

Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener 2009



Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener 2009

Rene S. Hendriksen

Susanne Karlsmose

Frank M. Aarestrup

Kaspar Krogh, Dyr lægegruppen Østdjursland A/S

Heidi Voss, Dianova A/S

Fødevareinstituttet
Danmarks Tekniske Universitet

Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener 2009

Copyright: Fødevareinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

Foto: Magnus Price

ISBN: 978-87-92158-57-4

Rapporten findes i elektronisk form på adressen

www.food.dtu.dk

Fødevareinstituttet

Danmarks Tekniske Universitet

Bülowsvej 27

1790 Copenhagen V

Tlf: +45 35 88 70 00

Fax +45 35 88 70 01

Ph.d - studerende Rene S. Hendriksen¹, Levnedsmiddelingenør Susanne Karlsmose¹, Forskningsprofessor, dyrlæge Frank M. Aarestrup¹, dyrlæge Kaspar Krogh², Product Manager, dyrlæge Heidi Voss³

¹ DTU Fødevareinstituttet. ² Sektion vedr. Kvæg, Den Danske Dyrlægeforening. Dyrlægegruppen Østdjursland A/S. ³ Dianova A/S.

Indledning

DTU Fødevareinstituttet, Sektion vedr. Kvæg, Den Danske Dyrlæge forening og Dianova A/S har igen i 2009 tilbudt mastitisringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af kendte mastitispatogener. Målgruppen er dyrlæger samt andet personale i kvægpraksis, som til daglig forestår "hjemmediagnostikken". Formålet med ringtesten er, at give personale mulighed for at kvalitetssikre og teste pålideligheden af deres diagnostik. I det følgende bringes et sammendrag af resultaterne fra ringtesten år 2009.

Undersøgelsen

Deltagere

Der var i alt 53 tilmeldte dyrlægepraksis (69 personer), hvoraf 7 praksis havde tilmeldt henholdsvis 2, 2, 3, 4, 4, 4 og 4 personer. 44 af de i alt 69 tilmeldte personer havde indtastet deres resultat ved opgørelsens afslutning den 25. maj 2009. Sammendraget er således baseret på i alt 44 besvarelser, hvoraf 38 er gengangere fra forrige år. Disse gengangere blev tildelt det samme login som de forrige år således, at eventuelle ændringer ville være målbare.

Procedure

Ringtesten 2009 bestod, som i de foregående år, af 15 udsendte mælkeprøver podet med renkulturer af mastitispatogener. Disse blev testet på sædvanligvis i de deltagende praksis ved anvendelse af de normale rutiner, og resultaterne blev indrapporteret via Internettet. Det var valgfrit for deltagerne i hvilken udstrækning, de ville medvirke i testen.

Alle deltagere blev to uger forud for udsendelsen af mælkeprøverne varskoet om ringtesten, samt orienteret om diverse detaljer angående selve testens udførelse. I alt blev 53 individuelle kølepakker sendt til de deltagende praksis den 9. marts 2009. Sammen med de 15 mælkeprøver modtog deltagerne deres individuelle login og passwords.

Resultater

Identifikation

I ringtesten 2009 var det, som i de foregående år, muligt at vælge to alternative betegnelser frem for en identifikation. I tilfælde hvor en prøve var steril, kunne deltageren vælge denne betegnelse, frem for at lade feltet være blankt. Ydermere kunne deltageren vælge betegnelsen "indsendes til referencelaboratorium". Begge betegnelser resulterede i, at feltet angivende det antal korrekte fund forblev åbent, og dermed ikke medførte en fejl. På baggrund af dette er

opgørelsen over antal korrekte identifikationer opgjort i procent af det antal prøver, som deltageren har benævnt med en identifikation og ikke et totalt antal prøver, som kan variere i antal fra deltager til deltager.

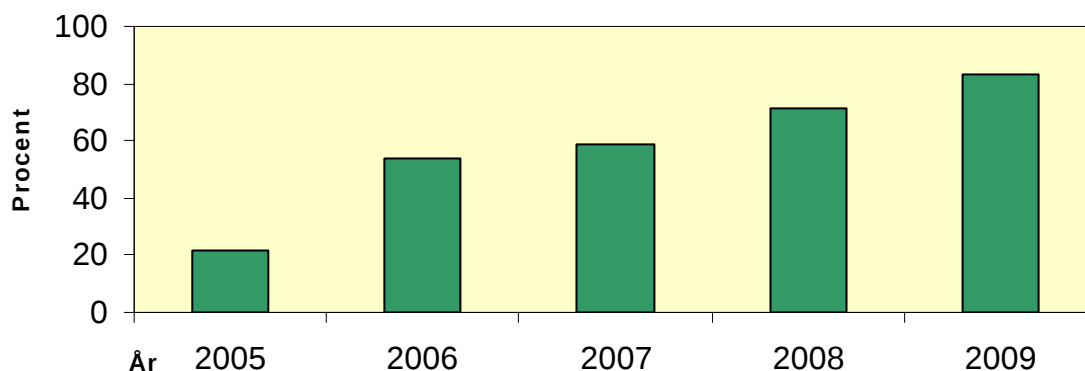
Igen i 2009 var der i testen kun inkluderet den ene af de to interne kontrolstammer (#2: *Str. agalactiae*). Denne skulle danne grundlag for at vurdere, om der har været en målbar forbedring af deltageren og det overordnede resultat igennem årene.

I dette års ringtest var der igen nomenklaturproblemer. Flere af deltageren har brugt betegnelsen *Micrococcus* frem for koagulase negative stafylokokker (CNS). Ligeledes er der deltagere, som har brugt betegnelsen *Lactococcus*, hvor man kan formode, at der er ment enterokokker. Disse problemer er ikke kun begrænset til nye deltagere, men ligeledes hos deltagere som tidligere har deltaget i ringtesten.

Figur 1 illustrerer den procentvise forbedring af deltagerens evne til at identificere den interne kontrolstamme (Prøve #2), som også de tidligere år har været benyttet i ringtesten. Sammenligner man figur 1 med resultaterne fra de forrige års ringtestrapporter, vil man kunne se, at den procentvise forbedring ikke er den samme fra rapport til rapport. Dette skyldes, at flere af deltagere har indrapporteret deres resultater efter at resultaterne til årsrapporterne, var opgjort.

Det er tydeligt, at der har været en forbedring igennem årene frem til 2009. Der kan være flere årsager til dette. Vi har i alle årene gjort meget ud af, at orientere deltagerne om, at gruppe B streptokokker ikke nødvendigvis er kraftigt beta hæmolyserede, men ligeledes kan antage an-hæmolytiske og svagt beta hæmolyserende former. Endvidere kan en mulig årsag være, at vi hvert år har inkluderet den selvsamme interne kontrolstamme, hvilket har fremgået af rapporterne. Det har muligvis ansporet nogle af deltagere til specifikt at formode, at denne stamme var iblandt de 15 prøver.

Figur 1.
Procent korrekt identificeret intern kontrol stamme

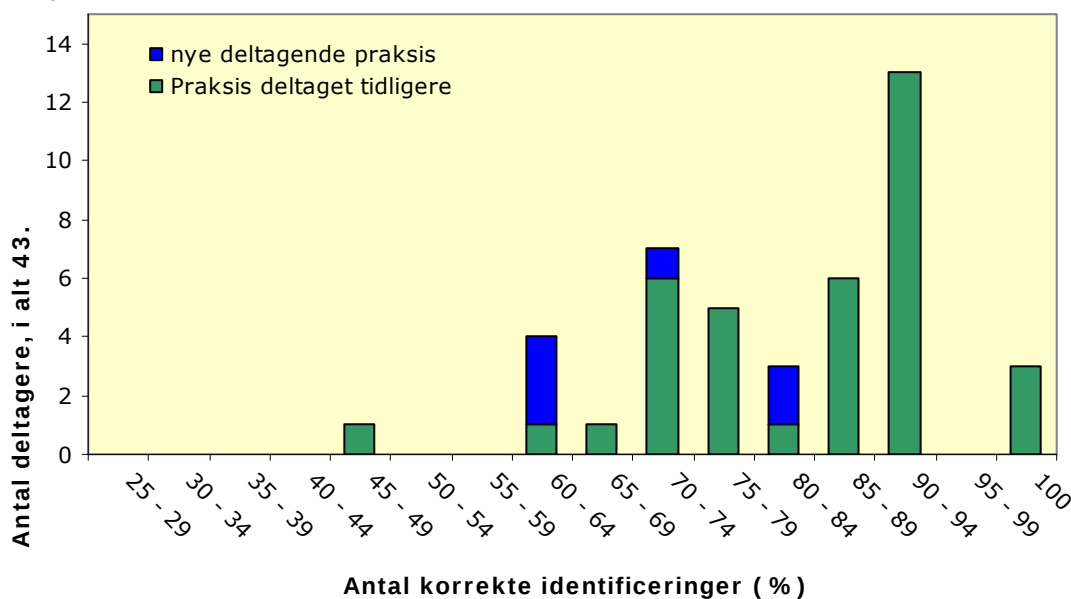


I år har syv deltagere ud af 40 fejlfortolket den interne kontrolstamme *Str. agalactiae*. I tre af tilfældene var den blevet forvekslet med andre beta-hæmolyserende streptokokker (*Str. pyogenes* og *Str. canis*).

I Figur 2 vises forholdet imellem antal deltagere og antal korrekte identifikationer i procent, samt hvorvidt disse var rapporteret af nye deltagere eller af deltagere, der tidligere har været med i ringtesten. Der er for få nye deltagere i år, som har indrapporteret deres resultater på nuværende tidspunkt, til at man kunne konkludere, om der var en forskel imellem de to grupper. Dog ser det umiddelbart ud til, at deltagerne i år har klaret sig væsentlig bedre end sidste år. I ringtesten 2009 har 37 % af deltagerne opnået 90 % korrekte identifikationer eller derover, sammenlignet med kun 16 % af deltagerne i ringtesten 2008.

Der var i år ingen resultater, som kunne betegnes som outliers. Dog var der en enkelt deltager, som kun har 47% af stammerne korrekt identificeret. Der var i år tre deltagere, som har identifikationerne 100% korrekte. De tre deltagere har alle tidligere deltaget i ringtesten. Alle tre har 14 prøver helt korrekte, men har fundet prøven indeholdende *Bacillus* steril.

Figur 2. Resultater for korrekte identifikationer.



Ringtesten 2009 viser, at nogle deltagere har problemer med mange af prøverne (Tabel 1). Dog har enkelte af stammerne resulteret i meget få fejlidentifikationer. I årets ringtest var der således to prøver, som indeholdt *S. aureus* (prøve #1 og #5). Begge blev testet af 43 deltagere, hvoraf kun en henholdsvis fire deltagere har prøve #1 og #5 fejlidentificeret som en CNS. Dette kunne være afklaret med en koagulase test (Figur 3) (konventionelt / kommercielle kits) eller en hyaluronidase test (Figur 4).



Figur 3.

Figur 4.

Prøve #6 og #10 indeholdende *Str. uberis* resulterede i vidt forskellige resultater. Prøve #10 gav således kun anledning til én fejlidentifikation ud af 43 indrapporterede resultater. Denne blev fejlfortolket som en *Lactococcus*. Den *Str. uberis* som var tilsat prøve #10, var en helt karakteristisk *Str. uberis*.

Derimod har 24 ud af 43 deltagere prøve #6 forkert. Det var dog ikke overraskende, da denne prøve var årets "joker". I årets løb har en bestemt praksis haft flere tilfælde af *Str. uberis*, som til forveksling lignede enterokokker. Alle indsendte stammer, som vores laboratorium modtog, blev 16S sekventeret, og alle var *Str. uberis* på trods af en slående morfologisk lighed med enterokokker. Denne prøve resulterede derfor ikke uventet med, at 19 af deltagere har fejlidentificeret den som *Enterococcus*. Det er ikke helt nemt at skelne imellem *Str. uberis* og *Enterococcus*. Dog kunne brug af non-selektive agar plader med og uden tilsætning af penicillin give et fingerpeg, idet *Str. uberis* ikke burde vokse på plader med penicillin (penicillin plader med en koncentration på 0.06µg/ml.) i kontrast til enterokokker (følsomme stammer har som regel en højere MIC værdi end 0.06µg/ml.). Penicillin resistens i streptokokker er yderst sjælden, hvorimod det er relativt almindeligt i enterokokker. Endvidere har fire deltagere, udover de 19, fejlagtigt rapporteret den som værende en *Lactococcus*, hvilket højst sandsynlig har været en nomenklaturforvirring med enterokokker.

I lighed med den ovenstående problematik var der ligeledes problemer med prøve #8 som indeholdt en enterokok. Ni deltagere ud af 43 har fejl i denne prøve. To deltagere har sandsynligvis brugt den forkerte nomenklatur og benævnt bakterien – *Lactococcus*. Dog var der tre deltagere, som netop har fejlidentificeret organismen som værende en *Str. uberis*.

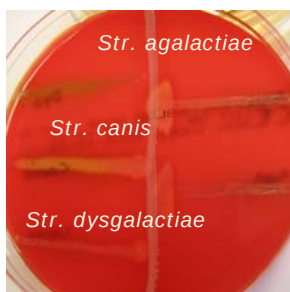
Ringtesten 2009 viser udprægede nomenklaturproblemer ved bestemmelsen af CNS. Prøverne #9 og #12 indeholdt således CNS, men blev indrapporteret af deltagerne som værende mikrokokker. Således benævnte ni deltagere ud af 42, samt fire deltager ud af 41, henholdsvis prøve #9 og #12 som værende *Micrococcus*. *Micrococcus* er en selvstændig species, og må ikke forveksles med *Staphylococcus* i denne test af nomenklatur-årsager. Dog kunne det i praksis virke mindre vigtigt, da der ikke ændres på antibiotikabehandling uanset hvilken af species der er tale om. Begge species kunne differenceres ved brug af en simpel resistensbestemmelse med

antibiotika furazolidone og bacitracin (Figur 5). *Staphylococcus* er følsom overfor furazolidone og resistent overfor bacitracin. Det er omvendt med hensyn til *Micrococcus*.

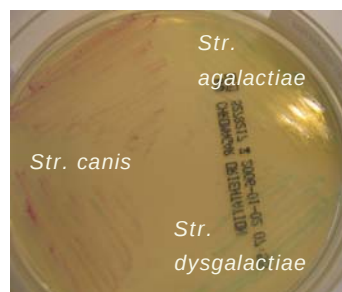


Figur 5.

I de forgangne års ringtest har udfaldet ved identifikation af *Str. dysgalactiae* altid været relativt godt. Vi kunne derfor i år ligeledes konkludere, at resultatet af denne organisme var pænt i overensstemmelse med det forventede resultat. Prøverne #13 og #15 indeholdt begge *Str. dysgalactiae*. Kun tre deltagere ud af 43 har prøve #13 forkert. I alle tilfældene var *Str. dysgalactiae* blevet forvekslet med beta-hæmolyserende streptokokker (*Str. canis* og *Str. agalactiae*) til trods for, at *Str. dysgalactiae* er alfa-hæmolyserende (grønfarvning af blodet i agar plader). Det skal dog nævnes, at *Str. agalactiae* kan antage andre former for hæmolyse end beta formen. Der er dog et væld af simple tests som kunne afklare fortolkningen. *Str. dysgalactiae* antager en speciel koloni morfologi efter mere end 24 timers inkubation, som de øvrige ikke antager. Centrum af kolonien for *Str. dysgalactiae* rejser sig i forhold til den øvrige kultur. Endvidere er *Str. dysgalactiae* CAMP negativ (Figur 6), farveløs på CHROM agar Orientation (Figur 7) samt tilhørende gruppe C i Lancefield serogruppe nomenklaturen til forskel fra de to øvrige. Seks deltagere har problemer med Prøve #15 ud af 41. Det var igen i denne prøve *Str. agalactiae* (2 deltagere) som gav anledning til fejl dog akkompagneret af en anden beta-hæmolyserende streptokok – *Str. pyogenes* (1 deltager).

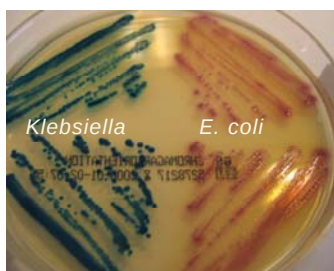


Figur 6.



Figur 7.

Problematikken med at differentiere imellem *Klebsiella* og *E. coli* var ligeledes i år udbredt. I alt har 11 deltagere ud af 43 fejlfortolket prøve #14 indeholdende *Klebsiella*. Ud af de 11 deltagere har de seks fortolket organismen som værende *E. coli*. Vi har fra nogle deltagere fået oplyst, at *Klebsiella* er mest udbredt i staldmiljøer med savsmuld, hvorfor vi anbefaler at teste koliforme bakterier på eksempelvis CHROM agar Orientation, såfremt man er i tvivl om species. På denne selektive agar er *Klebsiella* blålig, hvorimod *E. coli* er rød (Figur 8).



Figur 8.

Prøve #4 og #7 var begge *A. pyogenes*. Begge prøver resulterede i mange fejl blandt deltagerne. Seks deltagere ud af 37 havde fejl i prøve #4, hvorimod ni ud af 39 havde fejl i prøve #7. Der var rapporteret 8 forskellige fejlvalg imod 12 sidste år, hvoraf ingen igen skilte sig ud som dominerende. Fejlene spændte fra "Gram positive til negative og fra kokker til stave". Flere af deltagerne har i perioden kontaktet laboratoriet for at få tilsendt friske prøver, idet bakterierne har været svære at få i vækst. I disse tilfælde har vi spurgt ind til, hvordan prøverne var blevet inkuberet. I flere tilfælde var pladerne inkuberet i en almindelig inkubator uden efterfølgende at være forsøgt med CO₂ i atmosfæren. Det er vigtigt, at der forsøges med en tilsætning af CO₂ i atmosfæren, såfremt man observerer svagt beta hæmolyserende støvvækst på blod agar pladerne efter et døgn ved almindelig inkubation. Der kunne være tale om netop *A. pyogenes*.

I forhold til forrige år, hvor gær var inkluderet i ringtesten, syntes det at gå meget bedre med identifikationen. I prøve #11 var der således tilsat en gær som kun fem ud af 43 har fejlidentificeret. Vi håber, at årsagen skyldes laboratoriets opfordring til at benytte en form for mikroskopi i den primære identifikation. Vi har før nævnt nigrosin farvning som alternativ til en traditionel Gram farvning, da denne er mindre ressourcekrævende.

En *Bacillus* var blevet inkluderet i årets test som prøve #3. Den gav på lignende måde, som i år 2006, massive problemer, idet 26 deltagere ud af 44 har prøven steril. Vi kan ikke forklare årsagen til dette problem. Vi tester 10 rør for vækst før forsendelsen til praksis svarende til mere end 10 % for netop at sikre, at der er vækst i alle rør. Det har på ingen måde resulteret i problemer. Jeg har tidligere talt med en deltager, som ser på *Bacillus* som en

pladekontaminering i den daglige diagnostik og ikke som en patogen. Det kan være årsagen til at mange deltagere benævner prøven steril, da vi ikke opererer med en term som "kontamineret" i vores rapporteringssystem. Det skal dog nævnes, at 13 ud af de 44 deltagere har benævnt prøven korrekt, og fem har den fejlidentificeret.

Alt i alt ser resultatet for ringtesten 2009 bedre ud end sidste år, men der er stadig en del, som ville kunne få et bedre og korrekt resultat, såfremt de ville benytte enkelte ekstra tests til deres prøver. Endvidere er det glædeligt at se, at så mange har husket at *Str.canis* også kan være årsag til mastitis på trods af, at den ikke var med i år.

I Tabel 1 angives det, hvor store problemerne var og hvilke fejlidentifikationer, der lå til grund for dette.

Prøve	Forventet fund	Forkerte %	Forkerte n.	Afvigelserne
1	<i>Staph aureus</i>	2	1	1*CNS
2	<i>Strep agalactiae</i>	18	7	3*CNS, 2*Str.pyogenes, 1*Enterococcus, 1*Str.canis
3	<i>Bacillus spp.</i>	28	5	2*proteus, 2*Klebsiella, 5*Corynebact
4	<i>Arcanobact. pyogenes</i>	16	6	2*Corynebact, 2*Str.canis, 1*Str.pyogenes, 1*CNS
5	<i>Staph aureus</i>	9	4	4*CNS
6	<i>Strep uberis</i>	56	24	19*Enterococcus, 4*Lactococcus, 1*Str.canis
7	<i>Arcanobact. pyogenes</i>	23	9	2*Str. pyogenes, 2*Str.canis, 1*Corynebact, 1*Bacillus, 1*Str.agalactiae, 1*Str.bovis, 1*CNS
8	<i>Enterococcus</i>	21	9	3*Str.uberis, 2*Lactococcus, 2*Klebsiella, 1*Str.canis, 1*CNS
9	<i>Staph ssp (CNS)</i>	30	12	9*Micrococcus, 2*S.aureus, 1*Proteus
10	<i>Strep uberis</i>	2	1	1*Lactococcus
11	Gær	12	5	1*E.coli, 1*Bacillus, 1*Klebsiella, 1*Enterococcus, 1*Str.agalactiae
12	<i>Staph ssp (CNS)</i>	20	8	4*Micrococcus, 2*S.aureus, 1*Bacillus, 1*Str.agalactiae
13	<i>Strep dysgalactiae</i>	7	3	2*Str.canis, 1*Str.agalactiae
14	<i>Klebsiella ssp</i>	26	11	6*E.coli, 2*CNS, 2*Gær, 1*Bacillus
15	<i>Strep dysgalactiae</i>	15	6	2*Str.agalactiae, 1*Corynebact, 1*CNS, 1*Str.pyogenes, 1*CNS

Tabel 1

Resistensbestemmelse

Ringtesten bestod ligeledes i år foruden identifikationen af patogener, af resistensbestemmelse overfor penicillin, tetracyclin og makrolid-gruppen.

Igen i år er de følgende opgørelser over fejl kategoriseret efter de normer, vi benytter i andre ringtests. Disse normer er skitseret i tabel 2.

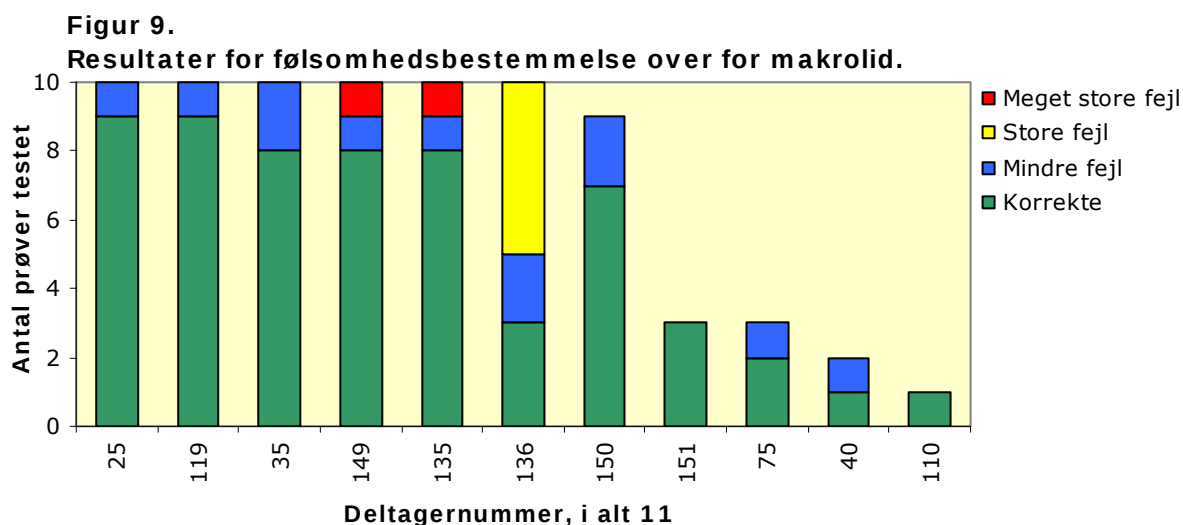
Tabel 2:

Fejl kode:	Fejl type:
Mindre fejl	Følsom testet intermediaær og omvendt. Resistent testet intermediaær og omvendt.
Stor fejl	Følsom testet resistent
Meget stor fejl	Resistent testet følsom

Makrolid

Der er igen i år kun 11 deltagere, som har testet prøverne overfor makrolid-gruppen. I Figur 9 kan man se, at antallet af de undersøgte prøver varierer fra en til alle 10 prøver. Ingen af deltagerne har testet alle prøverne korrekt.

Det er ikke en bestemt stamme, som er årsag til de 12 fejl. Fejlene er fordelt blandt otte stammer. Dog er der en stamme som var ansvarlig for fem fejl. Generelt må resultatet siges at være tilfredsstillende, selvom der for nogle deltagere 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. Herudover skal organismen man tester være en renkultur samt udsås ifølge Kirby Bauer (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 penicillin og tetracyclin.

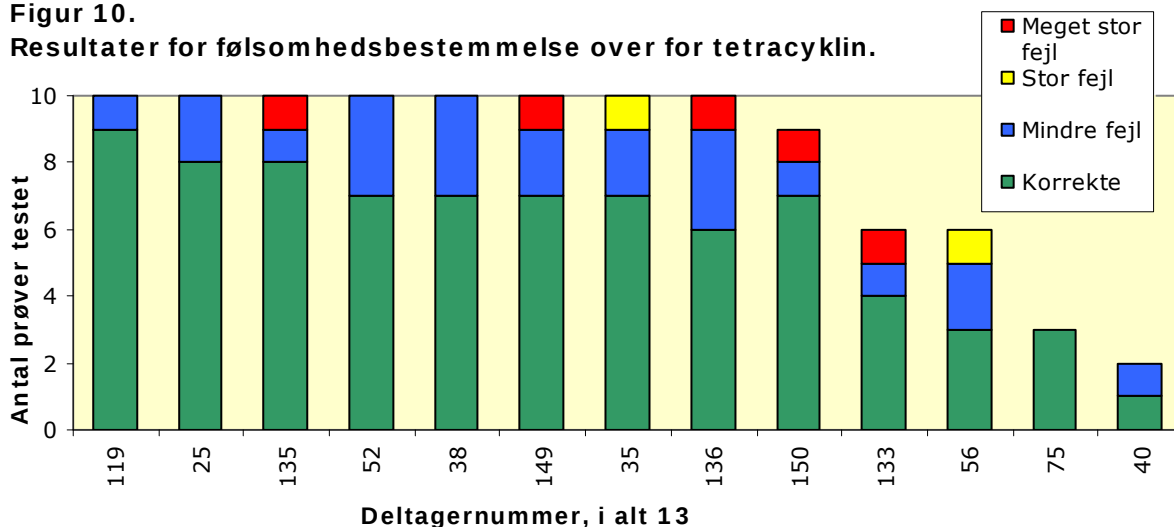


Tetracyclin

I alt 13 deltagere valgte at bestemme prøverne overfor tetracyclinfølsomhed (Figur 10), og ligesom for makrolider varierer det meget blandt deltagerne, hvor mange af de otte prøver de har valgt at bestemme resistens overfor. Det varierer således fra to til alle 10 bestemmelser. Ingen af deltagerne havde alle 10 prøver korrekte. Der var otte stammer som resulterede i de 13 fejl. Generelt set synes resultatet at være tilfredsstillende. De samme antagelser, som er nævnt under makroliderne, gælder ligeledes for tetracyclin.

Figur 10.

Resultater for følsomhedsbestemmelse over for tetracyclin.



Penicillin

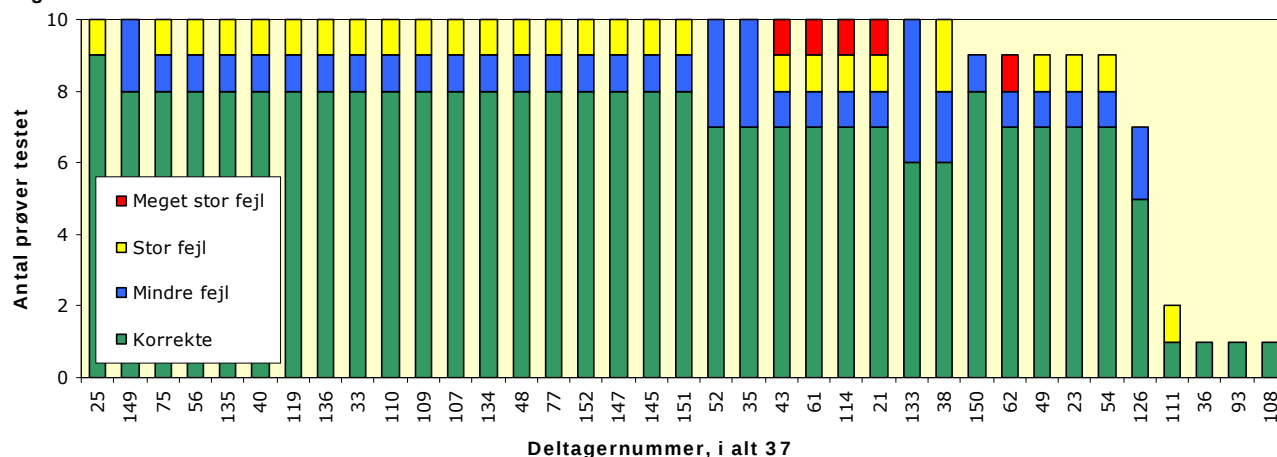
Helt overraskende er det ikke, at forholdsvis flere har udført resistensbestemmelse overfor penicillin. På Figur 11 ses det, at 37 deltagere har bestemt mellem 1 og 10 prøver. I alt 27 deltagere ud af de 37 har bestemt alle 10 prøver.

I ringtesten 2009 var to stammer primært årsag til fejlene. Prøve #8 indeholdt en penicillin følsom enterokok med en MIC værdi på 4 µg/ml. Såfremt deltageren benytter de ovenstående omtalte penicillin agar plader (0.06 µg/ml.) som udgangspunkt for en resistensbestemmelse for enterokokker, vil dette resultere i et forkert resultat. Årsagen er som nævnt, at følsomhedsbreakpointet for enterokokker ifølge CLSI er ≤ 8 µg/ml. I alt rapporterede 28 ud af 35 deltagere fejlagtigt stammen som værende resistent. Disse deltagere har derfor opnået en "stor fejl".

Prøve #6 indeholdende en *Str. uberis* forårsagede ligeledes mange fejl. Stammen havde en MIC værdi på 0.5 µg/ml. og fortolket som værende intermediær ifølge CLSI (breakpointet er ≤ 0.12 µg/ml.). I alt havde 20 deltagere rapporteret stammen som værende resistent, og 11 deltagere rapporterede den som følsom. I begge tilfælde vil en sådan fejl resultere i en "mindre fejl". I næste års ringtest vil vi tilføje en kommentar til protokollen angående fortolkning af resistensforholdene for de forskellige agenser ved brug af penicillin agar plader som

resistensbestemmelsemetode. Tager man forholdene omkring de to stammer i betragtning, må resultatet generelt siges at være fint.

Figur 11. Resultater for følsomhedsbestemmelse over for Penicillin.



Konklusion

Generelt set er resultatet for identifikationen af mastitis patogener forbedret sammenlignet med 2008. Dette kan ligeledes afspejles i stigningen af deltagere, som har identificeret den interne kontrol-stamme korrekt. Dog bør nogle deltagere stadig overveje om deres diagnostik er i orden med fokus på især *Enterococcus*, *Arcanobacterium pyogenes* og *Klebsiella*. Desuden bør nogle deltagere opdatere deres viden på nomenklaturområdet.

Resistensbestemmelsestesten forløb med et flot resultat sammenlignet med foregående år. Dog bør de deltagere, som anvender penicillin agar plader som resistensbestemmelsesmetode, sætte sig mere ind i for hvilke bakterier disse plader er brugbare.

Fødevareinstituttet
Danmarks Tekniske Universitet
Mørkhøj Bygade 19
2860 Søborg

Tlf. 35 88 70 00
Fax 35 88 70 01

www.food.dtu.dk

ISBN: 978-87-92158-57-4