Undersøgelse for *Mycoplasma bovis* i praksislaboratoriet

KASPAR KROGH[1], BRANKO KOKOTOVIC[2] OG HEIDI VOSS[3]
[1]KASPAR KROGH, SPECIALKONSULENT, KVÆGFAGDYRLÆGE, VIDENCENTRET FOR LANDBRUG, KVÆG,
[2]BRANKO KOKOTOVIC, SENIORFORSKER, DTU VETERINÆRINSTITUTTET, VETERINÆRINSTITUTTET, AFDELING FOR DIAGNOSTIK OG FORSKNING
[3]HEIDI VOSS, KVÆGFAGDYRLÆGE, VIRBAC ANIMAL HEALTH A/S

Mycoplasma anses for at være en medvirkende årsag til en lang række sygdomsforløb hos kvæg og andre dyrearter. I udlandet er infektioner med *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) og andre mycoplasmaarter kendte og velbeskrevne. Hos kvæg er infektion med *M. bovis* primært kendt som årsag til smitsom yverbetændelse (van der Burgt et al., 2008), mens andre kliniske manifestationer også kan ses lejlighedsvis (Maunsell et al., 2011). Visse dyr udvikler kliniske symptomer, mens andre kan udvikle sig til kroniske smittebærere uden kliniske symptomer. Fund af *M. bovis* i en besætning er således ikke altid ensbetydende med, at den giver anledning til sygdom. Diagnostikken af infektioner forårsaget af *M. bovis* sker på grund af prisen for den traditionelle bakteriologiske diagnostik ofte ved andre diagnostiske metoder (PCR og serologi) (Nicholas et al., 2003).

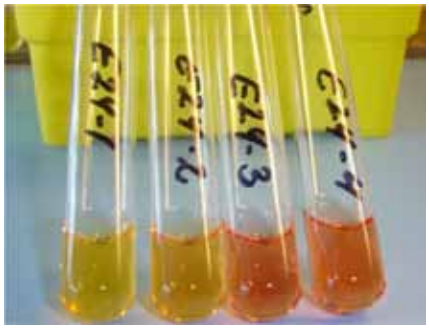
Figur 1 Mycoplasma-kolonier på fast medie med typisk »spejlægsmorfologi« set under stereomikroskop. (Kilde B. Kokotovic, DTU Veterinærinstituttet).

M. bovis smitter ved direkte kontakt fra kreatur til kreatur. Smitte sker primært via sekreter som fx mælk, snot og spyt – det vil sige via foder, vandtrug og ved malkning. Derfor er en god staldhygiejne og gode malkerutiner den bedste anbefaling til at undgå smitte indenfor besætningen. Det handler naturligvis også om at undgå at få smitten ind i besætningen. I tilfældet med *M. bovis* gøres det bedst ved at undgå at indkøbe smittede dyr.

Metoder til påvisning af Mycoplasma bovis

M. bovis kan påvises ved konventionelle metoder (dyrkning), molekylære metoder (PCR) og serologisk undersøgelse (ELISA). Forskelle mellem tilgængelige diagnostiske metoder er diskuteret af Nicholas (2011), som angiver serologisk undersøgelse som den billigste og mest cost-effektive metode til at påvise infektion med *M. bovis* på besætningsniveau.

Danske erfaringer tyder på, at tolkningen af serologiske undersøgelser vanskeliggøres af, at mange dyr i besætninger allerede har antistoffer forud for udvikling af symptomer. I et projekt gennemført af DTU Veterinærinstituttet påvistes antistoffer hos >80 % af slagtekalve i de undersøgte besætninger (ikke publicerede data). Hidtidig påvisning af *M. bovis* er derfor primært baseret på direkte påvisning af agens enten ved dyrkning eller påvisning af DNA ved PCR i de specialiserede laboratorier.



Figur 2. Mycoplasmavækst i flydende medie ses som farveomslag i en fortyndingsrække. Rør med vækst (=positive prøver er gullige) er længst mod venstre. (Kilde B. Kokotovic, DTU Veterinærinstituttet).

Dyrkning

Der kan indsendes prøver til dyrkning på DTU Veterinærinstituttet. Dyrkning kræver anvendelse af specialiserede komplekse medier (mod. Heyflicks medium) og erfaring med denne type undersøgelse. Dyrkning af *M. bovis* kan være tidskrævende og nogen studier (Maunsell et al. 2011) har rapporteret relativt lav sensitivitet. I figur 1 og 2 er vist eksempler på, hvordan *M. bovis* ser ud ved dyrkning på hhv. faste og flydende medier.

Figur 3. Speed Mam Color, Virbac A/S.

Serologi

Serologiske undersøgelser anvendes rutinemæssigt til påvisning af infektion med *M. bovis*.

Antistoffer mod *M. bovis* kan påvises længe efter ophør af infektionens akutte forløb. Det er derfor nødvendigt at undersøge parrede prøver for at påvise aktiv infektion.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Specifik påvisning af *M. bovis* sker rutinemæssigt ved undersøgelse af mælkeprøver på Eurofins. Undersøgelsen kan anvendes både på individ- og tankmælksprøver. Resultat af undersøgelse af prøver fra andre vævsemner/-typer (fx ledvæske, pus o.lign) med denne PCR er ikke valideret, og resultater vil derfor være behæftet med usikkerhed. PCR giver hurtigere svar end dyrkninger og serologiske undersøgelser med høj sensitivitet og specificitet (Nicholas, 2011).

Praksisdiagnostik

Der er markedsført et diagnostisk-kit til påvisning af mastitispatogener i praksislaboratorier, Speed Mam Color (Virbac A/S). Kittet baseres på dyrkning af forskellige mastitispatogener, heriblandt *M. bovis*. I dokumentationen for kittet er anført at tilstedeværelse af >10^3 CFU/ml vil udløse en positiv reaktion. Kittets evne til at påvise tilstedeværelse af *M. bovis* er testet i en mindre undersøgelse på DTU Veterinærinstituttet.

Metode og resultater

Kittets sensitivitet er testet ved at bruge en ren kultur af *M. bovis*. Kulturen er en felt-stamme (Mab 344) indeholdende 5x10^5 CFU/ml, der er fortyndet og podet samtidigt i »Speed Mam Color« kittet og DTU Veterinærinstituttets standard dyrkningsmedium, således at endelig koncentration af *M. bovis* var 50.000, 5.000, 500, 50 og 5 CFU/ml. Resultater af forsøget er angivet i tabel 1:

Tabel 1. Påvisning af M. bovis med Speed Mam Color kit og i DTU Veterinærinstituttets standard dyrkningsmedium.

CFU/ml	Speed mam kit	Standard medium
50.000	+	+
5.000	+	+
500	-	+
50	-	+
5	-	-

Yderligere karakterisering af kittets evne til detektion af *M. bovis* undersøgt i »spikede« prøver. Den ovennævnte feltstamme af *M. bovis* (Mab 344) er blandet sammen med en M. bovis – negativ mælkeprøve og undersøgt samtidigt med »Speed Mam Color« kittet og standard dyrkningsmedium. Endelig koncentration af bakterien, der skulle detekteres, var 25.000, 10.000, 5.000, 2500 og 1250 CFU/ml. Resultater af forsøget er angivet i tabel 2:

Tabel 2. Påvisning af M. bovis i »spikede« mælkeprøver med Speed-Mam Color kit og i DTU Veterinærinstituttets standard dyrkningsmedium.

CFU/ml	Speed mam kit	Standard medium
25.000	+	+
10.000	+	+
5.000	+	+
2500	+	+
1250	+	+

Kittets evne til at påvise *M. bovis* i fem mælkeprøver, som tidligere blev fundet positive ved dyrkning. Prøverne er opbevaret ved -25°C et par måneder og var til lejligheden samtidigt undersøgt med »Speed Mam Color« kittet og pány ved dyrkning i standardmedium. Resultater af forsøget er angivet i tabel 3:

Tabel 3. Påvisning af M. bovis med i positive mælkeprøver Speed-Mam Color kit og i DTU Veterinærinstituttets standard dyrkningsmedium.

Prøve	Speed mam kit	Standard medium
Mp38	+	+
Mp39	+	+
Mp40	+	+
Mp66	+	+
Mp68	+/- (tvetydig)	+

Konklusion

På baggrund af denne begrænsede undersøgelse kan det konkluderes, at kittet lever op til producentens påstand vedr. påvisning af *M. bovis* i en koncentration over 1000 CFU/ml. Testkittet kan bruges til påvisning af bakterien i mælkeprøver fra kliniske tilfælde af yverbetændelse, men er ca. 100 x mindre sensitiv end dyrkning ved standardmetoden på Veterinærinstituttet.

Kilder

Maunsell FP, Woolums AR, Francoz D, Rosenbusch RF, Step DL, Wilson DJ, Janzen ED., Mycoplasma bovis infections in cattle. J Vet Intern Med. 2011 Jul-Aug;25(4):772-83.

Nicholas RA, Ayling RD., Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control. Res Vet Sci. 2003 Apr;74(2):105-12.

Nicholas RA, Bovine mycoplasmosis: silent and deadly, Veterinary Record (2011) 168, 459-462

van der Burgt G, Main W, Ayling R., Bovine mastitis caused by Mycoplasma bovis. Vet Rec. 2008 Nov 29;163(22):666. ■