Udarbejdet af	Gitte Sørensen (PI), Elisabeth Holm, Charlotte Sværke Jørgensen, Branko Kokotovic, Øystein Angen, Jens Peter Christensen, Anette Boklund
Øvrige deltagere	
Kontaktperson i FVST	Gudrun Sandø

Dato for henvendelse	Dato for svarfrist	Dato for afsendelse	Versionsnummer
27. april 2021	27. maj 2021	27. maj 2021	01

Journalnummer/sagsnummer	FVST	KU	SSI
	2021-28-81-11315	061-0214/21-3680	21/03224

Besvarelse vedr.

Sygdomsovervågning i rugerier og fjerkrævirksomheder i henhold til AHL

Bestilling

I forhold til overvågning for Mycoplasma spp, Salmonella pullorum, S. gallinarum og S. arizona i fjerkræbesætninger i henhold til AHL ønskes en vurdering af,

- hvilken prøvetype (serologi eller bakteriologi) der er mest hensigtsmæssig. Der skal tages højde for, at alle fund skal verificeres med endnu en undersøgelse.
- hvilken prøvetype er mest hensigtsmæssig til verifikationsprøverne. Pt. overvåges serologisk og verifikationsprøverne har været enten serologiske eller bakteriologiske afhængig af situationen.
- Hvad er risikoen for falske positive serologiske prøver?
- Vil det give mening at udtage nye serologiske prøver til verifikation, såfremt der kun er få (f.eks. 1-2) positive reagenter i overvågningsprøverne?
- om det er acceptabelt, at analysere de 60 prøver som samleprøver i sygdomsovervågningen i fjerkrævirksomheder
- i givet fald: hvor mange prøver kan indgå i hver samleprøve?
- hvordan og hvor de 60 prøver skal udvælges

For overvågningen på rugerier, vil vi gerne have en vurdering af,

- om det er tilstrækkeligt at udtage prøver fra én klækkemaskine, når alle æg i klækkemaskinerne stammer fra samme flok?
- om det er acceptabelt, at analysere de 60 prøver som samleprøver i den mikrobiologiske kontrol

Baggrund

Sygdomsovervågningen i rugerier og fjerkrævirksomheder er beskrevet i forordning 2019/2035 bilag II. Fjerkrævirksomheder skal udtage 60 prøver hvert kvartal, som undersøges for Mycoplasma spp. og én gang årligt også for Salmonella pullorum, S. gallinarum og S. arizona (kun kalkuner). Rugerier skal udtage prøver hver 6. uge.

Prøverne skal undersøges serologisk og/eller bakteriologisk (pkt. 2.6 og 3.6). Prøvematrix i fjerkrævirksomheder afhænger af analysen (pkt. 2.4 og 3.4). Det er op til myndighederne at afgøre, hvilken metodik, der skal anvendes og dermed også prøvematrix.

Alle fund skal verificeres, og en flok er først positiv, når en ny prøve er udtaget, analyseret og fundet positiv (pkt. 2.7 og 3.7), uanset om den første prøve er analyseret serologisk eller bakteriologisk. Det er også op til myndighederne at vurdere, om verifikationsprøverne skal undersøges serologisk eller bakteriologisk.

I rugerierne skal der bl.a. udtages prøver af dun, støv og mekonium fra hver klækkemaskine. Det er ikke præciseret, om der skal tages prøver fra samtlige klækkemaskiner, hvis alle æg i klækkemaskinerne stammer fra samme flok, eller om det er tilstrækkeligt at udtage prøver fra én klækkemaskine.

Rugerier skal desuden gennemføre en mikrobiologisk kontrol hver 6. uge med 60 prøver fra miljøet.

Når en flok er positiv i sygdomsovervågningen bliver godkendelsen af virksomheden/rugeriet suspenderet på mistankestadiet. Herefter kan virksomheden ikke udføre rugeæg eller fjerkræ, før suspenderingen er ophævet. Som udgangspunkt omfatter restriktionerne alle æg og dyr på virksomheden.

Bilag

- KOMMISSIONENS DELEGEREDE FORORDNING (EU) 2019/2035 af 28. juni 2019 om supplerende regler til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EU) 2016/429 for så vidt angår regler for virksomheder, der holder landdyr, og rugerier samt sporbarhed for visse opdrættede landdyr og rugeæg
- Bekendtgørelse om fjerkræproduktion og omsætning af fjerkræ (retsinformation.dk) bilag 2
- Action card til håndtering af hønsetyfus
- Uddrag fra Dyresundheds sygdomshåndteringspixi vedr. Mycoplasma

---

Baggrund indført af DK-VET

I teksten refereres til betegnelserne *Salmonella* pullorum og *Salmonella* gallinarum, for god ordens skal det nævnes at hønsetyfus forårsages af *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Gallinarum biokemisk variant (biovar) Pullorum eller *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Gallinarum biokemisk variant (biovar) Gallinarum. Hønsetyfus beskrives ofte som 2 sygdomme “pullorum diasease” (forårsaget af biovar Pullorum) og “fowl typhoid” (forårsaget af biovar Gallinarum). Ved *Salmonella arizonae* forstås *Salmonella enterica* subspecies *arizonae* serogruppe K (O:18).

Svar

DK-VET har besvaret Fødevarestyrelsens spørgsmål nedenfor. Inden besvarelsen blev der holdt et opklarende møde med FVST d. 7. maj 2021, hvor FVST uddybede baggrunden for henvendelsen og forklarede om, at de forventer, at DK-VET i besvarelsen tager udgangspunkt i de nuværende danske regler og procedurer på området. FVST ønsker ikke et strammere regelsæt end dette ved implementering af AHL for sygdomsovervågning i rugerier og fjerkrævirksomheder, da der er tale om kontrol og ikke fritestning. AHL er gældende for samhandel med fjerkræ fra 21. april 2021.

Overvågning for *Mycoplasma spp, Salmonella* pullorum*, S.* gallinarum *og S. arizona* i fjerkræbesætninger

1. Vurdering af hvilken prøvetype (serologi eller bakteriologi) der er mest hensigtsmæssig. Der skal tages højde for, at alle fund skal verificeres med endnu en undersøgelse.

Forslag til overvågning af *Salmonella* pullorum*, S.* gallinarum *og S. arizona* i fjerkræbesætninger

DK-VET vurderer, at serologisk testning vil være mest hensigtsmæssig for overvågning af *Salmonella* pullorum og *Salmonella* gallinarum. Serologisk test for *Salmonella* pullorum og *Salmonella* gallinarum kan anvendes ved overvågning på flok niveau, mens bakteriologisk testning anbefales og er nødvendig for endelig diagnosticering af hønsetyfus (OIE - chapter 3.3.11.).

Med hensyn til *Salmonella arizonae* har laboratoriet ingen erfaring med denne test, da der ikke har været indsendt blodprøver til undersøgelse for *Salmonella arizonae* overvågning i over 30 år. Det har desuden ikke været muligt at finde kommercielle kit til undersøgelsen. I litteraturen nævnes, at antistofniveauet i kalkuner kan være svingende og under detektionsgrænsen i perioder. Det kan overvejes, om det er muligt at anvende en bakteriologisk metode (Shivaprasad, 2013).

Ved påvisning af én eller flere positive sero-reagenter for *Salmonella* pullorum eller *Salmonella* gallinarum kan det anbefales at gentage den serologiske testning ved udtagning af nye blodprøver - optimalt efter ca. 14 dage og mest hensigtsmæssigt ved, at de samme dyr testes på ny, hvis muligt. Hvis der er tegn på kliniske symptomer for hønsetyfus i flokken, betragtes det som en klinisk mistanke, og prøveudtagningen overgår derfor til regelsættet om kliniske mistanker.

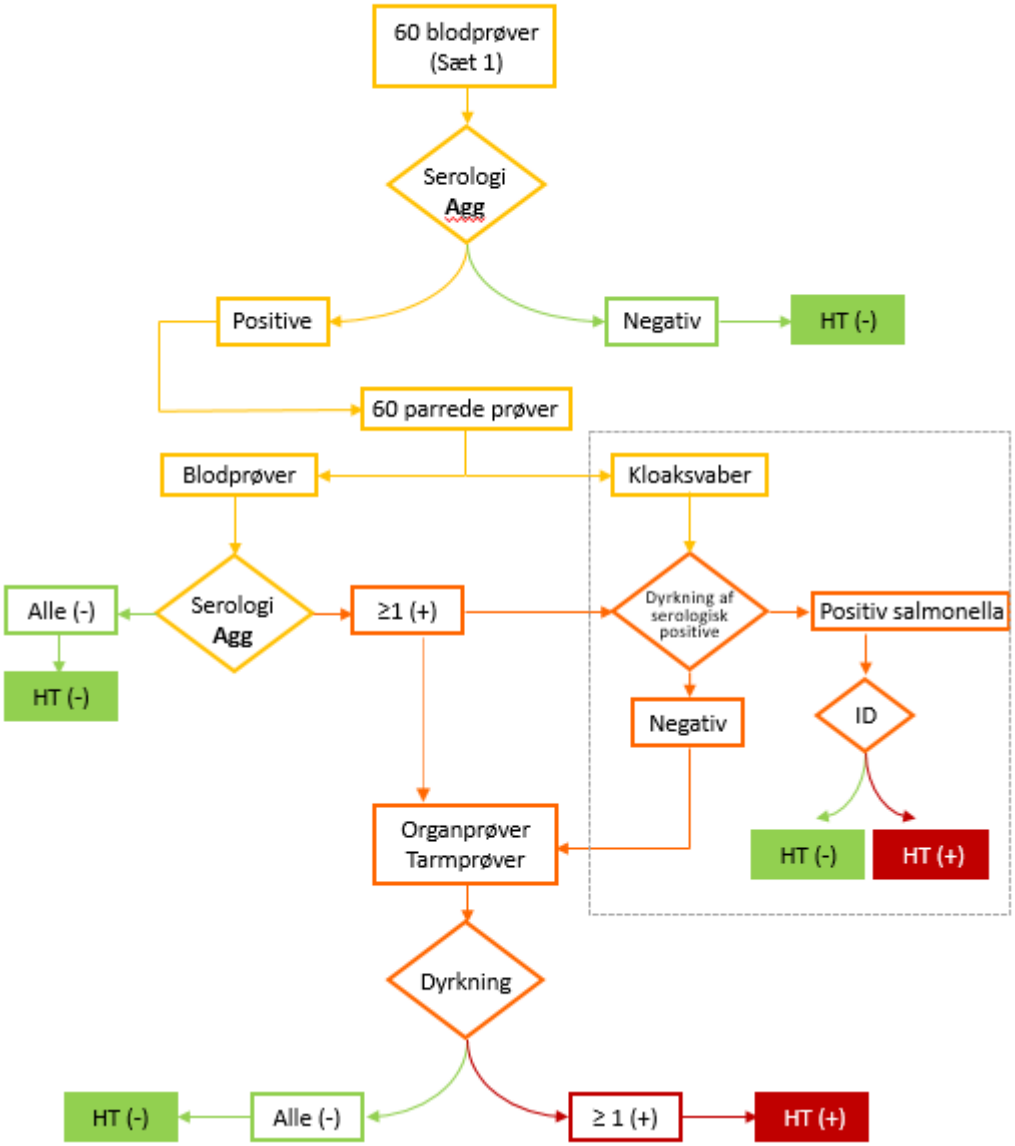
Hvis der i de opfølgende serologiske prøver fortsat påvises positive sero-reagenter, anbefales bakteriologisk testning som verifikationsundersøgelse. Det vurderes, at udvælgelse af dyr med høje titre til obduktion og dyrkningsundersøgelse (OIE; Shivaprasad & Barrow, 2013) vil øge dyrkningsmetodens følsomhed, som ved undersøgelse af prøver fra subkliniske carrier dyr er lav.

Salmonella pullorum og *Salmonella* gallinarum forårsager systemiske infektioner og udskilles kun i ringe grad i fæces, hvorfor organprøver anbefales til verifikationsundersøgelse. En supplerede undersøgelse (indsat i figur nedenfor i stiplet boks) kan eventuelt indføres for vurdering af om serologiske respons kan skyldes krydsreaktion til anden *Salmonella* type, idet kloaksvabere udtages til bakteriologisk undersøgelse fra de samme dyr, som testes med nye blodprøver. Som minimum bør der foretages dyrkning af kloaksvaberprøver fra serologisk positive dyr.

Hvis der i mindst en af disse kloaksvabere påvises hønsetyfus eller anden *Salmonella* type vil en yderligere verifikationsundersøgelse med dyrkning fra organprøver kunne undgås. En sådan situation (hvor dyrkning fra organ- og tarmprøver ikke bliver nødvendig) vil sandsynligvis sjældent forekomme.

Dyrkning fra organ- og tarmprøver kan ikke undlades, hvis der fortsat er sero-reagenter i de nye blodprøver, og der ikke påvises *Salmonella* (hverken pullourum/gallinarum eller zoonotiske *Salmonella* typer) i kloaksvaberprøverne. Det anbefales, at dyr med positiv serologisk test er blandt de dyr, som indsendes til obduktion og dyrkning fra organ- og tarmprøver (inkl. ileo-caecal junction), hvilket kræver at dyrene mærkes og evt. isoleres ved blodprøvetagningen.

Forslag til overvågnings-flow hønsetyfus (HT) infektion i fjerkræbesætninger



HT (-): Hønsetyfus ikke påvist, HT (+): Hønsetyfus påvist.

Det skal desuden nævnes, at bakteriologisk dyrkningsmetode til brug for detektion af *Salmonella* pullorum og *Salmonella* gallinarum er forskellig fra metoden anvendt til zoonotiske *Salmonella* typer. MSRV-medie kan ikke anvendes som selektivt opformeringsmedie, da *Salmonella* pullorum og *Salmonella* gallinarum er ubevægelig, hvorved flydende selektiv opformering kræves. *Salmonella* pullorum og *Salmonella* gallinarum vokser ukarakteristisk og langsommere (i forhold til zoonotiske *Salmonella* typer) på selektive og non-selektive medier og kan generelt være svær at påvise fra prøver med lave niveauer af bakterien (f.eks. fæcesprøver, miljøprøver og organer fra carrier dyr) og ved høje niveauer af følgeflora. Påvisning af bakterien ved dyrkning fra besætninger med kliniske symptomer er derimod typisk uproblematisk, idet målrettet analyse kan foretages fra organprøver med patologiske forandringer indeholdende høje niveauer af bakterien.

Yderligere kan det oplyses, at DK-VET i perioden 1. marts 2019 til d.d. i alt har undersøgt 12 fjerkræbesætninger ved bakteriologisk opfølgning med obduktion og dyrkning fra 60 dyr (eller 120 dyr ved 2 huse) efter serologisk mistanke om hønsetyfus. Dette dækker 4 besætninger, hvor agglutinationstesten er udført på SSI (efter 1. jan 2020) og 8 besætninger, hvor DTU har foretaget agglutinationstesten (før 1. januar 2020) eller, hvor serologisk testning har været med MIX-Elisa på DTU. I ingen af sagerne blev der påvist hønsetyfus ved dyrkning af 12 organpool og 12 tarmpool per 60 dyr.

Derudover har der i perioden fra 1. januar 2020 til d.d. været 8 sager (ud af i alt 84 sager) med 1-3 positive sero-reagenter, som er blevet undersøgt serologisk 2 til 3 gange før alle 60 blodprøver var uden positive reagenter for hønsetyfus, og hvor der ikke blev foretaget bakteriologisk opfølgning.

Forslag til procedure til overvågning for *Mycoplasma spp.* infektion i fjerkræbesætninger

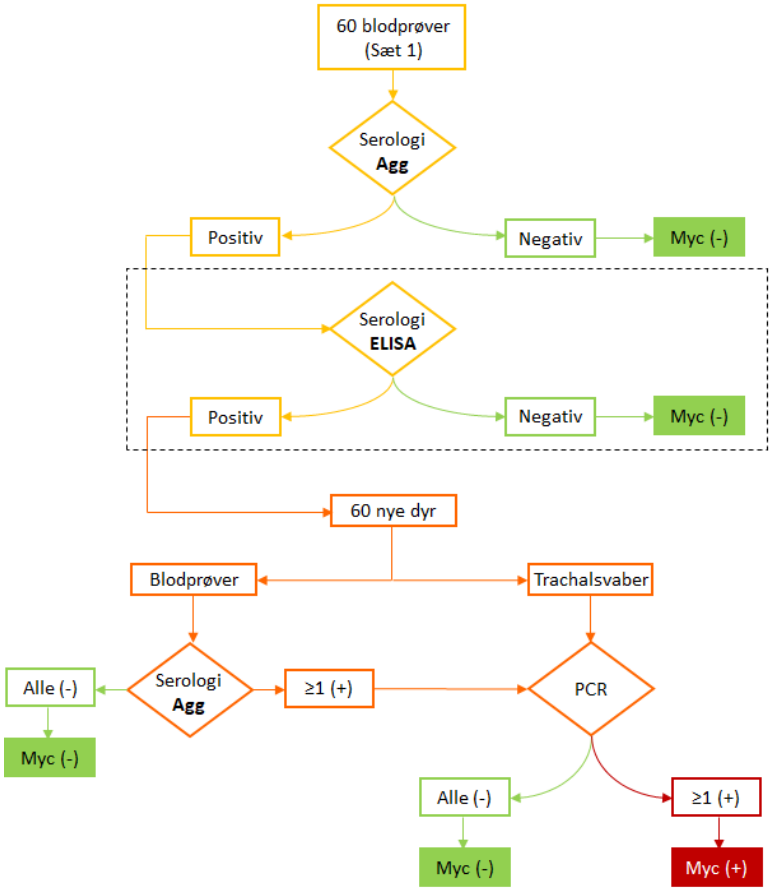
Den primære screening for *Mycoplasma* spp. foregår normalt ved anvendelse af agglutinationstest på blodprøver, hvor antal og udtagelsesfrekvens svarer til det, der er angivet i *Bilag II* af FORORDNING (EU) 2019/2035.

I tilfælde af én eller flere positive resultater fra den primære screening foreslås at udtage nye prøver i besætningen. Optimalt udtages denne gang både blod og trachealsvaber af de samme dyr (dyr og prøver mærkes individuelt) og fra det samme antal af fugle som ved den primære screening.
I tilfælde af et negativt resultat i agglutinationstesten afsluttes sagen uden videre opfølgning. I tilfælde af positive resultater i den serologiske test bør alle trachealsvaberprøver undersøges ved PCR for evt. verifikation af det positive serologiske resultat (Feberwee *et al* 2005, Evans *et al* 2009). Ganespaltesvaber kan anvendes som alternativ til trachealsvaber. Tidligere studier har vist at ganespaltesvaber er velegnet til dyrkningsundersøgelser (García et al 2005, OIE) og Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (Hennigan et al 2012), men der mangler data om direkte sammenligning af PCR påvisning af *Mycoplasma* spp. i ganespalte- og trachealsvaber.

Det kan overvejes at indføre en konfirmatorisk serologisk test (kommerciel ELISA) [indsat i figur nedenfor i stiplet boks), som kan anvendes ved positiv reaktion i den indledende pladeagglutinationstest.

I perioden fra 1. januar 2020 til d.d. har der været i alt 5 positive sager (ud af i alt 149 sager), heraf 4 sager med 1 positiv prøve og 1 med 5 positive prøver. Alle disse sager er efterfølgende fundet negative ved fornyede blodprøver.

Forslag til overvågnings-flow Mycoplasma spp. infektion i fjerkræbesætninger



Myc (-): Mycoplasma ikke påvist, Myc (+): Mycoplasma påvist.

---

2. Vurdering af hvilken prøvetype er mest hensigtsmæssig til verifikationsprøverne. Pt. overvåges serologisk og verifikationsprøverne har været enten serologiske eller bakteriologiske afhængig af situationen.

For svar på dette spørgsmål henvises til pkt. 1.

---

3. Hvad er risikoen for falske positive serologiske prøver?

Sensitiviteten og specificiteten af *Salmonella* pullorum/gallinarum agglutinationstesten er ikke beskrevet. Men det er kendt at *Salmonella* pullorum/gallinarum (O:9,12), pga. fælles O-gruppe D antigener, vil kunne krydsreagere med *Salmonella* Typhimurium (O:4,12) og Enteritidis (O:9,12).

Sensitiviteten og specificiteten af *Mycoplasma gallisepticum* agglutinationstesten er ikke beskrevet, men det er kendt, at der kan være krydsreaktioner til bl.a. *Mycoplasma synoviae*.

---

4. Vil det give mening at udtage nye serologiske prøver til verifikation, såfremt der kun er få (f.eks. 1-2) positive reagenter i overvågningsprøverne?

For svar på dette spørgsmål henvises til pkt. 1.

---

5. Vurdering af om det er acceptabelt, at analysere de 60 prøver som samleprøver i sygdomsovervågningen i fjerkrævirksomheder.

DK-VET vurderer, at det ikke er muligt at anvende samleprøver til serologiske undersøgelser.

For den bakteriologiske testning af hønsetyfus ved dyrkning vurderes det som acceptabelt at analysere som samleprøve (OIE). Det forudsætter dog, at prøverne som samles til analyse, indeholder samme niveau af følgeflora. Der skal ikke foretages samling mellem prøver med høj forekomst af følgeflora (tarmprøver, kloaksvabere, fæces/mekonium prøver og diverse miljøprøver) og prøver med lav forekomst af følgeflora (organprøver, embryoner døde i ægget).

For den konfirmatoriske undersøgelse for *Mycoplasma* spp ved PCR er det acceptabelt at analysere trachealsvaber som samleprøver (OIE). Der findes ikke data i litteraturen, hvorvidt ganespaltesvaber er egnet til undersøgelse som samleprøver.

---

6. i givet fald: vurdering af hvor mange prøver kan indgå i hver samleprøve? Samt hvordan og hvor de 60 prøver skal udvælges.

Ved dyrkning for hønsetyfus vurderes det, at organmateriale fra op til 5 dyr kan samles (OIE) og undersøges i prøvemængder af 25 gram til nonselektiv og /eller selektiv opformering.

Ved PCR for påvisning af *Mycoplasma* spp kan der indgå tre trachealsvabere i hver samleprøve (OIE). Hvis man indsender ganespaltesvaber mhp konfirmatorisk undersøgelse, anbefales det at undersøge prøver enkeltvist i stedet som samleprøver.

Se også pkt. 1 og pkt. 5.

Overvågningen for *Salmonella* pullorum, *S.* gallinarum *og S. arizona* på rugerier

---

7. Vurdering af om det er tilstrækkeligt at udtage prøver fra én klækkemaskine, når alle æg i klækkemaskinerne stammer fra samme flok.

Det vurderes som tilstrækkeligt at udtage prøver fra én klækkemaskine, når alle æg i klækkemaskinerne stammer fra samme flok, hvis prøverne dækker flokken repræsentativt. Prøvetagning fra klækkemaskiner, som fastsat og kendt fra BEK nr. 782 (bekendtgørelse om bekæmpelse af *Salmonella* i rugeægsproceducerende høns og kalkuner samt opdræt hertil) vurderes som anvendelig.

8. Vurdering af om det er acceptabelt, at analysere de 60 prøver som samleprøver i den mikrobiologiske kontrol.

DK-VET kan ikke besvare dette spørgsmål, da vi mangler informationer om, hvilken bakteriologisk analyse/kontrol de 60 prøver (hygiejneprøver) skal underkastes.

Generelt kan samling af prøver foretages ved analyse for specifikke patogener, mens det umiddelbart ikke vil være hensigtsmæssigt eller muligt, hvis den mikrobiologiske kontrol baseres på kimtalsundersøgelser.

Referencer

Evans J.D., D.L. Thornton and S.L. Branton. 2009. Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* from a Broiler Breeder Flock: Comparison of Three Diagnostics Methods. International Journal of Poultry Science 8: 104-107.

Feberwee, A., D. R. Mekkes, J. J. de Wit, E. G. Hartman, A. Pijpers. 2005. Comparison of Culture, PCR, and Different Serologic Tests for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Infections. Avian Dis 49: 260–268.

García, M. N. Ikuta, S. Levisohn, S. H. Kleven. 2005. Evaluation and Comparison of Various PCR Methods for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens. Avian Dis 49: 125-132.

Hennigan, S.L., J.D. Driskell, N. Ferguson-Noel, R.A. Dluhy, Y. Zhao, R.A. Tripp, D.C. Krause. 2012. Detection and Differentiation of Avian Mycoplasmas by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Based on a Silver Nanorod Array. Appl Environ Microbiol 78:1930-1935

KOMMISSIONENS DELEGEREDE FORORDNING (EU) 2019/2035 af 28. juni 2019 om supplerende regler til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EU) 2016/429 for så vidt angår regler for virksomheder, der holder landdyr, og rugerier samt sporbarhed for visse opdrættede landdyr og rugeæg

OIE Terrestrial Manual, Chapter 3.3.5 Avian Mycoplasmosis, pp. 844-859
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.05_%20AVIAN_MYCO.pdf

OIE Terrestrial Manual, Chapter 3.3.11 Fowl Typhoid and Pullorum Disease, pp. 914-930
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.11_FOWL_TYPHOID.pdf

Shivaprasad, H.L., Arizonosis, in: The 13th edition of *Diseases of Poultry.* Editor in chief, David E. Swayne, associate editors: J.R. Glisson; L.R. McDougald; L. K. Nolan; D.L. Suarez and V. Nair. Wiley-Blackwell (2013). Pp 706-713