

Ringtest for identifikation og resistens- bestemmelse af mastitispatogener

2016



Ringtest for identifikation og resistens- bestemmelse af mastitispatogener 2016

Lærke Boye Astrup

Karl Pedersen

Ljudmila Trojanova

Jytte Butters

Heidi K. Dahl Larsen

FEBRUAR 2017

RINGTEST FOR IDENTIFIKATION OG RESISTENSBESTEMMELSE AF MASTITIS PATOGENER 2016

AF

Dyrlæge Lærke Boye Astrup¹, Professor Karl Pedersen¹, Laborant Ljudmila Trojanova¹, Databaseansvarlig Jytte Butters² og Marketingchef Heidi K. Dahl Larsen³,

¹ DTU Veterinærinstituttet, ² DTU Fødevarerinstituttet, ³ Dianova A/S

COPYRIGHT: Hel eller delvis gengivelse af denne publikation er tilladt med kildeangivelse

UDGIVET AF: Veterinærinstituttet
Danmarks Tekniske Universitet
Bülowsvej 27, 1890 Frederiksberg C
Tlf. 35 88 60 00

REKVIRERES: Rapporten findes i elektronisk form på www.dianova.dk

INDLEDNING

Formålet med mastitis ringtesten er at give dyrlæger, veterinærpsygeplejersker og laboranter, der beskæftiger sig med mikrobiologisk laboratoriearbejde i veterinær klinisk praksis mulighed for at kvalitetssikre og teste pålideligheden af den diagnostik af mælkeprøver, der udføres i praksislaboratoriet. Mastitis ringtesten omfatter normalt forekommende mastitispatogener og bakterier, der kan give anledning til differentialdiagnostiske problemer. Ringtesten er målrettet kvægpraksis og laboratorier, der arbejder med mastitisdiagnostik. Mastitis ringtesten er blevet afholdt siden 2005, hvor den blev igangsat af DTU Fødevareinstituttet i et samarbejde med Den Danske Dyrlægeforening og Videncenter for Landbrug, Kvæg. Dianova udbyder ringtesten i samarbejde med DTU Veterinærinstituttet og har haft hjælp til overdragelse fra Lina Cavaco fra DTU Fødevareinstituttet.

I mastitis ringtesten 2016 har der været fokus på at inkludere vigtige og almindeligt forekommende mastitispatogener, som personale i kvægpraksis bør kunne skelne fra hinanden. Der er ved ringtesten næsten udelukkende anvendt kliniske isolater, som er indsendt til DTU Veterinærinstituttet i 2015 og 2016 fra danske kvægpraksis til identifikation og/eller resistensbestemmelse. Anvendelsen af sådanne isolater sikrer, at ringtesten baseres på relevante mastitispatogener, og at isolaterne er friske.

I det følgende bringes et sammendrag af resultaterne fra mastitis ringtesten 2016.

UNDERSØGELSEN

DELTAGERE

Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener blev annonceret på medlemsmøde for Sektion vedrørende Kvæg i august 2016. I oktober bragte Dansk Veterinærtidsskrift en artikel om ringtesten, og Dianova sendte information direkte til tidligere deltagere på e-mail og annoncerede ringtesten via nyhedsbrev, LinkedIn og dianova.dk.

I alt tilmeldte 41 personer sig til mastitis ringtesten. Af disse havde 30 deltagere været med i ringtesten tidligere, og dermed deltog 11 personer i ringtesten for første gang. I de seneste ringtests var deltagerantallet væsentligt højere med 59 personer i 2014 og 61 personer i 2012. Tidligere har det været muligt at deltage som praksis og bestille ekstra log-ins til de enkelte medarbejdere. I 2016 skulle alle deltagere tilmeldes individuelt, og mange klinikker valgte kun at deltage med en enkelt deltager pr. virksomhed. Deltagerne var primært tilknyttet kvægpraksis, men et enkelt laboratorium og en virksomhed, der udvikler diagnostiske kits, har også deltaget. Antallet af deltagende virksomheder er faldet fra 41 i 2014 til 37 i 2016. Det kan konkluderes, at beslutningen om at ændre ringtestens frekvens til hvert andet år for at få flere til at være med, ikke har haft den ønskede effekt. Mandag den 7. november 2016 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 14. november 2016 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.

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 sin egen præstation i 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. En fejl i databasen, hvor svarene indrapporteres af deltagerne medførte, at muligheden for indtastning af svar lukkede ned før tid. Databasen blev genåbnet og holdt længere åbent end planlagt, så alle kunne nå at indrapportere. Dette medførte at tidspunktet for, hvornår de personlige resultater kunne tilgås, blev skubbet fra tirsdag den 29. november til torsdag den 1. december.

Af de 41 deltagere var der to, der ikke havde indtastet resultatet ved ringtestens afslutning. Denne rapport er således baseret på i alt 39 besvarelser.

PROCEDURE

Ringtesten bestod af 15 mælkeprøver som hver var podet med renkulturer af et mastitispatogen. Disse blev testet på sædvanlig vis i praksis ved anvendelse af de normale rutiner, og resultaterne blev indrapporteret via internettet på portalen <http://mastitis.food.dtu.dk>

Ved indtastning af resultater i portalen var der tre alternative svarmuligheder frem for en patogenidentifikation: ”Blankt felt”, ”Steril” og ”Indsendes til referencelaboratorium”. De tre svarmuligheder tolkes i resultaterne som hhv.: ”Blankt felt” = prøven er ikke identificeret. ”Steril” = prøven var steril ved dyrkning på agar i mindst 48 timer. ”Indsendes til referencelaboratorium” = prøven kunne ikke identificeres efter mindst 48 timers dyrkning på blodagar og ville være sendt til bestemmelse på et referencelaboratorium, hvis prøven havde været en almindelig mælkeprøve udtaget af klinikken til diagnostisk formål. Det skal her understreges, at det er vigtigt at pladerne aflæses både ved 24 og 48 timer, da nogle mastitispatogener vokser langsomt frem. Dette fremgår også tydeligt af den fremsendte ”Procedure for mastitis ringtest 2016 – Sådan får du bedst mulige resultater”.

RESULTATER

Resultaterne er opgjort i to underafsnit: Først et identifikationsafsnit, som omhandler de korrekte identifikationer af prøverne i årets ringtest. 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 patogener, som er forbundet med et generelt mangelfuldt diagnostisk niveau blandt deltagerne og til at identificere mulige forklaringer på, hvorfor diagnostikken er utilstrækkelig for disse patogener. Samlet kan man derfor anvende de to resultatafsnit til at vurdere henholdsvis, hvordan det diagnostiske niveau er blandt deltagerne, og hvilke patogener der er årsag til de mest udbredte diagnostiske problemer.

IDENTIFIKATION

I mastitis ringtesten 2016 var der en del nomenklaturproblemer. Problemerne skyldtes, at generelle bakterienavne som fx CNS samt forældede bakterienavne som fx *Corynebacterium pyogenes* (nu *Trueperella pyogenes*) alle blev kategoriseret som forkerte i databasen. Dette problem er korrigeret i rapporten som angivet i Tabel 1. Resultaterne som er anført i denne rapport, er derfor baseret på de korrekte mikrobiologiske svar idet

fejl relateret til nomenklaturproblemer blev korrigerede før der blev lavet statistik. Databasen til mastitis ringtest vil blive ændret, så dette problem ikke optræder i kommende ringtest.

TABEL 1. KORREKTE PRØVEIDENTIFIKATIONSSVAR

	FORVENTET SVAR	KOMMENTAR
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kun <i>Staph. aureus</i> anses for korrekt svar
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kun <i>Staph. aureus</i> anses for korrekt svar
3	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Da <i>Staph. haemolyticus</i> er en CNS, er CNS også bedømt som korrekt svar. Da denne bakterie er hæmolytisk, er den en vigtig differentialdiagnose til <i>Staph. aureus</i> . <i>Staph. aureus</i> er således bedømt som forkert svar.
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Da <i>Staph. epidermidis</i> er en CNS, er CNS også bedømt som korrekt svar
5	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Strep. agalactiae</i> eller Grp. B strep. er begge korrekte svar
6	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Strep. agalactiae</i> eller Grp. B strep. er begge korrekte svar
7	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Strep. uberis</i> er korrekt svar
8	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Strep. dysgalactiae</i> er korrekt svar
9	<i>Enterococcus faecalis</i>	Fækale streptokokker er også godkendt som korrekt svar
10	<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Corynebacterium</i> er vanskelig at artsbestemme, så derfor er både <i>Corynebacterium bovis</i> og <i>Corynebacterium</i> spp. bedømt som korrekte svar
11	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Denne bakterie har skiftet navn flere gange, fra <i>Corynebacterium pyogenes</i> over <i>Actinomyces pyogenes</i> og <i>Arcanobacterium pyogenes</i> til nu <i>Trueperella pyogenes</i> . Alle disse navne er bedømt som korrekte svar.
12	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> er korrekt svar
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella</i> spp. er korrekt svar
14	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp. er korrekt svar
15	Gærsvamp	Prøven indeholdt <i>Candida cruzei</i> . Gærsvamp er det korrekte svar

Fordelingen af de korrekte identifikationer anvendes primært til at vurdere det diagnostiske niveau hos den enkelte testdeltager og generelt for årets ringtest. Fordelingen af korrekte identifikationer defineres som vist i Tabel 2.

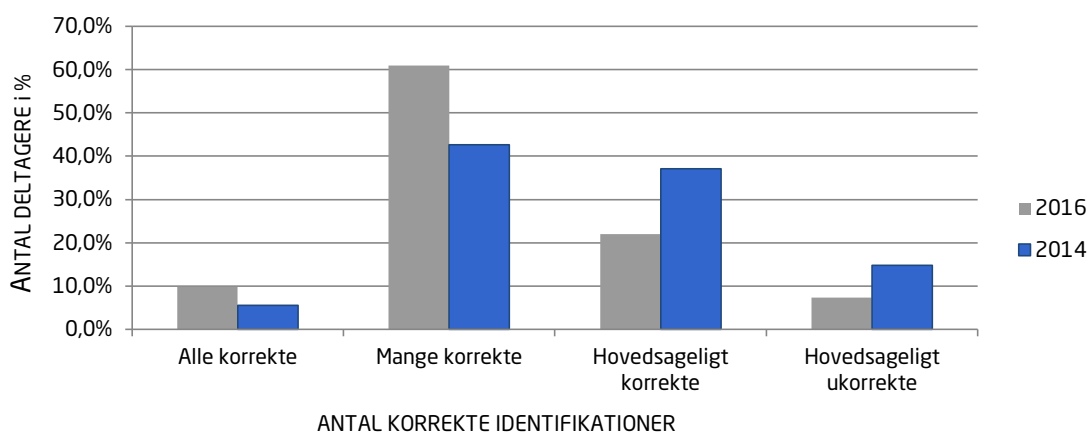
TABEL 2. DEFINITIONER FOR INDELING AF KORREKTE IDENTIFIKATIONER

IDENTIFIKATIONSKODE	DEFINITION
Alle korrekte	15/15 prøver korrekt identificeret
Mange korrekte	12 – 14 prøver korrekt identificeret
Hovedsageligt korrekte	8 – 11 prøver korrekt identificeret
Hovedsageligt ukorrekte	0 – 7 prøver korrekt identificeret

I ringtest 2016 havde 4 deltagere alle 15 identifikationer korrekte (svarende til 27 % af prøvedeltagerne). Dette er en moderat stigning i forhold til 2014, hvor der tilsvarende var 4 deltagere med alle korrekte, men ud af et højere

samlet deltagerantal (54 deltagere i 2014 mod 41 i 2016). I 2016 havde 25 af deltagerne (64 %) mange korrekte identifikationer hvilket er væsentligt højere end de 23 deltagere (42,6 %), som havde mange korrekte i 2014. Herudover havde 9 ud af de 39 deltagere (22 %) hovedsageligt korrekte identifikationer. Dette er en tilbagegang i forhold til 2014 hvor 20 (37 %) af deltagerne havde hovedsageligt korrekte identifikationer. I 2016 var der tre deltagere (7,3 %), som havde hovedsageligt ukorrekte svar, hvilket er lavere end de 8 deltagere i 2014 (14,8 %). Samlet er det generelle diagnostiske niveau derfor højt i ringtest 2016 sammenlignet med ringtest 2014, som det er vist i figur 1.

FIGUR 1. FORHOLDET IMELLEM ANTAL DELTAGERE OG ANTAL KORREKTE IDENTIFIKATIONER I RINGTEST 2014 OG 2016



IDENTIFIKATION AF FEJLKILDER

Identifikationen af fejlkilder anvendes primært til at udpege hvilke patogener, som forårsager flest diagnostiske problemer og til at udpege mulige forklaringer på, hvorfor disse patogener hyppigt bliver fejlidentificerede. Afsnittet omhandler derfor ikke de patogener, som kun blev sporadisk fejlidentificeret. Fejlidentifikationerne opgøres procentvist og defineres som vist i Tabel 3.

TABEL 3. FEJLIDENTIFIKATIONS-PROCENTEN 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 16 - 50
Mange fejl	Den samlede fejlprocent er over 50

Der var kun 3 prøver, som ingen fejl udløste: #7 *Strep. uberis*, #8 *Strep. dysgalactiae* og #12 *E. coli*. Desuden udløste prøve #13 som indeholdt *Klebsiella* spp., præcist 15 % fejl. Dette er en forringelse i forhold til 2014 hvor 6 prøver blev besvaret med under 15 % fejl. Dog indeholdt prøverne #8, #12 og #13 samme agens som forårsagede under 15 % fejl i 2014. Der er derfor tilsyneladende konsistent højt kvalitetsniveau i diagnostikken af disse tre agens. I 2016 tegnede 2 af prøverne sig for mange fejl dvs. over 50 % fejlidentifikationer for hver prøve. Det drejer sig om prøverne #3 *Staph. haemolyticus* og #14 *Pseudomonas* spp. hhv. I det følgende gives uddybende kommentarer til de prøver, som udløste systematiske diagnostiske problemer.

Prøve #1 indeholdt *Staph. aureus*. Identifikationsprocenten var høj for denne prøve (kun 6 fejlidentifikationer i

alt). Men 4 af fejlidentifikationerne skyldtes, at *Staph. aureus* blev forvekslet med *Staph. pseudintermedius*. Forklaringen på denne fejlidentifikation kan være, at det kan være vanskeligt at skelne *Staph. aureus* fra andre koagulase-positive staphylokokker. Dog kan *Staph. aureus* og *Staph. pseudintermedius* skelnes på mannitolsaltagar, idet *Staph. aureus* fermenterer mannitol og dermed ændrer agarens farve til gul hvorimod *Staph. pseudintermedius* godt kan vokse på mannitolsaltagar, men ikke ændrer farven af dette. Selvom fejlprocenten er lav for denne prøve, vurderes det relevant at knytte en generel kommentar til forvekslingen af *Staph. aureus* med *Staph. pseudintermedius*. Denne vurdering skyldes, at der i de seneste år har været international opmærksomhed på, at forekomsten af *Staph. pseudintermedius* sandsynligvis er underestimeret netop fordi *Staph. pseudintermedius* fejlkategoriseres som *Staph. aureus*. Der er således fra det Europæiske Medicinagentur allerede i 2010 opfordret til øget opmærksomhed blandt praktiserende dyrlæger og forskere på at undgå denne forveksling. Årsagen til, at denne forveksling bør undgås, er, at fejlidentifikationerne kan føre til mangelfuld eller ukorrekt behandling/afkolonisering af bl.a. Methicillin Resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Prøverne #3 (*Staph. haemolyticus*) og #4 (*Staph. epidermidis*) indeholdt en CNS og resulterede i henholdsvis 64 % og 18 % fejl. Herunder var *Staph. haemolyticus* en af de bakterier, som udløste absolut flest fejlidentifikationer. Størstedelen af fejlidentifikationerne af *Staph. haemolyticus* kunne tilskrives forveksling med enten *Staph. aureus* eller *Micrococcus*. *Staph. haemolyticus* kan let forveksles med *Staph. aureus*, hvis ikke der udføres en koagulase-test (*Staph. haemolyticus* er koagulase-negativ, mens de fleste *Staph. aureus* er koagulase-positive). Tilsvarende kan forvekslingen mellem *Staph. haemolyticus* og *Micrococcus* spp. undgås ved at undersøge for hæmolyse på agarpladen, da *Staph. haemolyticus* er hæmolytisk, mens *Micrococcus* spp. ikke er. Dog kan det hertil nævnes, at *Micrococcus* behandles på samme måde som CNS, og at denne fejlidentifikation derfor ikke er graverende. Ud over de to nævnte hyppige fejltyper blev *Staph. haemolyticus* også rapporteret som diverse andre bakterier. Disse fejl kunne også alle være undgået ved at udføre basale standard identifikationstest som angivet i ID-nøglen. Som eksempler er *Staph. haemolyticus* en kok og gram-positiv, men blev fejlidentificeret som både *Listeria monocytogenes*, der er stavformet, og som *Klebsiella* spp., der er både stavformet og gram-negativ. Disse typer fejlidentifikation kunne dermed være undgået ved fx nigrosinfarvning og/eller gram-farvning. Samlet peger de mange fejlidentifikationer af CNS – især af *Staph. haemolyticus* derfor på, at der ikke er blevet foretaget de nødvendige rutineundersøgelser (koagulase-test, katalase-test, nigrosinfarvning og gram-farvning) til at supplere den morfologiske identifikation på agarpladerne. Til testresultaterne for prøve #4 (*Staph. epidermidis*) skal det i øvrigt bemærkes, at der var tre testdeltagere, som besvarede denne prøve som ”Steril”. På baggrund af disse tre svar blev samtlige overskydende ringtest-prøver #4 opvækket og dyrket som ekstra kontrol på DTU Veterinærinstituttet. Der blev ingen sterile prøver fundet ved denne kontroldyrkning. De fejlfri kontroldyrkninger både før og efter udsendelsen af ringtestmaterialet peger derfor på, at de tre prøver, som er fundet sterile, ikke har været udsået/håndteret korrekt af ringtestdeltageren.

Prøve #5 og #6 indeholdt *Strep. agalactiae*. I ringtesten 2014 var der meget stor forskel på antallet af fejl rapporteret for de to daværende *Strep. agalactiae*-prøver med henholdsvis 8 % og 40 %. Den store forskel blev antaget at skyldes forskelligt niveau af udskilt beta-hæmolyse, idet graden af hæmolyse kan variere mellem forskellige isolater af *Strep. agalactiae*. I ringtesten 2016 blev begge *Strep. agalactiae*-prøver korrekt identificeret af de fleste testdeltagere idet fejlprocenten var 18 % og 13 % hhv. Dette samstemmer med, at de to *Strep. agalactiae*-prøver i 2016 havde nogenlunde ens hæmolyse, og at en variation i graden af hæmolyse derfor ikke har udløst fejlidentifikationer i år.

Prøve #10 indeholdt *Corynebacterium* spp. Denne bakterie blev inkluderet i panelet, da *Corynebacterium* spp. ofte forveksles med CNS baseret på morfologien. I ringtesten 2014 var fejlprocenten 53 %, hvorimod fejlprocenten

i 2016 var faldet til 15 %. I 2016 var der ingen deltagere, som havde forvekslet *Corynebacterium* spp. med CNS. Denne store forbedring af identifikationen af *Corynebacterium* spp. kan skyldes, at testdeltagerne har fulgt de anbefalinger, som blev givet i ringtestrapporten 2014, om at udføre nigrosinfarvning for at skelne mellem *Corynebacterium* spp. og CNS (*Corynebacterium* spp. er let genkendelige i et mikroskopipræparat, hvor stavene er lejret vinklet i kølleform).

Prøve #11 indeholdt *Trueperella pyogenes* (tidligere *Arcanobacterium pyogenes*/*Corynebacterium pyogenes*/*Streptomyces pyogenes*). Fejlprocenten i 2016 var 21 %, hvilket er betragteligt mindre end i ringtesten 2014, hvor *Trueperella* resulterede i 31 % fejlidentifikationer. *Arcanobacterium (Trueperella) pyogenes* er et beta-hæmolyserende agens, hvilket antages at være årsagen til, at *Trueperella* primært blev fejlidentificeret som *Strep. pyogenes* (5 ud af 8 fejlidentifikationer). Denne fejlidentifikation kunne dog let være undgået ved at udføre nigrosinfarvning idet *Trueperella* er stavformet, hvorimod *Strep. pyogenes* er en kok. Omvendt kan der have været testdeltagere, som netop har gennemført mikroskopiering af prøve #11, men har fortolket udseendet af *Trueperella* som *Corynebacterium* spp., idet begge bakterier er coryneforme. Det er selvfølgelig beklageligt, hvis dette er tilfældet, idet man netop har ulejliget sig med at udføre mikroskopi. Fejlen kunne dog have været undgået ved at supplere mikroskopieringen med en katalase-test, idet *Trueperella pyogenes* er katalase-negativ, mens *Corynebacterium* spp. er katalase-positiv. Desuden bør man på blodagaren forud for mikroskopieringen bemærke, at *Trueperella pyogenes* er beta-hæmolytisk, mens *Corynebacterium* spp. generelt ikke er. Mikroskopiering bør derfor ikke stå alene som beslutningsgrundlag for differentiering mellem de to patogener. Det skal dog i den forbindelse nævnes, at forvekslingen mellem *Trueperella* og *Corynebacterium* spp. ikke anses som en stor fejl, idet begge bakterier er sensitive for penicillin.

Prøve #14 indeholdt *Pseudomonas* spp. og var en af de prøver, som udløst absolut flest fejlidentifikationer (kun 10 deltagere havde identificeret prøve #14 korrekt). Årsagen til de mange fejlidentifikationer antages at være, at der ikke bliver foretaget de nødvendige rutinetests til at supplere dyrkningen på selektive agar-plader. Således er *Pseudomonas* spp. oxidase-positiv, men blev af 14 deltagere fejlidentificeret som *Proteus* spp., som er oxidase-negativ. Tilsvarende er *Pseudomonas* spp. gram-negativ, men blev af 10 deltagere fejlidentificeret som *Bacillus* spp., som er gram-positiv. Forvekslingen af gram-status er alvorlig, da det kan medføre forkert valg af antibiotika.

For de øvrige prøver er niveauet af fejlidentifikationer så lavt, at der ikke vil blive givet nogen samlet vurdering af årsagen til disse fejl. Dog gælder det for de prøver, som kun blev sporadisk fejlidentificeret, at fejlidentifikationerne generelt afspejler manglende udførelse af helt basale rutinetests til at supplere dyrkningen på selektive medier så som fx oxidase-test, katalase-test eller gram-farvning.

I Tabel 4 angives de samlede fejlidentifikationer i ringtest 2016. I tidligere år har fejlprocenterne været opgjort på baggrund af det samlede antal identifikationer for den pågældende prøve, hvor prøvesvarene ”Ikke besvaret”, ”Steril” og ”Indsendes til referencelaboratorium” ikke talte med. Fra og med i år er det besluttet, at prøver besvaret med ”Ikke besvaret” tæller som fejl i ringtesten. Årsagen er, at dyrlægepraksis altid bør indsende bakterieisolater til referencelaboratorium, hvis de ikke selv med sikkerhed kan identificere agens. Derfor vil det korrekte svar for en prøve, som ikke kan identificeres indenfor rammerne af en given klinik, være ”Indsendes til referencelaboratorium”. I årets ringtestrapport er fejlprocenterne derfor opgjort dobbelt: både som beregnet med og uden ”Ikke besvaret”-resultater. Denne dobbelte opgørelse vil kun forekomme i ringtest 2016 og gives som en service af to grunde: 1) For at kunne give den enkelte deltager mulighed for at vurdere sine resultater efter de tidligere retningslinjer. 2) For at kunne sammenligne resultaterne fra foregående ringtest med dem fra 2016 og fremtidige ringtest. Ringtestrapport 2016 udgør dermed en overgangsrapport, hvor udregningsproceduren for

fejlprocenten ændres.

TABEL 4. FEJLIDENTIFIKATIONER

PRØVE	FORVENTET FUND	FORKERTE UDEN "IKKE BESVAREDE" n, (%)	FORKERTE MED "IKKE BESVAREDE" n, %	FORKERT IDENTIFIKATION
1	<i>Staph. aureus</i>	6, (15 %)	6, (15 %)	<i>Staph. pseudintermedius</i> n = 4, <i>Staph. CNS</i> n = 1, <i>Micrococcus</i> spp. n = 1
2	<i>Staph. aureus</i>	4, (10 %)	4, (10 %)	<i>Staph. pseudintermedius</i> n = 2, <i>Staph. CNS</i> n = 1, <i>Lactococcus</i> spp. n = 1
3	<i>Staph. haemolyticus</i>	23, (59 %)	25, (64 %)	<i>Staph. aureus</i> n = 8, <i>Micrococcus</i> spp. n = 5, <i>Strep. agalactiae</i> n = 3, <i>Staph. pseudintermedius</i> n = 2, <i>Klebsiella</i> spp. n = 2, intet svar n = 2, <i>Strep. canis</i> n = 1, <i>Listeria mono-</i> <i>cytogenes</i> n = 1, <i>Ent. faecalis</i> n = 1
4	<i>Staph. epidermidis</i>	4, (10 %)	7, (18 %)	<i>Micrococcus</i> spp. n = 4, steril n = 3
5	<i>Strep. agalactiae</i>	7, (18 %)	7, (18 %)	<i>Strep. pyogenes</i> n = 2, <i>Strep. canis</i> n = 2, <i>Staph. CNS</i> n = 1, <i>Strep. dys-</i> <i>galactiae</i> n = 1, <i>Staph. haemolyticus</i> n = 1
6	<i>Strep. agalactiae</i>	5, (13 %)	5, (13 %)	Grp. B. <i>strep.</i> n = 2, <i>Strep. canis</i> n = 2, <i>Strep. dysgalactiae</i> n = 1
7	<i>Strep. uberis</i>	0, (0 %)	0, (0 %)	
8	<i>Strep. dysgalactiae</i>	0, (0 %)	0, (0 %)	
9	<i>Ent. faecalis</i>	5, (13 %)	5, (13 %)	<i>Ent. faecium</i> n = 3, <i>Micrococcus</i> spp. n = 1, <i>Klebsiella</i> spp. n = 1
10	<i>Corynebacterium bovis</i>	6, (15 %)	6, (15 %)	<i>Arcanobacterium (Trueperella)</i> n = 2, <i>Bacillus</i> spp. n = 1, <i>Micrococcus</i> spp. n = 1, <i>Actinomyces pyogenes</i> n = 1, alge n = 1
11	<i>Arcanobacterium</i> (<i>Trueperella</i>) <i>pyogenes</i>	8, (21 %)	8, (21 %)	<i>Strep. pyogenes</i> n = 5, <i>Corynebacte-</i> <i>rium</i> spp. n = 2, <i>Staph. haemolyti-</i> <i>cus</i> n = 1
12	<i>Escherichia coli</i>	0, (0 %)	0, (0 %)	
13	<i>Klebsiella</i> spp.	2, (5 %)	3, (8 %)	<i>Ent. faecalis</i> n = 1, <i>Strep. uberis</i> n = 1, intet svar n = 1
14	<i>Pseudomonas</i> spp.	28, (72 %)	29, (74 %)	<i>Proteus</i> spp. n = 14, <i>Bacillus</i> spp. n = 10, <i>E. coli</i> n = 2, <i>Staph. aureus</i> n = 1, Gærsvamp n = 1, intet svar n = 1
15	Gærsvamp	5, (13 %)	5, (13 %)	<i>Staph. CNS</i> n = 3, <i>Strep. uberis</i> n = 1, steril n = 1

RESISTENSBESTEMMELSE

Foruden identifikationen af patogener inkluderede mastitisringtesten resistensbestemmelse overfor penicillin, makrolid-gruppen, og tetracyclin. Samtlige 15 prøver var således markeret på besvarelsessiden, så der kunne indtastes resistensbestemmelse. Prøve #10 indeholdt *Corynebacterium bovis*. Der findes ikke internationalt fastsatte break-points til resistensbestemmelse for denne bakterie. Derfor kan man ikke fortolke MIC- værdien for *Corynebacterium bovis* (MIC = ”minimum inhibitory concentration” hvilket angiver den laveste koncentration, der kræves af et givet antibiotikum, for at forhindre vækst af bakterien. Det vil sige, at der ikke kan fastsættes endelige grænser for, hvor meget antibiotikum *Corynebacterium bovis* skal kunne tåle, for at man kategoriserer den som resistent). Ydermere indeholdt prøve #15 en gærsvamp og skal derfor ikke behandles med antibiotika. Derfor er resistensbestemmelser for prøve #10 og #15 ikke talt med i beregningerne af antal af fejl i resistensbestemmelserne. Der var enkelte deltagere, som havde identificeret prøve #15 korrekt men alligevel udført resistensbestemmelse. Det skal i denne sammenhæng understreges, at man ikke skal foretage resistensbestemmelse på gærsvampe. At det var gjort muligt at indtaste resistensbestemmelse for prøve #10 og #15 skyldes derfor, at det ville afsløre prøvernes patogener, hvis de som de eneste ikke var åbne for resistensbestemmelse. Opgørelsen over resistensbestemmelsesfejl er kategoriseret efter de definitioner, der er anvist i Tabel 5.

TABEL 5. DEFINITIONER FOR RESISTENSBESTEMMELSELSFEJL

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

I tabel 6 er angivet de korrekte resistensbestemmelser for de 14 prøver som indeholdt bakterier i årets ringtest.

TABEL 6. RESULTATERNE FOR RESISTENSBESTEMMELSERNE (S = SENSITIV, R = RESISTENT, - = IKKE TESTET

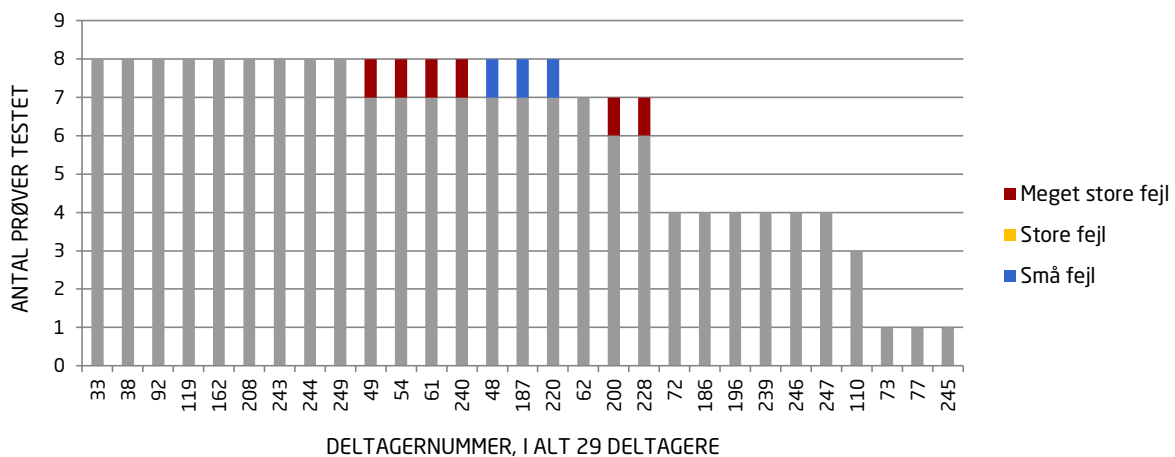
PRØVE NR	PENICILLIN	ERYTHROMYCIN	TETRACYKLIN
1	S	S	S
2	S	S	S
3	R	S	S
4	S	S	S
5	S	S	S
6	S	S	S
7	S	S	S
8	S	S	S
9	S	R	R
10	-	-	-
11	S	S	S
12	R	R	S
13	R	R	S
14	R	R	S

PENICILLIN

I ringtest 2016 havde 32 deltagere udført bestemmelse af penicillinresistens. De 32 deltagere havde udført resistensbestemmelse for penicillin på mellem 3 og 15 prøver. De 32 deltagere havde i alt lavet 3 små fejl, 24 store fejl og 10 meget store fejl. De små fejl var fordelt således: *Staph. haemolyticus* 3. De store fejl var fordelt således: *Ent. faecalis* 24. De meget store fejl var fordelt således: *Staph. haemolyticus* 6, *Ent. faecalis* 1, *E. coli* 1, *Klebsiella* spp. 1, *Pseudomonas* spp. 1. Det var således 5 prøver, som udløste alle fejlene hvoraf *Staph. haemolyticus* og *Ent. faecalis* var de eneste, som var fejlbedømt af mere end én deltager. Ud af de 32 deltagere, som havde udført resistensbestemmelser for penicillin, var der kun 5, som ingen fejl havde lavet (svarende til 16 %). Dette er en væsentlig nedgang i forhold til ringtest 2014, hvor 45 % af de deltagere, som udførte bestemmelse for penicillinresistens, havde alle bestemmelser korrekt. Ud af de 5 deltagere i 2016, som havde alle deres bestemmelser for penicillinresistens korrekt, var der kun én, som havde foretaget bestemmelse af penicillinresistens hos *Ent. faecalis*. For at undgå fejl i bestemmelsen af penicillinresistens er det vigtigt at følge de anvisninger til metodik og fortolkninger af resistenszonerne, som producenterne af diskene/tabletterne angiver. Herunder er det vigtigt, at man benytter Mueller-Hinton II agar som grundsubstrat med en dybde på netop 4 mm, samt ikke benytter flere end fem disks/tabs på plader med en diameter på 9 cm. Herudover skal organismen, man tester, være en renkultur, samt udsås ifølge Kirby-Bauer – dvs. tæppeudsæd. Fortolkningerne af diverse zoner skal modsvare både organismen man tester samt koncentrationen af det pågældende antibiotikum. Disse anbefalinger er generelle og gælder også for makrolider og tetracyklin.

Resultaterne for bestemmelserne for penicillinresistens er vist på Figur 2.

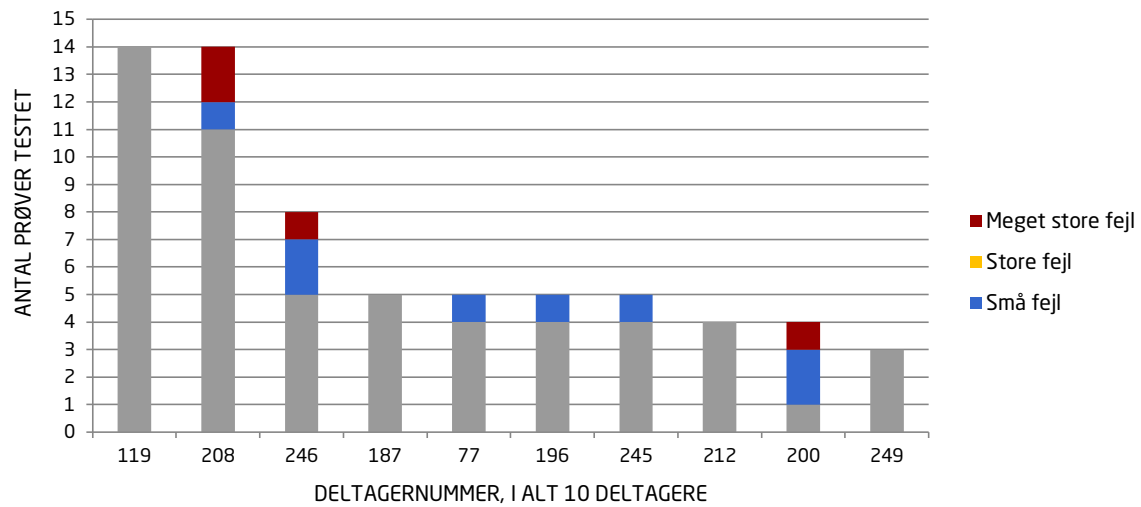
FIGUR 2. PENICILLINRESISTENS



MAKROLID

I alt havde 10 deltagere testet prøver for makrolidresistens. De ti deltagere havde testet mellem 4 til 15 af prøverne for makrolidresistens. De ti deltagere havde i alt lavet 8 små fejl og 4 meget store fejl. De små fejl var fordelt således: *Pseudomonas* spp. 4, *E. coli* 1, *Ent. faecalis* 1 og *Klebsiella* spp. 1. De meget store fejl var fordelt således: *Klebsiella* spp. 2, *E. coli* 1 og *Pseudomonas* spp. 1. Det var således fire prøver, som udløste alle fejlene i bestemmelserne af makrolid-resistens. Resultaterne for bestemmelserne af makrolidresistens er vist i Figur 3.

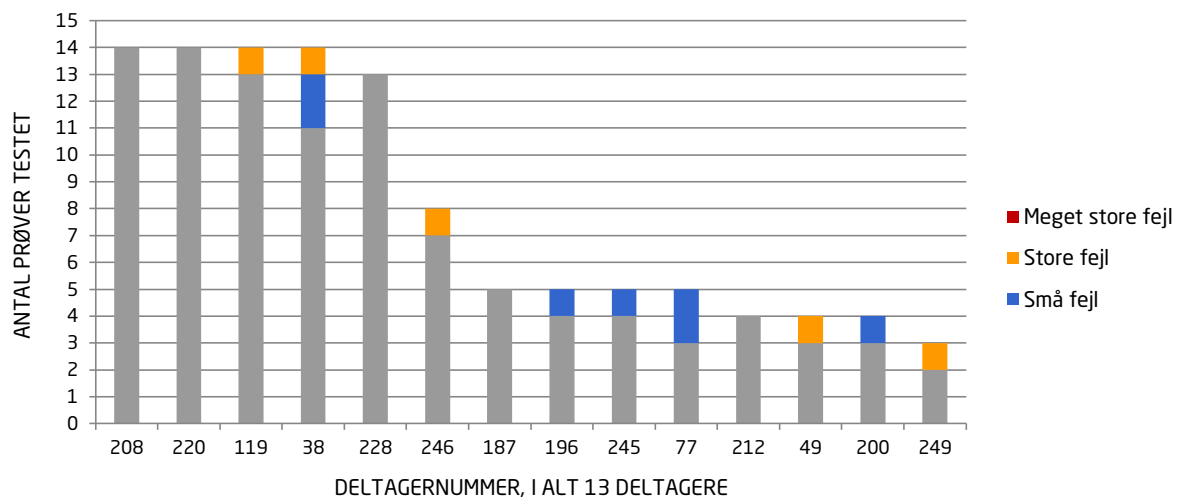
FIGUR 3. ERYTHROMYCINRESISTENS



TETRACYKLIN

Der var i 2016 14 deltagere, som havde udført resistensbestemmelse for tetracyklin. De 14 deltagere havde udført resistensbestemmelse for tetracyklin på mellem 4 til 15 prøver. De 14 deltagere havde i alt lavet 7 små fejl og 5 store fejl. De små fejl var fordelt således: *Pseudomonas* spp. 3, *E. coli* 2, *Ent. faecalis* 1 og *Klebsiella* spp. 1. De store fejl var fordelt således: *Pseudomonas* spp. 3, *E. coli* 1 og *Klebsiella* spp. 1. Det var således 4 prøver, som udløste alle fejlene i bestemmelsen af tetracyklinresistens. Resultaterne for bestemmelserne for tetracyklinresistens er vist på Figur 4.

FIGUR 4 TETRACYCLINRESISTENS



Samlet peger resistensbestemmelserne på, at det i særdeleshed er patogenerne *Pseudomonas* spp. og *Ent. faecalis* som udløser fejl.

KONKLUSION

Dette års ringtest er primært sammensat af patogener, som er blevet indsendt til DTU Veterinærinstituttet i forbindelse med mastitisdiagnostik indenfor de seneste 2 år. Derfor afspejler ringtesten 2016 en almindelig og forventelig sammensætning af mastitispatogener.

Overordnet viser resultatet af ringtest 2016 at:

- 1) Deltagerantallet i ringtest 2016 var lavere end i både 2014 og 2012, hvilket nedsætter den repræsentative værdi af test-resultaterne. Jo højere deltagerantallet er, jo bedre overblik giver ringtestrapporten over den samlede danske dyrlægestands kompetencer indenfor mastitisdiagnostik. 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 forbedre deres niveau indenfor mastitisdiagnostik. 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.
- 2) Deltagernes diagnostiske niveau er forbedret i forhold til ringtest 2014, idet den generelle og omfattende identifikationsprocent ligger højere end i 2014. Det vil med andre ord sige, at der er mange deltagere som identificerer en stor del af prøverne korrekt.
- 3) Antallet af prøver, som udløste mange fejl, er nogenlunde svarende til antallet i 2014 (2 prøver i 2016 og 3 prøver i 2014). Det vil med andre ord sige, at der er enkelte patogener, som der er generelle diagnostiske problemer forbundet med.
- 4) Det samlede resultat af ringtest 2016 er ikke så godt som i 2012, idet der gennemsnitsligt er væsentligt flere fejl pr deltager. I ringtesten 2012 blev materialet til mikrobiologiske undersøgelser sendt med ud sammen med ringtesten. Da ringtesten skal afspejle klinikens eget diagnostiske niveau, henstilles der i de øvrige ringtest – inklusiv 2016 til, at deltagerne selv står for indkøbene til sådanne mikrobiologiske tests. De supplerende mikrobiologiske tests (fx katalase-test og gram-farvning) er uundværlige for korrekt mikrobiologisk diagnostik, og disse tests forventes derfor at indgå som en del af den daglige rutinediagnostik på alle klinikker. Fejkilderne i årets ringtest peger dog med al tydelighed på, at sådanne rutinetests kun udføres i nogle klinikker. Det anbefales, at man altid anvender agarplader til at identificere, hvilke mulige agens der er tale om, og så vha. ID-nøglen og andet kildemateriale foretager den/de yderligere tests, som er nødvendige for den endelige diagnose. Der er altså ikke tale om, at man altid skal udføre en hel række tests af alle bakterieprøver! I stedet er der udelukkende tale om en to-trins procedure hvor man først bruger agarpladerne til at identificere en eller flere mulige diagnoser og så vha. ID-nøglen finder den/de test som kan udelukke alle de relevante muligheder på nær ét patogen. Altså skal ID-nøglen anvendes til simpel udelukkelsesmetode. Den nødvendige arbejdsbyrde forbundet med korrekt diagnostik er derfor begrænset. Faktisk kunne næsten samtlige forkerte svar i årets ringtest have været ændret til korrekte svar via én supplerende mikrobiologisk test!
- 5) 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. Derfor er der i ringtest 2016 inkluderet resistensbestemmelser på samtlige prøver for at henlede opmærksomheden på, at resistensforekomst altid bør være med i overvejelserne, når man diagnosticerer og behandler mastitis.

KOMMENDE RINGTEST

Ved kommende ringtest vil der ligeledes blive tale om 15 kulturer til dyrkning og identifikation. Nogle arter, såsom *Streptococcus agalactiae* og *Staphylococcus aureus* vil nok gå igen, men det vil tilstræbes, at der hver gang vil blive sendt nogle forskellige arter ud. Nogle af de arter, som var med i 2016 men ikke i den foregående (2014) ringtest var bl.a. *Pseudomonas aeruginosa* og *Staphylococcus haemolyticus*, som begge voldte mange problemer. Der har ved denne ringtest været nogle databasemæssige problemer ved indtastning af resultater og nomenklaturen af bakterier. De vil blive rettet til næste gang – det må ikke være sådanne problemer, der skal komme i vejen. Det er også et spørgsmål, hvorvidt der skal ændres på resistensbestemmelserne. For eksempel kunne der sammen med de 15 mælkeprøver til dyrkning udsendes 5 renkulturer af navngivne bakterier, som deltagerne skulle foretage resistensbestemmelse på. Dette vil kunne fjerne nogle af problemerne med, om man har den rigtige diagnose, og derfor tolker resistensresultatet korrekt i forhold til bakteriearten. Det er derfor vigtigt, at deltagerne giver konstruktive feed-back, således at testen kan blive bedre for hver gang.

VETERINÆRINSTITUTTET
Danmarks Tekniske Universitet

Bülowsvej 27
1870 Frederiksberg C
Tlf. 3588 6000

www.vet.dtu.dk