



Mastitisringtest2021

Kvalitetssikring og egenkontrol af identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener i Dk

Forfatter og ringtestansvarlig: Bettina Nonnemann
Laboratiemedarbejdere: Karina Lazarotti Elmdam

Kvalitetssikring og egenkontrol af identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener i Dk

AF

Ph.D., Bettina Nonnemann og laborant Karina Lazarotti Elmdam
Center for Diagnostik DTU SUND.

COPYRIGHT: Hel eller delvis gengivelse af denne publikation er tilladt med kildeangivelse

UDGIVET AF: Center for Diagnostik Danmarks Tekniske Universitet, Kemitorvet, 2800 Kgs. Lyngby Tlf. 35 88 60 00

REKVIRERES: Rapporten findes i elektronisk form ved kontakt til Bettina Nonnemann benon@dtu.dk

INDHOLDSFORTEGNELSE

Indledning	4
Procedure ang. ringtest	5
Deltagere.....	6
Procedure.....	7
Resultater - identifikation	10
Patogenidentifikation	10
Identifikation af fejkilder.....	12
Generelle tendenser	12
Bakterier der udløste systematiske fejlidentifikationer	13
Konklusion.....	17
Resistensbestemmelse.....	19
Resultater - resistensbestemmelse.....	20
Over eller undervurdering af resistens	23
Konklusion.....	23

Indledning

Formålet med mastitisringtestene er at tilbyde kvalitetssikring af den diagnostik der udføres på mælkeprøver i veterinære praksislaboratorier. Ringtesten omfatter et repræsentativt udvalg af danske mastitispatogener, herunder primært normalt forekommende mastitisbakterier, samt bakterier der kan give anledning til differentialdiagnostiske problemer.

Mastitisringtesten er blevet afholdt siden 2005, hvor den blev igangsat af DTU Fødevarerinstitutionen i samarbejde med Den Danske Dyrlegeforening og Videncenter for Landbrug, Kvæg. I 2016 overgik ringtesten til DTU Veterinærinstitutionen – nu kaldet Center for Diagnostik DTU SUND og har siden og til og med 2021 været udbudt herfra.

Ringtesten udgør det eneste fælles hjælpemiddel for alle praktiserende kvægdyrlæger i Danmark til at få vurderet deres diagnostiske kompetencer på en fælles målestok samt identificeret specifikke diagnostiske problemer i den enkelte klinik. Samtidig er Ringtesten med til at skabe et overblik over det landsdækkende diagnostiske niveau inden for potentielle mastitispatogener.

Historisk har danske dyrlæger været efterladt i et vakuum i ca. 30 år, hvor der nærmest intet fokus har været på mastitis – hverken forskningsmæssigt eller efteruddannelsesmæssigt. Der er dog tilsyneladende sket en positiv forandring af kvaliteten af det diagnostiske arbejde fra og med 2019, hvor der har været intenst fokus på mastitis. Før 2019 var fejldiagnoserne så forskellige, at det var nærmest umuligt at give en sammenhængende analyse af hvad der kunne forårsage fejlene. I 2019 og 2020 ser det helt anderledes ud. Diagnostikken er i den grad kommet meget tættere på det korrekte svar hos langt de fleste deltagere. Selvom der stadig er fejl, kan man derfor se det som at arbejdet hen mod (fejl)diagnosen er blevet langt mere systematisk og kvalificeret, idet de fleste når frem til en relevant differentialdiagnose.

I Mastitisringtest2021 har der været fokus på almindeligt forekommende mastitispatogener. Mastitisringtest2021 har således igen i år haft den daglige rutinediagnostik som udgangspunkt. Der er udelukkende anvendt patogener, som er indsendt til DTU i perioden 2016 - 2021 fra danske kvægpraksis i forbindelse med mastitis, eller indsamlet til DTU fra danske kvægbesætninger i forbindelse med forskningsprojekter omhandlende mastitis. Udvalget af patogener i Ringtesten er sammensat så det afspejler fordelingen af mastitispatogener i DK bedst muligt. Ringtesten er dermed baseret på relevante og repræsentative patogener.

I det følgende bringes et sammendrag af resultaterne fra Mastitisringtest2021 med hovedvægt på problemstillinger der har haft generel karakter blandt årets deltagere.

Procedure ang. ringtest

I Mastitisringtest2021 er der medsendt en ID-nøgle. ID-nøglen til Ringtesten opdateres løbende og kan derfor afvige fra tidligere års ringtestmateriale. Det skyldes, at der i disse år opbygges et mere og mere nuanceret indblik i mastitispatogenernes biologi. Dette indblik har vist, at de tidligere klassifikationsmodeller er for simple til at guide dyrlæger efter den viden vi har i dag. Der er simpelthen for mange "undtagelser" (biologisk variation) til at det giver mening at udfylde enorme og komplekse flowdiagrammer/skemaer. Det kan derfor virke omvendt, at ID-nøglen er forsimplet gennem årene. Pointen med den forsimplede ID-nøgle er, at Ringtesten nu kun sigter mod at guide brugerne til den rigtige patogenkategori, og ikke nødvendigvis til den fuldkomne mikrobiologiske diagnose. Den ændrede ID-nøgle afspejler dermed erkendelsen af, at mange diagnoser slet ikke kan stilles specifikt under praksisforhold. Et eksempel kan være koagulase-negative Stafylokokker som i dag kaldes non-aureus Stafylokokker (NAS). Disse blev tidligere betegnet som CNS. Non-aureus Stafylokokker kan ikke adskilles med sikkerhed selv hvis alle de anbefalede biokemiske tests udføres korrekt. Klinikker som ønsker at udvide deres sortiment af biokemiske tests vil i nogle, men ikke alle tilfælde, kunne opnå flere akkurate diagnoser. Ligeledes kan der være problemer med at skelne Streptokok-gruppen. Et eksempel kan være at supplere testene i ID-nøglen med et streptokok-grupperingskit. Dette vil give en mere sikker diagnostik inden for mange streptokokker, men fx ikke sikre diagnostik af *S. uberis*, da netop denne streptokok ikke kan klassificeres indenfor Lancefields streptokok-grupper. Da Ringtesten er et fælles nationalt værktøj afspejler den et minimumsniveau af biokemiske tests, der skal til for at opnå en tilstrækkelig rutinediagnostik. Der vil derfor altid være diagnoser, som ikke kan stilles med sikkerhed vha. biokemiske analyser – uanset om man holder sig til ringtestniveauet eller udvider sin rutinediagnostik til at omfatte flere tests. Derfor hensigten med Ringtesten, at man i veterinær praksis skal betragte sin mikrobiologiske diagnostik som en screening. Ved screening forstås, at man kan identificere visse grupper af bakterier med rimelig sikkerhed – under forudsætning af at man som minimum følger ringtestens analyseskema systematisk. Samt, men lige så vigtigt, at man kan identificere den gruppe af patogener, som man *ikke* kan stille

diagnostik på med rimelig sikkerhed. En sådan screening sikrer kvalitetsniveauet på de fleste dagligdags diagnoser, og sikrer samtidigt, at dyrlæge og landmand sammen kan træffe beslutning om og hvad der skal foretages med prøver, der ikke kan diagnosticeres tilstrækkeligt i praksis.

For at opnå korrekt diagnostik er ID-nøglen ikke kun forsimplet, men også siden 2019 stillet op i ændret rækkefølge. Ved at følge testene fra venstre mod højre opnås den bedst mulig udelukkelsesmetode. Det anbefales derfor, at man som minimum altid udfører *alle* relevante tests og i skemaets rækkefølge.

Penicillinagar er udeladt af ID-nøglen idet brug af denne agar helt frarådes. Penicillinagar kan ikke anvendes til resistensbestemmelse. Derudover kan de biokemiske forskelle, der kan ses på agaren, ikke skelne de relevante differentialdiagnoser ad. Som eksempel kan en *S. uberis* have så høj tolerance over for penicillin, at den godt kan vokse frem på penicillinagar, selvom den ikke er resistent. Da både *S. uberis* og Enterokokker er æskulinspaltende vil de derfor ikke med sikkerhed kunne skelnes fra hinanden på penicillinagaren. Det kan fx føre til at en *S. uberis* diagnosticeres som en Enterokok, og dermed potentielt føre til penicillinbehandling mod en *S. uberis* der burde have været undladt grundet intermediaær følsomhed over for penicillin, og deraf følgende risiko for at øge resistensudviklingen yderligere hos den fejldiagnosticerede *S. uberis*.

Som det fremgår af resultaterne senere i denne rapport, er det et særdeles relevant eksempel, idet *Enterococcus* sp. er den hyppigste fejldiagnose til *S. uberis* både i sidste års Ringtest og Mastitisringtest2021, og da resistensundersøgelserne på en intermediaær *S. uberis* i Mastitisringtest2021 tilsvarende viser omfattende tendens til at overse den øgede penicillintolerance hos dette væsentlige mastitispato-gen.

Samlet omfatter Mastitisringtest2021 to dele: 15 spikede mælkeprøver til patogenbestemmelse, samt 5 spikede mælkeprøver med forud oplyst patogen til resistensbestemmelse.

Deltagere

I Mastitisringtest2021 var der fire krav der skulle opfyldes for at opnå bedømmelse:

1. Personlig tilmelding samt tilsvarende personligt navn på besvarelsen
2. Angivelse af svar til bedømmelse i feltet "samlet diagnose"
3. Angivelse af metode til resistensbestemmelse

4. Angivelse af svar via skabelonens rullemenu

Kravene samt årsagerne til disse blev oplyst i det informationsmateriale, som blev fremsendt både før og under ringtesten, og fremgik desuden af selve skabelonen til besvarelserne. Det sidste krav for at opnå bedømmelse – Angivelse af svar via skabelonens rullemenu- er indført da dataopgørelsen ikke kan forgå elektronisk, hvis deltagerne staver diagnoserne forskelligt og/eller selv opfinder diagnoser. Forskellige stavemåder mm. nødvendiggør derfor omfattende manuel databehandling, hvilket både forsinker og fordyrer arbejdet med ringtestrapporten unødvendigt.

Procedure

Resultaterne blev indrapporteret via mail til benon.dtu.dk

Der blev gentagne gange, både forud for og under selve ringtesten, fremsendt information om kravene til korrekt besvarelse af ringtesten, samt deadline og procedure for indsendelse af svar. Som nyt i Mastitisringtest2021 blev deltagerinformation og procedure sendt til hver enkelte deltager som PDF-dokument, indeholdende vigtige datoer og eksempler på hvordan skema for bakterieidentifikation og resistensundersøgelse udfyldes korrekt.

Svarmuligheder

Ved indtastning af resultater i svararket var der fire alternative svarmuligheder frem for en renkulturs patogen-identifikation: "Forurenede (over to patogentyper)", "Kombineret prøve (to patogentyper)", "Dyrkningsnegativ" og "Sendes til udvidet diagnostik". De fire svarmuligheder tolkes i resultaterne som hhv.:

"Forurenede (over to patogentyper i mælkeprøven)":

Prøven er ikke egnet til diagnostik. I forurenede prøver kan man ikke med sikkerhed fastslå, hvilke(t) patogen(er) som er årsag til koens sygdom fordi: 1) Flere af patogenerne i prøven kan være sygdomsfremkaldende. 2) Den dominerende patogentype kan ikke altid identificeres ved forurening. 3) Selv hvis en dominerende patogentype kan identificeres, kan patogenerne have forskellig vækst så én dominerer på dag 1, mens en anden dominerer på dag 2 osv. 4) Selv hvis den ene type patogen dominerer over de andre, kan patogenerne have forskellig virulens. Samlet set kan det derfor ikke med sikkerhed afgøres, hvad koen er syg af. Derfor er der fastsat en

international definition på at mælkeprøver med mere end to typer patogener anses som forurenede og bør tages om.

”Kombineret (to patogentyper i mælkeprøven)”:

Det er meget almindeligt at mælkeprøver fra mastitiskøer indeholder to forskellige patogener. Derfor er det helt centralt at diagnostikken altid omfatter identifikation af *begge* typer. Her gælder det ligeledes, 1) begge patogenerne i prøven kan være sygdomsfremkaldende. 2) Selv hvis en dominerende patogentype kan identificeres, kan patogenerne have forskellig vækst så én dominerer på dag 1, mens en anden dominerer på dag 2. Selv hvis det ene type patogen dominerer i forhold til den anden, kan patogenerne have forskellig virulens. Samlet set kan det derfor ske at koen bliver behandlet for kun den ene patogen, hvis man ikke har undersøgt hvilket patogen den anden mikroorganisme er i den kombineret prøve. I sådan et tilfælde vil det derfor ikke med sikkerhed kunne afgøres hvilken sygdomsfremkaldende bakterie koen er syg af. Derfor er der fastsat en international definition på at mælkeprøver maksimalt må indeholde to typer patogener og prøver med mere end to typer patogener anses som forurenede og bør tages om.

”Dyrkningsnegativ”:

Prøven var dyrkningsnegativ ved 48-timers dyrkning under kvalitetssikrede dyrkningsforhold. Det skal dog nævnes at ikke alle mikroorganismer kan dyrkes i rutine

”Sendes til udvidet diagnostik”:

Prøvens indhold kunne ikke identificeres med rimelig sikkerhed efter systematisk udførelse af samtlige tests angivet i den fremsendte ID-nøgle ved både 24 og 48 t dyrkning.

En sådan prøve skal sendes til molekylær diagnostik på et akkrediteret laboratorium, hvis der skal opnås sikkert mikrobiologisk svar.

For den enkelte deltager kan det variere hvornår man træffer det valg til hverdag. Men for at kunne vurdere ringtestdeltagerne ens, er rammerne for ringtesten sådan, at man kun får korrekt svar for at angive "Samlet diagnose" som "Sendes til udvidet diagnostik", i de tilfælde, hvor man ikke ville kunne stille diagnosen ved at gennemføre de tests, der er anført på ID-skemaet. Det er

dermed altid bedst at lade tvivlen råde, og dermed i virkeligheden aldrig forkert at sende til udvidet diagnostik, tvært imod, men i forhold til ringtestbesvarelsene er der nødt til at være et fælles bedømmelseskriterie, således at man ikke kan undgå fejl i bedømmelsen ved blot at angive svar som ”sendes til udvidet diagnostik”.

Et eksempel på hvornår svaret ”Sendes til udvidet diagnostik” er anvendt korrekt i ringtesten kan være en bakterie, der ikke findes tilgængelige rutinediagnostiske tests til fx *Aerococcus viridans*. Et andet eksempel kan være en bakterie, som har et problematisk differentialdiagnostisk potentiale, det kunne være en *Stafylococcus pseudintermedius* i en besætning, som ønsker at sanere for *S. aureus*. I et sådant tilfælde vil det være nødvendigt at differentiere mellem gruppen af koagulase-positive stafylokokker, i stedet for at karakterisere dem alle som *S. aureus*, idet der ved mangel på denne skelnen kan udsættes forkerte køer. Ringtesten sammensættes derfor, så den afspejler, at der både findes bakterier, som det altid er nødvendigt at referere til specialiserede laboratorier, fordi de ikke *kan* diagnosticeres under praksisforhold, samt bakterier, hvor det afhænger af landmandens ønsker samt lovkravene, om situationen kan bedømmes uden specifik diagnostik, eller om en endelig identifikation er nødvendig for til/fravalg af antibiotika, slagtning, saneringsprotokol mm.

Bedømmelse

Point og rigtigt/forkert svar:

Besvarelsene i Mastitisringtest2021 bliver ikke kun bedømt som rigtigt/forkert. Der tildeles desuden point for svarenes nøjagtighed. Et fuldt og korrekt svar giver 2 point. Et svar der er korrekt, men kunne være stillet mere præcist inden for ID-nøglen, giver kun 1 point. Det gælder fx hvis man anvender genus-diagnosen *Streptococcus* sp., når der er tale om en kritisk streptokok, herunder *S. uberis*, *S. agalactiae* og *S. dysgalactiae*. I kombinerede prøver hvor kun den ene agens er identificeret tildeles ikke point.

I delen omhandlende resistensbedømmelsen bliver bedømt rigtigt/forkert i dette års ringtest.

Hvis en følsom prøve identificeres som intermediær, eller hvis en intermediær prøve identificeres som resistent vil man i disse to tilfælde, overvurdere resistensen. Da prøver med nedsat følsomhed (intermediære) eller decideret resistens, altid bør verificeres på et laboratorium der anvender kvalitetssikrede MIC-undersøgelser, bør disse to fejl derfor kun medføre, at man får undersøgt sit patogen igen. Altså vil konsekvenserne af at overvurdere

resistensniveauet være, at man arbejder videre ud fra et forsigtighedsprincip. Dermed er konsekvenserne af at overvurdere resistens ikke så store, som konsekvenserne af at undervurdere resistensforekomsten - forudsat at man agerer ansvarligt på alle mistanker om øget tolerance/resistens.

I tilfælde hvor man derimod undervurderer resistensen, vil denne type fejl vil have den potentielt værste konsekvens, fordi den ikke fører til yderligere verificering af resultatet, og dermed fører til at resistensen overses, og dermed både fejlbehandles, fejlregistreres og at resistenstrykket øges yderligere mod netop det pågældende patogen.

Resultater - identifikation

Resultaterne er opgjort i to underafsnit: Patogenidentifikationer og resistensbestemmelse, hvor resistensbestemmelsen indgår som et tilvalg for de laboratorer som rutinemæssigt udfører undersøgelsen.

Patogenidentifikationerne er opgjort i yderligere to underafsnit: Først et identifikationsafsnit, som omhandler de korrekte identifikationer af prøverne. De korrekte identifikationer anvendes til at vurdere ringtestdeltagernes præstationer både samlet og individuelt. Dernæst følger et fejlkildeafsnit, som omhandler mulige forklaringer på, hvorfor nogle prøver har forårsaget generelle problemer. Fejlkildeafsnittet anvendes til at vurdere hvilke patogener, som er forbundet med et generelt mangelfuldt diagnostisk niveau, og til at identificere mulige forklaringer på, hvorfor diagnostikken er mangelfuld for netop disse patogener. Samlet kan man derfor anvende patogenidentifikationen til at vurdere henholdsvis, hvordan det diagnostiske niveau er blandt deltagerne, og hvilke patogener der er årsag til de mest udbredte diagnostiske problemer – samt forslag til hvorfor.

Patogenidentifikation

Fordelingen af de korrekte identifikationer anvendes primært til at vurdere det diagnostiske niveau hos den enkelte deltager og generelt for årets ringtest. Fordelingen af korrekte identifikationer defineres som vist i Tabel 1.

Tabel 1. Definitioner for inddeling af korrekte identifikationer

IDENTIFIKATIONSKODE	DEFINITION
Alle korrekte	15/15 prøver korrekt identificeret
Mange korrekte	12 – 14 prøver korrekt identificeret
Hovedsageligt korrekte	9 – 11 prøver korrekt identificeret
Hovedsageligt ukorrekte	0 – 8 prøver korrekt identificeret

I Mastitisringtest2021 var der ingen deltagere som havde identificeret alle patogener korrekt. I Mastitisringtest2021 var det gennemsnitlige antal korrekte patogenidentifikationer 9,9 ud af 15, og det gennemsnitlige antal patogenidentifikationspoint var 20,3 ud af 30 (Tabel 4).

Seks deltagere (18,8%) havde mange korrekte identifikationer, og 21 (65,6%) havde hovedsageligt korrekte identifikationer. Dermed følger dette års præstationen samme mønster som i 2020, hvor en væsentligt større andel af deltagerne systematisk har ligget mellem 12-14 korrekte ud af 15 mulige dvs. ”mange korrekte” (Tabel 2).

I 2021 havde fem deltagere (15,6%) hovedsageligt ukorrekte identifikationer, hvilket er en stigning fra sidste år men nogenlunde på niveau med tidligere ringtestsår. Samlet er det generelle niveau i Mastitisringtest2021 dermed, at antallet af top-og bundpræstationer er nogenlunde som i tidligere år, mens præstationsniveauet for ”mange korrekte” er steget markant med en tilsvarende fald i antallet af ”hovedsageligt korrekte” besvarelser.

Tabel 2 Fordeling af antal korrekte identifikationer i ringtest 2014-2021 opgjort i procent.

Fordeling af antal korrekte identifikationer i ringtest 2014-2021 i %	2014	2016	2017	2019	2020	2021
Antal besvarelser	54	39	45	28	20	32
Alle korrekte	7,5%	10,5%	4,4%	7,1%	5%	0
Mange korrekte	46,6%	64,1%	33,3%	39,3%	10%	18,8%
Hovedsagelig korrekte	37%	23,1%	40%	39,3%	75%	65,6%
Hovedsagelig ukorrekte	14,8%	7,6%	22,2%	14,3%	10%	15,6%

Inddelingen er baseret på, at det vurderes som hovedsagelig ukorrekt hvis under halvdelen af patogenerne er identificeret korrekt.

Tabel 3 Pointinddeling for patogenidentifikation

Point	Definition
2	Korrekt diagnose med maksimal præcision indenfor ID-nøglen
1	Korrekt diagnose med submaximal præcision indenfor ID-nøglen
0	Forkert diagnose

Tabel 4 Fordeling for patogenidentifikationer i Mastitisringtest2021

Point	Antal deltagere
Over Gennemsnit	10
Gennemsnit	0
Under Gennemsnit	22

Det gennemsnitlige antal patogenidentifikationspoint var 20,3 ud af 30 mulige

Identifikation af fejlkilder

Identifikationen af fejlkilder anvendes primært til at udpege hvilke patogener, som forårsager systematiske diagnostiske problemer, og give mulige forklaringer på dette. Afsnittet gennemgår derfor både generelle tendenser ved fejlidentifikationerne, samt en nærmere analyse af specifikke patogener, som udløste systematiske fejlidentifikationer. Afsnittet omhandler ikke patogener, som kun blev sporadisk fejlidentificeret. Fejlidentifikationerne opgøres procentvist og defineres som vist i Tabel 7

Tabel 5. Fejlidentifikationsprocenten opgjort pr. deltager

Fejlidentifikationskode	Antal deltagere
Ingen fejl	Den samlede fejlprocent for prøven er nul
Få fejl	Den samlede fejlprocent for prøven er over 0 men under 15
Moderat antal fejl	Den samlede fejlprocent for prøven er mellem 15 – 50
Mange fejl	Den samlede fejlprocent for prøven er over 50

Generelle tendenser

Fejlidentifikationsprocenten er opgjort for de i alt 32 deltagere, som har indleveret systematisk korrekt udfyldt besvarelse på patogenidentifikationsdelen af ringtesten. Størstedelen af deltagerene (90,6%) ligger i intervallet ”moderate antal fejl” (15-50%), Tabel 6. I Tabel 7 ses en oversigt over hvilke bakterier som bliver fejlidentificeret.

Tabel 6. Fordelingen af prøver indenfor fejlidentifikationskoderne

Fejlidentifikationskode	Antal deltagere
Ingen fejl	0
Få fejl	1
Moderat antal fejl	29
Mange fejl	2

Bakterier der udløste systematiske fejlidentifikationer

De 5 patogener/prøver, som især udløser diagnostiske problemer i 2021 er: *Pastaurella multocida*, kombinationsprøven af *Proteus* sp. og Non aureus-stafylokokker samt *Mikrococcus luteus*. Desuden volder især skelnen mellem hæmolytisk og non-hæmolytisk *E. coli*. Der er ikke nogen fællesnævner for de 5 prøver, da de repræsenterer både almindelige og mindre almindelige mastitispatogener, samt både Gram-positive og Gram-negative patogener.

Det er dog væsentligt at understrege i forhold til den kombinerede prøve (#4), at netop kombinerede prøver er et område indenfor mastitisdiagnostikken, som kræver stor bevågenhed. Det skyldes, at et meget højt antal prøver fra både klinisk og subklinisk mastitis indeholder to forskellige patogener. Hvis man kun stiller diagnose på det ene, kan man derfor reelt ikke afgøre følgende:

- Er prøven en renkultur, en kombineret prøve (2 patogener) eller forurenede? For man undersøger jo ikke de forskellige patogener der er til stede, men kun det ene, og har derfor ingen evidens for, om der reelt er ét, to eller flere forskellige patogener til stede. Altså kan man ikke skille prøver der er egnede til diagnostik fra dem der ikke er (renkultur + kombineret prøve vs forurenede prøver)! Ved kun at stille diagnose på ét patogen, når der vitterligt er flere forskellige tilstede, risikerer man dermed at overse forurening, og dermed i yderste konsekvens stille diagnose på- og behandle ud fra, at koens yver er beskidt
- Hvad er de(t) relevant(e) patogen(er)? Hvis man kun stiller diagnose på det ene ud af flere patogener kan man selvsagt ikke afgøre, om det patogen man ikke stiller diagnose på er lige så væsentligt.

- I den kombinerede prøve i Mastitisringtest2021 var det således et normalvoksende patogen med synlig kolonimorfologi, *Staphylococcus chromogenes*, som reelt er det mest sandsynlige sygdomsvoldende patogen i prøven. Det andet patogen, *Proteus mirabilis* vokser meget hurtigt frem og danner i løbet af kort tid sværm som overvokser agarpladen. Begge patogener kan dog forårsage mastitis. Derfor kan man reelt ikke afgøre sygdomsårsagen i denne prøve, idet sygdomme kan skyldes begge patogener hver især eller dem kombinationen af dem. Følger man internationale anbefalinger, bør der udtages en ny mælkeprøve før der træffes behandlingsvalg/stilles endegyldig diagnose i et sådant tilfælde. Det udelukker stadig ikke, at sygdommen reelt er udløst af begge patogener, men det er den eneste måde at målrette sit behandlingsvalg på. Selvom man eventuelt identificerer det ene patogen korrekt, vil en renkulturs-diagnose derfor være forkert og med stor sandsynlighed misvisende i forhold til behandling og/eller rådgivning. Selvom en del af fejlidentifikationerne på den kombinerede prøve #4 faktisk var på rette spor, idet mange identificerede det ene af de to patogener, er det derfor alligevel bekymrende, at netop den kombinerede prøve er en af dem der udløser suverænt flest fejl, nemlig hos 25 ud af 32 deltagere svarende til 78% i Mastitisringtest2021. Ligeledes med en fejlidentifikation på 78% volder prøve #2 med den gram negative *Pasteurella multocida* og prøve #13 med den gram positive *Micrococcus luteus* store problemer.

Tabel 7. Fejlidentifikationer

Prøve	Forventet fund	Forkerte	Forkert identifikation
1	<i>Klebsiella sp. (Klebsiella pneumoniae)</i>	0%	n=0
2	<i>Pasteurella sp. (Pasteurella multocida)</i>	81,3 %	n=26 Dyrkningsnegativ (n=9), <i>Klebsiella sp.</i> (n=3), <i>Streptococcus sp.</i> + <i>E. coli</i> hæm (n=1)) <i>Micrococcus luteus</i> (n=3) NAS

			(n=2), Stafylococcus hyicus (n=2) Streptococcus sp. (n=2), Alge (n=1), Forurennet (n=1), Lactococcus sp (n=1), Pseudomonas aeruginosa (n=1)
3	<i>Proteus sp. (Proteus mirabilis)</i>	9,3%	n=3 E. coli + Proteus sp. (n=2), NAS+ Proteus (n=1)
4	<i>Proteus sp. + Non-aureus stafylokok (Proteus mirabilis + Staphylococcus chromogenes)</i>	78.1	n=25 Proteus sp. (n=12), Proteus sp. + Micrococcus sp. (n=3, NAS (n=3), Proteus sp. + Staphylococcus aureus (n=2), Proteus sp. +Streptococcus sp. (n=1), Forurennet (n=1) Proteus sp. + Pseudomonas aeruginosa(n=1), Pseudomonas aeruginosa (n=1) Udviddet diagnostic (n=1)
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18,8%	n=6 Staphylococcus aureus (n=2), Pseudomonas aeruginosa + Pataurella sp. (n=1) Pasteurella sp. (n=1), Corynebacterium sp. (n=1), Udviddet diagnostic (n=1)
6	<i>Staphylococcus aureus (non-hæm)</i>	31,3%	n=10 NAS (n=10), Micrococcus luteus (n=2), Pasteurella sp. (n=1), Staphylococcus haemolyticus + Stapylococcus aureus (n=3)
7	<i>Micrococcus luteus</i>	78,1%	n=25

			NAS (n = 7), Corynebacterium sp. (n=7), Mikrococcus luteus + Corynebacterium sp. n=(4), Corynebacterium sp + NAS (n=3), Stapylococcus haemolyticus (n= 1), Corynebacterium sp. + Gær (n=1), NAS + Streptococcus sp (n=1), NAS + Streptococcus agalactiae (n=1)
8	<i>Streptococcus uberis</i>	21,9%	n=7 Enterococcus sp. (n=5), Pseudomonas aeruginosa + Streptococcus uberis (n=1), Streptococcus uberis + Enterococcus sp.
9	Escherichia coli (non hæm)	18,8%	n=6 E. coli hæm (n=5), E. coli non-hæm + Gær (n=1)
10	<i>Escherichia coli</i> (hæm)	37,5%	n=12 E. coli non hæm (n=11), Udvidet diagnostik/listeria sp. (n=1)
11	<i>Streptococcus agalactiae</i>	18,8%	n=6 Streptococcus sp. (n=4), Streptococcus agalactiae + E. coli (n=1), Corynebacterium sp. (n=1)
12	Dyrkningsnegativ	9,4%	n=3. E. coli (n=1), E. coli + Staphylococcus aureus (n=1), NAS (n=1)
13	Gær (<i>Candida tropicalis</i>)	31,3%	n=10 Alge (n=4), Alge+Gær (n=2) Gær + E. coli non hæm (n=1), Gær+NAS (n=1), 2x gær (n=1), S. aureus +NAS (n=1)
14	Non-aureus staphyloccus (<i>Staphylococcus sciuri</i>)	50,0%	n=16

			Enterococcus sp. (n=10), Klebsiella sp. (n=1), NAS + Streptococcus uberis (n=2), Streptococcus uberis (n=1), Micrococcus luteus (n=2)
15	<i>Serratia marcescens</i>	31,3%	n=10 Klebsiella sp. (n=6), Enterococcus sp. (n=1), Citrobacter sp. (n=1), E. coli + Klebsiella sp. (1), Kombi prøve (n=1)

Konklusion

Overordnet viser resultatet af Mastitisringtest2021 at:

1. Deltagerantallet i Mastitisringtest2021 har vist en lille fremgang i forhold til antallet i 2020, hvor det var historisk lavt.
2. Den repræsentative værdi af testresultaterne er som i Ringtest2020 lav, idet ringtestbesvarelserne tilsammen udgør en ret begrænset delmængde af det samlede antal praktiserende kvægdyrlæger i Danmark.
3. Det diagnostiske niveau er forbedret på den måde, at fejldiagnoserne tydeligt viser at diagnostikken er blevet mere målrettet og kvalitetssikret, end i 2017 og tidligere år.
4. Det diagnostiske niveau er fortsat præget af, at der er mange patogener som udløser mange fejl, og mange deltagere som hver især har mange fejl.
5. De mange fejlindikationer ses også på patogener, som er gået igen i flere års ringtest og kan dermed ikke forklares af en særligt vanskelig test i 2021.
6. Nogle af de patogener, som udløser flest fejl, er blandt de absolut mest almindelige mastitispatogener.
7. Udover selve patogenerne, er den meget almindelige problemstilling med to relevante patogener i én mælkeprøve også noget af det som udløser flest fejl blandt ringtestdeltagerne.

8. Samlet set er *typen* af fejl i patogenidentifikationer derfor blevet kraftigt forbedrede, idet fejldiagnoserne nu og sidste år (Ringtest 2020), modsat Ringtest 2017 og tidligere, afspejler relevante differentialdiagnoser. Men selve *antallet* af fejldiagnoser er fortsat højt og uden tegn på faldende tendenser hverken siden sidste år eller generelt over ringtestårene.
9. Informationsmaterialet Mastitisringtest2021, som blev udsendt kort inden ringtestprøverne, med eksempler på hvordan skemaerne skulle udfyldes korrekt har vist sig at fungere fint. Dette betyder at næsten alle deltageres identifikationsresultater kan indgå i datamaterialet.

Ringtesten udgør det eneste fælles hjælpemiddel for alle praktiserende kvægdyrlæger i Danmark til at få:

1. Vurderet deres diagnostiske kompetencer på en fælles målestok
2. Identificeret specifikke diagnostiske problemer i den enkelte klinik
3. Skabt overblik over det landsdækkende diagnostiske niveau inden for aktuelle mastitispatogener

Ringtesten er derfor et unikt redskab for kvægdyrlæger til at udføre egenkontrol af deres mastisisdiagnostik. Der skal derfor lyde en stor opfordring til at flere tilmelder sig ringtesten – herunder anbefales det, at flere dyrlæger pr. klinik tilmelder sig, da det vil give et mere nuanceret resultat for den enkelte klinik at arbejde videre med.

Resistensbestemmelse

Foruden identifikationen af patogener inkluderede Mastitisringtest2021 resistensbestemmelse over for penicillin. Diagnosen på de 5 prøver til resistensbestemmelse blev forud oplyst.

I Mastitisringtest2021 havde 21 ud af 32 tilmeldte deltagere korrekt besvaret resistensbestemmelsen helt eller delvist og 8 havde ikke registreret hvilken metode der blev brugt til resistensbestemmelsen samt 3 havde på forhånd valgt ikke at deltage i resistensbestemmelsen.

Ringtestrapporten er ikke en lærebog i resistensbestemmelse, men udelukkende en evaluering af det årlige præ-stationsniveau blandt deltagerne. En uddybende gennemgang af resistensbestemmelsesmetoder ligger derfor uden for rammerne af rapporten. Det er til enhver tid dyrlægens eget ansvar at sikre, at der anvendes relevante og kvalitetssikrede metoder i praksis. Den følgende tekst har derfor udelukkende til formål at henlede deltagernes opmærksomhed på en række generelle forhold man skal være opmærksom på, når man udfører resistensbestemmelse.

Antibiotikaresistens er defineret af WHO som "Forandringer i bakterier som gør en hidtil virksom behandling uvirksom". Resistensbestemmelse baserer sig derfor på hvor meget antibiotika en bakterie kan tolerere og fortsat vokse/overleve. For at skelne følsomme fra resistente bakterier er der fastsat tærskelværdier for hver type bakterie mod hver type antibiotika. En tærskelværdi (cut-off) er derfor fastsat for en given koncentration af både antibiotika og bakterie. Resistensbestemmelse er derfor ikke en universel test af en tilfældig mængde af en bakterie mod en tilfældig mængde af et antibiotikum! Denne pointe er helt fundamental for al resistensbestemmelse, og heraf følger kvalitetssikringskravene til de metoder, der anvendes til resistensbestemmelse, nemlig at: For at udføre en korrekt resistensbestemmelse skal der være de korrekte forhold mellem både 1) typen af bakterie og typen af antibiotikum samt 2) koncentrationen af antibiotika og koncentrationen af bakterien samt 3) dyrkningsforholdene generelt, idet disse udover antibiotikummet også påvirker bakteriernes vækstforhold, og dermed det samlede resultat for resistensbedømmelsen.

Som følge af ovennævnte kan man udelukkende udføre korrekt resistensbestemmelse med metoder, hvor både dyrkningsforhold samt bakteriekoncentration og antibiotikakoncentration

svarer til de niveauer, der skal til for at undersøge, om den givne udgave af bakterien ligger under, mellem eller over tærskelværdien for resistent, for det givne antibiotikum.

Der findes to metoder som opfylder disse krav: Disk-diffusion og MIC-bestemmelse, dog med visse væsentlige forbehold, herunder især at der for nuværende ikke er fastsat cut-off for alle relevante kombinationer af bakterie + antibiotikum, for begge metoder. I forbindelse med Mastitisringtest2021 har der ikke været ko-relevante antibiotikapaneller tilgængelige idet sådanne paneller for nuværende er under udvikling jf. et samarbejdsprojekt mellem DTU-Yversundhedscenteret og SEGES. Disse antibiotikapaneller ventes først at være i handlen i løbet af 2022.

Erfaringen fra tidligere års ringtestdeltagere og ligeledes i Mastitisringtest2021 viser, at nogle praksis fejlagtigt anvender penicillinagar eller genetiske markører til resistensbestemmelse. Deltagerne opfordres til altid at sikre, at den metode de vælger at anvende, kan udføres kvalitetssikret. Med kvalitetssikring menes, at metoden både kan udføres på en måde som sikrer reproducerbare resultater, og som sikrer, at resultaterne kan tolkes i forhold til det relevante cut-off. Helt kort gælder for både penicillinagar og genetiske resistensmarkører, at de *ikke* kan oversættes direkte til officielle resistens-cut-offs. Derfor kan ingen af de to metoder betragtes som korrekt, fyldestgørende resistensbestemmelse.

Ansvaret for ethvert metodevalg samt fortolkningen af metodens resultater påhviler til en hver tid den dyrlæge, der vælger at anvende metoden.

[Resultater - resistensbestemmelse](#)

Som et krav for at få bedømt sin resistensbestemmelse, skulle man i Mastitisringtest2021 angive sin resistensbestemmelsesmetode. Besvarelserne med metodevalg er opgjort i Tabel 10 og resultaterne af metodevalget ses i Tabel 11.

Tabel 8. Deltagernes valg af metode til resistensbestemmelse

Metode	Antal deltagere	Kommentar
MIC bestemmelse	1	Metode kan gennemføres i overensstemmelse med internationale anbefalinger
Disk-diffusions test	7	Metode kan gennemføres i overensstemmelse med internationale anbefalinger, men mange relevante cut-offs mangler, herunder cut-off for penicillin for mange af de almindeligste mastitispatogener
Penicillinagar, 0,1%	11	Metode kan ikke gennemføres i overensstemmelse med internationale anbefalinger
Penicillinagar, 1,0%	0	Metode kan ikke gennemføres i overensstemmelse med internationale anbefalinger
Penicillinagar, 0,1% og 1,0%	2	Metode kan ikke gennemføres i overensstemmelse med internationale anbefalinger
Penicillinagar, samlet	13	Metode kan ikke gennemføres i overensstemmelse med internationale anbefalinger
PCR	0	Metode kan ikke gennemføres i overensstemmelse med internationale anbefalinger

Tabel 9. Resistensbesvarelse

Resistens bestemmelse		Penicillin 0.1%			Penicillin 10%			Diskdiffusion			MIC bestemmelse			
	Bakterie	Følsomhed	Svar	Sand	Falsk	Svar	Sand	Falsk	Svar	Sand	Falsk	Svar	Sand	Falsk
#16	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pen ^{Resistent}	11	5	6	2	0	2	7	6	1	1	1	0
#17	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pen ^{Følsom}	11	11	0	2	2	0	7	6	1	1	1	0
#18	<i>Streptococcus uberis</i>	Pen ^{Følsom}	11	11	0	2	2	0	7	5	2	1	1	0
#19	<i>Streptococcus uberis</i>	Pen ^{intermediær}	11	0	11	2	0	2	7	2	5	1	1	0
#20	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Pen ^{Følsom}	11	11	0	2	2	0	7	7	0	1	1	0

Over eller undervurdering af resistens

Valg af testmetode

Ved brug af penicillinagar 0.1% ses tydelige problemer med at bestemme følsomheden overfor penicillin. Den penicillinresistente *Staphylococcus aureus*, #16, blev i 54,5% af tilfældene besvaret som følsom og den intermediære penicillinfølsomme *Streptococcus uberis*, #19, blev besvaret i over halvdelen (54,5%) af tilfældene som resistent og 45,5% som følsom.

Ved brug af penicillinagar 10% ses 100% fejl diagnostik for penicillinresistente *S.aureus* som aflæses fejlagtigt som følsom. Ligeledes er her problemer med den intermediære *S. uberis*, #19, som aflæses som følsom.

I tilfældene hvor diskdiffusion blev brugt til resistensbestemmelsen ses ingen udfordringer med den penicillinresistente *S. aureus* men problemer med den intermediære *S. uberis*, #19, som i 71,4% af tilfældene bestemmes som følsom.

Ved brug af MIC-bestemmelse ses ikke udfordringer med de ringtestens resistensbestemmelse.

Konklusion

Dette års ringtest er sammensat af bakterier, som er blevet indsendt til DTU, Center for Diagnostik i forbindelse med mastitisforskning-og diagnostik i 2017-2021.

Overordnet viser resultatet af Mastitisringtest2021 at:

1. Deltagerantallet i Mastitisringtest2021 er identisk med antallet i 2020, og historisk lavt. Derudover ses en fremgang i antallet af korrekte udfyldt besvarelser, hvilket resulterer i at besvarelsesprocenten i 2021 er højere end i 2020.
2. Den repræsentative værdi af testresultaterne er lav, idet ringtestbesvarelserne tilsammen udgør en ret begrænset delmængde af det samlede antal praktiserende kvægdyrlæger i Danmark.
3. Det diagnostiske niveau er forbedret på den måde, at fejl-diagnoserne tydeligt viser at diagnostikken er blevet mere målrettet og kvalitetssikret, end i 2017 og tidligere år.
4. Det diagnostiske niveau er fortsat præget af, at der er mange patogener som udløser mange fejl, og mange deltagere som hver især har mange fejl.

5. De mange fejlindikationer ses også på patogener, som er gået igen i flere års ringtest og kan dermed ikke forklares af en særligt vanskelig test i 2021.
6. Nogle af de patogener, som udløser flest fejl, er blandt de absolut mest almindelige mastitispatogener.
7. Udover selve patogenerne, er den meget almindelige problemstilling med to relevante patogener i én mælkeprøve også noget af det som udløser flest fejl blandt ringtestdeltagerne.
8. Samlet set er *typen* af fejl i patogenidentifikationerne derfor blevet kraftigt forbedrede, idet fejldiagnoserne nu, modsat ringtest 2017 og tidligere, afspejler relevante differentialdiagnoser. Men selve *antallet* af fejldiagnoser er fortsat højt og uden tegn på faldende tendenser hverken siden sidste år eller generelt over ringtestårene.
9. Antallet af deltagere, som udfører resistensbestemmelser i overensstemmelse med internationale anbefalinger er overraskende lavt.
10. Der er udtalte problemer med både at overse resistens, samt at overvurdere resistens, endda på almindeligt forekommende mastitispatogener.
11. Antallet af deltagere, som udfører resistensbestemmelser i overensstemmelse med internationale anbefalinger er overraskende lavt.
12. Informationsmaterialet Mastitisringtest2021, som blev udsendt kort inden ringtestprøverne, med eksempler på hvordan skemaerne skulle udfyldes korrekt har vist sig at fungere fint. I resistensundersøgelsen var der dog ca. 25% som havde overset at resistensmetoden skulle oplyses, hvilket betyder at data ikke kan indgå i denne rapport. Derfor opfordres der til at deltagerne frem over følger ringtestinstrukserne, så ringtestrapporten kan baseres på så stort et datamateriale som muligt.

Ringtesten udgør det eneste fælles hjælpemiddel for alle praktiserende kvægdyrlæger i Danmark til at få:

1. Vurderet deres diagnostiske kompetencer på en fælles målestok
2. Identificeret specifikke diagnostiske problemer i den enkelte klinik

3. Skabt overblik over det landsdækkende diagnostiske niveau inden for aktuelle mastitispatogener

Ringtesten er derfor et unikt redskab for kvægdyrlæger til at udføre egenkontrol af deres mastitisdiagnostik. Der skal derfor lyde en stor opfordring til at flere tilmelder sig en ekstern kvalitetssikring som ringtesten – herunder anbefales det, at flere dyrlæger pr. klinik tilmelder sig ringtesten, da det vil give et mere nuanceret resultat for den enkelte klinik at arbejde videre med.