



Mattilsynet

Vårt saksnummer 16/38837

Oslo, 28.06.2016

Funn av *Mycobacterium bovis* hos lama ved PCR - faglige vurderinger av smittefare samt forslag til tiltak

Innledning

Det vises til to møter med Mattilsynet (22. april og 12. mai 2016) samt ett møte med Mattilsynet og husdyrnæringene inkludert alpakkaforeningen (19. mai). På disse tre møtene har Veterinærinstituttet presentert ett kasus hvor man ikke har kunnet utelukke bovin tuberkulose (*Mycobacterium bovis*) i prøver fra lever fra en lama som ble slakta i Rogaland. Mattilsynets hovedkontor har på møtene uttalt at de forventer en vurdering av smittefare samt råd om hvordan Veterinærinstituttet anbefaler kasuset håndtert og fulgt opp når relevante undersøkelser er avsluttet.

12. februar 2016 ble *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) påvist ved PCR i leverprøver fra kasuset. Prøvene ble sendt til EUURL i Spania samt til Animal & Plant Health Agency (APHA) i Storbritannia som begge bekreftet det positive PCR-resultatet i én av de tilsendte leverprøvene.

Bovin tuberkulose var utbredt hos storfe i Norge rundt forrige århundreskifte, men etter nærmere 70 års bekjempelse og mange tilbakefall kunne Norge, som et av de første land, erklære storfetuberkulose for utryddet i 1963. Bortsett fra utbrudd i to storfebesetninger i Sogn- og Fjordane i henholdsvis 1984 og 1986, har *M. bovis* ikke blitt påvist i Norge etter 1963.

Generelt om tuberkulose og tuberkulose hos kamelider

Tuberkulose er en kronisk, smittsom, granulomatøs sykdom forårsaket av mykobakterier. Den kan ramme et stort antall arter av vertebrater og manifesterer seg først og fremst i lunger med tilhørende lymfeknuter, men også i andre organer. Lesjonene er granulomer, ofte benevnt tuberkeler, som kan manifestere seg ulikt avhengig av dyreart og mykobakteriespecies.

Smitte overføres via inhalasjon eller peroralt til mage-tarm. Inhalasjon er hovedsmitteruta, men peroral smitte er mulig når faeces med mykobakterier har kontaminert beite, drikkevann eller fôr/fôrtro. Unge dyr kan også smittes av kontaminert mjølk.

Det er få rapporter om tuberkulose hos søramerikanske kamelider i og fra opprinnelseslandene i Sør-Amerika. Men etter at eksporten av lama og alpaka fra Sør-Amerika begynte for rundt 30 år siden er det rapportert utbrudd av tuberkulose forårsaket av *M. bovis* i blant annet New Zealand, USA, Nederland, Spania, Irland og særlig Storbritannia.

I Storbritannia har det vært en økende forekomst de siste 15 åra; først og fremst i Sørvest-England hvor særlig alpakkabesetninger er smittet av infiserte storfe og grevling, men også hjort. I et obduksjonsmateriale av kamelider gjennomført i 2010 ble bovin tuberkulose påvist i 8,3 % av obduserte dyr. Ingen annen infeksjonssykdom hadde forårsaket like mange dødsfall i dette materialet.

Det er internasjonal usikkerhet om hvor mottakelige lama og alpaka er for infeksjon med *M. bovis*. Tre utsagn fra OIEs nyeste publikasjoner om bovin tuberkulosis illustrerer denne usikkerheten:

1. «Camelids are not highly susceptible to tuberculosis, but in recent years a serious concern has arisen in countries where New World camels are bred away from their countries of origin (OIE 2012)»
2. «It is known that llamas and alpacas are very susceptible to even low doses of *M. bovis*, and incidents of high morbidity have been reported from several countries (OIE 2014)
3. «It is believed that llamas are not particularly susceptible to tuberculosis» (OIE 2014)

Sannsynligvis er det begrenset sirkulasjon av tuberkulosesmitte i kamelideflokkene i høylandet i Sør-Amerika, og de har oftest store arealer til disposisjon. I andre land og verdensdeler holdes kamelidene i lavlandet med oftest mindre areal til disposisjon per dyr. Under slike forhold vil smittepresset bli høyere når smitte introduseres i flokken. Samtidig ser motstandskraften til dyra ut til å reduseres i tette dyrehold. Tilsvarende er observert hos kameler; tuberkulose er sjelden forekommende under nomadiske forhold, mens sjukdommen forekommer mer hyppig når de holdes i tette dyrehold og/eller i tett kontakt med storfe (OIE 2014).

Hos kameldyr påvises tuberkuløse prosesser oftest i lunger og thorakallymfeknuter. OIE anfører at alle tilfellene av bovin tuberkulose hos dromedar og kamel (old world camelids) omfatter lunger/thorakallymfeknuter og i 60 % av tilfellene kun lunger/thorakallymfeknuter. I tillegg finner man lesjoner i lever, nyrer, trakea og perikard. En tilsvarende distribusjon av lesjoner er funnet hos lama og alpakka (new world camelids), men denne dokumentasjonen er basert på et mindre materiale sammenlignet med materialet fra «old world camelids».

Bovin tuberkulose og smittefaren til menneske

Det er på verdensbasis en økende insidens av tuberkulose hos menneske forårsaket av *M. bovis*, særlig hos immunsvekkede individer (OIE 2014). *M. bovis*-tuberkulose regnes som en viktig zoonose i dag, og OIE oppgir at 5 - 10 % av human tuberkulose er forårsaket av *M. bovis*. Det er relevant å se til britisk tuberkulosestatistikk for å få et nærmere innblikk i risikoen for å erverve bovin tuberkulose når *M. bovis* er utbredt i dyrepopulasjoner i et land som for øvrig kan sammenlignes med Norge.



Protecting and improving the nation's health

I rapporten «Tuberculosis in the UK, 2014 report» publisert på «Public Health England» sin hjemmeside står følgende:

Among all culture confirmed cases notified in 2013, 97.5% (4,563/4,680) were identified with *Mycobacterium tuberculosis* infection, 0.6% (29/4,680) with *Mycobacterium bovis*, 1.4% (63/4,680) with *Mycobacterium africanum* and 0.5% (25/4,680) with *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) bacteria which were not further differentiated. There were no cases of *Mycobacterium microti*.

Dette indikerer at *M. bovis* har mindre betydning som zoonose i land som kan sammenlignes med Norge, til tross for en omfattende sirkulasjon av bakterien i flere dyrepopulasjoner.

M. bovis har forårsaket alvorlig tuberkulose hos en alpakkaeier i England, og det er fremsatt en hypotese om at kameliders «spytting» og tette forhold til eiere/røkttere kan utgjøre en særlig risiko for overføring av *M. bovis*.

En beskrivelse av det aktuelle kasus

Det ble slakta to lamaer hos en privatperson nord i Rogaland. Dyrene var kjøpt fra besetning A som holdt sau i tillegg til et lite antall lama. De som slakta lamaen brakte levra fra det ene dyret (14 år) til kjøttkontrollen fordi den så «uappetittelig» ut. Veterinæren på kjøttkontrollen sendte 1. februar levra til Veterinærinstituttet i Sandnes og skrev på anamneseskjemaet: «En person kom innom med en lever av en lama han hadde slaktet for De syntes leveren så så uappetittlig ut at de ikke ville spise leveren eller dyret. Jeg arbeider i kjøttkontrollen og har ikke sett en slik lever før. Jeg ville sende den til patologen for at dere kan vurdere den».



Figur 1. Lever fra lama sendt til Veterinærinstituttet i Sandnes. Foto: Svein Gudmundsson.

De to lamaene som ble slakta, henholdsvis 9 og 14 år gamle, hadde A kjøpt fra besetning B i samme område i 2009. Kasuset, ei lamahoppe født i 2002, hadde B kjøpt fra en lamabesetning (besetning C) i Telemark i 2004. Foreldra til kasusdyret var født i Sverige og importert til besetning C. Besetning C har også importert lama fra Danmark.

Lamaen på 9 år var født i besetning B i 2007.

Laboratorieundersøkelser; obduksjon og histologi

Utdrag av obduksjonsrapporten fra Veterinærinstituttet i Sandnes, inklusive histologiske undersøkelser (Svein Gudmundsson; saksnummer 2016-40-4550):

«Multiple irregulære grå- /gulhvite knuter med en tørr kornet snittflate. Knutene varierer i størrelse fra ca. 1 x 1 cm til 0,2 x 0,2 cm og er solitære eller sammenflytende. Lite normalt levervev med forøket tekstur og delvis gummiaktig. Galleganger u.a...».....«Mange av prosessene er tydelig innkapslede (bindevev) og i helhet bærer betennelsen i leveren preg av kronisk betennelse. I prosessene var det sentralt henfall og i mange tilfeller også kalknedslag. Det var moderat forekomst av kjempeceller, men også områder der det var mange eosinofile granulocytter.»

Etter henstilling fra Gudmundsson reiste lokalt Mattilsyn til gården hvor lamaene var slaktet, for om mulig hente flere organer fra det aktuelle dyret. Tredje februar mottok Veterinærinstituttet i Sandnes nytt materiale; deriblant milt, en lungebit, nyre og en rest av lever.

Gudmundsson beskriver reultatene av de siste undersøkelsene slik:

«Materialet var delvis kadaverøst. En liten knute fra lungene ble ZN- og HE-farget. Ingen syrefaste staver funnet, og betennelsesforandringer var ikke assosiert med tuberkulose.»



Figur 2. Snittflate av lever fra lama sendt til Veterinærinstituttet i Sandnes. Foto: Svein Gudmundsson.

Materialet ble sendt til Veterinærinstituttet i Oslo, seksjon for patologi og seksjon for bakteriologi.

På seksjon for patologi ble det gjort histologiske tilleggsundersøkelser av Øyvor Kolbjørnsen som etter undersøkelsene rapporterte følgende:

«Det ble ikke påvist syrefaste staver i ZN-fargede preparater. Seriesnitting med HE-farging, for å se etter parasitter, ga ingen positive funn. Den lille lungeknuten: Ingen forandringer forenlig med tuberkulose»

KONKLUSJON:

Makrofunnene i levra fra lamaen var forenlig med tuberkulose, mens resultatene fra de histologiske undersøkelsene var usikre. Det var indikasjoner for å undersøke levermaterialet videre med dyrking og PCR-diagnostikk.

Laboratorieundersøkelser; bakteriologisk dyrking

Prøver fra levra ble omgående satt opp for dyrking på spesialmedier ved seksjon for bakteriologi. Normalt tar det 8 uker før endelig avlesing finner sted. På grunn av en positiv PCR-prøve (se under) ble dyrkingen, etter oppfordring fra EURL, forlenget til 3 måneder. Prøver ble også sendt til EURL for dyrking.

Både ved Seksjon for bakteriologi og ved EURL i Madrid er nå prøvene avlest etter 3 måneders dyrking. Alle prøvene har er negative for mykobakterier.

KONKLUSJON:

Det er ikke påvist mykobakterier ved dyrking av prøver fra lever fra det aktuelle kasus.

Laboratorieundersøkelser; PCR

PCR er relativt nylig etablert til bruk ved diagnostikk av mykobakterier ved Veterinærinstituttet i Oslo. Metoden påviser ikke selve mikroorganismen, men genmateriale fra den i organer, ekskretter eller sekreter. Fordelene med PCR ved mykobakteriediagnostikk er at metoden gir raske svar, og at den sannsynligvis er noe mer sensitiv enn dyrking på spesialmedier. PCR-metodikken for påvisning av *M. bovis* og *M. tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. africanus*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedi*, *M. microti*, *M. cannetti*) er etablert, men ikke ferdig validert, ved Veterinærinstituttet i Oslo.

Ved Veterinærinstituttet ble prøver fra leverlesjoner undersøkt med to forskjellige RT-PCR metoder (1. EURL QuantiFast® Pathogen, Ref.: EURL *M. bovis*, Spain; og 2. in-house PerfeCTa® qPCR ToughMix, Ref. Agdestein A, et al. 2011).

Resultatene viste at flere av de undersøkte leverprøvene hadde Ct verdi <40 som er grenseverdien for positiv prøve ifølge protokollene (EURL *M. bovis*: 37.6, 39.6, 39.7 og 40.1; In-house PerfeCTa® qPCR ToughMix: 35.5, 36.9, 39.8 og 40.5). Greseverdiene (Ct) her skal være <40 for å være positive. Leverprøvene ble deretter sendt EURL (Spania) og APHA (Storbritannia) for etterprøving av resultatene fra Veterinærinstituttet. Ved EURL og APHA er heller ikke PCR-metodikken validert for undersøkelse av leverprøver fra kamelider.

Ved EURL og APHA ble prøven NVI-2 funnet PCR-positiv for *M. tuberculosis complex/M. bovis* (tabell 1). I alt positivt materiale ble det påvist relativt høye Ct-verdier som indikerer at det var lite DNA til stede i materialet.

PCR-undersøkelsene var rettet mot 3 forskjellige genetiske elementer som alle ble påvist i prøve NVI-2 (IS6110 og IS1081 for MTC og RD4 for *M. bovis*).

KONKLUSJON:

Resultatene og konklusjonene basert på PCR-analyser ved tre laboratorier viser at prøve NVI-2 er **PCR-positiv for *M. tuberculosis complex/M. bovis***. NVI-1 og NVI-2 var begge PCR-positive, mens NVH-4 hadde Ct-verdier > 40 ved Veterinærinstituttet.

Tabell 1. Tabellen viser resultater av 3 leverprøver fra en lama undersøkt med PCR ved EURL og APHA. Leverprøver NVI-2 var positiv for *M. tuberculosis complex* ved EURL og APHA og for *M. bovis* ved APHA.

DNA sample ref	APHA, UK			EURL
	Complex	<i>M. bovis</i>	'Positivity'	
NVI-1	+ve	+ve	Weak	Inconclusive
NVI-2	+ve	+ve	Intermediate	M. tub. complex positive
NVI-4	+ve	?	Inconclusive	Inconclusive

Diagnostiske kriterier

PCR er en relativt ny metode ved diagnostikk av mykobakterier, og positiv dyrkingsprøve har vært og er fremdeles det avgjørende kriteriet for en positiv *M. bovis* diagnose. Dette gjelder også i Spania som har EURL, og hvor *M. bovis* er hyppig forekommende i storfe- og hjorteviltpopulasjonene i landet. I sine dokumenter om bovin tuberkulose anbefaler også OIE å anvende positiv dyrkingsprøve som det avgjørende diagnostiske kriterium for bovin tuberkulose:

[OIE 2009 Manual of Diagnostic test and.... \(CHAPTER 2.4.7. BOVINE TUBERCULOSIS\)](#): "Although direct PCR can produce a rapid result, it is recommended that culture be used in parallel to confirm a viable *M. bovis* infection".

[OIE 2012 Tuberculosis in camelids: a review \(Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz., 2012, 31 \(3\), 899-906 CHAPTER 2.4.7. BOVINE TUBERCULOSIS\)](#): "A definitive diagnosis can be made only at post-mortem examination by demonstration of typical gross lesions, followed by histopathology and confirmatory bacterial culture." "More rapid diagnosis can be made using polymerase chain reaction (PCR) assays."

KONKLUSJON:

Per dags dato kreves det påvisning av selve bakterien ved dyrking for å stille diagnosen bovin tuberkulose/funn av *M. bovis* i Norge.

Veterinærinstituttets vurderinger av det aktuelle kasus

Status per 28.06.2016:

- Det foreligger en PCR-positiv prøve for *M. bovis* fra en lamalever
- Det er svært lite sannsynlig at den PCR-positive prøven skyldes en falsk positiv reaksjon
- Det er ikke påvist levende bakterier eller syrefaste staver i prøver fra den aktuelle levra
- Lamaen (14 år) har mest sannsynlig blitt infisert med *M. bovis* langt tilbake i tid (men dette er det vanskelig å dokumentere)
- Lamaen er født i Norge i en av de tidlig etablerte lamabesetningene. Foreldredyra var importert fra Sverige

- Veterinærinstituttet har informasjon om at foreldredyra ble importert fra en lamabesetning i Skåne, men veit ikke om de var svenskfødte
- Årsaken til de store patologiske forandringene kan skyldes lang tid fra dyret ble smitta til det ble slakta, men parasittvandring mm. kan også ha bidratt til de omfattende patologiske prosessene

Smittemessig vurdering:

- Tuberkulose prosesser i lever hos lama, uten at lunger med tilhørende lmg. er medinddratt, regnes som uvanlig i litteraturen
- Smittetensialet fra innkapslede prosesser i lever, hvorfra man ikke kan påvise levende bakterier, vurderes generelt å ha liten smittemessig betydning for andre dyr, og svært liten betydning for mennesker
- Man kan ikke utelukke et større smittetensial tidligere i sjukdomsforløpet
- Lamaen er født i Norge og må derfor ha blitt smittet her i landet. Følgelig må det ha eksistert et smittetførende individ i en flokk hvor kasus har oppholdt seg
- Veterinærinstituttet anser det som sannsynlig at det finnes tilsvarende kasus, som det som her er beskrevet, i kamelidepopulasjonen i Norge

Veterinærinstituttets anbefalinger

- Veterinærinstituttet anbefaler at det aktuelle kasus ikke rapporteres som et positivt tilfelle av bovin tuberkulose hos lama
- Som oppfølgende tiltak anbefales:
 1. Forsterket overvåking av indeks-besetningen, andre besetninger lamaen har oppholdt seg i samt andre kontaktbesetninger
 2. En intensivering av det etablerte OK-programmet for tuberkulose hvor hensikten er å få innsendt og undersøkt et høyere antall aktuelle kamelidekasus

Ad 1:

Indeksbesetning og besetninger hvor lamaen har vært oppstallet, anbefales fulgt opp med tuberkulintest (storfe og kamelider) samt blodprøver fra kamelider >12 måneder som undersøkes med serologiske tester. Det ser ut til kun å dreie seg om besetningene A, B og C, og ingen av disse ser ut til å holde storfe. Fra Mattilsynet har Veterinærinstituttet fått følgende opplysninger om dyreholdet i besetningene: Besetning A: 2 lamaer på lån, ca. 115 søyer og 100 lam; besetning B: 5 alpakaer, ca. 100 voksne søyer og lam; besetning C: 3 alpakaer og 17 lama.

For indeksbesetning, øvrige besetninger hvor den aktuelle lamaen har vært oppstallet, samt øvrige kontaktbesetninger anbefales det at alle kamelider >12 måneder som dør eller slaktes, obduseres/kontrolleres.

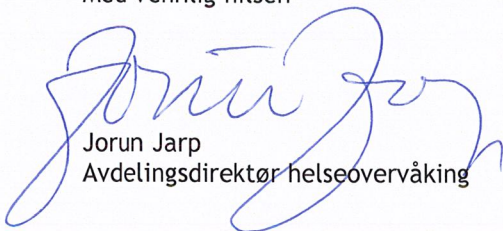
Veterinærinstituttet vil komme tilbake til en nærmere definisjon av kriteriene for karakterisering av kontaktbesetninger når kontaktbesetningene til særlig besetning C er nærmere kartlagt.

Ad 2:

Det er etablert et OK-program for tuberkulose, paratuberkulose og *Psoroptes ovis* for kamelider. Det anbefales at arbeidet med dette OK-programmet («Alle kamelider >12 måneder som dør eller avlives pga. sykdom, bør obduseres/innsendes») intensiveres i hele landet.

Veterinærinstituttet foreslår et møte med Mattilsynet om detaljene i de oppfølgende tiltakene/OK-programmet.

Med vennlig hilsen



Jorun Jarp
Avdelingsdirektør helseovervåking



Tormod Mørk
Fagansvarlig kamelider