

Mycoplasma bovis diagnostiikka Suomessa

Tarja Pohjanvirta
Eläintautibakteriologia
Evira, Kuopio

Mycoplasma bovis diagnostiikka on varsin vaativaa

- *Mycoplasma* -infektiot ovat alidiagnosoituja
 - Mykoplasma viljely vaatii erityiselatusaineita ja on työlästä
 - Keuhkotulehduksissa usein mukana muita bakteereja jotka vaikeuttavat mykoplasman löytymistä
 - Antibioottilääkitys saattaa alentaa tilapäisesti mykoplasmojen määrän niin alhaiseksi että ne eivät kasva viljelyssä/PCRn herkkyys ei riitä niitä toteamaan
 - Vasta-ainediagnostiikka ei ole täysin luotettavaa

Näytemateriaalit

- Kokonainen eläin ruumiinavaukseen
 - Keuhkopaketti
 - Syväsvively
 - Verinäyte
 - Korvaerite
 - Nivelneste
 - Maitonäyte
-
- Sierainlima (vastustusohjelma)

Menetelmät - raadonavaus

- Paras menetelmä *M. bovis* -infektion toteamiseen
- Avaukseen akuutisti sairastunut, mielellään lääkitsemätön eläin
- Avauksen edut:
 - Keuhkot voidaan tutkia kunnolla – silminnähtävät muutokset, kudokset ja immunohistokemia, bakteeriviljely ja herkkysmääritykset
 - Välikorvantulehdukset pystytään toteamaan ja tarvittaessa viljely
 - Nivelet voidaan tutkia huolella ja tarvittaessa viljely

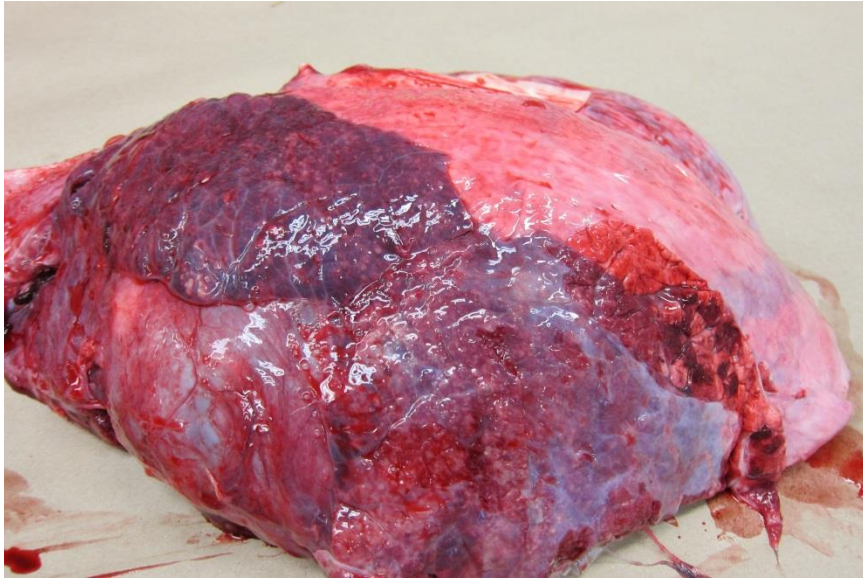


Keuhkomuutoksista

- *M. bovis* -keuhkotulehduksessa muutokset yleensä keuhkojen kranioventraalisissa
- Tyypillinen muutos kaseonekroottinen keuhkotulehdus
 - Juustoutuneita kuoliopesäkkeitä muutamasta millimetristä useisiin senttimetreihin
 - Pullistavat keuhkokalvoa



Obduktio



Menetelmät - viljely

- Mykoplasma viljely

- Vaatii kokonaisen raadon/elimen tai näytteiden lähetys kuljetuselatusaineessa
- Näytteet lähetettävä viileässä ja nopeasti, eivät saa kuivua
- Suora viljely maljalle + laimennussarja liemiviljelynä
- Hidas (n. 3 viikkoa kielteiseen tulokseen) ja työläs
- Antibioottihoito saattaa antaa väärän negatiivisen tuloksen
- Ainoa keino saada kantoja talteen jatkotutkimuksia varten (esim. genotyypitys, herkkyysmääritys)

- Ollut käytössä v. 2002 Eviran Kuopion toimipaikassa – syväsviljelynäytteet, kaikki nautojen raadonavauksessa todetut keuhkotulehdukset sekä luodut sikiöt viljellään *M. bovis* -bakteerin varalta

Menetelmät - PCR

- *M. bovis* -bakteerin suora osoitus näytteistä reaaliaika-PCR:llä
- Suomessa käytössä:
 - Maitonäytteille (kaupallinen Pathoproof-testi)
 - Mycoplasma bovis-vastustusohjelma (sierainlimanäytteet)
- Testeissä mukana sisäinen monistuskontrolli joka osoittaa PCRää estävät aineet (mm. veri)
- PCRn herkkyys vaihtelee sen mukaan millaisesta näytemateriaalista DNA eristetään
 - Puhdasviljelmä - < 10 bakteeria antaa positiivisen tuloksen
 - Utaretulehdusmaito – 100 -1000 bakteeria/ml antaa positiivisen tuloksen

Menetelmät - verinäytteet

- *M. bovis* vasta-aineet kohoavat havaittavalle tasolle kokeellisessa infektiossa jo 10 vrk:n kuluttua altistuksesta, luonnollisessa infektiossa hieman hitaammin
- Vasta-aineet säilyvät korkealla tasolla kuukausia, jopa vuosia infektiosta – ne eivät siten osoita akuuttia infektiota
- Vasikoilla voi olla emältä saatuja vasta-aineita jotka kuitenkin häviävät muutaman kuukauden ikään mennessä, mutta voivat siis hankaloittaa vasikoiden serologista tutkimusta
- Kaikilla infektoituneilla eläimillä vasta-aineet eivät nouse, ts. seronegatiivinen eläin voi erittää *M. bovis* -bakteeria
- Vasta-aineiden toteamiseen käytetään yleensä ELISA-testiä
- Kaupallisten *M. bovis* ELISA-testien saatavuus huono, käytännössä Euroopassa vain BioX (Belgia) testi

M. bovis ELISA-testi

- BioX ELISA-levy päällystetty *E. coli* -bakteerissa tuotetuilla *M. bovis*-bakteerin pintaproteiinilla – teoriassa testin spesifisyys (tunnistaa vain oikeita positiivisia) on suuri, mutta sensitiivisyys (tunnistaa oikeat negatiiviset) voi olla heikompi
- Tähän mennessä tutkittu n. 800 seerumia n. 90 tilalta, takautuvasti tuontinautojen seerumit vv. 2011-2012 sekä 298 kpl terveiden pihvirotuisten eläinten seerumeita (teurastettu maaliskesäkuu 2012)
- Tiloilla joilla akuutti taudinpurkaus ja *M. bovis* eristetty vasta-ainetasot olleet korkeita ja niitä on todettu 45- 100 % tutkituista näytteistä
- Käytännössä havaittu että kaikilla eläimillä joilla klinisiä muutoksia (välikorvan tulehdus, keuhkotulehdus) ei ole ELISA-testissä todettavia vasta-aineita

M. bovis ELISA-testi

- Usein lypsykarjatiloiilla joilla ei ole epäilyttäviä oireita todetaan kuitenkin 2-10 (17) % tutkituista näytteistä positiivisiksi – usein vanhat lehmät
- Pihvirotuisten näytteistä todettiin 5,7 % positiivisiksi BioX:n testillä ja 1 % toisella ELISA-testillä (AHVLA)
- Yleisesti ottaen vasta-ainemittaus ei sovellu yksittäisten eläinten tutkimiseen, mutta soveltuu karjatason tutkimukseen akuuteissa taudinpurkauksissa tai pian sellaisen jälkeen mikäli muita näytteitä ei ole otettu
- Antibioottilääkitys ei vaikuta vasta-aineiden tutkimiseen

M. bovis –epäily tilalla – mitä näytteitä ?

- Raato avaukseen
 - Kaikki Eviran toimipaikat tekevät nautojen raadonavauksia
- Avaus tilalla
 - Keuhkopaketti Eviraan
- Syväselvityspaketti vasikoiden hengitystietulehduksen tutkimiseen
 - Paketti sisältää pitkät suojatut tikut ja kuljetuselatusaineet neljän vasikan tutkimista varten
 - Näytteistä tehdään bakteeri- ja mykoplasmapiljely ja herkkyysmääritykset sekä virusosoitukset
 - Paketti tilataan Eviran Kuopion toimipaikasta (puh. 050 316 2932/toimisto) ja näytteet myös lähetetään Kuopioon
 - Paketin mukana voi laittaa verinäytteet samoista vasikoista – tutkitaan *M. bovis* vasta-aineet (kuuluu paketin hintaan)

M. bovis –epäily tilalla – mitä näytteitä ?

- Verinäytteet

- Sovittava etukäteen mistä ikäryhmästä/ryhmistä näytteet otetaan ja määrä
- Näytteet tutkitaan Kuopiossa
- Soveltuu lähinnä tapauksiin joissa akuutti vaihe ehti mennä ohi ilman muuta näytteenottoa
- HUOM! Nautojen hengitystietulehdus-lähete – merkitse selkeästi mitä vasta-aineita halutaan tutkittavaksi – virusvasta-aineet vai *M. bovis* vai molemmat
- [www.evira.fi/näytteenotto- ja lähetysohjeet/](http://www.evira.fi/näytteenotto- ja_lahetysohjeet/) Eläintautitutkimukset: [lähetelomakkeet ja ohjeet](#)/Nauta - nautojen hengitystietutkimuslähete

M. bovis vastusohjelma

- [www.ett.fi/Ohjeet ja lomakkeet/Mycoplasma Boviksen vastustaminen nautatiloilla](http://www.ett.fi/Ohjeet_ja_lomakkeet/Mycoplasma_Boviksen_vastustaminen_nautatiloilla)
- Vastustusohjelmassa tärkeintä oireiden rehellinen tarkkailu ja näytteiden lähettäminen tutkittavaksi mikäli epäilyttävää ilmenee
- Vastustusohjelmaan liityttäessä 2x puolen vuoden välein näytteet 1 vko – 6 kk vasikoiden sieraimista
- Vasikoita tutkitaan max 20 kpl ikäryhmästä 1 vko-6 kk, jos vasikoita enemmän kuin 20 kpl niin otetaan 20 näytettä nuorimmasta päästä
- Ideana se, että tiloilla joilla ei ole klinisiä *M. bovis* -oireita ei bakteeria yleensä löydy vasikoiden sieraimistakaan
- Näytteet otetaan Amies ilman hiiltä kuljetusputkeen
- Eläinlääkäri tilaa itse näytteenottovälineet

M. bovis vastusohjelma

- Sierainaukot pyyhitään puhtaaksi ja tikulla hangataan sierainontelon pohjaa suhteellisen voimakkaasti, mutta ei verille asti (veri estää PCR-reaktiota)
- Tikut lähetetään pikapakettina Eviran Kuopion toimipaikkaan omalla läheteellään (tutkimuslähete Naseva – *M. bovis* vastustusohjelma)
- Laboratorio yhdistää kahden vasikan näytteet samaan DNA-eristykseen mikäli näytteitä on neljä tai enemmän
- Samalla tila toimittaa tankkimaitonäytteen *M. bovis* -PCR tutkimukseen (esim. Valion Seinäjoen laboratorioon)

Naudan hengitystietulehdus - näytteenotto

Näytetyyppi	Välineet	Tutkimukset	Miten ja milloin käytetään	Mitä hyötyä	Muistettava
Syväsvivelynäytteet 4 kpl/oireileva eläinryhmä	Syväsvivelynäytteenottotikut, mykoplasmakuljetus-liemi ja bakt+virus kuljetus-liemi*	Bakteerit, mykoplasmat (myös <i>M. bovis</i>), ureaplasma, RS- ja koronavirus, herkkyysmääritys	Hengitystietulehdusoireisille vasikoille ja nuorille naudoille ensisijainen näytteenottotapa. Näytteenottoon valitaan äskettäin sairastuneita, lääkittämättömiä, mukana voi olla oireettomia karsinatovereita.	Aiheuttajien laajin selvitys syvältä nielusta usealta eläimeltä, bakteerikannat saadaan talteen, lääkeherkkyyden seuranta.	*Tilaa näytteenottopaketti etukäteen Kuopion Evira, puh. 050 316 2932/toimisto. Näytteiden oltava perillä laboratorioissa seuraavana päivänä. Jos tilalla kuolleisuutta, lähetä lisäksi raato/keuhkopaketti.
Verinäytteet <i>M. bovis</i> vasta-ainetutkimukseen	10 ml verinäyteputkia ilman hyytymistä estävää ainetta	<i>M. bovis</i> vasta-aineet	Lisätutkimus syväsvivelynäytteille. Mikäli seropositiivisia löytyy, tutkitaan 20% eläinryhmästä.	Tartunnan laajuuden selvittäminen	Virhepositiiviset mahdollisia, eläinten vasta-ainetasot vaihtelevat, tulkinta vaikeaa.
Pariverinäytteet 5 kpl/oireileva eläinryhmä	10 ml verinäyteputkia ilman hyytymistä estävää ainetta	RS, korona- ja parainfluenssa3-virusten vasta-aineet	Suosittelava lisätutkimus syväsvively- ja sierainlimanäytteille. I näytteet taudin alkuvaiheessa, II näytteet 3-4 viikon kuluttua samoista eläimistä. Virusvasta-ainetasojen nousu osoittaa akuutin infektion.	Tarvittaessa verinäytteistä voidaan tehdä myös muita vasta-ainetutkimuksia (IBR, BDV).	Ota I näytteet aina syväsvivelynäytteiden ja virussierainlimanäytteiden kanssa. Ota II näytteet, jos viruksen suora osoitus jää negatiiviseksi.
Sierainlimanäytteet virustutkimukseen 5 kpl/oireileva eläinryhmä	Vanupuikkoja ja puhtaita koeputkia	RS- ja koronaviruset	Voimakkaat virusinfektioon viittavat oireet. Näytteet otetaan aivan taudin alkuvaiheessa, mukana voi olla saman ryhmän oireettomien eläinten näytteitä.	Aiheuttajan varmistus, kun epäillään viruksen aiheuttamaa hengitystieinfektiota. Tarvittaessa näytteistä voidaan tehdä myös muita virustutkimuksia (IBR).	Ota aina varalta myös verinäytteet. Jos suora osoitus jää negatiiviseksi, ota II-verinäytteet 3-4 vkon kuluttua. Näytteiden oltava perillä laboratorioissa seuraavana päivänä.
Kokonainen eläin tai keuhkopaketti (1-2 eläimestä) patologiseen tutkimukseen	Tuonti lähimpään Eviraan (henkilöauton peräkärri) tai avaus tilalla ja elimet MH kautta	Patologisen tutkimuksen yhteydessä tehdään syväsvivelypakettia vastaavat tutkimukset	Voimakasoireinen tai poikkeava hengitystietulehdus, epidemia, tai mukana korva- tai niveloireita, kuolleisuutta. Aina suositeltava lisätutkimus syväsvivelypakettiin lisäksi.	Varmistaa diagnoosin/diffit. Taudinaiheuttajien osoitus keuhkomuutoksista.	Ota lisäksi syväsvivelynäytteet oireilevista (avattavat usein jo lääkittyjä, tauti ei enää akuutissa vaiheessa)
<i>M. bovis</i> -vastustusohjelman siveilynäytteet (4-20 kpl)	kuljetuselatusaine ilman hiiltä	<i>Mycoplasma bovis</i> PCR -tutkimus	Vastustusohjelmaan liityttäessä tai ETT:n/Eviran ohjeiden mukaan positiivisen tilan seurannassa.	Osoittaa sierainkantajuutta.	Ei sovellu muihin tutkimuksiin eikä taudin oireiden selvityksiin.