Ringtesten for identifikation og resistens-bestemmelse af mastitispatogener 2010

DTU Fødevareinstituttet

Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener 2010

Rene S. Hendriksen

Susanne Karlsmose

Jacob Dyring Jensen

Frank M. Aarestrup

Arne Bent Jensen

Dyrlæge Kaspar Krogh

Hanne Østergaard Heinesen

Fødevareinstituttet

Danmarks Tekniske Universitet

Ringtesten for identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener 2010

Copyright: Fødevareinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet
Foto: Magnus Price
ISBN: 978-87-92158-80-2

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 2010

Forsker Rene S. Hendriksen[1], Levnedsmiddelingeniør Susanne Karlsmose[1], Laborant Jacob Dyring Jensen[1], Professor, Dyrlæge Frank M. Aarestrup[1], Systemudvikler Arne Bent Jensen[1], Dyrlæge Kaspar Krogh[2], Marketing Manager Hanne Østergaard Heinesen[3]

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

Indledning

Hovedtemaet i dette års ringtest var streptokokken, idet den var at finde i 7 ud af de 15 prøver. Da det i år var femte gang at Ringtesten blev afholdt i et samarbejde mellem Sektion Kvæg, DTU Fødevareinstituttet og Dianova blev det besluttet at øge sværhedsgraden en smule.

Formålet med Mastitis Ringtesten er at give dyrlæger og veterinærsygeplejersker, der til daglig står for " hjemmediagnostikken" mulighed for at kvalitetssikre og teste pålideligheden af deres diagnostik.

Testen afspejler de kendte mastitispatogener, dog ikke i samme frekvens som de formodede prevalenser.

Undersøgelsen

Deltagere

Der var i alt 43 tilmeldte dyrlægepraksis (60 personer), hvoraf 7 havde tilmeldt henholdsvis 2, 3, 3, 3, 4, 4 og 5 personer. Af de i alt 60 tilmeldte personer, havde 44 indtastet deres resultat ved opgørelsens afslutning d. 28 maj 2010. Sammendraget er således baseret på de i alt 44 besvarelser. Praksis, som tidligere har deltaget i ringtestene, blev tildelt det samme login som de forrige år, således, at eventuelle ændringer kunne måles.

Procedure

Ringtesten bestod også i 2010 af 15 udsendte mælkeprøver podet med renkulturer af mastitispatogener. Disse blev testet på sædvanligvis i praksis ved anvendelse af de normale rutiner, 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 46 individuelle kølepakker sendt til praksis d. 15 marts således, at disse skulle kunne nå modtagerne inden weekenden. Følgebreve, med de individuelle login og passwords, blev medsendt de 15 mælkeprøver.

I 2010 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 om fundet var korrekt 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 kan variere i antal fra praksis til praksis. Igen i 2010 var der i testen inkluderet en intern kontrolstamme (#7: *Streptococcus agalactiae*). Denne skal danne grundlag for at vurdere, om der har været en målbar forbedring af praksis samt det overordnede resultat igennem årene.

I det følgende bringes et sammendrag af resultaterne fra ringtesten år 2010.

Resultater

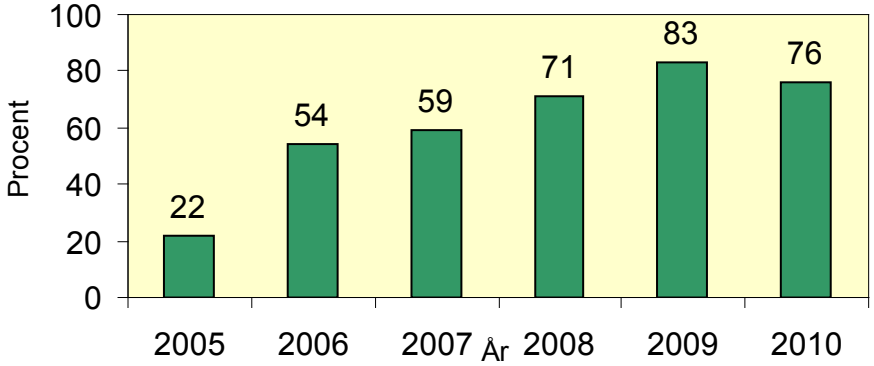
Identifikation

I dette års ringtest var der stadig nogle få formodede nomenklaturproblemer. Flere af deltagerne har brugt betegnelsen *Micrococcus* frem for koagulase negative stafylokokker (CNS). Ligeledes er der praksis, som har brugt betegnelsen *Lactococcus* samt *Lactobacillus,* hvor det er nærliggende, at der er ment enterokokker. Disse problemer er ikke kun begrænset til nye deltagere, men ligeledes brugt af deltagere som har deltaget i forrige år. Fejlene har været observeret i stammerne #9, #11 samt #14. Dog har disse fejl kun været få for stamme #9 (3 fejl) og #11 (1 fejl), og har derfor ikke haft afgørende betydning for resultatet. Derimod har de formodede nomenklaturproblemer haft afgørende betydning for resultatet for stamme #14, som indeholdt en *Lactococcus* spp. Ud af 41 fejlidentifikationer kunne 25 – altså over halvdelen af dem – tilskrives de formodede nomenklaturproblemer, idet 23 praksis har benævnt stammen som værende en enterokok og andre to praksis den som værende *Lactobacillus.*

Figur 1 illustrerer den procentvise forbedring af praksis evne til at identificere den interne kontrol stamme; *Str. agalactiae* (Prøve #7), som i alle årene har været benyttet. Det er tydeligt, at der har været en mindre forringelse af resultatet i år i forhold til 2009 på 7%. Vi har i alle årene gjort meget ud af at orientere de deltagende praksis om, at gruppe B streptokokker ikke nødvendigvis er kraftigt beta-hæmolyserede, men ligeledes kan antage an-hæmolytiske og svagt beta-hæmolyserende former. Mange har fejlidentificeret stammen som værende eksempelvis *Streptococcus dysgalactiae*. Dog har dette i år ikke været så udpræget som foregående år, da kun tre praksis har brugt denne betegnelse. Til forskel har fem praksis i år angivet stammen til at være en kraftig beta-hæmolyserende bakterie; nemlig *Streptococcus pyogenes* (n=1), *Arkanobacterium pyogenes* (n=2) samt *Streptococcus canis* (n=2). Alt i alt blev stammen

undersøgt af 41 praksis, og der blev observeret et fejlniveau på 24%, hvilket umiddelbart ikke kan være tilfredsstillende, da denne organisme er indberetningspligtig.

Figur 1. Procent korrekt identificeret intern kontrol stamme

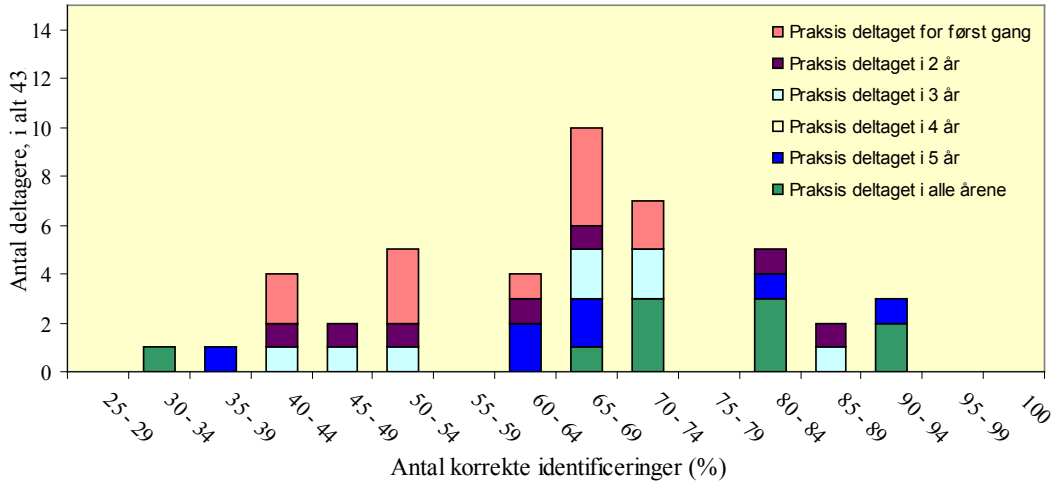


I Figur 2 vises forholdet imellem antal deltagere og antal korrekte identifikationer i procent, samt hvorvidt disse var rapporteret af nye deltagere eller af deltagere, som har medvirket i de foregående år.

Ud af de 44 personer, som har indrapporteret deres data inden deadline, havde de 10 (23%) deltaget i alle seks år. Herudover havde syv (16%), otte (18%) og syv (16%) deltagere rapporterede data til ringtesten i henholdsvis fem, tre samt to år. Tolv (27%) personer deltog i ringtesten for første gang i 2010. Ud fra Figur 2 ses det, at der er en overvægt af personer, som har deltaget i et til to år. Disse har klaret sig dårligst i ringtesten, hvorimod dem som klarede sig bedst har deltaget i fem til seks år. I 2010-ringtesten havde kun 7% af deltagerne opnået 90% korrekte identifikationer eller derover, sammenlignet med hele 37% i år 2009. Det er en klar tilbagegang, som nok skyldes den lidt sværere test med de tre "jokere"; bakterier som sjældent observeres.

I år var der 13 deltagere, som kunne betegnes som outliers med under 50% korrekte identifikationer. Yderligere var der i år ingen deltagere, som havde alle identifikationerne 100% korrekte.

Figur 2. Resultater for korrekte identifikationer.



Identifikation af fejlkilder

Generelt set lå antallet af fejl stadig højt – også når man så bort for eventuelle nomenklaturproblemer eller "jokere". Der var således kun to prøver, hvor den samlede fejlprocent lå under 10 (#1: *Staphylococcus aureus*, #3: *Streptococcus dysgalactiae*),.

Som det fremgår af tabel 1 var der i årets ringtest tre prøver, som indeholdt en stafylokok; CNS (prøve #8 og #9), samt en *S. aureus* (prøve #1). Prøve #1 blev undersøgt af alle 44 deltagende praksis, hvoraf kun tre havde fejlidentificeret den som værende enten CNS eller en mikrokok. Dette kunne være afklaret med en koagulase test eller en hyaluronidase test. Dog må dette resultat på 7% beskrives som værende tilfredsstillende. Prøve #8 og #9 indeholdende en CNS blev undersøgt af henholdsvis 43 og 44 af praksis. De resulterende fejlidentifikationer; 12% for prøve #8 og 20% for prøve #9 var ikke overraskende, idet flere praksis havde rapporteret prøverne indeholdende *S. aureus*. Denne fejltype er klassisk og umiddelbar. Dog var der fire praksis, som havde rapporteret gær på prøve #8. Dette kan selvfølgelig skyldes at prøven uheldigvis var kontamineret med gær, men ligeledes er det kendt at mange typer af gær netop makroskopisk ligner CNS – dog med en lidt tør kolonioverflade.

For prøve #9, havde tre praksis berettet *Bacillus*. *Bacillus* er makroskopisk meget anderledes end CNS og burde ikke give anledning til nogen forveksling. Dog er *Bacillus* en kendt årsag til kontaminering og et stort problem i mælkepulver (pga. at den er sporedanner), hvorfor vi som matrix benytter en opløst modermælkserstatning. Det er en plausibel forklaring, at disse tre fejlidentifikationer kan skyldes kontaminering. Overordnet set ligger fejlprocenterne noget højt for begge prøver, dog kan 14% af fejlene ud af 20% for prøve #9 muligvis tilskrives nomenklaturproblemer eller kontaminationer.

I årets ringtest var der som tidligere nævnt repræsenteret en del streptokokker; både beta-, alfa- samt an-hæmolytiske. Endvidere var der repræsenteret to *Streptococcus uberis* idet denne tilskrives en større rolle med hensyn til mastitis i Danmark. Der blev observeret en vis usikkerhed i identifikationen af denne og de lignende species såsom enterokokker, lactokokker og *Streptococcus bovis*.

Der var således tilsat *Str. uberis* i prøverne #4 og #5 som henholdsvis 14% og 21% af praksis havde fejlidentificeret ud af i alt 44 og 42 deltagende praksis. I prøve #4 havde tre ud af seks personer fejlagtigt rapporteret bakterien som værende en enterokok. Det samme mønster blev observeret i prøve #5, hvor ligeledes tre personer ud af ni fejlrapporterede bakterien som en enterokok. Yderligere havde to personer meldt bakterien som en lactokok. Dette er ikke overraskende, da alle tre bakterier ligner hinanden meget i morfologi, vokser ens på blodagar og er aesculin positive. De kan derfor være svære at skelne med simple tests og kræver ofte brug af supplerende tests såsom forgæringer.

De selvsamme problemer sås ligeledes i prøve #11, som var tilsat en *Enterococcus* og testet af i alt 44 personer. Atten procent svarende til otte praksis havde fejl i prøve #11, hvor den overvejende del (fem personer) af fejlidentifikationerne var *Str. uberis*.

I prøverne #2 og #13 var der i år tilsat en "joker" – ikke at de ikke er relevante, men måske lidt svære at identificere. Dette stod klart ved ringtestens afslutning da 98% henholdsvis 93% af praksis havde fejl i disse to prøver. I alt forsøgte 43 praksis at undersøge prøve #2 som indehold en *Str. bovis*. En af disse praksis havde identificeret bakterien korrekt, men hele 42 havde den forkert, hvoraf 33 praksis havde bestemt bakterien som værende *Str. uberis*. Det må siges at være problematisk, at mange praksis ikke kan kende forskel imellem en som patogen som *Str. uberis* og mere forureningsrelaterede bakterier såsom enterokokker og *Str. bovis*.

Tre praksis havde identificeret prøve #14 indeholdende en *Lactococcus* korrekt hvorimod 93% havde den fejlbestemt (41 praksis). Den overvejende del af fejlene skyldes, at 23 og 10 af praksis havde bestemt bakterien som værende henholdsvis en enterokok eller *Str. uberis*. Det er muligt, at de 23 personer havde identificeret bakterien som værende en enterokok grundet nomenklaturproblemer som tidligere nævnt.

Det bedste resultat i år blev opnået ved test af prøve #3, som var tilsat *Str. dysgalactiae* som kun resulterede i en fejlprocent på 5. To praksis havde fejlidentificeret organismen og rapporteret bakterien som værende en CNS og *Str. agalactiae*.

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

Prøve	Forventet fund	Forkerte %	Forkerte n.	Antal fejlidentifikationer
1	*Staph aureus*	7	3	2*CNS, 1*Micrococcus
2	*Strep bovis*	98	42	33*Str.uberis, 4*Enterococcus, 2*Lactococcus, 1*Str.agalactiae, 1*Bacillus, 1*Str.dysgalactiae
3	*Strep dysgalactiae*	5	2	1*CNS, 1*Str.agalactiae
4	*Strep uberis*	14	6	3*Enterococcus, 1*Str.dysgalactiae, 1*Micrococcus, 1*Str.canis
5	*Strep uberis*	21	9	3*Enterococcus, 2*Lactococcus, 1*Str.dysgalactiae, 1*A.pyogenes, 1*Str.bovis, 1*Gær
6	*Strep canis*	73	29	18*Str.agalactiae, 3*S.aureus, 3*Str.pyogenes, 1*CNS, 1*Str.uberis, 1*Lactococcus, 1*Str.bovis, 1*Micrococcus
7	*Strep agalactiae* (QC)	24	10	3*Str.dysgalactiae, 2*A.pyogenes, 2*Str.canis, 1*Str.pyogenes, 1*Corynebact, 1*Gær
8	*Staph spp (CNS)*	12	5	4*Gær, 1*S.aureus,
9	*Staph spp (CNS)*	20	9	3*S.aureus, **3*Micrococcus**, 3*Bacillus
10	*Strep pyogenes*	90	36	21*Str.agalactiae, 4*Str.canis, 3*A.pyogenes, 2*Corynebact, 2*Micrococcus, 1*S.aureus, 1*CNS, 1*Str.dysgalactiae, 1*Gær
11	*Enterococcus spp*	18	8	5*Str.uberis, 2*CNS, **1*Lactococcus**
12	*Klebsiella spp*	23	10	4*CNS, 2*Bacillus, 2*E.coli, 1*Proteus, 1*Str.uberis
13	*Klebsiella spp*	12	5	2*E.coli, 1*CNS, 1*Lactococcus, 1*A.pyogenes
14	*Lactococcus spp*	93	41	**23*Enterococcus**, 10*Str.uberis, **2*Lactobacillus**, 1*Str.dysgalactiae, 1*Str.agalactiae, 1*Bacillus, 1*Str.bovis, 1*Corynebact, 1*Pseudomonas
15	*Arcanobact. pyogenes*	16	6	3*Str.pyogenes, 2*Str.canis, 1*Micrococcus

Fejl-identifikationer markeret i rødt kan muligvis skyldes nomenklaturproblemer.

I år indeholdt testen to beta-hæmolyserende streptokokker; *Str. canis* og *Str. pyogenes*. De voldte ligeledes nogle problemer. I prøve #6 var der tilsat *Str. canis* og i prøve #10, *Str. pyogenes,* hvilket var blevet undersøgt af i alt 40 praksis. *Str. canis* har ikke været inkluderet testen i et par år, og *Str. pyogenes* var med i testen for første gang. Mange praksis har i årenes løb benævnt beta-hæmolyserende bakterier, såsom *Str. canis* og *Arcanobacterium pyogenes*, som værende *Str. pyogenes*. Derfor blev denne inkluderet i år, således at praksis havde muligheden for at vise, at de kunne skelne denne fra de øvrige beta-hæmolyserende streptokokker. Dog fejlidentificerede 21, fire og tre praksis denne som henholdsvis *Str. agalactiae*, *Str. canis* og *A. pyogenes*. I alt var fejlprocenten for denne prøve på 90.

Som udgangspunkt kan man ikke identificere beta-hæmolyserende streptokokker ud fra selve hæmolysen, hvorfor det er nødvendigt at udføre nogle laboratorietests til identifikation af disse. Det var ligeledes klart ved identifikationen af *Str. canis*. Den har som før omtalt været med i testen i foregående år og er beskrevet i rapporterne som værende meget beta-hæmolyserende. Denne prøve resulterede i år i en fejlprocent på 73, hvoraf 18 praksis havde rapporteret den som *Str. agalactiae* og tre praksis som *Str. pyogenes*.

En anden beta-hæmolyserende bakterier er *A. pyogenes*. Denne var tilsat prøve #15 og testet af 40 personer. Prøven gav anledning til en fejlprocent på 16. Ud af de seks fejl, havde tre fejlidentificeret bakterien som værende *Str. pyogenes* og to som *Str. canis*. I de foregående ringtest har netop A. pyogenes givet anledning til ret mange fejl – både praksis som ikke kunne få vækst i prøverne grundet *A. pyogenes* vækstkrav, men også mange som netop forvekslede den med en beta-hæmolyserende streptokok.

I år var der inkluderet to *Klebsiella* – mest for at ”tvinge” praksis til at tage stilling til, om det virkelig kunne være tilfældet, at to identiske stammer var udvalgt. Det er glædeligt at se, at kun fem praksis ud af 42 havde fundet en anden bakterie end *Klebsiella* i prøve #13. En fejlprocent på 12 er som sådan ikke helt så dårligt. Det var ej heller uden forventning at se at *Klebsiella* i to tilfælde var forvekslet med *E. coli*. En større del af praksis havde opnået fejl i prøve #12, som ligeledes indeholdt en *Klebsiella*. En plausibel årsag kan muligvis være som beskrevet over, at praksis ikke havde regnet med to identiske stammer, og derfor måske har tvivlet på deres resultat og valgt en anden identifikation. Dette er selvfølgelig ren spekulation. Spektret af fejlidentifikationer for denne prøve spænder over både kokker og stave og Gram positive og negative.

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.

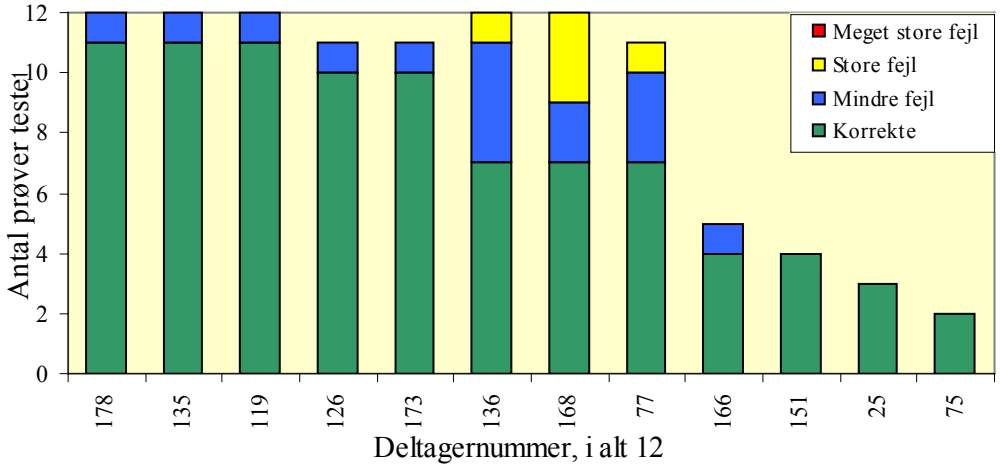
Tabel 2: Fejl kategorier

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 12 deltagere, som har testet prøverne overfor makrolid-gruppen. I Figur 3 kan man se, at antallet af undersøgte prøver varierer fra to til alle 12 prøver. Tre af deltagerne havde ingen fejl. De havde dog ikke testet alle prøverne.

Figur 3. Resultater for følsomhedsbestemmelse over for makrolid.



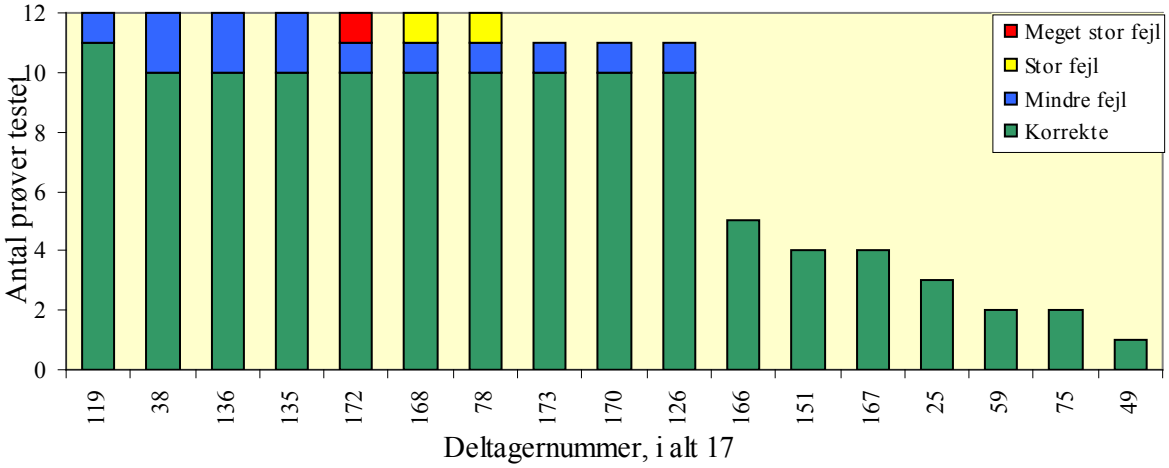
Det var ikke en bestemt stamme, som var årsag til de 20 fejl. Fejlene var fordelt blandt ni stammer. Dog skal det nævnes at 15 ud af de 20 fejl var kategoriseret som værende "mindre fejl". Generelt må resultatet siges at være tilfredsstillende, selvom der for nogle deltagere er plads til forbedringer. Det er således vigtigt at følge de anvisninger til metodik og fortolkninger af resistenszonerne, som producenterne til diskene / tabletterne angiver. 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 9 cm. Herover skal organismen man tester være en renkultur samt sås ud 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 tetracyklin.

Tetracyklin

I alt 17 deltagere valgte at bestemme prøverne for tetracyclinfølsomhed (Figur 4), og ligesom for makrolider varierede det meget blandt deltagerne, hvor mange af de 12 prøver de valgte at bestemme resistens overfor. Det varierede således fra én til alle 12 bestemmelser. Syv af deltagerne havde ingen fejl – dog havde de ikke testet alle 12 prøver. Der var ni stammer som resulterede i de 16 fejl, hvoraf de 13 var "mindre fejl" og kun én var en "meget stor fejl". Generelt set synes resultatet at være tilfredsstillende. Anbefalingerne som er nævnt under makroliderne, gælder selvfølgelig ligeledes for tetracyklin.

Figur 4. Resultater for følsomhedsbestemmelse over for tetracyklin.



Penicillin

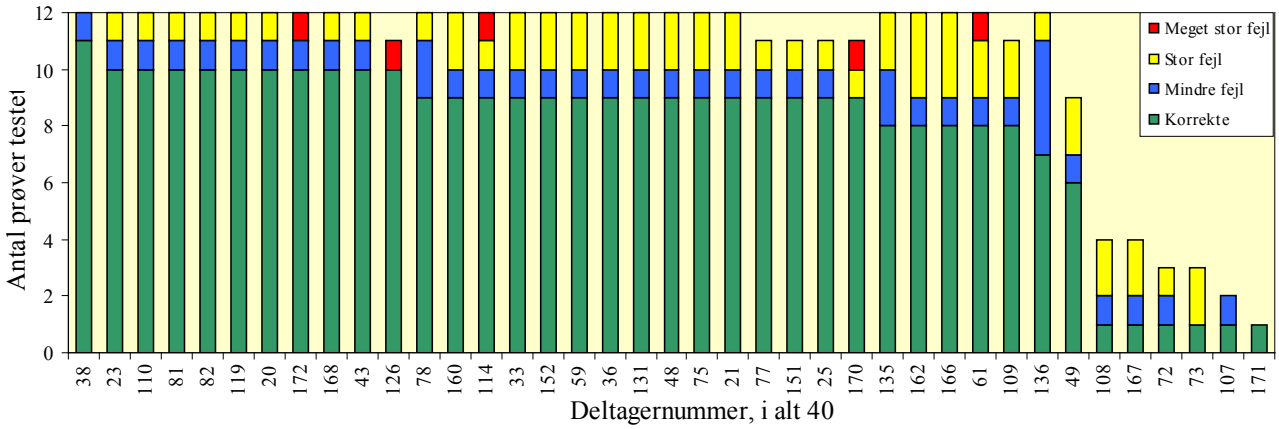
Helt overraskende er det ikke, at forholdsvis flere har udført resistensbestemmelse overfor penicillin. På Figur 5 ses det, at 40 deltagere har bestemt mellem én og 12 prøver. I alt 27 deltagere ud af de 40 har bestemt alle 12 prøver. Én deltager opnåede ud af 12 testede prøver at have 11 korrekt bestemt samt en "mindre fejl".

Der var i år fire stammer som primært var årsag til hovedparten af fejlene. Prøverne #11 og #14 indeholdt henholdsvis en penicillinfølsom enterokok og lactokok med en MIC værdi på henholdsvis 8 µg/mL og 2 µg/mL. Såfremt praksis benytter penicillin-blodagarplader (0,06 µg/mL) som udgangspunkt for resistensbestemmelserne vil dette resultere i et forkert resultat. Årsagen er som nævnt tidligere år, at følsomhedsbreakpointet for disse bakterier ligger over den koncentration som er i penicillin-blodagarpladerne, hvorfor selv følsomme stammer vil vokse på

disse. I alt rapporterede henholdsvis 31 og 21 deltagere stammerne fejlagtigt som værende resistente ud af 36 og 32 deltagere. Disse deltagere har derfor opnået en ” stor fejl”.

Prøve #8 indeholdende en CNS forårsagende ligeledes mange fejl. Stammen havde en MIC værdi på 2 µg/mL og fortolkes som værende intermediær ifølge Clinical and Laboratory Standard Institute. I alt havde 26 deltagere rapporteret stammen som værende resistent og 10 deltagere som følsom. I begge tilfælde vil en sådan fejl resultere i en ”mindre fejl”. Årsagen er den samme som for de to øvrige stammer, at penicillin-blodagarpladerne har en penicillinkoncentration, som ikke er passende til resistensbestemmelse af visse species. Faktum er, at disse plader er gode indikatorer for gruppering af mastitispatogenerne, men absolut ikke velegnede til generelle resistensbestemmelser.

Figur 5. Resultater for følsomhedsbestemmelse over for Penicillin.



Konklusion

Generelt set er resultatet for identifikationen sammenlignet med 2009 betydeligt dårligere i dette års ringtest. Dette kan afspejles i det dalende antal af deltagere, som har identificeret den interne kontrolstamme korrekt. Dog skal det også nævnes, at årets test har været betydelig sværere end de foregående år, hvilket dog ikke kan bortforklare det dårligere resultat på den interne kontrol.

Glædeligt er det, at praksis som i gentagne år har deltaget, umiddelbart ser ud til at klare testen bedre end praksis, som kun har deltaget et par år. Dog bør nogle praksis stadig overveje om deres diagnostik er i orden med fokus på problematikken omkring enterokokker, lactokokker og *Str. uberis* samt overfor de beta-hæmolyserende streptokokker. Desuden bør nogle praksis opdatere deres viden på nomenklarturområdet.

Resistensbestemmelsestesten overfor tetracyclin og makrolid forløb med et pænt resultat med enkelte fejl. Men de praksis, som bruger benytter penicillin agarplader som resistensbestemmelsesmetode, bør sætte sig mere ind i, for hvilke bakterier disse er brugbare, og især for hvilke bakterier penicillin agarplader er helt misvisende.

Fødevareinstituttet
Danmarks Tekniske Universitet
Mørkhøj Bygade 19
2860 Søborg

Tlf. 35 88 70 00
Fax 35 88 70 01

www.food.dtu.dk

ISBN: 978-87-92158-80-2