



Ringtest2020

Kvalitetssikring og egenkontrol af identifikation
og resistensbestemmelse af mastitispatogener i
Dk

Forfatter og ringtestansvarlig: Lærke Boye Astrup

Laboratiemedarbejdere: Bettina Nonnemann, Karina E. Lazarotti

Ringtest2020

Kvalitetssikring og egenkontrol af identifikation og resistensbestemmelse af mastitispatogener i Dk

AF

Dyrlæge, Ph.D., Specialkonsulent Lærke Boye Astrup¹, Postdoc Bettina Nonnemann¹ og laborant Karina E. Lazarotti¹

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 Lærke B. Astrup lboast@vet.dtu.dk

INDLEDNING

Formålet med mastitisringtesten 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 Fødevareinstituttet i samarbejde med Den Danske Dyrlægeforening og Videncenter for Landbrug, Kvæg. Siden 2016 udbydes ringtesten af DTU Veterinærinstituttet – nu kaldet Center for Diagnostik DTU SUND.

I Ringtest2020 har der været fokus på almindeligt forekommende mastitispatogener. Ringtesten har således igen i år haft den daglige rutinediagnostik som udgangspunkt. Der er udelukkende anvendt patogener, som er indsendt til DTU i 2016 - 2020 fra danske kvægpraksis i forbindelse med mastitis, eller indsamlet i DK i samme periode af DTU i forbindelse med forskningsprojekter om mastitis. Udvalget af patogener i ringtesten er sammensat så det afspejler fordelingen af mastitispatogener i DK bedst muligt. Ringtesten baseres dermed på relevante og repræsentative patogener.

I det følgende bringes et sammendrag af resultaterne fra Ringtest2020 med hovedvægt på problemstillinger der har haft generel karakter blandt årets deltagere.

PRAKTISK OM RINGTESTEN

STRUKTUR

I Ringtest2020 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 CNS (Koagulase-negative Stafylokokker), som ikke kan 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. 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 er hovedpointen 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 intermedier følsomhed over for penicillin, og deraf følgende risiko for at øge resistensudviklingen yderligere hos den fejl-diagnosticerede *S. uberis*. Som det fremgår af resultaterne senere i nærværende rapport, er det et særdeles relevant eksempel, idet *Enterococcus* sp. er den hyppigste fejl-diagnose til *S. uberis* i Ringtest2020, og da resistensundersøgelserne på en intermedier *S. uberis* i Ringtest2020 tilsvarende viser omfattende tendens til at overse den øgede penicillintolerance hos dette væsentlige mastitispatogen.

Samlet omfatter Ringtest2020 to dele: 15 spikede mælkeprøver til patogenbestemmelse, samt 5 spikede mælkeprøver med forud oplyst patogen til resistensbestemmelse.

DELTAGERE

I Ringtest2020 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. Desværre har mange ringtestdeltagere undladt at leve op til disse krav og kan derfor ikke indgå i det materiale, som ringtestrapporten opgør. Krav nr. 4 er dog fraveget, idet der var så mange deltagere, som selv indtastede svar i stedet for at anvende rullemenuen, at der stort set ikke ville være data til ringtestrapporten, hvis disse besvarelser blev udeladt. Fremover vil dette krav dog ikke kunne afviges, idet 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.

Ringtest2020 havde 34 tilmeldte, heraf 5 deltagere som enten ikke tilmeldte sig korrekt og/eller ikke indsendte besvarelse inden for deadline.

Samlet blev ringtesten dermed gennemført af 29 deltagere.

Ud af de 29 gennemførende deltagere, var der 2 kommercielle laboratorier og 27 danske praksislaboratorier.

Ud af de 29 gennemførende deltagere var der 3 som ikke angav navn på svararket, og som derfor udgår af bedømmelsen som "ikke-personlig besvarelse".

Samlet set var der således 26 deltagere som indgav personlig besvarelse og dermed modtog hel eller delvis bedømmelse. Begge kommercielle laboratorier var blandt de 26 bedømte besvarelser.

Deltagere bedømt for Patogenidentifikation

Blandt de 26 bedømte besvarelser var der 3 som kun havde angivet én eller få besvarelser som samlet diagnose. Herudover var der 3 andre deltagere blandt de 26 bedømte besvarelser, som slet ikke havde angivet besvarelser som samlet diagnose.

De 3 besvarelser, som havde benyttet den korrekte svarmulighed "samlet diagnose" men usystematisk, blev derfor bedømt og besvaret til den pågældende deltager, men kun med bedømmelse af de diagnoser, som var angivet korrekt (dvs. som samlet diagnose). De 3 deltagere, der helt havde udeladt at besvare korrekt modtog derimod individuelt svar om at deres patogenidentifikation ikke var bedømt grundet forkert svarangivelse.

Da svarangivelsen for alle 6 betragtes som fejlagtig, er de ikke medregnet i gennemsnittet for årets niveau af korrekte patogenidentifikationer. Således er det tilstræbt, at ringtestniveauet bedømmes ud fra den reelle patogenidentifikation, og ikke trækkes ned af deltagere, som enten helt eller langt overvejende, systematisk har afvejet fra instruksen om hvordan resultaterne skulle anføres.

Patogenidentifikationen i nærværende rapport er derfor opgjort for 20 deltagere.

Deltagere bedømt for resistensbestemmelse

Blandt de 26 bedømte besvarelser var der 7 deltagere, som ikke havde anført analyseteknik eller slet ikke havde angivet resistensbestemmelse. Disse 7 deltagere har derfor ikke modtaget bedømmelse for resistensbestemmelsen og er tilsvarende heller ikke medtaget i det opgjorte ringtestsniveau for dette.

Resistensbestemmelsen i nærværende rapport er derfor opgjort for 19 deltagere.

Ringtest2020 afspejler dermed et historisk lavt antal samlede bedømte besvarelser. I 2019 besvarede 28 deltagere patogenidentifikationen og 20 deltagere besvarede resistensbestemmelsen, hvilket indtil da var det hidtil laveste antal besvarelser, siden man indførte statistik over besvarelserne (2014). Tilsvarende var det samlede antal tilmeldte 34 i både 2019 og 2020, hvilket også er historisk lavt, da det samlede deltagerantal hidtil har været 48 i 2017, 41 i 2016 og 59 i 2014.

Trods gentagne forsøg på at målrette ringtesten til praksisbehov og opdatere instruktionsmaterialet så det bliver så anvendelsesorienteret som muligt, er der derfor en gennemgående tendens til at antallet af ringtestdeltagere falder.

PROCEDURE

Resultaterne blev indrapporteret via mail til lboast@vet.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.

Svarmuligheder

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

- "Forurenet (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 det 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, af samme årsager som nævnt under forurening.
- "Dyrkningsnegativ":
Prøven var dyrkningsnegativ ved 48-timers dyrkning under kvalitetssikrede dyrkningsforhold.
- "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 ringtestbesvarelsenerne 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 *Staphylococcus 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 lovkra-vene, 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:

Som noget nyt, bliver besvarelsenerne i 2020 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*.

Tilsvarende tildeles der også point for resistensbedømmelsen. Man får 1 point, hvis en følsom prøve identificeres som intermediær, eller hvis en intermediær prøve identificeres som resistent. Det skyldes, at man i disse to tilfælde, vil 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 underøgt 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 man få 0 point, bortset fra hvis man decideret angiver en resistent prøve som værende følsom. 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. Derfor vil den type fejl udløse 2 minuspoint.

Samlet afspejler bedømmelseskriterierne derfor både om deltagerne ender med en diagnose som er korrekt inden for en realistisk biokemisk undersøgelse, samt om de korrekte diagnoser er tilstrækkeligt nøjagtige til at opfylde de relevante formål inden for behandlingsvalg, sanering, rådgivning, datakvalitet i offentlige og branche-ejede registre mm.

RESULTATER

Resultaterne er opgjort i to underafsnit: Patogenidentifikationer og resistensbestemmelse.

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

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

I Ringtest2020 var det gennemsnitslige antal korrekte patogenidentifikationer 10,2 ud af 15, og det gennemsnitslige antal patogenidentifikationspoint var 19,4 ud af 30.

Den eneste deltager som havde alle korrekte ved patogenidentifikationen var et udenlandsk kommercielt laboratorium (svarende til 5% af deltagerne). To deltagere (10%) havde mange korrekte identifikationer, og 15 (75%) havde hovedsageligt korrekte identifikationer. Dermed afviger præstationen i 2020 fra tidligere år, hvor en væsentligt større andel af deltagerne systematisk har ligget mellem 12-14 korrekte ud af 15 mulige (dvs. ”mange korrekte”). I 2020 havde to deltagere (10%) hovedsageligt ukorrekte identifikationer, hvilket er nogenlunde på niveau med tidligere ringtestsår. Samlet er det generelle niveau i Ringtest2020 dermed, at antallet af top-og bundpræstationer er nogenlunde som i tidligere år, mens præstationsniveauet for ”mange korrekte” er faldet markant med en tilsvarende stigning i antallet af ”hovedsageligt korrekte” besvarelser.

Tabel 2. Fordelingen af antal korrekte identifikationer i ringtest 2014-2020 opgjort i procent.

	2014	2016	2017	2019	2020
Antal besvarelser	54	39	45	28	20
Alle korrekte	7,5%	10,3%	4,4%	7,1%	5%
Mange korrekte	42,6 %	64,1%	33,3 %	39,3%	10%
Hovedsageligt korrekte	37%	23,1%	40 %	39,3%	75%
Hovedsageligt ukorrekte	14, 8%	7,6%	22,2 %	14,3%	10%

I den danske ringtest har vi historisk sat niveauet for ”hovedsageligt ukorrekt” til at svare til, at minimum halvdelen af prøverne var fejlagtigt identificeret. Dermed bliver niveauet sammenligneligt på tværs af år, selv hvis antallet af ringtestprøver og/eller deltagere ændres. Derudover afspejler pejlemærket med ”minimum halvdelen forkert” det ofte anvendte niveau for bestået/ikke bestået ved mange typer tests. Der er ikke som sådant fastsat en beståelsesgrænse i mastitisringtesten, men niveauinddelingen kan tjene til generel oplysning. Der findes ikke mange mastitisringtests at sammenligne med, men i Irland har man på forsøgsbasis udbudt en ringtest til klinikker, som udfører mastitisiagnostisk arbejde for andre klinikker. I den irske test har man sat beståelsesniveauet til 80% for at afspejle, at det kræver yderligere højt præstationsniveau at være henvisningslaboratorium for kollegaer.

Hvis ringtesten i Danmark i fremtiden skal have en beståelsesgrænse kan man tilsvarende spørge, om det er rimeligt at bestå med ”halvdelen korrekt”, eller om det ville være mere passende for veterinærstanden at sætte højere standarder for sig selv? For at vurdere det diagnostiske niveau er det dog ikke nok kun at se på antallet af fejl – for både fejldiagnoserne- og de korrekte diagnosers karakter bidrager i høj grad til at vurdere den diagnostiske værdi. Denne vurdering er derfor medtaget i Ringtest2020 i form af pointsystemet. Præstationsniveauet, inklusiv vurderinger af om de korrekte diagnoser er tilstrækkeligt akkurate til at opfylde deres diagnostiske, behandlingsmæssige og rådgivningsmæssige funktion, omtales derfor nærmere i det følgende.

Tabel 3. Pointtildeling for patogenidentifikation

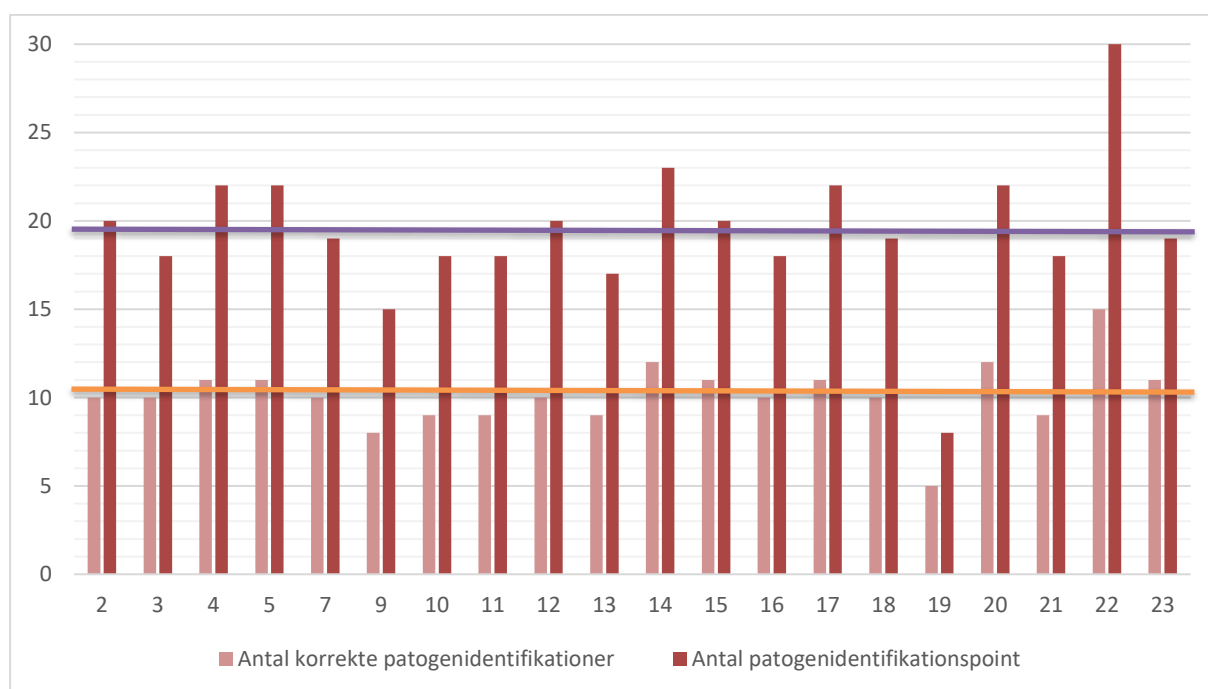
POINT	DEFINITION
2	Korrekt diagnose med maksimal præcision indenfor ID-nøglen
1	Korrekt diagnose med submaksimal præcision indenfor ID-nøglen
0	Forkert diagnose

Tabel 4. Fordelingen af point for patogenidentifikationer i Ringtest2020

POINT	ANTAL DELTAGERE
Over Gennemsnit	9
Gennemsnit	0
Under gennemsnit	11

Det gennemsnitslige antal patogenidentifikationspoint var 19,4 ud af 30 mulige makpoint.

Tabel 5. Sammenligning på deltagniveau mellem antal korrekte patogenidentifikationer og antal point.



På X-aksen ses det anonymiserede deltagnummer. På Y-aksen ses antal korrekt identifikation/point. Den horisontale orange streg angiver gennemsnitsniveauet for antallet af korrekte patogenidentifikationer på 10,2 mens den horisontale lilla streg angiver gennemsnitsniveauet for antal identifikationspoint på 19,4.

Ved at se på antallet af point tildelt for de korrekte diagnoser opnås en forståelse af, at der kan være stor forskel på hvor akkurat "korrekt" diagnostik er. Sammenligner man fx to deltagere, som begge ligger over gennemsnit i antal korrekte patogenidentifikationer, og som har præcist lige mange korrekte identifikationer, ser man, at der kan være relativt stor forskel i hvor akkurat deres diagnostik er. Det gælder fx konkret deltagerne nr. 17 og 23, som begge har identificeret 11 ud af 15 patogener korrekt, men hvor deltager 17 har identificeret 3 patogener flere, ud af de 11 korrekte, mere præcist, end deltager 23. Deltager 23 kan således have fået et pænt resultat i

ringtesten og alligevel i 3 ud af 11 tilfælde stillet en diagnose som var korrekt, men potentielt utilstrækkelig. Forskellen på de to deltagere kan ikke forklares af, at deltager 17 har anvendt diagnostik der ligger uden for ringtestniveauet, idet det er muligt at opnå 2 point for alle ringtestprøverne, hvis man anvender svarmulighederne i korrekt kombination med ID-nøglen.

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 6.

Tabel 6. Fejlidentifikationsprocenten opgjort pr ringtestprøve.

FEJLIDENTIFIKATIONSKODE	DEFINITION
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 20 deltagere, som har indleveret systematisk korrekt udfyldt besvarelse på patogenidentifikationsdelen af ringtesten.

Tabel 7. Fordelingen af prøver inden for fejlidentifikationskoderne

FEJLIDENTIFIKATIONSKODE	ANTAL PRØVER
Ingen fejl	2
Få fejl	2
Moderat antal fejl	6
Mange fejl	5

Der var kun 2 prøver, som ingen fejl udløste: #8 Non-hæmolytisk *E. coli* og prøve #9 Hæmolytisk *E. coli*. Det var akkurat det samme patogen, *E. coli*, som også var eneste prøve der ingen fejl udløste i ringtest 2019. Dog viste pointtildelingen i 2020, at 4 deltagere ikke havde stillet diagnosen så specifikt som muligt på prøve #8, idet de havde angivet diagnosen som "hæmolytisk *E. coli*" og dermed kun modtaget 1 point for deres svar. Tilsvarende for prøve #9 var der 9 deltagere, som havde angivet diagnosen Non-hæmolytisk, og dermed kun modtaget 1 point for deres svar.

Der var 2 prøver som udløste få fejl (i år svarende til prøver som færre end 3 af de 20 deltagere fejlidentificerede): #1 *S. agalactiae* og #14 *S. dysgalactiae* (begge prøver kunne også besvares korrekt som *Streptococcus* sp.). Pointtildelingen afspejlede, at diagnostikken på disse to patogener ikke kun var altovervejende korrekt, men også altovervejende specifik, idet der kun var én deltager som havde diagnosticeret *S. agalactiae* som *Streptococcus* sp., mens samtlige øvrige korrekte identifikationer på de to prøver, var foretaget på speciesniveau.

Der var 6 prøver som udløste moderat antal fejl (i år svarende til prøver som mellem 3 – 10 af de 20 deltagere fejlidentificerede): #4 *S. uberis* (kunne også besvares korrekt som *Streptococcus* sp.), #7 *Klebsiella pneumoniae* (kunne også besvares korrekt som *Klebsiella* sp.), #11 *Enterococcus faecium* (kunne også besvares korrekt som *Enterococcus* sp.), #12 *Staphylococcus aureus*, #13 *Candida tropicalis* (kunne også besvares korrekt som gær) og #15 *Corynebacterium frankenforstense* (kunne også besvares korrekt som *Corynebacterium* sp.). Det er interessant, at flere af de patogener, som regnes for "Major" i mastitisiagnostik, udløser moderat antal fejl. Det drejer sig om patogenerne *S. uberis*, *K. pneumoniae* og *S. aureus*, der alle internationalt anses for nogle af de absolut mest betydningsfulde mastitispatogener. Herunder kan det især undre, at *S. uberis* ikke en gang blev identificeret på genus-niveau (dvs. som *Streptococcus* sp.) hos hver 4. deltager.

Der var 5 prøver, som udløste mange fejl, svarende til at flere end halvdelen af deltagerne fejlidentificerede prøven: #2 *S. paruberis* (kunne både besvares som korrekt som *Streptococcus* sp., og som "sendes til udvidet diagnostik"), #3 *Serratia marcescens*, #5 *Micrococcus luteus* og *Trueperella pyogenes* (kombineret prøve), #6 *Staphylococcus chromogenes* (Non-aureus stafylokok, kunne også besvares korrekt som CNS), #10 *Staphylococcus haemolyticus* (Non-aureus stafylokok, kunne også besvares korrekt som CNS). Det er interessant, at begge CNS (i dag mere korrekt refereret til som Non-aureus Stafylokok (NAS)), var blandt de patogener, som udløste flest diagnostiske fejl, idet disse patogener er blandt de mest almindeligt forekommende hos mastitiskøer.

I forhold til tidligere år kan det bemærkes, at *E. coli* gennemgående har været det eneste patogen, der systematisk udløste ingen eller meget få fejl i ringtesten. Tilsvarende er *S. marcescens* et af de patogener, som gennemgående udløser flest fejl i ringtesten. Omvendt har *S. agalactiae* været repræsenteret i alle ringtestår med 1-3 prøver pr år, og har altid udløst moderat eller få fejl. Præstationen på *S. agalactiae* er derfor usædvanligt god i Ringtest2020.

Da det samlede antal ringtestbesvarelser i 2020 er historisk lavt, bliver det dog desværre i stigende grad vanskeligt at sammenligne data mellem ringtestårene, idet data må anses for mindre og mindre repræsentativt, jo mindre en andel af relevante dyrlæger der deltager.

I ringtestene op til og med 2017 var det tydelige mønster i fejlidentifikationerne, at der ikke var noget mønster. Der var med andre ord et højt niveau af forkert Gram-status og adskillige - og meget forskellige fejl diagnoser. Hvilket tydeligt viste, at mange deltagere ikke foretog systematisk og kvalitetssikret gennemgang af ID-nøglen tests.

Dette billede forandrede sig brat i ringtest 2019, og nu igen i Ringtest2020. I ringtest 2019 og 2020 gælder nemlig, at de patogener, som udløste moderat antal eller mange fejl, er præget af et klart mønster, som overordnet viser, at diagnostikken er blevet langt mere systematisk og grundig. Disse mønstre er derfor omtalt kort i Tabel 8.

Tabel 8. Fejlidentifikationer

PRØVE	FORVENTET FUND	FORKERT	FORKERT IDENTIFIKATION	KOMMENTAR
1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1, (5%)	Kombineret prøve (n=1),	
2	<i>Streptococcus paruberis</i>	17, (85 %)	<i>S. uberis</i> (n= 11), <i>S. dysgalactiae</i> (n=5), <i>Enterococcus</i> sp. (n = 1)	Fejlidentifikationer tydeligt præget af korrekt Genus-identifikation men forkert species.
3	<i>Serratia marcescens</i>	14, (70 %)	Sendes til udvidet diagnostik (n = 5), <i>Klebsiella</i> sp. (n = 4), <i>Citrobacter</i> sp. (n = 2), Kombineret prøve (n = 2), <i>Enterobacter</i> sp. (n = 1)	Fejlidentifikationer tydeligt præget af korrekt Genus-identifikation men forkert species, samt erkendelse af at vanskelig diagnostik bør refereres til akkrediteret laboratorium – dog tæller det valg som fejl i ringtesten, da <i>Serratia</i> godt kan identificeres indenfor ID-skemaet.
4	<i>Streptococcus uberis</i>	5, (25 %)	<i>Enterococcus</i> sp. (n = 3), <i>Kombineret prøve</i> (n = 1), <i>Enterobacter</i> sp. (n = 1)	Forveksling mellem streptokokker og enterokokker er vanskelig at udelukke indenfor ringteststrammen, idet de to genus kun i nogle tilfælde kan adskilles med biokemiske tests.
5	<i>Micrococcus luteus</i> og <i>Trueperella pyogenes</i> , kombineret prøve	13, (65 %)	<i>Micrococcus</i> sp. (renkultur) (n = 3), Non-aureus Stafylokok (n = 3), <i>Trueperella</i> sp. (renkultur) (n = 2), Sendes til udvidet diagnostik (n = 1), <i>S. haemolyticus</i> (n = 1), <i>S. aureus</i> (n = 1), gær (n = 1)	Intet mønster i fejlidentifikationerne bortset fra, at 5 deltagere har identificeret det ene patogen korrekt, men overset det andet, samt at næsten alle fejlidentifikationer har korrekt Gram-status.
6	<i>Staphylococcus chromogenes</i> (Non-aureus stafylokok)	14, (70 %)	<i>Micrococcus</i> sp. (n = 4), Kombineret prøve (n = 3), Sendes til udvidet diagnostik (n = 2), Forurennet (n = 1), <i>Micrococcus luteus</i> (n = 1), <i>S. aureus</i> (n = 1), Alge (n = 1), <i>E. coli</i> (n = 1).	Intet mønster i fejlidentifikationerne
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4, (20 %)	<i>Enterococcus</i> sp. (n = 1), Sendes til udvidet diagnostik (n = 1), <i>S. aureus</i> (n = 1), <i>Enterobacter</i> sp. (n = 1)	Intet mønster i fejlidentifikationerne
8	<i>Escherichia coli</i> (Non-hæmolytisk)	0, (0 %)		
9	<i>Escherichia coli</i> (hæmolytisk)	0, (0 %)		

10	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (Non-aureus stafylokok)	11, (55 %)	Sendes til udvidet diagnostik (n = 6), <i>Micrococcus</i> sp. (n = 2), <i>S. aureus</i> (n = 2)	Alle 4 fejlidentifikationer hvor der er angivet patogendiagnose tildeler korrekt Gram-status og korrekt mikroskopi (kakkoid mikroskopisk morfologi, som ikke er arrangeret i kæder)
11	<i>Enterococcus faecium</i>	7, (35 %)	<i>Streptococcus</i> sp. (n = 2), <i>S. uberis</i> (n = 3), <i>Enterobacter</i> sp. (n = 2)	Mange fejlidentifikationer tildeler korrekt Gram-status og korrekt mikroskopi (kakkoid mikroskopisk morfologi som er arrangeret i kæder). <i>Enterobacter</i> er Gram-negative og det kan således tænkes, at der er tale om nomenklaturfejl (forveksling med <i>Enterococcus</i> sp.), frem for diagnostik fejl i disse to tilfælde.
12	<i>Staphylococcus aureus</i>	3, (15 %)	Sendes til udvidet diagnostik (n = 1), Kombineret prøve (n = 1), <i>Streptococcus</i> sp. (n = 1)	Intet mønster i fejlidentifikationerne
13	<i>Candida tropicalis</i> (gær)	4, (20 %)	Kombineret prøve (n = 1), Non-aureus Stafylokok (n = 1), Alge (n = 1), Intet svar (n = 1)	Intet mønster i fejlidentifikationerne
14	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1, (5 %)	Kombineret prøve (n = 1)	
15	<i>Corynebacterium frankenforstense</i>	3, (15 %)	Non-aureus Stafylokok (n = 1), Sendes til udvidet diagnostik (n = 1), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 1)	Intet mønster i fejlidentifikationerne

Fejlidentifikationer som har modsat Gram-status af det korrekte patogen, er angivet i rød.

For de bakterier, der indgik i ringtesten både i 2016, 2017, 2019 og 2020 er fejlidentifikationsprocenterne sammenlignet i Tabel 9.

Tabel 9. Fejlidentifikationsprocenten opgjort for de patogener, hvor det samme patogen indgik i 2016, 2017, 2019 og 2020

	FEJLIDENTIFIKATIONSPROCENT			
	2016	2017	2019	2020
AGENS				
<i>S. uberis</i>	0 %	22 %	11%	25%
<i>S. agalactiae</i>	13 % og 18 %	22 %, 20 % og 33 %	14%	5%
<i>S. aureus</i>	15 % og 10 %	11 %	18%	15%
<i>E. coli</i> (non-hæmolytisk)	0 %	0 %	0%	0%
<i>Klebsiella</i> sp.	5 %	22 % og 16 %	14%	20%
<i>P. aeruginosa</i>	72 %	49 %	14%	-

Af tabel 9 fremgår det, at selvom selve fejlidentifikationerne er blevet ”bedre” ved at være præget af flere plausible differentialdiagnoser, så er fejlidentifikationsprocenten ikke reduceret specielt inden for de gennemgående patogener. Tvært imod ligger fejlidentifikationsprocenten på både *S. uberis* og *Klebsiella* sp. ganske højt i 2020 sammenlignet med tidligere år.

BAKTERIER DER UDLØSTE SYSTEMATISKE FEJLIDENTIFIKATIONER

De 4 patogener, som især udløser diagnostiske problemer i 2020 er: *Streptococcus paruberis*, *Serratia marcescens*, kombineret prøve (2 patogener i samme prøve) og *Staphylococcus haemolyticus* (Non-aureus stafylokok), som alle er karakteriserede ved, at mere end halvdelen af deltagerene har fejlidentificeret prøvens indhold.

Der er ikke nogen fællesnævner for de 4 prøver, da de repræsenterer både almindelige og sjældne mastitispatogener, samt både Gram-positive og Gram-negative patogener.

Det er dog væsentligt at understrege i forhold til den kombinerede prøve (#5), at netop kombinerede prøver er et område indenfor mastitisiagnostikken, 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:

1. 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...

2. 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 Ringtest2020 var det således et langsomtvoksende patogen med meget lille kolonimorfologi, *Trueperella pyogenes*, som reelt er det mest sandsynlige sygdomsvoldende patogen i prøven - men også det som overses nemmest. Det andet patogen, *Micrococcus luteus*, vokser nemlig hurtigt frem og danner tydelige kolonier. 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 fejldiagnoserne på den kombinerede prøve #5 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 i Ringtest2020. Ud af de 7, som identificerede prøven korrekt som "kombineret", var det kun 3 deltagere, der havde begge patogener korrekt og dermed fik tildelt 2 point. Ud over de 13 som fejlagtigt angiver prøven som en renkultur, er der altså yderligere 4, som angiver prøvens status (kombineret) korrekt, men alligevel laver fejldiagnose på det ene af de to patogener i prøven. De pågældende 4 deltagere risikerer dermed at træffe forkert behandlingsvalg, trods at deres overordnede karakteristik af prøven som "kombineret" er korrekt. Samlet er det derfor kun 3 deltagere, som opnår det fulde, korrekte behandlingsgrundlag for den kombinerede prøve. Ser man på diagnosen af begge patogener, i stedet for den overordnede samlede diagnose "kombineret prøve", ville 85% af deltagerne (13 + 4 ud af 20) dermed risikere at til/fravælge forkert behandling. Den kombinerede prøve er dermed, sammen med det sjældne og vanskeligt diagnosticerbare patogen *Streptococcus paruberis*, de prøver der udløser suverænt flest fejl. Trods at begge patogenerne i den kombinerede prøve er helt almindeligt forekommende bakterier hos mastitiskøer.

OPSAMLING

Samlet peger fejlidentifikationerne på, at der er sket en forbedring af diagnostikken siden ringtest 2017 og tidligere, på den måde, at de fleste fejldiagnoser er kommet nærmere den korrekte diagnose. Dette afspejler, at man også under praksisforhold kan optimere diagnostikken betragteligt ved at arbejde systematisk og kvalitetssikret.

Når det er sagt, er der dog i 2020 et stort antal prøver, som mange ringtestdeltagere fejlidentificerer. Til sammenligning var der i ringtest 2019 kun 2 prøver, som udløste mange fejl og 5 prøver der udløste moderat antal fejl, mod hhv. 5 og 6 prøver i 2020. Samlet set er der altså væsentligt flere prøver der udløser et højt antal fejl i 2020 sammenlignet med 2019, selvom billedet af, at fejldiagnoserne er kommet tættere på den korrekte diagnose, faktisk er endnu tydeligere i 2020 end i 2019. Dette giver anledning til at overveje, om billedet i ringtesten

reelt afspejler et forbedret diagnostisk niveau i Dk, eller en selektion hvor kun de dedikerede kvægdyrlæger efterhånden deltager i ringtesten. Det kan nemlig ikke udelukkes, at den højere grad af spredte og uforklarlige fejl der blev observeret i tidligere ringtest, i virkeligheden blot skyldtes et højere deltagerantal og dermed en større spredning i deltagerens diagnostiske niveau. I ringtest 2017 er resultaterne baseret på 45 besvarelser, altså flere end dobbelt så mange deltagere som i 2020.

Isoleret set er resultatet i Ringtest2020 derfor positivt idet diagnostikken er blevet mere målrettet. Men generelt set er antallet af fejl diagnoser fortsat højt, med mange prøver der udløser fejl hos over halvdelen af deltagerne, og mange deltagere, som har mange fejl hver især. Dette billede er nogenlunde uforandret gennem årene. Yderligere vanskeliggøres vurderingen af, om det diagnostiske niveau forbedres af, at deltagerantallet for ringtesten fortsat falder.

RESISTENSBESTEMMELSE

Foruden identifikationen af patogener inkluderede Ringtest2020 resistensbestemmelse over for penicillin. Diagnosen på de 5 prøver til resistensbestemmelse blev forud oplyst.

I Ringtest2020 havde 19 ud af 34 tilmeldte deltagere korrekt besvaret resistensbestemmelsen helt eller delvist. Heraf begge de kommercielle laboratorier.

Ringtestrapporten er ikke en lærebog i resistensbestemmelse, men udelukkende en evaluering af det årlige præstationsniveau 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. Hvis ringtesten giver anledning til ønske om at skifte resistensbestemmelsesmetode og/eller efteruddanne sig inden for området, henvises der til kurset i mastitisdiagnostik på ringtestniveau, der ligesom ringtesten udbydes af Center for Diagnostik DTU siden 2018. Den følgende tekst har derfor udelukkende til formål at henlede deltagerens 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 (dog er alle kombinationer af antibiotika-bakterie desværre ikke tilgængelige for alle ko-relevante behandlinger). 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 ikke er fastsat cut-off for alle relevante kombinationer af bakterie + antibiotikum, for begge metoder. En nærmere gennemgang af dette ligger dog som nævnt uden for rammerne af denne rapport. Ringtestrapporten er en pulsmåling på den aktuelle diagnostik i danske praksislaboratorier, ikke en lærebog.

Erfaringen fra tidligere års ringtestdeltagere 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.

Ansvar 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 Ringtest2020 angive sin resistensbestemelsesmetode. Besvarelsenerne om metodevalg er opgjort i Tabel 10.

Tabel 10. Deltagernes valg af metode til resistensbestemmelse

METODE	ANTAL DELTAGERE	KOMMENTAR
MIC	1	Metode kan gennemføres i overensstemmelse med internationale anbefalinger
Disk-diffusions test	8	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%	5	Metode kan ikke gennemføres i overensstemmelse med internationale anbefalinger
Penicillinagar, 1,0%	4	Metode kan ikke gennemføres i overensstemmelse med internationale anbefalinger
Penicillinagar, 0,1% og 1,0%	0	Metode kan ikke gennemføres i overensstemmelse med internationale anbefalinger
Penicillinagar, samlet	9	Metode kan ikke gennemføres i overensstemmelse med internationale anbefalinger
PCR	1	Metode kan ikke gennemføres i overensstemmelse med internationale anbefalinger

Ud fra informationerne om deltagernes metodevalg ses det, at kun 1 ud af 19 deltagere har anvendt en metode (MIC), som der findes cut-off for til de kombinationer af bakterie + antibiotikum, som er fremsendt med ringtesten, nemlig penicillin og *S. uberis*, *S. aureus* og *S. xylosus*, hhv. For disk-diffusionstesten findes der officielle internationale cut-offs til bovin mastitis for andre kombinationer af antibiotikum + bakterie, men cut-off for ren penicillin og de fremsendte patogener foreligger ikke.

Resultaterne for de 19 deltagere, som både besvarede resistensbestemmelsen og angav deres metode, er gennemgået nedenfor. Definitionerne for resistensbestemmelsesfejl er anvist i Tabel 11.

Tabel 11. Definitioner for resistensbestemmelsesfejl. Svarmulighederne var Følsom (F), Intermediær (I) og Resistent (R).

KORREKT SVAR	SVARMULIGHED	POINT	KOMMENTAR
F	F	2	Korrekt
	I	1	Overvurderet
	R	0	Overvurderet
I	I	2	Korrekt
	F	0	Undervurderet
	R	1	Overvurderet
R	R	2	Korrekt
	I	0	Undervurderet
	F	-2	Alvorligt undervurderet resistens

Definitionerne er ændret i år, således at alle fejl som fører til en ukorrigeret undervurdering af resistensforekomsten betragtes som værre, end tilsvarende fejl som fører til korrektion af undersøgelsen.

Det er problematisk at undervurdere resistensforekomst, fordi man så kan øge resistenstrykket ved at ordinere netop den behandling, som der allerede er nedsat følsomhed overfor, og dermed selekttere yderligere for resistensen.

Omvendt er det også alvorligt at overvurdere resistensforekomst. Det kan nemlig i teorien både føre til en fejlagtigt høj registrering af resistente yverbetændelsesbakterier og til fejlagtigt fravalg af simpelt penicillin. Begge disse konsekvenser er dog teoretiske, da de kan undgås ved at udføre kvalitetssikret diagnostik på alle prøver med nedsat følsomhed. Dette er uddybet i det følgende. Alle typer fejl er derfor alvorlige, men i ringtesten vægter det højest at undervurdere resistensen, da det vil føre til behandling uden videre undersøgelser, hvorimod fejl forbundet med at overvurdere resistensen altid vil blive opdaget, da de vil føre til yderligere undersøgelser, så frem der foretages kvalitetssikret diagnostik.

Forklaringen på denne vægtning er, at hvis man finder, at en bakterie *ikke* er fuldt følsom for penicillin, bør bakterien altid undersøges med kvalitetssikret resistensbestemmelse før det besluttet om – og i så fald *hvad* dyret skal behandles med, som alternativ til penicillin. Hvis man har lavet en forkert vurdering – og dermed en overvurdering, vil det blive afklaret, at bakterien faktisk er følsom, og det fejlagtige fravalg af simpelt penicillin vil dermed blive undgået. Hvis det derimod bekræftes, at bakterien har nedsat følsomhed over for penicillin, vil anbefalingen i mange af disse mastitstilfælde være slet ikke at anvende antibiotika, men udelukkende palliativ terapi, hvis det er dyrevelfærdsmæssigt forsvarligt. Med andre ord: hvis man følger kvalitetssikret resistensbestemmelse, er der ikke risiko for overforbrug af bredspektret antibiotika, selvom man laver en indledende fejl, der overvurdere resistensforekomsten. For hvis man følger behandlingsvejledningen og behandler smalspektret

indtil der er evidensbaseret grundlag for andet, vil disse fejl altid blive opdaget og behandlingen vil derfor kun blive korrigeret, når det er fagligt forsvarligt, uagtet den indledende fejl. Altså fører disse "overvurderings"-fejl kun til en be/afkræftende undersøgelse, hvorimod de fejl, som her vægtes tungest, nemlig dem der undervurdere resistensforekomsten, vil føre til at dyret behandles uden videre undersøgelser, og med netop det stof der allerede er nedsat følsomhed overfor.

Det oplagte spørgsmål der melder sig er, hvorfor man ALTID skal be/afkræfte et fund af nedsat følsomhed – dvs. alle prøver som viser sig intermediært følsomme eller resistente? Svaret er, at der erfaringsmæssigt anvendes forskellige former for resistensundersøgelser i danske praksislaboratorier, herunder bl.a. agar med penicillin – hvilket ikke er en kvalitetssikret metode til at undersøge for resistens. Herudover har det erfaringsmæssigt også vist sig, at disk-diffusionsmetoden, som godt kan anvendes i overensstemmelse med gældende cut-off værdier for resistens, ofte anvendes forkert og/eller medfører aflæsningsproblemer. Derudover mangler der relevante cut-off værdier til disk-diffusionstest for mange kombinationer af bakterie + behandling for mastitis. For at undgå sådanne fejl skal en korrekt resistensundersøgelse derfor altid foretages kvalitetssikret, hvilket i de fleste tilfælde kun kan lade sig gøre med en MIC-undersøgelse. Selv hvis den indledende undersøgelse er udført kvalitetssikret, vil den følgende undersøgelse skulle omfatte flere forskellige antibiotika for at udpege det bedste valg – såfremt der fortsat både er belæg for- og ønske om, at anvende andet end simpelt penicillin. Alene at konstatere nedsat følsomhed over for penicillin er derfor ikke tilstrækkeligt til at guide det korrekte næste valg, uanset om penicillinundersøgelsen er udført kvalitetssikret fra start eller ej. Årsagen er, at der ofte er nedsat følsomhed overfor flere typer antibiotika. Hvis ikke man undersøger for samtlige relevante behandlinger vil man derfor ikke vide hvilken behandling der reelt er det bedste alternativ til penicillin. Samet set er den eneste mulighed for at undgå behovet for at gentage (validere) en resistensundersøgelse derfor at anvende MIC som udgangspunkt. I en MIC-undersøgelse vil en (gen)undersøgelse af penicillinfølsomheden også altid indgå. MIC-undersøgelser kan udføres i praksislaboratoriet. Alternativt udbydes MIC-undersøgelser bl.a. af landbrugets eget brancheorganisations-laboratorium Kjellerup. Som betalende kunde vil landbruget derfor nok forvente, at praktiserende dyrlæger som minimum tilbyder den standart som landbruget selv udbyder, i deres diagnostik.

Fordelingen af deltagernes resistensbestemmelser er vist i Tabel 12.

Tabel 12. Resultater af resistensbestemmelserne.

PRØVE NR	PATOGEN	KORREKT SVAR	SVARMULIGHED	POINT	KOMMENTAR	ANTAL SVAR
16	<i>Streptococcus uberis</i>	I	I	2	Korrekt	4
			F	0	Undervurderet	12
			R	1	Overvurderet	2
			Ikke besvaret	0	-	1
17	<i>Streptococcus uberis</i>	F	F	2	Korrekt	17
			I	1	Overvurderet	1
			R	0	Overvurderet	0
			Ikke besvaret	0	-	1
18	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	2	Korrekt	16
			I	0	Undervurderet	2
			F	-2	Alvorligt undervurderet resistens	1
19	<i>Staphylococcus aureus</i>	F	F	2	Korrekt	17
			I	1	Overvurderet	2
			R	0	Overvurderet	0
20	<i>Staphylococcus xylosum</i> (Non-aureus-Stafylokok)	F	F	2	Korrekt	9
			I	1	Overvurderet	4
			R	0	Overvurderet	6

Den intermediært følsomme *S. uberis*, #16, har udløst betragtelige problemer. Kun 4 ud af 19 deltagere har identificeret det korrekte resistensniveau for denne prøve. Men det helt store problem består i, at langt størstedelen af dem, som ikke identificerer #16 korrekt, ender med at undervurdere resistensen. Altså ville 12 ud af 19 potentielt have sat koen i penicillinbehandling selvom dette er kontraindikeret.

Intermediær følsomhed hos *S. uberis* er ikke udbredt, men forekommer ofte nok til, at den ret beskedne resistensovervågning på mastitispatogener i Dk alligevel finder sådanne tilfælde. Når overvågning baseret på ret beskedent data, som ikke er fra særligt vanskelige tilfælde, men derimod fra tilfældigt udvalgte mastitistilfælde, viser forekomst af intermediære isolater, må man bestemt antage, at det også er et scenarie der er relevant i dagligdags praksis. Derfor er det bekymrende, at tendensen til at overse disse tilfælde tilsyneladende er så omfattende.

Prøve #18 og 19 indeholdt begge *S. aureus* og her er størstedelen af resistensbestemmelserne korrekte. Men sammenligner man med resistensbestemmelserne på en relevant differentialdiagnose, nemlig *S. xylosus*, #20, som blot er en anden Stafylokok, tegner der sig et mere bekymrende billede. Her overvurderer over halvdelen af deltagerne resistensforekomsten. Selvom overvurdering, som beskrevet ovenfor, altid bør føre til en videre undersøgelse, er det problematisk, at kvaliteten af resistensbedømmelsen på to stafylokokker kan afvige så markant. Det er svært at udpege en plausibel forklaring uden at gå i detalje med hvilken resistensbestemmel- sesmetode den enkelte fejl ses i relation til. Men overordnet må man desværre konkludere, at Non-aureus-Sta- fylokokker er blandt de suverænt hyppigste bakterier hos mastitiskøer, og samtidigt er blandt de patogener som både udløser størst antal fejl i patogen-identifikation og i resistensbestemmelse. Dette understreger tyde- ligt anbefalingen om altid at sende isolater med nedsat følsomhed (intermediære såvel som resistente), til kva- litetssikret resistenebestemmelse, så man kan få afklaret om man har overvurderet resistensen, før man even- tuelt korrigerer en penicillinbehandling. Hvis man ikke følger denne anbefaling, tyder ringtest 2020 meget klart på, at særdeles mange tilfælde af Non-aureus-Stafylokokker enten fejldiagnosticeres, og hvis de ikke gør, så udløser forkert behandlingsvalg.

Eksemplet med *S. xylosus* viser derfor med al tydelighed hvorfor kvalitetssikret resistensbestemmelse er altafgø- rende, også når man har med patogener at gøre, som ikke på nuværende tidspunkt sættes i forbindelse med høje resistensniveauer. Hvis 10 ud af 19 køer med Non-aureus-Stafylokokker bliver overflyttet til bredspektret behandling, baseret på fejlagtig overvurdering af deres penicillinresistens, vil det drive et betragteligt, og unød- vendigt, forbrug af bredspektret antibiotika.

Omvendt kan man sige, at hvis penicillin er førstevalg og bakterien er følsom for dette, så vil der slet ikke blive foretaget resistensundersøgelse, og dermed forsvinder risikoen for den fejlagtige korrektion fra penicillin til bred- spektret behandling.

Eksemplet med *S. xylosus* viser derfor blot, at det er afgørende både at følge antibiotikavejledningen og at fore- tage alle resistensundersøgelser kvalitetssikret. Dette understreges yderligere af eksemplet med den intermedi- ære *S. uberis*, hvor man har den modsatte problemstilling: nemlig at et helt almindeligt forekommende patogen får overset sin resistens. Her vil et eventuelt behandlingssvigt dermed heller ikke blive fulgt korrekt til dørs, med mindre den følgende resistensundersøgelse foretages af et akkrediteret laboratorium, eftersom langt størstede- len af praksislaboratoriernes egen resistensbestemmelse var fejlagtig i dette tilfælde.

Samlet peger resistensundersøgelsen derfor på, at der selv ved almindelige mastitispogener er udbredt risiko for at de resistensundersøgelser, som udføres i danske veterinære praksislaboratorier, både kan føre til unød- vendigt højt forbrug af bredspektret antibiotika, og til risikabelt forbrug af penicillin i tilfælde hvor det er kontra- indikeret, fordi der allerede er nedsat penicillinfølsomhed.

KONKLUSION

Dette års ringtest er sammensat af bakterier, som er blevet indsendt til DTU, Center for Diagnostik i forbindelse med mastitisforskning-og diagnostik i 2017-2020.

Overordnet viser resultatet af Ringtest2020 at:

- 1) Deltagerantallet i Ringtest2020 er identisk med antallet i 2019, og historisk lavt. Derudover er antallet af besvarelser endnu lavere i 2020 end i 2019.
- 2) Den repræsentative værdi af test-resultaterne 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. Faktisk er der flere prøver som udløser et moderat antal fejl diagnoser i 2020 end tidligere.
- 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 2020.
- 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 fejl diagnoserne nu, modsat ringtest 2017 og tidligere, afspejler relevante differentialdiagnoser. Men selve *antallet* af fejl diagnoser 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) Langt størstedelen af de tilmeldte deltagere undlader at opfylde mindst et af de 4 overordnede krav for at modtage bedømmelse af ringtestresultatet. Dette trods omfattende information om disse krav. Det påhviler den enkelte deltager at besvare i overensstemmelse med testens krav. Der opfordres derfor til at deltagerne fremover 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 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.