

Diagnostiek van rundertuberculose

De bestrijding van tuberculose wordt geregeld bij het koninklijk besluit van 17 oktober 2002.

1. Tuberculinatie

In de eerste fase van een infectie met rundertuberculose (*Mycobacterium bovis*) overheerst de cellulaire immuniteit. Pas in een later stadium kan eveneens een humorale reactie serologisch worden aangetoond. De maximale cellulaire immunerespons wordt bij een geïnfecteerd rund 8 tot 65 dagen na een infectie bereikt. De meest gebruikte methode voor de vaststelling van rundertuberculose namelijk de intradermale tuberculinatie is hierop gebaseerd. Deze methode kan al binnen enkele weken na een infectie positieve resultaten opleveren. Bij een tuberculinatie wordt een dosis mycobacterium-antigeen (tuberculine) in de diepere huid ingespoten. De tuberculinatie kan enkelvoudig of vergelijkend worden uitgevoerd. Een enkelvoudige tuberculinatie wordt uitgevoerd door de bedrijfsdierenarts, een vergelijkende door een officiële dierenarts van de PCE of door de bedrijfsdierenarts in opdracht van de PCE. Bij een enkelvoudige tuberculinatie wordt boviene (B) tuberculine intradermaal ingespoten. Bij een vergelijkende tuberculinatie wordt op twee verschillende plaatsen boviene (B) en aviaire (A) tuberculine intradermaal geïnjecteerd. De vergelijkende tuberculinatie is minder gevoelig, maar meer specifiek dan de enkelvoudige. Meestal wordt een dier dat positief reageert op een enkelvoudige tuberculinatie nadien vergelijkend getuberculineerd. Deze tweede tuberculinatie kan ten vroegste 6 weken na de eerste worden uitgevoerd om problemen met desensibilisatie te vermijden.

Verwittiging van de uitvoering en de rapportering van de aflezing van de resultaten van de tuberculinatie

- Met uitzondering van de verplichte tuberculinatie bij aankoop, informeert de dierenarts de PCE vooraf van de datum van de uit te voeren tuberculinaties. ARSIA/DGZ geven de opdrachten in het kader van de wintercampagne. De PCE geeft de opdrachten voor andere tuberculinaties;
- De melding van de datum van uitvoering en van de geplande aflezing van de resultaten door de dierenarts gebeurt via fax of per e-mail aan de PCE ten laatste op de dag van de uitvoering van de tuberculinatie met het document dat met de opdracht werd overgemaakt;
- Twijfelachtige of positieve resultaten moeten onmiddellijk rechtstreeks aan de PCE worden gemeld per fax of per e-mail met hetzelfde document;
- Negatieve resultaten worden per e-mail, fax of post met hetzelfde document overgemaakt aan de opdrachtgever, hetzij ARSIA/DGZ bij tuberculinaties uitgevoerd in het kader van de wintercampagne in opdracht van ARSIA/DGZ (binnen de 2 werkdagen na aflezing), hetzij aan de PCE bij tuberculinaties in opdracht van de PCE (binnen de 7 dagen na aflezing);
- De PCE zal controles uitvoeren op een correcte uitvoering van de tuberculinatie(s).

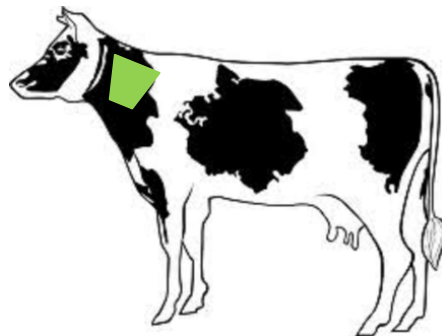
Tuberculine

- Voor de uitvoering van de tuberculinaties maakt de dierenarts uitsluitend gebruik van de door het CODA gratis afgeleverde tuberculine;
- De aanvraag van de tuberculine gebeurt door de dierenarts met het document "[Aanvraag tuberculine](#)" dat voor akkoord wordt overgemaakt aan de PCE waartoe de dierenarts behoort;
- Mits akkoord wordt de aanvraag door de PCE overgemaakt aan het CODA;
- De tuberculine wordt door het CODA verstuurd naar de bedrijfsdierenarts;
- De tuberculine moet bij een temperatuur van 2°C tot 8°C worden bewaard en beschermt tegen invloed van licht;
- Voor ieder gebruik van tuberculine moet de vervaldatum worden gecontroleerd en gerespecteerd;

- De bedrijfsdierenarts dient het gebruik van tuberculine minstens gedurende 3 jaar chronologisch bij te houden aan de hand van de volgende gegevens:
 - Volgnummer
 - Beslagnummer
 - Datum van uitvoering van de tuberculinatatie;
 - Datum van aflezing van de tuberculinatatie;
 - Reden van tuberculinatatie: individuele tuberculinatatie (aankoop, aankoop import risicoland, opvolging import risicoland, hercontrole, verdenking,...), staltuberculinatatie (wintercampagne, directe verkoop rauwe melk, opvolging verdenking, opvolging haard);
 - Aantal getuberculineerde dieren;
 - Resultaat van de aflezing: aantal negatieve/twijfelachtige/positieve resultaten;
 - Lotnummer van de tuberculine;
 - Vervaldatum van de tuberculine.

Uitvoering van de tuberculinatatie

- Het in bedwang houden van de dieren valt onder de verantwoordelijkheid van de rundveehouder en moet door hem/haar worden uitgevoerd op vraag van de dierenarts;
- De dierenarts gaat na (vraagt aan veehouder en controleert fysiek) of er geen enkele behandeling, injectie, vaccinatie werd uitgevoerd in de zone waar de tuberculinatatie zal worden uitgevoerd die met deze laatste zou kunnen interfereren;
- De dierenarts gaat na of er geen huidletsel aanwezig is of een gezwel/knobbel in de zone waar de tuberculinatatie zal worden uitgevoerd;
- De tuberculinatatie moet ter hoogte van de hals in het middenste derde worden uitgevoerd:



- Voor een correcte uitvoering van de tuberculinatatie dient de (intacte) huid vooraf gereinigd en geschoren te worden (scheermachine, scheermes, schaar). In ieder geval moet deze plaats duidelijk zichtbaar zijn door de afwezigheid van haren en moet de plaats van tuberculinatatie kunnen worden gelokaliseerd. Bij het scheren moeten bloedingen worden vermeden;
- Bij een enkelvoudige tuberculinatatie wordt 2.000 IE boviene tuberculine (0.1ml) intradermaal ingespoten met een revolverspuit met naald of onder druk met een Dermojet. In beide gevallen wordt direct na de injectie een lichte zwelling van de huid zicht- en voelbaar op de injectieplaats. Wettelijk is enkel de injectie van de tuberculine met de revolverspuit met naald voorzien doch het gebruik van de Dermojet wordt eveneens toegelaten in afwachting van de aanpassing van het koninklijk besluit van 17 oktober 2002;
- Indien de intradermale injectie niet correct kan/kon worden uitgevoerd, moet een nieuwe injectieplaats gekozen worden aan de andere zijde van de nek van het dier en deze wijziging wordt duidelijk genoteerd;

- De dierenarts is verantwoordelijk voor een correcte werking van de revolverspuit of de Dermojet. Vooral dit laatste apparaat moet regelmatig worden gecontroleerd op een correcte werking.

Aflezings van het resultaat van de tuberculatie.

- 72 uur na de tuberculatie moet het resultaat worden afgelezen.
- Praktisch wordt de huiddikte van de intacte huid opgemeten juist boven de injectieplaats op de dag van de aflezing (zie foto) en wordt de huiddikte ter hoogte van de injectieplaats of de zwelling direct hierna opgemeten. Beide metingen worden hierbij genoteerd samen met het volledige oormerknummer van het dier;



- De interpretatie van de tuberculatie gebeurt door:
 - Een kwantitatieve aflezing: vaststelling van pijnlijke reacties, diffuus of uitgebreid oedeem, exsudatie, necrose of ontsteking van de injectieplaats of de lymfwegen of lymfeknopen moeten als positief worden beschouwd
 - Een kwantitatieve aflezing: door de huiddikte te meten ter hoogte van de injectieplaats en de toename in huiddikte te berekenen ten opzichte van de eerder opgemeten normale huiddikte. De interpretatie van de metingen gebeurt als volgt:
 - Voor de enkelvoudige tuberculatie: indien de toename
 - < 2mm = negatief
 - 2 – 4mm = twijfelachtig
 - > 4mm = positief
 - Voor de vergelijkende tuberculatie
 - B negatief = negatief
 - B < A = negatief
 - B 1 – 4mm > A = twijfelachtig
 - B 4mm > A = positief

PS *Mycobacterium avium* en andere Mycobacteriën kunnen ook aanleiding geven tot positieve reacties bij de enkelvoudige tuberculatie.

Twijfelachtige of positieve resultaten moeten steeds direct aan de PCE worden gemeld per fax of per e-mail. Hierna volgen de contactgegevens van de verschillende PCE's:

<u>PCE</u>	<u>E-mail adres</u>	<u>N° fax</u>
Antwerpen	pri.ant@favv.be	03/202.27.90
Vlaams-Brabant	pri.vbr@favv.be	016/39.01.05
Waals-Brabant	pri.brw@afsca.be	010/42.13.80
Oost-Vlaanderen	pri.ovl@favv.be	09/210.13.20
West-Vlaanderen	pri.wvl@favv.be	050/30.37.12
Henegouwen	pri.hai@afsca.be	065/40.62.10
Luik	pri.lie@afsca.be	04/224.59.01
Limburg	pri.lim@favv.be	011/26.39.85
Luxemburg	pri.lux@afsca.be	061/21.00.79
Namen	pri.nam@afsca.be	081/20.62.02

Veehouders en dierenartsen uit Brussel kunnen de PCE Vlaams-Brabant contacteren.

2. Cultuur voor bacteriologisch onderzoek

De onderzoeken via cultuur worden uitgevoerd in het CODA. Dieren die positief/twijfelachtig reageren bij een tuberculatie kunnen op bevel worden afgeslacht. De diagnose van rundertuberculose kan alleen definitief worden vastgesteld na een post-mortem onderzoek waarbij *M. bovis* na kweek wordt aangetoond. Van een aangetast, een verdacht aangetast of een verdacht besmet rund worden monsters van lymfeklieren, longen of verdachte letsels genomen voor het inzetten van een **cultuur** op *M. bovis*. Hoewel de groei van de kiem op cultuur lang kan duren (tot 2 maanden voor *M. bovis* vooraleer een zeker resultaat wordt bekomen), wordt deze methode nog steeds als "gouden standaard" aangenomen en gebruikt ter bevestiging of ontkenning van een besmetting. Bij sommige culturen begint de groei van de kiem op het selectief milieu pas enkele weken na de opstart. Bij andere culturen kan de aanwezigheid van een mycobacterie reeds na 2 weken worden bevestigd via PCR.

Op verdachte letsels wordt een **kleuring** (zuurvaste kiemen) uitgevoerd. Deze methode is indicatief en moet worden bevestigd met een cultuur van de kiem.

Bij afwezigheid van macroscopische letsels bij het post-mortemonderzoek in geval van een afslachting op bevel van verdacht aangetaste, verdacht besmette of aangetaste dieren wordt toch een cultuur uitgevoerd op een pool van weefsels of organen om een mogelijke besmetting aan te tonen die visueel nog niet zichtbaar is.

3. Gamma-interferontest

Aanvullend met de tuberculatie kan de gamma-interferontest worden gebruikt. Bij dieren geïnfecteerd met *M. bovis* zijn de in het bloed circulerende lymfocyten gesensibiliseerd voor mycobacteriële antigenen. Wanneer deze cellen *in vitro* in aanraking worden gebracht met diagnostische (boviene of aviaire PPD- (Protein Purified Derivatives) tuberculines) of met specifieke antigenen (CFP10, ESAT6, MBP70), zullen zij gamma-interferon uitscheiden. Het gamma-interferon kan vervolgens met een ELISA worden aangetoond. De test wordt op ongestold bloed uitgevoerd.

Voordelen van deze test zijn dat er maar één bedrijfsbezoek nodig is (voor de bemonstering) en de uitslag snel kan volgen (24 uur). Deze test zou ook zeer snel na een infectie (vanaf 2 weken) een stijging in gamma-interferon kunnen detecteren. Nadelen zijn de hoge kostprijs van de test en de logistieke problemen die de test met zich meebrengt. Lymfocyten hebben slechts een beperkte levensduur en moeten bij voorkeur binnen de 8 uur na de bemonstering in het referentielaboratorium CODA worden behandeld. Het CODA dient vooraf te worden verwittigd dat er bloedmonsters zullen worden overgemaakt voor onderzoek met de gamma-interferontest.

In de praktijk wordt deze test enkel door de officiële dierenartsen van de PCE gebruikt. Het CODA voert op dit moment bijkomende onderzoeken uit om deze test in de toekomst in serie of parallel te kunnen gebruiken met de tuberculatie of eventueel apart te gebruiken voor een detectie van besmette dieren.

4. ELISA

De humorale respons na een infectie kan ook gemeten worden via een serologische test op bloed. Nadeel zijn de zeer lage gevoeligheid en de lage specificiteit van de beschikbare commerciële tests die resulteren in respectievelijk een te groot aantal vals negatieve en vals positieve resultaten. Deze laatste worden veroorzaakt doordat er gebruik gemaakt wordt van ruwe antigeenfracties van *M. bovis* of door kruisreactie met antigenen die ook voorkomen bij andere in het milieu aanwezige mycobacteriën.

5. PCR

Een **PCR** kan worden gebruikt voor de directe detectie van mycobacteriën op een cultuur (vroegtijdige diagnose bij snelle groei op een cultuur van 2 weken of laattijdige diagnose op een cultuur van 2 maanden) of op verdacht of normaal weefselmateriaal dat besmet is met rundertuberculose.

6. Moleculaire typering van de isolaten

Sinds 1995 worden alle veldisolaten van *M. bovis* genetisch getypeerd. Het referentielaboratorium CODA gebruikt hiervoor de **spoligotypering** en **RFLP**-methoden met additioneel sinds enkele jaren de **MIRU-VNTR**-techniek. Het meest voorkomende spoligotype in België is SB-0162 dat voorkomt bij 40% van de veldisolaten. Deze typering ondersteunen het epidemiologisch onderzoek en kunnen helpen om verbanden aan te tonen tussen verschillende gevallen of haarden en dit soms over vele jaren heen.