



Ringtest for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener 2017

Lærke Boye Astrup

Karl Pedersen

Katja Ann Kristensen

Sanne Fisker, Dianova

DECEMBER 2018

INDLEDNING

Formålet med mastitisringtesten er at tilbyde kvalitetssikring af den diagnostik der udføres på mælkeprøver i veterinære praksislaboratorier. Ringtesten omfatter normalt forekommende mastitisbakterier, samt bakterier som kan give anledning til differentialdiagnostiske problemer. Ringtesten er målrettet veterinære kvægpraksis. Mastitis ringtesten er blevet afholdt siden 2005, hvor den blev igangsat af DTU Fødevarerinstitutionen i samarbejde med Den Danske Dyrlægeforening og Videncenter for Landbrug, Kvæg. Siden 2016 udbydes ringtesten af DTU Veterinærinstituttet/Center for Diagnostik DTU.

I ringtesten 2017 har der været fokus på almindeligt forekommende mastitisbakterier. Ringtesten har således haft den daglige rutinediagnostik som udgangspunkt. Der er ved ringtesten udelukkende anvendt bakterier, som er indsendt til DTU, Veterinærinstituttet i 2015, 2016 og 2017 fra danske kvægpraksis i forbindelse med klinisk mastitis. Ringtesten baseres dermed på relevante og friske mastitispatogener. I ringtest 2017 er der desuden medtaget flere mælkeprøver med samme bakterieisolat. Dette sker for at kunne analysere, om ringtestdeltageres præstation afhænger af selve bakterien, eller af faktorer, der ligger udenfor selve ringtestmaterialet – fx variation i hvilke tests, der gennemføres under diagnostikken, m.m. Ved at sammenligne de samme deltageres identifikation af den samme bakterie i flere forskellige prøver bliver det nemmere at identificere eventuelle mønstre bag de diagnostiske fejl.

Herudover er strukturen for resistensopgørelserne ændret i 2017, således at bakterietypen blev oplyst på de 5 prøver, som skulle resistensbestemmes. Derved blev det tydeligt og ens for alle deltagere, hvilke prøver som blev bedømt for diagnostik og hvilke prøver som blev bedømt for resistensbestemmelse. Denne ændring indførtes for at undgå den tidligere problemstilling, hvor brugerens bakterieidentifikation påvirkede den efterfølgende resistensbestemmelse. Hidtil var resistensbestemmelserne derfor vanskelige at fortolke, da der fx kunne være en identifikationsmæssig anledning til fravalg af resistensundersøgelse osv. Med det nye opsæt kan resistensbestemmelserne sammenlignes på tværs af deltagerne, idet alle har haft samme udgangspunkt for resistensbestemmelserne uafhængigt af deres præstation indenfor bakterieidentifikationerne.

I det følgende bringes et sammendrag af resultaterne fra mastitisringtesten 2017.

PRAKTISK OM RINGTESTEN

FORLØB

Ringtesten blev i 2017 annonceret direkte til kvægdyrlæger i Danmark, bl.a. med hjælp fra brancheorganisationen Dyrlæge og Ko. I september 2017 bragte Dansk Veterinærtidsskrift en artikel om

ringtesten og Magasinet DYRLÆGEN annoncerede testen på deres facebookside. Dianova sendte information direkte til tidligere deltagere på e-mail og annoncerede ringtesten via dianova.dk.

Fredag den 10. november 2017 blev alle tilmeldte adviseret på e-mail om, hvornår de ville modtage prøvematerialet. Yderligere modtog de procedureforslag til at opnå det bedst mulige resultat og liste over relevant materiale og udstyr i laboratoriet.

Mandag den 13. november 2017 blev mælkeprøverne afsendt fra DTU Veterinærinstituttet. Pakken var vedlagt et brev til hver enkelt deltager indeholdende login og password til indtastning af resultater, identifikationsnøgler, samt procedureforslag til opnåelse af det bedst mulige resultat, samt en liste over relevant materiale og udstyr til laboratoriet. Dagen efter blev der sendt en e-mail til den enkelte med login og password samt link til indtastning af resultater. I år indgik resistensbestemmelse som en del af ringtesten og torsdag den 16. december blev der udsendt en vejledning i resistensbestemmelse, som deltagerne i tvivlstilfælde kunne konsultere.

Deltagere, som har været med i en eller flere af de foregående års ringtests, blev tildelt det samme log-in som tidligere og kunne dermed sammenligne resultaterne med egne præstationer fra tidligere år.

To dage før sidste frist for indtastning af resultater, blev der sendt en reminder på mail til de deltagere, der endnu ikke havde afsluttet indtastning af besvarelse. Pga. tekniske udfordringer i databasen, hvor svarene indrapporteres af deltagerne, blev databasen holdt længere åbent end oprindeligt planlagt, så alle kunne nå at indrapportere. Dette medførte at tidspunktet for, hvornår de personlige resultater kunne tilgås, blev skubbet fra tirsdag den 28. november til tirsdag den 5. december. Der blev afdækket en fejl i databasen, hvor facit ved to af prøverne var forkerte og derved gav fejlrultat til korrekte svar. Fejlen blev rettet, og deltagerne blev orienteret via mail den 22. december 2017.

DELTAGERE

I 2017 var det muligt at deltage som praksis og bestille ekstra log-ins til de enkelte medarbejdere i virksomheder, hvor mere end én medarbejder medvirkede i ringtesten.

I alt tilmeldte 41 virksomheder sig ringtesten med i alt 48 deltagere. Af disse havde 34 deltagere været med i ringtesten tidligere, og dermed deltog 14 personer i ringtesten for første gang. I ringtesten i 2016 var deltagerantallet lidt lavere med 41 personer, men i 2014 var det noget højere med 59 personer. Deltagerne var primært tilknyttet kvægpraksis i Danmark, men et norsk laboratorium, en kvægbesætning i Slovakiet samt to danske laboratorier deltog også.

I alt bidrog de 4 virksomheder, som ikke var fra danske kvægpraksis, med 9 logins. Der var altså samlet tilmeldt 39 logins fra danske kvægpraksis (48 - 9).

De 39 logins fra danske kvægpraksis var fordelt på 37 virksomheder ($41 - 4 = 37$). Ud af de 39 danske personlogins var der 3 som afleverede blank besvarelse. Alle tre blanke besvarelser repræsenterede kvægpraksis med kun én tilmeldt deltager. Der er således besvarelser fra 36 danske personer, fordelt på 34 praksisnumre.

Af de samlede 48 deltagere var der tre, der indleverede blank besvarelse. Denne rapport er således baseret på i alt 45 besvarelser.

PROCEDURE

Ringtesten bestod af 15 mælkeprøver, som hver skulle testes for indholdet af mastitisbakterier, og 5 mælkeprøver som skulle testes for resistensmønster. Typen af bakterie blev oplyst for de 5 resistensprøver. De samlede 20 mælkeprøver skulle testes på sædvanlig vis i testdeltagernes laboratorium. Dermed tilsigtede ringtesten, at deltagerne anvendte deres normale rutiner, således at deres daglige diagnostiske niveau blev afspejlet i testen. Resultaterne blev indrapporteret via internettet på portalen:

www.mastitisingtest/user.dtu.food.dk

Ved indtastning af resultater i portalen var der tre alternative svarmuligheder frem for en bakterieidentifikation: "Forurenet (over to bak. typer)", "Steril" og "Send til reference lab.". De tre svarmuligheder tolkes i resultaterne som hhv.:

- "Forurenet (over to bak. typer)" = Prøven er ikke egnet til diagnostik. I forurenede prøver kan man ikke med sikkerhed fastslå, hvilken bakterietype som er årsag til koens kliniske symptomer fordi: 1) Der kan være flere mulige patogene bakterier i prøven. 2) Den dominerende bakterietype kan ikke altid identificeres ved forurening. 3) Selv hvis en dominerende bakterietype kan identificeres, kan bakterierne have forskellig vækst så én dominerer på dag 1, mens en anden dominerer på dag 2 osv. og 4) Selv hvis den ene type patogene bakterie dominerer over de andre, kan bakterierne have forskellig virulens. Samlet set kan det derfor ikke med sikkerhed afgøres, hvilken bakterie koen er syg af.
- "Steril" = Prøven var dyrkningsnegativ ved 48-timers dyrkning.
- "Send til reference lab." = Prøven kunne ikke sikkert identificeres efter 48 timers dyrkning på blodagar samt specialmedier, inklusiv udførelse af samtlige relevante mikrobiologiske undersøgelser angivet i den fremsendte ID-nøgle. En sådan prøve skal derfor sendes til bestemmelse på et akkrediteret diagnostisk laboratorium, hvis der skal opnås sikkert mikrobiologisk svar. Et eksempel kan være en bakterie, der ikke findes tilgængelige rutinediagnostiske tests til fx *Mycoplasma* spp. Et andet eksempel kan være en bakterie, som har et problematisk differentialdiagnostisk potentiale, det kunne være en *Staphylococcus pseudintermedius* fra en ko i en besætning, som ønsker at sanere for *S. aureus*. I et sådant tilfælde vil det være nødvendigt at differentiere mellem gruppen af koagulase-positive stafylokokker, i stedet for at karakterisere dem alle som *S. aureus*, idet der ved mangel på

denne skelnen vil udsættes forkerte køer. Ringtesten sammensættes derfor, så den afspejler, at der både findes bakterier, som det altid er nødvendigt at referere til specialiserede laboratorier, fordi de ikke kan diagnosticeres under praksisforhold, samt bakterier hvor det afhænger af landmandens ønsker, om bakterien kan behandles ud fra rutinediagnostik, eller om en endelig species-identifikation er nødvendig uafhængigt af et eventuelt antibiotikavalg.

RESULTATER

Resultaterne er opgjort i to underafsnit: Først et identifikationsafsnit, som omhandler de korrekte identifikationer af prøverne. De korrekte identifikationer anvendes til at vurdere ringtestdeltagernes præstationer både samlet set og individuelt. Dernæst følger et fejlkildeafsnit, som omhandler mulige forklaringer på, hvorfor nogle prøver har forårsaget generelle problemer for deltagerne. Fejlkildeafsnittet anvendes til at vurdere hvilke bakterier, som er forbundet med et generelt mangelfuldt diagnostisk niveau blandt deltagerne, og til at identificere mulige forklaringer på, hvorfor diagnostikken er mangelfuld for disse bakterier. Samlet kan man derfor anvende de to resultatafsnit til at vurdere henholdsvis, hvordan det diagnostiske niveau er blandt deltagerne, og hvilke bakterier der er årsag til de mest udbredte diagnostiske problemer – samt forslag til hvorfor.

IDENTIFIKATION

Fordelingen af de korrekte identifikationer anvendes primært til at vurdere det diagnostiske niveau hos den enkelte deltager og generelt for årets ringtest. Fordelingen af korrekte identifikationer defineres som vist i Tabel 1. Prøve nr. 7 måtte udgå af ringtest 2017, fordi prøve nr. 7 var blevet fejlmærket. Derfor er fordelingen af korrekte identifikationer opgjort med et totalt prøveantal på 14.

Tabel 1. Definitioner for inddeling af korrekte identifikationer

IDENTIFIKATIONSKODE	DEFINITION
Alle korrekte	14/14 prøver korrekt identificeret
Mange korrekte	12 – 13 prøver korrekt identificeret
Hovedsageligt korrekte	8 – 11 prøver korrekt identificeret
Hovedsageligt ukorrekte	0 – 7 prøver korrekt identificeret

I ringtest 2017 var der 2 deltagere ud af 45, som havde alle 14 identifikationer korrekte (svarende til 4,4 % af prøvedeltagerne). Dette er relativt færre, end i 2016 og 2014. Tilsvarende havde 15 deltagere (33,3 %) mange korrekte identifikationer, hvilket også relativt færre end i 2016 og 2014. Omvendt havde 18 deltagere (40 %) hovedsageligt korrekte identifikationer, hvilket er relativt flere end i 2016 og 2014. Tilsvarende havde hele 10 deltagere (22,2 %) hovedsageligt ukorrekte identifikationer, hvilket også er betydeligt flere relativt end i 2016

og 2014. Samlet er det generelle diagnostiske niveau derfor lavt i ringtest 2017 sammenlignet med ringtest 2016 og 2014, som det er vist i Tabel 2.

Tabel 2. Fordelingen af antal korrekte identifikationer i ringtest 2014, 2016 og 2017 opgjort i procent.

	2014	2016	2017
Antal ringtestbesvarelser	54	39	45
Alle korrekte	7,5%	10,3%	4,4 %
Mange korrekte	42,6 %	64,1%	33,3 %
Hovedsageligt korrekte	37%	23,1%	40 %
Hovedsageligt ukorrekte	14, 8%	7,6%	22,2 %

IDENTIFIKATION AF FEJLKILDER

Identifikationen af fejlkilder anvendes primært til at udpege hvilke bakterier, som forårsager systematiske diagnostiske problemer, og give mulige forklaringer på dette. Afsnittet giver først en gennemgang af generelle tendenser ved fejlidentifikationerne, dernæst en gennemgang af nogle specifikke bakterier som udløste systematiske fejlidentifikationer. Afsnittet omhandler derfor ikke bakterier, som kun blev sporadisk fejlidentificeret. Fejlidentifikationerne opgøres procentvist og defineres som vist i Tabel 3.

Tabel 3. Fejlidentifikationsprocenten opgjort pr ringtestprøve

FEJLKODE	DEFINITION
Ingen fejl	Den samlede fejlprocent er nul
Få fejl	Den samlede fejlprocent er under 15
Moderat antal fejl	Den samlede fejlprocent er mellem 15 – 50
Mange fejl	Den samlede fejlprocent er over 50

GENERELLE TENDENSER

Der var kun 1 prøve, som ingen fejl udløste: #4 *E. coli*.

Der var 3 prøver som udløste få fejl: #2 *S. dysgalactiae*, #6 *S. aureus* og #12 Steril mælkeprøve.

Der var 1 prøve, som udløste mange fejl: #13 *S. marcescens*.

I forhold til tidligere år kan det bemærkes, at *E. coli* var én ud af tre bakterier, som ingen fejl udløste i ringtest 2016. Tilsvarende var *S. dysgalactiae* en af de bakterier, som udløste få fejl i ringtest 2016. Der er således konsistent højt kvalitetsniveau i diagnostikken af disse bakterier.

For de bakterier, som udløste moderat eller mange fejl, er der tre problemstillinger, som er tydelige i ringtest 2017.

- 1) Der er mange fejlidentifikationer for hver ringtestprøve, sammenlignet med tidligere år.
- 2) Der er intet/meget begrænset mønster i fejlidentifikationerne indenfor hver bakterie.
- 3) Manglende udførelse af de fundamentale mikrobiologiske identifikationstrin lader til at være en del af forklaringen på de mange fejlidentifikationer.

De tre problemstillinger gennemgås hver for sig i det følgende:

1) Der er mange fejlidentifikationer for hver ringtestprøve, sammenlignet med tidligere år.

For de bakterier, der indgik i ringtesten både i 2016 og 2017 er fejlidentifikationsprocenterne sammenlignet i Tabel 4.

Tabel 4. Fejlidentifikationsprocenten opgjort for de bakterier, hvor det samme bakterieisolat blev anvendt i 2016 og 2017.

AGENS	FEJLIDENTIFIKATIONSPROCENT 2016	FEJLIDENTIFIKATIONSPROCENT 2017
<i>S. uberis</i>	0 %	22 %
<i>S. dysgalactiae</i>	0 %	11 %
<i>S. agalactiae</i>	13 % og 18 %	22 %, 20 % og 33 %
<i>S. aureus</i>	15 % og 10 %	11 %
<i>E. coli</i>	0 %	0 %
<i>Klebsiella</i> spp.	5 %	22 % og 16 %
Gær	13 %	33 %
<i>P. aeruginosa</i>	72 %	49 %

Det eneste agens, af dem som også var med i ringtest 2016, som havde en lavere fejlidentifikationsprocent i 2017 var *P. aeruginosa*. Selvom denne bakterie var opgjort som "*Pseudomonas* spp." i ringtest 2016 var der tale om nøjagtigt det samme isolat, som bare skulle identificeres på genus-niveau i 2016 men på species-niveau i 2017. At fejlidentifikationsprocenten var væsentligt højere i 2016 er derfor svært at forklare, dels fordi det er mindre krævende at identificere en bakterie på genus-niveau end species-niveau, dels fordi stammen var den samme og derfor ikke burde være vanskeligere at identificere det ene år end det andet. Måske har tilstedeværelsen af *Pseudomonas* spp. i 2016 skabt øget opmærksomhed om denne bakterie. I så fald må det betragtes som en succes, at ringtesten kan bidrage til at skabe fokus og højne det diagnostiske niveau for deltagerne over tid. Udover forskellen i antallet af fejlidentifikationer var hovedtendensen dog den samme i 2016 og 2017: *P. aeruginosa* blev fejlidentificeret som *Proteus* spp.

Udover *P. aeruginosa* havde samtlige bakterier en højere fejlidentifikationsprocent i 2017 end i 2016, bortset fra *E. coli* og *S. aureus*, som begge havde et sammenligneligt fejlidentifikationsniveau. Årsagen til den systematisk dårligere identifikation i 2017 er vanskelig at fastslå, da der for alle de agens, som var med i begge ringtestår, blev brugt nøjagtigt de samme isolater begge år, og i samme koncentration. Formålet med af at fremsende flere identiske isolater over 2 år var at gøre resultaterne for ringtestene sammenlignelige historisk. Konklusionen bliver derfor tilsyneladende, at det ikke kun er de fremsendte bakteriers sværhedsgrad, der afgør udfaldet af ringtestbesvarelserne. Derimod lader der desværre til at være et generelt lavere diagnostisk niveau i ringtest 2017.

Bakterieisolater kan lide skade ved at være frosset ned, men der er to årsager til, at dette ikke kan antages som generel forklaring på det gennemgående dårligere resultat i 2017 sammenlignet med 2016. 1) Alle bakterier blev kvalitetssikret inden fremsendelse af materialet i begge ringtestår. Hvis et isoalt havde lidt skade af nedfrysningsperioden og dermed havde ringere fremvækst i 2017 end i 2016, ville bakterien være blevet udelukket fra ringtestmaterialet i 2017. 2) Der er ingen eller få af ringtestdeltagerne der har fejlidentificeret prøverne som "sterile". Derimod er de pågældende bakterier listet i tabel 4 fejlidentificeret som diverse forskellige andre bakterier. Fejlidentifikationerne har derfor intet mønster og kan heller ikke tilskrives ringere kvalitet af bakterierne i 2017.

2) Der er intet/meget begrænset mønster i fejlidentifikationerne indenfor hver bakterie.

Strukturen hvor flere bakterietyper udsendes i ringtesten to år i streg gør det muligt at sammenligne præstationen indenfor bakterietyperne over tid. Derudover var der i ringtest 2017 fremsendt 3 prøver med *S. agalactiae* hvoraf to var fra ét isolat og altså identiske. Forveksling med andre streptokokker går igen hos alle tre mælkeprøver med *S. agalactiae*, men derudover blev *S. agalactiae* forvekslet med helt forskellige bakterier i hver af de tre prøver – også af de samme ringtestdeltagere. Flere deltagere fejlidentificerede således de tre prøver med *S. agalactiae* som tre forskellige bakterier.

Samlet er det derfor vanskeligt at komme med en forklaring på hvad der kan have forårsaget fejlene. Den enkelte ringtestdeltager identificerer bakterier meget forskelligt fra år til år og endda indenfor samme år, og på tværs af deltagergruppen er der stor spredning på de forkerte svar – den enkelte bakterie fejlidentificeres på op til 12 forskellige måder.

3) Manglende udførelse af de basale mikrobiologiske identifikationstrin lader til at være en del af forklaringen på de mange fejlidentifikationer.

For at komme nærmere en forklaring på de mange fejlidentifikationer er der i ringtest 2017 lavet en ekstra opgørelse i forhold til tidligere ringtest. Det drejer sig om opgørelsen af Gram-status fejl. Dvs. de fejlidentifikationer, hvor ringtestdeltagerne har angivet en diagnose med forkert Gram-status. Selv når der ikke er noget mønster i fejlidentifikationerne, kan Gram-status indikere, hvad der som minimum bidrager til at forklare fejlene på tværs af deltagergruppen. Gram-status er opgjort således, at alle de fejlidentifikationer, hvor

bakterien er identificeret som en mikroorganisme (altså undtagen svarene "steril", "forurennet" og "sendes til reference lab"), blev summeret. Ud af denne sum blev det så beregnet, hvor mange af diagnoserne der var mikroorganismer med modsat Gram-status af den korrekte for den pågældende bakterie. Som eksempel kan nævnes prøve #5 der indeholdt *Klebsiella* spp. Denne prøve blev fejlidentificeret af 10 deltagere. Heraf var der én deltager, der fejlidentificerede den Gram-negative *Klebsiella* spp. som Gram-negativ *Proteus* spp. For de øvrige 9 fejlidentifikationer, blev *Klebsiella* spp. forvekslet med forskellige Gram-positive bakterier. I dette tilfælde kan Gram-status dermed være med til at forklare, hvorfor *Klebsiella* spp. fejlidentificeres. For selvom *Klebsiella* spp. af 9 deltagere forveksles med 6 forskellige andre agens, så er der en tydelig tendens til, at fejlene delvist skyldes, at den anbefalede Gram-undersøgelse (KOH) ikke er udført under det diagnostiske forløb.

Gram-status fejlene er vist i Tabel 5 hvor fejl diagnoser som også er Gram-statusfejl er angivet med rødt.

BAKTERIER DER UDLØSTE SYSTEMATISKE FEJLIDENTIFIKATIONER

Selvom der var mange bakterier, hvor der ikke var noget tydeligt mønster i fejlidentifikationerne, er der et par eksempler, som skiller sig ud. De gennemgås i det følgende for at hjælpe deltagerne med at identificere mulige forklaringer på fejlidentifikationerne.

Klebsiella spp. var repræsenteret i to prøver i 2017. De to prøver indeholdt det samme isolat, i samme koncentration (10^6 CFU/ml). Den eneste forveksling, som forekommer hyppigt ved begge prøver (#5 og #10), er, at *Klebsiella* spp. forveksles med *Enterococcus faecalis*. Det er vanskeligt at give et bud på, hvorfor det netop er *E. faecalis* der stilles som diagnose, da denne bakterie adskiller sig fra *Klebsiella* spp. både ved at være Gram-positiv, have små kolonier på blodagar, og ved at være katalase-negativ. Dog kan der tænkes tre fejlkilder: 1) Bakterieisolater, der har været frosset ned, har ofte mindre kolonimorfologi end ferske isolater. *Klebsiella*-kolonierne kan derfor have været mindre, end man er vant til fra friske mælkeprøver og dermed lignet *Enterococcus* spp. mere på blodagarpladen. 2) De to bakterier kan være blevet forvekslet ved mikroskopi da *Klebsiella* spp. er korte stave, mens *Enterococcus* spp. er kokker. Det skal dog understreges, at forvekslingen i mikroskop nok indikere, at bakteriekolonien ikke er smurt ordentligt ud i fremstillingen af mikroskopipræparatet, så morfologien ikke bliver tydelig nok. 3) De to bakterier kan være blevet forvekslet på grund af deres beslægtede farver på CHROM-Orientation agar. Samlet bør det derfor understreges, at mikroskopi altid bør udføres, men aldrig bør stå alene i mikrobiologisk diagnostik, ligesom dyrkning på specialmedier heller ikke bør stå alene som diagnostisk grundlag. Herudover er det eneste mønster i besvarelsen af de to *Klebsiella*-prøver, at de fleste fejlidentifikationer har forkert Gram-status. Sammenlagt tyder *Klebsiella*-fejlidentifikationerne derfor på mangel på systematisk gennemgang af de mikrobiologiske tests forud for diagnosen.

S. agalactiae var repræsenteret i tre prøver. Isolaterne var udvalgt, så de dels kunne sammenlignes med 2016, dels kunne sammenlignes indenfor 2017 idet to af prøverne var fra samme isolat, og dels så der kunne testes eksempler på *S. agalactiae* med forskellig grad af hæmolyse, idet de to ens prøver havde almindelig hæmolyse

mens den tredje havde svag hæmolyse. I ringtest 2014 var forskellig grad af hæmolyse anledning til væsentligt flere fejlidentifikationer af det svagt hæmolytiske *S. agalactiae*-isolat. I ringtest 2017 derimod udløste det svagt hæmolytiske *S. agalactiae*-isolat nogenlunde lige så mange fejl som dem med almindelig hæmolyse. Det må derfor betragtes som en forbedring i 2017, at relativt flere ringtestdeltagere har identificeret en svagt hæmolytisk *S. agalactiae* korrekt. Det er derfor muligt, at det fokus der har været på *S. agalactiae* med forskellig hæmolysegrad i både 2016 og 2014 har opnået den ønskede opmærksomhed omkring denne problemstilling. Omvendt er der generelt for alle tre *S. agalactiae*-isolater i 2017 flere fejlidentifikationer, end der var for *S. agalactiae* i 2016. Samlet set har opmærksomheden på forskellig hæmolysegrad hos *S. agalactiae* derfor ikke været nok til at sikre en generel sikker diagnostik af denne bakterie.

Bacillus spp. var repræsenteret i én prøve (#11). 22 ud af 45 deltagere fejlidentificerede *Bacillus*-prøven. Dog var det kun 5 deltagere, som fejlidentificerede *Bacillus* spp. som en anden bakterie. De øvrige 17 fejlidentificerede *Bacillus* spp. som "Steril". En så systematisk fejlidentifikation rejser ved første øjekast tvivl om kvaliteten af prøve #11. Derfor gennemgås kvalitetskontrollen af prøve #11 her:

Som led i fremstillingen af ringtestprøverne anvendes der høje mængder af bakterierne – oftest 10^6 bakterier/ml mælk. Til sammenligning kan nævnes, at CFU i mælkeprøver, der indsendes til DTU fra klinisk mastitis, ofte har CFU/ml på et par tusind (eller mindre) – altså er der i ringtestprøverne høje bakteriekoncentrationer. Det er derfor ikke sandsynligt, at en udstrygning af mælkeprøverne vil resultere i et sterilt resultat, med mindre prøven er blevet fejlhåndteret – eller fejlfremstillet.

Ud af de 17 som besvarede *Bacillus* spp. som "Steril" var der 5, som også svarede mere end én anden prøve fejlagtigt som "Steril". Disse 5 deltagere besvarede således mere end to prøver med bakterier i, som "Steril". For disse 5 deltagere må det antages, at der har været systematiske problemer med enten opbevaringen af ringtestprøverne forud for diagnostikken, eller med selve håndteringen under diagnostikken. Som eksempler kan tænkes, at mælkeprøverne har været opbevaret forkert (fx i direkte sollys, op ad noget varmt), eller at de har været dyrket forkert (fx at inkubatoren ikke er kalibreret til den korrekte temperatur, eller lignende). Ellers ville man ikke få flere af prøverne som sterile, når de både er kvalitetssikrede inden fremsendelse, og ikke er fundet sterile af andre ringtestdeltagere. Disse 5 "Steril"-besvarelser må derfor betragtes som fejlhåndterede af ringtestdeltagerne.

De resterende 12 besvarelser af *Bacillus* spp. som "Steril" rejser omvendt mistanke om at prøve #11 kan være fejlfremstillet. Altså at der under produktionen af ringtestmaterialet er sket en beskadigelse af nogle af prøverørende. Forud for at ringtestmaterialet fremsendes foretages der to gange kvalitetskontrol: Prøverne optøes, udstryges og dyrkes for kontrol af 1) Renhed (altså for at sikre, at mælkeprøverne ikke er blevet kontamineret under fremstillingen) og 2) Total CFU (altså for at sikre, at der er den forventede mængde bakterier i prøven pr. ml efter nedfrysning og optøning). Hvis et bakterieisolat tolererer nedfrysning/optøning dårligt, vil det vokse frem med lavere CFU end det forventede og dermed blive ekskluderet. For begge de to

undersøgelser kontroldyrkes 10% af alle mælkeprøverne. I 2017 svarer det til, at der for hver bakterie blev kontroldyrket 5 mælkeprøver (10% af 48 tilmeldte deltagere rundet op). Ingen af de 5 kontroldyrkede prøver #11 var sterile – og de havde ikke reduceret CFU. Hvis man fraregner de 5 som fejlidentificerede #11 som en anden bakterie + de 5 som antageligt fejlhåndterede prøve #11, er der således $45 - 10 = 35$ besvarelser tilbage. Heraf er 12 besvaret som "Steril" svarende til $35/12 =$ hver 3. besvarelse. Det er derfor usandsynligt, at der i 5 kontroldyrkninger ikke var repræsenteret en steril prøve, hvis der havde været en beskadigelse på ca. $1/3$ af #11. For at være sikre, blev der alligevel foretaget yderligere kontroldyrkninger, da ringtestresultaterne var indsendt til DTU, og problemet med #11 blev opdaget. Der blev kontroldyrket samtlige resterende 12 mælkeprøver #11 (der produceres altid flere mælkeprøver, end der er tilmeldte til ringtesten, dels for at kunne efterkontrollere, dels for at kunne eftersende nye prøver ved behov). Af disse 12 blev ingen fundet hverken sterile eller med nedsat CFU/ml, trods at disse mælkeprøver havde været frosset ned ca. 4 uger længere, end dem fremsendt til ringtestdeltagerne. Samlet kan der derfor ikke gives nogen tilfredsstillende forklaring på de 12 besvarelser som "Steril".

Erfaringerne med *Bacillus*-prøven er frustrerende for alle parter, og der vil derfor fremover blive kontroldyrket 20% af mælkeprøverne før ringtestmaterialet fremsendes, selvom det ikke antages at øget kontroldyrkning ville have ændret noget i ringtest 2017. Derudover vil det pågældende *Bacillus* spp. isolat ikke blive anvendt fremover, idet oplevelsen fra 2017 rejser tvivl om dette isolats stabilitet uagtet, at en egentlig forringelse ved frysning/optøning ikke kunne påvises ved i alt 17 kontroldyrkninger (5 før og 12 efter fremsendelse af materialet til deltagerne).

Serratia marcescens var repræsenteret i prøve #13. *S. marcescens* blev systematisk fejlidentificeret idet 21 ud af 39 fejlidentifikationer skyldes forveksling med *Klebsiella* spp. *S. marcescens* er en enterobakterie ligesom *Klebsiella* spp. og *E. coli*. Men der kan være kliniske forskelle og potentielt forskellige resistensdynamikker, så der bør generelt skelnes indenfor gruppen af enterobakterier for at sikre korrekt besætningsrådgivning og enkeltdyrsbehandling.

Pseudomonas spp. var repræsenteret i prøve #14. I alt fejlidentificerede 22 deltagere prøve #14. Heraf var der 21, som stillede en diagnose med en anden bakterie og én, som stillede diagnosen "Steril". Af de 21 bakteriediagnoser havde 8 forkert Gram-status, dvs. at der blev angivet forskellige Gram-positive diagnoser for den Gram-negative *Pseudomonas* spp. Selvom der ikke er noget egentligt mønster i fejlidentifikationerne, kan det derfor konkluderes, at manglende gennemførelse af de grundlæggende rutinetests som minimum forklarer ca. $1/3$ af fejlidentifikationerne – svarende til problemstillingen, der blev belyst for *Klebsiella* spp. I ringtest 2016 var *Pseudomonas* spp. også en af de bakterier, som udløste flest fejl, og 12 ud af 28 fejlidentifikationer kunne dengang relateres til forkert Gram-status. Det må derfor konkluderes, at selvom problemstillingen med Gram-status blev grundigt belyst i ringtest 2016, så har niveauet desværre ikke forbedret sig i 2017. Dette er problematisk, da især Gram-status er afgørende for korrekt antibiotikavalg/fravalg.

Fra og med 2016 blev det annonceret, at prøver besvaret med "Ikke besvaret" tæller som fejl i ringtesten. Årsagen er, at dyrlægepraksis altid bør indsende bakterieisolater til et akkrediteret diagnostiklaboratorium, hvis de ikke selv med sikkerhed kan identificere bakterien. Derfor vil det korrekte svar for en prøve, som ikke kan identificeres indenfor rammerne af en given klinik, være "Indsendes til referencelaboratorium". I ringtest 2017 var der én fejlidentifikation, som skyldtes, at en bakterie, der skal kunne diagnosticeres ved gennemførelse af den fremsendte ID-nøgle, blev diagnosticeret som "Indsendes til referencelaboratorium". Herudover havde 1 deltager diagnosticeret prøve #12, som var en steril mælkeprøve, med "Indsendes til referencelaboratorium". I tilfælde af dyrkningsnegative prøver anbefales det, at mælkeprøven sendes til ekstern diagnostik for at afgøre, om prøven er sandt steril eller blot indeholder bakterier, som ikke kan dyrkes under praksisforhold. I tilfældet med den sterile prøve #12 blev svaret "Indsendes til referencelaboratorium" derfor medregnet som korrekte svar. Samlet set er der dermed kun én fejlagtig anvendelse af diagnosen "Indsendes til referencelaboratorium" og meget få "ikke besvaret". Dette er en meget positiv udvikling siden 2016, som viser, at de danske dyrlæger er bevidste om deres ansvar for at kunne nå en endelig diagnose – også når diagnosen ligger udenfor rammerne af den enkelte praksis.

I Tabel 5 angives de samlede fejlidentifikationer i ringtest 2017.

Tabel 5. Fejlidentifikationer. De forkerte identifikationer, som både er forkert bakterie og forkert Gram-status er markeret med rød for hver ringtestprøve.

PRØVE	FORVENTET FUND	FORKORTE UDEN "IKKE BESVAREDE" n, (%)	FORKERT IDENTIFIKATION
1	<i>Strep. uberis</i>	10, (22 %)	Steril n = 3, Forurennet n = 2, <i>Strep. agalactiae</i> /Grp B streptokok n = 2, <i>Strep. dysgalactiae</i> n = 1, CNS n = 1, <i>Ent. faecalis</i> n = 1
2	<i>Strep. dysgalactiae</i>	5, (11 %)	<i>Strep. agalactiae</i> n = 2, CNS. n = 2, <i>Strep. bovis</i> n = 1
3	<i>Strep. agalactiae</i>	10, (22 %)	<i>Strep. canis</i> n = 2, <i>Strep. dysgalactiae</i> n = 2, steril n = 2, intet svar n = 1, gær n = 1, <i>Strep. uberis</i> n = 1, <i>T. pyogenes</i> n = 1*
4	<i>E. coli</i>	0, (0 %)	
5	<i>Klebsiella</i> spp.	10, (22 %)	<i>Ent. faecalis</i> n = 4, <i>Bacillus</i> spp. n = 2, <i>Ent. faecium</i> n = 1, <i>Proteus</i> spp. n = 1, <i>Strep. uberis</i> n = 1, <i>S. aureus</i> n = 1
6	<i>S. aureus</i>	5, (11 %)	<i>S. pseudintermedius</i> n = 2, CNS n = 1, <i>T. pyogenes</i> n = 1
7	UDGÅET		
8	<i>Strep. agalactiae</i>	9, (20 %)	<i>Strep. dysgalactiae</i> n = 2, <i>Strep. uberis</i> n = 1, <i>Strep. canis</i> n = 1, <i>Lactococcus</i> spp. n = 1, <i>T. pyogenes</i> n = 1, <i>Ent. faecalis</i> n = 1, steril n = 1, send til reference lab n = 1. *
9	Gær	15, (33 %)	CNS n = 5, Steril n = 4, <i>Corynebacterium</i> spp. n = 1, <i>C. bovis</i> n = 1, <i>Micrococcus</i> spp. n = 1, <i>Klebsiella</i> spp. n = 1, send til reference lab n = 1, ikke besvaret n = 1

10	<i>Klebsiella</i> spp.	7, (16 %)	<i>Ent. faecalies</i> n = 3, CNS n = 2, <i>E. coli</i> n = 1, <i>S. marcescens</i> n = 1
11	<i>Bacillus</i> spp.	22, (49 %)	Steril n = 17, <i>S. aureus</i> n = 2, alge n = 2, CNS n = 1
12	Steril	3, (7 %)	CNS n = 1, <i>Corynebacterium</i> spp. n = 1, <i>Bacillus</i> spp. n = 1, Send til reference lab n = 1**
13	<i>Serratia marcescens</i>	39, (87 %)	<i>Klebsiella</i> spp. n = 21, Steril n = 6, Gær n = 2, <i>Strep. uberis</i> n = 2, CNS n = 2, Send til reference lab n = 2, <i>Micrococcus</i> spp. n = 1, alge n = 1, <i>Bacillus</i> spp. n = 1, <i>E. coli</i> n = 1
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22, (49 %)	<i>Proteus</i> spp. n = 7, Gær n = 3, <i>E. coli</i> n = 2, <i>Staph. aureus</i> n = 2, <i>S. haemolyticus</i> n = 1, <i>Strep. canis</i> n = 1, <i>S. pseudintermedius</i> n = 1, <i>Bacillus</i> spp. n = 1, <i>Micrococcus</i> spp. n = 1, <i>Klebsiella</i> spp. n = 1, steril n = 1, CNS n = 1
15	<i>Strep. agalactiae</i>	15, (33 %)	Steril n = 4, Send til reference lab n = 3, <i>Strep. dysgalactiae</i> n = 3, <i>T. pyogenes</i> n = 2, <i>Bacillus</i> spp. n = 1, CNS n = 1, <i>Ent. durans</i> n = 1

* For prøverne # 3, 8 og 15 var der hhv. 5, 6 og 5 brugere, som i første omgang fik registreret fejl for at identificere prøven som "Grp. B streptokok". Dette skyldtes en fejl i databasen, hvor nomenklaturen (*Strep. agalactiae* = Grp. B streptokok) ikke var blevet koblet sammen. Denne registrering er blevet korrigeret, så begge navne indgår som korrekt besvarelse i det endelige data som vist i tabellen.

** For prøve # 12 regnes besvarelsen "send til reference laboratorium" for korrekt svar på linje med "Steril", da dyrknings-negative prøver altid bør verificeres som sandt sterile.

RESISTENSBESTEMMELSE

Foruden identifikationen af bakterier inkluderede ringtesten resistensbestemmelse overfor penicillin, erythromycin og tetracyclin. Som et nyt tiltag i ringtest 2017 skulle der kun foretages resistensbestemmelse på 5 mælkeprøver. Diagnosen på disse 5 prøver blev forud oplyst. Denne ændring skyldes, at der var ønske om et mere overskueligt opsæt af resistensbestemmelserne, hvor alle deltagere foretog resistensbestemmelse på alle resistensprøverne og med samme udgangspunkt.

I ringtest 2017 havde 48 deltagere tilmeldt sig. 3 afleveret blank besvarelse for bakterieidentifikationerne, men én af disse 3 besvarede resistensbestemmelserne. Der var således 46 deltagere som besvarede ringtesten for bakterieidentifikation og/eller resistens. Af disse 46 afleverede 30 blank for resistensbestemmelserne.

I alt blev resistensbestemmelserne dermed besvaret af 16 deltagere, hvoraf de 15 også besvarede bakterieidentifikationerne. Af de 16 resistensbestemmelser var der 10 som besvarede hele resistensundersøgelsen. For de 6 delvise besvarelser var det især erythromycin og/eller tetracyclin som ikke

blev testet, mens der ikke var noget mønster i hvilke agens som blev udeladt af testene. Definitionerne for resistensbestemmelsesfejl er anvist i Tabel 6.

Tabel 6. Definitioner for resistensbestemmelsesfejl.

FEJLKODE	FEJLTYPE
Små fejl	Følsom men testet intermediær og omvendt. Resistent men testet intermediær og omvendt.
Stor fejl	Følsom men testet resistent
Meget stor fejl	Resistent men testet følsom

Fordelingen af deltageres resistensbestemmelser er vist i Tabel 7.

Tabel 7. Resultater af resistensbestemmelserne.

PRØVE #	FEJLKATEGORI	PENICILLIN	ERYTHROMYCIN	TETRACYKLIN	TOTAL
16	Små fejl				
	Store fejl				
	Meget store fejl				
	Ubesvaret		4	3	7
17	Små fejl	2	1	1	4
	Store fejl				
	Meget store fejl	2			2
	Ubesvaret		4	3	7
18	Små fejl	1	1	1	3
	Store fejl		1		1
	Meget store fejl		5		5
	Ubesvaret		4	3	7
19	Små fejl		1	5	6
	Store fejl	1		3	4
	Meget store fejl		2		2
	Ubesvaret	1	4	3	8
20	Små fejl		2		2
	Store fejl				
	Meget store fejl				
	Ubesvaret	1	4	3	8

ALLE PRØVER TILSAMMEN	Små fejl	3	5	7	15
	Store fejl	1	1	3	5
	Meget store fejl	2	7		9
	Ubesvaret	2	20	15	37

I tabel 8 er angivet bakterie samt korrekt resistensmønster for de 5 resistensprøver.

Taleb 8. Bakterie samt resistensprofil for resistensprøverne (S = sensitiv, I = intermediær, R = resistent).

PRØVE NR	AGENS	PENICILLIN	ERYTHROMYCIN	TETRACYKLIN
16	<i>S. aureus</i>	S	S	S
17	<i>S. aureus</i>	R	S	S
18	<i>S. aureus</i>	S	R	S
19	<i>S. uberis</i>	S	R	S
20	<i>E. coli</i>	R	R	R

Prøve #20 blev ved en fejl i databasen registrerede som følsom. Dette er blevet rettet, så deltagernes besvarelser er blevet vurderet efter den korrekte profil som angivet i Tabel 8.

PENICILLIN

16 deltagere udførte hel eller delvis bestemmelse af penicillinresistens. Det lave antal resistensbesvarelser kan undre, især for penicillin, da stoffet er førstevalg til mastitisantibiose hvis ikke andet er indikeret. Der bør altid udføres penicillinresistensbestemmelse på den oprindelige mælkeprøve, og mælkeprøven skal derefter gemmes, så den kan sendes til udvidet resistensdyrkning, hvis der identificeres antibiotikaresistens/behandlingssvigt. Hvis man ikke følger denne procedure, vil man dels overse de tilfælde der er af penicillinresistens/nedsat følsomhed (intermediære tilfælde), dels ikke have det korrekte materiale at anvende til udvidet resistensundersøgelse. For den udvidede resistensundersøgelse anbefales det at sende mælkeprøven til et akkrediteret laboratorium, så der kan opnås præcist svar på resistensprofilen.

Hvis man ser på prøve #17 så var der 2 meget store fejl – altså besvarelser, hvor en ringtestdeltager diagnosticerede en penicillinresistent *S. aureus* som penicillinfølsom.

Ud af 16 deltagere, som resistensbestemte prøve #17 var der altså 12,5% som ville have behandlet koen med penicillin, selvom det var kontraindikeret (2 ud af 16). Hvis man vil være skrap kan man endda lave regnestykket ud fra den præmis, at alle de 30 som undlod resistensbestemmelsen også havde behandlet koen med penicillin. Det vil så føre til følgende konklusion: ud af 46 dyrlæger overser 46-14 = 32 dyrlæger penicillinresistens hos *S. aureus*. Altså overses ca. 70% af resistenstilfældene (32 ud af 46). Og så tager regnestykket endda ikke højde for, at de som ikke udfører resistensbestemmelse, både vil overse de resistente bakterier – men også de intermedært følsomme, som heller ikke bør penicillinbehandles, og dermed potentielt fejlbehandle endnu flere køer. Da der ikke var intermedært følsomme bakterier i ringtest 2017, kan prævalensen af disse fejlbehandlinger dog ikke estimeres.

Baseret på ringtesten må man frygte, at den resistens, der findes i dag, kommer til at vokse, fordi den ofte overses, hvilket vil føre til, at de resistente bakterier behandles med penicillin. Dette er endda baseret på en ringtest, hvor alt var stillet til rådighed for dyrlægen, idet diagnosen var forud oplyst, så antallet af penicillinbehandlinger, der iværksættes på baggrund af forkert bakteriediagnose, ikke er taget med.

Det er helt klart en udfordring for danske dyrlæger, at der ikke er nogen officielle krav til hvordan antibiotikaresistens bestemmes korrekt. Dels er der begrænsninger for, hvad der kan lade sig gøre i et praksislaboratorium, da der bl.a. er begrænset tilgængelighed til resistensbestemmelsesmateriale. Dels er der ingen officielle angivelser af, hvilke af de tilgængelige materialer der skal anvendes. Derfor udføres resistensbestemmelser meget forskelligt fra klinik til klinik – hvis overhovedet. Den eneste sikre måde at identificere antibiotikaresistens er ved systematisk at teste for penicillinfølsomhed i praksislaboratoriet og videresende alle intermedære og resistente bakterier til et akkrediteret diagnostiklaboratorium, hvis koen fortsat ønskes antibiotikabehandlet. Så længe dette ikke er klart og et krav til alle, vil det skabe negativ konkurrenceforvriddning for de dyrlæger, som ønsker at resistensbestemme. Om dette er forklaringen på, at mange helt fravælger at resistensbestemme, må stå hen i det uvisse. Sikkert er det dog, at der samlet set er urimeligt dårlige vilkår for de dyrlæger, som ønsker at minimere og målrette anvendelsen af antibiotika.

Samlet må man derfor konkludere, at der tilsyneladende er mange dyrlæger, som helt fravælger at forholde sig til problematikken med resistensforekomst, og at der er dårlige vilkår for de dyrlæger, som ønsker at forholde sig til problematikken.

MAKROLID

Ud af 16 deltagere som udførte resistensbestemmelser, havde 4 undladt at besvare bestemmelserne for erythromycin. Der var således i alt 12 deltagere der testede for erythromycinresistens. De fejl der blev registreret for erythromycinresistens var primært relateret til prøverne 18 og 19. Heraf var der især mange alvorlige fejl for prøve #18 som indeholdt en erythromycinresistent *S. aureus*. Resistensbestemmelserne for

erythromycin svarer nogenlunde til resultaterne for ringtest 2016, hvor 10 deltagere havde gennemført bestemmelsen og med hhv. 8 små og 4 store fejl.

TETRACYKLIN

Ud af 16 deltagere som udførte resistensbestemmelser, havde 3 undladt at besvare bestemmelserne for tetracyklin. Der var således i alt 13 deltagere der testede for tetracyklin. Der var ingen meget alvorlige fejl og slet ingen fejl relateret til prøve #20 som indeholdt *E. coli*. Dette er en forbedring i forhold til ringtest 2016, hvor 14 havde besvaret tetracyklin-resistensen men med flere store fejl, herunder også en for *E. coli*.

KONKLUSION

Dette års ringtest er sammensat af bakterier, som er blevet indsendt til DTU, Veterinærinstituttet i forbindelse med mastitisdiagnostik i 2015, 2016 og 2017.

Overordnet viser resultatet af ringtest 2017 at:

- 1) Deltagerantallet i ringtest 2017 er lavt, men nogenlunde svarende til antallet i 2016. Den repræsentative værdi af test-resultaterne er derfor lav, idet ringtestdeltagerne tilsammen udgør en ret begrænset delmængde af det samlede antal praktiserende kvægdyrlæger i Danmark.
- 2) Det diagnostiske niveau er forringet i forhold til ringtest 2016, på trods af at mange bakterier var identiske i de to ringtestår, og at de fleste ringtestdeltagere i 2017 også medvirkede i ringtest 2016.
- 3) Der er mange fejlidentifikationer for hver ringtestprøve, sammenlignet med tidligere år. Dette fund gælder generelt men også specifikt for de bakterier, som indgik både i ringtest 2016 og 2017.
- 4) Der er intet/meget begrænset mønster i fejlidentifikationerne indenfor hver bakterie. Den enkelte ringtestdeltager identificerer bakterier meget forskelligt fra år til år og endda indenfor samme år, og på tværs af deltagergruppen er der stor spredning på de forkerte svar.
- 5) I ringtest 2017 blev det forsøgt at øge identifikationen af generelle fejlkilder ved at angive fejl diagnoser relateret til Gram-status. Dette understøtter konklusionen om, at manglende udførelse af de fundamentale mikrobiologiske identifikationstrin lader til at være en del af forklaringen på de mange fejlidentifikationer.

- 6) Antallet af deltagere, som udfører resistensbestemmelser, er overraskende lavt. Der er øget forekomst af resistente bakterier i danske staldmiljøer og derfor også øget behov for opmærksomhed på dette blandt de danske dyrlæger. I ringtest 2016 blev der inkluderet resistensbestemmelser på samtlige prøver for at henlede opmærksomheden på, at resistensforekomst altid bør være med i overvejelserne, når man diagnosticerer og behandler mastitis. Alligevel var antallet af deltagere som gennemførte resistensbestemmelserne lavt i 2016. I ringtest 2017 forsøgte man at gøre resistensbestemmelserne yderligere brugervenlige, ved at oplyse bakterierne der skulle laves resistensbestemmelser på, og ved at begrænse antallet af resistensbestemmelser til 5. Dette har dog ikke ændret på den dominerende tendens til at ringtestdeltagerne fravælger at gennemføre resistensbestemmelse.
- 7) *S. aureus* anses som et almindeligt og alvorligt mastitispatogen. Ydermere er *S. aureus* kendt fra andre produktionsdyr for at være anledning til omfattende resistensdebat. I et endnu upubliceret studie anslås den danske prævalens af nedsat penicillinfølsomhed hos *S. aureus* fra mastitis til at være ca. 17,5 %. Derfor er det bekymrende, at så få dyrlæger vælger at teste *S. aureus* for penicillinresistens, og at så relativt stor en del af dem, der gennemfører resistensbestemmelsen resulterer i meget store fejl.

Som resultat af ovennævnte konklusioner, vil ringtesten fremover ikke omfatte resistensbestemmelse for erythromycin og tetracyclin. Det skyldes, at ringtesten fremover vil fokusere på resistensbestemmelse af penicillin. Dette sker for at signalere, at penicillinresistens er et af de nødvendige aspekter for den indledende korrekte mastitisiagnostik. Hvis en ko ikke kan behandles med penicillin, bør der foretages en fuld resistensbestemmelse, hvis der fortsat ønskes antibiotikose. Resistensprofiler er ofte komplekse, så det vil være utilstrækkeligt at teste for ét eller få andre antibiotika, hvis en fejlbehandling skal udelukkes. Dermed vil ringtesten fremover opfordre til én fælles resistensbestemmelsesprocedure, som bør indgå i al rutinediagnostik på mælkeprøver.

Herudover giver konklusionerne i ringtest 2017 anledning til at gentage opfordringen fra 2016: Jo højere deltagerantallet er, jo bedre overblik giver ringtestrapporten over den samlede danske dyrlægestands kompetencer indenfor mastitisiagnostik. Ringtesten udgør det eneste fælles hjælpemiddel for alle praktiserende kvægdyrlæger til at få kalibreret deres diagnostiske kompetencer, få identificeret specifikke diagnostiske problemer i den enkelte klinik, og at få et overblik over det landsdækkende diagnostiske niveau indenfor aktuelle mastitispatogener. Ringtesten er derfor et unikt redskab for kvægdyrlæger til at udføre egenkontrol af deres mastitisiagnostik. Der skal derfor lyde en stor opfordring til at flere tilmelder sig ringtesten – herunder anbefales det, at flere dyrlæger pr. klinik tilmelder sig, da det vil give et mere nuanceret resultat for den enkelte klinik at arbejde videre med.

For at imødekomme behovet for egenkontrol og problemfinding i mastitisiagnostik er der fra 2018 udbudt et hands-on kursus i mastitisiagnostik. Kurset udbydes i samarbejde mellem Center for Diagnostik DTU, SEGES og Den Danske Dyrlægeforening Faggruppe kvæg. Kurset afholdes næste gang 13.-14. marts 2019.