

Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener 2007



Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener 2007

Rene S. Hendriksen

Frank M. Aarestrup

Kaspar Krogh, Dyrlægegruppen Østdjursland A/S

Fødevareinstituttet
Danmarks Tekniske Universitet

Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener 2007

Copyright: Fødevareinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

Foto: Magnus Price

ISBN: 978-87-92158-53-6

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

Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener

2007

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

¹ Fødevareinstituttet. ² Sektion for kvæg, DDD, Dyrlægegruppen Østdjursland A/S.

Indledning

Den Danske Dyrlægeforening (DDD) sektionen vedrørende kvæg (SVK) opfordrede igen i år Fødevareinstituttet (FOOD-DTU) til at fortsætte mastitisringtesten 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 40 tilmeldte dyrlægepraksis, hvoraf to havde tilmeldt henholdsvis tre og fem dyrlæger. Syv praksis ud af de 40 havde ikke indtastet deres resultat ved opgørelsens afslutning. Sammendraget er således baseret på i alt 39 besvarelser, hvoraf 9 praksis var gengangere fra 2005 og 19 fra 2006. 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 før udsendelsen af mælkeprøverne samt orienteret om diverse detaljer angående selve testens udførelse. I alt blev 40 individuelle kølepakker sendt til praksis d. 19 marts, således at disse skulle kunne nå modtagerne inden weekenden. Følgelbreve, angivende de individuelle logins og passwords, blev medsendt de 15 mælkeprøver.

Resultater

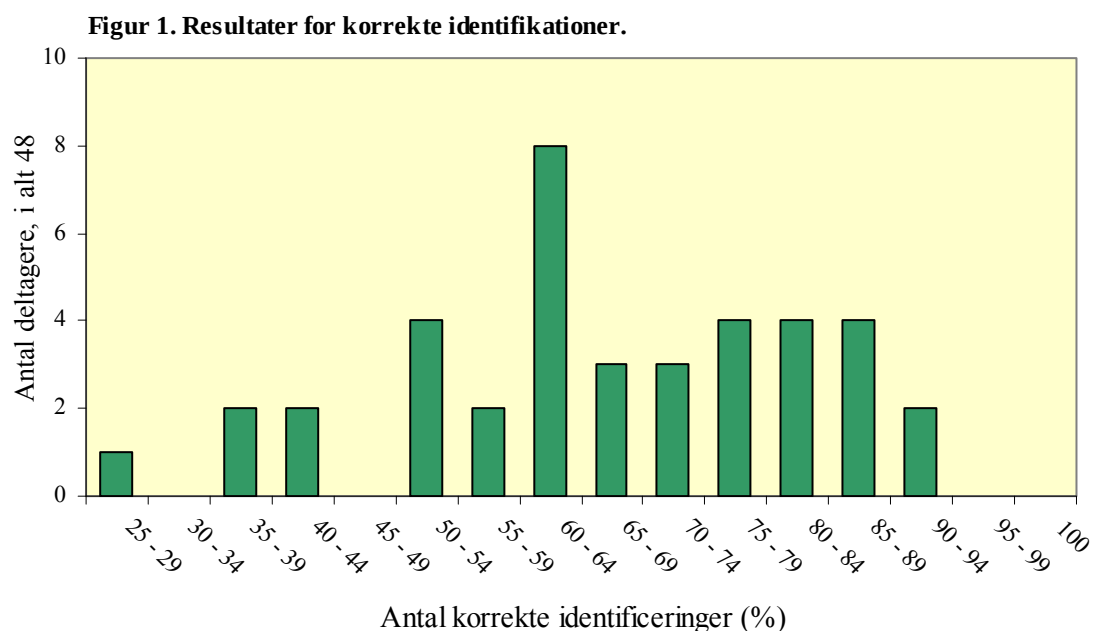
Identifikation

I år var det som det 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 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.

Igen i år var der i testen inkluderet de to interne kontrolstammer (#1: *Str. canis* og #2: *Str. agalactica*) som tidligere har voldt problemer for praksis med hensyn til identifikationen. Disse skal danne grundlag for 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 (n:7), som vælger organismen *Micrococcus* frem for koagulasenegative stafylokokker (CNS). Ligeledes er der en 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 kurven over antal korrekte identifikationer topper med otte deltagere ved intervallet for 60-64 % korrekte med yderpunkterne ved henholdsvis 29 % og 93 % korrekte. Ingen havde testen 100 % korrekt.

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

Tabel 1:

Prøve	Forventet fund	Forkerte %	Forkerte n.	Afvigelserne
1	<i>Strep canis</i>	79,5	31	20* <i>Str. agalactiae</i> , 2* <i>Str. pyogenes</i> , 2*CNS*, 2*S.aureus, 1* <i>Str. dysgalactiae</i> , 1* <i>Str. bovis</i> , 1* <i>Arcanobact.pyogenes</i> , 1*Lactococcus, 1*Micrococcus
2	<i>Strep agalactiae</i>	33,3	13	5* <i>Str. dysgalactiae</i> , 3*CNS, 2* <i>Str. canis</i> , 1*Bacillus, 1* <i>Str. bovis</i> , 1*Lactococcus
3	<i>Arcanobact. pyogenes</i>	12,8	5	3*Corynebact, 1* <i>Str. pyogenes</i> , 1*CNS
4	Gær	17,9	7	3*CNS, 3*Klebsiella, 1*Micrococcus,
5	<i>Staph aureus</i>	71,8	28	20*CNS, 7*Micrococcus, 1*Bacillus
6	<i>Staph aureus</i>	2,6	1	1*CNS
7	<i>Staph ssp (CNS)</i>	30,8	12	5Gær, 2*Enterococcus, 1*Listeria, 1* <i>Str. canis</i> , 1*E.coli, 1*Klebsiella, 1*Bacillus
8	<i>Strep dysgalactiae</i>	5,1	2	1*Micrococcus, 1* <i>Str. uberis</i> ,
9	<i>Strep uberis</i>	25,6	10	3*Enterococcus, 2* <i>Str. agalactiae</i> , 2*Bacillus, 1* <i>Str. pyogenes</i> , 1* <i>Arcanobact. pyogenes</i> , 1*Corynebact,
10	<i>E.coli</i>	5,1	2	1*Klebsiella, 1*Proteus
11	<i>Klebsiella ssp</i>	30,8	12	6*E.coli, 2*Proteus, 2*Enterococcus, 1*CNS, 1*Bacillus
12	<i>Corynebact. Ssp</i>	56,4	22	9*CNS, 6*Micrococcus, 3* <i>Str. bovis</i> , 1*Gær, 1*Bacillus, 2*S.aureus
13	<i>Strep agalactiae</i>	25,6	10	3*CNS, 3*Enterococcus, 2* <i>Str. dygalactiae</i> , 1*Micrococcus, 1* <i>Str. bovis</i> ,
14	Bacillus	17,9	7	4*Proteus, 2*CNS, 1* <i>Str. agalactiae</i>
15	<i>Arcanobact. pyogenes</i>	20,5	8	4*Corynebact, 1* <i>Str. canis</i> , 1* <i>Str. agalactiae</i> , 1*Bacillus, 1* <i>Str. pyogenes</i>

Der var udbredte problemer for nogle praksis med mange af prøverne. Prøve #1 *Str. canis* var det således kun 21,5 %, som havde korrekt. Dog var der i år en forbedring at spore med identifikationen af prøverne #2 og #13 indeholdende *Str. agalactiae*, hvor henholdsvis 66.7 % og 74.4 % havde dem korrekte. Dette er en klar forbedring i forhold til sidste år, hvor niveauet for korrekt identifikation lå på henholdsvis 45,8 %, 43,8 % samt 52,1%.

For den ene af de to kontrolstammer (#2 *Str. agalactiea*) var der en markant forbedring hos de 26 praksis som også sidste år deltog i ringtesten hvor 18 praksis ud af de 26 havde denne organisme korrekt identificeret. Der var ikke den samme forbedring at spore for den anden kontrolstamme (#1: *Str. canis*), som kun 7 ud af de 27 praksis havde korrekt. Det er vores formodning, at den øgede fokus, der er blevet rettet mod specielt *Str. agalactiae* har haft en positiv indvirkning på identifikationen af denne.

I år var der inkluderet en mucoid *Str. uberis* i testen. Dette har øjensynlig skabt problemer for nogle praksis da hele 26.5 % af praksis havde denne forkert. Dette er væsentlig dårligere end i 2006 hvor 4.2 % havde fejl ved denne bakterie. Det er sandsynligt, at den mere mucoid morfologi har haft en negativ påvirkning af resultatet ved identifikationen.

Ud over streptokokkerne var der også problemer med identifikationen af prøve #15 med *Arcanobacterium pyogenes* som 20.5 % af praksis havde forkert. Der var dog problemer med at få denne prøve i vækst, da 23.1 % havde prøven steril og 2.6 % havde undladt at testen prøven. Dog ses der en forbedring sammenlignet med sidste år, hvor kun 25 % havde *Arcanobacterium pyogenes* korrekt identificeret mod henholdsvis 59.0 % og 53.8 % i år. Dette kunne tyde på at den fokus vi sidste år rettede mod korrekt inkubation af denne patogen har båret frugt.

Corynebacterium (prøve # 12) voldte også ganske store problemer, idet kun 43.6 % havde denne korrekt. Det er dog ej heller ikke overraskende at 15 praksis havde benævnt denne CNS / *Micrococcus*, idet kolonimorfologien er slående med netop denne gruppe.

I årets ringtest var der kun én CNS (#7) med og fejlprocenten var 30.8 %. Der var mange praksis som havde forskellige bud på hvad prøven indeholdt lige fra Grampositive til Gramnegative samt stave og kokker. Der var tale om en *S. xylosus* som er ganske almindelig, men som forårsager høje celletal sammenlignet med så mange andre CNS. *S. xylosus* kendetegnes ofte ved at være hvidlig med en flosset koloni-rand.

Prøve # 11 indeholdende *Klebsiella* var der 30.8 % som havde fejlidentificeret, hvoraf seks praksis havde valgt den som *E. coli*.

I dette års test var der som sædvane en 'joker' med. Denne voldte 71.8 % af praksis problemer. Vi har gentagne gange hørt at *S. aureus* "altid" giver dobbelt-hæmolyse, hvorfor den er så "nem" at identificere. Dog er virkeligheden noget anderledes, hvilket kunne observeres i testen hvor en svag β -hæmolyserende *S. aureus* var inkluderet. Hæmolysen kom først til udtryk efter et helt døgn inkubation, hvorfor de praksis som undersøgte stammen efter eksempelvis 18 timer ikke så denne udvikling. Vi har før påpeget vigtigheden af at inkubere stammerne fuldt ud i minimum 24 timer.

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:

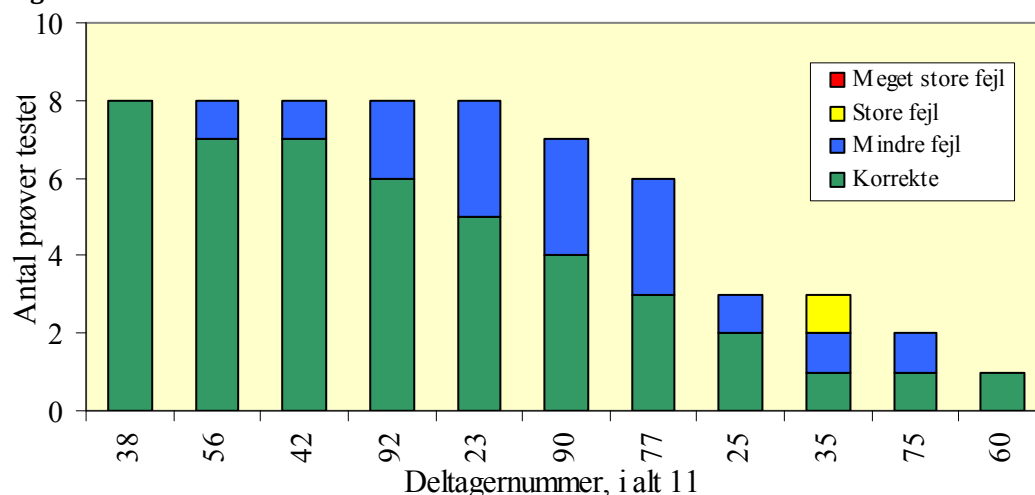
Fejl kode:	Fejl type:
Mindre fejl	Følsom testet intermediær og omvendt. Resistent testet intermediær og omvendt.
Stor fejl	Følsom testet resistent
Meget stor fejl	Resistent testet følsom

Makrolid

Der var i år kun 11 deltagere, som har testet prøverne overfor makrolid-gruppen. I Figur 2 kan man se, at antallet af de undersøgte prøver imellem deltagerne varierer fra 1 til alle 8 prøver. Én deltager havde testet alle prøverne korrekt.

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 tetracyklin.

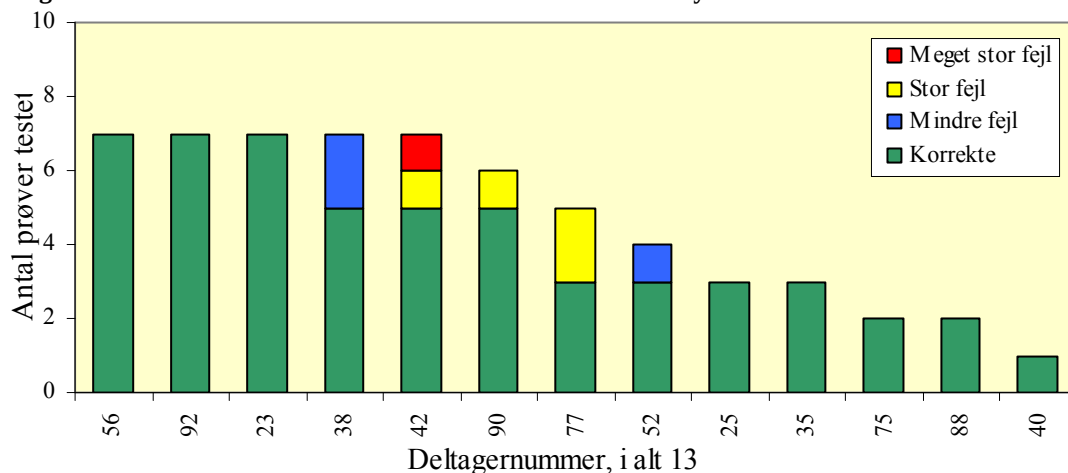
Figur 2. Resultater for følsomhedsbestemmelse over for makrolid.



Tetracyklin

I alt 13 deltagere valgte at bestemme prøverne overfor tetracyclinfølsomhed (Figur 3), 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 1 til 7 bestemmelser. Ingen af deltagerne havde alle 8 prøver korrekte. 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 tetracyklin.

Figur 3. Resultater for følsomhedsbestemmelse over for tetracyklin.



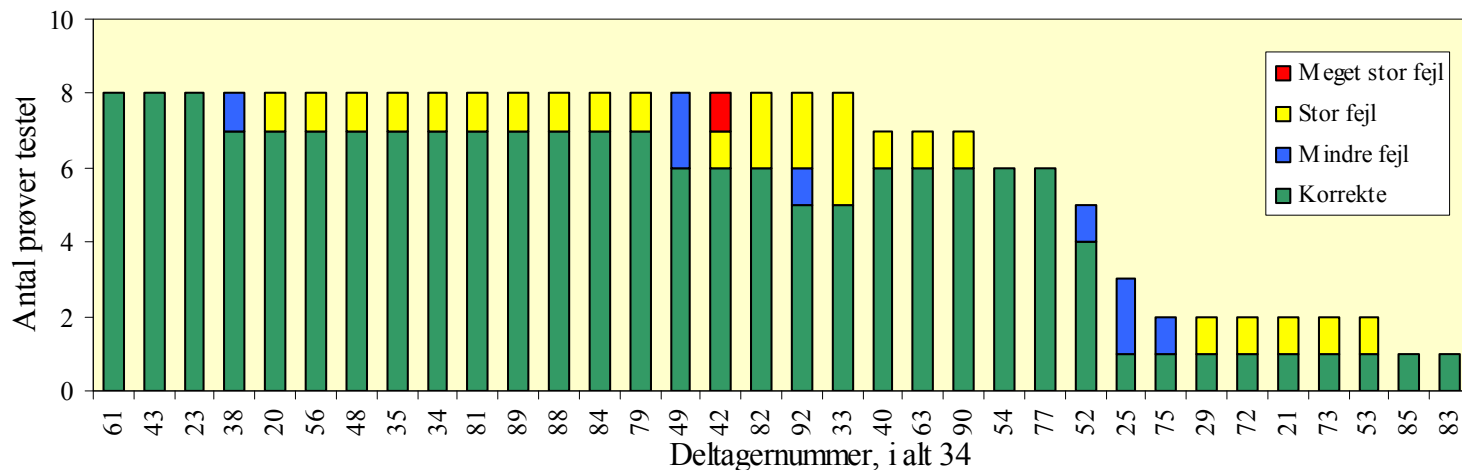
Penicillin

Helt overraskende er det ikke, at forholdsvis flere har udført resistensbestemmelse overfor penicillin. På Figur 4 ses det, at 34 deltagere har bestemt mellem 1 og 8 prøver. I alt 19 deltagere ud af de 34 har bestemt alle 8 prøver. Det er især stafylokokkerne i prøve #5 og #7, som giver anledning til fejlene. Begge prøver er følsomme, men testes resistente af deltagerne. Fem praksis har bestemt #5 resistent og tre intermediært, hvorimod hele 18 praksis har bestemt #7 resistent og tre intermediært. Prøve #6 som ligeledes er en stafylokok blev korrekt bestemt resistent i 31 tilfælde.

Med udgangspunkt i, at metodikken følges korrekt, kunne en mulig forklaring for problemerne med prøverne #5 og #7 være usikkerhed ved måling af diameterzonerne, idet forskellen imellem følsom og resistens skiller med 1 mm ifølge CLSI og Rosco tabellerne. Der synes at være et generelt problem med at bestemme resistensforholdet for følsomme stafylokokker. Årsagen kan måske også findes i brugen af penicillinagar, som Steins i 2006 har oplyst indeholder 0,06 µg/ml. Grænsen for følsomhed for stafylokokker ligger ifølge CLSI på $\leq 0,12$ µg/ml, hvilket vil medføre, at en følsom stafylokok med en MIC værdi på 0,12 µg/ml godt kan vokse på penicillinagarpladen. Man skal derfor være ekstra opmærksom

på fortolkningen ved brug af disse plader, hvorvidt en stafylokok er følsom eller resistent. Teoretisk set vil det samme gøre sig gældende for enterokokker og streptokokker jf. CLSI guidelines.

Figur 4. Resultater for følsomhedsbestemmelse over for Penicillin.



Konklusion:

Generelt set er resultatet for identifikationen blevet dårligere sammenlignet med 2006. Praksis bør nok overveje om deres diagnostik er i orden. 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.

Resistensbestemmelsestesten forløb 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. Det skal dog nævnes, at opdelingen imellem agarplader med og uden penicillin stadig er fortræffelige til at indikere hvilke patogener der er årsag til mastitis.

Fødevareinstituttet
Danmarks Tekniske Universitet
Mørkhøj Bygade 19
2860 Søborg

Tlf. 35 88 70 00
Fax 35 88 70 01

www.food.dtu.dk

ISBN: 978-87-92158-53-6