated infections). Den veterinære del af dette projekt har til hensigt at udvikle en større europæisk systematisk overvågning af resistens i dyrepatogene bakterier, herunder fra svin. Det nye overvågningsprogram, kaldet EARS-Vet, er pt i støbeskeen som et pilotprojekt, og hensigten er at danske AMR data for bl.a. svinepatogener skal inkluderes fremover i denne europæiske overvågning foruden mere traditionel publicering af data i internationale tidsskrifter, DANMAP mm. Under lederskab af ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety) skal danske data således tilpasses det format, der tiltænkes i EARS-Vet pilotprojektet, formentlig ved at data analyseres ud fra epidemiologiske cutoff (ECOFF) værdier i stedet for nuværende kliniske

grænseværdier. Tidsplanen er endnu ikke fastlagt, da projektet indtil nu er baseret på frivillige kræfter.

- Identifikation af huller i den danske resistensovervågning og optimering af tests hos SEGES-lab. Den danske overvågning af resistens i patogener fra grise foretages i et akkrediteret laboratorium (SEGES-lab) ved MIC bestemmelse ifølge ISO-metode og ud fra gældende CLSI standard (CLSI, 2018). Metoden er derfor i orden, men sammensætningen af antibiotika i testpaneler er ikke tidssvarende ud fra de antibiotika der i dag bruges i svineindustrien. Samtidig er fortolkningen af MIC data for nogle patogen/antibiotika-kombinationer ikke evidensbaseret, idet der mangler grænseværdier til at definere hvornår en bakterie kan defineres som følsom hhv. resistent. Samtidig mangler nuværende resistenspaneler flere antibiotika af klinisk relevans. Disse manglende grænseværdier identificeres ved systematisk gennemgang af eksisterende og ønskede resistenspaneler i et af Svineafgiftsfonden finansieret projektsamarbejde mellem KU, DTU (koordinator), SEGES-lab og partnere fra medicinalindustrien. Metoden til udvikling af resistenspanelerne består i at resistensteste forskellige grise patogener med mange koncentrationer af klinisk relevante antibiotika. Ud fra resultaterne (MIC distributioner) kan der således etableres grænseværdier (ECOFFs) til med større sikkerhed at vide om bakterier er resistente eller følsomme overfor antibiotika. Disse ECOFFs vil blive anvendt sammen med andre tilgængelige grænseværdier til, ved konsensus mellem eksperter, at beslutte hvilke antibiotika resistenspanelerne fremover bør indeholde.

I forhold til pkt 2 var det planen at foretage

- Aktiv overvågning af AMR. Dette skulle efter planen ske via selektiv dyrkning og PCR, men er endnu ikke planlagt (se uddybning under Resultater og Diskussion)

Resultater

Overvågning af AMR i danske svin

Som en pilotundersøgelse er der i 2020 foretaget resistensundersøgelse (fænotypisk) og helgenomsekvensanalyse af 90 ETEC isolater fra danske grise (indsamlet af SEGES-lab og igangværende Veterinærforlig-III projekt, finansieret af fødevarerministeriet). Denne undersøgelse er foretaget i samarbejde med et Innovationsfondsprojekt (PigVac), der udvikler vacciner til beskyttelse mod fravænningsdiare. Innovationsfondsprojektet har haft fokus på at confirmere tilstedeværelse af de relevante antigener, men det har samtidig været muligt på grundlag af sekvenserne at sammenligne resistensundersøgelse ved MIC-bestemmelse med forekomst af resistensgener i isolaterne. 60 ud af de 90 isolater (66,7%) var multiresistente, med høj forekomst af fænotypisk resistens mod streptomycin (68,9%), sulfamethoxazol (67,8%), tetracyclin (56,7), spectinomycin (55,6%), trimethoprim (53,3%), og ampicillin (48,3%). Ingen af isolaterne viste resistens mod 3. generations cefalosporin (ceftiofur, cefotaxime) og heller ikke mod colistin og ciprofloxacin. Der var tæt på perfekt overensstemmelse mellem fænotypisk resistens og påvisning af resistensgener (Kappa >0.9 for sammenligninger), hvilket understreger at helgenomsekventering er en brugbar metode i overvågning. Sekvensanalysen (Res-finder fra Center for Biologisk Sekvensanalyse) prædikterede colistinresistens i et isolat, der var fænotypisk følsom mod dette stof. Otte isolater var nalidixin resistente, og alle bar den samme mutation i gyrA-genet.

Foruden pilotprojektet er der opnået enighed om hvilke kliniske isolater fra svin, der i 2021 skal indsamles af SEGES-lab og sendes til SSI for sekventering. Der er tale om i alt knap 800 isolater fordelt således:

- 100 non-hæmolytisk *E. coli*
- 100 hæmolytisk *E. coli*
- 100 *Streptococcus suis*
- 100 *Actinobacillus pleuropneumoniae*
- 100 *Clostridium perfringens* type A
- 50 *Haemophilus parasuis*
- 50 *Salmonella*
- 25 *Bordetella bronchiseptica*
- 25 *Staphylococcus hyicus*
- 10 *Klebsiella* spp.

De første *Klebsiella* isolater er sendt af sted og er blevet sekventeret. Datanalysen er forestående.

En samarbejdsaftale samt en Data Transfer Agreement (DTA) er udarbejdet mellem SSI/KU/SEGES-lab og mangler kun den sidste juridiske finpudsning inden underskrift. Samtidig arbejdes der på at få adgang til SEGES-lab metadata (f.eks. geografisk oprindelse af isolater) via en "sky-løsning", som sikrer at der ikke kan anmodes om aktindsigt i følsomme data som f.eks. CHR numre, idet disse numre ikke vil være på KU/SSI servere men i "skyen". Det overvejes pt om vi kan være med på en allerede etableret sky-løsning udarbejdet mellem SEGES kvæg og Institut for Veterinær og Husdyrvidenskab.

I starten af 2022 vil de sidste isolater ankomme til sekventering, hvorefter de sidste sekvensanalyser kan foretages. Til den tid vil der også kunne laves en samlet opgørelse over den fænotypisk målte resistens i patogener samlet i 2021, samt en korrelation mellem påvist fæno- og genotypisk resistens.

Internationalt samarbejde

Et manuskript med forslag til design på EARS-Vet er forberedt og submittet til publikation. Pilotprojektet med samling af AMR data fra forskellige europæiske lande er ved at blive planlagt af ANSES.

Udvikling af nye resistenspaneler

Indledende møder mellem partnere har været med til at bestemme hvilke antibiotika, der er klinisk relevante og/eller relevante som indikator for bestemte resistensfænotyper. MIC-bestemmelser af relevante kombinationer af patogener og antibiotika er overstået, og de første ECOFFs er ved at blive beregnet. Næste trin er ved konsensus at blive enige om designet af nye resistenspaneler ud fra ECOFFs, kliniske grænseværdier, samt klinisk relevans af antibiotika. Derefter skal panelerne produceres og anvendes på SEGES-lab, formentlig med udgangen af 2021 eller start 2022.

Aktiv overvågning af resistens

Som nævnt under metoder var det planen, at der på baggrund af resultater fra resistensovervågningen skulle foretages aktiv overvågning og opsporing af nye resistenstyper via selektiv dyrkning og PCR. Vi har endnu ikke iværksat selektiv dyrkning og PCR undersøgelse af fæcesprøver, da vi afventer resultatet af resistensovervågningen i 2021, herunder resultatet af sekventeringsanalyserne. Samtidig overvejer vi hvilken strategi for eventuel aktiv overvågning, der er bedst. Dette er uddybet i diskussionen.

Diskussion

Den hidtidige passive resistensovervågning for svin har i de seneste år bestået af årlige opgørelser af resistens i *E. coli*, *A. pleuropneumoniae* og *S. suis* (DANMAP, 2019). Vi vil fortsætte denne overvågning, men vores nuværende projekt med i 2021 at udføre opfølgende sekventering på isolater fra disse samt andre species vil vise mulighederne for en langt mere omfattende fremtidig genetisk overvågning med mulighed for også at spore smitteveje og sammenhæng mellem antibiotikaresistens/kloner og faktorer som geografisk oprindelse og antibiotikaforbrug. Der er stadig nogle praktiske udfordringer med at kunne lave sådanne opgørelser, men som nævnt ovenfor arbejdes der på at udarbejde forskellige aftaler, som kan sikre at dette bliver muligt.

Det internationale samarbejde er ikke en decideret del af Veterinær Myndighedsbetjening, men det kan være medvirkende til at få resultater (også for andre dyrearter) ud over vores landegrænse. Dette er af betydning, da vi på den måde kan måle os med andre lande og lære af deres strategier for håndtering af AMR – foruden at andre lande vil kunne inspireres af danske forhold. Samarbejdet internationalt er også en god mulighed for at lære om overvågningssystemer, herunder analyser og dataopgørelser i andre lande. Der findes i den forbindelse ikke én guldstandard for alt dette, men ved fælles løsninger kan optimerede metoder udvikles til gavn for såvel vores egen som andres overvågning. Det skal bemærkes, at der indtil nu kun er planlagt et pilotprojekt for et kommende EARS-Vet. Dette betyder, at der ikke findes nogen garanti for en vedvarende europæisk overvågning som f.eks. ved den humane pendant EARS-Net.

Udviklingen af nye resistenspaneler er heller ikke en direkte del af Veterinær Myndighedsbetjening, men den tjener formålet at fylde et vigtigt hul i forbindelse med nuværende overvågning. Formentlig vil der fra 2022 med nye resistenspaneler kunne laves bedre resistensovervågning, dvs. målrettet flere klinisk relevante antibiotika samt med mere evidensbaseret viden om ved hvilke MIC-værdier bakterier kan klassificeres som følsomme hhv. resistente overfor de testede antibiotika.

I forhold til aktiv overvågning af AMR vurderer vi at de foreslåede metoder selektiv dyrkning og PCR er af ringe interesse for svins sundhed, da vi allerede har et godt overblik over resistens i de patogene bakterier og løbende holder øje med ændringer i resistens i kliniske isolater. Samtidig vil igangværende sekventering af kliniske isolater bringe endnu mere viden om AMR af klinisk relevans. I forhold til folkesundheden vil en meget sensitiv opsporing af særlige resistenstyper/gener (ved selektiv dyrkning/PCR) kunne bruges til at vurdere, om disse er til stede og dermed af potentiel risiko for smitte til mennesker. Vi tvivler dog på værdien af denne undersøgelse, da vi kan risikere at finde mange resistente bakterier og resistensmekanismer i meget lav forekomst uden at kunne vurdere risikoen for videre spredning. Vores anbefaling er derfor helt at undlade denne del af projektet og i stedet fokusere på ovennævnte punkter, særligt helgenomsekventeringen, som allerede rækker langt ud over tidligere resistensovervågning i Danmark og andre lande. Såfremt vi – f.eks. ved sekventering – finder resistenstyper af særlig relevans, kan vi på sigt revurdere denne beslutning og eventuelt begynde selektiv screening.

Pilotprojektets sammenligning af fænotypisk resistensundersøgelse og resultater af helgenomundersøgelse på 90 danske ETEC isolater konfirmerer høj forekomst af resistens i denne bakteriegruppe, men viser også (glædeligt) fravær af resistens mod de for human sundhed vigtigste antibiotika. Undersøgelsen viste overraskende god overensstemmelse mellem fænotypiske og genotypiske metoder, hvilket konfirmerer at overvågning af ETEC kan baseres på genomsekventering, og giver håb for at vi finder tilsvarende overensstemmelse for andre kombinationer af bakterier/antibiotika. Fordelen ved denne sekvensbaserede metode er, at der samtidig vil opnås detaljeret viden om hvilke kloner der cirkulerer i danske produktionsdyr og dermed tillade en direkte og hurtig sammenligning til kloner der cirkulerer i den humane population.

Konklusion

Der er truffet beslutning om format for en fremtidig overvågning af resistens i danske produktionsdyr, og vi vil fortsætte den nuværende fænotypiske analyse, men supplere med mere sekvensbaseret data såfremt de første lovende resultater bekræftes i flere bakteriearter og såfremt det kan forsvares økonomisk. Der arbejdes på at opnå de nødvendige samarbejdsaftaler med erhvervet for kunne få mere kontinuerlig adgang til kliniske isolater og for at kunne få adgang til metadata, som kan styrke vores analyser og koble resultater på f.eks. geografisk lokalisation eller antibiotikaforbrug.

Det ses ikke for nærværende at være hensigtsmæssigt at supplere ovenstående med en strategi, hvor man forsøger at opformere resistente bakterier af bestemte typer og at lede efter bestemte resistensgener ved PCR på prøver fra dyr.

En pilotundersøgelse baseret på 90 ETEC isolater fra danske grise viste fravær af resistens mod de for human sundhed vigtigste antibiotika, og viste god sammenhæng mellem resistensforekomst påvist ved MIC bestemmelse og forudsigelse af resistens ud fra helgenomsekvenser.

Litteraturliste

- DANMAP 2019. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark.
- CLSI, 2018. VET08. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals.