

Afrapportering fra arbejdsgruppen vedr. azolresistens

Indhold

Ordliste	4
1.0 Resume	5
2.0 Kommissorium samt arbejdsgruppens nedsættelse	11
2.1 Baggrund.....	11
2.2 Etablering af tværfaglig arbejdsgruppe	11
2.3 Arbejdsgruppens medlemmer og arbejdsproces	12
3.0 Generelt om til <i>Aspergillus fumigatus</i> og aspergillose	13
3.1 Diagnostik, behandling og overvågning	13
4. Miljø resistens hos <i>Aspergillus</i> fra patienter og fra miljøet	16
4.1 Azolresistensmekanismer i <i>A. fumigatus</i> fra patienter, der ikke er behandlet med azoler.....	16
4.2 Azol resistens i <i>A. fumigatus</i> fra miljøet i DK og globalt.....	17
4.3 Identificerede miljøer som selekterer for resistens	19
4.4 Forskellige azolers aktivitet over for <i>A. fumigatus</i>	21
5.0 Azoler – forbrug og forekomst	23
5.1 Humant.....	24
5.2 Azolanvendelse i landbruget	25
5.3 Frugtavl, gartnerier og planteskoler	28
5.3.1 Brug af azoler i gartneri-erhvervet	28
5.3.2 Brug af paclobutrazol til vækstregulering af potteplanter.....	29
5.3.3 Blomsterløg fra Holland	30
5.4 Træbeskyttelse og anden materialepræservering (biocider)	30
5.5 Veterinært	31
5.6 Kosmetikindustri.....	33
5.7 Slam (rensningsanlæg)	33
5.8 Fødevarer, herunder importerede	35
5.9 Industrikemikalier.....	36
5.10 Sammenskrivning af forbrug og eksponering.....	36
6.0 Sammenhæng mellem azolresistens og brug af azolmidler i miljøet.....	39
6.1 Behov for mere viden	40

7.0 Referencer	42
Bilag 1 Kommissorium for arbejdsgruppen	47
Bilag 2. Oversigt over humane resistent mutationer	49
Bilag 3. Foreløbig status over den nationale Aspergillus overvågning per 21/12 2018	51
Bilag 4. Resumé af abstract indsendt til ECCMID omfattende studie fra SSI og Rigshospitalet for CF patienter	53
Bilag 5. Notat om landbrugets indsats ift. resistensudvikling og beskrivelse af hvilke alternativer der er til kemisk bekæmpelse	54

Ordliste

ADI: Acceptabelt dagligt indtag.

Azoler: Er en gruppe svampemidler, kendetegnet ved at deres molekyle indeholder en azolring (6 kantet ring af kulstof og kvælstof). De virker svampehæmmende ved at hæmme dannelsen af en vigtig komponent (ergosterol) i svampens cellemembran. Azoler anvendes i humanmedicin, veterinært, landbrug og til materiale beskyttelse/imprægnering og omtales per tradition henholdsvis azoler, azol fungicider og azol biocider i hver af disse tre sektorer.

Biocid: Biocider er en betegnelse for stoffer, der giver en kemisk beskyttelse af mennesker, dyr, vand, overflader, materialer eller produkter mod skadegørere som fx skadedyr, bakterier, svampe eller andre uønskede organismer. For mere information se <https://mst.dk/kemi/biocider/>.

DMI fungicider: andet navn for azol-gruppen af fungicider som dækker over demethylation inhibitors, også kaldet sterol biosynthesis inhibitorer (SBI).

EC50 Værdier: Koncentrationer, som hæmmer væksten af svampe med 50% i *in vitro* forsøg udført i laboratorier.

Fungicid: (svampemiddel) stoffer der kan bruges til at bekæmpe svampe.

Hazard Quotienter: Hazard Index-metoden (HI) kan bruges til at risikovurdere det kumulative kroniske indtag for stoffer med samme type effekt. Ved HI metoden beregnes en hazard kvotient (HQ) for hvert stof, dvs. forholdet mellem eksponering og stoffets ADI. Ved at summere HQ for hvert stof fås HI. En HI < 1 (eller 100 %) indikerer, at der ikke er en sundhedsmæssig risiko ved indtag af de fundne stoffer samtidigt.

MIC: Minimum inhibition concentration = koncentration der som minimum skal til for at hæmme en mikroorganisme i laboratorieforsøg.

Pesticid: Er betegnelsen for stoffer, der er beregnet til at bekæmpe for eksempel planter, insekter, svampe, gnavere og andre organismer, der opfattes som skadelige for planter. For mere information se <https://mst.dk/kemi/pesticider/>.

Polymeriserede materialer: En polymer (polymeriseret material) er en naturlig (fx gummi) eller syntetisk (fx plastik) forbindelse, som er dannet ved at mange identiske enheder er sammenføjet.

TR₃₄/L98H: Miljøresistent *A. fumigatus* variant. Dette er den hyppigst forekommende azol-resistente miljøvariant. Betegnelsen afspejler resistensmekanismen i svampen (TR₃₄ står for Tandem Repeat, dvs. en duplikering i *CYP51A* genet af 34 basepar, og L98H for en udskiftning af aminosyren Leucin med Histidin på position nr. 98).

TR₄₆/Y121F/T289A: Miljøresistent *A. fumigatus* variant. Dette er den næst hyppigst forekommende azol-resistente miljøvariant. Betegnelsen afspejler resistensmekanismen i svampen (TR₄₆ står for Tandem Repeat, dvs. en duplikering i *CYP51A* genet af 46 basepar, og Y121F/T289A for aminosyrer udskiftninger på to positioner nr. 121 og 289).

1.0 Resume

Generelt om Aspergillus og A. fumigatus

Aspergillus fumigatus (*A. fumigatus*) er kendt som en almindelig og udbredt svamp i naturen. Den findes typisk i jord og på organiske materiale, som f.eks. kompost, hvor den spiller en vigtig rolle for nedbrydning af organisk materiale. Svampen er normalt harmløs for mennesker, men kan hos patienter med lavt immunforsvar og visse kroniske lungesygdomme give anledning til sygdomme i lunger og andre organer (aspergillose).

Aspergillose er ikke en smitsom sygdom, der spreder sig fra patient til patient, men en sygdom man kan få ved at indånde svampesporer. Tal fra 2011 viser, at den alvorligste form, invasiv aspergillose, rammer ca. 50-60 personer om året i Danmark.

Azoler og azolresistens

Ved forebyggelse og behandling af aspergillusinfektioner inden for humanmedicin anvendes først og fremmest azollægemidler, da de er mest effektive. Således er overlevelsesraten ved behandling af invasiv aspergillose omkring 70% ved azolbehandling, mens den kun er 50-65% ved behandling med andre svampemidler.

Azoler anvendes herudover til behandling af en række andre svampeinfektioner hos mennesker samt til bekæmpelse af svampeinfektioner inden for andre sektorer. Det drejer sig om landbruget, hvor de benyttes som fungicider til bekæmpelse af plantesygdomme og i industrien som biocider i forbindelse med materialepræservering (fx træbeskyttelse). Derudover anvendes azoler bl.a. i veterinærlægemidler, industrikemikalier og i kosmetik. *A. fumigatus* kan således komme i kontakt med azoler på flere måder.

Hyppig eller længerevarende brug af azoler kan føre til udvikling af azolresistens, hvorved de ikke længere kan bruges til behandling af infektioner forårsaget af azolresistente *A. fumigatus*. Azolresistens i *A. fumigatus* forekommer hos patienter efter langvarig behandling med azollægemidler, hvor det oftest kommer til udtryk via forskellige mutationer i genet for azolernes angrebepunkt (CYP51A), men andre mekanismer findes også. Baseret på mutationer i Cyp51A genet hos *A. fumigatus* kan gensekventering vise, hvilken slags resistens der er tale om, herunder om resistensen omfatter et, flere eller alle medicinske azoler. Udvikling af azolresistens er også kendt fra landbruget, hvor flere plantepatogene svampe har vist forskellig grad af resistens efter år med sprøjtning med azol-fungicider.

Azolresistens hos ikke tidligere behandlede patienter

Der er inden for de seneste 10-15 år i flere tilfælde også fundet azolresistens hos patienter uden forudgående anvendelse af medicinske azoler (azolnaive patienter). Samtidigt har man fundet en række karakteristiske resistenskendetegn, de såkaldte miljømutationer (TR₃₄/L98H - den hyppigste og TR₄₆/Y121F/T289A - den næsthypigste), både i resistente *A. fumigatus* fra azolnaive patienter og i resistente *A. fumigatus* fra miljøet. Dette indikerer, at patienterne har inhaleret *A. fumigatus* sporer, som

har udviklet azolresistens i miljøet. Desuden er det vist, at miljøresistente *A. fumigatus* isolater er stabile i miljøet og ikke umiddelbart forsvinder, når de ikke længere udsættes for azoler. Der kan således ske en løbende akkumulering i miljøet af resistent *A. fumigatus*. Dette harmonerer med resistensundersøgelser inden for plantepatogene svampe. Selektionen for specifikke azol-mutationer varierer for de forskellige azoler-fungicider, men azolresistens har generelt vist sig stabil hos forskellige plantepatogene svampe.

I Danmark har problemstillingen med azolresistens hos *A. fumigatus* ikke været undersøgt systematisk. I 2018 blev det besluttet at indføre national overvågning for azolresistens, og foreløbige tal fra denne overvågning (sep. – nov. 2018) viser, at der blev påvist azolresistens hos 10/135 patienter (7,4%). Tidligere – ikke systematisk indsamlede - data viste resistens hos 2,9% af patienterne i perioden 2010-2013 og 4,7% i perioden 2014-2017. Selvom tallene ikke er direkte sammenlignelige, synes der at være en opadgående tendens.

Dette bekræftes også af en endnu upubliceret undersøgelse omfattende patienter med den kroniske lungesygdom Cystisk Fibrose (CF) fulgt på Rigshospitalet første halvår af 2018. Her blev der fundet azolresistens i *A. fumigatus* hos 10 ud af 109 patienter svarende til 9,2%. Det er forventeligt, at der påvises mere resistens i denne gruppe, da de behandles med azollægemedler.

Studiet er det første med sammenlignelige danske tal, da samme patientgruppe blev undersøgt i 2007-2009. Andelen af patienter med resistent *A. fumigatus* bestemt ved påvisning af mutationer i CYP51A genet, var 4,6 % i 2018 mod 3,8 % i 2007-2009.

Miljøresistens i A. fumigatus – forekomst og mulig fremkomst

I forhold til den såkaldte miljøresistens kunne tallene fra den danske nationale overvågning i 2018 påvise miljøresistensmekanismen i 5/10 af de azol resistente *A. fumigatus* isolater.

I det upublicerede studie fra Rigshospitalet sås miljøresistens hos 4 ud af 109 patienter (3,7%) i 2018 mod 2 ud af 133 patienter (1,5%) i 2007-2009. I studiet fandt man også en ny miljøresistens type (TR₃₄³/L98H), der ikke tidligere er påvist i Danmark.

I Holland – som er det eneste andet land med national overvågning – ses i dag miljøresistens i op til 30% af patientprøverne. Dette har medført, at behandlingsanbefalingerne for en Aspergillusinfektion er ændret. I stedet for at have voriconazole som førstevalgsbehandling, anbefales nu indledende behandling med både voriconazole og caspofungin, indtil analyser har vist, om infektionen skyldes en *A. fumigatus*, der kan behandles med azoler.

I forhold til fremkomsten af de miljøresistentetyper af *A. fumigatus*, er der en undersøgelse der viser, at der er store ligheder mellem nogle af de medicinske azoler og de azoler, der anvendes i fx landbruget. Laboratorieforsøg har vist, at i hvert fald 5 fungicid-azoler har effekt på *A. fumigatus* i en grad, som er sammenlignelig med de medicinske azoler. Disse stoffer har samtidigt ingen virkning på den hyppigst forekommende (og mest velundersøgte) azol-resistente miljø-variant af *A. fumigatus* (TR₃₄/L98H). Yderligere er det vist, at disse 5 azol-fungicider passer godt i det aktive virkningssted for azoler i *A. fumigatus* svampen. Konkret drejer det sig om stofferne:

- propiconazol
- tebuconazol,
- difenonazol,
- epoxiconazol
- bromuconazol (ikke godkendt i Danmark)

Dette viser, at de 5 fungicider kan være årsag til fremkomsten af den første miljøresistente *A. fumigatus* type (TR₃₄/L98H). Der er større usikkerhed om flere af de andre azolers effekter og selektionsmønstre for resistens, da detaljerede studier kun er udført i begrænset omfang for disse. Stoffet propiconazol forbydes som pesticid i EU efter 2019 sæsonen, men anvendelsen af stoffet som biocid vil fortsat være tilladt.

Forbrug og forekomst af azolforbindelser i miljøet

I dansk **landbrug** anvendes aktivstofferne tebuconazol, propiconazol, epoxiconazol, difenoconazol, prothioconazol og metconanzol samt imazalil og paclobutrazol. Azolerne har været anvendt siden slutningen af 1970'erne og har i ca. 40 år været den mest anvendte gruppe af fungicider til bekæmpelse af forskellige tabsgivende svampesygdomme. Siden 2013 har prothioconazol været mest anvendt. Dette azol er ikke associeret med mulig selektion for resistent *A. fumigatus* af typen TR₃₄/L98H, mens det ikke vides, hvilken effekt dette aktivstof har i forhold til de andre miljømutationer.

Der har over en 10-årig periode været en fordobling af forbruget af azol-fungicider i landbruget. I de seneste par år har forbruget ligget på omkring 200 tons/år. De seneste års stigning skal ses i sammenhæng med resistensudvikling hos en række af de vigtigste plantesygdomme over for et af de kemiske alternativer – strobilurinerne. Nye fungicidgrupper er under udvikling, men disse anvendes overvejende i kombination med azoler for at mindske resistensudvikling over for de nye midler. Der arbejdes generelt meget med at reducere pesticidforbruget og finde alternativer til anvendelsen af fungicider. Der findes dog ikke fuldgældige alternativer, og med den nuværende viden anslås det, at der vil være et årligt gennemsnitlig tab på ca. 680 millioner DKK, såfremt man ikke har azoler til rådighed i landbruget. Afhængigt af afgrøden er der typisk tale om et tab på mellem 100-500 kr./ha.

Anvendelsen af azoler i **gartnerierhvervet** er forholdsvis begrænset, og her anvendes hovedsageligt difenoconazol. Paclobutrazol er et vækstreguleringsmiddel, og må kun anvendes til vækstregulering af pryddplanter i væksthuse. Det er vist, at paclobutrazol ikke er særligt aktivt over for *A. fumigatus* i de anvendte koncentrationer.

Inden for **materialepræservering** anvendes azolerne propiconazol og tebuconazol som biocider til træbeskyttelse imod råd og svampeangreb. På dette område vurderes det, at der ikke umiddelbart er alternativer til denne anvendelse. Generelt er der sket en mindre stigning i forbruget af produkter med propiconazol, mens produkter med tebuconazol har været mere stabilt med et mindre fald. Azolerne må også anvendes som konserveringsmiddel til overfladefilm, dvs. produkttype 7 (jf. Biocidforordningen (EU) 528/2012). Der udover er propiconazol godkendt til beskyttelse af fibermaterialer eller polymeriserede materialer, og tebuconazol er godkendt til beskyttelse af murværk, kompositmaterialer og andre byggematerialer. For disse materialer er der dog ingen tilgængelig statistik.

På det **veterinærmedicinske område** anvendes 5 azoler, der er identiske med humane azollægemedler, hvor kun stoffet itraconazol også er vigtigt til at behandle humane *A. fumigatus* infektioner. Generelt er der tale om et stigende forbrug, dog er den veterinære anvendelse af itraconazol meget begrænset. Til gengæld anvendes de azolholdige lægemidler primært til hobbydyr, hvor der er tæt kontakt med mennesker (hund, kat og hest), men der er ikke nogen viden om, til hvilke behandlinger produkterne anvendes (herunder om det er sandsynligt, at de kommer i kontakt med *A. fumigatus*), da dyrlæger ikke er forpligtet til at indberette oplysninger om anvendelse eller udlevering af medicin til ikke-produktionsdyr. *A. fumigatus* er dog ikke en del af hverken menneskers eller dyrs normale mikroflora, men der er fra udlandet flere eksempler på, at *A. fumigatus* kan angribe lungerne hos husdyr – bl.a. hos høns og kalkuner.

Azolerne anvendes også inden for andre områder bl.a. i **kosmetik** og i **industrikemikalier** (som kemisk stof). I kosmetiske produkter er det kun tilladt at anvende ét enkelt azolprodukt, Climbazole. Det vides ikke, om Climbazole har nogen selektiv effekt over for *A. fumigatus*.

Anvendelser som industrikemikalier er ikke omfattet af godkendelses- og registreringspligt, hvorfor der ikke her findes opgørelser over, hvilke azolforbindelser, der anvendes eller i hvor store mængder. Bl.a. er 1,2,4-triazol et udbredt industrikemikalie, og det kan ikke udelukkes, at anvendelsen kan føre til eksponering i miljøet. Det er ikke kendt, om 1,2,4-triazol potentielt er aktivt over for *A. fumigatus*, og på den vis kan ses, som en kilde til selektion for resistens.

Som følge af den alsidige anvendelse af azoler kan restkoncentrationer forventeligt findes i miljøet og i lave restkoncentrationer på **fødevarer**. En lang række forskellige azolforbindelser er fundet som restkoncentrationer i fødevarer på det danske marked, hvor tebuconazol og difenoconazol står for hhv. ca. 43 % og 46 % af den samlede fødevareeksponering af børn (4-6 år) og voksne (15-75 år) for triazoler i perioden 2012-17.

Udenlandske undersøgelser viser fund af azoler, herunder tebuconazol, i rensningsanlæg. Der kan derfor ikke udelukkes, at stofferne også er til stede i **spildevandsslam**, der i Danmark bl.a. spredes på marker. Der er ikke foretaget danske undersøgelser af azol-restindhold i danske rensningsanlæg og/eller spildevandsslam.

Der er manglende viden om, hvilke erhvervsmæssige anvendelser, der er mest kritiske i forhold til udvikling af de såkaldte miljømutationer. I Danmark er der foreløbig kun udført 3 miljøundersøgelser, hvor man i 2011 fandt azolresistent TR₃₄/L98H *A. fumigatus* isolater i 8% af de undersøgte jordprøver (fra Tivoli og jorde omkring Rigshospitalet), men ikke i indkøbt kompost og pottemuldssække. Man har desuden gjort enkelte fund af resistente *A. fumigatus* i luftprøver. Fra udlandet findes der flere eksempler på fund af resistente *A. fumigatus* fra indsamlede jord og luftprøver – fortrinsvist udtaget i sommerhalvåret.

Et hollandsk forskerteam har identificeret en række "Hot spots", hvor risikoen for resistensudvikling er særlig høj. Undersøgelsen konkluderer, at den største risiko for udvikling af resistens i Holland findes i kompost miljøer, hvor kompost fra blomsterløg og blomsterblade, træfliskompost og grønne kompostbunker har vist høje forekomster af *A. fumigatus*, fund af miljømutationer hos svampen, og af restkoncentrationer af azoler i plantematerialet. I Holland dyppes og sprøjtes blomsterløg med azoler under dyrkning for at bekæmpe forskellige sygdomme.

En undersøgelse har testet effekten af at varmebehandle komposten for at nedbringe *A. fumigatus* risikoen. Dette viste, at andelen af resistente isolater kunne nedsættes betydeligt.

Den store globale handel med blomsterløg og planter kan være medvirkende til spredning af resistente *A. fumigatus*. Undersøgelser fra Irland har vist, at hollandske blomsterløg på planteskoler indeholdt sådanne *A. fumigatus* miljømutanter.

Danmark importerede i 2017 2.670 tons blomsterløg fra Holland svarende til 84% af den samlede import. Der findes ingen danske undersøgelser, der viser om hollandske løg indeholder miljøresistente *A. fumigatus* svampe.

I forhold til markbrug af azoler er der en artikel, der argumenterer for, at de koncentrationer af azolmidler, der anvendes i de åbne landbrugsarealer er for lave til at bidrage til en væsentlig selektion af mutationer. Også her er der ingen danske studier, som kan afkræfte eller bekræfte rigtigheden af dette.

Arbejdsgruppens vurdering af nuværende viden og behovet for mere viden

På baggrund af den nuværende viden er det arbejdsgruppens opfattelse, at der er dokumenteret en sammenhæng mellem anvendelsen af azolmidler i miljøet og den udvikling af azolresistens, på baggrund af miljømutationer, der er konstateret hos *A. fumigatus* hos patienter. Samtidig ser der ud til at være en stigende forekomst af azolresistens – både som følge af behandling med azollægemedler og miljøresistens. De to former for resistens er imidlertid meget forskellige problemstillinger. Resistens opstået som følge af intensiv medicinsk behandling er en forudsigelig konsekvens ved relevant behandling af den meget syge, men afgrænsede gruppe af patienter, det vedrører.

Det kan også konstateres, at resistensen ikke ser ud til at forsvinde (de resistente isolater er stabile i miljøet), selvom brugen af azoler begrænses.

Arbejdsgruppen konstaterer samtidig, at azolresistens er et begrænset folkesundhedsmæssigt problem i Danmark. Infektioner med *Aspergillus* er relativt sjældne, de fleste kan fortsat behandles med de anbefalede lægemidler, og infektionerne spreder sig ikke som smitte fra person til person.

For de enkelte patienter, der erhverver en resistent *A. fumigatus*, kan konsekvensen dog være meget alvorlig. Infektioner med *Aspergillus* rammer patienter, der i forvejen har dårligt immunforsvar. De alternativer til azolmidler, der findes, giver mange bivirkninger og er ikke lige så effektive. Udenlandske studier viser, at dødeligheden ved infektion med en resistent *A. fumigatus* kan stige til omkring 80-100%, svarende til niveauet før azollægemedlerne blev introduceret med mindre man som i Holland ændrer i behandlingsvejledningerne. I Holland indgår i dag således både voriconazol og de mindre effektive stoffer i en indledende kombinationsbehandling.

Problemstillingen omkring azolresistente *A. fumigatus*, herunder den særlige miljøtype, har indtil videre primært været behandlet i Holland og på videnskabeligt plan. Arbejdsgruppen konstaterer dog, at fire ud af de fem fungicider, der udpeges som kritiske i forhold til udvikling af miljømutationer, også anvendes i Danmark, herunder i betydelig udstrækning inden for forskellige anvendelser i landbrug og gartneri. Siden 2013 har en stor andel af azol- fungiciderne indeholdt prothioconazol, der ikke p.t. er associeret med nogen kendt selektion for miljømutationer, ligesom arbejdsgruppen konstaterer, at nogle af de øvrige stoffer enten står over for et forbud (propiconazol) eller snarlig revurdering under skærpede sundhedsmæssige afskæringskriterier.

Generelt er der meget lidt viden og beskrivelser af forholdsregler eller tiltag, der håndterer udfordringen. Der efterlyses mere viden på området, herunder om hvilke anvendelser og stofgrupper, der bidrager mest til problemet, og om der er andre forhold, fx omkring sæson, intensivitet, koncentrationer mv. der forstærker eller mindsker udviklingen af resistensmekanismerne. Særligt peges på behovet for overvågning på området, herunder også flere miljøundersøgelser, både i landbruget og andre områder med intensivt brug.

Arbejdsgruppen er enig i behovet for mere viden og overvågning, og har udpeget en række konkrete områder, der med fordel kunne undersøges nærmere (se afsnit 6.1). Arbejdsgruppen har noteret, at der i 2018 er blevet etableret national human overvågning af resistens i *Aspergillus*, der kan bidrage til mere viden på området.

Arbejdsgruppen bemærker endvidere, at håndtering af azol-resistens skal betragtes som en global/grænseoverskridende problemstilling, da resistente *A. fumigatus* kan spredes med vinden eller importeres fx via blomsterløg eller fødevarer, ligesom resistent *A. fumigatus* potentielt kan erhverves i udlandet.

2.0 Kommissorium samt arbejdsgruppens nedsættelse

2.1 Baggrund

Statens Serum Institut (SSI) har siden 2007 påvist flere tilfælde af danske patienter, der har været i behandling for en svampeinfektion forårsaget af *Aspergillus fumigatus*, hvor behandling har været vanskelig eller umulig som følge af resistensudvikling over for stoffer tilhørende gruppen af azoler, der er førstevalg og det mest effektive stof til at behandle sådanne infektioner.

Da azoler samtidig anvendes i bl.a. landbruget til plantebeskyttelse, har der været rejst en bekymring for, at den landbrugsmæssige anvendelse kan lede til resistensopbygning hos *A. fumigatus*, der efterfølgende kan sprede sig til mennesker via luften, da *A. fumigatus* findes naturligt i miljøet/luften.

Bekymringen er beskrevet videnskabeligt flere steder, og i 2012 blev den første danske tværfaglige publikation på området udgivet: "Azole Resistant Invasive Aspergillus Relationship to Agriculture" (Stensvold *et al.*, 2012).

I 2013 har ECDC (European Center for Disease Control) behandlet emnet i en rapport:

<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/risk-assessment-impact-environmental-usage-of-triazoles-on-Aspergillus-spp-resistance-to-medical-triazoles.pdf>

Her var en af anbefalingerne, at der var behov for at afdække årsagerne til stigende azolresistens, herunder i miljøet, og hvad det evt. medfører af klinisk betydning.

Problemstillingen omkring azolresistens har også været behandlet politisk i 2018, hvor de to ministre på området, hhv. Sundhedsministeren og Miljø- og Fødevareministeren, har tilkendegivet, at der er behov for mere viden på området, herunder tværfagligt samarbejde. Dette blev også konklusionen på et møde mellem sundhedsmyndighederne (Sundhedsstyrelsen og Statens Serum Institut) samt miljømyndighederne den 2. marts 2018, hvor der var enighed om at nedsætte en tværfaglig/ministeriel arbejdsgruppe på området.

2.2 Etablering af tværfaglig arbejdsgruppe

Der blev i sommeren 2018 således nedsat en hurtigarbejdende arbejdsgruppe på baggrund af mistanken om, at de azolresistente *A. fumigatus* svampe, man finder i et stigende antal immunsvækkede patienter, oprindeligt kan stamme fra miljøet. Arbejdsgruppens opdrag var:

- Foretage en gennemgang af eksisterende viden og anbefalinger (litteratur- og praksisgennemgang).
- Identificere områder, hvor der er behov for mere viden på området.

Af kommissoriet fremgår det endvidere, at azolresistens i miljøet er en kompleks problemstilling, hvor der er behov for at udpege kilder, hvor selektionspresset i miljøet er særligt højt. Hermed kan man forhindre opformering af azolresistente svampe for at bevare effektive lægemidler samtidig med, at der tages højde for azolmidlernes samfundsnyttige egenskaber og brug i forskellige øvrige sammenhænge.

Kommissoriet fremgår af bilag 1.

2.3 Arbejdsgruppens medlemmer og arbejdsproces

Følgende har været medlem af arbejdsgruppen:

Lars Villiam Pallesen, Ph.d., Civilingeniør, Afdelingschef (formand for arbejdsgruppen), SSI

Maiken Cavling Arendrup, Prof. overlæge dr.med., Ph.d., fagchef for mykologi, SSI

Heidi Søltoft, Chefkonsulent, SSI, sekretær/referent

Birte Fonnesbech Vogel, Ph.d. Civilingeniør, Miljøstyrelsen

Vibeke Møller, Funktionsleder, Miljøstyrelsen

Lise Nistrup Jørgensen, Seniorforsker, Institut for Agroøkologi, Aarhus Universitet (AGRO)

Gideon Ertner, Læge, Sundhedsstyrelsen

Det fremgår desuden af kommissoriet, at arbejdsgruppen løbende holder Sundheds- og Ældreministeriet og Miljø- og Fødevareministeriet orienteret om gruppens arbejde, og at gruppen senest ved udgangen af 2018 vil afrapportere til de to departementer. Derefter skal der tages stilling til evt. fortsættelse af arbejdsgruppen mv.

Der har været afholdt to møder i arbejdsgruppen, hvor første møde primært har været anvendt til at drøfte fælles viden, herunder hvad der skulle med i rapporten samt fordeling af arbejdsopgaver. På andet møde drøftedes de første rapportbidrag. Rapportdisposition og senere rapportudkast er drøftet på mail blandt arbejdsgruppens medlemmer. Fødevarestyrelsen/DTU Fødevareinstituttet har bidraget til afsnittene omkring veterinært brug og eksponering via fødevarer. Fødevarestyrelsen har ligeledes haft et rapportudkast i høring. SSI har via sekretariatsfunktionen forestået den primære gennemskrivning af bidragene.

3.0 Generelt om til *Aspergillus fumigatus* og aspergillose

Aspergillus er en omfattende slægt af skimmelsvampe, hvor arten *A. fumigatus* er den mest udbredte underart. Den findes udbredt i naturen og vokser bedst i varme og fugtige omgivelser. Den findes typisk i jord og på organisk materiale, som f.eks. kompost, hvor den spiller en vigtig rolle for nedbrydning af organisk materiale. Svampen er således ”nyttig” i naturen og ikke kendt som en skadelig svamp for planter.

A. fumigatus kræver ilt for at kunne vokse og vokser derfor bedst på overflader af f.eks. kompostbunker, hvor fra der frigøres myriader af små svampesporer. Mennesker inhalerer dagligt et stort antal svampesporer fra *A. fumigatus* gennem luft, støv, vand, te, krydderier mv. Dette er harmløst for raske mennesker. Hos patienter med lavt immunforsvar eller visse kroniske lungesygdomme kan den dog give anledning til alvorlig sygdom:

- Invasiv aspergillose med infektion i indre organer, oftest lunger, men ethvert organ kan angribes. Invasiv aspergillose kan være akut (<1 måneds forløb), subakut (1-3 måneder forløb) eller kronisk aspergillose (> 3 måneder).
- Allergiske sygdomme, så som allergisk bronkopulmonal aspergillose (ABPA) med nedsat lungefunktion, astmasymptomer, opspyt og feberanfald hos patienter eksempelvis med astma eller cystisk fibrose.

Patienter efter knoglemarvstransplantation er særligt udsat for invasiv aspergillose, hvor hyppigheden er 0,5-15 % (blandt andet afhængig af typen af knoglemarvstransplantation), mens lungetransplanterede patienter har en hyppighed på 3-16 %. Også patienter med visse lungesygdomme (kronisk obstruktiv lungesygdom, tidligere tuberkulose, medfødte lungesygdomme og andre immunsygdomme) er i risiko for aspergillose. Her vokser svampen langsomt og mere begrænset – man kan tale om kronisk lokaliserede infektioner i lungen. Kortikosteroid-behandling (behandling med medicin indeholdende kortisol lignende hormoner) er en kendt risikofaktor, dels betinget af den immunsupprimerende virkning, men også på grund af en direkte vækststimulation af *A. fumigatus* svampen.

A. fumigatus smitter ikke mellem mennesker, og infektionen opstår således, fordi en modtagelig person indånder *A. fumigatus* sporer.

3.1 Diagnostik, behandling og overvågning

Ved klinisk mistanke om aspergillose kan sygdommen påvises på tre måder:

- 1) Dyrkning af *A. fumigatus* fra ophostet materiale eller lungevæske, hvilket giver mulighed for efterfølgende resistensbestemmelse (udføres på SSI og Skejby). Det er imidlertid kun halvdelen af prøverne, der er dyrkningspositive, og dyrkningen tager flere dage.
- 2) Blodprøve hvor der påvises *A. fumigatus* antigen (små bestanddele fra svampens cellevæg). Denne analyse giver ikke mulighed for at påvise resistens.

- 3) Molekylærbiologisk test (kun SSI). Hurtig-test til påvisning og skelnen mellem de forskellige *Aspergillus* arter. Metoden er sensitiv og kan fortælle, om patienten er inficeret med en af de to kendte miljøresistente *A. fumigatus* typer påvist i Danmark.

Svampeinfektioner hos mennesker med *A. fumigatus* kan først og fremmest behandles med en gruppe lægemidler, der hedder azoler. Særligt invasiv aspergillose er en alvorlig sygdom, der ubehandlet medfører død.

Azolerne er hovedhjørnesten i *Aspergillus* behandling, fordi de er den mest effektive behandling og samtidig den eneste lægemiddelgruppe, patienten kan tage som tabletbehandling, hvilket tillader tidligere udskrivelse og mindre risiko for sygehuserhvervede infektioner. Til behandling af akut alvorlig *A. fumigatus* infektion er voriconazol det primære valg, men der findes to (ikke azol) alternativer: Ambisome og echinocandin. Begge er mindre effektive, og ambisome er yderligere behæftet med betydelige bivirkninger i form af bl.a. nyrepåvirkning. Effekten af behandlingerne er ca. 70% for voriconazol, 60-65% for ambisome, og ca. 50% for echinocandin. Echinocandin er således signifikant mindre effektivt, men har færre bivirkninger. Begge alternativer kan kun gives i en blodåre, og prisen er markant højere. På Rigshospitalet koster et døgn's behandling med voriconazol ca. 80 kroner mod flere tusind for ambisome.

Det er velkendt, at hyppig eller længevarende brug af et stof kan lede til resistens, dvs. stoffet bliver uvirksomt over for den infektion, det var udset til at bekæmpe. Den humane anvendelse af azolholdige lægemidler skaber således også resistens, hvor erhvervet azolresistens i *A. fumigatus* første gang blev rapporteret i tre isolater fra to amerikanske patienter i 1997 (Denning, 1997 og Denning, D. W. et al, 1997). Siden årtusind skiftet er resistens påvist med stigende hyppighed og første gang i Danmark i 2007.

Azolresistent *A. fumigatus* infektion kan opstå på to måder:

1. Ved at patienten er under langvarig (måneder til år) azolbehandling som fx patienter med kronisk aspergillose, hvor den oprindeligt følsomme *A. fumigatus* bliver resistent eller
2. Ved at patienten inhalerer en *A. fumigatus*, der er resistent fra miljøet (Mortensen, K.L et al, 2011).

Resistens i *A. fumigatus* opstået under human behandling er knyttet til en lang række forskellige mutationer (ændringer) i genet for azolernes angrebepunkt (*CYP51A*). Den specifikke ændring, dvs. hvilken aminosyre erstattes af hvilken, og den præcise position i genet, dvs. hvor i genet ændringen optræder, betinger om resistensen kun omfatter et, flere eller alle medicinske azoler. Af bilag 2 fremgår de mest almindelige mutationer i humane isolater (Stensvold et al, 2012).

Der er først indført national og systematisk overvågning af resistens over for *A. fumigatus* i 2018, hvorfor der er begrænset viden om udviklingen af denne resistensform i Danmark. En undersøgelse udført på de prøver (fra 125-250 patienter årligt), som SSI modtog i perioden 2010-17 viser, at der blev fundet resistens i *A. fumigatus* hos 2.9% af de undersøgte patienter i perioden 2010-2013, mens tallet var 4.7% i 2014-17. Generelt er prøvetallet på SSI gået ned i perioden, som følge af regionernes hjemtagelser af diagnostik, hvorfor tallene ikke er direkte sammenlignelige.

Foreløbige tal fra den nationale overvågning viser, at der nu findes resistens mekanismer hos 10/135 patienter (7,4%) – se også bilag 3, "Foreløbig status over den nationale *Aspergillus* overvågning pr. 21/12 2018".

Samtidig viser en endnu upubliceret undersøgelse omfattende patienter med den kroniske lungesygdom Cystisk Fibrose (CF) fulgt på Rigshospitalet første halvår af 2018, at der blev fundet azol resistens hos 10 ud af 109 patienter svarende til 9,2%. Det er forventeligt, at der påvises mere resistens i denne gruppe, da de behandles med azollægemedler.

Studiet er det første med sammenlignelige danske tal, da samme patient gruppe blev undersøgt i 2007-2009. Andelen af patienter med resistent *A. fumigatus* bestemt ved påvisning af mutationer i CYP51A genet, var 4,6 % (5/9 patienter) i 2018 mod 3,8 % (5/133 patienter) i 2007-2009. Se også bilag 4.

Sammenfattende viser de forskellige studier en stigende tendens til resistensudvikling i Danmark. Langt de fleste patienter kan dog fortsat behandles med azollægemedler. For et relativt begrænset antal patienter er konsekvensen meget alvorlig. Hvor mortaliteten i internationale studier viser, at dødeligheden er 40-60% for infektioner med følsomme isolater, er den 90-100% for azolresistente isolater, hvilket bringer dødeligheden tilbage til niveauet før azollægemedlerne blev introduceret. Den højere dødelighed skyldes primært forsinkelse i opstart af behandlingen med et aktivt stof, hvorfor infektionen har nået et stadie, hvor effekten af de alternative behandlinger (der samtidig er mindre effektive og behæftiget med flere bivirkninger) er meget ringe.

Der findes ikke danske tal for overlevelse efter resistent *A. fumigatus* infektion.

4. Miljø resistens hos *Aspergillus* fra patienter og fra miljøet

I løbet af de seneste 10-15 år er der i flere tilfælde også fundet azolresistent *A. fumigatus* hos patienter uden forudgående anvendelse af azollægemidler (azol naive patienter). Da patienter udsættes for *A. fumigatus* gennem inhalation af *A. fumigatus* sporer, tyder dette på, at resistente svampesporer findes i luften. Samtidigt har man fundet en række karakteristiske kendetegn, de såkaldte miljømutationer, både i resistente *A. fumigatus* fraazol naive patienter og i resistente *A. fumigatus* fra miljøet. Disse fund gennemgås i de to næste afsnit.

4.1 Azolresistensmekanismer i *A. fumigatus* fra patienter, der ikke er behandlet med azoler

De første fund af azolnaive patienter med resistent *A. fumigatus*, blev observeret af læger i Holland i slutningen af 1990'erne.

Studier af disse patienter viser, at langt hovedparten (>99%) af de resistente *A. fumigatus* fraazolnaive patienter har én af to specifikke miljømutationer i *CYP51A* genet (Verweij, P. E., 2016; Astvad, K. M. T. *et al*, 2014; Pelaez, T. *et al*, 2015 og Wu, C.J. *et al*, 2015):

- 1) TR₃₄/L98H eller
- 2) TR₄₆/Y121F/T289A.

Miljøresistente isolater er også fundet hos patienter, der har været i azol-behandling. Forskellige *A. fumigatus* isolater kan "flytte ind" i lungerne samtidigt, og det er derfor ikke ualmindeligt, at der kan påvises mere end én *A. fumigatus* type hos den enkelte patient, hvis man undersøger grundigt herfor (Astvad, K.M T *et al*, 2014 og Warris, A m.fl. 2002). Det skyldes, at lungerne hos en risikopatient skal opfattes som et attraktivt boligkompleks for *A. fumigatus* svampe. Ved azolbehandling af en patient med både følsomme og resistente *A. fumigatus* isolater i lungerne, vil den resistente svamp favoriseres og derfor efterfølgende dominere (selektion), uanset om den resistente *A. fumigatus* er opstået under behandling eller inhaleret udefra. Med andre ord har medicinsk azolbehandling hos en patient ikke noget at gøre med udvikling af miljøresistens i et isolat, men den understøtter, at en miljøresistent *A. fumigatus* kan etablere sig (selektion) og give anledning til en resistent infektion.

Det første TR₃₄/L98H isolat i Danmark blev påvist i 2007 hos en patient med Cystisk Fibrose (CF) (Mortensen, K. L. *et al*, 2011). Siden da er flere påvist både hos CF patienter, men også hos patienter med anden underliggende sygdom i såvel azol behandlede som azol naive patienter (Jensen, R. H. *et al*, 2016; Mortensen, K. L. *et al*, 2011 og Astvad, K. M. T. *et al*, 2014). Det første isolat af TR₄₆/Y121F/T289A udenfor CF patient population blev fundet i 2014.

I 2018 blev det besluttet at iværksætte national human overvågning af azolresistens, og her påviste de systematisk indsamlede tal miljøresistens mekanismen i 5/10 af de azol resistente *A. fumigatus* isolater i de første 3 måneder. Dvs. at man finder de miljøresistente typer i halvdelen af de resistente isolater. Se også bilag 3.

Tallene er (forventeligt) lidt anderledes, hvis man ser på patienter, der har været behandlet med azollægemidler i længere tid, og hvor andre resistensmekanismer derfor optræder. Her viser det endnu

upublicerede studie, omfattende patienter med cystisk fibrose på Rigshospitalets primo 2018 en generel stigende forekomst af azol resistens, jf. afsnit 3.1. Andelen der skyldes miljøresistens er samtidig steget fra 1,5% (2 patienter) til 3.7% (4 patienter) miljøresistens i CF patienter for de henholdsvis 133 undersøgte patienter i 2007-2009 og de 109 undersøgte patienter i 2018. I studiet fandt man også en ny miljøresistenstype (TR₃₄³/L98H) i 2018, der ikke tidligere er påvist i Danmark. Studiet er det første med sammenlignelige tal i Danmark, og selvom der er tale om et meget begrænset antal patienter, kan det konstateres, at flere CF patienter har resistenstyper, der stammer fra miljøet hos *A. fumigatus*. Se også bilag 4.

Varierende resistensrater er påvist andre steder i verden, lavest i Canada og USA (ingen eller enkelte tilfælde), og højest i Holland, hvor miljøresistens nu ses i op til 30% af patient prøverne på visse hospitaler. I Holland har det medført, at behandlingsrekommendationerne er ændret til indledende kombinationsbehandling med både voriconazol og caspofungin, da man ikke længere kan behandle med voriconazol alene før følsomhed er dokumenteret. De store variationer afspejler formentligt dels reelle forskelle i forekomst af resistens i miljøet, men også forskelle betinget af forskellige patientpopulationer, og forskellig ihærdighed, hvormed dette er belyst. Bl.a. resistensundersøger flertallet af mikrobiologiske afdelinger i verden ikke *Aspergillus*.

4.2 Azol resistens i *A. fumigatus* fra miljøet i DK og globalt

Som nævnt i det foregående afsnit er det nogle helt specielle resistenstyper, som findes i azolnaive patienter, hvorfor man må formode, at azolresistens er opstået ved, at patienten har indåndet azolresistente *A. fumigatus* typer. Dette afsnit omhandler fund af de samme resistensmekanismer i miljøet.

I Danmark er der gennemført 3 miljøstudier med indsamling af jord og luftprøver. Det første studie blev udført i juni - august i 2009 med jordprøver omkring Rigshospitalet og fra bede i Tivoli. Her fandtes azolresistens TR₃₄/L98H *A. fumigatus* isolater i 8% af de undersøgte jordprøver. Der blev også indkøbt kompost/pottemuldsække, men her fandt man ingen resistente isolater. To efterfølgende studier blev udført i det tidlige forår 2010 og senere efterår 2013 uden fund af resistente isolater. Til sammenligning er der fundet resistent *A. fumigatus* typer i prøver indsamlet i sommersæsonen i Holland, UK og Belgien, og uden for sommermånederne i Holland, Italien og Indien, hvilket kunne tyde på at optimal indsamlingsperiode i Danmark er i de varme måneder

Internationalt er disse resistensmekanismer påvist i mange sammenhænge, jf. også tabel 1. Således er TR₃₄/L98H i dag påvist i kliniske prøver i mindst 26 lande og i miljøprøver i mindst 20 lande. Mange lande har stadig ikke undersøgt for specifikke miljømutationer, så de præsenterede data reflekterer resultater fra de lande, som har foretaget undersøgelser. Som det fremgår, er miljømutationer fundet på alle kontinenter og må betragtes som et globalt fænomen (se figur 1).

Tabel 1. Oversigt over første detektions-/publikationsår for fund af azolresistent *A. fumigatus* betinget af de to dominerende mekanismer TR₃₄/L98H og TR₄₆/Y121F/T289A i henholdsvis patient- og miljøprøver*

Mekanisme	Fund i patientprøver	Fund i miljøprøver
TR ₃₄ /L98H	1998: Holland, Italien ⁹	2001: Norge ²⁰
	2000: Tyrkiet ⁹	2002: Holland, Italien ⁹
	2003: Spanien ⁹	2005: Iran ⁹
	2004: Australien ⁹	2006: Belgien ⁹
	2005: Iran ⁹	2009: Danmark ⁹
	2006: Belgien, UK ⁹	2008: Indien ^{9,21}
	2007: Danmark ⁹	2009-11: UK ^{9,22}
	2008: Indien, Kina ⁹	2010: Frankrig ⁹
	2009-11: UK ⁹	2012: Tyskland ⁹
	2010: Frankrig, USA ⁹	2013: Kuwait ⁹
	2011: Taiwan ⁹	2014-15: Thailand ²³
	2012: Tyskland ⁹	2015: Colombia ^{9,15} , Schweiz ¹⁷
	2013: Kuwait ⁹	2016: Japan ²⁴
	2006-14: Polen ^{9,13}	2017: Kina ²⁵ , Irland, Pakistan, Romænien ¹⁸ (artikler fra 2016) ¹⁶
	2014-15: Tanzania ¹⁴	
	2016: Colombia ^{9,15} , Japan ¹⁶ , Schweiz ¹⁷	
	N/A: Irland, Pakistan, Romænien ¹⁸ Østrig ¹⁹ (artikler fra 2015-16)	
	2018: Tjekkiet (upubliceret)**	
TR ₄₆ /Y121F/T289A	2008: USA ⁹	2009: Holland ⁹
	2009: Holland ⁹	2012: Belgien, Tyskland, Indien ⁹
	2012: Belgien, Tyskland ⁹	2013: Frankrig, Tanzania ⁹
	2013: Frankrig ⁹	2015: Colombia ^{9,15}

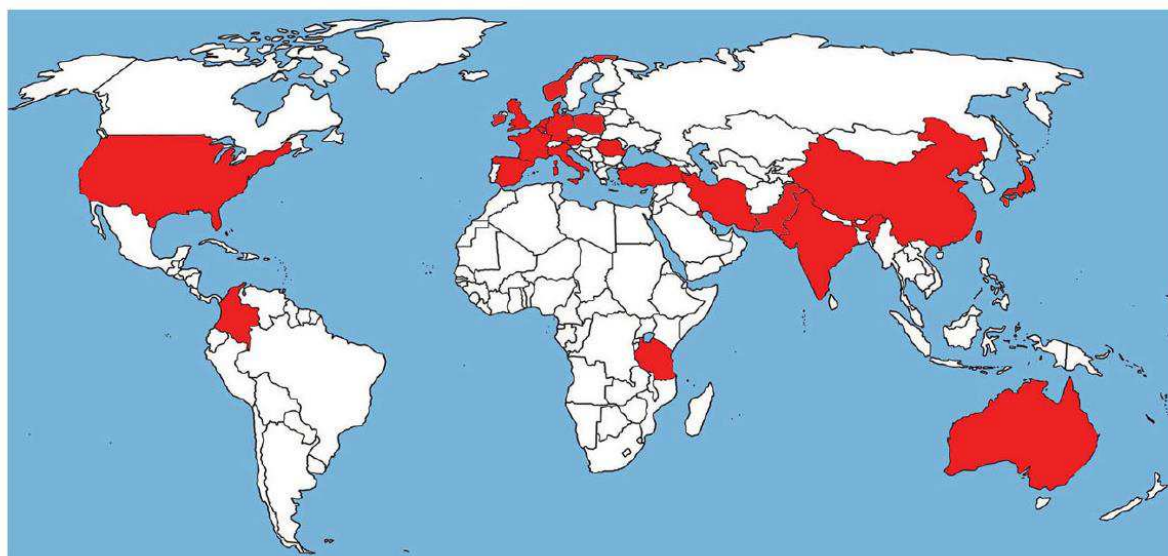
2014: Danmark, Spanien⁹

2018: Argentina²⁶

N/A: Kina²⁵

*Det skal bemærkes, at årstal for nogle fund repræsenterer de eksakte år den resistente *A. fumigatus* blev fundet i det pågældende land, mens det for andre er det år den videnskabelige artikel blev udgivet (når årstallet for *A. fumigatus* isolatet ikke fremgår af artiklen).

**TR₃₄/L98H er netop påvist i et isolat fra Tjekkiet som led i et samarbejdsprojekt mellem SSI og kollega (Petr Hamal) i Tjekkiet.



Figur 1: Verdenskort over hvilke lande man frem til 2016 har fundet og rapporteret fund af miljømutationer af *A. fumigatus* (Kilde: Meis et al, 2016).

Udover TR₃₄/L98H og TR₄₆/Y121F/T289A er enkelte andre resistensmekanismer fundet i enten miljø eller azolnaive patienter. Det upublicerede danske studie fra 2018 (cystisk fibrose patienter fra Rigshospitalet) fandt også en miljøresistentstype, der ikke tidligere er fundet i Danmark. Det drejer sig om TR₃₄³/L98H, der har tre 34bp repeats mod to i den dominerende azolresistente miljøvariant.

4.3 Identificerede miljøer som selekterer for resistens

En række artikler har beskæftiget sig specifikt med emnet set fra landbruget side (Gisi, 2015, Holloman, 2017). En artikel argumenterer for, at de koncentrationer, der anvendes i de åbne landbrugsarealer, er for lave til at bidrage til en væsentlig selektion af mutationer. Samme artikel beskriver dog enkelte områder som "hotspots", bl.a. bejdsning af løg, overfladebehandling af frugt og ikke mindst kompost og affaldsbunker, hvor azolbehandlet plantematerialer indgår (Gisi, 2015).

Et hollandsk forskerteam med eksperter fra forskellige discipliner har undersøgt, hvilke forhold der er af største betydning for miljøresistens (Anon. 2017). De har specifikt undersøgt "Hot spots" for spredning af azolresistent hos *A. fumigatus*. I rapporten fremhæves det, at *A. fumigatus* trives godt i forskellige

kompostsystemer, hvor den kan udvikle både de kønnede og ukønnede stadier, som skønnes nødvendigt for at få de dobbeltmutationer, der kendetegner miljøvarianterne. Rapporten konkluderer, at den største risiko for resistens i Holland findes fra kompost fra blomsterløg og blomsterblade, træfliskompost og grønne kompostbunker. Kompost er et godt medium for vækst af *A. fumigatus*, og hvis der samtidig er rester af azoler på de planterester, som indgår i komposten, vurderes der at være en øget risiko for selektion af mutationer og opbygning af resistens. For at nedbringe *A. fumigatus* risikoen, under disse forhold, har man testet effekten af at varmebehandle komposten. Dette viste, at andelen af resistente isolater kunne nedsættes betydeligt.

Undersøgelser af jord fra blomsterbede og marker i Columbia har vist resistens i 19 ud af 60 undersøgte prøver (Le Pape *et al.* 2016). Næst efter Holland er Columbia den største blomstereksportør i verden. Tilsvarende blev resistens målt i 15 ud af 108 *A. fumigatus* isolater fra Tanzania, som også er en stor blomstereksportør (Chowdhary *et al.*, 2014)

Tulipanløgproduktion har således været sat i fokus som et højrisikoområde, og på hollandske tulipaner solgt i Irland, har man bl.a. fundet udbredt forekomst af resistent *Aspergillus* (Dunne *et al.*, 2017). I undersøgelsen fandt man *Aspergillus* resistens i 5 ud af 6 prøver fra blomsterløg indkøbt i et havecenter i Irland. Blomsterløgene var importeret fra forskellige områder i Holland. *A. fumigatus* resistens blev også fundet i en indkøbt prøve med kompost fra samme havecenter, ligesom der blev fundet resistens i en luftprøve og en jordprøve indsamlet uden for et hospital i Irland. På den baggrund anbefaler undersøgelsens forfattere, at der ikke sættes blomsterløg i haver og parker i nærheden af hospitaler og sundhedscentre.

En fransk undersøgelse beskriver en undersøgelse for resistent *A. fumigatus* i og omkring en ældre mands bopæl. Undersøgelsen blev foretaget flere måneder efter den ældre, svækkede landmands død, som følge af en infektion med miljøresistent *Aspergillus* (Lavergne *et al.*, 2017). I tre af 10 prøver udtaget inde i huset blev der konstateret en miljøresistent *A. fumigatus*, mens der i 2 af 11 prøver fra haven blev fundet miljøresistent *A. fumigatus*. Der blev også udtaget jordprøver fra 13 nærliggende marker med byg, majs eller hvede. Alle disse prøver viste forekomst af *A. fumigatus*, men kun i en enkelt jordprøve fra en bygmark var der azolresistens. Genotypiske undersøgelser dokumenterede, at isolaterne i huset og haven var identiske med den svamp, som gav anledning til sygdomsforløbet. Derimod var de resistente isolater fra bygmarken genotypisk forskellige fra patientens. Undersøgelsen viser, at miljøresistente *A. fumigatus* isolater er stabile i miljøet og ikke umiddelbart forsvinder, når de ikke længere udsættes for azol-selektion. Dette harmonerer med resistensundersøgelser inden for plantepatogene svampe, som ligeledes generelt viser høj stabilitet af resistens i miljøet.

En kinesisk undersøgelse fra 2017 viste miljøresistens (Tr 46/Y121F/T289A) fra 6% af 144 jordprøver udtaget i væksthuse med produktion af frugt og grønsager (Ren *et al.*, 2017). Denne undersøgelse peger på, at risikoen for overførelse af resistente *A. fumigatus* via fødekæden bør undersøges nærmere.

4.4 Forskellige azolers aktivitet over for *A. fumigatus*

En undersøgelse peger på, at selvom azolerne ikke er identiske, er der en række azol-fungicider, der kan binde sig effektivt til det samme aktive site i *A. fumigatus*, som de medicinske azoler også binder sig til og udøver deres virkning gennem (Snelders et al, 2012).

Laboratorieforsøg har således vist, at flere fungicid-azoler har effekt på *A. fumigatus* i en grad, som er sammenlignelig med de medicinske azoler (Snelders et al 2012). Samtidigt er det i et laboratorieforsøg vist, at flere fungicid-azoler har kunnet udvikle resistente *A. fumigatus* isolater, herunder resistens over for medicinske azoler. Som det fremgår af tabel 2 har både de medicinske azoler og fungicid azolerne (DMI) forhøjede EC₅₀ værdier, når der er tale om resistente isolater, hvilket indikerer en potentiel krydsresistens (Snelder et al, 2012).

Tabel 2. Følsomhed af medicinske azoler og fungicid azoler (DMI) over for *A. fumigatus*. (Uddrag fra Snelders et al, 2012)

Azol	Anvendelse	MIC50	
		Vild type fra miljøet	TR ₃₄ /L98H
Itroconazol	Medicinsk	0,25	32
Voriconazol	Medicinsk	0,5	4
Posaconazol	Medicinsk	0,063	0,5
Propiconazol	Fungicid	2	32
Tebuconazol	Fungicid	2	16
Difenoconazol	Fungicid	1	16
Epoxiconazol	Fungicid	2	32
Bromuconazol	Fungicid	1	16

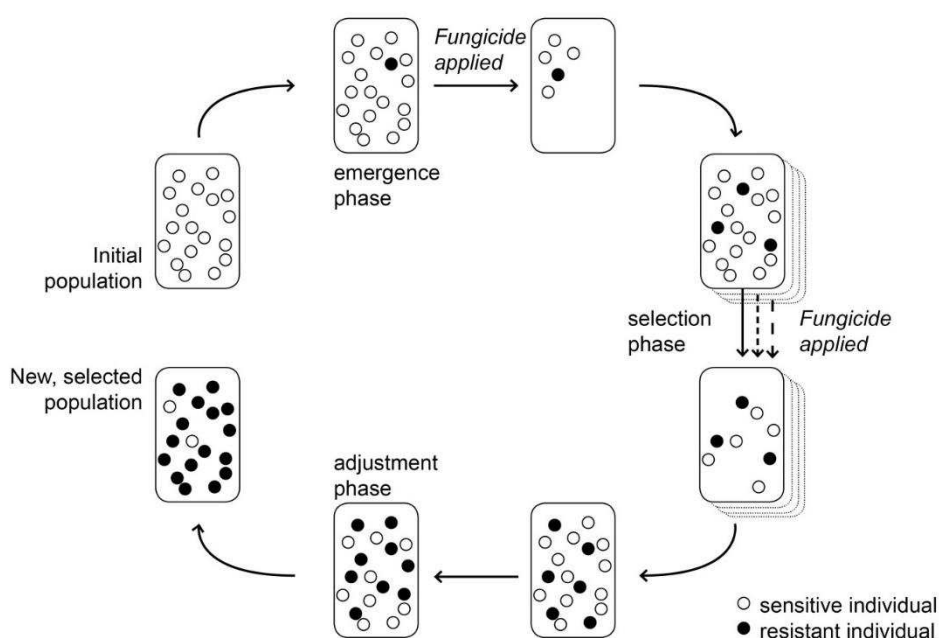
En række af fungicid azolerne "fitter" samtidig godt i det aktive virkningssted hos *A. fumigatus*, men præcist hvilke fungicid azoler, der er aktive over for *A. fumigatus*, og som er tilstede i koncentrationer, som vil kunne selekttere for resistens, er uklart og kræver yderligere afdækning.

Specifikt har der været fokus på 5 azoler: propiconazol, tebuconazol, difenonazol, epoxiconazol og bromuconazol, fordi disse har vist god effekt på *A. fumigatus*, men omvendt ingen virkning på den dominerende miljøresistente variant (TR₃₄/L98H). Dette sandsynliggør, at disse 5 har været involveret i opståen af netop denne miljø-variant.

Imidlertid er der en række andre fungicid azoler, der har effekt over for *A. fumigatus*, og hvor effekten omfatter både *A. fumigatus*, der er følsomme for medicinske azoler og den dominerende miljøvariant TR₃₄/L98H. Disse fungicidazoler er ikke undersøgt over for de øvrige miljøresistente varianter som f.eks. TR₄₆/Y121F/T289A og TR₃₄³/L98H, og derfor er det uvist, om disse azoler har haft en rolle i udvikling af disse resistensmekanismer. Det gælder eksempelvis metconazol, prochloraz og imazilil, der har vist stor aktivitet over for *A. fumigatus*, men lav krydsresistens over for nogen af miljømutationerne. Specifikt for prochloraz har laboratoriestudier vist, at dette middel kan fremkalde resistens i *A. fumigatus* ved langtidseksponering; en resistens som er stabil og også omfatter de medicinske azoler (Faria-Ramos et al, 2014).

Der findes ikke klare undersøgelser, som dokumenterer, hvilken effekt og resistensrisiko, som kan forventes i forbindelse med brugen af prothioconazole (eller destio- prothiconazol, som er den aktive del), som er en meget anvendt fungicid-azol, som tilhører sin egen undergruppe.

Det skal endeligt bemærkes, at det er kendt fra andre resistenssammenhænge, at der skal mere til at udvikle resistens i en følsom mikroorganisme, end til at selekttere en resistent mikroorganisme frem, når den først er opstået. Det er derfor uvist i hvilken grad, der i Danmark er forhold, der henholdsvis tillader opståen af resistent *A. fumigatus* henholdsvis fremelsker de resistente *A. fumigatus*, vi allerede har i miljøet. Den første udvikling af resistens sker ofte ved tilfældig dannelse af mutationer i populationen – disse dannes typisk i uhyre små koncentration på 1×10^{-10} (Camps, S. M. T *et al*, 2012 og Mortensen, K. L. *et al*, 2011). Hvorvidt disse få mutationer udvikler sig, afhænger af det efterfølgende selektionstryk, og hvorvidt den muterede organisme er konkurrencedygtig (har god fitness), også når azoler ikke er tilstede i miljøet (Van den Bosch *et al*, 2011). Se også figur 3.



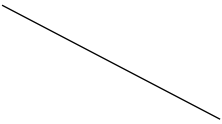
Figur 2: Illustration af udviklingen af resistens hos en mikroorganisme inddelt i 3 faser (efter van den Bosch *et al*. 2011)

5.0 Azoler – forbrug og forekomst

Ligesom det er relevant at undersøge hvor i miljøet, man finder disse resistensformer, er det også relevant at undersøge forbrug og forekomst af de azoler, der fører til resistens.

I de følgende afsnit gives en sammenstilling af, hvilken anvendelse af azoler, der finder sted inden for forskellige discipliner i Danmark med fokus på de azoler, der har lighed med de medicinske azoler. I tabel 3 findes en samlet oversigt.

Tabel 3. Oversigt over azolforbindelser, hvor der i Danmark er registreret anvendelse og/eller forekomst*. Stofferne markeret med gult anvendes til *Aspergillus* infektionsbehandling i mennesker. Stoffer markeret med blå anvendes til svampeinfektioner inden for human- og veterinærmedicin, men hvor det vides, at den humane brug ikke gælder *Aspergillus* infektionsbehandling. Stofferne markeret med grønt anvendes i landbruget (og delvist til materialepræservasjon) og har vist krydsresistens med de medicinske azoler over for den hyppigste azolresistente miljøvariant (TR₃₄/L98H).

Anvendelse/forekomst 	Human medicin	Landbrug (pesticider)	Gartneri (pesticider)	Træbeskyttelse (biocider)	Veterinært	Slam (rensingsanlæg) **	Fødevarer	Kosmetik
Azolforbindelse								
Fluconazol***	+							
Voriconazol	+							
Itraconazol	+				+			
Posaconazol	+							
Isavuconazol****	+							
Clotrimazol***	+				+			
Econazol***	+							
Ketonazol***	+				+			
Enilconazol=imazalil					+			
Miconazol***	+				+			
Ronidazol					+			
Thiamazol					+			
Tebuconazol		+	+	+		+	+	
Epoxiconazol		+	+				+	
Difenconazol		+	+				+	
Propiconazol		+	+	+		+	+	
Imazalil		+			(+)			
Prothioconazol		+					+	
Metconazol		+						
Paclobutrazol			+					
Climbazole								+

*Bemærk at der også kan være anvendelser, hvor der ikke kræves forudgående godkendelse og/eller krav om forbrugsangivelser. Det gælder områder, hvor brug af azoler fx ikke er omfattet af lægemiddellovgivningen eller regler om pesticider/biocider. Det gælder fx industrikemikalier, hvor azoler kan tilsættes som kemisk stof. Brug af stofferne skal registreres, men ikke godkendes og der findes ingen forbrugsstatistikker.

** Der er ikke foretaget danske undersøgelser i slam. De angivne stoffer er baseret på studier fra hhv. Kina og Schweiz.

*** Clo-, eco-, mico- og ketoconazol anvendes i humanmedicin som cremer, shampoo mv til lokal behandling af hud og slimhindeinfektioner (fx skedesvamp hos kvinder, hudinfektion mm) og er ikke associeret med udvikling af resistens i *A. fumigatus*. Fluconazol virker på gærinfektioner, og er således heller ikke aktiv over for *A. fumigatus*.

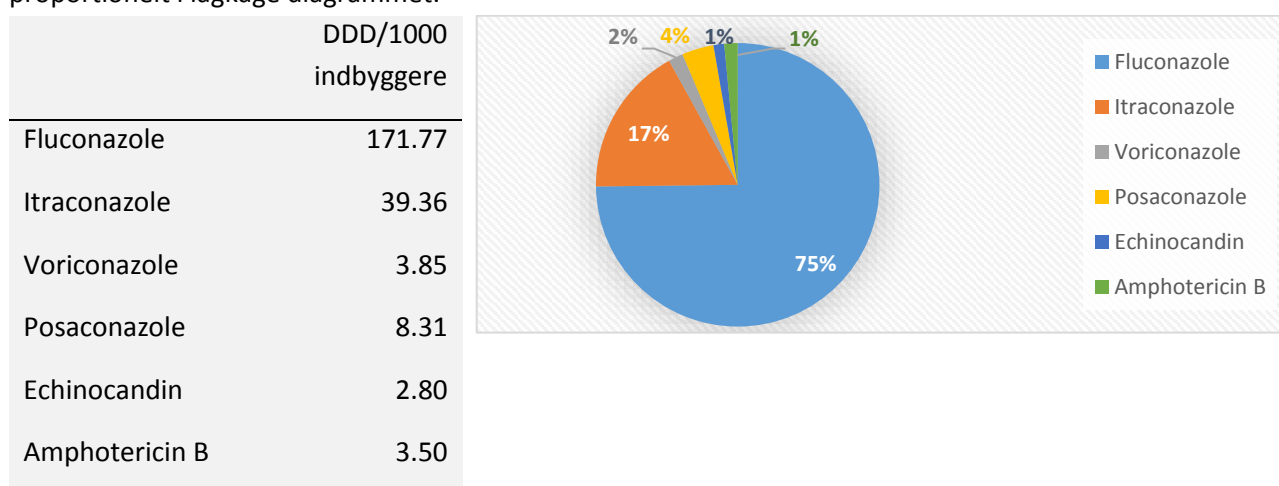
****Isavuconazol blev introduceret i 2017 og forbruget er stadig meget beskedent.

5.1 Humant

Forbruget af medicinske svampemidler i Danmark i 2016 er angivet nedenfor i figur 3. Fluconazol, der virker på gærinfektioner, men ikke på *Aspergillus* eller andre skimmelsvampe, udgør 75%. De *Aspergillus* aktive azoler itraconazol, voriconazol, og posaconazol udgør tilsammen 23% (51,5 DDD/1000 indbyggere), og kom på markedet i 1990'erne. Gruppen af echinocandin og amphotericin B (inkl. Ambisome) udgør en forsvindende lille del af det samlede forbrug.

Omregnet til kg er den forbrugte mængde af de tre *Aspergillus* aktive azoler i human medicin (itraconazol, voriconazol og posaconazol) således 66,7 kg per år. Isavuconazol blev godkendt i 2015, men først introduceret i Danmark i 2017, og er ikke med i denne opgørelse, da forbruget er meget beskedent. Den største del af itraconazolforbruget bruges formentligt til behandling af hudsvampeinfektioner (som alternativ til terbinafin) og til komplicerede skedeinfektioner hos kvinder. Det vurderes derfor, at det er en betydeligt mindre del, der anvendes til *Aspergillus* infektioner og dermed udgør et selektionspres for azol-resistens i *A. fumigatus*.

Figur 3. National forbrug af svampemidler i 2016 i Danmark opgjort som DDD/1000 indbyggere og proportionelt i lagkage diagrammet.



Set over en årrække lå forbruget af itraconazole på ca. 60 DDD/1000 indbyggere i perioden 2004-10, men faldt derefter gradvist til ovennævnte niveau i 2016 (omkring 40 DDD/1000 indbyggere). Forbruget af

voriconazole (indført i 2002) steg frem til 2013 (8 DDD/1000 indbyggere) og faldt derefter. Posaconazole forbruget (indført i 2005) steg frem til 2015 (50 DDD/1000 indbyggere) og faldt derefter.

Clotrimazol, econazol, miconazol og ketoconazol anvendes også i humanmedicin som cremer, vaginal tabletter og shampoo og fås som håndkøbspræparater uden recept. Præparaterne anvendes til lokalbehandling af hud, slimhindeinfektioner og hovedbundsinfektioner, der forårsages af gærsvampe og hudsvampe. *A. fumigatus* er ikke en del af den normale hud- eller slimhinde flora, og der er ikke eksempler i den medicinske litteratur på, at brugen af disse midler har givet anledning til udvikling af azolresistens i *A. fumigatus*. Brugen af de fire præparater vurderes derfor uden betydning for den aktuelle problemstilling omkring azolresistens i *A. fumigatus*.

5.2 Azolanvendelse i landbruget

Generelt har azol-fungicider været anvendt som plantebeskyttelsesmiddel i mere end 35 år, og de er i dag den mest anvendte fungicidgruppe i Danmark, ligesom de udgør mere end 50% af fungicidmarkedet til kornafgrøder i Europa. I Danmark og EU reguleres godkendelse af pesticider (inkl. fungicider) ifølge Pesticidforordningen (EU) 1107/2009, og Miljøstyrelsen har et præcist kendskab til, hvilke pesticider der er godkendt i Danmark, samt anvendelse og mængder af solgte midler. Azol-fungicider anvendes til bekæmpelse af plantepatogene svampe på afgrøder, herunder plantesygdomme som septoria, rust og meldug. Derimod bruges azolerne *ikke* til at bekæmpe *A. fumigatus*, som er harmløs over for planter. I tabel 4 er angivet, hvornår de specifikke azol-fungicider er godkendt, og hvor de hovedsageligt har været anvendt.

Når fungicider godkendes, angives det på brugsanvisningen, hvilken virkningsgruppe midlet tilhører, ligesom der for hvert produkt er sat en øvre grænse for, hvor høj en dosis og hvor mange gange det enkelte middel må anvendes per sæson. Disse begrænsninger fastsættes hovedsageligt ud fra en sundheds- og miljømæssig vurdering. Resistenshåndtering i plantepatogene svampe indgår dog også i denne vurdering, og for midler, som har høj til moderate risiko for resistensudvikling, skal der udarbejdes en anti-resistensstrategi (EPPO-Guideline) for midlets anvendelse for at mindske risikoen for resistensudvikling. I den nuværende godkendelsesordning tages ikke hensyn til risikoen for krydsresistens med ikke plantepatogene svampe.

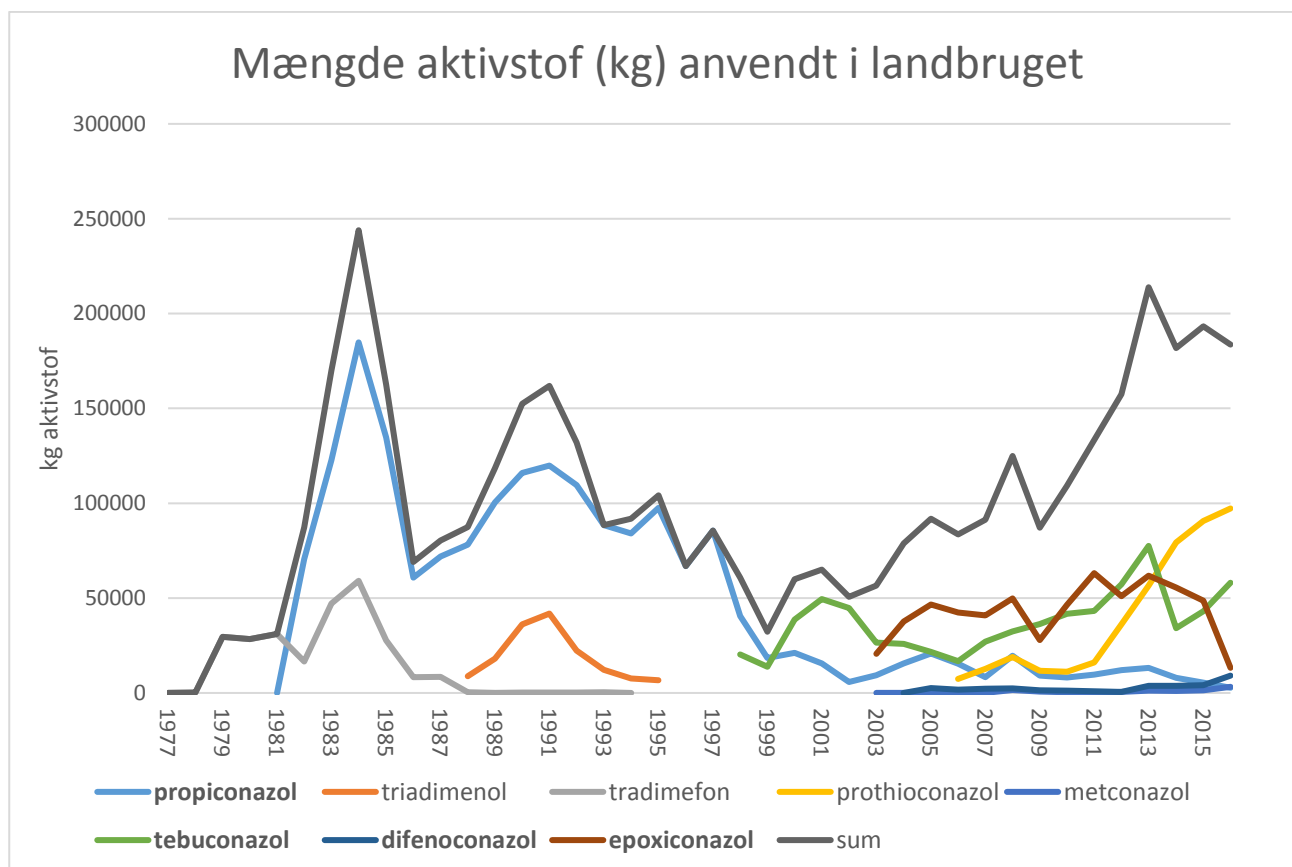
I figur 4 vises den solgte mængde azol-fungicider fra Danmark fra 1977 til 2016 fordelt på de enkelte aktivstoffer. I en lang periode var propiconazol og triadimenol de to dominerende azoler på det danske marked – frem til slutningen af 1990'erne. Først i begyndelsen af 00'erne kom der flere azoler på markedet, hvor især tebuconazol, epoxiconazol og siden 2013 prothioconazol er de mest udbredte azoler. Prothioconazol er ikke associeret med mulig selektion for resistent *A. fumigatus* af typen TR₃₄/L98H, men det vides ikke, hvilken effekt dette aktivstof har i forhold til de andre miljømutationer (Snelders *et al*, 2012).

Propiconazol forbydes i EU og Danmark efter 2019 sæsonen. Desuden står både epoxiconazole, tebuconazol og difenoconazol overfor revurdering i nærmeste år (EU 1107/2009), hvor de skal leve op til de skærpede sundhedsmæssige kriterier.

Tabel 4: Liste med azol fungicider som er eller har været godkendt og anvendt til landbrugsafgrøder.

	Godkendelsesperiode	kommentar
Triadimefon	1977-1994	Første azol til bekæmpelse af kornssygdomme –focus på meldug og rust
Imazalil	1980-2018	Hovedsageligt anvendt til bejdsning
Procloraz	1981-2011	Brugt hovedsageligt i korn
Propiconazol	1982-2019	Stor udbredelse som kornfungicid fra 1982-99; Midlet er forbudt fra 2019
Triadimenol	1988-1995	Ny formulering af triademefon.
Bitertanol	1998- 2011	Anvendt til bejdsning og frugtavl
Tebuconazol	1999-	Anvendt i korn, raps og frø
Metconazol	2003-	Hovedsageligt anvendt til rapssygdomme
Epoxiconazol	2003-	Anvendt i korn, roer, majs og frø
Difenoconazol	2005-	Hovedsageligt til kartofler og grønsager
Prothioconazol	2006-	Hovedsageligt anvendt i korn

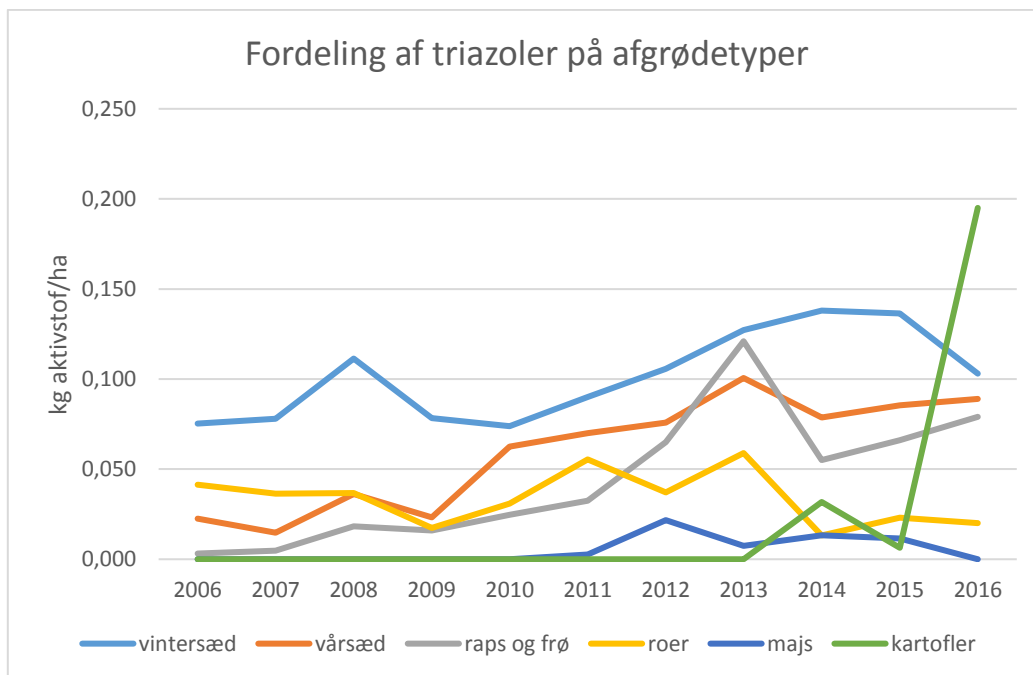
Overordnet set var der en nedgang i anvendelsen af azoler fra slutningen af 1990'erne til omkring 2005, hvor strobilurinerne kom på markedet og i løbet af kort tid kom til at dominere markedet. Siden steg brugen af azoler igen i takt med, at der udvikledes resistens overfor strobilurinerne over for de vigtigste plantesygdomme (bl.a. septoria og meldug). Den markante stigning i forbruget i de senere år i korn og raps skyldes udbredte angreb af septoria - den mest tabsvoldende sygdom i korndyrkningen - og aftagende effekter af azolerne på grund af stignende grad af resistensdannelse, som har påvirket doseringerne i opadgående retning. Stigningen af forbruget i raps hænger sammen med mere udbredte angreb af især knoldbægersvamp i de senere år. Variationer i det årlige forbrug er desuden påvirket af klimaet og det aktuelle sygdomsniveau i sæsonen (f.eks. udbredt angreb af gulrust i 1989-91). Generelt har der over en 10-årig periode været en fordobling af forbruget af fungicider, hvor det i de seneste år har ligget på omkring 200 tons/år.



Figur 4: Salget af azoler (minus imidazoler) anvendt som sprøjtemiddel fra 1979 til 2016 opdelt på de enkelte aktivstoffer samt den samlede sum.

Ud fra "Bekæmpelsesmiddel-statistikken" er de solgte mængder aktivstof fordelt på de store afgrødegrupper jvf opgørelserne i statistikken (figur 5). Opdelingen af azol-forbruget på specifikke afgrødetyper i de sidste 10 år har vist en betydelig forskel imellem behandlingsintensiteten i afgrødegrupperne. Opdeling på afgrødetyper bygger siden 2011 på data fra de indsamlede sprøjtejournaler. Forbruget af azoler er størst i vintersæd, ca. 100 g/ha/år; mens det i vårsæd og raps/frøafgrøder i gennemsnit har ligget på henholdsvis 57 og 41 g/ha/år. Anvendelsen i sukkerroer ligger på ca 35 g/ha/sæson, mens forbruget i kartofler og majs er yderst begrænset, dog er der i 2016 sket en markant stigning af difenoconazol i kartofler, som har haft stigende problemer med bekæmpelse af *Alternaria* bladplet.

Imazalil er et bejdsemiddel der bruges til beskyttelse imod udsædsbårne sygdomme på kernerne. Anvendelsen er hovedsageligt sket i byg.



Figur 5: Fordeling af anvendte azoler (kg aktivstof/ha) på afgrøder i en 10 årige periode 2006-2015.

Det skal bemærkes, at der i Danmark generelt er stort fokus på problemer omkring resistensudvikling, da man ønsker at bevare effektive plantebeskyttelsesmidler, ligesom det af økonomiske årsager er bedst at sprøjte så effektivt/mindst som muligt. Der henvises til bilag 6 for en gennemgang af danske anbefalinger omkring sprøjteadministration og alternativer til azolerne.

Sammenfattende for landbrugets anvendelse af azol-fungicider kan det konkluderes, at midlerne har stor betydning, når man tilstræber at mindske risikoen for udbyttetab som følge af plantesygdomme i de store landbrugsafgrøder. Muligheden for alternative midler er yderst begrænset og stiller ofte krav til brug af blandinger med azoler for at mindske udviklingen af resistens i plantepatogene svampe.

Det anbefales generelt, at man tilstræber dyrkning af resistente sorter og anvendelse af en bred vifte af tiltag – herunder monitoring og behovsbaseret sprøjtning. Til trods for disse tiltag er nettotabet ved undladelse af sprøjtninger med azoler estimeret til mellem 100 -4.000 kr/ha afhængigt af afgrøden.

5.3 Frugtavl, gartnerier og planteskoler

5.3.1 Brug af azoler i gartneri-erhvervet

Gartnerierhvervet dækker væksthushusholdninger (grønsager og potteplanter), planteskoler, frugt og bæravl samt frilandsgrønsager. Afhængig af hvilken afgrøde, der er tale om, dækker anvendelsen over en bekæmpelse af et vidt spænd af sygdomme (rust, meldug, bladpletsygdomme).

Tabel 5 viser hvilke sygdomme og azoler, der bruges i forskellige afgrøder. Tal fra sprøjtejournalerne i 2017 har vist, at ca. 8.000 ha behandles med azoler inden for disse havebrugskulturer (tabel 5 og 6) (Ørum, pers. Comm). Propiconazol anvendes i mindre grad, og har haft anvendelser på friland til prydplanter, i

planteskoler og frugt og bær. Dette produkt er under generel udfasning. Tebuconazol bliver anvendt til bekæmpelse af sygdomme i frugt og bær, mens difenoconazol bruges bredt især i frilandsgrønsager og kernefrugt.

Tabel 5: Tabel med anvendelser af azoler til gartnerierhvervet (kilde: Kemikaliestatistikken). Stoffer angivet med fed skrift er stoffer, der er vist at være involveret i den hyppigst forekommende krydsresistens i *A. fumigatus*.

Område	Bekæmpelsesformål	Aktivstoffer
Frilandsgrønsager	Diverse sygdomme i Gulerødder, kål, løg, mm	Difenoconazol + azoxystrobin Tebuconazol (porre og purløg)
Jordbær plus diverse bær	Meldug, rust	Propiconazol, Tebuconazol
Æbler og pærer	Diverse sygdomme, skurv, gråskimmel, mm	Difenoconazol,
Planteskoler	Diverse sygdomme,	Propiconazol
Væksthus grønsager	Diverse sygdomme,	Difenoconazol + azoxystrobin
Potteplanter Mange arter	Vækstregulering	Paclobutrazol
Potteplanter	Vækstregulering	Metconazol (i blanding med mepiquat- chlorid)

Tabel 6: Behandlingshyppighed med azoler i havebrugskulturer (sprøjtejournaler 2017)

	Æbler og pærer	Øvrige træfrugter	Jordbær	Solbær, stikkelsbær, ribs og blåbær	Øvrig frugt og bær	Planteskole mv., friland
I alt ha	1340	254	1096	597	442	1715
	BH (BI pr. ha)					
Tebuconazol		0,38		0,82	0,00	0,14
Difenoconazol	0,70					0,51
Metconazol						
Epoxiconazol						0,01
Propiconazol			3,30	1,45	0,00	0,49
Prothioconazol						0,00

5.3.2 Brug af paclobutrazol til vækstregulering af potteplanter.

Paclobutrazole er ligeledes en azol og godkendt til vækstregulering af en lang række potteplantekulture. Disse dækker kulturer som roser, azalea, pelagonier, julestjerner, kalanchoe, chrysanthemums, m.fl.

Koncentrationer ved behandling varierer mellem 0,02 og 1% afhængigt af de enkelte arters og sorts respons og avlernes ønske om regulering. Der behandles fra få gange til ugentlig behandlinger afhængigt af kulturen, udviklingstrinet, tiden på året og sorten. Paclobutrazol optages af planterne og reducerer plantehøjden, således at potteplanterne fremstår mere kompakte og robuste med mørkere grønne blade.

Produktet har en koncentration på 4 g/l. Jævnfør bekæmpelsesmiddelstatistikken er der i de senere år solgt mellem 4-36 kg. Et gennemsnit på ca. 25 kg per år svarer til 6250 l produkt. En mængde der svarer til behandling af et areal svarende til omkring 20-30 ha. Afhængigt af arten findes der i visse kulturer få alternativer bl.a. Cycocel (Chlormequat –chlorid), ethepon og mepiquat-chlorid, samt et blandingsprodukt af metconazole + mepiquat-chlorid.

Studier har vist, at paclobutrazol kun har meget begrænset aktivitet over for *A. fumigatus*. Da midlet samtidig bruges i meget lave og fortyndede koncentrationer (4 mg/L), vurderes det højst usandsynligt, at det har effekt på svampen og dens resistensudvikling. Dette understøttes af, at følsomme og miljøresistente *A. fumigatus* med TR₃₄/L98H mekanismen har vist samme lave sensitivitet over for dette middel, hvilket indikerer, at midlet er neutralt i forhold til at selekttere for (i hvert fald denne) resistens (Snelder et al 2012).

5.3.3 Blomsterløg fra Holland

På baggrund af erfaringerne fra Holland vides det, at der er betydelige rest-koncentrationer af især prothioconazole, men også af små mængder af tebuconazole og prochloraz, epoxoconazole og propiconazole i Hollandsk løg-kompost. Dette hænger sammen med, at en række azoler er godkendt til behandling af blomsterløg med dypning i Holland, inkl. bl.a. tebuconazol, prothioconazole, prochloraz. Azolbehandlingen anvendes med henblik på at bekæmpe især *Fusarium* svampe, der kan være hæmmende for god opbevaring og spiring.

Holland står for 75% af den globale produktion af blomsterløg, herunder med en betydelige eksport til Danmark. Baseret på udtræk fra Danmarks Statistiks database over udenrigshandel ses der fx, at den danske import af blomsterløg fra Nederlandene i 2017 udgjorde 2.670 tons, svarende til 84 % af den samlede import¹. Der findes ingen danske undersøgelser, der viser om hollandske løg indeholder miljøresistente *A. fumigatus* svampe, men undersøgelser fra Irland har vist, at hollandske blomsterløg på irske planteskoler indeholdt sådanne miljømutationer (Dunne et al, 2017)

5.4 Træbeskyttelse og anden materialepræservering (biocider)

I Danmark og EU reguleres godkendelse af biocider ifølge Biocidforordningen (EU) 528/2012.

Af azolerne er aktivstoffet propiconazol godkendt til anvendelse i produkttyperne (PT) 7 (konserveringsmidler til overfladefilm), 8 (træbeskyttelsesmidler) og 9 (beskyttelsesmidler til fibermaterialer, læder, gummi og polymeriserede materialer). Aktivstoffet tebuconazol godkendt til anvendelse i PT 7, PT 8 og PT 10 (midler til beskyttelse af byggematerialer).

¹ Opgørelsen er baseret på udtræk fra Danmarks Statistik over import fra Nederlandene i 2017 af følgende: Hyacintløg, narcisseløg, tulipanløg, gladiolusløg samt løg, rod-og stængelknolde, rodstokke og jordstængler (både i og ikke i vækst eller blomst). Ikke spiselige løg mv.

Desuden er cyproconazol og thiabendazol godkendt i PT 8, mens thiabendazol stadig er under vurdering i PT 7, PT 9 og PT 10.

Der findes i Danmark godkendte træbeskyttelsesmidler med propiconazol og tebuconazol, og tabel 7 viser de solgte mængder for årene 2010-2016. For cyproconazol og thiabendazol er der ikke træbeskyttelsesmidler godkendt i Danmark. Herudover kan der være produkter, som ikke er godkendelsespligtige endnu samt behandlede artikler (for eksempel maling), som ikke er godkendelsespligtige, og hvor salget derfor ikke opgøres.

Af tabellen ses at salget af træbeskyttelsesmidler med propiconazol har været stigende i årrækken, mens salget af produkter med tebuconazol har været mere stabilt med et mindre fald nogle år.

Tabel 7: Samlet salg fra bekæmpelsesmiddelstatistik, uddrag fra 2016 (solgte mængder aktivstof i kg)

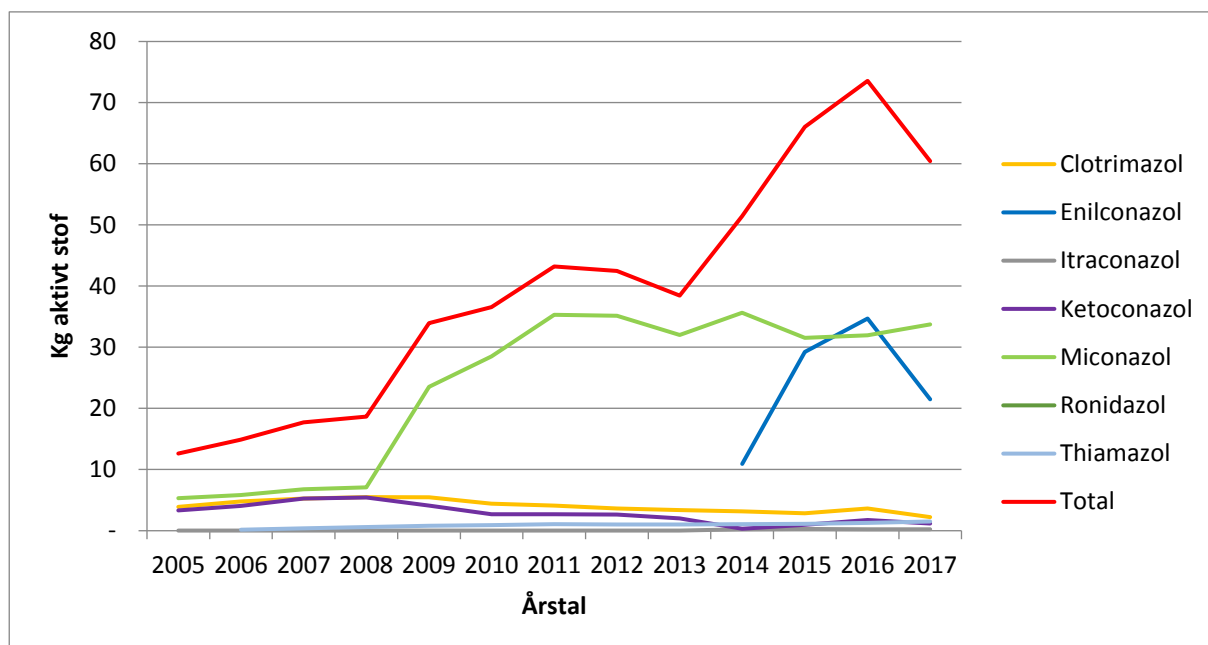
Aktivstofnavn	Anvendelse	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Propiconazol	Træbeskyttelse	4.525	3.324	5.070	3.836	4.902	5.842	6.285
Tebuconazol	Træbeskyttelse	2.032	1.669	1.311	1.205	1.649	1.271	1.574

Azolerne propiconazol og tebuconazol bruges i vid udstrækning til træbeskyttelse både til trykimprægnering og til overfladebehandling for at bekæmpe svampe og råd. Til trykimprægnering bruges azoler - i nogle tilfælde i kombination med kobberforbindelser eller insekticider - og kan ikke umiddelbart erstattes af andre godkendte organiske biocidaktivstoffer. Azoler indgår også i overfladebehandling til træbeskyttelse både i grunder, og maling og kan ikke på nuværende tidspunkt umiddelbart erstattes af alternativer. De to aktivstoffer er blevet søgt om fornyelse i EU i PT 8 (iht. EU forordning 528/2012), mens optaget i de resterende produkttyper først skal fornyes i 2025 eller 2026. Ved fornyelsen af aktivstofferne kan der komme skærpede kriterier på baggrund af risikovurderingen.

5.5 Veterinært

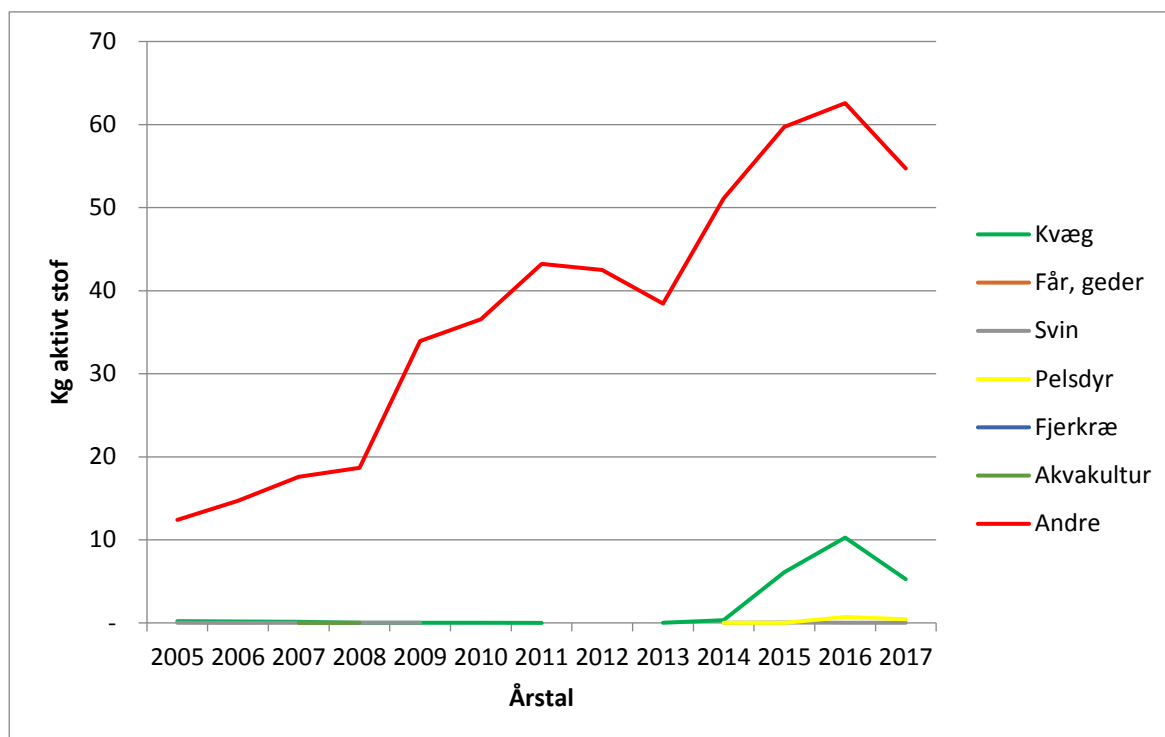
Fødevarestyrelsen har – med hjælp fra Lægemiddelstyrelsen - opgjort forbruget af azoler anvendt til veterinært brug i perioden 2005-2017. Fødevarestyrelsen har udtrukket data fra den danske veterinære medicindatabase VetStat, som indeholder oplysninger om salg af receptpligtige veterinære lægemidler i Danmark. Det bemærkes, at datagrundlaget er dynamisk, hvorfor de nedenfor nævnte tal kan ændre sig over tid, idet der efterfølgende kan foretages rettelser i datagrundlaget på grund af indtastningsfejl, forsinkede opdateringer, nye afgørelser m.v.

Af figur 6 fremgår det, at der overordnet har været en stigning i forbruget af azoler siden 2005. I 2005 blev anvendt ca. 13 kg aktivt stof, hvor der i 2017 blev anvendt ca. 60 kg aktivt stof. Det samlede veterinære forbrug af azoler har indtil 2017 holdt sig under 74 kg aktivt stof om året. Det er primært Miconazol der har været anvendt i perioden 2005 til 2013. I perioden 2014 til 2017 har Miconazol og Enilconazol været de primært anvendte azoler i den veterinære sektor. Enilconazol er identisk med imazalil, der bruges som et azol-fungicid primært til bejdsning af byg.



Figur 6: Salget af azoler anvendt til veterinært brug i perioden 2005-2017 opgjort i kg aktivt stof.

Figur 7 viser forbruget af azoler fordelt på dyrearter i perioden 2005-2017. Af figuren fremgår det, at størstedelen af forbruget af azoler til veterinær anvendelse er brugt til gruppen "andre". Gruppen "andre" er det totale forbrug fratrukket kvæg, får/geder, svin, mink, fjerkræ og akvakultur og udgøres derfor væsentligst af arterne hund, kat og hest, dvs. dyrearter, hvor der er tæt kontakt med mennesker. Der er imidlertid ikke nogen viden om, til hvilke behandlinger produkterne anvendes, da dyrlæger ikke er forpligtet til at indberette oplysninger om anvendelse eller udlevering af medicin til ikke- produktionsdyr. På den baggrund kan arbejdsgruppen heller ikke vurdere, hvor sandsynligt det er, at azolerne kommer i kontakt med *A. fumigatus*. *A. fumigatus* er dog ikke en del af hverken menneskers eller dyrs normale mikroflora, men lungeinfektioner med *Aspergillus* er kendt fra bl.a. kalkuner, hvor man fra udlandet rapporterer om behandlinger med enilconazol i besætninger. Der er kun få kendte resistensproblemer med *A. fumigatus* inden for husdyr, men enkelte eksempler er beskrevet hos papegøjer, jagtfalke og gæs (Jacques Guilot per.com).



Figur 7: Forbruget af azoler til veterinært brug i perioden 2005-2017 fordelt på dyreart opgjort i kg aktivt stof.

5.6 Kosmetikindustri

Kosmetikreglerne fastsætter krav til visse typer af ingredienser. Eksempelvis må man kun anvende de farvestoffer, konserveringsmidler og UV-filtre, der fremgår af Kosmetikforordningens ((EF) Nr. 1223/2009) positivlister. Omvendt findes der en negativliste med alle de stoffer, der er forbudt at anvende og en begrænsningsliste med stoffer, der kun må anvendes til særlige formål og i bestemte koncentrationer. Stofferne er ordnet i forskellige bilag. Den eneste azol forbindelse der er tilladt at anvende i kosmetiske produkter er Climbazole (CAS 38083-17-9). Climbazole er anført i bilag 5, som er positivlisten over konserveringsmidler og må for nærværende anvendes i op til 0,5 % i alle kosmetiske produkter. I efteråret 2019 finder en skærpelse af kravene til climbazole anvendelse. Herefter må climbazole kun anvendes som konserveringsmiddel i hårlotion, ansigtscreme og fodplejeprodukter i op til 0,2 % og i shampoo op til 0,5 %. Udover skærpelsen af kravet til climbazole som konserveringsmiddel, skærpes kravet til anvendelse af climbazole til andre anvendelser, da det fremover kun tillades i skælshampoo i op til 2 % som skælbekæmpende middel.

5.7 Slam (rensningsanlæg)

Miljøstyrelsen er ikke bekendt med undersøgelser af forekomsten af azoler i danske rensningsanlæg. Studier fra Kina og Schweiz har analyseret for forskellige azoler i rensningsanlæg. I begge studier blev der fundet azoler fra lægemidler, og i studiet fra Schweiz også azoler fra biocider i spildevandet. Studierne viser, at stofferne fluconazol, der benyttes i medicin (men ikke har nogen effekt over for *A. fumigatus*), og propiconazol og tebuconazol, der benyttes som azol-fungicider og biocider, ikke nedbrydes i rensningsanlægget, og dermed kan stofferne være til stede i spildevandsslam.

Ifølge rapporten "Livscyklusvurdering og samfundsøkonomisk analyse for anvendelse af spildevandsslam" (Miljøprojekt nr. 1459, 2013) blev der i Danmark i 2009 produceret ca. 144.000 tons tørstof slam fra de kommunale og private rensningsanlæg. Heraf blev ca. 75.000 tons tørstof (52%) udspredd på landbrugsjord, ca. 34.000 tons tørstof (24%) til forbrænding, ca. 17.000 tons tørstof (12%) til slam-mineraliseringsanlæg, ca. 835 tons tørstof (1%) til deponi, ca. 9.900 tons tørstof (7%) til eksport og ca. 5.600 tons tørstof (4%) til andet. Baseret på udenlandske undersøgelser kan det ikke afvises, at azoler ender i spildevandsslam, som kan ende på landbrugsjord, men der foreligger ingen danske undersøgelser eller informationer om sådanne forekomster.

5.8 Fødevarer, herunder importerede

Fødevarestyrelsen har med bidrag fra DTU Fødevareinstituttet oplyst, at der er beregnet følgende eksponering med triazoler fra fødevarer på det danske marked:

Tabel 8. Eksponering fra fødevarer på det danske marked og Hazard Quotienter for triazoler for børn 4-6 år og voksne 15-75 år

Pesticide	Børn 4-6 år		Voksne 15-75 år	
	Eksponering µg/kg bw/day	Hazard Quotient %	Eksponering µg/kg bw/day	Hazard Quotient %
Bitertanol	0,024	0,79	0,0075	0,25
Cyproconazole	0,00071	0,0035	0,00037	0,0019
Difenoconazole	0,041	0,41	0,016	0,16
Diniconazole	0,00069	0,0014	0,00019	0,00038
Epoxiconazole	0,0059	0,074	0,0015	0,018
Fenbuconazole	0,0026	0,043	0,0011	0,018
Flusilazole	0,0042	0,21	0,0011	0,057
Flutriafol	0,022	0,22	0,0071	0,071
Hexaconazole	0,0012	0,024	0,00055	0,011
Myclobutanil	0,026	0,10	0,0064	0,026
Penconazole	0,012	0,04	0,0028	0,0094
Propiconazole	0,012	0,03	0,0045	0,011
Prothioconazole	0,0047	0,047	0,0013	0,013
Tebuconazole	0,072	0,24	0,024	0,081
Tetraconazole	0,0012	0,03	0,00033	0,0083
Triadimefon (sum)	0,034	0,068	0,012	0,023
Total	0,26	2,33	0,087	0,76
HQ, max	0,072	0,79	0,024	0,25
HQ, min	0,00069	0,0014	0,00019	0,00038

Opgørelsen er baseret på overvågningsrapporten for perioden 2012-2017 (Jensen, B.H. *et al.* Pesticide Residues. Results from the period 2012 - 2017. DTU Fødevareinstituttet (*in prep.*)), hvor der i alt er fundet 67 forskellige fungicider, herunder 16 azoler. Kun 5 af de 16 undersøgte triazoler er godkendt i Danmark, de

Øvrige på listen må tilskrives fund i udenlandske fødevarer. Det konstateres dog, at de stoffer, som er associeret med resistensudvikling af TR₃₄/L98H i *A. fumigatus* (fremhævet med fed), også er der, hvor der er den største eksponering. Det gælder navnlig for difenoconazol og tebuconazol, der står for hhv. ca. 43 % og 46 % af den samlede fødevareeksponering af børn (4-6 år) og voksne (15-75 år) for azoler i perioden 2012-17.

Som det fremgår er indtaget triazoler via kosten for børn (4-6 år) gennemsnitligt 0,3 ug (mikrogram) per kilo kropsvægt per dag, mens det tilsvarende tal for voksne er 0,1 ug. Det svarer til 6 ug per barn/dag og 8 ug per voksen/dag.

Fødevarestyrelsen har oplyst, at en risikovurdering (ved Hazard Index-metoden) af de estimerede indtag indikerer, at der ikke er en sundhedsmæssig risiko for indtag af fungicider fundet i den danske overvågning i perioden 2012-2017, alene såvel som i kombination, for både børn og voksne. Vurderingen relaterer sig ikke til spørgsmålet om resistens.

5.9 Industrikemikalier

Producenter og importører har pligt til at registrere kemiske stoffer, der produceres eller importeres i mængder over 1 ton pr. år hos EU's kemikalieagentur (ECHA). Det gælder også kemiske stoffer i blandinger og visse artikler. I forbindelse med registreringen skal der leveres data om stoffernes miljø- og sundhedsskadelige egenskaber. Industrikemikalier kan også indeholde azolforbindelser, men da de ikke er omfattet af en godkendelsespligt, findes der ingen opgørelse over, hvilke azolforbindelser, der anvendes eller i hvor store mængder.

Bl.a. er 1,2,4-triazol et udbrudt industrikemikalie, og det kan ikke udelukkes, at anvendelsen kan føre til eksponering i miljøet. Det er ikke kendt, om 1,2,4-triazol potentielt er aktivt over for *A. fumigatus*, og hvorvidt stoffet kan være en kilde til selektion for resistens.

1,2,4-triazol kan desuden anvendes som nitrifikationshæmmer (mindske udvaskning af kvælstof) i landbruget. Anvendelsen i Danmark vurderes umiddelbart at være relativt begrænset. Nogle studier indikerer, at der kan ske en naturlig dannelse af 1,2,4-triazol i jorden. For flere detaljer henvises til notat om mulige kilder til 1,2,4-triazol, der er oversendt til Folketinget i forbindelse med oversendelse af sammendrag af rapporten "Varslingssystemet for udvaskning af pesticider til grundvand – monitoringsresultater med fokus på juli 2013–juni 2016" i december 2017. Miljøstyrelsen er i gang med en nærmere undersøgelse af kilder til 1,2,4-triazol i miljøet.

5.10 Sammenskrivning af forbrug og eksponering

Gennemgangen af forbrug og anvendelse af azolmidler viser, at der er forskel på de midler, der anvendes i human medicin, primært, fluconazol, itraconazol, voriconazol og posaconazol, og de midler, der anvendes til andre formål, primært som fungicider i landbrug og gartneri, samt i træbeskyttelsesmidler. Der er en større grad af sammenfald mellem det humane og veterinære forbrug. I forhold til de anvendte mængder er det ikke hensigtsmæssigt at sammenstille på tværs af sektorerne, da anvendelsen sker i forskellig form, koncentrationer og under forskellige betingelser.

I dansk landbrug anvendes aktivstofferne tebuconazol, propiconazol, epoxiconazol, difenoconazol, prothioconazol og metconazol samt imazalil og paclobutrazol. Bromuconazol, et af de 5 stoffer, der er identificeret som relateret til udviklingen af den hyppigst forekommende miljøresistenstype, anvendes ikke i Danmark.

Der har over en 10 årig periode været en fordobling af forbruget af azol-fungicider, hvor det i de seneste par år har ligget på omkring 200 tons/år. Stigningen skal ses i sammenhæng med en nedgang af et af de kemiske alternativer – strobilurinerne – der har vist sig hurtigt at udvikle resistens over for de vigtigste plantesygdomme. Siden 2013 har prothioconazol – været mest anvendt. Dette azol er ikke associeret med mulig selektion for resistent *A. fumigatus* af typen TR₃₄/L98H, hvor data har vist, at prothioconazol har lav effekt og selektion i forhold til TR₃₄/L98H. Det vides ikke, hvilken effekt dette aktivstof har i forhold til de andre miljømutationer.

Som pesticid forbydes propiconazol i EU og Danmark efter 2019 sæson. Desuden står både epoxiconazole, tebuconazol og difenoconazol over for revurdering i nærmeste år (EU 1107/2009). Forventningerne er, at azolerne epoxiconazol, tebuconazol og difenoconazol vil være under pres, når de skal leve op til de skærpede sundhedsmæssige kriterier, men først i løbet af 2020-21 vil der komme klarhed om disse midlers fremtidige registreringsmæssige situation.

Difenoconazol anvendes mest inden for gartnerierhvervet og paclobutrazol må kun anvendes i væksthuse i prydplanter. Man har vist, at sidstnævnte stof ikke er særligt aktivt over for *A. fumigatus* i de anvendte koncentrationer. I 2017 blev 8.000 ha behandlet med azoler inden for havebrugskulturer.

I forhold til brug inden for materialepræservering anvendes azolerne propiconazol og tebuconazol også som biocider i produkter til træbeskyttelse. Generelt er der sket en stigning i forbruget af træbeskyttelsesmidler med propiconazol, mens forbruget af træbeskyttelsesmidler med tebuconazol har været mere stabilt med et mindre fald.

Propiconazol er endvidere godkendt til anvendelse i produkttyperne (PT) 7 (konserveringsmidler til overfladefilm) og 9 (beskyttelsesmidler til fibermaterialer, læder, gummi og polymeriserede materialer), mens tebuconazol yderligere er godkendt til anvendelse i PT 7 og PT 10 (midler til beskyttelse af byggematerialer). Desuden er cyproconazol og thiabendazol godkendt i PT 8, mens thiabendazol stadig er under vurdering i PT 7, PT 9 og PT 10. Propiconazol og tebuconazol er søgt fornyet som aktivstof i PT 8, hvor kravene til anvendelsen kan skærpes på baggrund af risikovurderingen.

Inden for veterinærmedicin anvendes fem azoler, der er identiske med humane azollægemedler, hvor det dog kun er stoffet itraconazol, der også er et vigtigt stof til at behandle humane *A. fumigatus* infektioner. Generelt er der tale om et stigende forbrug, dog er den veterinære anvendelse af itraconazol meget begrænset. Til gengæld anvendes de azolholdige lægemidler primært til hobbydyr, hvor der er tæt kontakt med mennesker (hund, kat og hest), men der er ikke nogen viden om, til hvilke behandlinger produkterne anvendes (herunder om det er sandsynligt, at de kommer i kontakt med *A. fumigatus*), da *A. fumigatus* er dog ikke en del af hverken menneskers eller dyrs normale mikroflora.

Azolerne anvendes også inden for andre områder bl.a. i kosmetik og i industrikemikalier (som kemisk stof). I forhold til kosmetiske produkter er det kun tilladt at anvende ét enkelt azolprodukt, Climbazole. Det vides

ikke, om Climbazole har nogen selektiv effekt over for *A. fumigatus*. I efteråret 2019 bliver kravene til anvendelsen af climbazole skærpet. Herefter må climbazole kun anvendes som konserveringsmiddel i hårlotion, ansigts- og fodcreme i op til 0,2 % og i shampoo op til 0,5 %. Udover skærpelsen af kravet til climbazole som konserveringsmiddel skærpes kravet til anvendelse af climbazole til andre anvendelser, da det fremover kun tillades i skælshampoo i op til 2 % som skælbekæmpende middel.

Anvendelser som industrikemikalier er ikke omfattet af godkendelses- og registreringspligt, hvorfor der ikke her findes opgørelser over, hvilke azolforbindelser, der anvendes eller i hvor store mængder. Bl.a. er 1,2,4-triazol et udbrudt industrikemikalie, og det kan ikke udelukkes, at anvendelsen kan føre til eksponering i miljøet. Det er ikke kendt, om 1,2,4-triazol potentielt er aktivt over for *A. fumigatus*, og på den vis kan ses, som en kilde til selektion for resistens.

Som følge af den alsidige anvendelse af azoler kan restkoncentrationer forventeligt findes i miljøet og i lave restkoncentrationer på fødevarer. En lang række forskellige azolforbindelser er fundet som restkoncentrationer i fødevarer på det danske marked, hvor tebuconazol og difenoconazol står for hhv. ca. 43 % og 46 % af den samlede fødevareeksponering af børn (4-6 år) og voksne (15-75 år) for triazoler i perioden 2012-17.

Udenlandske undersøgelser viser fund af azoler, herunder tebuconazol, i rensningsanlæg, og dermed kan det ikke udelukkes at stofferne også er til stede i spildevandsslam. Der er ikke foretaget danske undersøgelser af azol-restindhold i danske rensningsanlæg og/eller spildevandsslam.

6.0 Sammenhæng mellem azolresistens og brug af azolmidler i miljøet

Det er arbejdsgruppens opfattelse, at den nuværende, overvejende udenlandske, litteratur har dokumenteret, at der er en sammenhæng mellem anvendelsen af azolmidler i miljøet og den udvikling af miljøresistens, der er konstateret hos *A. fumigatus* hos patienter. Disse miljømutationer kan lede til behandlingssvigt hos ofte kritisk syge patienter, fordi de azolholdige lægemidler bliver virkningsløse. Følgende argumenter understøtter dette synspunkt:

- 1) Azolresistens er påvist hos patienter, der ikke tidligere har været i behandling med azollægemidler (azolnaive patienter). Da patienter udsættes for *A. fumigatus* primært gennem inhalation af *A. fumigatus* sporer, tyder dette på, at der findes resistente sporer i luften. Samtidig er *A. fumigatus* infektion ikke en smitsom sygdom, hvorfor det er usandsynligt, at der er sket patient-til-patient smitte med *A. fumigatus* isolater (og dermed resistens mekanismer).
- 2) I nogle patienter med resistens opstået under medicinsk behandling, har man ved sammenligning påvist, at de tidligere følsomme isolater har samme genetiske baggrund som efterfølgende resistente isolater. Dette tyder på, at resistensen er opstået på grund af påvirkning af det medicinske azol. I modsætning hertil har man aldrig påvist en identisk eller nært beslægtet følsom *A. fumigatus* fra en patient, der har en af de miljøresistente typer, hvilket understøtter, at der er tale om en udefra kommende kilde.
- 3) To specifikke dominante resistensmekanismer (TR₃₄/L98H og TR₄₆/Y121F/T289A) er påvist hos azolnaive patienter og samtidig i miljøet. Sådanne isolater er fundet i jord, blomsterløg og bede, luftprøver og kompost fra alle 5 kontinenter, herunder i begrænset, men stigende omfang i Danmark. Miljømutationer er hovedsageligt isoleret fra intensivt azol-behandlede kulturer eller jorde.
- 4) De to resistensmekanismer er væsentligt forskellige fra den brede vifte af forskellige resistensmekanismer, der er fundet hos patienter, hvor resistens er opstår under medicinsk azolbehandling. Forskelligheden består dels i, at de indeholder en TR region (tandem repeat), som man ikke ser hos patienter, hvor resistens opstår under behandling, og dels viser genotypning, at de er forskellige.
- 5) Undersøgelser har vist, at særligt 5 azol-fungicider/biocider er molekylært opbygget på samme måde som medicinske azoler. Samtidig hæmmer de følsom *A. fumigatus*, men ikke den hyppigste miljøresistente variant TR₃₄/L98H og passer godt ind i angrebepunktet i *A. fumigatus* sammenlignet med de medicinske azoler. Det drejer sig om propiconazol, tebuconazol, epoxiconazol, difenoconazol og bromuconazol. Hvorvidt andre azoler kan selekterer for andre miljømutationer, er endnu ikke undersøgt.
- 6) De 5 nævnte azolfungicider blev introduceret i Holland mellem 1990 and 1996, og dermed før det første TR₃₄/L98H isolat blev påvist i en klinisk prøve i Holland i 1998. I Danmark har propiconazol været meget udbredt siden begyndelsen af 1980'erne, mens de øvrige blev introduceret fra ca. 2000.

Arbejdsgruppen har samtidig noteret, at der er meget begrænset viden om, hvilke erhvervsmæssige anvendelser, der er mest kritiske i forhold til udvikling af disse miljømutationer. Der er som nævnt konstateret en sammenhæng mellem særligt den dominerende resistente miljøvariant TR₃₄/L98H og anvendelse af 5 specifikke azolmidler, men der er ikke meget viden om, hvilke mængder og evt. under hvilke forhold, der udvikles resistens. Der er heller ikke viden om, hvorvidt disse 5 også er hovedansvarlige for udbredelsen af de øvrige miljøresistente *A. fumigatus* typer.

Det er forventeligt, at der generelt er en sammenhæng mellem forbrug og udvikling af resistens under forudsætning af, at den specifikke azol er aktivt over for *A. fumigatus* og koncentrationen i miljøet er høj nok til at generere et selektionspres. De hollandske undersøgelser peger på, at risikoen er høj i nogle miljøer (fx løgkompost), men ikke i andre. Det er vurderingen, at de hollandske erfaringer ikke kan overføres til danske forhold, bl.a. fordi planteproduktion og fungicid/pesticidanvendelsen i Holland er meget forskellig fra Danmark. Det kan dog konstateres, at 4 ud af de 5 fungicider, der udpeges som kritiske i forhold til udvikling af miljømutationer også anvendes i Danmark, herunder i et betydeligt omfang inden for forskellige anvendelser i landbrug og gartneri.

Selvom problemstillingen omkring azolresistente *A. fumigatus*, herunder den særlige miljøtype, har været offentligt kendt siden 2007, har problemstillingen indtil videre primært været behandlet i Holland og på videnskabeligt plan. Der er således også meget lidt viden og beskrivelser af tiltag, der håndterer udfordringen. Generelt er det vurderingen, at der er behov for mere viden på området, herunder om hvilken anvendelse og stofgrupper, der bidrager mest til problemet, og om der er andre forhold, fx omkring sæson, intensivitet, koncentrationer mv. der forstærker eller mindsker udviklingen af resistensmekanismerne.

I ECDC rapporten fra 2013

<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/risk-assessment-impact-environmental-usage-of-triazoles-on-Aspergillus-spp-resistance-to-medical-triazoles.pdf>

konkluderes det også, at der er behov for mere viden – særligt overvågning på området, herunder også flere miljøundersøgelser, både i landbruget men også inden for andre områder med intensivt brug. I næste afsnit gennemgås arbejdsgruppens forslag til identifikation af områder, hvor der er behov for mere viden.

6.1 Behov for mere viden

Arbejdsgruppen vurderer, at nedenstående punkter kan have betydning for udvikling og selektion af azolresistens i *A. fumigatus* og med fordel kan undersøges nærmere:

1. I plantepatogene svampe har man data for, at meget høje koncentrationer af pesticider øger risikoen for resistensudvikling (Van den Boss et al 2014), mens det omvendte generelt er erfaringen i humanmedicin (data primært fra *Candida*). Derimod er der ikke meget viden om, hvilken effekt høj versus lav azol fungicid påvirkning i miljøet (påvirknings koncentration, længde og hyppighed) har for udviklingen af resistens i *A. fumigatus* overfor humane azoler. Data på dette område kan være vigtige for at kunne prioritere yderligere undersøgelser og eventuelle indsatsområder.
2. Fem fungicid azoler er identificeret som formodede drivere af forekomst af TR₃₄/L98H miljøresistensvarianten. Det er uvist, om samme eller andre azolfungicider er væsentlige for udbredelse af de øvrige miljøresistente varianter, hvoraf TR₄₆/Y121F/T289A og TR₃₄³/L98H er påvist i Danmark. Undersøgelse af fungicidaktivitet over for disse mutanter kan bidrage til at afdække, hvilke azolstoffer, der er betydningsfulde for disse varianter. Det vil også være relevant at udføre eksponeringsforsøg, der viser forskellige azolers potentiale for at udvikle miljøresistens varianter.
3. Det er muligt, at der eksisterer andre former for hotspot end de kompostmiljøer, som er identificeret i Holland, men dette er ikke undersøgt i Danmark. En kortlægning af eventuelle hotspot i Danmark, hvor der tages højde for både danske produktionsmetoder kunne generere vigtig viden. I en sådan evt. kortlægning vil det også være relevant at undersøge, om der sker en introduktion af resistente *A. fumigatus* via importeret frugt og grønt, blomster, mm.

4. Hvilke landbrugs- og væksthusholdningsformer der har betydning for resistensudviklingen hos *A. fumigatus* er ikke kortlagt. Det vurderes relevant at undersøge for udvikling og selektion af resistens afhængigt af sprøjteintensitet/dosering af azoler, halmhåndtering samt ved anvendelse på hhv. mark flader, i havebrug og i væksthuse samt brug som træbeskyttelse.
5. Fortsat løbende monitorering af azolresistente *A. fumigatus* i patientprøver er vigtigt for at kunne afdække, om der er variation i forekomsten af resistens ift. årstid, klimatiske forhold, azoleksponering, planterest håndtering, mm.
6. I udenlandske studier er der fundet azol pesticidrester i slam fra rensningsanlæg. Om det samme gør sig gældende i spildevandsslam fra danske rensningsanlæg, som bliver recirkuleret som gødning på danske landbrugsarealer, er ikke kendt. Ved en kortlægning af niveauet af azoler i slam vil der kunne genereres data, som gør det muligt at vurdere potentialet for udvikling og selektion af azolresistens i slam.
7. For visse humane azoler og fungicid azoler findes der aktive nedbrydningsprodukter. Det er uvist, i hvilken udstrækning disse nedbrydningsprodukter fra azoler bidrager til udvikling og/eller selektion af resistens – fx 1,2,4-triazol.
8. Ikke alle relevante azoler, f.eks. climbazole som kan findes i visse kosmetikprodukter, der bruges i Danmark er undersøgt for aktivitet over for de forskellige miljømutationer af *A. fumigatus*. Disse kunne undersøges nærmere i forhold til, om de har et ukendt potentiale for selektion af resistens (i hvilke koncentrationer og under hvilke forhold), herunder effekten af nye azoler, som forventes introduceret. Desuden kunne effekten af andre non-azol fungiciders hæmning på *A. fumigatus* undersøges for at vurdere, om disse anvendt i blanding med azoler potentielt kan reducere risikoen for selektion af azolresistens i *A. fumigatus* i forhold til brugen af azol-fungicider alene.
9. Betydningen af brugen af industrikemikalier som f.eks. 1,2,4-triazol for udvikling af azol resistens er ukendt. Når resultaterne af Miljøstyrelsens undersøgelse af kilder til 1,2,4-triazol i miljøet foreligger, kunne relevansen af disse for udvikling af azolresistens i *A. fumigatus* vurderes.

7.0 Referencer

1. Denning, D. & Venkateswarlu, K. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1364–1368 (1997).
2. Denning, D. W. *et al.* Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 401–14 (1997).
3. Buied, a., Moore, C. B., Denning, D. W. & Bowyer, P. High-level expression of cyp51B in azole-resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 512–4 (2013).
4. Stensvold, C. R., Jørgensen, L. N. & Arendrup, M. C. Azole-Resistant Invasive Aspergillosis: Relationship to Agriculture. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **6**, 178–191 (2012).
5. Bueid, A. *et al.* Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 2116–8 (2010).
6. Camps, S. M. T. *et al.* Discovery of a hapE Mutation That Causes Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* through Whole Genome Sequencing and Sexual Crossing. *PLoS One* **7**, e50034 (2012).
7. Jensen, R. H. *et al.* Azole resistant *Aspergillus fumigatus* in Denmark: a laboratory based study on resistance mechanisms and genotypes. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 570.e1-570.e9 (2016).
8. Mortensen, K. L. *et al.* *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2243–51 (2011).
9. Verweij, P. E., Chowdhary, A., Melchers, W. J. G. & Meis, J. F. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? *Clin. Infect. Dis.* **62**, 362–8 (2016).
10. Astvad, K. M. T. *et al.* First detection of TR46/Y121F/T289A and TR34/L98H alterations in *Aspergillus fumigatus* isolates from azole-naïve patients in Denmark despite negative findings in the environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 5096–101 (2014).
11. Pelaez, T. *et al.* First detection of *Aspergillus fumigatus* azole-resistant strain due to Cyp51A TR46/Y121F/T289A in an azole-naïve patient in Spain. *New microbes new Infect.* **6**, 33–4 (2015).
12. Wu, C.-J. *et al.* Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates carrying TR34 /L98H mutations in Taiwan. *Mycoses* **58**, 544–9 (2015).
13. Nawrot, U. *et al.* Detection of Polish clinical *Aspergillus fumigatus* isolates resistant to triazoles. *Med. Mycol.* **56**, 121–124 (2018).
14. Mushi, M. F., Buname, G., Bader, O., Groß, U. & Mshana, S. E. *Aspergillus fumigatus* carrying

- TR34/L98H resistance allele causing complicated suppurative otitis media in Tanzania: Call for improved diagnosis of fungi in sub-Saharan Africa. *BMC Infect. Dis.* **16**, 16–21 (2016).
15. Alvarez-Moreno, C. *et al.* Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A and TR53 mutations related to flower fields in Colombia. *Sci. Rep.* **7**, 45631 (2017).
 16. Toyotome, T. *et al.* First clinical isolation report of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H-type mutation in Japan. *J. Infect. Chemother.* 50–52 (2017). doi:10.1016/j.jiac.2016.12.004
 17. Riat, A., Plojoux, J., Gindro, K., Schrenzel, J. & Sanglard, D. Azole Resistance of Environmental and Clinical *Aspergillus fumigatus* Isolates from Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e02088-17 (2018).
 18. Meis, J. F., Chowdhary, A., Rhodes, J. L., Fisher, M. C. & Verweij, P. E. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **371**, 20150460 (2016).
 19. Van der Linden, J. W. M. *et al.* Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1041–4 (2015).
 20. Snelders, E. *et al.* Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med.* **5**, 1629–1637 (2008).
 21. Chowdhary, A., Kathuria, S., Xu, J. & Meis, J. F. Emergence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains due to Agricultural Azole Use Creates an Increasing Threat to Human Health. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
 22. Bromley, M. J. *et al.* Occurrence of azole-resistant species of *Aspergillus* in the UK environment. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2**, 276–279 (2014).
 23. Tangwattanachuleeporn, M. *et al.* Prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment of Thailand. *Med. Mycol.* 1–7 (2016). doi:10.1093/mmy/myw090
 24. Onishi, K. *et al.* Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* Containing a 34-bp Tandem Repeat in cyp51A Promoter is Isolated from the Environment in Japan. *Med. Mycol. J.* **58**, 67–70 (2017).
 25. Chen, Y. *et al.* Epidemiology and Molecular Characterizations of Azole Resistance in Clinical and Environmental *Aspergillus fumigatus* from China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, AAC.01005-16 (2016).
 26. Isla, G. *et al.* First Clinical Isolation of an Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Isolate Harboring a TR46 Y121F T289A Mutation in South America. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, 1–5 (2018).
 27. Zhang, J. *et al.* A Novel Environmental Azole Resistance Mutation in *Aspergillus fumigatus* and a Possible Role of Sexual Reproduction in Its Emergence. *MBio* **8**, e00791-17 (2017).
 28. Bader, O. *et al.* Environmental isolates of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany.

- Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 4356–4359 (2015).
29. Alanio, A. *et al.* Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 371–4 (2011).
 30. Jeanvoine, A. *et al.* Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in sawmills of Eastern France. *J. Appl. Microbiol.* **123**, 172–184 (2017).
 31. Warris, A., Weemaes, C. M. & Verweij, P. E. Multidrug resistance in *Aspergillus fumigatus*. *N. Engl. J. Med.* **347**, 2173–4 (2002).
 32. van der Linden, J. W. M. *et al.* Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007–2009. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1846–1854 (2011).
 33. Steinmann, J. *et al.* Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. 1522–1526 (2015). doi:10.1093/jac/dku566
 34. Mortensen, K. L. *et al.* Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4545–4549 (2010).
 35. Snelders, E. *et al.* Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4053–7 (2009).
 36. Van Der Linden, J. W. M. *et al.* Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin. Infect. Dis.* **57**, 513–520 (2013).
 37. Prigitano, A. *et al.* Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment of northern Italy, May 2011 to June 2012. *Euro Surveill.* **19**, 20747 (2014).
 38. Chowdhary, A. *et al.* Clonal expansion and emergence of environmental multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR₃₄/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. *PLoS One* **7**, e52871 (2012).
 39. Vermeulen, E., Maertens, J., Schoemans, H. & Lagrou, K. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation emerging in Belgium, July 2012. *Euro Surveill.* **17**, pii=20326 (2012).
 40. Chowdhary, A., Sharma, C., Kathuria, S., Hagen, F. & Meis, J. F. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with the environmental TR46/Y121F/T289A mutation in India. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 555–71 (2014).
 41. Hollomon, D. (2017). Does agricultural use of azole fungicides contribute to resistance in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*? Pest management science.
<https://pdfs.semanticscholar.org/94b4/9cd00eda484e1871ccd833892c54f9b97879.pdf>
 42. Dunne, K., Hagen, F., Pomeroy, N, Meis, JF and Rogers, TR (2017) Inter-country Transfer of Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus* on Plant Bulbs. *Clinical Infectious Diseases®* 2017;65 (1):147–9.

43. Gisi U, Assessment of selection and resistance risk for demethylation inhibitor fungicides in *Aspergillus fumigatus* in agriculture and medicine: a critical review. *PestManag Sci* 70:352–364 (2014).
44. Anon 2015-2017 Azole resistance selection in *Aspergillus fumigatus* – Final report CLM, WU, Raboudumc.
45. Meneaul and Sanglard D, Azole and fungicide resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol* **43**(Suppl 1):S307–S311 (2005).
46. Ren J, Jin X, Zhang Q, Zheng Y, Lin D and Yu Y, Fungicides induced triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with mutations of TR46/Y121F/T289A and its appearance in agricultural fields. *J Hazard Mater* **326**:54–60 (2017).
47. Faria-Ramos I, Farinah S, Neves-Maia J, Tavares PR, Miranda IM, Estev- inho LM *et al.*, Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. *BMC Microbiol* **14**:155 (2014).
48. VAN DEN BOSCH, F., OLIVER, R. P., VAN DEN BERG, F. & PAVELEY, N. 2014a. Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics. *Annual Review Of Phytopathology*, 52, 175-195.
49. VAN DEN BOSCH, F., PAVELEY, N., SHAW, M., HOBBELEN, P. & OLIVER, R. 2011. The dose rate debate: Does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose? *Plant Pathology*, 60, 597-606.
50. Reiss, A & Jørgensen, LN (2016) Biological control of yellow rust (*Puccinia striiformis*) on wheat by *Bacillus subtilis* strain QST713. *Crop Protection*. 10.1016/j.cropro.2016.11.009)
51. Singh, RP; Singh, PK; Rutkoski, J, Hodson, DP, He,X; Jørgensen,LN; Hovmøller, MS, and Huerta-Espino, J. (2016) Disease impact on wheat yield potential and prospects of genetic control”, *Annu. Rev. Phytopathol.* 2016. 54:303–22
52. Gigot, C. Saint-Jeanba, S., Huber,C. Maumene, C, Leconte, M. Kerornou, B. and Vallery de Ile-Pope (2013)Protective effect of a cultivar wheat mixture against splash-dispersed septoria tritici blotch epidemics. *Plant Pathology* 62, 1011–1019
53. Heick TM. Justersen, A.F.; Jørgensen LN. (2017) Fungicide Spray Strategies Avoiding Resistance Development in Winter Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Crop Protection*. 99, 108-117
54. Jørgensen, LN, Oliver, R. Van den Bosch, F. Paveley, N.P. (2017) Targeting fungicides inputs according to need. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55 :181–203.

55. Jørgensen, L.N.; Hovmøller, M.S.; Hansen, J.G.; Lassen, P.; Clark, B.; Bayles, R.; Rodemann, B.; Jahn, M.; Flath, K.; Goral, T.; Czembor, J.; Cheyron, P.; Maumene, C.; Pope, C.; Nielsen, G.C. Berg, G (2014) IPM strategies and their dilemmas including an introduction to www.Eurowheat.org . Journal of Integrative Agriculture, Vol. 13, Nr. 2, 2014, s. 265-281. Doi. 10.1016/S2095-3119(13)60646-2.
56. Jensen, B.H. *et al.* Pesticide Residues. Results from the period 2012 - 2017. DTU Fødevareinstituttet (*in prep.*).
57. Snelders et al. (2012) Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. Plos One, 7, e31801.

Bilag 1 Kommissorium for arbejdsgruppen

Den 3. juli 2018

Kommissorium for tværfaglig arbejdsgruppe vedr. azolresistens

Baggrund

Statens Serum Institut (SSI) har siden 2007 påvist flere tilfælde af danske patienter, der har været i behandling for en svampeinfektion (*Aspergillus fumigatus*), hvor behandling har været vanskelig eller umulig som følge af resistensudvikling overfor stoffer tilhørende gruppen af azoler, der er førstevalg og det mest effektive stof til at behandle sådanne infektioner. En opgørelse fra 2014 viste, at 4 % af patienterne med svækket immunforsvar er resistente overfor *Aspergillus fumigatus*, mens data fra Nederlandene dokumenterer en forekomst af azol-resistens hos 80-90% af patienterne.

Da azoler samtidig anvendes i bl.a. landbruget til plantebeskyttelse, har der været rejst en bekymring for, at den udvikling af resistens, som også kendes her, kan sprede sig til mennesker via luften, da *Aspergillus fumigatus* findes naturligt i miljøet/luften. Bekymringen er beskrevet videnskabeligt flere steder, og i 2012 blev den første danske tværfaglige publikation på området udgivet: "Azole Resistant Invasive Aspergillus Relationship to Agriculture".

I 2013 har ECDC (European Center for Disease Control) behandlet emnet i en rapport:

<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/risk-assessment-impact-environmental-usage-of-triazoles-on-Aspergillus-spp-resistance-to-medical-triazoles.pdf>

Her er en af anbefalingerne, at der er behov for at afdække årsagerne til stigende azol resistens, herunder i miljøet og hvad det evt. medfører af klinisk betydning.

Problemstillingen omkring azol resistens har også været behandlet politisk i 2018, hvor de to ministre på området, hhv. Sundhedsministeren og Miljø- og Fødevareministeren, har tilkendegivet, at der er behov for mere viden på området, herunder tværfagligt samarbejde. Dette blev også konklusionen på et møde mellem sundhedsmyndighederne (Sundhedsstyrelsen og Statens Serum Institut) samt miljømyndighederne den 2. marts 2018, hvor der var enighed om at nedsætte en tværfaglig/ministeriel arbejdsgruppe på området.

Etablering af tværfaglig arbejdsgruppe

Arbejdsgruppen etableres på baggrund af mistanken om, at de azol-resistente *Aspergillus fumigatus* svampe, man finder i et stigende antal immunsvækkede patienter, oprindeligt kan stamme fra miljøet. Svampen *Aspergillus fumigatus* findes naturligt i miljøet (jorden), og der er en potentiel risiko for at fremme forekomsten af azol-resistente varianter, når man anvender azol-baserede sprøjtemidler i marken, der skal bekæmpe skadegørende svampe i afgrøden.

Inden for jordbrugsproduktionen udgør plantebeskyttelsesmidler indeholdende azoler den mest udbredte gruppe af svampemidler til bekæmpelse af plantepatogene sygdomme, og til mange områder findes ikke alternative midler eller metoder, som kan erstatte azolerne. Dertil kommer, at azoler forekommer i 80 % af alle træbeskyttelsesmidler, hvorfor disse midler også er væsentlige inden for denne branche, ligesom

øvrige kilder – herunder import af behandlet plantemateriale, industrikemikalier, veterinære og humane lægemidler – kan bidrage til azolforbindelser i miljøet.

Azolresistens i miljøet er således en kompleks problemstilling, hvor der er behov for at udpege kilder, hvor selektionspresset i miljøet er særligt højt med henblik på at forhindre opformering af azol-resistente svampe for at bevare effektive lægemidler samtidig med, at der tages højde for azolmidlernes samfundsnyttige egenskaber og brug i forskellige øvrige sammenhænge.

Problemstillingen har været behandlet sektorvis både nationalt og i EU regi – men der har ikke været en konsekvent samlet tilgang (One health) til området, herunder deling af viden.

Der nedsættes derfor en hurtigarbejdende arbejdsgruppe med følgende opgaver:

- Gennemgang af eksisterende viden og anbefalinger (litteratur- og praksisgennemgang).
- Identificere områder, hvor der er behov for mere viden på området.

Sammensætning af arbejdsgruppen

- En formand og to øvrige repræsentanter fra Statens Serum Institut.
- En repræsentant fra Sundhedsstyrelsen.
- To repræsentanter fra Miljøstyrelsen
- En repræsentant fra Institut for Agroøkologi, Århus Universitet

Mødekadence og sekretariat:

SSI indkalder hurtigst muligt til et indledende møde, hvor arbejds- og tidsplan fastlægges, herunder mødekadance.

SSI varetager formands- og sekretariatsfunktionen, herunder indkalder til møder, udarbejder (i samarbejde med øvrige deltagere) mødedagsordener og udsender mødereferater. Referatet sendes til kommentering senest to uger efter mødets afholdelse med henblik på gruppens bemærkninger og skriftlige godkendelse inden for en fastsat tidsfrist.

Arbejdsgruppen holder løbende Sundheds- og Ældreministeriet og Miljø- og Fødevareministeriet orienteret om gruppens arbejde, og gruppen vil senest ved udgangen af 2018 afrapportere til de to departementer.

Derefter skal der tages stilling til evt. fortsættelse af arbejdsgruppen mv.

Bilag 2. Oversigt over humane resistent mutationer

Cyp51A gen mutationer fundet i kliniske *A. fumigatus* isolater med eller uden azolresistens (R) eller nedsat følsomhed (I). For fuld reference liste til original publikationer for hver enkelt mutation se Stensvold et al ⁴.

	Position i <i>CYP51A</i>	Aminosyre substitution	Azol følsomheds-fænotype		
			Itraconazol	Posaconazol	Voriconazole- og isavuconazol
Hotspot mutations (mutationer der ofte findes i resistente isolater og som er eftervist at give resistens)	G54	E	R	S/I/R	S
		K	R	Ej undersøgt	Ej undersøgt
		R	R	R	S
		V	R	I/R	S
		W	R	R	S
	L98	H ^a	R	S/I/R	I/R
		I ^b	R	I	S
		Q ^b	R	I	I
		R ^b	R	I	I
		Y ^b	R	I	S
	M220	I	R	S/I/R	S
		K	R	I/R	S/I/R
		R	R	I/R	S/I
		T	R	S/I/R	S/I/R
		V	R	I/R	S
		W	R	R	NA
	G138	C	R	R	R
		R	S	S	R
	Y431	C	I/R	S/R	S/I/R
	G448	S	R	I/R	R

Mutationer fundet i isolater der ikke er fuldt følsomme, men som endnu ikke er eftervist at være årsag til resistens.

N22	D	R	NA	NA
Y121	F ^c	I	I	R
H147	Y	R	I	R
P216	L	R	I/R	S/I
F219	I	R	S/I/R	S/I/R
M236	V, K, T	R	NA	NA
I266	N	R	I	S
A284	T ^d	I	I	I
T289	A ^c	I/S	I/S	R
F332	K	R	I	S
S400	I	S	S	I
E427	G	R	S/I	I/R
G432	S	R	S	S
T440	A	R	NA	NA
Y491	H	R	NA	NA
G434	C	R	R	R

Bilag 3. Foreløbig status over den nationale *Aspergillus* overvågning per 21/12 2018

Landets mikrobiologiske afdelinger blev før sommerferien inviteret til at deltage i en national overvågning af *Aspergillus* i Danmark. Tre prøve kategorier indgik i overvågningen:

1. Klinisk relevante *Aspergillus* fund i dyrkede prøver.
2. Bronkoalveolær-lavage (BAL) væske fra lungerne taget under bronkoskopi på indikation om *Aspergillus* infektion.
3. Baggrundsprævalensprøver dvs. prøver hvorfra der dyrkes *Aspergillus* uanset klinisk betydning. Til denne del er prøver med vækst om mandagen udvalgt som et repræsentativt udsnit.

Forbehold: Det er vigtigt at gøre opmærksom på, at den frivillige indsendelse af prøver til overvågningen er etableret på de klinisk mikrobiologiske afdelinger i løbet af efteråret og der stadig er noget transportlogistik og mærkning af prøverne der kan optimeres. Dette arbejdes der med i en løbende dialog med de enkelte afdelinger.

Indsendte prøver. Samlet er der på nuværende tidspunkt modtaget 282 isolater, hvoraf 264 er *Aspergillus* arter, og 200 er *A. fumigatus*. Da der er indsendt gentagne prøver på nogle patienter (hvilket giver god mening da én patient kan have flere forskellige *A. fumigatus* isolater i lungerne samtidigt) stammer disse isolater fra i alt 135 patienter.

Resultater. I tabel 2 er angivet hyppigheden af fuld resistens som svinger mellem 2,5% og 6,5% for de forskellige azoler.

Tabel 2. Oversigt over antal resistente *Aspergillus fumigatus* isolater fra september-november 2018. I denne opgørelse er alle isolater medtaget.

	Resistente isolater	
	n/total	(%)
Itraconazol	12/200	6,00%
Posaconazol	13/200	6,50%
Voriconazol	5/200	2,50%
Isavuconazol	12/200	6,00%
Amfotericin	0/200	0,00%

Resistente *A. fumigatus* isolater undersøges efterfølgende med en gen-sekventeringsteknik for tilstedeværelsen af velkendte underliggende resistensmekanismer. Resultatet af de isolater, der er undersøgt hidtil, er vist i tabel 3. I denne tabel er gentagne isolater fra samme patient udeladt - dvs. her er det antal patienter med resistens ud af de 135 patienter hvorfra der var fundet *A. fumigatus*. Samlet er der således påvist resistensmekanismer hos 10/135 patienter (7,4%) hvoraf miljøresistensmekanismen påvistes i 5/10 (50%) af de azol resistente *A. fumigatus* isolater.

Tabel 3. Resistensfordeling iblandt 135 patienter med 200 isolater med *A. fumigatus*. I alt 10/135 patienter med et resistent isolat.

Resistensmekanisme	Antal patienter med resistente isolater
TR ₃₄ /L98H – miljøresistens mekanisme	5
M220R - human-medicin resistensmekanisme	1
M220K - human-medicin resistensmekanisme	1
G432S - human-medicin resistensmekanisme	1
WT	1
Ikke påvist miljøresistens, pt ikke undersøgt for human-medicin resistensmekanismer	1

Bilag 4. Resumé af abstract indsendt til ECCMID omfattende studie fra SSI og Rigshospitalet for CF patienter

I 2007 og 2009 undersøgte vi i to 6-måneders perioder forekomsten af *Aspergillus* hos patienter med cystisk fibrose (CF) på Rigshospitalet, hvilket blev publiceret i 2011*. I 2018 gentog vi denne undersøgelse i en 6 måneders periode (første halvår).

Azol-resistent *A. fumigatus* blev påvist hos 10 ud af 109 patienter svarende til 9,2%. Resistensmekanismerne omfattede både resistenstyper opstået ifm. humant azol forbrug ved behandling af infektioner med *Aspergillus* og resistenstyper, der stammer fra miljøet.

Resistens kan skyldes forskellige resistensmekanismer i svampen, hvoraf nogle mekanismer (mutationer i genet *CYP51A*) er lette at påvise med enkle metoder. Sammenlignes med de tidligere data fandt vi i 2018 *A. fumigatus* med sådanne resistensmekanismer** hos 5/109 patienter (4,6% af de undersøgte patienter) sammenlignet med 5/133 (3,8%) i den samme population i 2007-9, svarende til en stigning på 20%.

Hvis man ser på forekomsten af de resistenstyper, der stammer fra miljøet, så vi miljøresistens hos 4 ud af 109 patienter (3,7%) i 2018 mod 2 ud af 133 patienter (1,5%) i 2007-9.

Endelig fandt vi en ny miljøresistens type***, der ikke tidligere er påvist i Danmark.

* Mortensen et al, Journal of Clinical Microbiology, June 2011, p. 2243–2251

** mutationer i target genet (*CYP51A*)

*** TR₃₄³/L98H der har tre 34bp repeats mod normalt to

Bilag 5. Notat om landbrugets indsats ift. resistensudvikling og beskrivelse af hvilke alternativer der er til kemisk bekæmpelse

Generelt er der i Danmark stor fokus på problemer forårsaget af resistensudvikling hos skadegørere i landbrugs og havebrugsafgrøder. Da man kun har få kemiske midler til rådighed, er der et stort ønske om at bevare effektiviteten og levetiden for plantebeskyttelsesmidlerne længst muligt.

For at mindske risikoen for fungicidresistens anbefales følgende generelle elementer:

- Vælg sorter med god resistens, når det er muligt, da det giver mulighed for at mindske risikoen for angreb.
- Begræns antallet af fungicid-sprøjtninger i vækstsæsonen og sprøjt kun, når der vurderes at være behov.
- Varier valget af effektive fungicider i bekæmpelsesstrategierne. Brug altid fungicider med forskellige virkemekanismer – og som ikke har krydsresistens - i blandinger eller ved alternering
- Sprøjt med tilpassede doseringer justeret efter sygdomstryk. Sprøjt fortrinsvis ved lave angrebsgrader frem for på etablerede angreb, da dette giver bedre muligheder for at reducere doseringen.

Blanding af fungicider

Anvendelsen af fungicidblandinger er almindeligt udbredt. Ved blanding af fungicider med forskellige virkemåder kan udviklingen af resistens forsinkes, som f.eks. resistens over for azol midler og SDHI'er. Mange fungicider markedsføres allerede kun i blandinger for at sikre, at der anvendes en form for anti-resistens-strategi. Det er vigtigt, at de fungicider, der indgår i blandinger virker mod de samme sygdomme i samme tidsinterval. Et sådant optimalt sammenfald er ofte ikke tilfældet. Men blandinger med de bedste muligheder anvendes. Blandinger understøtter anvendelsen af reducerede doseringer; et forhold der for fungicider har været udbredt i mange år og som har vist sig at selekttere mindre end høje doseringer for resistens (Van den Bosch 2014).

Monitering for sygdomme

Jævnlig inspektion i marken og ikke mindst forud for en sprøjtning er vigtig for at vurdere behovet for bekæmpelse. Efterfølgende vurderinger er tilsvarende nødvendig for at fastlægge, hvad effekten har været af den første sprøjtning og om der er behov for yderligere behandlinger. En korrekt vurdering af behovet for sygdomsbekæmpelse og dermed om det er nødvendigt at sprøjte er i sig selv vældig vigtig, da unødvendige sprøjtninger øger risikoen for resistensudvikling.

Hvis man ser svigtende effekt i marker, kan det skyldes, at plantepatogenet i marken har udviklet en ændret population med nedsat følsomhed. Det økonomiske tab kan være betydeligt, hvis bekæmpelsen i marken slår fejl og der ikke har været muligheder for at lave en alternativ indsats. Marker hvor man

opdager svigtende effekt bør efterforskes nærmere, for at klarlægge om der reelt er tale om resistens, eller den nedsatte effekt skyldes for sen sprøjtning, dårlige sprøjteforhold e.l.

Vurdering af effekten og monitoring foretages nationalt for visse af de mest betydningsfulde plantepatogene svampe og videreformidles rutinemæssigt til rådgivere og landmænd. Hvis anbefalingerne ændres som følge af resistens, ser man normalt hurtigt et ændret forbrugsmønster, som indikerer at jordbrugerne ændre praksis for at mindske risikoen for tab. Monitoring assisteres ofte af lokale konsulenter og prøver fremsendes til verificering af resistens hos bl.a. AU. De agrokemiske firmaer, som sælger pesticider er desuden forpligtiget til at lave eller støtte monitoring af resistens hos betydningsfulde plantepatogene svampe.

Formidling af viden om resistens

Der har i flere år været meget fokus på resistensproblemer i rådgivningssystemet bl.a. som led i de senere års fokus på implementering af integrerede plantebeskyttelses strategier (IPM). En løbende formidling om forebyggelse af resistens er afgørende for at holde fokus på problematikken. Foruden baggrundsmateriale og informationer af mere generel karakter og specifikke anbefalinger af, hvad der skal gøres i tilfælde af resistens, er det også vigtigt med en kortlægning af, hvor resistens optræder, da det kan yderligere skærpe opmærksomheden i de områder, hvor problemet forekommer.

Vejledninger på etiketten om resistens

Fungicider med moderat til høj risiko for resistensudvikling skal indbygge en anti-resistensstrategi på etiketten. For at tilskynde til opmærksomhed omkring forskellige virkemekanismer angives midlets virkningsgruppe(R) på brugsanvisningen. Det pointeres desuden, hvis det er vigtigt at midlet blandes med andre midler med anden virkemekanisme, eller, hvis man bør veksle imellem midler. For alle midler er angivet max antal behandlinger pr sæson. Max antal behandlinger pr sæson kan udover resistensforhold være styret af rest-koncentrationer, udvaskningsrisiko, eller human og økotoksikologiske undersøgelser.

Udvikling af alternativer og alternative bekæmpelsesmetoder

Kemiske alternativer til Azolerne

En liste med kemiske alternativer til azolerne er vist i tabel 1. Som det fremgår er strobilurinerne en af de vigtigste alternative kemi-grupper til azolerne – især når det gælder bekæmpelse af rust-sygdomme. Da der er udbredte problemer med resistens hos strobilurinerne – er denne gruppe midler dog ikke et reelt alternativ til mange sygdomme og ensidig anvendelse vil formodentlig fremprovokere flere resistensproblemer. For at opnå effekter på niveau med azolerne på f.eks. rust vil det betyde, at der skal sprøjtes flere gange pr sæson – da langtidsvirkningen af strobilurinerne er kortere end for azolerne. En generel lavere effekt i marken gælder også for folpet og mancozeb til bekæmpelse af septoriabekæmpelse i hvede.

Tabel 1: Liste med kemiske alternativer til azolerne i de store afgrøder.

Afgrøde	skadegørere	Alternative midler hvor azoler ikke indgår	kommentar
Hvede	Septoria	Folpet Mancozeb	Multi-site produkter med moderat effekt. Godkendte SDHI'er indgår kun i blandinger med azoler
	Rust sygdomme	Pyraclostrobin Azoxytrobin	Har kortere virkningstid en azolerne
	Meldug	proquinazid Metrafenon pyriofenon	Metrafenon virker meget svagt pga resistens.
	Hvedebladplet	Ingen	
	akksfusarium	Ingen	
Byg	Bygbladplet	Pyraclostrobin Azoxytrobin	Nogen grad af resistensproblemer med strobiluriner
	Skoldplet	Pyraclostrobin	
	bygrust	Pyraclostrobin Azoxytrobin	
	Meldug	proquinazid Metrafenon	
	Ramularia	Ingen	
Rug/Triticale/havre	Meldug	proquinazid Metrafenon	
	Rust	Pyraclostrobin Azoxytrobin	
	Hvedebrunplet	pyraclostrobin Folpet	Resistensproblemer med strobiluriner og lave til moderate effekter fra folpet
	Skoldplet	Pyraclostrobin	
	Havrebladplet	Pyraclostrobin	
Raps	Knoldbægersvamp	Azoxytrobin Boscalid	Resistensudvikling til SDHI konstateret
	skulpesvamp	Azoxytrobin Boscalid	
	phoma	Boscalid	
	Lysbladplet	Ingen	
Roer	Meldug	Svovl	
	Rust	Azoxytrobin	
	ramularia	Ingen	
frøgræs	Meldug	Proquinazid	
	Rust	Azoxytrobin Pyraclostrobin	
	Bladplet	Pyraclostrobin	
Kartofler	Alternaria	Azoxytrobin Boscalid pyraclostrobin	Resistens problemer med både strobiluriner og boscalid
Majs	Øjeplet Majsbladplet	Pyraclostrobin	
Hestebønner	Rust, chokoladeplet, hestebønnebladplet	Azoxytrobin Boscalid Pyraclostrobin	
Æbler, pærer	æbleskurv	Dithianon Svovl Pyrimethanil	

Mikrobiologiske løsninger

I de seneste år har der været afprøvet en række forskellige mikrobiologiske løsninger (BCA'er) til bekæmpelse af bl.a. sygdomme i korn og kartofler. Midlerne består bl.a. af *Bacillus subtilis* (Serenade) og *Clonostachys rosea* (Reiss & Jørgensen 2016, Jensen et al 2016). Selvom der er stigende interesse for disse midler ikke mindst fra den kemiske industri mangler der stadig et væsentligt udviklingsforløb, før disse midler kan ses, som erstatning til de kemiske løsninger i de store landbrugsafgrøder. De nuværende løsninger peger i retning af at disse midler i bedste fald kan ses, som et supplement til de kemiske løsninger. BCA midler er mere følsomme over for vejr og timing og giver store variationer i opnåede effekter. En mere optimal anvendelse kræver bedre viden om, hvilke forhold der er gunstige for deres effekter og de nuværende studier peger på, der vil være behov for flere sprøjtninger pr sæson målt i forhold til det, vi kender til i dag.

Påvirkning af sædskiftet

En række svampesygdomme er luftbårne (bl.a. meldug, rust, Septoria) og ikke knyttet specifikt til sædskiftet. Andre plantepatogene svampe er knyttet til forfrugten og overlever typisk på stubrester eller i jorden. For sidstnævnte gruppe er sædskiftet af væsentlig betydning for epidemiudviklingen og dermed behovet for sprøjtning. Det gælder f.eks. knoldbægersvamp i raps, hvedebladplet og fusarium i hvede, bygbladplet og skoldplet i byg, kartoffelskimmel og alternaria i kartofler.

Som følge af det store hvedeareal gælder specifikt for septoria, at mængden af ascosporer, der spredes i efteråret er så stor og omfattende, at det aktuelle sædskifte ikke har betydning for smitterisikoen. En reduktion i den høje mængde ascosporer vil formodentlig kræve en meget stor nedgang i vinterhvedearealet.

Et varieret sædskifte, hvor der indgår forskellige kornafgrøder og bredbladede afgrøder vil resultere i mindre sygdomstryk og et mindre behov for fungicidanvendelse. Jordbehandling spiller en væsentlig rolle for, hvor stort et problem et begrænset sædskifte er. Kombinationen af reduceret jordbehandling og ensidigt sædskifte øger specifikt risikoen for flere sygdomme.

Påvirkning af sortsvalg og andre kulturtekniske elementer

For at mindske problemerne med sygdomme er det i nogle afgrøder muligt at vælge sorter med god eller nogen grad af resistens over for de vigtigste sygdomme. Dyrkning af sygdomsresistente sorter i korn kan medvirke til at reducere fungicidbehovet med 25-50% afhængig af sygdom og afgrøde (Jørgensen et al 2017). Landmænd vælger som udgangspunkt at dyrke de højtydende sorter, disse sorter er ikke altid de mest resistente.

De vigtigste kornafgrøder karakteriseres årligt for sygdomsmodtagelighed baseret på observationsparcellerne placeret på tværs af landet (Tystoftefonden, www.sortinfo). En god og langtidsholdbar sortsresistens kender vi fra Mlo resistens hos byg. Denne resistens har stort set elimineret behovet for meldugbekæmpelse i danske vårbygssorter. Der er dog mange andre eksempler på, at svampe med tiden kan tilpasse sig til resistente sorter, hvor resistensen således mister deres effekt. Det kender man f.eks. fra meldug, gulrust og hvedegråplet (septoria) i hvede (Singh et al. 2017). Det er derfor vigtigt, at der løbende arbejdes intensivt med forædling af nye sorter, som kan erstatte gamle "slidte" sorter. Inden

for en række af vores vigtige sygdomme er der ikke kendskab til god sygdomsresistens i sorterne. Det gælder f.eks. knoldbægersvamp i raps.

Sortsblandinger er et andet tiltag, som der arbejdes med som mulighed for at mindske sygdomsudviklingen og som man forventer også kan medvirke til at stabiliserer sorternes resistens (Gigot et al 2013). Foreløbige undersøgelser peger på, at dyrkning af sortsblandinger kan være med til at mindske behovet, men det er stadig for tidligt at sige, hvor store sygdomsreduktionerne vil være. Med vores nuværende viden om sortsblandinger forventes i bedste fald en reduktion i antallet af sprøjtninger i hvede fra 2-3 til 0-2 behandlinger.

En række andre kulturtiltag, som sen såning af vintersæd, en forøgelse af udsædsmængden samt justering af gødningsmængden kan være af betydning for angrebsgraden af visse sygdomme. Kulturtekniske tiltag er især relevante med henblik på at forebygge opformering af kraftige angreb. Forskellige tiltag virker dog forskelligt på forskellige sygdomme, så et tiltag kan reducere angrebet for en specifik sygdom, men samtidig øge den for en anden (Jørgensen et al 2014). Meget høje mængder af kvælstof (N) tildelt på en gang vil ofte øge risikoen for angreb af bl.a. meldug. Hvis tildeling sker af flere gange og inden for de normale danske N-normer ses sjældent et øget behov for fungicidindsats. Kulturtekniske tiltag vil ofte skulle kombineres med andre tiltag for at have en tilfredsstillende effekt.

Økonomiske tab som følge af sygdomme i landbrugsafgrøder

Baseret på forsøgsdata over en årrække er det opgjort, hvilket udbyttetab svampesygdomme i vores større landbrugsafgrøder med nuværende dyrkede sorter kan forårsage (SEGES, 2017). Ud fra disse tab er det skønnet, hvilket tab der kan forventes, hvis azolerne ikke er til rådighed. Tabene i tabel 2 angivet for specifikke afgrøder vil svinge mellem 0 og 4000 kr./ha. Ganget op på de samlede arealer giver det tab af størrelsesordenen 680 millioner kr. per år.

En væsentlig årsag til jordbrugerens anvendelse af fungicider skal ses som en sikring imod store udbytteudsving. Ud over de beregnede tab bidrager svampebekæmpelse også med forbedring af kvaliteten af produkterne, f.eks. forbedret sortering i maltbyg, foderværdi af hvede og byg, mm.

Dårlig sygdomsbekæmpelse kan desuden give større udvaskning af næringsstoffer. Landmænd gøder og behandler en afgrøde med henblik på at producere et forventet udbytte på f.eks. 10 tons/ha. Hvis man så på grund af sygdomme kun høster 8 tons/ha – vil dette tab øge risikoen for udvaskning af kvælstof.

Tabel 2: Tab som følge af sygdomsangreb i konventionelle afgrøder opdelt på afgrøder.

Afgrøde	Dyrket areal i 2017	Afgrødepris Kr per enhed	Gns. netto-merudbytte i kr med sorter som vi kender dem i dag. Fratrukket sprøjte-omkostninger. Tallet i parentes angiver max tab i visse afgrøder.	% tab uden azoler skønnet i runde tal
Stivelseskartofler	28.000	3,20 kg	10.000-12.000	33% (=4000 kr /ha)
Alm rajgræs	35.000	7,5 kg	1200-1400 (3800)	50% (700 kr/ha)
Sukkerroer	34.000	prisaftale	1200-1400 (3500)	66% (925 kr/ha)

Vinterhvede	572.000	105 /hkg	500-600 (2000) -septoria	75% (450 kr /ha)
Vinterraps	176.000	270/hkg	500-600 (3000)	33% (300 kr/ha)
Maltbyg	100.000	135/hkg	500 (2400)	66% (330 kr/ha)
Foderbyg	450.000	100/hkg	300-400 (1800)	66% (264 kr/ha)
Vinterbyg	125.000	100/hkg	300 (1400)	66% (264 kr/ha)
Hestebønne	20.000	120/hkg	300-400 (1400)	25% (100 kr/ha)
Rug	111.000	95/hkg	200 (1000)	50% (100 kr/ha)
Triticale	8.000	95/hkg	500-1000 (5000)	50% (500 kr/ha)
Strandsvingel/engrapgræs	25.000?	9-15 /kg	0-200 (1800)	25% (50 kr)
Havre	64.000	90 /hkg	0 (1000)	0