

Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener 2008



Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener 2008

Rene S. Hendriksen

Frank M. Aarestrup

Kaspar Krogh, Dyrlægegruppen Østdjursland A/S

Heidi Voss, Dianova A/S

Fødevareinstituttet
Danmarks Tekniske Universitet

Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener 2008

Copyright: Fødevareinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

Foto: Magnus Price

ISBN: 978-87-92158-56-7

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

Phd - studerende Rene S. Hendriksen¹, Forskningsprofessor, dyrlæge Frank M. Aarestrup¹, Dyrlæge Kaspar Krogh², Product Manager, dyrlæge Heidi Voss³

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

Indledning

DTU Fødevareinstituttet, Sektion vedr. Kvæg, DDD og Dianova A/S har igen i år tilbudt praktiserende kvægdyr læger at deltage i mastitisringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af kendte mastitispatogener. Målgruppen var de praktiserende dyrlæger samt andet personale, som til daglig forestår "hjemmediagnostikken" i deres 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 54 tilmeldte dyrlægepraksis (80 personer), hvoraf 5 havde tilmeldt henholdsvis 3, 3, 4, 5 og 16 personer. 49 ud af de i alt 80 tilmeldte personer havde indtastet deres resultat ved opgørelsens afslutning d. 11 juni. Sammendraget er således baseret på i alt 49 besvarelser, hvoraf 25 var gengangere fra forrige år. Disse gengangere blev tildelt det samme login som de 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 blev testet på sædvanlig vis i praksis, og resultaterne blev indrapporteret via Internettet. Det var valgfrit for praksis, i hvilken udstrækning de ville deltage i testen.

Alle praksis blev varskoet omkring to uger forud for udsendelsen af mælkeprøverne samt orienteret om diverse detaljer angående selve testens udførelse. I alt blev 54 individuelle kølepakker sendt til praksis d. 3 marts, således at disse skulle kunne nå modtagerne inden weekenden. Følgebrev, angivende de individuelle login og passwords, blev medsendt de 15 mælkeprøver.

Resultater

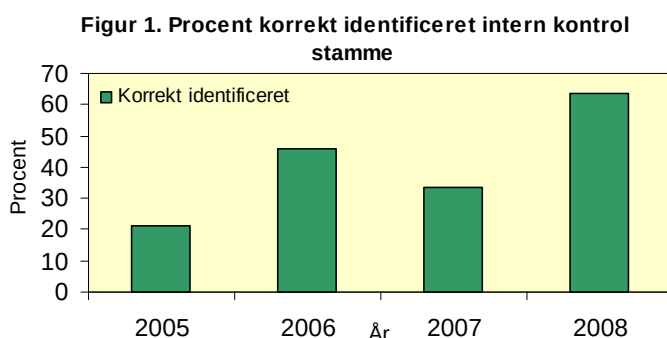
Identifikation

I år var det som de foregående år 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

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 praksis har benævnt med en identifikation og ikke et total antal prøver, som kunne variere i antal fra praksis til praksis. I år var der i testen kun inkluderet den ene af to interne kontrolstammer (#8: *Str. agalactiae*). Denne skal danne grundlag for at vurdere, om der har været en målbar forbedring af praksis samt det overordnede resultat igennem årene.

På grund af de mange ny tilmeldte (24) i dette års ringtest var nomenklaturproblemerne igen til stede. Der er udtalt brug af betegnelsen *Micrococcus* frem for koagulasenegative stafylokokker (CNS). Ligeledes er der praksis, som har brugt betegnelsen *Lactococcus*, hvor det er nærliggende, at der er ment enterokokker.

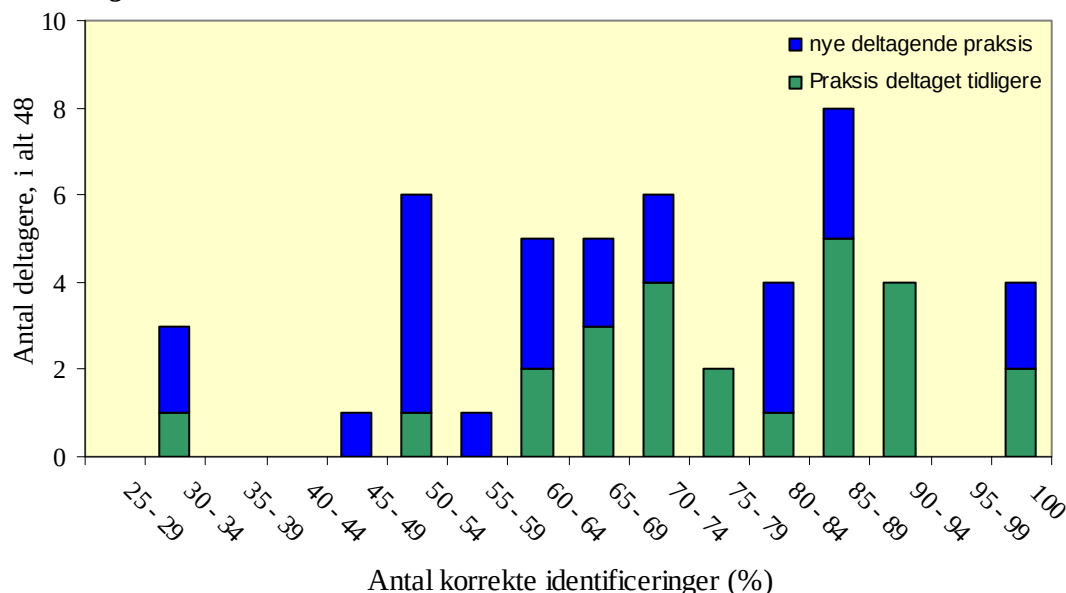
Figur 1 illustrerer den procentvise forbedring af praksis evne til at identificere den interne kontrolstamme, som i alle årene har været benyttet. Det er tydeligt, at der har været en forbedring fra 21% i 2005 til 63% i 2008. Der kan være flere årsager til denne forbedring. Vi har i alle årene gjort meget ud af at orientere de deltagende praksis om, at gruppe B streptokokker ikke nødvendigvis er kraftig beta hæmolyserende, men ligeledes kan antage an-hæmolytiske og svag beta hæmolyserende former. Vi har endvidere for et par år siden afholdt tre "roadshows", hvor vi ligeledes formidlede dette budskab samt rundsendte vejledninger. Da der er forholdsvis mange nye deltagere i dette års ringtest ville et eventuelt dårligere resultat være forventeligt. Dette var dog ikke tilfældet.



I Figur 2 vises forholdet imellem antal deltagere og antal korrekte identifikationer i procent samt hvorvidt disse er rapporteret af nye deltagere eller af deltagere fra foregående år. Umiddelbart ser det ud til, at dyrlæger som har deltaget ved en foregående ringtest klare sig lidt bedre til sammenligning med nye deltagere. Der var tre deltagere, som kan betegnes som outliers. De havde imellem 30-34 % korrekte identifikationer. Som kontrast var der fire deltagere – to nye og to

gengangere – som havde identifikationerne 100% korrekte. Tre af disse havde alle 15 prøver helt korrekte.

Figur 2. Resultater for korrekte identifikationer.



Der var udpræget problemer for nogle praksis med mange af prøverne. Der var 19 dyrlæger som havde prøve #1 med *Str.agalactiae* forkert. Der var rapporteret otte forskellige organismer med hovedparten som *Str. dysgalactiae*. Dette er dog ikke overraskende, da det i de foregående år ligeledes var denne streptokok, som blev valgt når dyrlægerne tog fejl i forbindelse med *Str.agalactiae*. Der er dog flere af deltagerne, som har valgt en hæmolyserende organisme, såsom *Str. canis* og *Arcanobacterium pyogenes*. Brug af Lancefield serogruppe ville have afhjulpet dette. I år var der 10 deltagere, som tog fejl af *Klebsiella* og *E.coli* for prøve #3 (*Klebsiella*). Det er velkendt, at disse to bakterier er lidt svære at skelne fra hinanden. Den rutinerede vil nok makroskopisk kunne skelne imellem dem, men det er svært. Desværre er der ifølge min viden ikke en hurtig test til rådighed og en sikker identifikation beror på sukkerforgæring og andre biokemiske analyser. Dog har vi anbefalet at benytte CHROM-agar orientation, som giver to forskellige farvereaktioner af kolonierne. I alt var der yderligere syv deltagere, som havde fået en fejl for denne prøve. Prøve #4 og #9 var begge *A. pyogenes*. Begge prøver resulterede i mange fejl blandt deltagerne. Femten dyrlæger havde fejl i prøve #4 og 14 for prøve #9. Der var rapporteret 12 forskellige fejlvalg, hvoraf ingen skilte sig ud som dominerende og fejlene spændte fra Gram positive til negative og fra kokker til stave. Nogle af fejlene kan skyldes, at bakterien har været svær at få i vækst, da den kræver tilsætning af CO₂ i atmosfæren. Det kan betyde at pladerne har fået lov til at stå længe i en almindelig inkubator med håb om vækst, og derved tilladt vækst af eksempelvis gær eller *Bacillus*. Dog er der flere, som har valgt en hæmolyserende streptokok frem for *A. pyogenes*.

Prøve #6 var årets "joker" og indeholdt en *Corynebacterium ssp.* Denne bakterie ligner en CNS, som også 27 deltagere har valgt at indrapportere – heriblandt syv som en Mikrokok. En enkel screening af isolaterne ville have været en løsning. Det er velkendt at Gram farvning er langsommelig, hvorfor mange undlader at benytte denne teknik. Vi finder det nødvendigt, såfremt man baserer sin identifikation på makroskopi og få analyser. Dog kan en nigrosin eller methylenblåfarvning være et nemmere alternativ. Prøverne #11 og #12 havde henholdsvis 30% og 17% fejl. Majoriteten af disse fejl skyldes nomenklaturproblemer, idet syv deltagere havde valgt Mikrokok frem for det korrekte CNS i prøve #11. Såfremt man ser bort fra denne fejl ville fejlprocenten dale til 17%. Ligeledes ville det være for prøve #12, hvor fejlprocenten ville dale til 4% såfremt deltagerne havde valgt Enterokok frem for *Lactococcus*.

Prøve #13 indeholdt en almindelig CNS – *S.xylosus*, som kan have en lidt speciel koloni morfologi. Kolonien er hvidlig med en takket kant. Det er måske årsagen til at hele 15 deltagere har benævnt den som gær. Dog ville en mikroskopi have afsløret, at denne prøve ikke indeholdt en organisme med så relative store celler som gær har.

Alt i alt er der stadig en del, som ville kunne få et meget bedre og korrekt resultat, såfremt de ville benytte mikroskopi af deres prøver. Endvidere er det glædeligt at se, at så mange har husket at *Str.canis* også kan være årsag til mastitis. Dog har jeg ikke i år inkluderet denne, selvom den de foregående år har været brug som intern kontrol.

Prøve	Forventet fund	Forkerte %	Forkerte n.	Afvigelserne
1	<i>Strep agalactiae</i>	37	19	7*Str.dysgalactiae, 4*CNS, 2*Enterococcus, 2*Micrococcus, 1*E.coli, 1*Lactococcus, 1*Str.canis, 1*Arcanobact. Pyogenes
2	<i>Strep dysgalactiae</i>	9	5	2*Str.canis, 1*CNS, 1*Str.pyogenes, 1*Enterococcus
3	<i>Klebsiella ssp</i>	33	17	10*E.coli, 2*Enterococcus, 2*proteus, 1*lactococcus, 1*Bacillus, 1* Micrococcus
4	<i>Arcanobact. pyogenes</i>	33	15	3*Corynebact, 2*Str.canis, 2*Str.pyogenes, 2*Bacillus, 1*Lactococcus, 1*CNS, 1*Str.agalactiae, 1*Str.bovis, 1*Gær, 1*Str.uberis
5	<i>Staph aureus</i>	4	2	1*Micrococcus, 1*Gær
6	<i>Corynebact. Ssp</i>	69	37	20*CNS, 7*Micrococcus, 3*Bacillus, 2*Gær, 2*Str.bovis, 1*S.aureus, 1*Listeria, 1*Arcanobact. Pyogenes
7	<i>Strep uberis</i>	13	7	3*Klebsiella, 2*Lactococcus, 1*Str.agalactiae, 1*E.coli,
8	<i>Strep agalactiae</i>	8	14	7*Str.dysgalactiae, 2*Str.canis, 2*CNS, 1*Enterococcus, 1*Str.pyogenes
9	<i>Arcanobact. pyogenes</i>	30	14	5*Corynebact, 3*Str. pyogenes, 2*Bacillus, 1*E.coli, 1*Str.agalactiae, 1*Str.dysgalactiae, 1*Str.bovis
10	<i>Strep uberis</i>	16	8	3*Str.dysgalactiae, 3*Lactococcus, 1*CNS, 1*E.coli
11	<i>Staph ssp (CNS)</i>	30	16	7*Micrococcus, 4*E.coli, 4*S.aureus, 1*Enterococcus
12	<i>Enterococcus</i>	17	9	7*Lactococcus, 2*Str.uberis
13	<i>Staph ssp (CNS)</i>	50	24	15*Gær, 3*E.coli, 3*Micrococcus, 2*Bacillus, 1*Klebsiella
14	<i>E.coli</i>	9	5	2*CNS, 1*Proteus, 1*Bacillus, 1*Pseudomonas
15	<i>Staph aureus</i>	2	1	1*CNS

Resistensbestemmelse

Ringtesten bestod ligeledes i år foruden identifikationen af patogener, af resistensbestemmelse overfor penicillin, tetracyklin 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:

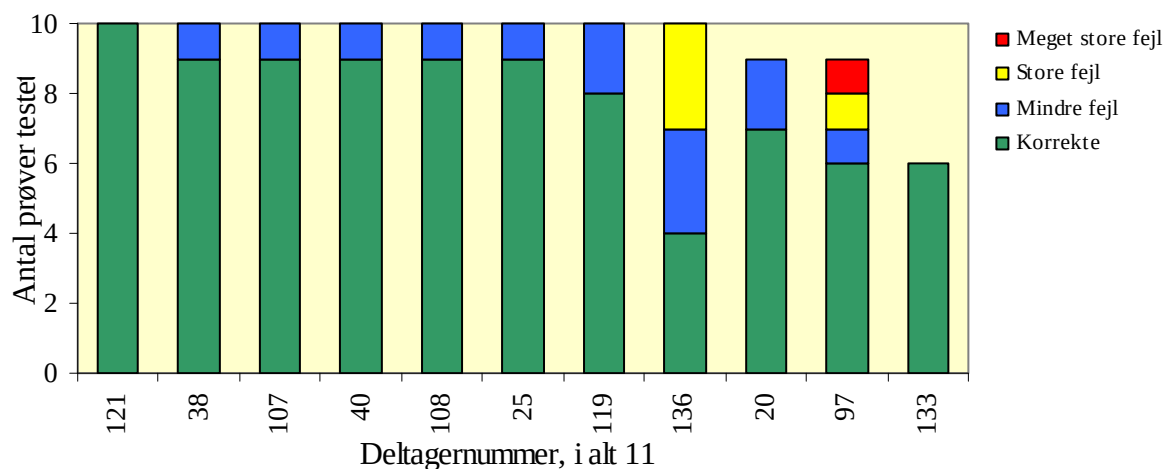
Fejl kode:	Fejl type:
Mindre fejl	Følsom testet intermediær og omvendt. Resistent testet intermediær og omvendt.
Stor fejl	Følsom testet resistent
Meget stor fejl	Resistent testet følsom

Makrolid

Der var igen i år kun 11 deltagere, som har testet prøverne overfor makrolid-gruppen. I Figur 3 kan man se, at antallet af de undersøgte prøver imellem deltagerne varierer fra 6 til alle 10 prøver. To deltager havde testet alle prøverne korrekt.

Det er ikke en bestemt stamme, som er årsag til fejlene. Fejlene er fordelt blandt otte stammer. Dog 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. 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 tetracyklin.

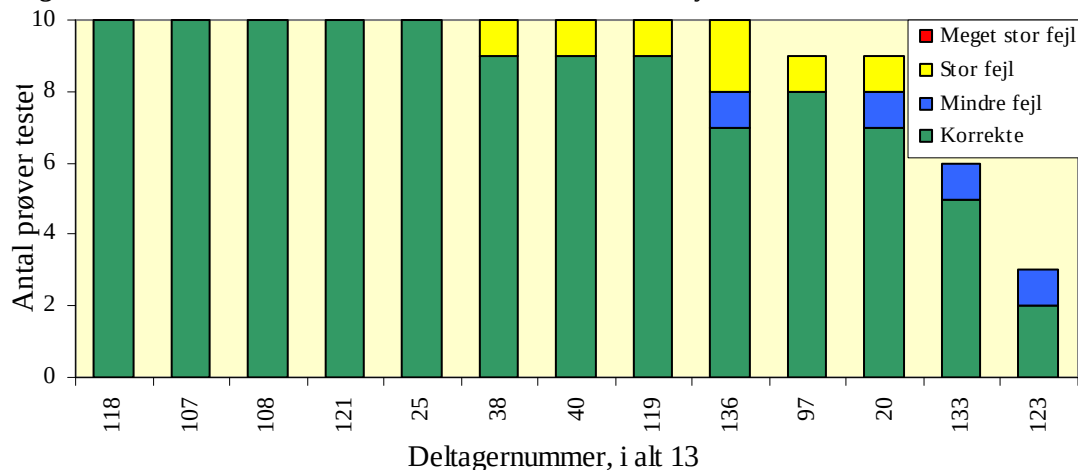
Figur 3. Resultater for følsomhedsbestemmelse over for makrolid.



Tetracyclin

I alt 13 deltagere valgte at bestemme prøverne overfor tetracyclinfølsomhed (Figur 4), og ligesom for makrolider varierede det meget blandt deltagerne, hvor mange af de otte prøver de valgte at bestemme resistens overfor. Det varierede således mellem 3 til 10 bestemmelser. Fem af deltagerne havde alle 10 prøver korrekte, hvilket er en klar forbedring sammenlignet med 2007. Generelt set synes resultatet at være tilfredsstillende. Dog er der et par praksis som burde genteste deres resultater, da de har fået et par af de større fejltyper. De samme antagelser som er nævnt under makroliderne, gælder ligeledes også for tetracyclin.

Figur 4. Resultater for følsomhedsbestemmelse over for tetracyclin.

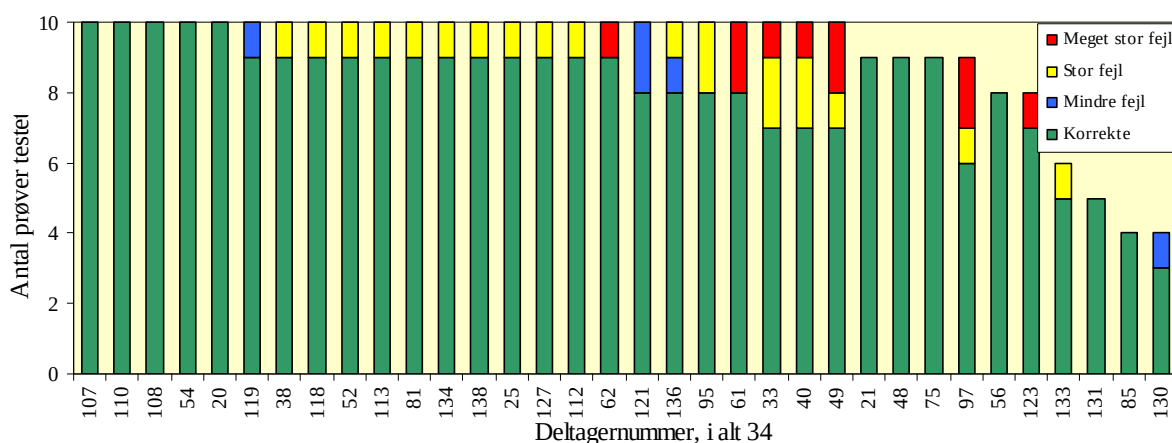


Penicillin

Helt overraskende er det ikke, at forholdsvis flere har udført resistensbestemmelse overfor penicillin. På Figur 5 ses det, at 34 deltagere har bestemt mellem 1 og 10 prøver. I alt 24 deltagere ud af de 34 har bestemt alle 10 prøver. Det er CNSen i prøve #13, som giver anledning til fejlene. Stammen er følsom, men testes resistente af deltagerne 21 ud af 54.

Med udgangspunkt i, at metodikken følges korrekt, kunne en mulig forklaring for problemerne med prøve #13 være usikkerhed ved måling af diameterzonerne, idet forskellen imellem følsom og resistens skiller med 1 mm ifølge CLSI og Rosco tabellerne. Generelt set må resultatet siges at være fint og med en forbedring i forhold til foregående år.

Figur 5. Resultater for følsomhedsbestemmelse over for Penicillin.



Konklusion

Generelt set er resultatet for identifikationen blevet bedre sammenlignet med 2007. Dette kan ligeledes afspejles i stigning af deltagere som har haft en interne kontrol-stamme identificeret korrekt. Dog bør nogle praksis stadig overveje om deres diagnostik er i orden. For mange fejlvælger stadig imellem kokker og stave og Gram positive og negative. Testen afspejler ikke frekvensen af de forskellige patogener som daglig ses i besætningerne. Den burde dog afspejle de patogener som praksis fra tid til anden får til identifikation. En ringtest som denne ville intet være værd såfremt alle stammerne var *S.aureus* og *Str.uberis*.

Resistensbestemmelsestesten forløb med et flot resultat sammenlignet med foregående år. Dog bør de praksis, som bruger disk diffusion, undersøge om de udfører testen efter de gældende vejledninger og bruger de rigtige fortolkningsnøgler.

Fødevareinstituttet
Danmarks Tekniske Universitet
Mørkhøj Bygade 19
2860 Søborg

Tlf. 35 88 70 00
Fax 35 88 70 01

www.food.dtu.dk

ISBN: 978-87-92158-56-7