

# Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener 2006

Laboratoriefuldægtig Rene S. Hendriksen<sup>1</sup>, Forskningsprofessor, dyrlæge Frank M. Aarestrup<sup>1</sup>, Dyrlæge Kaspar Krogh<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Danmarks Fødevareforskning. <sup>1</sup> Sektion for kvæg, DDD, Dyrlægegruppen Østdjursland A/S.  
ISBN: 978-87-92158-55-0

## Indledning

På grund af den positive modtagelse som den første mastitis-ringtest fik i 2005, gennemførte Den Danske Dyrlægeforening (DDD) sektionen vedrørende kvæg (SVK) og Danmarks Fødevareforskning (DFVF) igen i 2006 en ringtest for identifikation og resistensbestemmelse af kendte mastitispatogener. Målgruppen var de praktiserende dyrlæger, som til daglig forestår ”hjemmediagnostikken” i praksis. Formålet var, at give dyrlægerne lejlighed for at kvalitetssikre og teste pålideligheden af deres diagnostik. I det følgende bringes et sammendrag af resultaterne fra denne ringtest.

## Undersøgelsen

### *Deltagere*

Der var i alt 43 tilmeldte dyrlægepraksis, hvoraf to havde tilmeldt fire dyrlæger. En praksis ud af de 43 havde ikke indtastet deres resultat ved opgørelsens afslutning. Sammendraget er således baseret på i alt 48 besvarelser, hvoraf 20 praksis var gengangere fra 2005. Disse gengangere blev tildelt det samme login som det forrige år, således, at en eventuel forbedring kunne måles.

### *Procedure*

Ringtesten bestod ligeledes i år af 15 udsendte mælkeprøver podet med renkulturer af mastitispatogener. Disse testes på sædvanlig vis i praksis, og resultaterne indrapporteres via Internettet. Det var valgfrit for praksis, i hvilken udstrækning de ville deltage i testen.

Alle praksis blev varskoet omkring tre uger forud før udsendelsen af mælkeprøverne samt orienteret om diverse detaljer angående selve testens udførelse. I alt blev 43 individuelle kølepakker sendt til praksis, således at disse skulle kunne nå modtagerne inden weekenden. Følgebreve angivende de individuelle logins og passwords blev medsendt de 15 mælkeprøver.

## Resultater

### *Identifikation*

I år var det i modsætning til i 2005 muligt at vælge to alternative betegnelser frem for en identifikation. I tilfælde hvor en prøve var steril, kunne praksis vælge denne betegnelse, frem for at lade feltet være blankt. Ydermere kunne praksis vælge betegnelsen ”indsendes til reference laboratorium”. Begge betegnelser resulterede i, at feltet angivende det antal korrekte fund forblev åbent, og dermed ikke medførte en fejl. På grund af denne ændring er opgørelsen over antal korrekte identifikationer opgjort i procent af det antal prøver, som praksis har benævnt med en identifikation og ikke et total antal prøver, som kunne variere i antal fra praksis til praksis.

I sidste års ringtest var der især to prøver (#13: *Str. agalactiae* og #14: *Str. canis*) som voldte problemer for praksis med hensyn til identifikationen. Disse to stammer var igen i år repræsenteret i ringtesten for at give praksis som deltog sidste år, lejlighed for at genteste organismene med tilvejebragt fornyet viden på området, og dermed om muligt at vurdere, om der har været en målbar forbedring af praksis resultater efter at have deltaget første gang.

I dette års ringtest var nomenklaturproblemerne væsentlig minimeret. Der er dog stadig nogle praksis, som vælger organismen *Micrococcus* frem for koagulasenegative stafylokokker, CNS. Ligeledes er der nogle få praksis, som har brugt betegnelsen *Lactococcus*, hvor det er nærliggende, at der er ment enterokokker. I figur 1 vises forholdet imellem antal deltagere og antal korrekte identifikationer i procent.

Det fremgår heraf, at størstedelen af deltagerne har imellem 75-79% korrekte med yderpunkterne ved henholdsvis 30-34% og 100% korrekte. I alt fire praksis havde testen 100% korrekt. Heraf var det dog kun to, som havde testet alle 15 prøver. I tabel 1 angives det hvor store problemerne var og hvilke fejlidentifikationer, der lå til grund for dette.

Der var udbredte problemer for nogle praksis med nogle af prøverne. Prøve #8 *Str. canis* var det således kun 20,8 %, som havde korrekt, og der var ligeledes problemer med identifikationen af prøverne #9, #14 og #15 indeholdende *Str. agalactiae*, hvor henholdsvis 45,8%, 43,8% og 52,1% havde dem korrekte. Der var dog en markant forbedring hos de 20 praksis som også sidste år deltog i ringtesten. I hvert fald målt på de to gengangere fra 2005 (#9: *Str. agalactiea* og #8: *Str. canis*), som generelt gav praksis problemer. For prøve #9 sås en pæn signifikant forbedring sammenlignet med sidste års resultat ( $\chi^2$  test), og for prøve #8 en tilnærmelsesvis signifikant forbedring. Det er vores formodning, at den øgede fokus, der er blevet rettet mod hjemmediagnostikken har haft en positiv indvirkning på kvaliteten af denne. Ud over streptokokkerne var der også problemer med identifikationen af prøve #10 med *Arcanobacterium pyogenes* som det kun var 25,0 % af praksis som havde korrekt. Der var udbredte problemer med at få denne prøve i vækst, da hele 54,2 % havde prøven steril. På DFVF har vi sammenlignet vækst i ”candle jar” og CO<sub>2</sub>-inkubator og havde problemer med vækst i ”candle jar” men ikke i CO<sub>2</sub>-inkubator. Praksis bør nok være opmærksomme på, at ”candle jar” ikke er så følsom som korrekte inkubationsforhold. I prøven indeholdende gær (#11) var der ligeledes problemer med at få prøven i vækst, idet 18,8 % havde prøven steril. 66,7 % af praksis havde prøven korrekt. *Corynebacterium* (prøve # 12) voldte også ganske store problemer, idet kun 37,5 % havde denne korrekt. I årets ringtest var der kun en CNS (#2) med og fejlprocenten var 27,1 %, hvoraf 12,5 % formentligt skyldes nomenklatur problemer med *Micrococcus*, som nævnt tidligere. Ni deltagere havde enterokokken i prøve #7 forkert svarende til 18,8 %. Det kan være svært at skelne imellem *Enterococcus* og *Str. uberis*, hvilket også fremgår af, at tre deltagere har valgt *Str. uberis*. En deltager har valgt CNS, hvor nogle species godt kan have en del lighed med enterokokker såsom *S. epidermidis*.

### *Resistensbestemmelse*

Ringtesten bestod ligeledes i år foruden identifikationen af patogener, af resistensbestemmelse overfor penicillin, tetracyclin og makrolid-gruppen. I år kunne man indtaste, om man havde brugt disk diffusion, MIC eller penicillinpladen til at bestemme resistensforholdene over for de tre antibiotika. I år er de følgende opgørelser over fejl kategoriseret efter de normer, vi benytter i andre ringtests. Disse normer er skitseret i tabel 2.

### Makrolid

Der var 18 deltagere, som har testet prøverne overfor makrolidgruppen. I figur 2 kan man se, at antallet af de undersøgte prøver imellem deltagerne varierer fra 1 til alle 10 prøver. En deltager havde testet alle prøverne korrekt. I alt 13 deltagere har oplyst, at de bruger disk diffusion, hvorimod 5 deltagere har undladt at besvare spørgsmålet. Disse er opmærket med tegnet ”\*” i figur 2. Det er ikke en bestemt stamme, som er årsag til fejlene og generelt må resultatet vurderes som tilfredsstillende, selvom der i nogle tilfælde er plads til forbedringer. Det er således vigtigt at følge de anvisninger til metodik og fortolkninger af resistenszonerne, som producenterne til diskene / tabletterne giver. Det er vigtigt, at man benytter Müller Hinton II agar som grundsubstrat af en dybde af 4 mm, samt ikke benytter flere end henholdsvis 5 og 7 disks/tabs på plader af en diameter på 9cm. Herover, skal organismen man tester være en renkultur samt udsås ifølge Kirby Baurer (tæppeudsæd). Fortolkningerne af diverse zoner skal modsvare både organismen man tester samt koncentrationen af det pågældende antibiotikum. Disse anbefalinger er generelle og gælder såvel også for penicillin og tetracyclin.

### *Tetracyclin*

I alt 20 deltagere valgte at bestemme prøverne overfor tetracyclinfølsomhed (Figur 3), og ligesom for makrolider varierede det meget blandt deltagerne, hvor mange prøver de valgte ud af de 10 at bestemme resistens overfor. Det varierede således mellem 1 til 10 bestemmelser. Ingen af deltagerne havde alle 10 prøver korrekte. Fjorten deltagere havde benyttet disk diffusion til bestemmelserne, hvorimod de resterende 6 ikke havde besvaret spørgsmål omkring test metoden. (markeret ”\*” i figur 3). Generelt set synes resultatet at være tilfredsstillende taget i betragtning at prøve #3 *Str. dysgalactiae* er intermediær, hvilket kan være svært at ramme med disk diffusion uden, at testen er standardiseret helt efter de angivne normer og metodikker. De samme antagelser som er nævnt under makroliderne, gælder også for tetracyclin.

### *Penicillin*

Helt overraskende er det ikke, at forholdsvis flere har udført resistensbestemmelse overfor penicillin. På figur 4 ses det, at 44 deltagere har bestemt mellem 1 og 10 prøver. I alt 21 deltagere ud af de 44 har bestemt alle 10 prøver. Hele 10 deltagere har valgt at teste organismerne ved brug af disk diffusion. Dog er der ikke nogle informationer om, hvorvidt bestemmelserne er ifølge en kendt standard såsom CLSI (NCCLS). Som beskrevet overfor er det af afgørende vigtighed, at bestemmelserne bliver udført ifølge de vejlederne som

medfølger diskene / tabsene, idet resultaterne ellers ikke er pålidelige. På figur 4 tyder det på, at de deltagere som har benyttet disk diffusion (markeret ”\*\*”) har værre og / eller flere fejl sammenlignet med de øvrige deltagere. Dette er dog ikke statistisk signifikant. Det er især stafylokokkerne i prøve #1 og #2, som giver anledning til fejlene. Begge prøver er følsomme, men testes resistente af deltagerne. Med udgangspunkt i at metodikken følges korrekt, kunne en mulig forklaring være usikkerhed ved måling af zonerne, idet forskellen imellem følsom og resistens skiller med 1 mm ifølge CLSI og Rosco tabellerne. Ud over de 10 deltagere, som har benyttet disk diffusion, har 22 deltagere brugt penicillinagarpladerne fra Steins Laboratorium til resistensbestemmelserne. I alt 12 deltagere har undladt at besvare feltet omhandlende metodikken.

Der synes at være et generelt problem med at bestemme resistensforholdet for prøve #7 (enterokok). Kun seks deltagere ud af 30 har denne korrekt. Årsagen skal måske findes i brugen af penicillinagar, som Steins har oplyst indeholder 0,06 µg/ml. Grænsen for følsomhed for enterokokker ligger ifølge CLSI på  $\leq 8$  µg/ml, hvilket vil medføre, at en følsom enterokok med en MIC værdi på 2 µg/ml godt kan vokse på penicillinagarpladen. Denne plade kan således ikke bruges til at tolke, hvorvidt en enterokok er følsom eller resistent. Teoretisk set vil det samme gøre sig gældende for stafylokokker og streptokokker, som begge ifølge CLSI har et en grænse for følsomhed på  $\leq 0,12$  µg/ml.

### **Konklusion:**

Generelt er resultatet tilfredsstillende for identifikationen. Dog skal praksis nok overveje om deres diagnostik af især streptokokker og *Arcanobacterium* er i orden, idet der for disse species synes at være et generelt problem. Ved at have et forudgående kendskab til besætningen, samt anvende simple tests og give organismerne den tid, de skal have, for at udtrykke deres karakteristika, er man nået langt i identifikationen af selv lidt drilske organismer. Resistensbestemmelsestesten forløb ligeledes med et tilfredsstillende resultat. Dog bør de praksis, som bruger disk diffusion, undersøge om de udfører testen efter de gældende vejledninger og bruger de rigtige fortolkningsnøgler. Endvidere bør de praksis som benytter penicillinagarpladerne tænke på, at ikke alle organismer har den samme grænseværdi for resistens og at disse plader derfor kun kan anvendes for ganske få bakteriearter.

## Referencer

Hendriksen RS. Aarestrup FM, Krogh K. Ringtest for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispotogener. Dansk Veterinærtidsskrift 2005; 88(18): 22-25

Tabel 1. Bakterier, der indgik i testen, samt antal afvigelser for de 15 prøver.

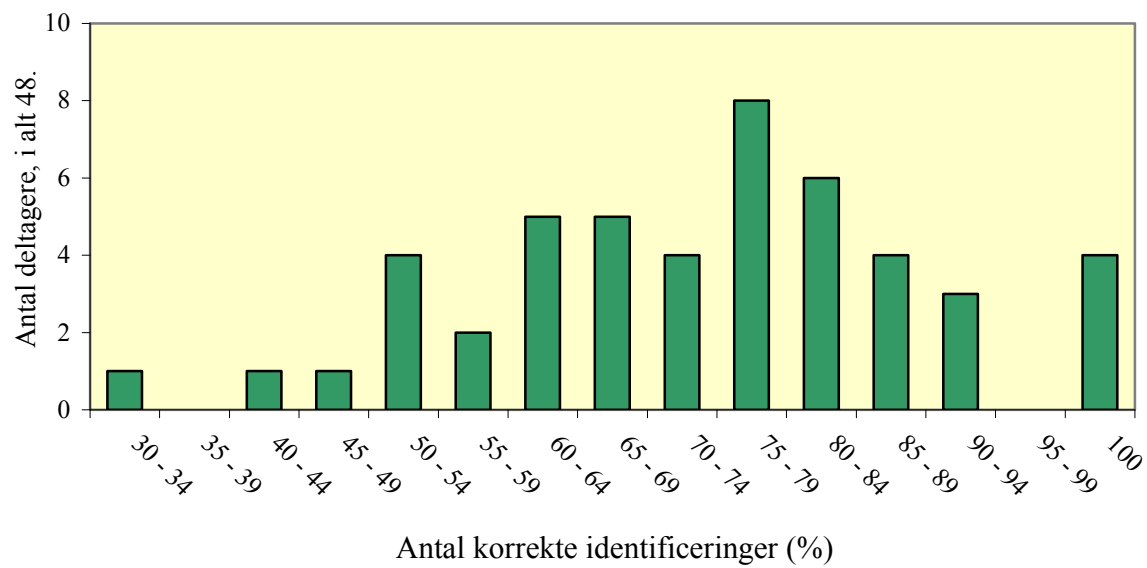
Prøve	Forventet fund	Korrekte %	Antal forkerte	Afvigelser
1	<i>S. aureus</i>	93,8	3	2*CNS, 1* <i>Micrococcus</i>
2	<i>Staph ssp</i> (CNS)	72,9	13	6* <i>Micrococcus</i> , 4* <i>S.aureus</i> , 1*Gær, 1* <i>E.coli</i> , 1* <i>Enterococcus</i>
3	<i>Str. dysgalactiae</i>	83,3	4	1*CNS, 1* <i>Micrococcus</i> , 1* <i>Str.canis</i> , 1* <i>Str. agalactiae</i>
4	<i>Str. uberis</i>	95,8	2	1* <i>Enterococcus</i> , 1*CNS
5	<i>E. coli</i>	97,9	1	1* <i>Klebsiella</i>
6	<i>Klebsiella ssp</i>	77,1	6	2*Gær, 2* <i>Bacillus</i> , 2* <i>E.coli</i>
7	Enterokokker	79,2	9	3* <i>Str. uberis</i> , 3* <i>Lactococcus</i> , 1* <i>Klebsiella</i> , 1* <i>E. coli</i> , 1*CNS
8	<i>Str. canis</i>	20,8	34	22* <i>Str. Agalactiae</i> , 4*CNS, 3* <i>Enterococcus</i> , 2* <i>Str.dysgalactiae</i> , 2* <i>Str. Pyogenes</i> , 1* <i>Str.uberis</i>
9	<i>Str. agalactiae</i>	45,8	19	5* <i>Str.dysgalactiae</i> , 2* <i>Str. uberis</i> , 2*CNS, 2* <i>Str.canis</i> , 2* <i>Lactococcus</i> , 2* <i>Enterococcus</i> , 1*A. <i>pyogenes</i> , 1* <i>Str. Pyogenes</i> , 1* <i>Micrococcus</i> , 1* <i>Str.bovis</i>
10	<i>A. pyogenes</i>	25,0	9	3*CNS, 2*Gær, 2* <i>Str. Agalactiae</i> , 1* <i>Micrococcus</i> , 1* <i>Corynebacterium</i>
11	Gær	66,7	6	3* <i>Corynebact.</i> , 2*CNS, 1* <i>Bacillus</i>
12	<i>Corynebacterium</i>	37,5	24	9*CNS, 5* <i>Bacillus</i> , 4*Gær, 2* <i>Micrococcus</i> , 2* <i>Str.bovis</i> , 1* <i>E.coli</i> , 1*A. <i>pyogenes</i>
13	<i>S. aureus</i>	89,6	3	2*CNS, 1* <i>Micrococcus</i>
14	<i>Str. agalactiae</i>	43,8	21	7* <i>Str.dysgalactiae</i> , 4*A. <i>pyogenes</i> , 3*CNS, 3* <i>Str.bovis</i> , 2* <i>Str.canis</i> , 1* <i>Enterococcus</i> , 1* <i>Micrococcus</i>
15	<i>Str. agalactiae</i>	52,1	17	3* <i>Str.canis</i> , 3* <i>Str.dysgalactiae</i> , 3*A. <i>pyogenes</i> , 2* <i>Str. pyogenes</i> , 2*CNS, 1* <i>Corynebacterium</i> , 1* <i>Micrococcus</i> , 1* <i>Lactococcus</i> , 1* <i>Enterococcus</i>

*Tabel 2. liste over fejl typer med tilhørende fejl kategorier.*

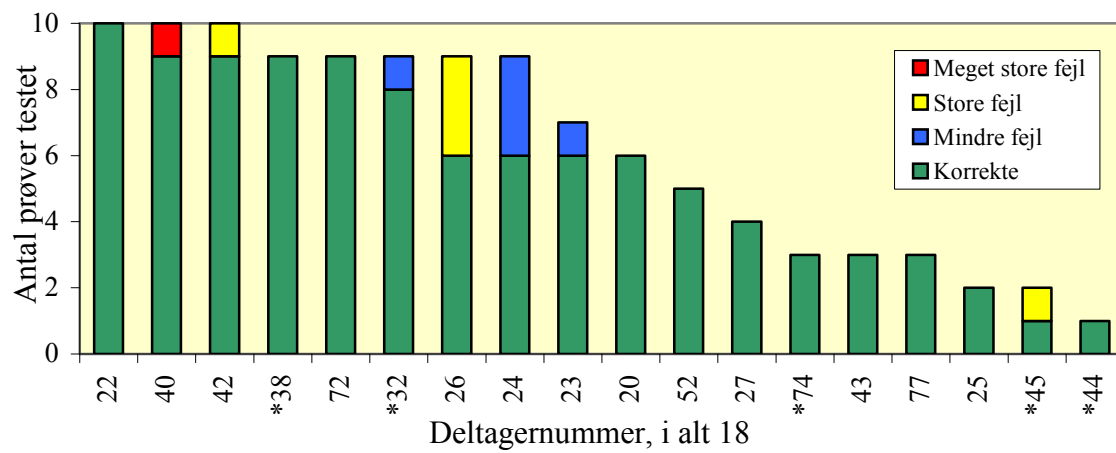
<b>Fejl kode:</b>	<b>Fejl type:</b>
Mindre fejl	Følsom testet intermediær og omvendt. Resistent testet intermediær og omvendt.
Stor fejl	Følsom testet resistent
Meget stor fejl	Resistent testet følsom



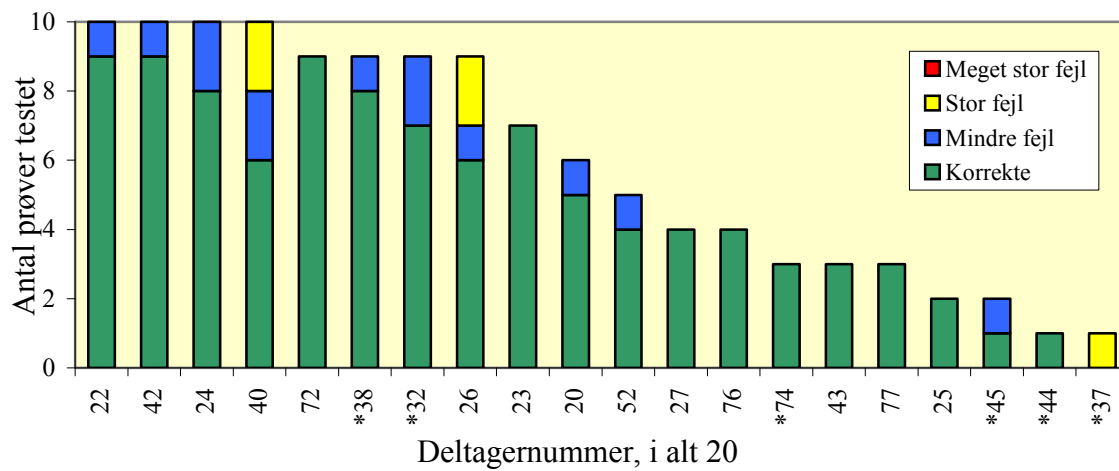
Figur 1. Antal korrekte identifikationer i procent fordelt på de 48 deltagere.



Figur 2. Antal korrekte og antal fejl ved resistensbestemmelse over for makrolid.



Figur 3. Antal korrekte og antal fejl ved resistensbestemmelse over for tetracyclin.



Figur 4. Fordeling af antal korrekte og fejl ved resistensbestemmelse over for penicillin.

