

Titel: Nye resistenspaneler til kvæg

Forfatter(e): Vibeke Frøkjær Jensen, dyrlæge, ph.d. (SEGES Innovation P/S, tidl. Center for Diagnostik, DTU)

STØTTET AF

Mælkeafgiftsfonden

Indledning

Projektet blev finansieret af Mælkeafgiftsfonden i 2021 til gennemførelse på Center for Diagnostik, DTU. Grundet barsel blev projektet forsinket, og projektledelsen blev overdraget til Vibeke Frøkjær Jensen. Ved nedlæggelse af de veterinære aktiviteter på CfD DTU, blev projektet overført til SEGES Innovation pr. 1/1 2022, og Vibeke Frøkjær Jensen blev ansat til at afslutte projektet.

Projektdeltagere og ekspertgruppe:

Projektleder: Vibeke Frøkjær Jensen, dyrlæge, ph.d. (SEGES Innovation , tidl. Center for Diagnostik, DTU)

Projekt hovedansøger: Lærke Astrup, Dyrlæge Ph.d. (SEGES Innovation, Tidl. Center for Diagnostik, DTU)

Bettina Nonnemann, Mikrobiolog, ph.d. (Tidl. Center for Diagnostik, DTU)

Helle Slot, kvægfagdyrlæge. Formand for Faggruppe Kvæg, den Danske Dyrlægeforening

Peter Damborg, Dyrlæge, ph.d., Lektor på Sektion for Veterinær Klinisk Mikrobiologi, Københavns Universitet.

John Haugegaard (MSD Animal Health, Formand for Faggruppe Svin, Den Danske Dyrlægeforening)

Margit Andreasen (Danish Crown, tidl. Den Danske Dyrlægeforening)

ViNordic: Lisbet Vesterager Borge, Kirsten Jensen (ELANCO), Henrik Schmidt (Hipra Nordic)

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 mastitis hos kvæg i Danmark.

De nuværende paneler er forældede så resistensforekomsten i mastitisbakterier ofte fortolkes ud fra antibiotika, som ikke er relevante for malkekvæg. Hvis resistensforekomsten ikke kan påvises korrekt, kan det føre til såvel behandlingssvigt som overbehandling, og på længere sigt en fejlagtig resistenspolitik. Derfor er det kritisk vigtigt både for koen, landmanden, dyrlæger, forbrugerne og samfundet, at antibiotikaresistens hverken overses eller overvurderes.

Udviklingen af nye tidssvarende resistenspaneler har været begrænset af manglen på tolkningsværdier (ECOFF værdier eller kliniske break-points) for mange af de relevante antibiotika overfor de bakterier der giver mastitis hos kvæg.

Det konkrete mål for projektet var derfor

- 1) Fastlæggelse af nye tolkningsværdier (cut-off værdier), på grundlag af MIC-fordelinger for relevante antibiotika og bakterier. Til dette formål blev designet et projektpanel, som indeholdt de vigtigste antibiotika for hvilke, der manglede tolkningsværdier for mastitisbakterier. Tolkningensværdierne blev fastsat for de vigtigste mastitisbakterier under danske forhold. Bakterierne var indsamlet fra kliniske prøver fra danske kvægbesætninger.
- 2) Design af et nyt resistenspanel til anvendelse i mastitis-diagnostikken fremadrettet. Denne del af projektet bestod af udpegning af de relevante antibiotika, og fastlæggelse af testrange for hvert antibiotikum på grundlag af MIC-værdier, som blev fastlagt i projektets første del.

I efteråret 2021 blev vi kontaktet af forskere fra det Norske Veterinærinstitut, som ønskede at anvende vores projektpanel i deres forskningsprojekt, som er en del af overvågningen af antibiotikaresistens i relation til mastitis. Vi indgik en aftale om at måtte bruge deres data sammen med vore egne data til fastsættelse af tolkningsværdierne (ad 1), og at publicere resultaterne sammen eller efter aftale. Dette betød en væsentlig styrkelse af vores projekt, idet det betyder at fastsættelse af tolkningsværdierne hviler på et betydeligt mere sikkert grundlag. Dette er af væsentlig betydning for fremtidig brug af det nye panel både i Danmark, Norge og andre lande.

Det nye resistenspanel kan forventeligt bestilles af interesserede laboratorier fra efteråret 2022.

Vi – projektgruppen – håber, at de nye resistenspaneler vil medføre, at dyrlægerne oplever bedre muligheder for optimal behandling af mastitis i danske besætninger, og dermed også at samfundets krav om reduktion i antibiotikaforbrug bedre kan mødes, uden at dyrevelfærden kompromitteres.

1. Introduktion

Mastitis er årsag til langt hovedparten af antibiotika-forbruget i danske kvægbesætninger. Det er afgørende, at den valgte behandling er effektiv. Dette både for at mindske de økonomiske tab og for at tilgodese dyrevelfærden, idet mastitis kan være yderst smertevoldende. Foruden de dyrevelfærds-mæssige og økonomiske konsekvenser vil manglende effekt af antibiotikabehandlingen kunne føre til gentagne behandlinger af køerne. Den direkte selektion af de resistente bakterier samt det øgede forbrug ved genbehandling kan øge resistensudviklingen i kvægpopulationen. Resistensundersøgelse er derfor et vigtigt værktøj, for at sikre effektiv behandling og mindske resistensudvikling.

Omvendt er det lige så vigtigt at kunne fastslå, om en bakterie faktisk *kan* behandles med smalspektret antibiotika, så man undgår unødvendigt brug af bredspektret antibiotika og risiko for øget resistensudvikling.

I Danmark skal bakteriel bovin mastitis som udgangspunkt behandles med smalspektret penicillin. Undtagelsesvis kan dyrlægen indlede behandling med andre antibiotika. Mere generelt skal der foretages resistensundersøgelse, hvis der anvendes andre antibiotika, for at dokumentere at bakterieinfektionen er resistent overfor smalspektrede (simple) penicilliner og følsom overfor det valgte antibiotikum. Dette gælder dog ikke, hvis der er påvist patogene bakterier, som ifølge forskrift skal behandles med andre antibiotika, jf. bekendtgørelse om sundhedsrådgivningsaftaler for kvægbesætninger. Siden 2021 har lovgivningen krævet, at der skal foreligge en besætningsdiagnose, hvis der skal udleveres andre antibiotika end penicillin til behandling af flere køer (Bekendtgørelse om sundhedsrådgivningsaftaler for kvægbesætninger (25/5 2021), §42). Besætningsdiagnosen skal bygge på isolering af samme bakterieart fra fem forskellige køer i besætningen og MIC resistensbestemmelse på alle fem bakterieisolater. Hvis der er resistens overfor smalspektrede penicilliner må der udleveres andre antibiotika.

Penicillinresistente bakterier er ofte også resistente overfor et eller flere andre antibiotika, hvilket yderligere understreger vigtigheden af, at dyrlægen kan få lavet resistensundersøgelse overfor de antibiotika, som reelt anvendes til behandling af mastitis hos køer i Danmark.

De hidtidige resistensundersøgelser på bakterier isoleret fra mastitis, har omfattet en række antibiotika af begrænset relevans, fordi de enten er reserveret til human brug, eller er veterinære antibiotika, som ikke må bruges til lakterende køer. Det har imidlertid ikke været muligt at opdatere panelerne med relevante antibiotika, fordi der ikke er etablerede tolkningskriterier, enten epidemiologiske cut-off (ECOFF) eller kvægspecifikke kliniske break points for størstedelen af de antibiotika, som er relevante for mastitis behandling.

Formålet med nærværende projekt er at danne grundlaget for at udvikle nye resistenspaneler med de antibiotika, der er relevante til behandling af bovin mastitis i Danmark, samt at designe disse paneler, så de kan sættes i produktion. Målet er derfor i første omgang at fastlægge vildtypefordelinger og tolkningsværdier (cut-off værdier) for de mest relevante antibiotika og bakterier. Disse resultater kan derefter anvendes til at fastlægge fortyndingsrækkerne på det nye panel og de fastsatte cut-off værdier kan anvendes til at tolke MIC værdierne, hvormed det opdaterede panel bliver anvendeligt i praksis.

Projektets langsigtede formål er at fremme optimal rådgivning og behandling i relation til mastitis i danske kvægbesætninger, og dermed reducere antibiotikaforbrug og resistensudvikling, samt fremme dyrevelfærden i besætningerne.

2. Materialer og metoder

Antibiotikaresistens undersøges ved at dyrke bakterier i vækstmedier med antibiotika i forskellige koncentrationer, og derfra afgøres hvor meget antibiotikum, der skal til for at standse bakteriens vækst. Metoden kaldes Minimum Inhibitory Concentration (MIC) bestemmelse og er den internationalt anbefalede metode (<https://www.iso.org/standard/70464.html>). Når man har bestemt MIC-værdien for en bakterie/antibiotika kombination, skal man herudfra vurdere (tolke) om bakterien er følsom eller resistent (har nedsat følsomhed) for det givne antibiotikum.

Når resultaterne skal anvendes i klinisk sammenhæng, bør man ideelt set have såkaldte kliniske break-points til tolkning af MIC-værdierne, for at afgøre om der kan forventes klinisk effekt. Kliniske break-points fastsættes for hver kombination af en patogen bakterie, antibiotikum og det relevante organ, hvor infektionen er. Hvorvidt et antibiotikum er klinisk effektivt, afhænger af bakteriens følsomhed og koncentrationen af antibiotikum i vævet over tid (lægemidlets PK/PD-egenskaber). Et klinisk break-point angiver, hvor følsom bakterien (mindst) skal være (dvs. hvilken maximal MIC-værdi), for at der kan forventes klinisk effekt af behandling af patienten (koen). Der er dog meget få kliniske break-points for mastitis-bakterier, idet det blandt andet kræver et kostbart arbejde med dyreforsøg, og det kan derfor tage mange år før relevante kliniske break points bliver fastlagt. Ingen af de få tilgængelige kliniske break-points for mastitis-bakterier omfatter antibiotika, som anvendes til behandling af bovin mastitis i Danmark.

Et alternativ til kliniske break-points er epidemiologiske cut-off (ECOFF) værdier, som ikke kræver forsøgsdyr, men som bygger på datasæt af MIC-værdier. EUCAST definition af ECOFF er: *“For a given microbial species and antimicrobial agent, the epidemiological cut-off value (ECOFF) is the highest MIC for organisms devoid of phenotypically detectable, acquired resistance mechanisms. It defines the upper end of the wild-type MIC distribution”*.

En ECOFF værdi skelner altså 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 bakterieinfektionen, kan man derfor som udgangspunkt regne med, at en bakterie er klinisk følsom, 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 antibiotikumet 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 (tECOFF), som kan anvendes vejledende indtil ECOFFs eller relevante kliniske break points fastsættes (Se afsnit 2.1.5).

2.1 Projekt design, materialer og metoder

Projektet tager udgangspunkt i de antibiotika, der reelt er til rådighed og anvendes til at behandle mastitis hos køer i Danmark. For at kunne udvikle nye testpaneler, er det nødvendigt at kende bakteriearternes følsomhed for de inkluderede antibiotika. Dette danner grundlaget dels for at fastsætte hvilke antibiotikafortyndinger, der skal anvendes på panelerne, dels for at fastsætte grænseværdier, der skelner de følsomme fra de resistente bakterier, så panelerne bliver praktisk anvendelige i diagnostikken.

I dette projekt har vi derfor fastsat tentative epidemiologiske cut-off værdier for vildpopulationen (WT cut-off, svarende til EUCAST tECOFF) for en given bakterieart. Et WT cut-off for et antibiotikum afgrænser den fuldt følsomme vildpopulation fra den del af bakteriepopulationen, som har erhvervet resistensgener eller muteret - og dermed har nedsat følsomhed overfor antibiotikum'et.

Dette projekt har omfattet nedenstående arbejdsopgaver i den angivne rækkefølge:

- 1) Udpegning af de mest relevante patogene bakterier fra mastitis i danske kvægbesætninger.
- 2) Design af nyt resistenspanel til brug i projektet, på grundlag af ekspertgruppens ekspertise og litteraturstudie (1)
- 3) Laboratorieanalyser: MIC-bestemmelse for alle de udvalgte bakterieisolater på de specialdesignede projektpaneler.
- 4) Litteraturstudie (2): Identifikation af videnskabelige publicerede studier med relevante MIC-data.
- 5) Fastlæggelse af WT cut-off for alle bakterie-antibiotika kombinationer, hvor der ikke er ECOFF eller kliniske breakpoints til rådighed.
- 6) Design af nyt resistenspanel rettet specifikt mod mastitis bakterier

2.1.1 Bakterieisolater (Ad 1)

Der er store forskelle i følsomhed hos vildpopulationen af forskellige bakteriearter, og dermed varierer cut-off værdierne, der adskiller følsomme bakterier fra resistente, betydeligt mellem forskellige bakteriearter. Derfor er det afgørende, at MIC-panelet udvikles med et repræsentativt udvalg af de bakterier, som er årsag til mastitis hos kvæg.

Danmarks største samling af bakterier fra yverbetændelse i nyere tid tilhører projektets hovedansøger (oprindelige projektleder), Lærke Boye Astrup, og har således stået til rådighed for projektet. Samlingen af bakterier repræsenterer både køer med yverbetændelse i udbrud (akut og mere kronisk klinisk mastitis) og køer med infektion i lav grad, uden symptomer (subklinisk mastitis). Mælkeafgiftsfonden er en af de primære bidragsydere bag samlingen, idet mange af bakterierne er indsamlet i projektet "Yversundhed i Top", som er finansieret af MAF.

1) Projekt "Yversundhed i Top" i 2018 indsamlede alle mælkeprøver fra 11 dyrlægeklinikker i ca. 3 måneder (indsamlingsstid varierede lidt mellem klinikkerne), med krav om indsendelse af 100 mælkeprøver om ugen. Der blev ikke selekteret i materialet. Fra dette projekt kommer langt de fleste kliniske isolater, men projektet omfatter også den samlede database består langt overvejende af to studier:

2) Projekt i 2019 - 2021 der indsamlede subkliniske prøver fra 89 besætninger, som var udvalgt efter statistisk randomisering i forhold til årstider og et antal besætninger som sikrer at prøverne er repræsentative. Fra ca. 10 af disse besætninger blev der også indsamlet kliniske prøver.

Samlingen af bakterier er således af nyere dato og er tilstræbt repræsentativ alle typer yverbetændelser, geografi og besætningstyper. De forskningsprojekter, der har indsamlet bakterierne, er både omfattende og langvarige. Det sikrer, at man kan inkludere en høj grad af biologisk variation, fordi der eksempelvis kan medtages mange af hver bakterieart, mange forskellige besætninger, og op til 5 forskellige indsamlings-år (2016-2020).

Fem af de seks hyppigst isolerede patogene bakteriearter fra mastitis blev udvalgt: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes* og *Klebsiella pneumoniae*. *S. chromogenes* er med som repræsentant for de koagulase negative stafylokokker (CNS), som den hyppigst isolerede CNS-bakterie fra mastitis. *Escherichia coli* er også blandt de hyppigste bakterier isoleret fra mastitis, men ikke inkluderet i projektet, fordi der i forvejen er etablerede tolkningsværdier for mange af de relevante antibiotika og mange publicerede MIC-data.

I projektet blev for hver bakterie-species tilstræbt at inkludere et isolat per besætning, men der var enkelte undtagelser: I enkelte tilfælde blev inkluderet to isolater fra samme besætninger indsamlet fra forskellige køer¹. Næsten alle de inkluderede isolater stammer fra mastitis-isolat samlingen, men der blev suppleret med enkelte bakterier i CfD DTU's isolatbank, løbende indsamlet (af Veterinærinstituttet under forskellige organisationer) siden 1990'erne (Se tabel 1). De inkluderede isolater var alle fra efter år 2000, ligeledes fra forskellige kvægbesætninger. De udvalgte isolater er således tilstræbt repræsentativ for populationen af den givne bakteriespecies i den danske kvægpopulation.

Det har ikke nogen større betydning, at der i enkelte tilfælde er flere isolater fra samme besætning, da det primære formål med følsomhedstestningen er at fastsætte cut-off værdier for vildtypefordelingen og en stor del af variationen henføres til tilfældig og metodologisk variation. Derimod, hvis resultaterne skal anvendes til at vurdere resistensforekomsten i populationen, må besætningerne kun indgå én gang.

I projektansøgningen var målsætningen for antal isolater 100 isolater per bakterie species. Imidlertid besluttede vi at køre bridging studie på 40 isolater per *Streptococcus spp.* (se sektion 2.1.3), for at understøtte EUCAST arbejde (Bridging studie betyder at analyser med to forskellige metoder køre parallelt, for at undersøge om der er en sammenhæng mellem resultaterne af de to analysemetoder). For at frigive ressourcer til bridging studiet, besluttede vi at nedsætte antal isolater per species til 80 (400 isolater, 480 MIC-bestemmelser).

For *K. pneumoniae* kom en stor del af isolaterne i mastitis databasen fra samme besætning, og kun 38 isolater levede op til kriterierne, suppleret med 7 isolater fra CfD-DTU isolatbanken. For *S. chromogenes* var der ingen isolater i CfD DTU isolat banken, og fra mastitis isolatbanken blev identificeret 71 isolater som opfyldte kriterierne. Et isolat måtte udgå, mens et isolat blev inkluderet fra en mælkeprøve i den almindelige diagnostik på CfD.

¹ Seks tilfælde med mere end 4 måneder (4- 15 mdr.) mellem prøvetagningerne (en besætning for *K. pneumoniae*, *S. chromogenes*, og 4 besætninger for *S. aureus*). I enkeltstående tilfælde blev inkluderet to isolater fra forskellige køer i samme besætning med kortere interval: 1) For *S. chromogenes* medtaget to isolater fra samme besætning indsamlet samme måned fra henholdsvis akut mastitis og fra subklinisk mastitis. 2) I tre tilfælde er to *S. aureus* isolater udtaget fra samme besætning med 2, 3 og 3 måneders mellemrum. 3) I to tilfælde er to *S. dysgalactiae* udtaget fra samme besætning indenfor samme uge.

Tabel 1: Bakterieisolater inkluderet i projektet

Bakterie	Målsætning for antal isolater	Endeligt antal isolater med MIC-bestemmelse ¹			Oprindelse, Isolat bank:	
		CaMHB	CaMHB- LHB	MH-F	Mastitis	CfD DTU
<i>Staph. aureus</i>	80	79			70	9
<i>Staph. chromogenes</i>	80	72			71	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	80	45			38	7
<i>Strep. uberis</i>	80		81	41	81	
<i>Strep. dysgalactiae</i>	80		78	42	78	
Total	400	355		83	338	17

1) På alle isolater er kørt MIC bestemmelse med CaMHB og CaMHB-LHB, iht CLSI guidelines. For streptokokkerne er endvidere lavet bridging-studie, dvs. parallel analyse med MH-F mediet, iht EUCAST guidelines.

2.1.2 Udvælgelse af antibiotika og design af projektpanel (ad 2)

På grundlag af projektgruppens ekspertise blev det fastlagt hvilke antibiotika, der er relevante for behandling af mastitis hos køer i Danmark.

Det blev også undersøgt om der var andre antibiotika, som var godkendt til mastitisbehandling i EU, idet disse i princippet også kan anvendes i Danmark. Her blev pirlimycin (et lincosamid), nafcillin (et penicillin) og amoxicillin-clavulansyre identificeret som muligt relevante.

Tabel 2 viser en oversigt over de antibiotika, som kan være relevante for behandling af mastitis i Danmark.

De mest anvendte antibiotika til mastitis og goldning i Danmark omfatter penicillin, amoxicillin, cloxacillin, cefalexin, cefapirin, og aminoglycosider. Desuden kan lincomycin, tylosin, oxytetracyclin, og sulfonamid-trimethoprim anvendes. Andre stoffer er godkendt, men anvendes ikke i praksis. Tabel 2 viser hvilke antibiotika, som blev inkluderet på det endelige panel. Bag beslutningerne vedr. det endelige projektpanel ligger følgende overvejelser:

- Ampicillin har traditionelt været inddraget på resistenspaneler, som repræsentant for både ampicillin og amoxicillin. Ampicillin indgår imidlertid ikke længere i veterinære præparater i DK, og det har længe været dyrlægenes ønske at amoxicillin blev inddraget i stedet. Amoxicillin blev derfor medtaget på projektpanelet.
- Tredje-fjerde generation cefalosporiner og flouroquinolon blev ikke inddraget, selv om der er præparater med disse tilgængelige i Danmark eller EU. Disse antibiotika selekterer for resistens overfor antibiotika der bruges som førstevalg til livstruende infektioner hos mennesker (f.eks. blodforgiftning). Derfor er der meget restriktive danske regler for brug af disse antibiotika, hvilket betyder at de i praksis ikke bliver brugt til behandling af mastitis i DK, siden 2018 (DANMAP 2020).
- Første generation cefalosporiner indgår i de allermest anvendte intramammaria til kvæg (DANMAP 2020) og cefalexin og cefapirin blev derfor medtaget på projektpanelet.

- d) Tylosin er det eneste makrolid, der kan anvendes til mastitis, fordi de andre makrolider ikke må bruges til lakterende køer.
- e) Lincomycin: findes til lokalbehandling i kombination med neomycin, men findes også som injektionspræparat, som kan anvendes til mastitis. Lincosamider virker primært på gram positive bakterier.
- f) Neomycin er et aminoglycosid og virker primært på Gram-negative bakterier. Der er i forvejen tilgængelige data på neomycin for *E. coli*. Da der kun mangler data for *Klebsiella* spp., nedprioriteres neomycin på projektpanelet.
- g) Streptomycin (aminoglycosid) er i Danmark kun godkendt i kombination med penicillin (til injektion). Det vides ikke i hvilket omfang der er effekt overfor de Gram-positive bakterier, men kombinationen har ifølge SPC'et effekt over beta-hæmolyserende Stafylococcer, *S. uberis* og *S. dysgalactiae*. Medtages på panelet, fordi det bruges i kombinationen, og stofferne i kombination har additiv og angiveligt ofte synergistisk effekt.
- h) Framycitin (aminoglycosid) forefindes i kombination med penicillin til lokal behandling af yveret og anvendes til goldning. Thermo Fisher kan foreløbig ikke inkludere på Sensititre paneler og det måtte derfor udelades af projektpanelet.
- i) Sulfonamid og trimethoprim er kun tilgængelige i kombinations-præparater veterinært. Da bakterierne i nogle tilfælde kan være følsomme over for kombinationen, selv om de har nedsat følsomhed over for stofferne individuelt, blev de inkluderet på panelet. Ved projektets start var der ikke tolkningsværdier tilgængeligt for sulfamethoxazol-trimethoprim.

Andre antibiotika godkendt i EU:

- j) Pirlimycin: Der findes etablerede CLSI breakpoint ($R \geq 4$ mg/L) til behandling af mastitis forårsaget af *S. aureus* og streptokokkerne *S. uberis*, *S. dysgalactiae* og *S. agalactiae*. Pirlimycin er et lincosamid, virker primært på Gram-positive, og er dermed ikke relevant for behandling af *Klebsiella* og *E. coli* infektioner. Pirlimycin blev ikke inkluderet på projektpanelet.
- k) For amoxicillin-clavulansyre bør ECOFF være det samme som for amoxicillin iht EUCAST regler for fastsættelse af ECOFF (SOP 10.2), hvorfor det ikke var relevant at inddrage dette på projektpanelet.
- l) Nafcillin er et penicillin og tilhører, sammen med cloxacillin, gruppen af beta-lactamase resistente penicilliner. Da cloxacillin i forvejen er på panelet og nafcillin ikke forhandles i Danmark, nedprioriteres dette.

Projektpanelet skulle omfatte de mastitis relevante antibiotika, for hvilke der ikke allerede var etablerede tolkningsværdier. Derfor blev gennemført et litteraturstudie med identifikation af tilgængelige relevante CLSI kliniske break points og ECOFFs.

For streptokokkerne var der stort set ingen relevante etablerede tolkningsværdier, hvorfor alle relevante antibiotika blev inkluderet på projekt panelet, dog med enkelte undtagelser (se nedenfor). Litteraturstudiet omfattede også publicerede data, som blev lagt til grund for fastsættelse af de fortyndingsrækker af antibiotika, der mindst skulle indgå på projektpanelet. Fortyndingsrækkerne skulle indeholde vildpopulations-fordelingerne, inkl. mindst en 2-folds fortynding under modus (den hyppigste MIC værdi) for de inkluderede bakterier, samt enkelte fortyndinger over vildpopulationen for alle de inkluderede bakterier.

Tabel 2 viser en oversigt over de relevante antibiotika, med angivelse af de fortyndingsrækker, som blev anvendt på projektpanelet. Endvidere er angivet de antibiotika, som var relevante, men blev nedprioriteret af pladshensyn (idet de kan være maksimalt ca 15 antibiotika på panelet), jf. ovenstående liste.

Tabel 2: Antibiotika relevante for behandling af mastitis i Danmark og fortyndingsrækker på projektpanelet

Bakterier	Administrationsvej	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
Oxytetracyklin	Injektion	0,125-16	0,125-16	0,06-8
Amoxicillin	Injektion + Intramammært	0,008-8	0,008-8	0,004-4
Amoxicillin-clavulansyre (EU)	Intramammært			
Benzylpenicillin	Injektion + Intramammært	0,004-4	0,004-4	0,002-2
Cloxacillin	Intramammært	0,03-4	0,03-4	0,015-2
Nafcillin (EU)	Intramammært			
Cefapirin	Intramammært	0,008-16	0,008-16	0,004-8
Cefalexin	Intramammært	0,06-32	0,06-32	0,03-16
Trimethoprim-Sulfonamid	Injektion	0,015/0,3-2/32	0,015/0,3-2/32	0,008/0,15-1/19
Tylosin	Injektion	0,06-16	0,06-16	0,03-8
Lincomycin	Intramammært	0,06-16	0,06-16	0,03-8
Streptomycin	Injektion	1-128	1-128	0,05-64
Neomycin	Intramammært			
Framycitin	Intramammært			
Pirlimycin (EU)	Intramammært			

Signaturforklaring: Fuldt farvede felter: Antibiotika som er relevante for behandling af bakteriegruppen. Skraverede felter: antibiotika, som muligvis har nogen effekt på bakterier i gruppen. De grå felter repræsenterer relevante antibiotika, som ikke kunne inkluderes på projektpanelet (se afsnit 2.1.2)

2.1.3 Laboratorieundersøgelser, MIC-bestemmelser (Ad 3)

MIC-bestemmelserne blev foretaget ved mikroforyndingsmetoden (mikrodilution) i henhold til Dansk Standard (ISO 20776-1: 2019) og CLSI guidelines (CLSI Vet01S (kapitel 5, underkapitel 5.4.2)), som begge refererer til Clinical Laboratory Testing and In Vitro Diagnostic Test Systems, International Standard 20776-1 (ISO).

Projekt-panelerne blev fremstillet som custom made Sensititre paneler fra Thermo Fisher Scientific (panel ID DNKDTUV1). Som anbefalet i CLSI guidelines, blev metoderne justeret iht. Thermo Fisher Scientific guidelines for Sensititre paneler. Sensititre paneler anvendes i rutinediagnostikken på Veterinært Laboratorium i Kjellerup, og metoderne er dermed sammenlignelige med den forventede fremtidige anvendelse. I Tabel 3 er angivet de anvendte medier og inkubationsforhold for de forskellige bakterier.



Generelt for alle bakterie species blev følgende procedure anvendt:

- På førstedagen, blev fra frysekultur (i BHI bouillon med 10% glycerol) foretaget udsæd på blodagar med 5% kalveblod (SSI Diagnostika) til opformering.
- Inkubationsbetingelserne fremgår af Tabel 3.
- Der blev om nødvendigt foretaget subkultivering til udsæden var ren. Efter opformering af renkultur, blev bakterie species konfirmeret ved MaldiToF analyse.

MIC-analyse blev foretaget som følger:

- Toppen af ca. 3-5 kolonier blev opslæmmet i sterilt saltvand (Streptokokker) eller sterilt vand (Staphylokokker og enterobactericea) og opblandet grundigt med Whirlmixer. Koncentrationen blev justeret til en turbiditet svarende til 0.5 McFarland standard ved hjælp af et kalibreret nephelometer.
- Et transfer volumen (tabel 3) blev overført til den valgte bouillon (tabel 3), og opblandet med Whirlmixer.
- Det valgte transfervolumen blev fastsat ved indledningsvis at foretage koloni-tælling (se CLSI Vet01 kap 5.5) for fem isolater, og justere transfervolumen, så den ønskede koncentration blev opnået.
- Inokulation blev foretaget indenfor 30 minutter efter fremstilling af McFarland standard. Det fastlagte inokulations-volumen blev overført til hver brønd på resistenspanelet.

- For hvert panel blev foretaget en renhedskontrol, ved overførsel af 1 µl (loop) og spredt på en blodagar-plade, som blev inkuberet sammen med panelet. Inkubationsforhold er angivet i Tabel 3.

Tabel 3: Analysebetingelser for microdilution test anvendt i projektet.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. uberis</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Rendyrkning på blodagar	Atmosfærisk 36-37°C 16-20 timer	Atmosfærisk 36-37°C 16-20 timer	Atmosfærisk+ 5% CO ₂ , 36°C 18-20 timer	Atmosfærisk+ 5% CO ₂ , 36°C 18-20 timer	Atmosfærisk 36-37°C 16-20 timer
Inokulum transfer (fra McFarland)	20 µl	50 µl	80 µl	100 µl	30 µl
Inokulum koncentration	3*10 ⁵ cfu/ml (1,5*10 ⁵ - 6*10 ⁵)	3*10 ⁵ cfu/ml (1,5*10 ⁵ - 6*10 ⁵)	5*10 ⁵ cfu/ml (2*10 ⁵ - 7*10 ⁵)	5*10 ⁵ cfu/ml (2*10 ⁵ - 7*10 ⁵)	1*10 ⁵ cfu/ml (5*10 ⁴ - 5*10 ⁵)
Bouillon ¹	CaMHB w/TES	CaMHB w/TES	CaMHB w/TES + LHB	CaMHB w/TES + LHB ²	CaMHB w/TES
Inokulations volumen	50 µl	50 µl	100 µl	100 µl	50 µl
Panel inkubation	Atmosfærisk 36-37°C 18-20 timer	Atmosfærisk 36-37°C 18-20 timer	Atmosfærisk 36-37°C 20-24 timer	Atmosfærisk 36-37°C 20-24 timer	Atmosfærisk 36-37°C 18-20 timer

1) Bouillonerne blev indkøbt færdigfremstillet fra ThermoFisher Scientific, med undtagelse af 2) For *S. dysgalactiae* blev CaMHB w/TES + LHB fremstillet på Veterinært Laboratorium i Kjellerup ved tilsætning af 3% lyseret hesteblod (Thermo Fisher) til CaMHB w/TES (Thermo Fisher).

Det blev tilstræbt at inkubationstiden var midt i det angivne interval. Aflæsning af panelerne blev foretaget umiddelbart efter og afsluttet indenfor 1 time efter inkubationen blev afsluttet.

Aflæsning blev foretaget iht. retningslinjer fra EUCAST (2020) og CLSI Vet01S (kapitel 5.8). Aflæsning blev kun udført hvis inokulum renhed var fastslået, der var forventet vækst i de positive kontroller og der ikke var atypisk vækstmønster. For hver organisme blev resistenspanelerne for de første mindst 10 isolater aflæst af både laboranten (Panchale Olsen) og ansvarshavende VIP og i tilfælde af uenighed blev aflæsningen diskuteret for at sikre enighed om aflæsning. Det bør nævnes, at efter den indledende kalibrering var der ekstrem lille inter-observatør variation. Opfølgende kontrolaflæsninger bekræftede fuld overensstemmelse mellem observatørerne.

Bridging studie

For streptokokkerne blev der foretaget et bridging studie, for at understøtte fremtidig mulighed for at kunne anvende EUCAST-standardiserede medier til de såkaldte "fastidious" bakterier, dvs. bakterier der er følsomme eller vokser langsomt, og kræver specielle vækstbetingelser. For hver streptokok species, blev mindst 40 isolater analyseret med EUCAST mediet MH-F, i parallel med analyser med CLSI metodik. Bortset fra anvendelse af en anden bouillon, var de øvrige parametre identiske (se tabel 3) i de to parallelle analyser.

2.1.4 Litteraturstudie

For hver bakterie species blev foretaget en systematisk søgning i PubMed på følgende søgekriterier:

[Navn på bakteriespecies] + MIC + *susceptibility*

Studierne blev ekskluderet, hvis de ikke levede op til følgende kriterier:

- 1) omfatter mindst et af de antibiotika vi har på panelet
- 2) omfatter publicerede MIC distributioner i tabelform
- 3) MIC fordelingen for Vildpopulationen for det relevante antibiotika er ikke trunkeret (dvs. at isolater under modus er opsummeret på fortynding svarende til modus eller derover) eller mindst en fortynding under modus er inkluderet i fortyndingsrækken.

2.1.5 Fastlæggelse af Vildtype (WT) cut-off

EUCAST har beskrevet metodikken for bestemmelse af tentative ECOFF værdier i procedurebeskrivelsen SOP 10.2. Ved beregninger af tECOFF (WT cut-off) værdier i dette projekt, anvendte vi de kriterier som er beskrevet af EUCAST:

Grundet inter-laboratorie variation skal inddrages data fra mindst tre laboratorier, og fordelingerne skal overholde følgende kriterier:

- 1) Der skal være anvendt samme godkendte metodik ved MIC bestemmelserne på de inkluderede laboratorier (ISO 20776-1)
- 2) Der skal være anvendt to-fold fortyndingsserie med udgangspunkt i 1 mg/L.
- 3) Isolaterne skal være identificeret på species niveau
- 4) Fastsættelse af en tECOFF forudsætter at der indgår mindst 3 acceptable distributioner (3 laboratorier)

Acceptkriterier for MIC-distributioner:

- 5) Der må kun være en enkelt peak i den formodede vildtypedistribution. Dog er distributioner med mode der strækker sig over to fortyndinger acceptable (dvs. mode er i virkeligheden mellem de to fortyndinger).
- 6) Fortyndingsrækken skal være tilstrækkelig til at indeholde den sandsynligt laveste og højeste MIC for den formodede vildtypefordeling. Dvs. der bør være mindst to fortyndinger på hver side af vildtype mode.
- 7) Hver MIC fordeling skal omfatte mindst 15 isolater i den formodede vildtype-distribution.
- 8) Der skal være mindst 100 isolater i den aggregerede vildtypedistribution (for at fastsætte ECOFF. I princippet kan accepteres færre ved fastsættelse af tECOFF, men det er ikke optimalt).
- 9) Modus for de individuelle vildtype-distributioner skal være identiske eller indenfor en to-fold fortynding fra den mest almindeligt forekommende mode for den aktuelle species. Hvis de andre distributioner understøtter at der kunne være en lavere mode, hvormed der kan være tvivl om vildtype-mode, kan tECOFF ikke estimeres.
- 10) Den formodede vildtypefordeling bør ikke strække sig over 5 fortyndingstrin.

Vi bruger betegnelsen WT cut-off i stedet for tECOFF, fordi vi har brugt andre medier end de af EUCAST anbefalede til streptokokkerne, og fordi vi ikke i alle tilfælde har data fra tre laboratorier.

WT cut-off værdier blev estimeret ved iterativ modellering med det statistiske værktøj ECOFFinder (Turnidge et al, 2010). Ved estimering af WT cut-off værdier er data vægtet, så hvert laboratorie vejer

lige tungt, dvs. uafhængig af antallet af isolater. Vi har også beregnet WT cut-off på de enkelte fordelinger adskilt, for at vurdere præcisionen i estimatet.

I tilfælde hvor der er ECOFF eller tECOFF fra EUCAST, er disse prioriteret som tolkningsværdier frem for estimater på grundlag af de øvrige data. I disse tilfælde er WT cut-off beregninger foretaget på de øvrige fordelinger (samlet, ekskl. EUCAST data) for at kontrollere om de understøtter EUCAST tECOFF hhv. ECOFF.

2.1.6 Design af nye paneler

På projektpanelet indgik meget lange fortyndingsrækker for at sikre at vildtypefordelingen var dækket ind og data kunne anvendes til fastsættelse af WT cut-off.

Det nye panel til fremtidig test af kliniske isolater skulle designes så alle relevante antibiotika kunne inkluderes. Derfor blev fortyndingsrækkerne afkortet for at skabe plads til yderligere antibiotika.

2.2 Fastlæggelse af tolkningsværdier til nyt resistenspanel

Fastlæggelsen af tolkningsværdier afhænger af hvilke data, der er til rådighed. Generelt prioriteres kliniske break points højt, fordi panelerne skal anvendes på kliniske isolater til behandling. Dog kan kliniske break points være irrelevante, hvis de er baseret på lægemiddel doseringer som ikke anvendes i Danmark eller anden administrationsvej. For mastitispanelet var der ingen relevante kliniske break points til rådighed.

Tolkningsværdierne er her fastsat ud fra følgende kriterier, i prioriteret rækkefølge:

- 1) Etablerede EUCAST ECOFF. Alle MIC-værdier over ECOFF regnes for resistent (nedsat følsomhed, ikke nødvendigvis klinisk resistente)
- 2) Tentativt EUCAST ECOFF (tECOFF).
- 3) Subsidiært anvendes WT cut-off beregnet på grundlag af data fra mindst tre laboratorier, herunder egne data (se afsnit 2.2.2). Der anvendes cut-off svarende til 99.5% af vildtype-distributionen, estimeret med ECOFFinder.
- 4) Subsidiært anvendes data fra mindre end tre laboratorier, estimeret med ECOFF finder

Når der beregnes WT cut-off sammenlignes resultatet med en visuel vurdering af den foreliggende MIC-fordeling hvor ECOFF formentlig ligger. Kun hvis disse metoder er overensstemmende fastsættes en tolkningsværdi. Når der indgår færre end tre MIC fordelinger (laboratorier), kan fordelingerne være meget smalle, og WT cut-off justeres evt. et enkelt fortyndingstrin efter en visuel vurdering.

3. Resultater og diskussion

3.1 MIC-fordelinger

For hver kombination af bakterie og antibiotikum, blev samlet et datasæt med MIC- værdier og udarbejdet et histogram. Bilag A viser MIC fordelingerne fra projektet grafisk (histogrammer).

Resultater for bridging-studiet er vist grafisk i bilag B. Data vil blive overgivet til EUCAST til videre anvendelse.

3.2 Fastlæggelse af vildtype cut-off værdier

Vi tilstræbte at inddrage MIC fordelinger fra mindst 3 laboratorier. Således er WT cut-off beregnet på grundlag af data fra

- 1) Nærværende projekt
- 2) Resultaterne fra Norsk projekt, udført i 2021-2022, udført i samarbejde mellem det norske veterinær-institut og det norske mastitis center TINE. I deres projekt er anvendt Sensitive paneler med vores panel design.
- 3) Fordelinger publiceret af EUCAST. Data fra EUCAST dækker ofte over flere fordelinger (laboratorier). Hvis EUCAST data er tilgængelig anvendes nedenstående data ikke, fordi det kan være uklart om de indgår i EUCAST data
- 4) VetPath data fra tre publicerede studier (VetPath data: Garch et al, 2016, De Jong et al. 2014).
- 5) i nogle tilfælde data fra andre publicerede studier, hvor ovennævnte data var utilstrækkelige.

De acceptable fordelinger blev aggregeret til MIC fordelinger med vægtede data, således at hver af de inkluderede fordelinger vægtede lige blev vægtet lige højt. Der blev beregnet vildtype cut-off (WT cut-off, svarende til tentative ECOFF) ved hjælp af ECOFFinder, både på de enkelte fordelinger adskilt og på de aggregerede data. Således gav de aggregerede data det endelige estimat, mens estimerne på grundlag af de individuelle fordelinger gav indtryk af spredningen (sikkerheden) på estimatet. Generelt gav estimerne på de individuelle fordelinger samme cut-off som de aggregerede data, dog sås for enkelte antibiotika en afvigelse på maksimalt et trin afvigelse fra det fastsatte WT cut-off.

3.3 Tolkingsværdier for Stafylokokker

Staphylococcus aureus

For *S. aureus* er der en meget lang række ECOFF værdier publiceret af EUCAST, men disse er primært for antibiotika som anvendes til mennesker. Imidlertid er der også en del data publiceret på veterinære antibiotika. De fastsatte WT cut-off er baseret på data fra mindst 3 laboratorier, undtagen for oxytetracyklin, hvor kun vores (MAF) og de norske projektdata var brugbare. Det eksisterende ECOFF for tetracyklin (TET) er 1 mg/L, altså en to-folds fortynding højere end for oxytetracyklin (OXY), men også mode er et trin højere for TET (0,5 mg/L) end for OXY (0,25 mg/L).

Tabel 4: Tolkingsværdier¹ for antibiotika til mastitisbehandling af *Staphylococcus* spp.

Antibiotika	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus Chromogenes</i> ⁵	
	WT cut-off	mode	WT cut-off	mode
Oxytetracyklin	0,5 ²	0,25	0,5	0,25
Amoxicillin	0,5 ^{2,4}	0,125-0,25	0,5	0,25
Benzylopenicillin	0,125	0,016-0,031	0,125	0,03
Cloxacillin	1 ^{2,3}	0,25-0,5	2	1
Cefapirin	0,5 ^{2,4}	0,125-0,25	0,5	0,125
Cefalexin	8 ^{2,4}	(1)-2	8	1
Trimethoprim-sulfamethoxazol (1:19)	0,25/4,75	0,06/1,19	0,25/4,75	0,06/1,19
Tylosin	4 ^{2,4}	1-2	4	2
Lincomycin	2	1	2	1
Streptomycin	16	4-8	8	2
Neomycin	1	0,5	Ingen data	

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

Tolkingsværdierne er baseret på: Blå: ECOFF, Grøn: EUCAST t- ECOFF, Gul: WT-cut-off

2) Egne projektdata og data fra norsk projekt, 3) EUCASTdata, 4) VetPath data,

5) Tentative WT cut-off for *S. chromogenes* er fastsat udelukkende på grundlag af data fra MAF, og derfor meget usikre.

Staphylococcus chromogenes

Der er meget få publicerede data på *S. chromogenes*, fordi næsten alle publicerede MIC fordelinger på koagulase negative stafylokokker (CNS), er baseret på poolede data af CNS species. Vi har således været nødsaget til at estimere tentative WT cut-off baseret udelukkende på egne data (MAF), omfattende kun 71 isolater. Da fordelinger baseret på et enkelt laboratories resultaters oftest er meget smalle, har derfor valgt at bruge cut-off for 99.9 % af fordelingen (for øvrige bakterier er anvendt 99.5%). De fastsatte cut-off værdier kan ikke anvendes af andre laboratorier, i stedet bør ECOFFs og tECOFFs for *Staphylococcus aureus* anvendes.

De fastsatte tolkningsværdier er understøttet af, at publicerede fordelinger på CNS har samme mode (gælder for AMOX, PEN, HAP, LEX, LIN, STR og TYL). De publicerede fordelinger for CNS er dog meget brede, fordi de består af poolede data for flere species, og kan derfor ikke anvendes til at estimere WT cut-off.

De fastsatte cut-off værdier for *S. chromogenes* understøttes også af, at de i vidt omfang svarer til WT cut-off for *S.aureus*.

For neomycin er der ingen data for *S. chromogenes*. EUCAST data for CNS indikerer at mode=0,125, men fordelingen er meget bred. For oxytetracyklin er estimeret et WT cut-off på 0,5 mg/L for *S. chromogenes*, men MIC fordelingen er på kun to fortyndingstrin (0,25-0,5), baseret på kun 71 isolater. Der er et ECOFF=1 for tetracyklin, fastsat for CNS, med samme mode=0,25.

3.4 Tolkningssværdier for streptokokker

For *S. uberis* og *S. dysgalactiae* forefindes mange publicerede data, og der er 3 eller flere fordelinger til grund for de fleste af de fastsatte WT cut-off værdier. For enkelte antibiotika ligger dog kun fordelinger fra to laboratorier til grund (Tabel 5).

EUCAST anbefaler at bruge MH-F mediet til MIC bestemmelse af streptokokker, og bruger ikke længere MIC fordelinger baseret på CLSI mediet MHF-LHB. Imidlertid er der på EUCAST hjemmeside publiceret ECOFF for trimethoprim-sulfamethoxazol (1:). Disse ECOFF er baseret på data fra IM-PART, hvorfor der er anvendt samme metodik som i vores projekt. Ved estimering af WT cut-off på grundlag af MAF data og norske data fås samme værdier som EUCAST ECOFF for TMP-sulfamethoxazol, ligesom fordelingerne har samme mode.

Med hensyn til neomycin har *S. uberis* en meget lang range (0,25 til >128 mg/L), og det tyder på at mode= 64 repræsenterer ikke vildtypen. Helt generelt er streptokokkernes følsomhed overfor de to aminoglycosider (streptomycin og neomycin) meget lav, hvad enten der er tale om naturlig lav følsomhed eller erhvervet resistens.

Tabel 5: Tolkingsværdier¹ for streptokokker på nyt resistenspanel til mastitis bakterier.

Antibiotika	<i>Streptococcus uberis</i>		<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
	WT cut-off	mode	WT cut-off	mode
Oxytetracyklin	1 ^{2,5}	0,5	8 ^{2,5}	2
Amoxicillin	0,125 ^{2,4}	0,03-0,06	0,06 ^{2,4}	0,016-0,03
Benzylpenicillin	0,06 ^{2,4}	0,03	0,016 ^{2,4}	0,008
Cloxacillin	1 ^{2,4}	0,5	0,25 ^{2,4}	0,125
Cefapirin	0,125 ^{2,4}	0,06	0,125 ^{2,4}	0,06
Cefalexin	1	0,25-0,5	1 ^{2,4}	0,5
Trimethoprim-sulfamethoxazol (1:19)	1	0,125	0,25	0,03
Tylosin	4	0,5-1	0,5 ^{2,4}	0,25
Lincomycin	0,5 ²	0,125	0,5 ^{2,4}	0,25
Streptomycin	Ikke relevant	64-128	Ikke relevant	16 ²
Neomycin	Ikke relevant	64	Ikke relevant	16-32 ^{4,5}

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

Tolkingsværdierne er baseret på: Blå: ECOFF(baseret på IMPART data), Gul: WT-cut-off.

2) Egne projekt data og data fra norsk projekt; 3) EUCAST data ; 4) VetPath data;

5) McDougall et al. 2014.

3.5 Tolkingsværdier for Enterobacterales

Klebsiella pneumoniae

For *K. pneumoniae* er der meget begrænsede MIC data for de antibiotika, der er relevante for behandling af mastitis. En stor del af de publicerede data er poollet på *Klebsiella spp.*, eller en blanding af *K. oxytoca* og *K. pneumoniae*. De data vi har inkluderet fra MAF, EUCAST og Bengtsson et al. (2009) er på *K. pneumoniae*. Desuden er inkluderet data fra Garch et al. (2020), baseret på *K. pneumoniae* og *K. oxytoca*, fordi fordelingerne har overensstemmende mode med data på *K. pneumoniae*, og de formodede WT fordelinger er smalle (5 eller færre to-foldfortyndinger). Grundet manglen på data har det i flere tilfælde været nødvendigt at fastsætte tentative WT cut-off på mindre end 3 laboratorier.

For benzylpenicillin, cloxacillin, tylosin og lincomycin lå alle MIC værdier meget højt, omkring eller over fortyndingsrækken. Disse stoffer virker primært på Gram-positive bakterier og er ikke godkendt til behandling af Enterobacterales, og resultaterne underbygger, at de ikke er relevante til behandling af *K. pneumoniae*.

For cefapirin skal bemærkes at WT fordelingen med mode=2 og WT cut-off=4 for *K. pneumoniae* ligger højt i forhold til WT fordelingerne for de Gram-positive kokker. Cefapirin er ikke godkendt til behandling af enterobacterales, og der bør ikke fastsættes en tolkning på grundlag af de eksisterende data.

For cefalexin indikerer MAF og VetPath data et mode på 4, og modelleres med en smal fordeling på ca. tre to-folds fortyndinger. De danske data har dog en ekstra top på MIC=16, hvilket kan repræsentere isolater med nedsat følsomhed. Imidlertid indikerer EUCAST data (1 fordeling, n=64) et mode på MIC=8, men fordelingen ligner de øvrige fordelinger. Det er usikkert om tolkningsværdien skal sættes tentativt til WT cut-off=8, men data er utilstrækkelige til at afgøre dette. Den vægtede aggregerede MIC fordeling giver WT cut-off=4 (99.5%).

For amoxicillin er der projektdata (MAF) og VetPath-data, men for begge fordelinger ligger næsten alle MIC værdier tæt på øverste grænse eller over fortyndingsrækken. EUCAST angiver (SOP 10.2) at ECOFF for amoxicillin og amoxiclav bør ligge samme sted. Derfor har vi brugt EUCAST data på amoxiclav til at fastsætte et tentativt WT cut-off for amoxicillin.

Escherichia coli

For *E. coli* er der på EUCAST hjemmesiden fastsat ECOFF for et meget stort spektrum af antibiotika, herunder en del af de antibiotika der er relevante for behandling af mastitis (se Tabel 6). Der er også ECOFF værdier fastsat for ceftiofur og enrofloxacin, som ikke anvendes i DK.

For *E. coli* viser publicerede MIC fordelinger for cefapirin en meget bred fordeling (0,125-64) omkring mode (=4), og data er ikke egnede til beregning af WT cut-off (Garch et al 2020). Dette mode er meget højt i forhold til mode for de Gram-positive bakterier, og som nævnt er cefapirin ikke godkendt til behandling af *E. coli* infektion. Andre publicerede datasæt på *E. coli* fra mastitis har endnu højere mode=16 (De Jong et al.2018), hvilket indikerer udbredt resistens i *E. coli* overfor cefapirin.

Der er ingen MIC data tilgængeligt for framycetin, som er godkendt til behandling af gram positive bakterier. CLSI har for bovin mastitis angivet break points for framycetin i kombination med penicillin (I=16/8 mg/L). Da Enterobacterales ikke er klinisk følsom overfor benzylpenicillin, kan det antages, at effekten af kombinationen beror på en effekt af framycetin, og man kunne anvende et breakpoint på I=8 for framycetin. Imidlertid er det muligt at der er en synergetisk effekt af de to antibiotika, og breakpoint bør være lavere for framycetin alene (i kombination med neomycin). Da det pt. ikke er muligt at få framycetin på resistenspanelet, er det pt. irrelevant at fastsætte en tolkningsværdi.

Tabel 6: Tolkingsværdier¹ for Enterobacterales fra mastitis

Antibiotika	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	WT cut-off	mode	WT cut-off	mode
Oxytetracyklin	TET ECOFF: 8		(8) ²	2
Amoxicillin	8	4	(8) ²	
Benzylpenicillin		Ikke relevant		
Cloxacillin		Ikke relevant		
Cefapirin		Ikke relevant		
Cefalexin	32	8	8 ^{2,4,5}	4 (-8)
Trimethoprim-sulfamethoxazol (1:19)	0,5	0,06 (-0,125)	0,5	0,125
Tylosin		Ikke relevant		
Lincomycin		Ikke relevant		
Streptomycin	16	8	8 ^{2,4,6}	2-4
Neomycin	8	1-2	(2) ⁵	0,5

1) Værdierne angiver højeste MIC for følsomme isolater hvis intet andet er angivet. I= MIC for isolater med intermedier følsomhed. Modus betegner den MIC-værdi, som er hyppigst forekommende. Tolkingsværdier i parentes er baseret på data fra mindre end 3 laboratorier. Tolkingsværdierne er baseret på: Blå: ECOFF, Grøn: EUCAST t- ECOFF, Gul: WTcut-off.

2) Egne projekt data 3) EUCASTdata på amoxiclav 4) EUCAST data 5) VetPath data 6) Bengtsson et al., 2009

3.6 Design af nye diagnostiske resistenspaneler

Ved design af det nye testpanel tilstræbes det at inkludere alle antibiotika, der er relevante for behandling af mastitis i Danmark (subsidiært EU). Grundet begrænset plads på panelet, må enkelte antibiotika udelades efter en prioritering ud fra væsentlighed.

I rutinediagnostikken anvendes testpaneler med 96 brønde, således at der kan testes flere antibiotika i to-folds-fortyndinger. Resultaterne (MIC fordelingerne) anvendes således også til at fastlægge hvilke fortyndinger der er nødvendige, for at resistenspanelet kan anvendes til de forskellige mastitis-bakterier. Der anvendes således 2-folds fortyndingsrækker, der er afkortet i forhold til de fortyndingsrækker der blev anvendt på projektpanelet.

Fortyndingsrækkerne på panelet skal indeholde mindst en fortynding under mode og en fortynding over de fastsatte cut-off værdier, optimalt to fortyndinger for, at der kan indsamles mere viden når panelerne bruges i diagnostikken. Idet panelet skal bruges til både Gram-positive og Gram-negative bakterier, betyder dette at de i nogle tilfælde skal bruges ret lange fortyndingsrækker

Ved prioritering af antibiotika, indgik følgende overvejelser:

- Hvilke lægemidler der mest oplagt anvendes i praksis.
- Hvilke bakterier 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.
- Mulighed for at inkludere det aktive stof på Sensititre-panelet.

Da 3.- 4. generation cefalosporiner og flourkinlone i praksis er forbudt til behandling af mastitis i DK nedprioriteres disse, om end de ville være relevante i en Europæisk kontekst. I særlige situationer (f.eks. ved påvist multiresistens) vil man stadig kunne få undersøgt for resistens overfor de udeladte antibiotika, ved anvendelse af andre paneler, eksempelvis på Veterinært Laboratorium, Kjellerup.

De konkrete overvejelser om hvilke antibiotika, der kunne være relevante på panelet, fremgår af afsnit 2.1.2. Alle antibiotika fra projektpanelet inkluderes. Endvidere inkluderes neomycin. Framycitin kan desværre ikke inkluderes, fordi det endnu ikke er tilgængeligt på Thermo Fishers paneler, men vil kunne inkluderes senere, hvis det udbydes fra producenten.

Projektgruppen anså det ikke for sandsynligt at danske dyrlæger vil begynde at importere de EU godkendte pirlimycin, nafcillin eller amoxiclav til behandling af danske køer. Endvidere bruges pirlimycin humant til vigtige infektioner, som campylobacteriose. Det blev besluttet ikke at inkludere disse stoffer på de nye mastitis panel for nuværende. Dette udelukker ikke, at de kan inddrages på et senere tidspunkt, hvis det bliver relevant, men det vil kræve, at fortyndingsrækker for andre antibiotika afkortes eller udelades.

Tabel 7 viser en oversigt over de forskellige cut-off værdier der er fastsat i studiet og de tilhørende mode værdier for de organismer som er inkluderet. Desuden er taget højde for at panelet skal kunne bruges til *E. coli*. De farvede felter angiver der forskellige bakteriers modus (hyppigste fortynding i vildtypefordelingen) og de lodrette streger angiver de fastsatte WT cut-off værdier. Det vil sige at de nye

paneler bør indeholde minimum en fortynding under de farvede felter og de lodrette streger, og helts mindst en fortynding over de lodrette streger.

Tabel 7: Oversigt over tolkningsværdier og mode for mastitisbakterier på nyt resistenspanel til mastitis

	Fortyndiger mg/L														
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Oxytetracyclin															
Amoxicillin															
Penicillin															
Cloxacillin															
Cefapirin															
Cefalexin															
Trimethoprim- Sulfonamid (1:19)															
Tylosin															
Lincomycin															
Streptomycin															
Neomycin															

NB: for streptokokker er koncentrationen det halve af det angivne, fordi der bruges dobbelt inokulationsvolumen

Farvekoder til cut-off værdier (lodrette streger) : **Grøn**: Stafylokokker **Brun**: Streptokokker **Rød**: *S.uberis* (hvor denne afviger fra *S. dysgalactiae*). Sort *K. pneumoniae*. **Fed sort**: *K. pneumoniae* sammen med nogle kokkoide bakterier. Enkelte ECOFF for *E.coli* er angivet med grå streg, hvor der ikke er sammenfald med andre cut-offs.

Farvekoder for felter=mode værdier: Grøn: Stafylokokker. Fersken: Streptokokker. Grå: *K. pneumoniae*. Skraverede felter angiver at flere bakterier har denne mode.

4. Konklusion

Formålene med projektet er opnået, idet vi har designet et nyt resistenspanel med de antibiotika, der er relevante for behandling af bovin mastitis i Danmark. Dog er det desværre ikke muligt at inkludere framycitin for nuværende, både grundet mangel på tolkningsværdi og fordi det ikke kan inkluderes på Sensititre panelet, grundet både pladsmangel og mangel på mulighed for at anvende stoffet hos ThermoFisher. Projektet omfatter designet men ikke selve udarbejdelsen (produktionen) af de nye paneler, som kan bestilles og indkøbes eksempelvis fra Thermo Fisher.

De fastlagte tolkningsværdier vil blive anvendt i forbindelse med diagnostiske undersøgelser, når de nye paneler tages i brug.

Det var oprindeligt planlagt at Center for Diagnostik DTU ville udbyde disse analyser, men dette er ikke længere en mulighed efter nedlæggelse af de veterinære aktiviteter på DTU.

Hvorvidt de nye analyser vil blive udbudt til danske dyrlæger, afhænger af de nuværende og fremtidige diagnostiske laboratorier.

Resultaterne vil søges publiceret i Dansk Veterinær Tidsskrift inden lancering af de nye analyser.

Tak til

Panchale Olsen og Jane Kensø, Laboranter, Center for Diagnostik, DTU, for en dedikeret indsats for at få alle analyserne gennemført effektivt og kvalitetssikret efter højeste faglige standard.

5. Referencer

Bengtsson B, Unnerstad HE, Ekman T, Artursson K, Nilsson-Öst M, Waller KP. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Veterinary Microbiology* 136 (2009) 142–149

Clinical Laboratory Testing and In Vitro Diagnostic Test Systems. Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices. Part 1: Reference Method for Testing the In Vitro Activity of Antimicrobial Agents Against Rapidly Growing Aerobic Bacteria Involved in Infectious Diseases. International Standard 20776-1. Geneva, Switzerland: ISO; 2019

Performance standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility test for bacteria isolated from Animals- 5th Edition. CLSI standard Vet01. ISBN 978-1-68440-008-9 Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne Pennsylvania 19087, USA, 2018.

Performance standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility test for bacteria isolated from Animals- 5th Edition. CLSI standard Vet01 S. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne Pennsylvania 19087, USA, 2020. (Online version, <http://clsivet.org/dashboard.aspx>)

CLSI 2017 M45 Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, 3rd Edition

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)

de Jong A, Garch FE, Simjee S, Moyaert H, Rose M, Youala M, Siegwart E; VetPath Study Group. Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Vet Microbiol.* 2018 Jan;213:73-81.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Distributions and ECOFFs. <https://mic.eucast.org/> (last accessed June 30, 2022) These data have been produced in part under ECDC service contracts and made available at no cost by EUCAST and can be accessed freely on the EUCAST website www.eucast.org. **Fejl! Linkreferencen er ugyldig.**

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. MIC distributions and the setting of epidemiological cut-off (ECOFF) values. EUCAST SOP 10.2, 2021. www.eucast.org/eucastsops/

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST reading guide for Broth Microdilution, Version 2.0. 2020. www.eucast.org

El Garch F, de Jong A, Simjee S, Moyaert H, Klein U, Ludwig C, Marion H, Haag-Diergarten S, Richard-Mazet A, Thomas V, Siegwart E. Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe, 2009-2012: VetPath results. *Vet Microbiol.* 2016 Oct 15; 194:11-22.

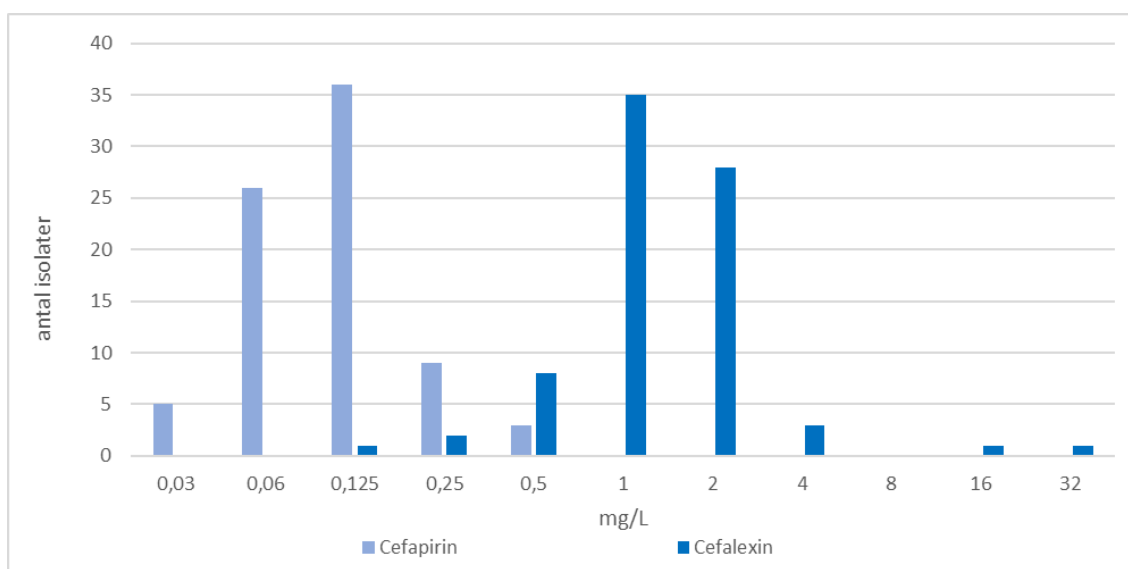
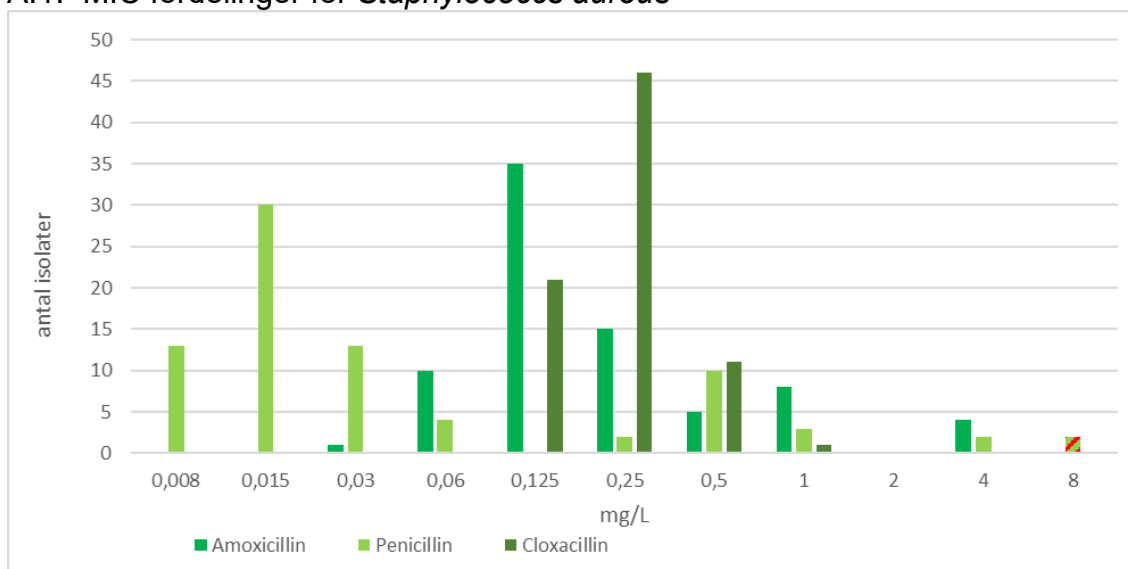
Thomas V, de Jong A, Moyaert H, Simjee S, El Garch F, Morrissey I, Marion H, Vallé M. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Jul;46(1):13-20. Turnidge J. ECOFFinder XL 2010 v2.1, <https://clsi.org/meetings/microbiology/ecoffinder/> [senest tilgået 20 juli 2021]

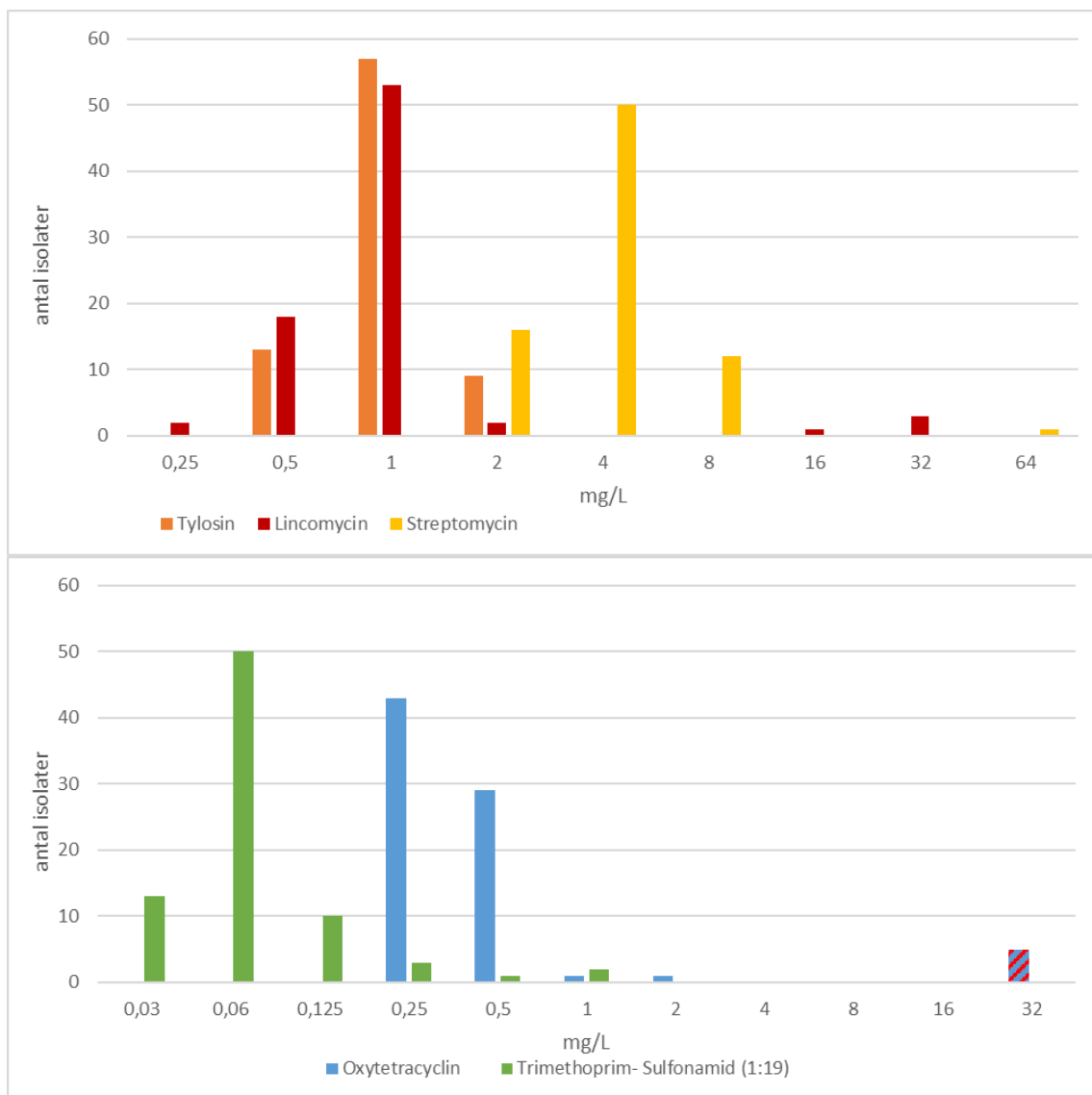
Bilag A Resultater MIC fordelinger

Nedenfor er vist MIC fordelinger fra projektet (farvede søjler), og i nogle tilfælde andre data (grå søjler) til sammenligning.

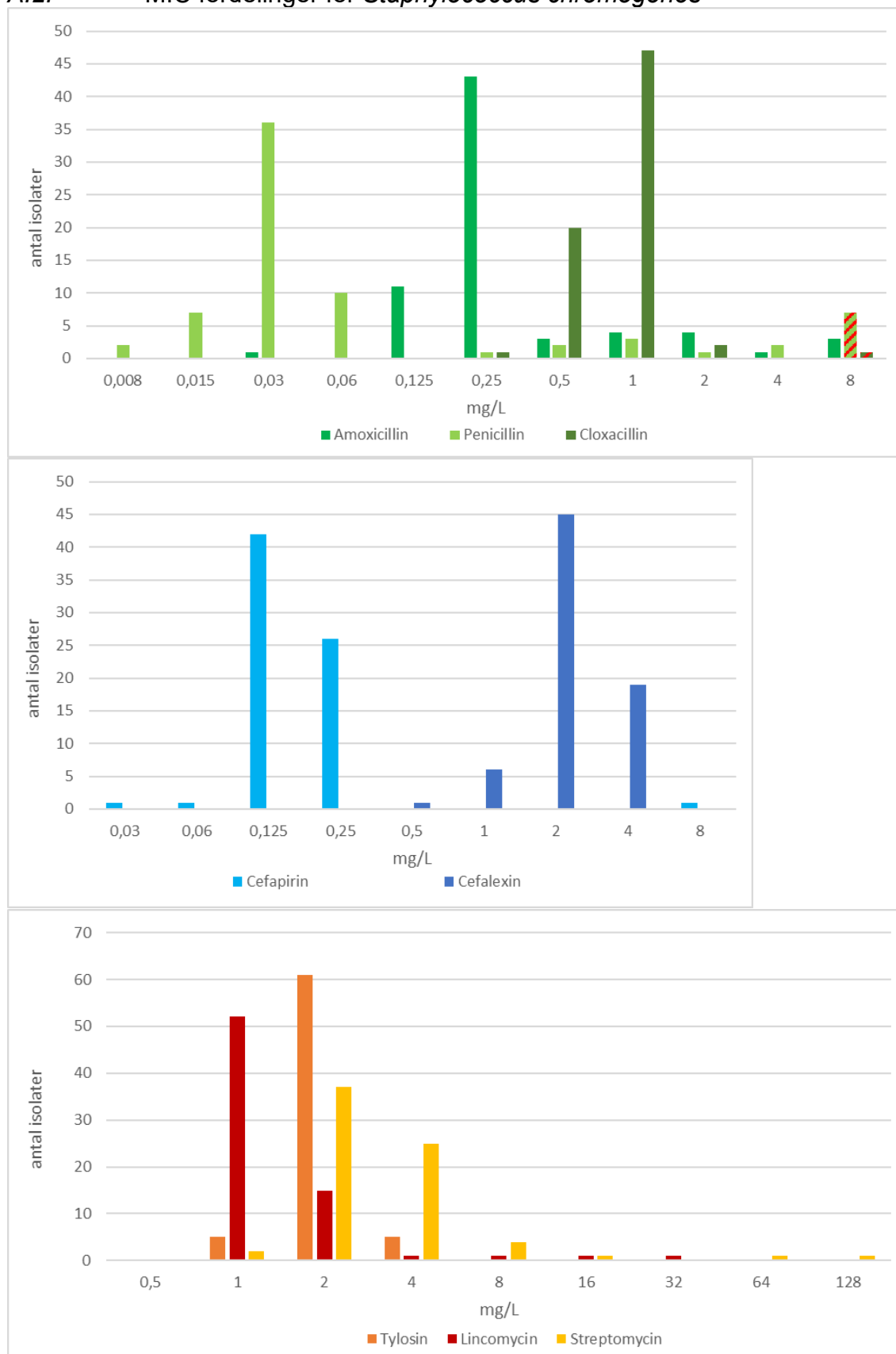
For nogle isolater falder MIC-værdierne uden for de anvendte fortyndingsrækker. For isolater med MIC-værdi under laveste fortynding angives de med laveste fortynding. For isolater med MIC-værdi over højeste fortynding, angives de med MIC-værdi et trin over øverste fortynding. **Disse akkumulerede data angives ved rød skravering i histogrammerne.**

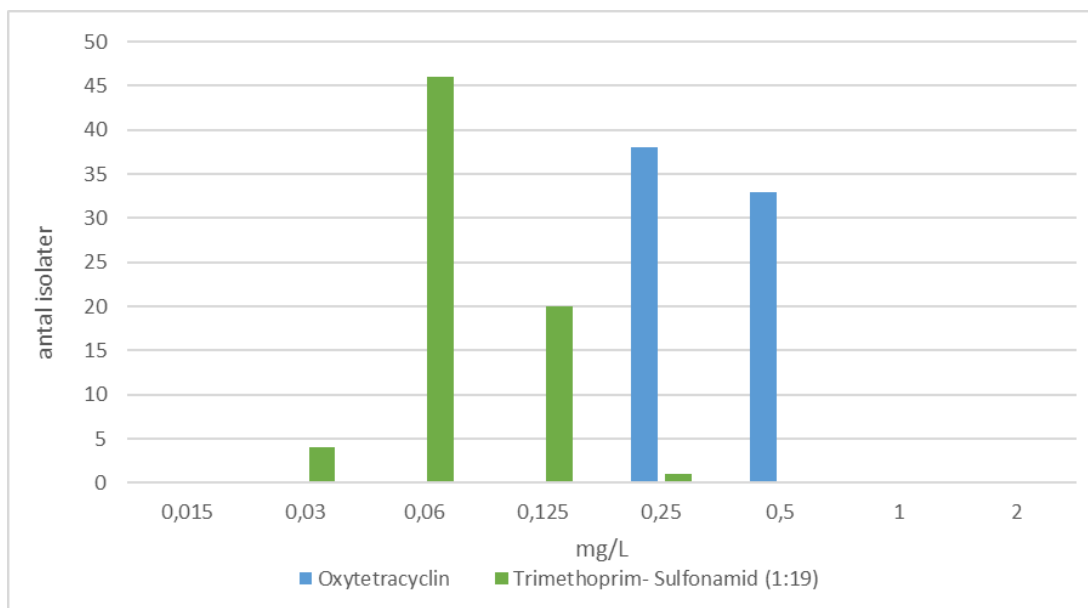
A.1. MIC fordelinger for *Staphylococcus aureus*



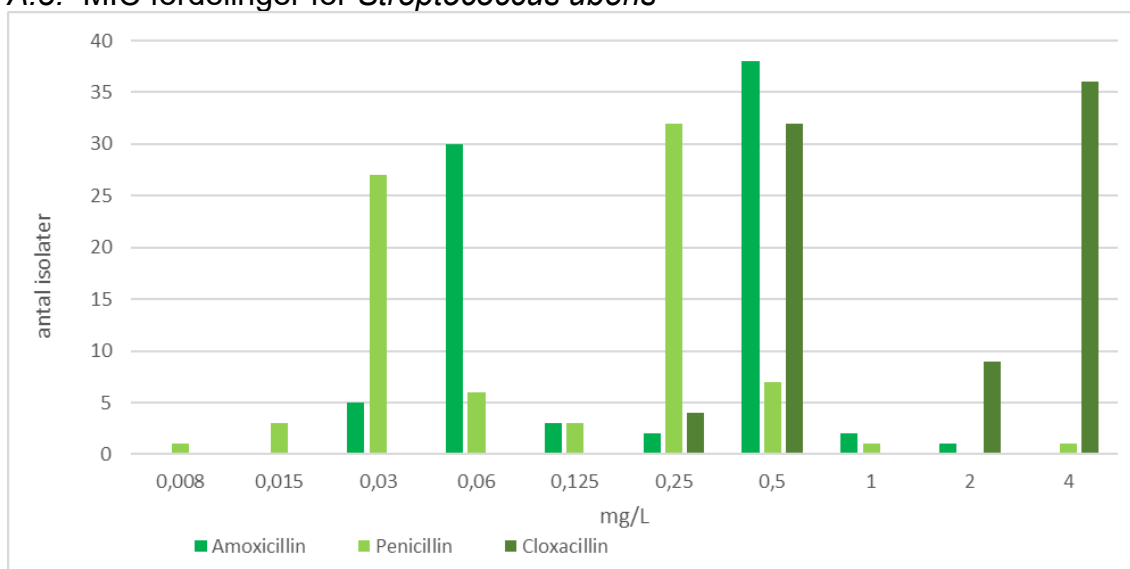


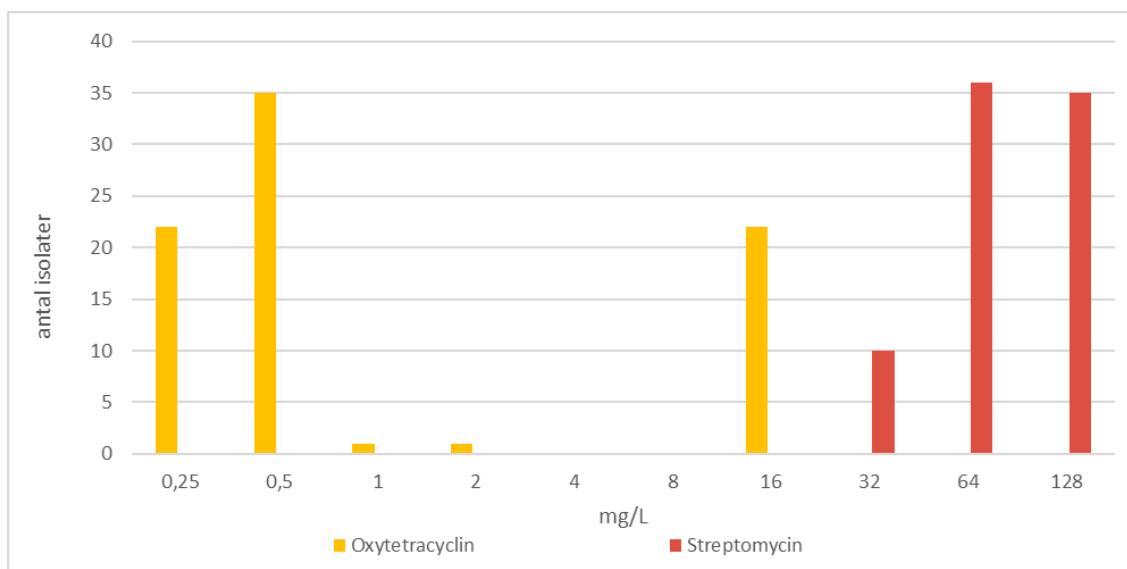
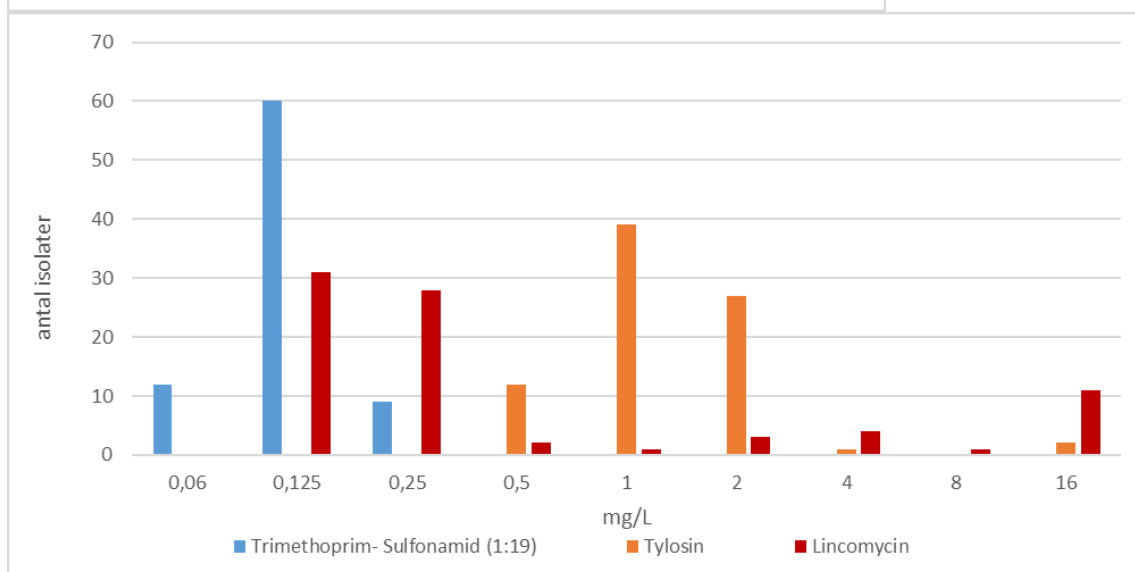
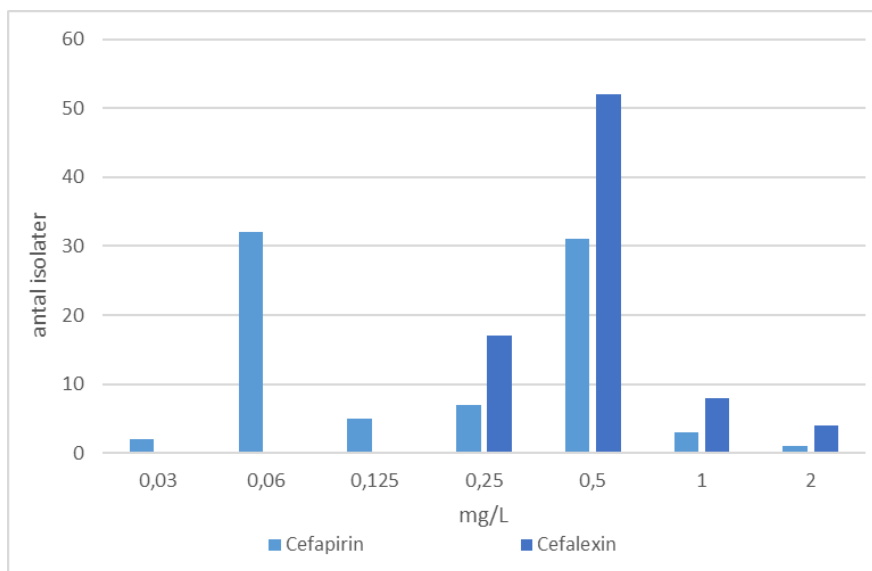
A.2. MIC fordelinger for *Staphylococcus chromogenes*



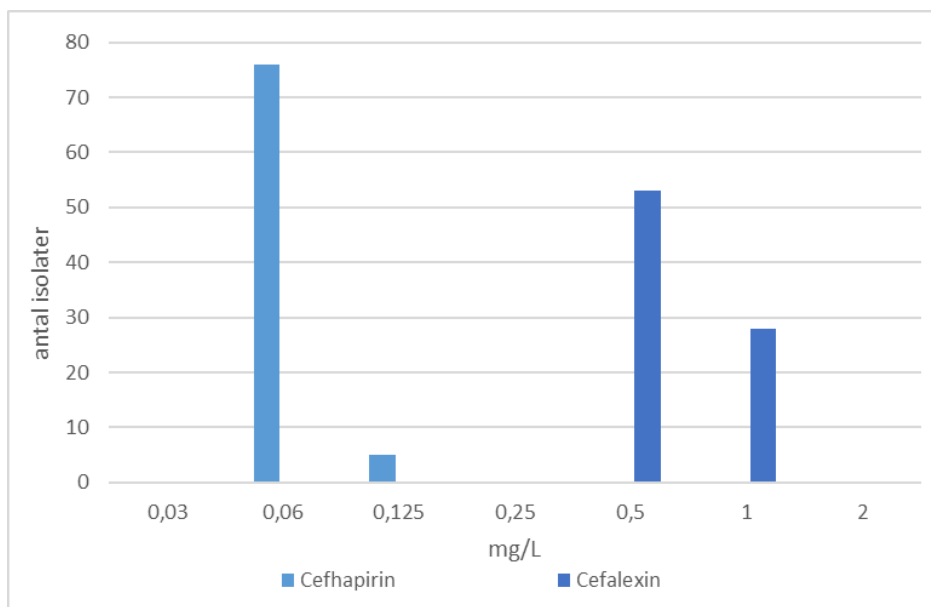
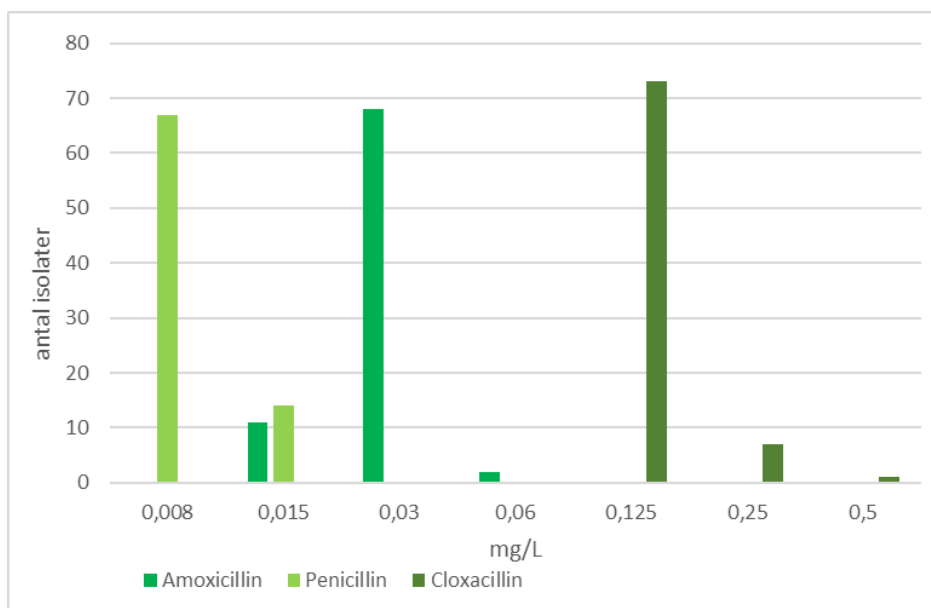


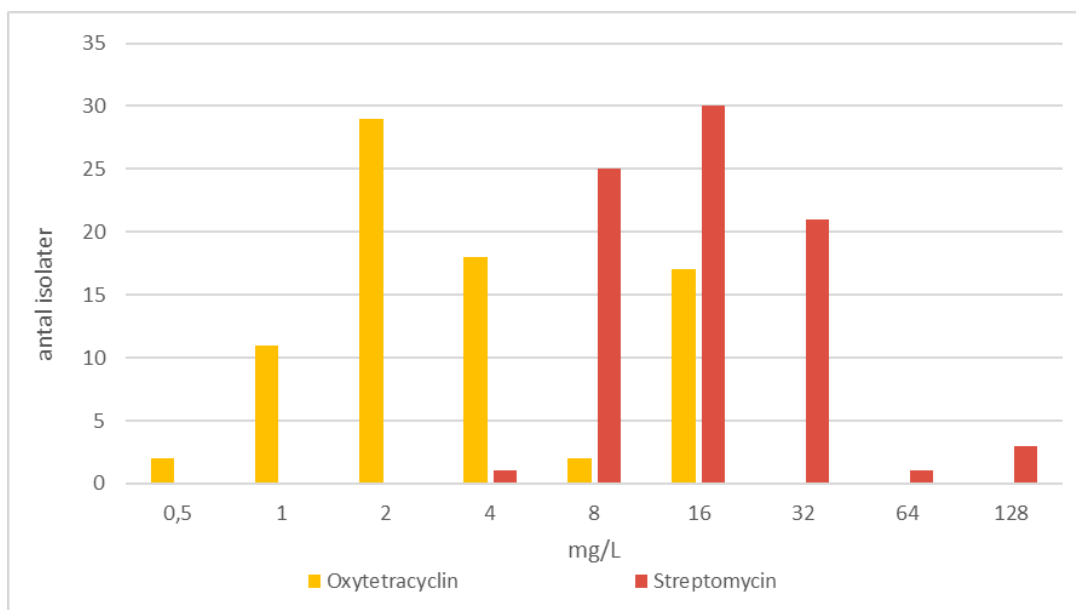
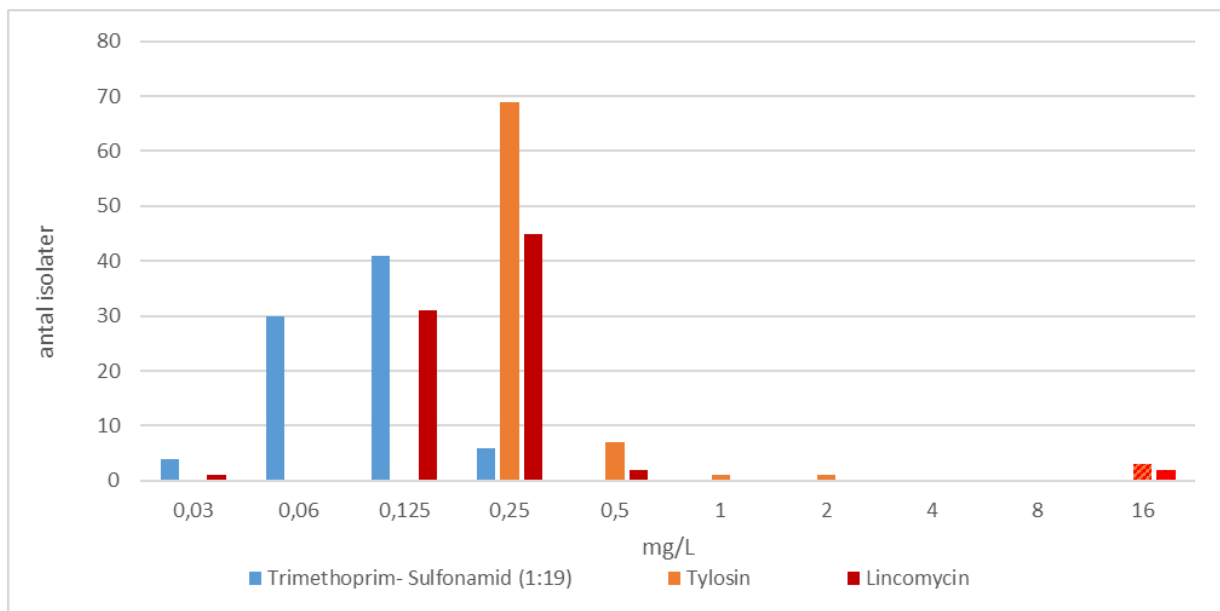
A.3. MIC fordeling for *Streptococcus uberis*



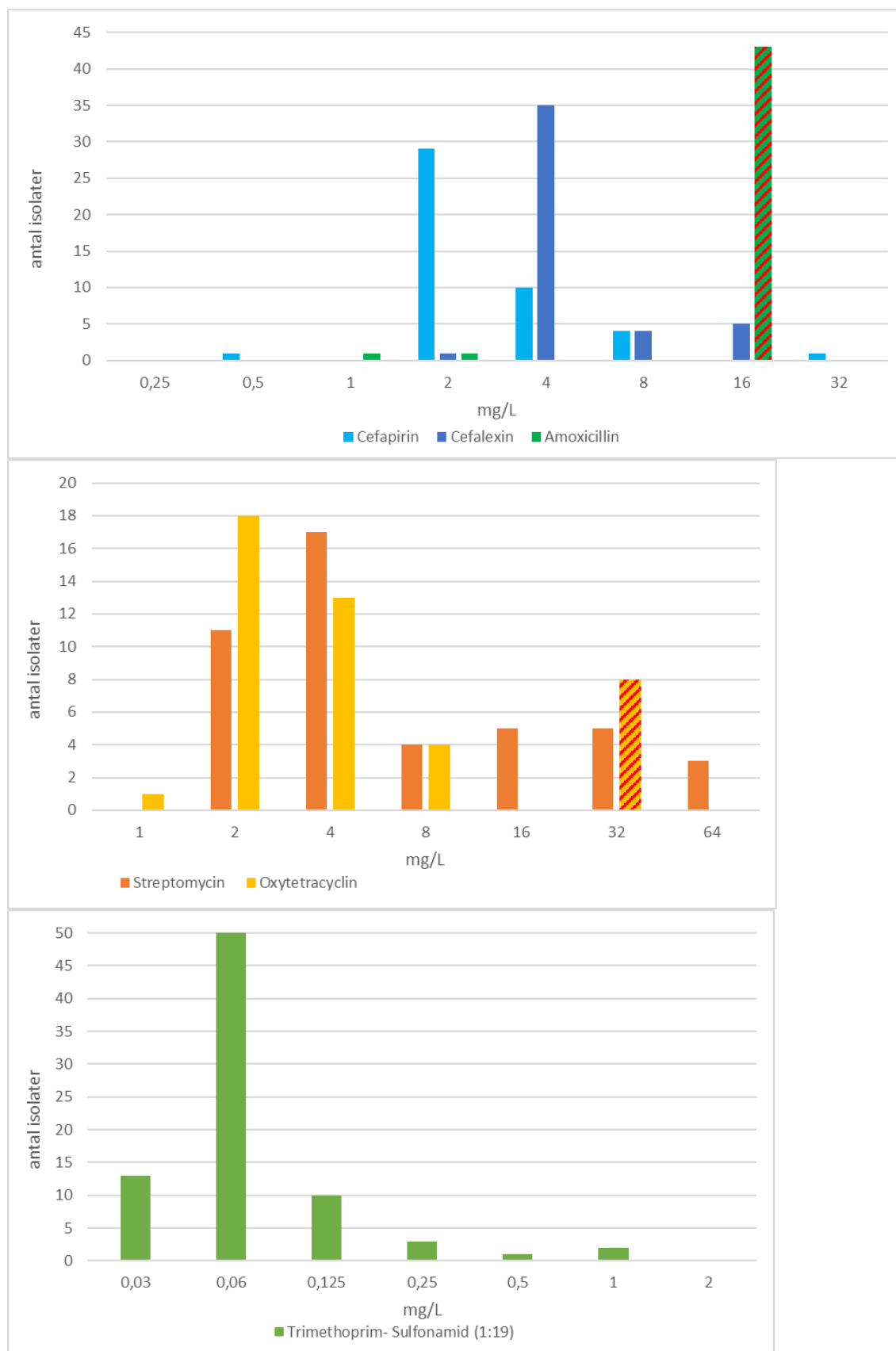


A.4. MIC fordelinger for *Streptococcus dysgalactiae*



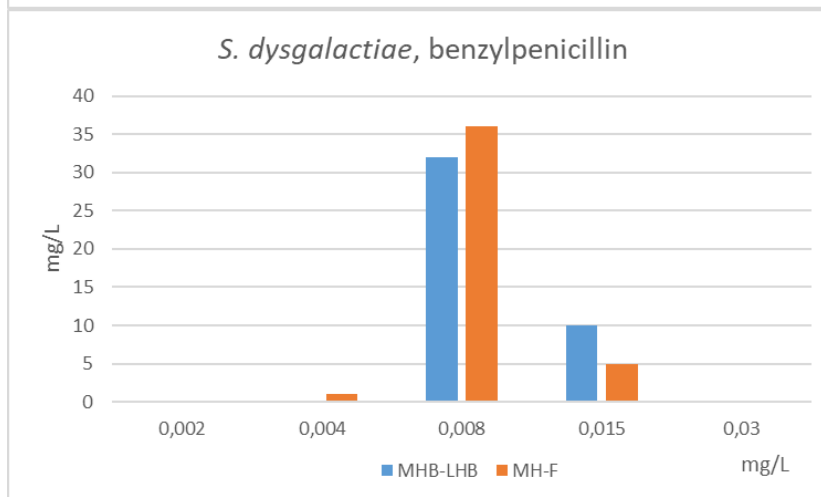
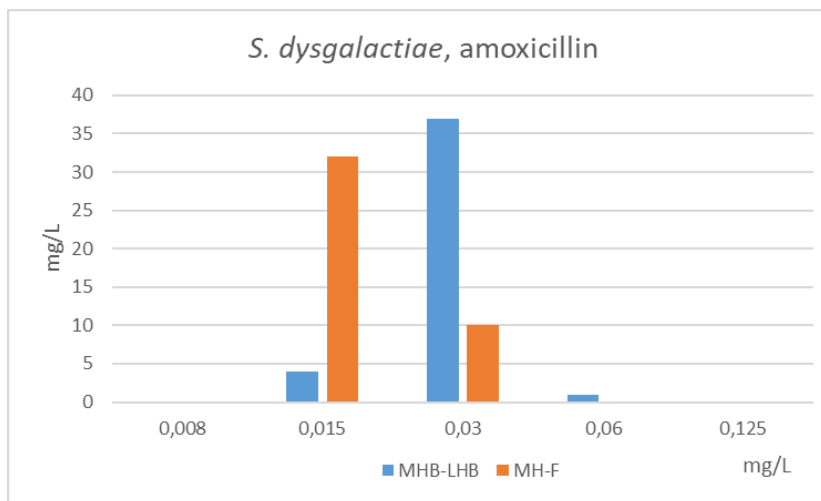
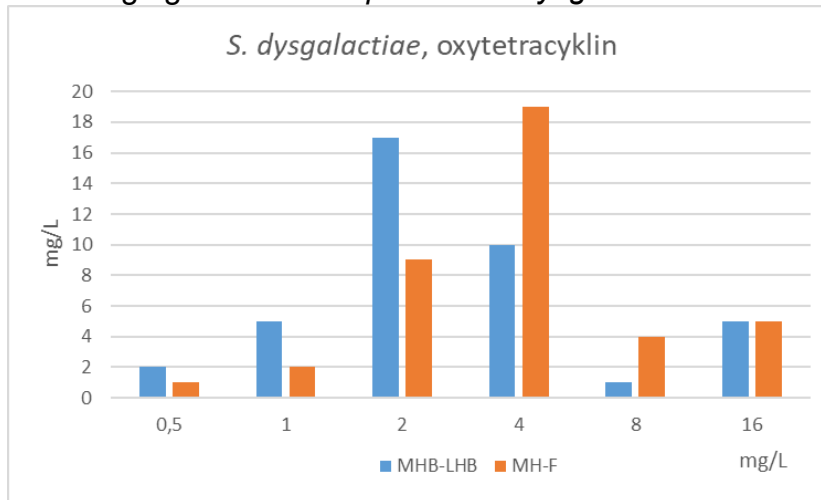


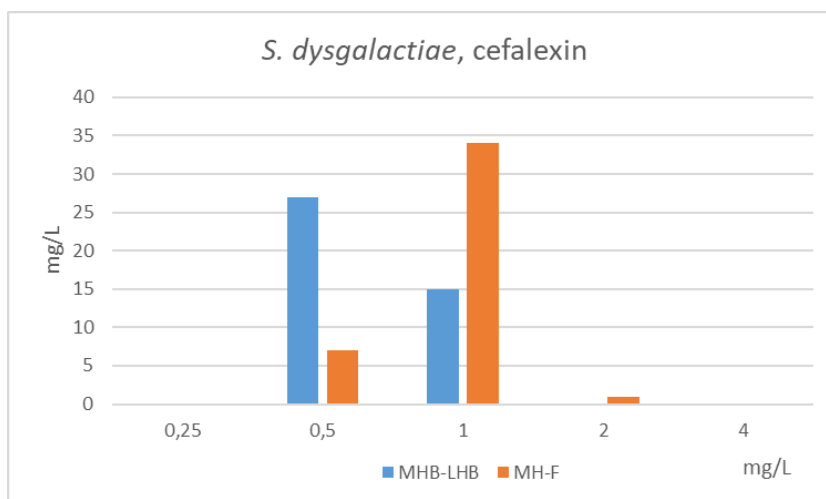
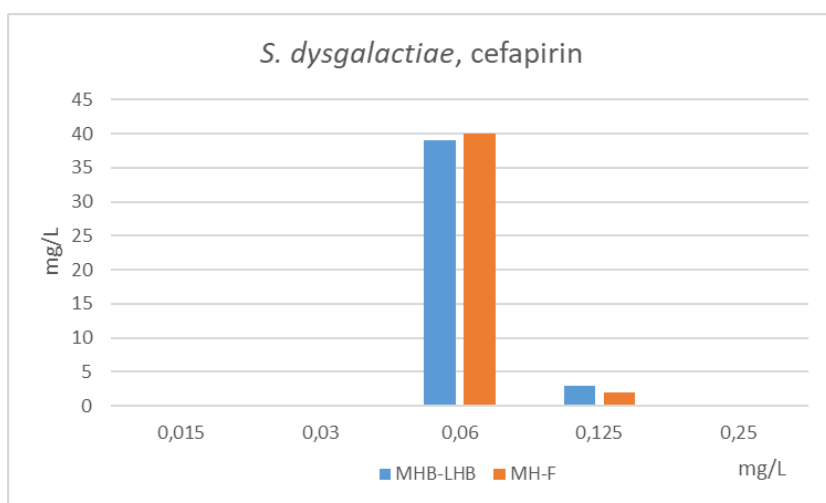
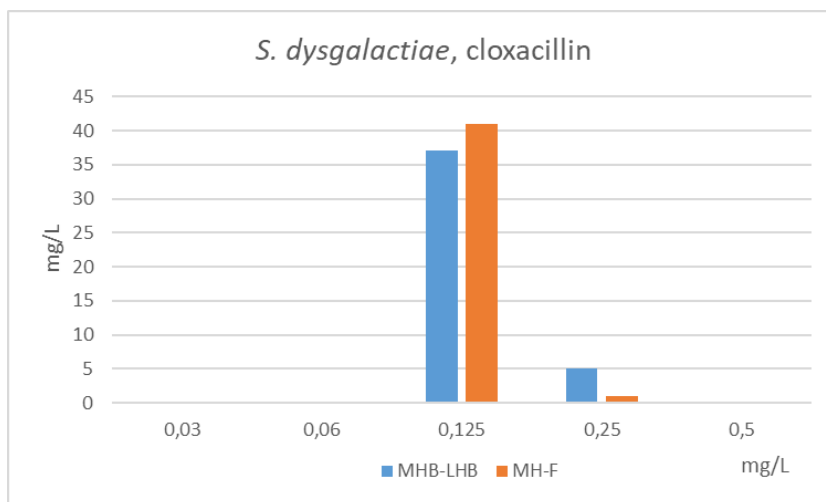
A.5. MIC fordelinger for *Klebsiella pneumoniae*

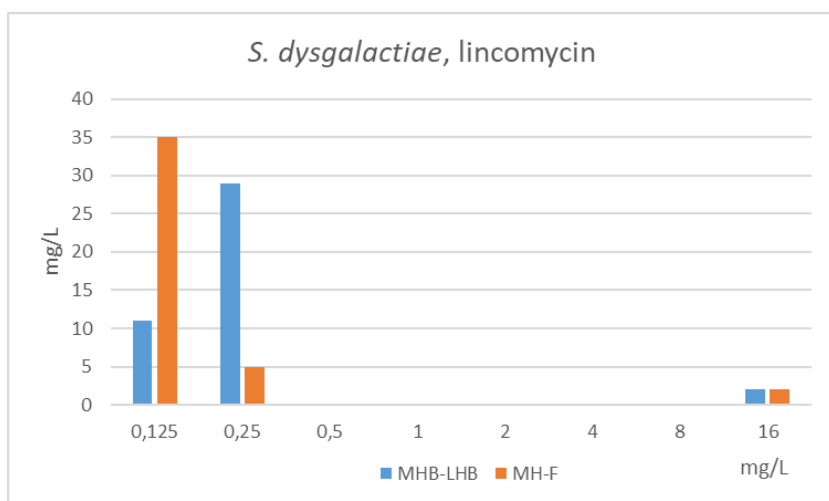
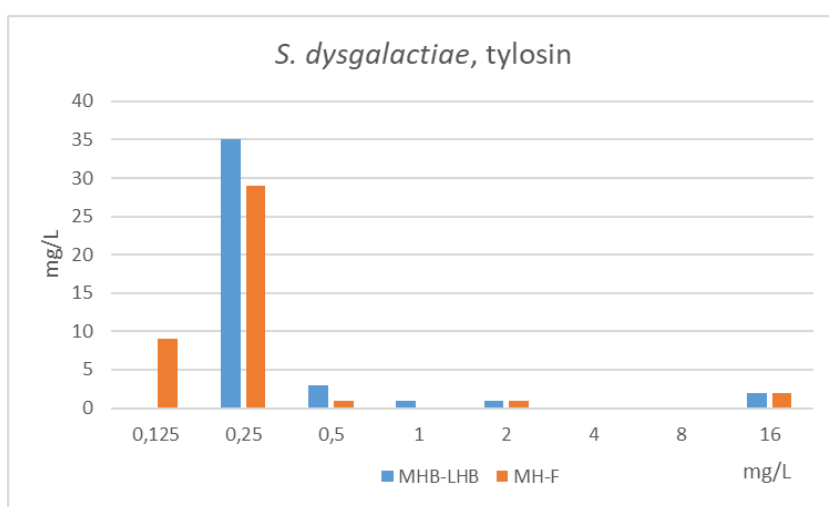
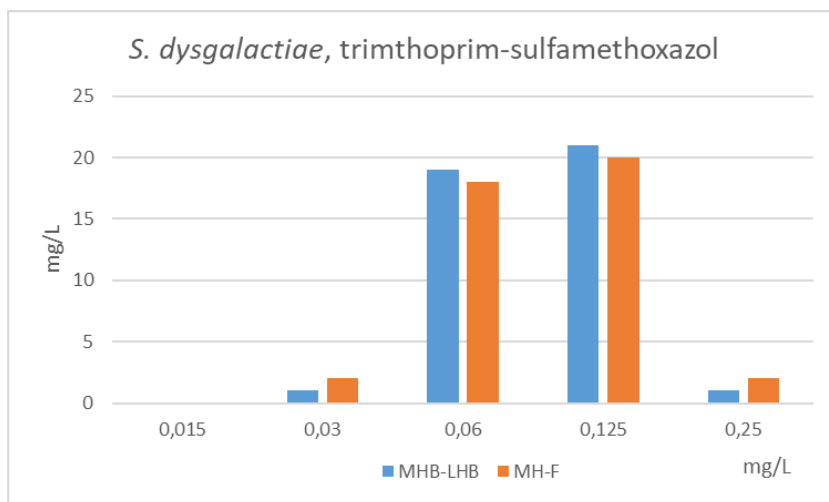


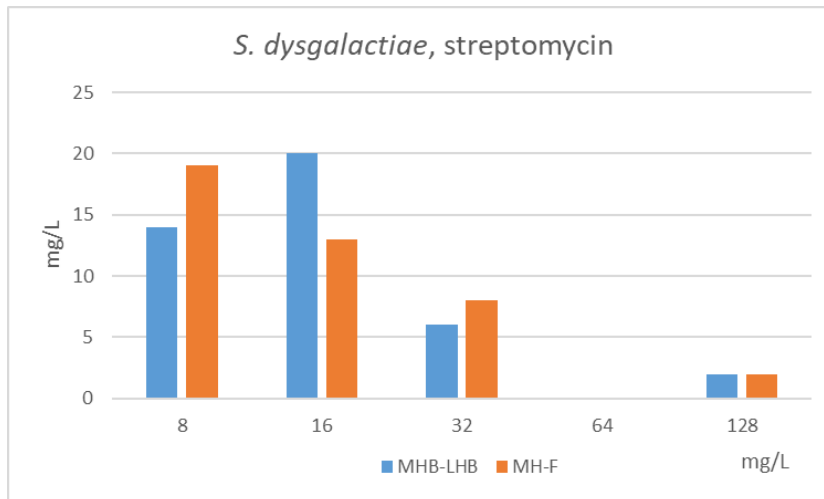
Bilag B Bridging data

B.1 Bridging data for *Streptococcus dysgalactiae*









B.2 Bridging data for *Streptococcus uberis*

