



Afsluttende rapport for forskningsprojektet

*Udvikling af nye praksis-relevante analyser for  
bestemmelse af antibiotikaresistens i luftvejsbakterier  
hos kvæg*

November 2022

## **Udvikling af praksis-relevante resistenspaneler for kvægpatogener – fastlæggelse af cut off værdier**

Projektdeltagere og ekspertgruppe:

Center for Diagnostik, DTU: Vibeke Frøkjær Jensen, Bettina Nonnemann, Lærke Astrup,

Veterinært Laboratorium, Kjellerup: Charlotte Salomonsen, Solveig Harksen

Institut for Veterinær og Husdyrvidenskab, KU: Peter Panduro Damborg, John Elmerdahl Olsen

Den Danske Dyrlægeforening: Helle Slot, John Haugegaard (nu Merck), Margit Andresen (nu Danish Crown)

ViNordic: Lisbet Vesterager Borge, Kirsten Jensen (ELANCO)

Projektet var finansieret af Kvægafgiftsfonden og gennemført på Center for Diagnostik, DTU.

Projektets resultater stilles gratis til rådighed for alle virksomheder, der er aktive i den pågældende sektor eller delsektor.

# Forord

Formålet med dette projekt var at imødekomme et stadig mere presserende behov i dyrlægepraksis, for at kunne få udført resistensundersøgelse for de antibiotika, som rent faktisk er tilgængelige for behandling af kalve i Danmark.

Udviklingen af nye tidssvarende resistenspaneler har været begrænset af manglen på tolkningsværdier (ECOFF eller kliniske breakpoint værdier) for mange, især nyere veterinære lægemidler.

Projektet bestod af to dele:

- 1) Fastlæggelse af nye tolkningsværdier (tECOFF) på grundlag af MIC-fordelinger for relevante antibiotika og bakterier. Til dette formål er designet og anvendt nogle projektpaneler, som kun indeholdt de antibiotika for hvilke, der manglede tolkningsværdier. Bakterierne var indsamlet fra kliniske prøver fra danske kvægbesætninger.
- 2) Design af nye resistenspaneler til anvendelse i laboratorierne fremadrettet. Denne del af projektet bestod af udpegning af de relevante antibiotika, og fastlæggelse af testrange for hvert antibiotikum på grundlag af MIC-fordelinger og tolkningsværdier

De nye resistenspaneler er taget i brug på Veterinært laboratorium Kjellerup i 2022, hvor resistenstest på bovine respirationsvejs-patogener tilbydes.

Vi – projektgruppen – håber, at de nye resistenspaneler vil medføre, at dyrlægerne oplever bedre muligheder for optimal behandling af sygdomsudbrud i kalvebesætninger, og dermed færre tilfælde af behandlingssvigt og bedre dyrevelfærd. En reduktion af forekomsten af behandlingssvigt vil medvirke til, at samfundets krav om reduktion i antibiotikaforbrug bedre kan mødes uden at dyrevelfærden kompromitteres.

Vibeke Frøkjær Jensen  
Dyrlæge, Ph.D

# Indhold

1. Projektets baggrund og formål .....	5
2. Materialer og metoder .....	6
3. Resultater .....	11
4. Design af nye diagnostiske resistenspaneler .....	12
5. Afsluttende bemærkninger .....	15
6. Referencer	

# 1. Projektets baggrund og formål

Projektets formål er at fremme målrettet og effektiv antibiotikabehandling ved vigtige og tabsvoldende infektioner hos kalve og derigennem forbedre dyrevelfærd, optimere og reducere antibiotikaforbrug og reducere økonomiske tab ved sygdomsudbrud i besætningerne.

Projektets mål er udvikle forbedrede metoder til resistensundersøgelse, som kan bringes i anvendelse direkte i forlængelse af projektet. Det konkrete mål med nærværende projekt er at danne grundlaget for at udvikle nye resistenspaneler med tilføjelse af nyere og mere relevante antibiotika, herunder fastsætte tolkningsværdier for resistensundersøgelse af vigtige tabsvoldende bakterieinfektioner hos kvæg. Med de nye metoder til resistensundersøgelser vil dyrlæger og landmænd få mulighed for at foretage målrettede og effektive antibiotikabehandlinger ved alvorlige og tabsvoldende infektioner hos især kalve.

Luftvejsinfektioner udgør et stort problem hos slagtekalve og er årsag til omkring 80% af antibiotikaforbruget til kalve. Årsagen er ofte bakterieinfektioner, evt. i kombination med virusinfektion<sup>1</sup>. Hvis bakterierne er resistente, vil antibiotika behandlingen være forgæves, med deraf følgende økonomisk tab for landmanden og forringet dyrevelfærd. Samtidig vil den fejlslagne behandling øge forekomsten af resistens ved at selektere for resistente bakterier - som efterfølgende kan spredes yderligere i besætningen. At bruge antibiotika mod resistente bakterier skaber dermed en ond cirkel.

Endelig kan uhensigtsmæssig antibiotikabehandling hos den unge kalv påvirke tarmbakterierne (mikrobiomet), hvilket kan have langsigtede negative konsekvenser for kalven<sup>2,3</sup>. Det er derfor vigtigt at vælge smalspektret behandling og undgå gentagne behandlinger som følge af behandlingssvigt. Derfor har det stor betydning for branchen som helhed, at den praktiserende dyrlæge kan få afgjort, om den sygdomsvoldende bakterie er resistent over for de antibiotika, der reelt er til rådighed til behandling.

I DK bliver i stigende grad observeret resistens over for det mest almindeligt anvendte antibiotikum til luftvejsinfektion hos kalve (tulathromycin) - dog stadig på et lavt niveau<sup>1</sup>. Imidlertid er der i Nordamerika og Holland er nu påvist høj resistensforekomst hos ungvæg og kalve overfor tulathromycin hos vigtige bakterier<sup>4,5,6</sup>. Dette er relateret til et meget højt forbrug af antibiotika til kalve i disse lande. Omvendt antibiotika ikke anvendes i samme omfang til kalve i DK, anvendes antibiotikabehandling i de fleste danske kalvebesætninger, oftest med samme få antibiotika år efter år. Der er således flere indikationer på, at behandlingssvigt kan være et stigende problem i danske kalve, med deraf følgende behov for genbehandlinger og stigende antibiotikaforbrug. Dette understøttes af, at der de seneste år faktisk er set støt stigende antibiotikaforbrug til danske kalve.

Projektets aktiviteter omfattede:

- 1) Udvælgelse af de vigtigste sygdomsvoldende bakterier i kalveproduktionen, primært bakterier, som forårsager luftvejsinfektioner hos kalve. Luftvejsinfektioner alene er anledning til omkring 80 % af antibiotikaforbruget i slagtekalvebesætninger.
- 2) Indsamling af bakterieisolater
- 3) Udvælgelse af de antibiotika, som reelt kan bruges til behandling af kvæg i Danmark.
- 4) Fastsætte følsomheden overfor alle nye antibiotika, som ønskes inkluderet i de nye praksis-relevante resistenspaneler.

Endvidere indgik et pilotprojekt vedr. *Mycoplasma bovis*, som i dag kan påvises ved PCR i rutine-diagnostikken. *M. bovis* indgår i ca. 30% af luftvejsinfektionerne hos kalve, men dyrkning af bakterien og resistenstestning udbydes ikke i Danmark. Imidlertid indikerer internationale studier, at der kan være betydelig resistensforekomst i *M. bovis*<sup>6</sup>. Også i Sverige ses tulathromycin resistens i *M. bovis* (Swedres), som menes at stamme fra import af sæd fra Danmark. Hvis denne resistenstype er udbredt i Danmark, udgør det et betydeligt problem, idet tulathromycin som nævnt er det mest anvendte antibiotikum til kalve. Målet med pilotprojektet var at få sat en metode op til isolation af *M. bovis* og indsamle isolater til senere resistenstestning. Formålet var på sigt at muliggøre isolation og resistenstest af *M. bovis* i rutinediagnostikken, og få undersøgt forekomsten af resistens i danske isolater af *M. bovis*.

## 2. Materialer og metoder

Bakterier analyseres for antibiotikaresistens med fortyndingsmetoden, hvor der måles MIC (mindste inhiberende koncentration) værdier mod forskellige antibiotika. Når man har bestemt MIC-værdien for en bakterie/antibiotika kombination, skal man herudfra vurdere om bakterien er følsom eller resistent for det givne antibiotikum.

Når resultaterne skal anvendes i klinisk sammenhæng, bør man ideelt set have såkaldte kliniske breakpoint-værdier til tolkning af MIC-værdierne. Hvorvidt et antibiotikum er klinisk effektivt, afhænger af bakteriens følsomhed og koncentrationen af antibiotikum i vævet over tid (lægemidlets PK/PD-egenskaber). Kliniske breakpoint værdier fastsættes for hver kombination af en patogen bakterie, antibiotikum og det relevante organ, hvor infektionen er. Et klinisk breakpoint angiver, hvor følsom bakterien (mindst) skal være (MIC-værdien), for at der kan forventes klinisk effekt af behandling af det levende dyr. Der er dog kun få kliniske breakpoint værdier for kvæg-patogener, idet det blandt andet kræver et kostbart arbejde med dyreforsøg, og det kan derfor tage mange år før relevante kliniske break points bliver fastlagt. Et alternativ er at udvikle epidemiologiske cut-off (ECOFF) værdier, som ikke kræver forsøgsdyr, men som bygger på datasæt af MIC-værdier. ECOFF-værdier fastsættes af European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

En epidemiologiske cut-off værdi (ECOFF) skelner mellem de bakterier, som tilhører den følsomme vildtypepopulation, og de bakterier, som har nedsat følsomhed over for et givent antibiotikum, som følge af erhvervede resistensgener. Hvis lægemidlet er godkendt til behandling af infektionen med en bestemt bakterieart, kan man således oftest regne med, at bakteriearten er klinisk følsom, hvis den ikke har specifikke resistensgener, dvs. hvis MIC-værdien er lig med eller under ECOFF-værdien. Hvis MIC-værdien kun er lidt over ECOFF-værdien, kan man dog ikke udelukke, at infektionen kan behandles med det givne antibiotikum – det afhænger af dosering, og hvor meget antibiotikummet opkoncentreres i det organ, der skal behandles.

ECOFF-værdier fastsættes for forskellige antibiotika og bakteriekombinationer af EUCAST/VETCAST på grundlag af data fra mindst 5 laboratorier med anvendelse af den anbefalede metode. Hvis man har data fra færre laboratorier, kan man fastsætte såkaldte

tentative ECOFF-værdier (t-ECOFF), som kan anvendes vejledende indtil ECOFFs eller relevante kliniske breakpoints fastsættes.

I nærværende projekt har følgende strategi været anvendt:

- 1) Fastlæggelse (i projektgruppen) af hvilke antibiotika, der er relevante for behandling af hver af 4 udvalgte, vigtige sygdomsfremkaldende bakterier fra kvæg (se afsnit 2.1): *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, og *Truoperella pyogenes*.
- 2) Litteratursøgning 1 – identifikation af relevante CLSI kliniske breakpoints og ECOFFs, der er tilgængelige<sup>7,9</sup>. Antibiotika, der i dansk dyrlægepraksis er relevante for behandling af infektionerne hos kalve, og for hvilke der ikke allerede er tolkningsværdier, blev medtaget på projektpanelet
- 3) Litteratursøgning 2: Identifikation af videnskabelige publicerede studier med relevante MIC-data. Disse har dannet grundlag for bestemmelse af test-range (fortyndinger) på projektpanelerne, og data har indgået i beregning af tentative ECOFF (tECOFF) værdier sammen med projektets analyseresultater.
- 4) Design af projektpanel til resistenstest overfor relevante antibiotika (fremstillet af ThermoFisher)
- 5) MIC-bestemmelse for alle de udvalgte bakterieisolater på de specialdesignede projektpaneler.
- 6) Fastlæggelse af t-ECOFF for alle bakterie-antibiotika kombinationer, hvor der ikke er ECOFF eller kliniske breakpoints til rådighed.
- 7) Tilpasning af nyt resistenspanel til luftvejsinfektioner hos kvæg, så dette kan anvendes også til kalve.
- 8) Pilotprojekt: Indsamling af trachealskylleprøver fra kalvebesætninger med henblik på isolation af især *M. bovis* – herunder opsætning af metoden, med henblik på fremtidig diagnostik, og indsamling af isolater (til fuldgenomsekventering i andet projekt og undersøgelser for forekomst af resistens i fremtidige projekter).

## 2.1 Materiale

### 2.1.1 Bakterieisolater

I dette projekt indgår de mest almindeligt forekommende bakterier, som er til årsag vigtige sygdomsvoldende bakterier hos kalve:

Dette omfatter *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* og *Histophilus somni*, som tilsammen er årsag til størstedelen af de bakterielle lungeinfektioner hos kalve (foruden *M. bovis*).

Desuden indgår i dette projekt også *Truoperella pyogenes*, som kan give lungebetændelse hos kalve og er den hyppigste årsag til navleinfektion hos kalve. *Truoperella* kan desuden forårsage alvorlige infektioner i en række andre organer og være årsag til abort.

Desuden påvises hyppigt *Mycoplasma bovis*, ved PCR test på lungevæv fra danske kalve. Der er imidlertid ikke fastsat internationale guidelines for hvordan man fastsætter MIC værdier for *M. bovis*, hvorfor det pt. ikke vil være muligt at indføre akkrediterede MIC analyser på *M. bovis* (se Arbejdspakke 3).

Målet var oprindeligt at indsamle mindst 100 isolater af hver bakteriearterne *M. haemolytica*, *P. multocida*, *H. somi* og *T. pyogenes*, for at danne et rimeligt grundlag for at fastsætte t-ECOFF. For hvert isolat undersøges følsomheden over for hvert af de nye relevante antibiotika.

*I henhold til CLSI guidelines kan antallet af isolater dog reduceres (<100) hvis hovedparten af isolaterne tilhører vildpopulationen, hvilket er tilfældet for de fleste M. haemolytica, H. somni og T. pyogenes, som generelt har lav resistensforekomst.*

Til disse bakterier skal anvendes specialmedier, som er designet til bakterier med særlige vækstkrav ("fastidious"). I henhold til CLSI guidelines<sup>7,8</sup> skal anvendes medier, som produceres af meget få producenter, og EUCAST har derfor udviklet nye medier som kan fremstilles efter offentligt tilgængelige opskrifter, for at sikre forsyningssikkerhed og konkurrencedygtige priser. Dette har dog den ulempe, at etablerede tolkningsværdier, baseret på de hidtidige medier, ikke umiddelbart kan bruges hvis der anvendes de nyere medier. Det forudsætter såkaldte "bridgingstudier", som danner bro mellem tolkningsværdier på gamle og nye medier.

Da vi gerne vil støtte muligheden for at anvende de nye medier (og dermed på sigt opnå større forsyningssikkerhed og lavere priser), besluttede vi at bruge nogle af ressourcerne på at lave "bridging studier", dvs. dobbeltbestemmelse med gammelt og nyt medie på 30-50 isolater for hver bakterieart.

Vi ændrede derfor målet for antal bakterieisolater i projektet iht. tabel 1, som også viser hvilke medier der blev anvendt. Som det fremgår, er antallet af analyser fastholdt iht. projektansøgningen. Antallet af *P. multocida* blev reduceret til 50, fordi der var synergi med et tilsvarende projekt vedr. svin (SAF projekt), hvor der indgik 50 *P. multocida* isolater. For at sikre tilstrækkeligt mange MIC-værdier for at kunne fastsætte tECOFF, måtte vi prioritere et af medierne, som blev anvendt til 70 isolater (pr bakterieart). CLSI medierne blev prioriteret for *M. haemolytica* og *H. somni*, fordi de fleste etablerede tolkningsværdier er baseret på disse, og disse medier derfor foreløbig må anvendes i diagnostikken. Det gælder dog ikke *T. pyogenes* idet der stort set ikke er relevante etablerede tolkningsværdier. For *P. multocida* og *M. haemolytica* anvendes almindeligvis i rutinediagnostikken det basale medie CA-MHB (cation adjusted Müller Hinton broth), men bakterierne betragtes af EUCAST som "fastidious" hvorfor vi valgte at lave en sammenligning (bridging) med det nye EUCAST medie (Müller Hinton Fastidious= MHF).

Tabet 1: Oversigt over anvendelse af vækstmedier til MIC-bestemmelserne i projektet

Bakterie	Medier og antal bestemmelser			
	Agar	CLSI medie	EUCAST medie	Antal dobbeltbestemmelser
<i>M. haemolytica</i>	Blodagar	CA-MHB (70)	MHF (30)	30
<i>H. somni</i>	Chokolade agar	MHB-Y (70)	MHF (30)	30
<i>P. multocida</i>	Blodagar	CA-MHB (50)	MHF (50)	50
<i>T. pyogenes</i>	Blodagar	CA-MHB-LHB (30)	MHF (70)	30

For at fastsætte et (tentativt) ECOFF er det vigtigt, at der indgår et bredt udvalg af den oprindelige følsomme bakterie (vildtypen), så denne kan karakteriseres og dermed skelnes fra



de resistente typer. Typisk vil en større andel af ældre isolater tilhøre vildtypen – og det er meget vigtigt at have en stor andel af vildtype isolater for at kunne fastsætte ECOFFs

I projektet indgår derfor både ældre isolater (2000-2010) fra DTU CfD's bakteriesamling, samt nyere isolater indsamlet af DTU Center for Diagnostik, Sektion for Veterinær Klinisk Mikrobiologi (KU-SUND) og SEGES laboratorium (nu veterinært Laboratorium i Kjellerup). Desuden sikres høj grad af biologisk variation ved at der kun indgår et isolat af hver bakterieart fra hver besætning.

- Fra DTU Center for Diagnostik indgik 35 *Mannheimia haemolytica*, 44 *Pasteurella multocida*, 51 *Histophilus somni*, 33 *Trueperella pyogenes* fra perioden 2000-2016. Endvidere 22 isolater af *T. pyogenes* via Mastitiscenteret fra perioden 2018-2020, samt 3 *M. haemolytica* og 2 *T. pyogenes* indsamlet fra den løbende diagnostik på CfD i løbet af 2021.
- Fra Sektion for Veterinær Klinisk Mikrobiologi, KU-SUND indgik 25 *M. haemolytica* og 19 *H. somni* indsamlet i perioden 2016-2018
- Fra SEGES laboratorium indgik 8 *M. haemolytica*, 7 *P. multocida*, 3 *H. somni* og 4 *T. pyogenes* indsamlet i perioden maj 2020 til oktober 2021.

### 2.1.2 Udvælgelse af antibiotika til MIC-bestemmelse i projektet (projektpanel)

Tabel 2 giver en oversigt over veterinære antibiotika, der er relevante for behandling af gram negative luftvejsinfektioner hos kvæg, og hvilke der er medtaget på projektpanelet.

Makrolidgruppen: I de gamle diagnostiske paneler indgik erythromycin, som repræsentant for makroliderne, fordi dette antibiotikum er anbefalet af internationale organisationer til overvågning. Dette er imidlertid et humant præparat, og erythromycin (14-ring makrolid) er ikke repræsentativt for de makrolider, som anvendes veterinært. Derfor er tidligere tilføjet de veterinært relevante makrolider tylosin, tulathromycin og tilmicosin. Siden er også tildipirosin og gamithromycin blevet registreret, og er relevante på det fremtidige panel. Tulathromycin og gamithromycin er 15-rings makrolider, mens tilmicosin og tildipirosin er 16-rings makrolider. Tylosin (16-ring makrolid) var med på det gamle luftvejspanel, og blev overvejet ved design af det nye panel (udeladt). Ved design af panelerne bør de langtidsvirkende makrolider (tulathromycin, gamithromycin og tildipirosin) principielt sidestilles – det vil sige inddrages på lige fod, bl.a. for at undgå konkurrenceforvridende forhold, medmindre faglige forhold taler imod.

Cefalosporiner og enrofloxacin: Anvendelse af 3. og 4. generations cefalosporiner samt enrofloxacin til både kvæg og svin er nu meget restriktiv, og i praksis nærmest forbudt, og de nedprioriteres i forhold til andre relevante antibiotika. Første generation cephalosporiner indgår i de allermost anvendte intramammaria til kvæg (DANMAP 2018) (cefalexin og cefapirin), men er irrelevante på luftvejspanelet.

Tabel 2: Relevante antibiotika til gram-negative luftvejsinfektioner

Antibiotika	Relevans for behandling af kvæg
<b>Oxytetracyclin</b>	Meget brugt til "tetracyclinfølsomme bakterier". Vigtigt til enkeltdyrs behandling af luftvejsinfektioner og meget vigtigt til kvæg.
<b>Doxycyclin</b>	Kan anvendes til kalve, men oxytetracyclin bruges fortrinsvis brugt til kvæg
Amoxicillin	Amoxicillin foretrækkes frem for ampicillin, idet det er amoxicillin der anvendes veterinært
Amox+clavulansyre	Ikke tilgængeligt til kvæg
<b>Penicillin</b>	Meget brugt til kvæg
Cefquinom, Ceftiofur	Anvendelse kun i særlige tilfælde, ved påvisning af multiresistens
Enrofloxacin	Anvendelse kun i særlige tilfælde, ved påvisning af multiresistens
Florfenikol	Meget brugt til kvæg
<b>Sulfa+TMP</b>	Godkendt til kvæg
<b>Tulathromycin</b>	Meget brugt til kvæg. Langtidsvirkende makrolid godkendt til luftvejsinfektioner
Tildipirosin	Godkendt til kvæg. Langtidsvirkende makrolid godkendt til luftvejsinfektioner
<b>Tilmicosin</b>	Godkendt til kvæg
Gamithromycin	langtidsvirkende makrolid godkendt til luftvejsinfektioner hos kvæg
<b>Tylosin</b>	Godkendt til kvæg
<b>Lincomycin/spektinomycin</b>	Ikke godkendt til kvæg, men vil kunne anvendes til kalve iht. Kaskadereglen. Indgår på nyt luftvejspanel til svin.
Tiamulin	Ikke tilgængeligt til kvæg
<b>Streptomycin</b>	Repræsentativ for dihydrostreptomycin, der bruges til kvæg i kombination med penicillin

**Fed skrift** angiver de antibiotika der indgik på projektpanelet

## 2.2 Metoder

### 2.2.1 Bestemmelse af MIC

For hvert bakterieisolat blev bestemt MIC for hvert antibiotikum på projektpanelet.

MIC-bestemmelserne blev foretaget i henhold til Dansk Standard<sup>10</sup> og CLSI<sup>7,8</sup> guidelines, med anvendelse af Sensititre-paneler. Vi valgte at bruge disse paneler frem for at lave antibiotika fortyndingsserier selv af hensyn til kvalitetssikring af analyserne.

Projektpanelet blev fremstillet og indkøbt til projektet fra Thermo Fisher Scientific.

### 2.2.2 Fastlæggelse af tentative epidemiologisk cut-off værdier

For hver kombination af bakterie og antibiotikum, blev samlet et datasæt med MIC-værdier og udarbejdet et histogram.

MIC-fordelingerne blev anvendt til at estimere de relevante epidemiologiske cut-off værdier (tECOFF) ved hjælp af det statistiske software ECOFF-finder (Turnidge, 2021). De epidemiologiske tolkningsværdier (t-ECOFF og ECOFF) angiver den øverste MIC-værdi i vildtype fordelingen.

## 3. Resultater

### 3.1 Fastlæggelse af tolkningsværdier til nye resistenspaneler

Fastlæggelsen af tolkningsværdier afhænger af hvilke data der er til rådighed. Generelt prioriteres kliniske breakpoint værdier højt, fordi panelerne skal anvendes på kliniske isolater til behandling. Dog kan kliniske breakpoint værdier være irrelevante hvis de er baseret på lægemiddel doseringer som ikke anvendes i Danmark.

I dette projekt blev tolkningsværdierne fastsættes ud fra følgende kriterier, i prioriteret rækkefølge:

- 1) Hvis der er klinisk CLSI<sup>7</sup> breakpoint anvendes disse – forudsat at disse er baseret på samme dosering, som anvendes i Danmark.
- 2) Etablerede EUCAST ECOFF<sup>9</sup>. Alle MIC over ECOFF regnes for resistente (nedsat følsomhed, ikke nødvendigvis klinisk resistente)
- 3) Subsidiært anvendes t-ECOFF beregnet på grundlag af data fra nærværende projekt, sammenholdt med eventuelle data fra to publicerede studier (VetCast data: Garch et al, 2016, De Jong et al. 2014) samt danske data (SEGES laboratorium og DTU Veterinærinstituttet). Eventuelt suppleres med andre publicerede data, hvis førnævnte er utilstrækkeligt.
- 4) MIC-data fra et hollandsk studie (finansieret af EU) ved navn IMPART blev inddraget hvor øvrige data var utilstrækkelige (Endnu ikke publiceret, data stillet til rådighed af projektleder Kees Veldman)
- 5) Når hverken ECOFF eller CLSI breakpoint værdier findes og/eller ECOFF-finder ikke kan beregne tECOFF med de tilrådeværende data, anvendes "Eyeball method", dvs. ud fra den foreliggende MIC-fordeling, vurderes visuelt, hvor tECOFF formentlig ligger. (dette gælder kun enkelte bakterie/antibiotikum kombinationer).

Ad 3: Tolkningsværdier baseret på disse tECOFF blev i videst muligt omfang sammenholdt med eventuelle relevante data fra IMPART. IMPART har ikke helt samme stoffer med som i nærværende projekt, men ved overlap har deres data understøttet vores tolkninger. I nogle tilfælde blev IMPART data inddraget i beregning af tECOFF, særligt hvor datagrundlaget fra nærværende projekt, egne laboratoriedata fra nuværende paneler og publicerede studier var utilstrækkeligt.

Kombinationspræparater udgør en særlig situation. Hvor der – i sjældne tilfælde - er et etableret breakpoint anvendes dette. I øvrige tilfælde kan der potentielt være forskellige måder at fastsætte tolkningsværdien for kombinationspræparater:

- a) Fastlæggelse af tECOFF, dvs. afvigelsen fra vildtypepopulation, som er følsom for begge antibiotika. Bakterier som ikke er følsom for begge antibiotika tolkes som resistente.
- b) Kun subpopulationen med resistens over for begge antibiotika, tolkes som resistent.

Ad b: Nogle fordelinger er trimodale (eller poly-modale), dvs. flere "toppe" i MIC-fordelingen, hvilket kan repræsentere fordelinger af subpopulationer med hhv. fuld følsomhed, resistens over for et antibiotika og resistens over for begge antibiotika - samt evt. flere resistensgener. Det kan imidlertid være meget komplekst eller umuligt at identificere/adskille disse fordelinger, her skal nævnes nogle eksempler:

Hvis vi kun har fordelingen af vildpopulationen, kan kun tECOFF bestemmes ad a). Det kan være vanskeligt at afgrænse subpopulationerne (ad b), hvilket kan vanskeliggøres yderligere af, at der kan være synergi mellem de to stoffer (så viden om stofferne hver for sig ikke kan anvendes).

For nogle af bakterierne var der etableret ECOFF for trimethoprim-sulfamethoxazol kombinationen. For at have sammenhæng i tolkningsmetodikken, blev det besluttet så vidt muligt at **anvende ECOFF hhv. t-ECOFFs, dvs. afgrænsning af vildtypepopulation for alle kombinationspræparaterne** til fastlæggelse af tolkningsværdier. Dette valg understøttes af, at man principielt ikke bør behandle med et antibiotikum (heller ikke i kombination), hvis der er kendt resistens over for dette, for at undgå selektion af resistens.

## 4. Design af nye diagnostiske resistenspaneler

### 4.1 Valg af antibiotika til nyt diagnostisk panel

Det blev besluttet at udvikle et panel, der både kan anvendes til kvæg og grise, fordi antallet af resistensundersøgelser på kalve er for lavt til at oppebære et selvstændigt panel i laboratoriedriften ud fra en økonomisk betragtning. Udviklingen af panelet blev derfor i nærværende projekt og i det tilsvarende projekt for grise (finansieret af SAF) koordineret, så det kan anvendes til begge dyrearter.

I rutinediagnostikken anvendes testpaneler med 96 brønde, så der kan testes flere antibiotika i to-folds-fortyndinger. MIC resultaterne (arbejdsmappe 2-4) er også anvendt til at fastlægge hvilke fortyndinger, der er nødvendige, for at resistenspanelet kan anvendes til de forskellige bakterier.

Panelet er designet med udeladelse af antibiotika, der er irrelevante i veterinær praksis, og inklusion af nye relevante antibiotika. I princippet er medtaget alle antibiotika, som kan anvendes veterinært til at behandle luftvejsinfektioner hos kvæg og grise, men ved pladsmangel på panelet måtte enkelte antibiotika udelades ved en prioritering ud fra væsentlighed. Da cefalosporiner sjældent bruges (grundet restriktioner), foretages især nedprioritering af disse.

Ved prioritering af antibiotika, indgår følgende overvejelser:

- Hvilke lægemidler kan mest oplagt anvendes i praksis
- Hvilke bakterier og dyrearter der indgår i godkendelsen af lægemidlet (SPC)

- Forekomst af erhvervet og naturlig resistens -hvis stort set alle bakterierne er resistente, kan stoffet nedprioriteres
- Tilgængelighed af etablerede tolkningsværdier og/eller data

Design af det nye luftvejspanel til kvæg og grise fremgår af tabel 3. Der er et stort sammenfald mellem antibiotika, der er relevante til behandling af luftvejsinfektioner hos de to dyrearter. Dog er oxytetracyclin, gamithromycin og streptomycin primært medtaget med henblik på kvæg, men lincomycin-spectinomycin og doxycyklin primært er medtaget fordi panelet også skal anvendes til grise (se afsnit 4.2).

## 4.2 Nyt resistenspanel til gram-negative luftvejsbakterier

Følgende antibiotika indgår på det nye panel (med gråt er markeret de som bibeholdes fra det gamle panel):

- **Doxycyklin** - bredspektret, til bl.a. luftvejsinfektioner og de gram-negative luftvejsbakterier (primært brugt til svin).
- **Oxytetracyclin** – bredspektret, bred godkendelse til kvæg.
- **Florfenicol**
- **Amoxicillin** – bredspektret, bred godkendelse
- **Penicillin**
- **Ceftiofur** - kun godkendt til luftvejsinfektioner.
- **Sulfamethoxazol-trimethoprim**
- **Tulathromycin**
- **Tilmicosin**
- **Gamithromycin** - er godkendt til gram-negative luftvejsbakterier hos kvæg (herunder P. multocida)
- **Tildipirosin** - er godkendt til de Gr- luftvejsbakterier hos kvæg og svin
- **Lincomycin/spectinomycin** – bredspektret, godkendt til bl.a. luftvejsinfektioner
- **Enrofloxacin** – bredspektret, godkendt til bl.a. luftvejsinfektioner.
- **Tiamulin**

Projektgruppen vedtog, at følgende antibiotika skal udelades af panelet, idet de er irrelevante for behandling af luftvejsbakterierne: Gentamicin, tylosin og streptomycin. Gentamicin er kun tilgængeligt til peroral (lokal GI) enkelttyrbehandling af pattegrise. Tylosin skal ikke med på panelet fordi det dels er det meget tvivlsomt om dyrlægerne vil bruge det til luftvejsinfektioner, dels indikerer vores resultater at følsomheden er meget lav. Streptomycin er udeladt pga. udbredt resistens hos flere af de gram negative luftvejsbakterier.

Der var kun plads til ét cefalosporin på panelet, men cefquinom og ceftiofur er begge godkendte til luftvejsinfektioner og kunne være relevante ved sjældne tilfælde af multiresistens. Det blev besluttet at prioritere ceftiofur på dette panel, fordi cefquinom er med på panel til Enterobacteriaceae, hvorfor det vil være muligt i ekstreme tilfælde af multiresistens at få testet følsomhed overfor cefquinom med det panel.

Tabel 3: Tolkingsværdier<sup>1</sup> og fortyndingsrækker for nyt resistenspanel til gram negative luftvejsbakterier

Antibiotikum	Fortyndingsrækker	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Histophilus somni</i>
Oxytetracyclin	0,5-16	2	1	1
Doxycyclin	0,25-8	2	1	0,5
Florfenicol	0,5-16	2	1	I=4
Penicillin	0,125-4	I=0,5	I=0,5	I=0,5
Amoxicillin	0,25-8	0,5	0,5	0,06 <sup>2</sup>
Ceftiofur	0,03-8	0,06	0,06	I=4
Trimethoprim/ sulfamethoxazol (1:19)	0,03/0,59- 4/76	0,06/1,19	0,125/2,38	0,25/4,75
Gamithromycin	1-32	I=8	I=8	I=8
Tulathromycin	1-128	I=32	I=32	I=32
Tilmicosin	2-64	32	32	16
Tildipirosin	1-32	I=8	I=16	I=16
Enrofloxacin	0,06-2	0,125	0,06	0,125
Lincomycin/ spectinomycin (1:8)	1/8-16/128	8/64	4/32	4/32
Streptomycin	4-64	32	32	32
Tiamulin	4-64	32	Tolkes ikke	32

1) Værdierne angiver højeste MIC for følsomme isolater hvis intet andet er angivet. I= MIC for isolater med intermediær følsomhed. Modus betegner den MIC-værdi, som er hyppigst forekommende.

Tolkingsværdierne er baseret på: Blå: Klinisk breakpoint, Grøn: ECOFF, Orange: Vetcast breakpoint Gul: tECOFF.

2) For *Histophilus somni* vil resultat for amoxicillin ikke altid kunne tolkes med det panel, som nu anvendes på Veterinært laboratorium, Kjellerup. Modifikation af panelet bør overvejes.

#### 4.3 *Mycoplasma bovis* (arbejds pakke 3)

Mykoplasma bakterier vokser normalt inde i celler, og er derfor meget vanskelige at dyrke, - om end det er lidt lettere for *M. bovis* end andre mykoplasma arter. Derfor undersøges der sædvanligvis for *M. bovis* ved PCR-analyse - hvilket ikke giver mulighed for resistensundersøgelse.

Imidlertid tyder svenske undersøgelser på, at der er udbredt resistens i *M. bovis* i Skandinavien (Personlig meddelelse Karl Pedersen, SVA Uppsala) og ligeledes i andre Europæiske lande<sup>7</sup>. For nuværende er der som nævnt ikke akkrediterede metoder til MIC-bestemmelser på *M. bovis*, hvilket betyder, at der ikke kan udbydes troværdige (akkrediterede) analyser fra de diagnostiske laboratorier.

Da *M. bovis* samtidig er meget udbredt i luftvejsinfektioner hos kalve, er det imidlertid vigtigt at udvikle metoder til resistensundersøgelse også for *M. bovis*.

Et formål med dette projekt var derfor at indsamle *M. bovis* fra trachealskylleprøverne (target 20-25 isolater fra 100 trachealskylleprøver).

I projektet blev fastlagt en metodik og indsamlet erfaring i at isolere *M. bovis*, hvilket åbner mulighed for fremadrettet at isolere *M. bovis* fra kliniske prøver.

I selve projektet modtog vi imod vi kun knap 10 trachealskylleprøver, hvorfra vi isolerede 2 *M. bovis* isolater (fra to ud af tre PCR positive besætninger).

Materialerne og erfaringerne blev ved udgangen af 2021 overdraget til Veterinært Laboratorium i Kjellerup. Her vil de indkøbte materialer blive anvendt til at isolere *M. bovis* fra trachealskylleprøver indsendt i den almindelige diagnostik.

Formålet hermed er at nå nedenstående projektmål i løbet af 2022:

- 1) Indsamling af *M. bovis* isolater til gensekventering i projekt på KU SUND samt
- 2) grundlag for at projektgruppen i et senere projekt kan lave MIC bestemmelser og etablere t-ECOFFværdier også for *M. bovis*.
- 3) Fastlæggelse af metodikker som muliggør at isolation og resistensbestemmelse af *M. bovis* i fremtiden vil kunne udbydes til dyrlægerne på Laboratoriet i Kjellerup

## 5. Afsluttende bemærkninger

Pilotprojektet vedr. *M. bovis* nåede ikke i mål med hensyn til antal isolater, men den nødvendige viden og erfaringer blev indhentet, metodikken udviklet og afprøvet, og det lykkedes at overdrage denne del af projektet til Veterinært Laboratorium i Kjellerup.

De øvrige mål i projektet blev nået fuldt ud:

Designet af det nye panel omfatter udpegning af antibiotika til det enkelte panel og fastlæggelse af testrange for hvert antibiotikum på panelet i synergi med det tilsvarende SAF-projekt.

Litteraturstudierne har tilvejebragt alle relevante publicerede tolkningsværdier, og MIC-data fra publicerede studier. Nye tolkningsværdier er fastlagt på grundlag af MIC-bestemmelserne i projektet, suppleret med de publicerede data.

De fastlagte tolkningsværdier vil blive anvendt i forbindelse med diagnostiske undersøgelser, når der nye panel tages i brug. Panelet er taget i brug på Veterinært Laboratorium i Kjellerup i 2022, hvor analyserne udbydes til danske dyrlæger.

## Referencer

1. Jensen VF, Svensmark B, Larsen G, Pedersen K, Toft N, Jorsal SE: Diagnostiske undersøgelser og antibiotikabehandling af kalve. DVT, 06 2018, side 28-35.
2. Chase CCL. Enteric Immunity: Happy Gut, Healthy Animal. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2018 Mar;34(1):1-18.
3. Malmuthuge N, Guan LL. Understanding the gut microbiome of dairy calves: Opportunities to improve early-life gut health. J Dairy Sci. 2017 Jul; 100(7):5996-6005.
4. Woolums AR, Karisch BB, Frye JG, et al. Multidrug resistant Mannheimia haemolytica isolated from high-risk beef stocker cattle after antimicrobial metaphylaxis and treatment for bovine respiratory disease. Vet Microbiol. 2018 Jul; 221:143-152.
5. Timsit E, Hallewell J, Booker C, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida, and Histophilus somni isolated from the lower respiratory tract of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bovine respiratory disease. Vet Microbiol. 2017; 208:118-125.
6. Heuvelink A, Reugebrink C, Mars J. Antimicrobial susceptibility of Mycoplasma bovis isolates from veal calves and dairy cattle in the Netherlands. Vet Microbiol. 2016 Jun 30;189:1-7.
7. CLSI 2018. Vet 01S – Performance standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility test for bacteria isolated from Animals- 5<sup>th</sup> Edition.
8. CLSI 2017 M45 Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, 3rd Edition (på det veterinære område nu erstattet af CLSI 2021 Vet06 Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated from Animals, 1st Edition)
9. Dansk Standard, ISO 20776-1: Klinisk laboratorieprøvning og in vitro-diagnostiske prøvningssystemer – Følsomhedsundersøgelse af mikroorganismer og vurdering af ydeevne for udstyr til undersøgelse af antimikrobiel følsomhed –Del 1: Referencemetode til undersøgelse af in vitro-aktivitet af antibiotika imod hurtigt voksende aerobe bakterier involveret i smitsomme sygdomme (aerobe bakterier)
10. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 10.0, 2020. [Http://Www.Eucast.Org](http://www.Eucast.Org).; 2020.
11. Turnidge J. ECOFFinder XL 2010 v2.1, <https://clsi.org/meetings/microbiology/ecoffinder/> [senest tilgået 20 juli 2021]