

Advies 12-2016

Onderwerp:

**Evaluatie van het Belgische boviene tuberculose  
bewakingsprogramma**  
SciCom 2015/11

Wetenschappelijk advies goedgekeurd door het Wetenschappelijk Comité op 17 juni 2016.

**Key terms:** *Mycobacterium bovis* – bovine tuberculosis – surveillance – diagnostic tests – epidemiology

**Sleutelwoorden:** *Mycobacterium bovis* – boviene tuberculose – bewaking – diagnostische testen – epidemiologie

**Mots clés:** *Mycobacterium bovis* – tuberculose bovine – surveillance – tests diagnostiques – épidémiologie

## Inhoud

|   |    |
|---|----|
| Uitgebreide samenvatting.....   | 4  |
| Executive summary .....   | 8  |
| 1 Referentietermen.....   | 11 |
| 1.1 Achtergrond en gestelde vragen.....   | 11 |
| 1.2 Methodologie.....   | 13 |
| 2 Inleiding .....   | 13 |
| 3 Huidige bTB maatregelen in België .....   | 14 |
| 4 Evaluatie van de huidige diagnostische testen voor de detectie van bTB .....  | 14 |
| 5 Evaluatie van het huidige bTB bewakingsprogramma in België .....  | 15 |
| 5.1 ‘Scenario tree’ analyse .....   | 15 |
| 5.2 Verwacht aantal echte en vals positieve reacties.....   | 16 |
| 5.3 Schatting van directe en indirecte kosten van bTB bewaking .....  | 16 |
| 5.4 Conclusie .....   | 16 |
| 6 Antwoord op de verschillende vragen geformuleerd in de referentietermen .....   | 17 |
| 6.1 Evaluatie van het huidige bewakingsprogramma:.....  | 17 |
| 6.1.1 Met welke risicofactoren kan bij het systematisch post-mortemonderzoek van slachtrunderen rekening worden gehouden om de detectie van tuberculosegevallen te verbeteren?.....   | 17 |
| 6.1.2 Met welke risicofactoren (leeftijd, categorie dieren, type bedrijf, ...) zou bij het uitvoeren van aankooptuberculinaties rekening kunnen worden gehouden? Heeft het onderzoek via aankooptuberculinaties, zoals ze op dit moment door de praktijkdierenartsen wordt uitgevoerd, nut in het kader van de bewaking?..... | 18 |
| 6.1.3 Met welke risicofactoren zou rekening kunnen worden gehouden om proportionele maatregelen te nemen in geval van een verdenking?.....  | 18 |
| 6.1.4 Is de opvolging van melkproducerende dieren op beslagen met de verkoop van rauwe melk nog zinvol in de huidige epidemiologische situatie?.....  | 19 |
| 6.1.5 Met welke risicofactoren (leeftijd, categorie dieren, type bedrijf o.a. zuivere vestmesting, ...) zou rekening kunnen worden gehouden bij de opvolging via staltuberculinaties van vroegere haarden, contactbeslagen of verdachte beslagen en kan deze peiler uit de bewaking worden geoptimaliseerd?.....              | 19 |
| 6.1.6 Is het risico bij aanvoer van runderen afkomstig uit officiële vrije lidstaten met een belangrijk aantal haarden of zones met een verhoogde tuberculoseproblematiek groter dan bij aanvoer van runderen uit de nationale handel?.....   | 19 |
| 6.2 Evaluatie van de huidige diagnostische methoden voor de detectie van rundertuberculose op basis van de analytische en diagnostische performantie-eigenschappen van de verschillende testen en het ‘fit-for-purposegebruik’ teneinde de bewaking zo efficiënt mogelijk te laten verlopen.....                              | 19 |
| 6.2.1 Intradermale huidtest (tuberculinaties):.....   | 19 |
| 6.2.2 Kan de huidige cultuurmethode worden geoptimaliseerd om de groei van Mycobacterium bovis te versnellen en een vroegere ontkenning of bevestiging door kiemgroei met isolatie en identificatie te bekomen? .....   | 21 |
| 6.2.3 Voldoen de testkarakteristieken van de huidige PCR’s om als screenings- of bevestigingstest te gebruiken zonder de resultaten van de cultuur af te wachten?.....  | 21 |
| 6.2.4 Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) test.....   | 21 |
| 6.2.5 Kunnen de beschikbare commerciële Antistoffen ELISA’s zinvol worden gebruikt in België? 23  |    |
| 6.2.6 Kan de voorgelegde beslissingsboom met gebruik van de tuberculinaties en de gamma-interferon test worden gevalideerd? .....   | 23 |
| 6.3 Evaluatie van voorstellen tot wijzigingen in het huidige koninklijk besluit van 17 oktober 2002 betreffende de bestrijding van rundertuberculose: .....   | 24 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 6.3.1 | Invoegen van het verplicht melden van Mycobacterium bovis en tuberculosis bij diersoorten andere dan runderen. Dienen er bij vaststelling bij andere diersoorten (honden, katten, schapen, geiten, exotische dieren, wilde dieren, andere gedomesticeerde dieren, zoodieren (olifant)) maatregelen te worden genomen, onder andere als op hetzelfde bedrijf runderen worden gehouden? ..... | 24 |
| 6.3.2 | Eventueel invoegen van andere mycobacteria buiten Mycobacterium bovis zoals nu enkel voorzien is in het huidige besluit: M. caprae, M. tuberculosis of andere Mycobacteria. ...   | 24 |
| 6.3.3 | Samenvoeging van de definities ‘verdacht aangetast’ en ‘verdacht besmet’ .....  | 24 |
| 6.3.4 | Voorstellen tot proportionele maatregelen in geval van een verdenking op dier- en op beslagniveau die gebaseerd zijn op het epidemiologisch onderzoek en op een risicobeoordeling.  | 25 |
| 6.3.5 | Diagnostiek: het wettelijk voorzien van het gebruik van de interferon-gamma test, PCR en moleculaire technieken voor genetische profilering. ....   | 25 |
| 6.3.6 | Aanpassing en verduidelijking van de minimumleeftijd voor de tuberculatie bij aankoop en bij staltuberculatie.....  | 25 |
| 6.3.7 | Pijlers van de bewaking aanpassen met bijzondere aandacht voor de tuberculaties bij aankoop.....  | 26 |
| 6.4   | Evaluatie van het Tuberculose Actieplan .....   | 26 |
| 7     | Aanbevelingen voor het toekomstige bTB bewakingsprogramma .....   | 26 |
| 8     | Conclusie .....   | 27 |
|       | Referenties .....   | 28 |
|       | Voorstelling van het Wetenschappelijk Comité van het FAVV .....   | 31 |
|       | Leden van het Wetenschappelijk Comité.....  | 31 |
|       | Belangenconflict.....   | 31 |
|       | Dankbetuiging .....   | 32 |
|       | Samenstelling van de werkgroep .....  | 33 |
|       | Wettelijk kader .....   | 33 |
|       | Disclaimer .....  | 33 |

## Uitgebreide samenvatting

### Achtergrond en referentietermen

Boviene tuberculose (bTB) of rundertuberculose is een infectieuze zoönotische ziekte veroorzaakt door *Mycobacterium bovis* die voorkomt bij runderen, andere gedomesticeerde dieren en wilde fauna. Mensen worden voornamelijk blootgesteld door de consumptie van rauwe melk en rauwmelkse producten of via contact met dieren (aerosol). bTB is een officieel aangifteplichtige ziekte.

Het bewakingsprogramma voor boviene tuberculose in België is reeds enkele jaren oud en is gebaseerd op passieve klinische bewaking en routine diagnostische testen. Ondanks het feit dat België vrij is van bTB sinds 2003, worden er toch jaarlijks één of enkele uitbraken gedetecteerd. Vanuit economisch standpunt is het zeer belangrijk dat België zijn officiële tuberculose vrije status behoudt om een vlotte intracommunautaire handel toe te laten.

De epidemiologische evolutie in een aantal buurlanden heeft aangetoond dat, wanneer de waakzaamheid voor bTB in gedomesticeerde dieren afneemt, bTB terug kan uitbreken. Bovendien kan deze afnemende waakzaamheid leiden tot een 'spill-over' van bTB naar wilde fauna waardoor de controle van bTB nog moeilijker wordt. Een aantal stakeholders hebben recent een aantal problemen in verband met hun rol in het huidige bTB bewakingsprogramma aangekaart.

Het Wetenschappelijk Comité wordt gevraagd om een grondige evaluatie van het huidige bTB bewakingsprogramma uit te voeren. Naast een algemene evaluatie, zijn er ook een groot aantal specifieke vragen voorgelegd aan het Wetenschappelijk Comité.

### Methodologie

De evaluatie is gebaseerd op simulatieoefeningen (scenario tree analyse om de gevoeligheid van elke bewakingscomponent te evalueren), een 'benchmarking'-studie die het verwachte aantal positieve dieren vergelijkt met het werkelijk aantal gemelde positieve dieren en een schatting van de directe en indirecte kosten van de bewaking.

Verder bevat dit advies een beoordeling van de bestaande diagnostische technieken voor bTB en de risicofactoren waarmee dient rekening te worden gehouden bij bTB bewaking. Deze beoordeling is gebaseerd op de beschikbare kennis in de wetenschappelijke literatuur en op expertopinie.

Tenslotte worden een aantal aanbevelingen betreffende de bTB bewaking geformuleerd.

### Literatuuronderzoek: diagnostische testen en risicofactoren

Het Wetenschappelijk Comité heeft een grondig literatuurstudie uitgevoerd om de verschillende diagnostische technieken voor bTB, die kunnen gebruikt worden voor bTB bewaking in België, te karakteriseren en te evalueren.

**De intradermale huidtest** of 'vertraagde hypersensitiviteitstest' omvat de intradermale injectie van boviene tuberculine 'purified protein derivative' (PPD) en vervolgens de detectie van eventuele zwelling (vertraagde hypersensitiviteit) op de injectieplaats 72 uur later. Dit kan worden uitgevoerd met enkel boviene tuberculine (single intradermal test, SIT) of als een vergelijkende test door gebruik te maken van aviair en bovien tuberculine (single intradermal comparative test, SICT) om het verschil te maken tussen een infectie met respectievelijk *M. avium* en *M. bovis*. Deze test dient te worden uitgevoerd in het voorste deel van de nek om een zo hoog mogelijke gevoeligheid te bekomen. In de literatuur wordt een grote variatie voor de sensitiviteit (Se) en specificiteit (Sp) van de test gerapporteerd: Se tussen 53% (27.3-81.5, 95% CI) en 69.4% (40.1-92.2, 95% CI); Sp tussen 55.1% en meer dan 99% met een mediane waarde boven de 95%. Een groot aantal technische en socio-economische parameters kunnen de resultaten van de intradermale huidtest beïnvloeden.

**De isolatie van *M. bovis* door bacteriële cultuur** is de gouden standaard voor de diagnose van bTB. Volgens de huidige Belgische wetgeving is enkel de isolatie van de bacterie het definitieve bewijs voor de bevestiging van een uitbraak. Niettemin is de bacteriële cultuur tijdrovend en kan 8 tot 12 weken in beslag nemen. Methoden die een sneller resultaat (in 2-3 weken) toelaten bestaan, maar zijn niet gevalideerd in de diergeneeskunde. Er is geen standaardprotocol voor bacteriële cultuur van Mycobacteria beschreven in de literatuur noch in referentiehandoeken. Daardoor is het nodig dat het protocol toegepast voor bacteriële cultuur van Mycobacteria wordt gevalideerd in elk laboratorium. De ontwikkeling van nieuwe bacteriële media of methoden dient steeds in perspectief geplaatst te worden van de ontwikkeling van **moleculaire methoden** (real-time PCR). Moleculaire methoden zullen in principe sneller resultaat geven dan bacteriologische cultuur.

Er bestaan verschillende moleculaire methoden om *M. bovis* te detecteren. De beste moleculaire methode op het vlak van van Se en Sp is de real-time PCR (RT-PCR): Se 87% en Sp 97%. Deze methode is een goede optie om een snelle en kwaliteitsvolle diagnose van bTB te stellen. Daarom wordt aangeraden om de RT-PCR methode in overweging te nemen als officiële test voor de diagnose van bTB. Echter, de isolatie van *M. bovis* blijft steeds relevant om moleculaire typering van de stammen en epidemiologisch onderzoek toe te laten.

De **interferongammatest** meet de vrijstelling van het gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) lymphokine door lymfocyten geïncubeerd in een vol-bloed cultuursysteem samen met een specifiek antigeen (zoals PPD-tuberculine) gedurende 16-24u. Het boviene IFN- $\gamma$  wordt gedetecteerd met een sandwich ELISA door middel van twee monoclonale antistoffen gericht tegen boviene IFN- $\gamma$ . Aangezien de test gebruik maakt van levende bloedcellen is het belangrijk dat de bloedstalen zo snel als mogelijk, en zeker niet later dan de dag van de staalname, het laboratorium bereiken. Gebaseerd op een meta-analyse van 15 veldstudies uitgevoerd tussen 1991 en 2006 wordt een geschatte mediane Se van 87,6% (met een spreiding tussen 73% en 100%) en een Sp van 96,6% (met een spreiding tussen 85% en 99,6%) gerapporteerd. In de literatuur wordt er ook een mogelijke stimulatie van IFN- $\gamma$  productie na een intradermale huidtest gerapporteerd. Bovendien laat de IFN- $\gamma$  test toe om geïnfecteerde dieren in een vroeger stadium van infectie te detecteren dan met de intradermale huidtest. Als besluit kan gesteld worden dat de IFN- $\gamma$  test een zeer beloftevolle test is maar dat de verschillende kits en antigenen moeten gevalideerd worden onder Belgische veldomstandigheden.

Er bestaan verschillen **serologische tests** voor bTB. Van de antistof-detectie testen blijkt de ELISA de meest geschikte test te zijn. Deze test is complementair aan testen gebaseerd op cellulaire immuniteit in het bijzonder om anergische dieren, die niet meer reageren op de intradermale huidtest of IFN- $\gamma$  test, op te sporen. De ELISA is een gemakkelijke, snelle, objectieve en kosten-effectieve optie in het kader van bTB bewaking. Niettemin is de Se van de ELISA laag (geschatte waarde van 63% met een spreiding tussen 30% en 97%) terwijl de Sp geschat wordt op 98% (met een spreiding tussen 88% en 100%). Er wordt een opflakking van de antistofproductie gerapporteerd 2 weken na het uitvoeren van een intradermale huidtest.

Er werd een simulatieoefening uitgevoerd om de theoretische Se en Sp van verschillende combinatie's van diagnostische testen te berekenen. Deze resultaten kunnen gebruikt worden door de risicobeheerders voor het verkrijgen van de gewenste Se en Sp voor toekomstige bTB bewaking.

Het gebruik van elke diagnostische test bij andere dieren dan runderen werd eveneens geëvalueerd. In het algemeen kan besloten worden dat deze studies gebaseerd zijn op een klein aantal dieren of kuddes voor de schatting van de Se en Sp en voor sommige speciës ontbreken zelfs de nodige gegevens. Bijgevolg wordt het praktische gebruik van deze testen bij andere dieren dan runderen momenteel niet aangeraden.

Tenslotte werden alle gekende risicofactoren voor bTB infectie volgens de wetenschappelijke literatuur beschreven. Deze risicofactoren dienen in rekening te worden gebracht om een op risico gebaseerde bewaking van bTB toe te laten.

### Evaluatie van het huidige bTB bewakingsprogramma

Er werd een 'scenario tree' analyse uitgevoerd om de sensitiviteit van de verschillende componenten van het Belgische bTB bewakingsprogramma te evalueren. De uitkomst van dit model (scenario's) werd voornamelijk beïnvloed door de volgende parameters: het aantal onderzochte dieren per component en de sensitiviteit van de gebruikte test(en). Externe validatie van de uitkomst met behulp van een logistiek regressiemodel toonde aan dat staltuberculaties tijdens de winterscreening en post-mortem inspecties in het slachthuis significante componenten zijn voor de detectie van bTB uitbraken in België. Gezien het lage aantal positieve resultaten was dit niet het geval voor de bewaking bij aankoop. De bewaking bij aankoop bleek zelfs een risicofactor te zijn voor de introductie en verspreiding van bTB. Verder toonde een 'benchmarking' studie, waarin het verwachte aantal positieve dieren vergeleken werd met werkelijk aantal gemelde positieve dieren, een duidelijke onderrapportering aan tijdens de bewaking bij aankoop. Gezien de relatief lage melding van positieve of twijfelachtige reacties na tuberculatie bij aankoop, kan de effectiviteit van deze bewaking in twijfel worden getrokken. De kosten van de bewaking bij aankoop in 2014 worden geschat op meer dan 1 miljoen €.

Als conclusie, kan de effectiviteit van het huidige bewakingsprogramma, dat voornamelijk gebruik maakt van de intradermale huidtest (tuberculatie) in twijfel worden getrokken.

### Aanbevelingen

Het Wetenschappelijk Comité beveelt aan het bewakingsprogramma aan te passen door:

- de intradermale huidtest (tuberculatie) te vervangen door een gecombineerde IFN- $\gamma$  en serologische test (in parallel) bij aankoop. In het geval van een positief/twijfelachtig resultaat, is het aangeraden dat de bevoegde overheid een intradermale huidtest uitvoert als bevestigingstest;
- de intradermale huidtest, uitgevoerd door praktijkdierenartsen, te behouden voor de wintercampagne. In het geval van een positief/twijfelachtig resultaat, is het aangeraden dat de bevoegde overheid een IFN- $\gamma$  test uitvoert als bevestigingstest;
- een (vergelijkende) intradermale huidtest, IFN- $\gamma$  test en serologische test uit te voeren op alle aanwezige runderen in het geval van een verdachte of bevestigde uitbraak.
- de intradermale huidtest, uitgevoerd door praktijkdierenartsen, te behouden voor 'tracing back en tracing on' analyse na een bevestigde uitbraak. In het geval van een positief/twijfelachtig resultaat, is het aangeraden dat de bevoegde overheid een IFN- $\gamma$  uitvoert als bevestigingstest;
- een classificatie van rundveebedrijven en/of individuele runderen in te voeren naar gelang hun risico voor bTB om zodoende een meer gerichte bewaking van hoog risico bedrijven/dieren te verkrijgen in het slachthuis.

Het is aanbevolen om epidemiologische data te bewaren in een centrale FAVV-databank die consulteerbaar is voor alle actoren van het bewakingsnetwerk om zodoende een risicogebaseerde bewaking toe te laten gebaseerd op de bTB historiek.

Het is ook aanbevolen om de controlemaatregelen en hun duur (bv. blokkeren van veehouderijen) aan te passen aan indicatoren die toelaten een risicoprofiel van veehouderijen/dieren op te stellen.

Verder is het ook aanbevolen om de wetgeving aan te passen in functie van de huidige en toekomstige beschikbare diagnostische testen (inclusie van moleculaire methoden (RT-PCR), IFN- $\gamma$  test en serologische test of eventuele andere nieuwe methode). RT-PCR dient te worden gebruikt in de eerstelijnsdiagnostiek (in parallel met bacteriologische cultuur) om een snellere bevestiging van

een positief geval toe te laten en om de tijd dat een veehouderij is geblokkeerd na een positieve of twijfelachtige test te reduceren.

Het recente bTB geval bij een geïmporteerde alpaca in België (2016) toont aan dat waakzaamheid voor bTB in niet-boviene gedomesticeerde dieren zeer belangrijk is aangezien zij een bron van introductie kunnen zijn. Bovendien zijn er recente gevallen van bTB in dassen, herten en everzwijnen gemeld in Frankrijk, dicht tegen de Belgische grens. Daarom is het ten stelligste aangeraden om een continu bewakingsprogramma, gebaseerd op gekende risicofactoren, bij wilde fauna te installeren in België. Voor Camelidae is het eveneens aangewezen om een bewakingsprogramma te installeren. Tenslotte is aangeraden om de ontwikkeling en validatie van diagnostische testen die kunnen gebruikt worden bij niet-boviene gedomesticeerde dieren en wilde fauna te stimuleren. Deze testen kunnen van groot nut zijn wanneer deze dieren samen met runderen op hetzelfde bedrijf of in de dichte nabijheid van rundveehouderijen worden gehouden.

Het is belangrijk om de waakzaamheid van alle actoren die betrokken zijn bij de bTB bewaking te verhogen door middel van regelmatige informatieuitwisselingen en opleidingen. Elementaire bioveiligheidsmaatregelen (bv. quarantaine) dienen correct en standvastig te worden toegepast door rundveehouders in België, aangezien deze zeer belangrijk zijn in de preventie van de verspreiding van bTB. Veehouders en dierenartsen dienen daarom regelmatig aangemoedigd te worden om deze bioveiligheidsmaatregelen toe te passen.

## Executive summary

### Background & Terms of reference

Bovine tuberculosis (bTB) is an infectious zoonotic disease caused by *Mycobacterium bovis* that may affect cattle, other domesticated animals and wildlife. People get mostly exposed via the consumption of raw milk and raw milk products or via animal contact (aerosol). Bovine tuberculosis is an officially notifiable disease. Despite the fact that Belgium is officially free of bTB since 2003, its surveillance still remains important because almost every year one or more outbreaks are detected. From an economical perspective, it is very important for Belgium to maintain its officially tuberculosis free status in order to facilitate intracommunity trade.

The epidemiological evolution in a number of neighboring countries has demonstrated that, when awareness for bTB in domesticated animals decreases, bTB can reemerge. This decreased awareness in domesticated animals can lead to a spill-over of bTB to wild animals making the control of bTB even more difficult. Recently, stakeholders have expressed a number of problems and constraints about their role within the current bTB surveillance program.

Given these circumstances, the Scientific Committee was asked to perform a thorough evaluation of the current bTB surveillance and control program in Belgium. Next to a general evaluation, a great number of specific questions were asked.

### Methodology

In this opinion, a thorough evaluation of the bTB surveillance in Belgium has been executed. This evaluation is based on simulation exercises (scenario tree analysis to evaluate the sensitivity of each surveillance component), a benchmarking study comparing the expected number of false positive reactors with the actual notified reactors and an estimation of the direct and indirect costs of surveillance.

Furthermore, this opinion contains a review of current diagnostic techniques for bTB and risk factors to be considered in bTB surveillance. This review is based on the available knowledge in scientific literature and on expert opinion.

Finally, a number of recommendations regarding bTB surveillance are proposed. Their relevance is evaluated by experts.

### Literature review: diagnostic techniques and risk factors

The Scientific Committee has performed a comprehensive literature review to characterize and evaluate different diagnostic techniques for bTB which can be used in bTB surveillance in Belgium.

**The intradermal skin test** or delayed hypersensitivity test involves the intradermal injection of bovine tuberculin purified protein derivative (PPD) and the subsequent detection of swelling (delayed hypersensitivity) at the site of injection 72 hours later. This may be performed using bovine tuberculin alone (single intradermal test, SIT) or as a comparative test using avian and bovine tuberculins (single intradermal comparative test, SICT) to differentiate between an infection with *M. avium* and *M. bovis* respectively. The test should be performed in the anterior neck area to render its sensitivity as high as possible. In literature, a wide range of sensitivity (Se) and specificity (Sp) values are reported: Se between 53% (27.3-81.5, 95% CI) and 69.4% (40.1-92.2, 95% CI); Sp between 55.1% and more than 99% showing a median value over 95%. Indeed, a lot of technical and socio-economical parameters can affect the results of the intradermal skin test.

**The isolation of *M. bovis* by bacterial culture** is the gold standard method for the diagnosis of bTB. According to the Belgian legislation, the sole isolation of the bacteria remains the definitive proof for the confirmation of an outbreak. However, bacterial culture is time consuming and may last from 8 to 12 weeks. Methods which allow a faster result (in 2-3 weeks) exist, but are not validated in veterinary medicine. A single recommended protocol for bacterial culture of Mycobacteria has not



been described in literature or in reference manuals. Therefore, it is necessary that the culture protocol is validated in each laboratory. The development of new bacterial media or methods needs to be put in perspective with the development of **molecular methods** (RT-PCR). Molecular tests always surpass bacteriology in terms of rapidity in results.

There are various molecular methods to detect *M. bovis*. However, the best molecular method in term of Se and Sp is the real-time PCR (RT-PCR): Se 87% and Sp 97%. The method is a good option to obtain rapid and good quality diagnosis of bTB. Therefore, the RT-PCR should be considered as an official tool for the diagnosis of bTB. However, the isolation of *M. bovis* remains relevant to allow molecular typing and epidemiology.

The **interferon gamma test** measures the release of the gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) lymphokine in a whole-blood culture system. The assay is based on the release of IFN- $\gamma$  from lymphocytes sensitized during a 16–24-hour incubation period with a specific recall antigen (like PPD-tuberculin). The detection of bovine IFN- $\gamma$  is carried out with a sandwich ELISA that uses two monoclonal antibodies to bovine gamma-interferon. Because the assay makes use of viable blood cells, it is recommended that the blood samples are transported to the laboratory and the assay set up as soon as practical, but not later than the day of blood collection. Based on a meta-analysis of 15 field studies conducted between 1991 and 2006, an estimated median Se of 87.6% (with a range between 73% and 100%) and a Sp of 96.6% (with a range of 85% and 99.6%) is reported. Also, a possible boost of IFN- $\gamma$  production after skin test is reported in literature. Moreover, infected animals are detected sooner with the IFN- $\gamma$  test than with the skin test. To conclude, the IFN- $\gamma$  test is a very promising test but validation of the different kits and antigens must be performed under Belgian field conditions.

There are several **serological tests** for bTB. The ELISA test appears to be the most suitable of the antibody-detection tests and can be complementary to tests based on cellular immunity notably to detect animals that are anergic and do not react to the skin test and IFN- $\gamma$  anymore. The test is an easy, fast, objective, and cost-effective option for bTB surveillance. However, the Se of the ELISA is low (estimated at 63% with a range between 30% and 97%) while the Sp is estimated at 98% (with a range between 88 and 100%). A boost of antibodies after the skin test (2 weeks) is reported in literature.

A simulation exercise has been performed to calculate the theoretical Se and Sp of different combinations of diagnostic tests. These results can be used by risk managers to obtain the desired Se and Sp for bTB surveillance in the future.

The use of every diagnostic test in non-bovine animals has also been evaluated. In general, it can be concluded that these studies are based on a small number of animals and herds for estimation of the values for Se and Sp and for some species data are still lacking. Hence, the practical use of these tests in other species is currently not advisable.

Finally, all known risk factors for bTB infection in scientific literature are described. These risk factors should be taken into account to allow a risk based surveillance of bTB.

#### Evaluation of the current bTB surveillance program

A scenario tree analysis has been performed in order to evaluate the sensitivity of the different components of the Belgian bTB surveillance program to prove the official freedom of disease. The outcome of the model (scenarios) was mostly influenced by the following parameters: the number of tested animals per component as well as the used Se for each of the test(s). External validation of the output using a logistic regression model showed that herd tuberculinations (during winter screening) and slaughterhouse post-mortem inspections were significant components to detect outbreaks in Belgium. Considering the low number of positive results, this was not the case for the purchase testing, despite it has been identified as a risk factor for introduction and dissemination of bTB.

Furthermore, a benchmarking study in which the expected number of positive reactors was compared with the actual number of notified reactors clearly shows underreporting during purchase surveillance of bTB. Considering the relatively low declaration of positive or doubtful reactions during tuberculin testing at purchase, its effectiveness in the surveillance program can be questioned. In addition, given the estimated costs of purchase testing of more than 1 million € for 2014, the cost-benefit of the present strategy is questionable.

In conclusion, the efficacy of the current surveillance program, which especially makes use of SIT as first line screening test, can be questioned.

### Recommendations

It is recommended to adapt the surveillance program by:

- replacing the SIT test by a combined IFN- $\gamma$  and a serological test (in parallel) at purchase. In case of positive/doubtful result, it is recommended that the competent authorities execute themselves a SIT as confirmation test;
- maintaining the SIT test performed by the private veterinarian during winter screening. In case of positive/doubtful result, it is recommended that the competent authorities execute themselves an IFN- $\gamma$  test as confirmation test;
- executing both a SIT (or SICT), IFN- $\gamma$  and serological tests on all cattle present on the farm in suspected/outbreak herds;
- maintaining the SIT test performed by the private veterinarian during tracing analysis. In case of a positive/doubtful result it is recommended that the competent authorities execute themselves an IFN- $\gamma$  test as a confirmation test;
- classification of bovine herds and/or individual animals according to their risk for bTB allowing a more targeted surveillance of high risk herds/animals at slaughter.

It is recommended to store epidemiologic data in a centralized FASFC database consultable for all actors involved in the surveillance network and allowing to perform a risk based surveillance based on bTB history.

It is recommended to adapt the control measures and their duration (i.e. blocking of farms) based on indicators allowing to allocate a risk profile to animals and/or herds.

It is recommended to adapt legislation in relation to current and future available diagnostics (e.g. inclusion of nucleic acid recognition methods (RT-PCR), IFN- $\gamma$  test and serological tests or any other new method). RT-PCR should be used as first line diagnostic (in parallel with bacteriological culture) to allow a faster confirmation of a positive case and to reduce the time a farm is blocked after a positive or doubtful test.

The recent bTB case in an imported alpaca in Belgium shows that vigilance for bTB in non-bovine domesticated animals is very important as they can be a source of introduction. Moreover, there have been some recent bTB in badger, deer and wild boar in France, close to the border with Belgium. Therefore, it is strongly recommended to install a continuous surveillance program in wildlife in Belgium based on known risk factors. For camelids, a surveillance program is also recommended. Furthermore, it is recommended to stimulate the development and validation of diagnostic tests which can be applied in non-bovine domesticated species and wildlife and which can be useful in case these animals are kept on the same farms or in close vicinity to bovines.

It is important to raise awareness of all the actors involved in the bTB surveillance program by regular information and training. Basic biosecurity measures (e.g. quarantine) are too often not (well) applied by cattle farmers in Belgium, although they are very important for bTB prevention. Therefore, farmers and veterinarians must be stimulated to respect these biosecurity measures.

## 1 Referentietermen

### 1.1 Achtergrond en gestelde vragen

Niettegenstaande België sinds 2003 officieel vrij is van boviene tuberculose (bTB), blijft de bewaking van bTB nog steeds een belangrijke taak omdat bijna elk jaar één of meerdere uitbraken worden gedetecteerd. Vanuit een economisch perspectief is het heel belangrijk dat België zijn officieel vrije status behoudt om een vlot intracommunautair handelsverkeer te kunnen blijven garanderen.

De epidemiologische evolutie in een aantal buurlanden heeft aangetoond dat, als waakzaamheid voor bTB in gedomesticeerde dieren afneemt, bTB opnieuw kan uitbreken. Deze verminderde waakzaamheid in gedomesticeerde dieren kan leiden tot een verspreiding van bTB in de wilde fauna waardoor de controle van de ziekte nog moeilijker wordt. Recent hebben stakeholders een aantal problemen en moeilijkheden aangekaart omtrent hun rol in het huidige bTB bewakingsprogramma.

Gezien deze omstandigheden wordt het Wetenschappelijk Comité gevraagd om een grondige evaluatie van het huidige bTB bewakingsprogramma in België uit te voeren. De aanbevelingen in dit advies zullen dienen als basis voor toekomstige aanpassingen aan het bTB bewakings- en controleprogramma. Naast een algemene evaluatie worden ook een aantal specifieke vragen gesteld:

1. Evaluatie van het huidige bewakingsprogramma met specifieke aandacht voor de volgende vragen:
  - a. Met welke risicofactoren kan bij het systematisch post-mortemonderzoek van slachtrunderen rekening worden gehouden om de detectie van tuberculose gevallen te verbeteren?
  - b. Met welke risicofactoren (leeftijd, categorie dieren, type bedrijf, ...) zou bij het uitvoeren van aankooptuberculinaties rekening kunnen worden gehouden. Heeft het onderzoek via aankooptuberculinaties, zoals ze op dit moment door de praktijkdierenartsen wordt uitgevoerd, nut in het kader van de bewaking?
  - c. Met welke risicofactoren zou rekening kunnen worden gehouden om proportionele maatregelen te nemen in geval van een verdenking?
  - d. Is de opvolging van melkproducerende dieren op beslagen die rauwe melk verkopen nog zinvol in de huidige epidemiologische situatie?
  - e. Met welke risicofactoren (leeftijd, categorie dieren, type bedrijf o.a. zuivere vestmesting, ...) zou rekening kunnen worden gehouden bij de opvolging via staltuberculinatie van vroegere haarden, contactbeslagen of verdachte beslagen en kan deze peiler uit de bewaking worden geoptimaliseerd?
  - f. Is het risico bij aanvoer van runderen afkomstig uit officiële vrije lidstaten met een belangrijk aantal haarden of zones met een verhoogde tuberculoseproblematiek groter dan bij aanvoer van runderen uit de nationale handel?
2. Evaluatie van de huidige diagnostische methoden voor de detectie van rundertuberculose op basis van de analytische en diagnostische performantie-eigenschappen van de verschillende testen en het 'fit-for-purposegebruik' teneinde de bewaking zo efficiënt mogelijk te laten verlopen.
  - a. Tuberculinatie:
    - i. Moet de tuberculinatie nog steeds als standaard worden aanvaard of bestaan er andere diagnostische methoden die de tuberculinatie kunnen vervangen?
    - ii. De tuberculinatie wordt momenteel verplicht uitgevoerd in de halsstreek. Kunnen er andere locaties op het dier worden gebruikt voor een meer 'praktische' uitvoering van de tuberculinatie (bv. staartbasis, bilnaad, ...).
    - iii. Is het nog praktisch haalbaar onder de huidige bedrijfsomstandigheden waarbij de rundveebeslagen steeds groter worden, waarbij de dieren permanent loslopen en waarbij de dieren algemeen steeds minder worden gefixeerd om de tuberculinaties nog 'secundem artem' uit te voeren?

- Bestaan er moderne installaties om de runderen voldoende te fixeren om een tuberculatie en de aflezing correct uit te voeren?
- iv. Wordt de gevoeligheid en de specificiteit van de intradermale tuberculatie beïnvloed door het type tuberculinespuit (klassieke tuberculinespuit, dermojet)?
  - v. Is de huidige tuberculine geproduceerd op basis van een historisch isolaat nog aangepast om de huidige mycobacteria te detecteren?
  - vi. Bij welke diersoorten buiten runderen kan de tuberculatie worden toegepast?
- b. Kan de huidige cultuurmethode worden geoptimaliseerd om de groei van *Mycobacterium bovis* te versnellen en een vroegere ontkenning of bevestiging door kiemgroei met isolatie en identificatie te bekomen?
  - c. Voldoen de testkarakteristieken van de huidige PCR's om als screenings- of bevestigingstest te gebruiken zonder de resultaten van de cultuur af te wachten?
  - d. Gamma Interferon (IFN- $\gamma$ ) test
    - i. Voldoen de testkarakteristieken van deze test om routinematig te worden gebruikt onder Belgische omstandigheden ter vervanging van de tuberculatie?
    - ii. Zou de IFN- $\gamma$  test als screeningstest kunnen worden gebruikt in geval van herhaaldelijke staltuberculaties met ongunstige resultaten die echter niet via cultuur kunnen worden bevestigd?
    - iii. Voldoen de testkarakteristieken van deze test om als bevestigingstest na een ongunstig resultaat bij tuberculatie gebruikt te worden?
    - iv. Welk(e) specifiek(e) antige(n) dienen gebruikt te worden?
    - v. Kan deze test als bevestigingstest voor een ongunstig resultaat bij tuberculatie serieel of parallel worden gebruikt?
    - vi. Bij welke diersoorten buiten runderen kan deze test worden gebruikt?
  - e. Kunnen de beschikbare commerciële antistoffen ELISA's zinvol worden gebruikt in België?
  - f. Kan de beslissingsboom met gebruik van de tuberculatie en de gamma-interferon test worden gevalideerd?
3. Evaluatie van voorstellen tot wijzigingen in het huidige koninklijk besluit van 17 oktober 2002 betreffende de bestrijding van rundertuberculose:
- a. Invoegen van het verplicht melden van *Mycobacterium bovis* en *tuberculosis* bij diersoorten andere dan runderen. Dienen er bij vaststelling bij andere diersoorten (honden, katten, schapen, geiten, exotische dieren, wilde dieren, andere gedomesticeerde dieren, zoodieren (olifant)) maatregelen te worden getroffen, onder andere als op hetzelfde bedrijf runderen worden gehouden?
  - b. Eventueel invoegen van andere Mycobacteria buiten *Mycobacterium bovis* zoals nu enkel voorzien is in het huidige besluit: *M. caprae*, *M. tuberculosis* of andere Mycobacteria.
  - c. Samenvoeging van de definities 'verdacht aangetast' en 'verdacht besmet'.
  - d. Voorstellen tot proportionele maatregelen in geval van een verdenking op dier- en op beslagniveau die gebaseerd zijn op het epidemiologisch onderzoek en op een risicobeoordeling.
  - e. Diagnostiek: gebruik van de interferon-gamma test, PCR en moleculaire technieken voor genetische profilering wettelijk voorzien.
  - f. Aanpassing en verduidelijking van de minimumleeftijd voor de tuberculatie bij aankoop en bij staltuberculatie.
  - g. Peilers van de bewaking aanpassen met bijzondere aandacht voor de tuberculaties bij aankoop.
4. Evaluatie van het Tuberculose Actieplan.

Het Wetenschappelijk Comité heeft als antwoord op de gestelde vragen een uitgebreid advies in het Engels geschreven. Het onderstaande advies in het Nederlands is een gereduceerde versie van dit Engelstalige advies en geeft een kort antwoord op de gestelde vragen. De geïnteresseerde lezer die bijkomende informatie wenst, wordt doorverwezen naar dit Engelstalige advies in **Bijlage I**.

## 1.2 Methodologie

De beoordeling van het bTb bewakingsprogramma is gebaseerd op simulatieoefeningen (scenario tree analyse om de gevoeligheid van elke bewakingscomponent te evalueren), een benchmarking studie die het verwachte aantal positieve dieren vergelijkt met het werkelijk aantal gemelde positieve dieren en op een schatting van de directe en indirecte kosten van de bewaking.

Verder bevat dit advies een beoordeling van de bestaande diagnostische technieken voor bTB en de risicofactoren waarmee dient rekening te worden gehouden bij bTB bewaking. Deze beoordeling is gebaseerd op de beschikbare kennis in de wetenschappelijke literatuur en op expert opinie.

Tenslotte worden een aantal aanbevelingen voor de bTB bewaking voorgesteld. De relevantie van deze aanbevelingen werd geëvalueerd door experts.

Overwegende de besprekingen tijdens de werkgroepvergaderingen van 26/08/2015, 01/10/2015, 22/10/2015, 16/11/2015, 05/01/2016, 16/02/2016 en gedurende de plenaire zitting van het Wetenschappelijk Comité van 23/10/2015, 18/03/2016, 22/04/2016 en 17/06/2016,

## geeft het Wetenschappelijk Comité het volgende advies:

## 2 Inleiding

Boviene tuberculose (bTB) is een infectieuze zoönotische ziekte veroorzaakt door *Mycobacterium bovis* die voorkomt bij runderen, andere gedomesticeerde dieren en wilde fauna. bTB is een zoönose en mensen worden voornamelijk blootgesteld door de consumptie van rauwe melk en rauwmelkse producten of via contact met dieren (aerosol). bTB is een officieel aangifteplichtige ziekte.

De ziekte wordt gekenmerkt door de vorming van nodulaire granuloma's, ook gekend als tuberkels. Elk orgaan kan aangetast zijn, maar de meeste letsels worden vastgesteld in de lymfeknopen (vooral ter hoogte van het hoofd en de thorax), de longen, ingewanden, lever, milt, pleura en peritoneum.

In veel gevallen kent de infectie een chronisch verloop en zijn symptomen afwezig, zelfs in sterk gevorderde gevallen met aantasting van vele organen. Wanneer aanwezig, zijn de klinische symptomen variabel: longaantasting kan gekenmerkt zijn door hoesten dat kan uitgelokt worden door temperatuursveranderingen en druk op de trachea. Dyspnee en andere symptomen van laag-gradige pneumonie kan ook wijzen op longinfectie. In vergevorderde gevallen zijn aangetaste lymfeknopen vaak sterk vergroot en kunnen obstructie van luchtwegen, spijsverteringsstelsel of bloedvaten veroorzaken. Aangetaste lymfeknopen ter hoogte van het hoofd of de nek zijn vaak uitwendig zichtbaar en kunnen uitbreken en draineren. Indien het spijsverteringsstelsel betrokken is, is intermitterende diarree en obstipatie mogelijk. Extreme emaciatie en acute respiratoire problemen kunnen voorkomen tijdens de terminale fases van tuberculose. Lesies van de vrouwelijke genitalia kunnen voorkomen. Mannelijke genitalia zijn zelden aangetast.

Tijdens lijkschouwing worden tuberkels het vaakst gezien in de bronchiale, mediastinale, retrofaryngeale en portale lymfeknopen. Bijkomend zijn vaak de longen, de milt en de oppervlakten van lichaamsholten aangetast. Vroege nodulaire longletsels kunnen vaak worden gedetecteerd via

palpatie. Ook andere anatomische plaatsen kunnen geïnfecteerd zijn en dienen onderzocht te worden.

### 3 Huidige bTB maatregelen in België

De bewaking van bTB bestaat voornamelijk uit passieve klinische bewaking en routine diagnostische testen gesteund op de volgende 4 peilers:

- 1) Een systematisch post-mortemonderzoek van slachtrunderen (visuele inspectie en palpatie/incisie van organen/lymfeknopen);
- 2) Een individuele of een staltuberculatie in het kader van de opvolging en de tracering ('tracing back' en 'tracing forward') van een verdenking of een haard;
- 3) Wintercampagne:
  - a. Een systematische opvolging via staltuberculaties van haarden en mogelijke contactbeslagen met haarden gedurende 5 opeenvolgende jaren;
  - b. Een staltuberculatie op melkveebeslagen met rechtstreekse verkoop van rauwe melk en/of rauwmelkse bereidingen;
  - c. Een herhaalde opvolging via tuberculatie van runderen aangevoerd uit niet officieel tuberculose vrije lidstaten gedurende 3 opeenvolgende jaren;
- 4) Een verplichte tuberculatie bij aankoop van runderen;

### 4 Evaluatie van de huidige diagnostische testen voor de detectie van bTB

Het Wetenschappelijk Comité heeft een grondige literatuurstudie uitgevoerd om de verschillende diagnostische technieken voor bTB, die kunnen gebruikt worden voor bTB bewaking in België, te karakteriseren en te evalueren (voor meer details: zie bijlage I).

**De intradermale huidtest** of 'vertraagde hypersensitiviteitstest' omvat de intradermale injectie van boviene tuberculine 'purified protein derivative' (PPD) en vervolgens de detectie van eventuele zwelling (vertraagde hypersensitiviteit) op de injectieplaats 72 uur later. Dit kan worden uitgevoerd met enkel boviene tuberculine (single intradermal test, SIT) of als een vergelijkende test door gebruik te maken van aviair en boviene tuberculine (single intradermal comparative test, SICT) om het verschil te maken tussen een infectie met respectievelijk *M. avium* en *M. bovis*. In de literatuur wordt een grote variatie voor de sensitiviteit (Se) en specificiteit (Sp) van de test gerapporteerd: Se tussen 53% (27.3-81.5, 95% CI) en 69.4% (40.1-92.2, 95% CI); Sp tussen 55.1% en meer 99% met een mediane waarde boven de 95%. Een groot aantal technische en socio-economische parameters kunnen inderdaad de resultaten van de intradermale huidtest beïnvloeden.

**De isolatie van *M. bovis* door bacteriële cultuur** is de gouden standaard voor de diagnose van bTB. Volgens de huidige Belgische wetgeving is enkel de isolatie van de bacterie het definitieve bewijs voor de bevestiging van een uitbraak. Niettemin is de bacteriële cultuur tijdrovend en kan 8 tot 12 weken in beslag nemen. Methoden die een sneller resultaat (in 2-3 weken) toelaten bestaan, maar zijn niet gevalideerd in de diergeneeskunde. Er is geen standaard aanbevolen protocol voor bacteriële cultuur van Mycobacteria beschreven in de literatuur, noch in referentie handboeken. Daardoor is het nodig dat het protocol voor bacteriële cultuur van Mycobacteria wordt gevalideerd in elk laboratorium. De ontwikkeling van nieuwe bacteriële media of methoden dient steeds in het perspectief geplaatst te worden van de ontwikkeling van **moleculaire methoden** (real-time PCR). Moleculaire methoden zullen in principe steeds sneller resultaat geven dan bacteriologische cultuur. Er bestaan verschillende moleculaire methoden om *M. bovis* te detecteren. De beste moleculaire methode in termen van Se en Sp is niettemin de real-time PCR (RT-PCR): Se 87% en Sp 97%. Deze methode is een goede optie om een snelle en kwaliteitsvolle diagnose van bTB te kunnen stellen. Daarom is het aangeraden om de RT-PCR in overweging te nemen als officiële test voor de diagnose van bTB. Echter, de isolatie van *M. bovis* blijft steeds relevant om moleculaire typering van de stammen en epidemiologisch onderzoek toe te laten.

De **interferon gamma test** meet de vrijstelling van het gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) lymphokine door lymfocyten geïncubeerd in een vol-bloed cultuursysteem samen met een specifiek antigeen (zoals PPD-tuberculine) gedurende 16-24u. Het boviene IFN- $\gamma$  wordt gedetecteerd met een sandwich ELISA door middel van twee monoclonale antistoffen gericht tegen boviene IFN- $\gamma$ . Aangezien de test gebruik maakt van levende bloedcellen is het aanbevolen dat de bloedstalen zo snel als mogelijk, en zeker niet later dan de dag van de staalname, het laboratorium bereiken. Gebaseerd op een meta-analyse van 15 veldstudies uitgevoerd tussen 1991 en 2006 wordt een geschatte mediane Se van 87,6% (met een spreiding tussen 73% en 100%) en een Sp van 96,6% (met een spreiding tussen 85% en 99,6%) gerapporteerd. In de literatuur wordt er ook een mogelijk stimulatie van IFN- $\gamma$  productie na een intradermale huidtest gerapporteerd. Bovendien laat de IFN- $\gamma$  test toe om geïnfecteerde dieren in een vroeger stadium van infectie te detecteren dan met de intradermale huidtest. Als besluit kan gesteld worden dat de IFN- $\gamma$  test een zeer beloftevolle test is maar dat de verschillende kits en antigenen moeten gevalideerd worden onder Belgische veldomstandigheden.

Er bestaan verschillende **serologische testen** voor bTB. Van de antistof-detectie testen blijkt de ELISA de meest geschikte test te zijn. Deze test is complementair aan testen gebaseerd op cellulair immuniteit in het bijzonder om anergische dieren, die niet meer reageren op de intradermale huidtest of IFN- $\gamma$  test, te kunnen detecteren. De ELISA test is een gemakkelijke, snelle, objectieve en kosten-effectieve optie in het kader van bTB bewaking. Niettemin is de Se van de ELISA laag (geschatte waarde van 63% met een spreiding tussen 30% en 97%) terwijl de Sp geschat wordt op 98% (met een spreiding tussen 88% en 100%). Er wordt een opflakking van de productie van antistoffen na de intradermale huidtest gerapporteerd (na 2 weken).

Er werd een simulatie oefening uitgevoerd om de theoretische Se en Sp van verschillende combinaties van diagnostische testen te berekenen. Deze resultaten kunnen gebruikt worden door risico beheerders om de gewenste Se en Sp voor toekomstige bTB bewaking te verkrijgen.

Het gebruik van elke vermelde diagnostische test bij andere dieren dan runderen werd eveneens geëvalueerd. In het algemeen kan besloten worden dat deze studies zijn gebaseerd op een klein aantal dieren of kuddes voor de schatting van de Se en Sp en voor sommige speciës ontbreken zelfs de nodige gegevens. Bijgevolg wordt het praktisch gebruik van deze testen bij andere dieren dan runderen momenteel niet aangeraden.

## 5 Evaluatie van het huidige bTB bewakingsprogramma in België

### 5.1 'Scenario tree' analyse

Welby et al. (2012) voerden een 'scenario tree' analyse uit met als doel de sensitiviteit te evalueren van de verschillende componenten van het Belgische bTB bewakingsprogramma om de afwezigheid van bTB te bewijzen met een maximum prevalentie van 0,1% op kuddeniveau. In deze studie bleek de betrouwbaarheid voor het bewijzen van de afwezigheid van bTB 83%, 85%, 99% and 99% te zijn voor respectievelijk i) enkel staltuberculatie tijdens de wintercampagne ii) enkel testen van geïmporteerde runderen iii) testen van alle aangekochte runderen en iv) testen van alle geslachte dieren. De uitkomst van het model (scenario's) werd vooral beïnvloed door de volgende parameters: het aantal geteste dieren per component (hoe meer hoe beter) en de sensitiviteit van de gebruikte test voor elke bewakingscomponent. Bovendien bleek in dezelfde studie, door middel van externe validatie van de uitkomst van het model met behulp van logistische regressie (met data van de laatste 5 jaar), dat staltuberculatie tijdens de wintercampagne en post-mortem inspectie in het slachthuis significante componenten waren voor de detectie van uitbraken in België. Dit was niet het geval voor de bewaking bij aankoop, aangezien deze zelfs als een risicofactor voor infectie kon worden geïdentificeerd.

Welby et al. (2012) concludeerden dat de veronderstellingen die gebruikt werden in de 'scenario tree' analyse (alle testen en alle dieren werden uitgevoerd/getest volgens de richtlijnen) niet altijd waar bleken te zijn in de realiteit. Bevindingen tijdens de laatste jaren tonen aan dat de bewaking bij aankoop (in zijn huidige vorm) niet efficiënt blijkt te zijn voor de (vroeg) detectie van bTB uitbraken in België. Het Wetenschappelijk Comité is echter van mening dat de bewaking bij aankoop in principe een goed instrument is voor de vroeg detectie van dierenziekten in het algemeen en van bTB in het bijzonder (Humblet et al., 2010). Elke goed uitgevoerde test voor bTB bij aankoop kan immers informatie verschaffen over een mogelijke introductieroute van bTB temeer aangezien handel/dierbeweging wordt beschouwd als een belangrijke risicofactor (Welby et al., 2012; Humblet et al., 2009; Gilbert et al., 2005).

### **5.2 Verwacht aantal echte en vals positieve reacties**

Een andere manier om de effectiviteit van een bewakingsprogramma te evalueren is het verwachte aantal (vals) positieve reacties in een bTB vrije populatie te berekenen rekening houdend met de sensitiviteit en specificiteit van de diagnostische testen die gebruikt worden in het bewakingsprogramma en deze te vergelijken met het werkelijk aantal positieve reacties.

Welby et al. (2015) voerden dergelijke studie uit voor de verschillende componenten van het bTB bewakingsprogramma. De vergelijking tussen het verwachte aantal en de werkelijk geregistreerde positieve reacties (zie bijlage I voor meer details) toonde duidelijk aan dat er een onderrapportering is bij de bewaking bij aankoop voor bTB.

### **5.3 Schatting van directe en indirecte kosten van bTB bewaking**

Het Wetenschappelijk Comité heeft een schatting gemaakt van de directe en indirecte kosten verbonden aan de bewaking van bTB in België (voor meer details zie tabel 18 in Bijlage I).

Gezien het relatief lage aantal positieve of twijfelachtige reacties na een intradermale huidtest bij aankoop, kan de effectiviteit van deze bewakingscomponent in twijfel worden getrokken. Bovendien worden de kosten voor de bewaking bij aankoop voor 2014 geschat op meer dan 1.000.000 €. Bijgevolg blijkt de bewaking bij aankoop in zijn huidige vorm ook een weinig kosten-effectieve strategie te zijn.

Gedurende de jaren 2008-2015 werd geen enkele uitbraak gedetecteerd na een intradermale huidtest bij aankoop. Deze uitbraken werden daarentegen gedetecteerd in het slachthuis of na tracing-on en -back analyse in contactbedrijven met introductie van runderen afkomstig van uitbraken die bij een intradermale huidtest bij bewaking bij aankoop negatief bleken te zijn. Bovendien roept de vaak hoge prevalentie aan positieve runderen in nieuw gedetecteerde uitbraken samen met het eerder chronisch verloop van de ziekte (gegeneraliseerde lesies op organen en karkassen en latent geïnfecteerde runderen) ernstige twijfels op over de effectiviteit van de bewaking bij aankoop in zijn huidige vorm. Verder geven de hoge indirecte kosten van een uitbraak die gedetecteerd wordt in een laat stadium (geschat op 1.500.000 €) en het feit dat de sensitiviteit van post-mortem inspectie in het slachthuis geen 100% is, duidelijk aan dat het bewakingsprogramma dient te worden aangepast om de kosten te reduceren en de efficiëntie en waakzaamheid te verhogen.

### **5.4 Conclusie**

Er werd een 'scenario tree' analyse uitgevoerd om de sensitiviteit van de verschillende componenten van het Belgische bTB bewakingsprogramma te evalueren. Er werd aangetoond dat staltuberculaties tijdens de wintercampagne en post-morteminspecties in het slachthuis significante componenten zijn voor de detectie van bTB uitbraken in België. Gezien het lage aantal positieve resultaten was dit niet het geval voor de bewaking bij aankoop. De bewaking bij aankoop bleek zelfs een risicofactor te zijn voor de introductie en verspreiding van bTB. Verder toonde een 'benchmarking' studie een duidelijke onderrapportering aan voor de bewaking bij aankoop. Gezien het feit dat de laatste jaren geen enkele uitbraak werd gedetecteerd na tuberculatie bij aankoop en



de kostprijs die gepaard gaat met deze component van de bewaking (geschat op meer dan 1.000.000 EUR in 2014, kan de effectiviteit hiervan in twijfel worden getrokken.

Als conclusie, kan de effectiviteit van het huidige bewakingsprogramma, dat voornamelijk gebruik maakt van de intradermale huidtest (tuberculinatie) in twijfel worden getrokken.

## 6 Antwoord op de verschillende vragen geformuleerd in de referentietermen

### 6.1 Evaluatie van het huidige bewakingsprogramma:

#### 6.1.1 Met welke risicofactoren kan bij het systematisch post-mortemonderzoek van slachtrunderen rekening worden gehouden om de detectie van tuberculosegevallen te verbeteren?

Niettegenstaande post-mortem inspectie in het slachthuis een belangrijke en effectieve component is van het bewakingsprogramma in België (zie 'scenario tree' analyse in bijlage I) is het verwachte aantal verdachte lesies hoger dan hetgeen in werkelijkheid gemeld wordt (zie 'benchmarking' studie in bijlage I).

Het Wetenschappelijk Comité heeft alle risicofactoren die van belang zijn voor de bTB bewaking opgelijst (zie Tabel 1). Het wordt aangeraden om op basis van deze risicofactoren een classificatie van rundveebedrijven en/of individuele runderen in te voeren naar gelang hun risico voor bTB om zodoende een meer gerichte bewaking van hoog risico bedrijven/dieren te verkrijgen in het slachthuis. Om dit te kunnen verwezenlijken, is het van belang om epidemiologische data te bewaren in een centrale databank die consulteerbaar is voor alle actoren van het bewakingsnetwerk.

**Tabel 1. Belangrijke risicofactoren beschreven in de wetenschappelijke literatuur (naar Humblet et al., 2009)**

| Niveau | Risicofactor voor infectie/spreiding  | bron   |
|--------|---|--|
| Dier   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ras/ Genetica<sup>^</sup></li> <li>• Geslacht<sup>^</sup></li> <li>• Leeftijd</li> <li>• Voederen van melk/colostrum</li> <li>• Malnutritie</li> <li>• Immunosuppressie/geneesmiddelen</li> <li>• Limitaties van diagnostische testen*<sup>^</sup></li> </ul>  | Bekara et al., 2016; Guta S, et al., 2014; Humblet et al., 2009; Schiller et al., 2010; Welby et al., 2015                             |
| Kudde  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Historiek van bTB*<sup>^</sup></li> <li>• Klimaat (invloed op persistentie in omgeving van Mycobacteria)</li> <li>• Contact met geïnfecteerd gedomesticeerd reservoir (rund, geit, schaap, hond, kat)<sup>^</sup></li> <li>• Contact met wilde fauna (vos, das, hert, everzwijn)<sup>^</sup></li> <li>• Gedeelde weide</li> <li>• Import van Camelidae voor wie de effectiviteit van diagnostische testen laag is</li> <li>• Densiteit aan gevoelige diersoorten *<sup>^</sup></li> <li>• Groote van de kudde*<sup>^</sup></li> <li>• Management/Bioveiligheid<sup>^</sup></li> <li>• Verminderd menselijk contact</li> <li>• Type van bedrijf*<sup>^</sup></li> <li>• Contact tussen runderen</li> <li>• Bewegingen/aankoop*<sup>^</sup></li> <li>• Verminderde testfrequentie/veterinaire diensten*</li> <li>• Gelimiteerde controle maatregelen (partiele vs volledige depopulatie)</li> <li>• Vals negatieve reacties (anergie of stress)</li> </ul> | Adkin et al., in press; Bekara et al., 2016; Conlan et al., 2012; Guta S, et al., 2014; Humblet et al., 2009, 2010; Welby et al., 2012 |

|         |   |  |
|---------|---|--|
|         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Uitsluiting van groepen runderen van diagnostische testen (bv. &lt;6 weken oud, etc.)</li> </ul>   |  |
| Land    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Afwezigheid van epidemiologische data op dierniveau*^</li> <li>• Onvoldoende registratie/centralisatie/participatie van epidemiologische data*^</li> <li>• Belemmeringen voor afsluiten van geïnfecteerde bedrijven/regio's*^</li> <li>• Verlaagde waakzaamheid en aangifte (o.a. door angst voor repressieve maatregelen)</li> <li>•</li> </ul> | EFSA, 2014; Elbers et al., 2010; Guta et al., 2014; Jansen et al., 2012; Lupo et al., in press; More et al. 2015 |
| Globaal | <ul style="list-style-type: none"> <li>• bTB prevalentie</li> <li>• Internationale en interregionale bewegingen: intracommunitaire handel, import/export derde landen</li> <li>• Translocatie van wilde fauna</li> </ul>  | Humblet et al., 2009   |

\* *Risicofactoren specifiek geïdentificeerd in België*

^ *Meest significante risicofactoren geïdentificeerd in België en elders bevestigd (Adkin et al., in press; Békara et al., 2016; Humblet et al., 2009; Schiller et al., 2010; Welby et al., 2012 )*

*6.1.2 Met welke risicofactoren (leeftijd, categorie dieren, type bedrijf, ...) zou bij het uitvoeren van aankooptuberculaties rekening kunnen worden gehouden? Heeft het onderzoek via aankooptuberculaties, zoals ze op dit moment door de praktijkdierenartsen wordt uitgevoerd, nut in het kader van de bewaking?*

Zoals hoger gesteld, is de performantie van de huidige bewaking bij aankoop door middel van een intradermale huidtest (tuberculatie) onvoldoende hoog. Er wordt dan ook aangeraden om de intradermale huidtest te vervangen door een gecombineerde IFN- $\gamma$  en serologische test (in parallel) bij aankoop.

Deze aanpak heeft een aantal voordelen. De dierenarts dient slechts één bedrijfsbezoek uit te voeren en moet niet terugkeren naar het bedrijf om na drie dagen het resultaat van de intradermale huidtest te beoordelen. Bovendien is het nemen van een bloedstaal (in de staartvene) vaak veiliger en praktischer uit te voeren onder de huidige bedrijfsomstandigheden van toenemende aantallen runderen die zelden gefixeerd worden. Verder ervaren bedrijfsdierenartsen, in geval van een verdenking, een belangenconflict om het verdachte bedrijf te melden aan de bevoegde autoriteiten. In het geval van een bloedstaal, niettegenstaande dit nog steeds genomen wordt door de bedrijfsdierenarts, wordt de analyse en de interpretatie van het eerste resultaat uitgevoerd door een laboratorium. Tenslotte laat de combinatie van de IFN- $\gamma$  test met een serologische test zowel de vroege detectie van positieve dieren (IFN- $\gamma$  test) als de detectie van dieren gedurende de laatste stadia van de ziekte (serologische test) toe. De dieren in de laatste stadia van de ziekte worden vaak niet meer gedetecteerd met de IFN- $\gamma$  test en intradermale test omwille van afwezigheid van een adequate immunologische reactie (anergie).

Onafhankelijk van de test die gebruikt zal worden bij de bewaking bij aankoop is het aangeraden om op basis van gekende risicofactoren (zie Tabel 1) een classificatie van rundveebedrijven en/of individuele runderen in te voeren naar gelang hun risico op insleep van bTB om zodoende een meer gerichte bewaking van hoog-risico bedrijven/dieren toe te laten.

*6.1.3 Met welke risicofactoren zou rekening kunnen worden gehouden om proportionele maatregelen te nemen in geval van een verdenking?*

Zoals reeds hoger gesteld, is het aangeraden om op basis van gekende risicofactoren (zie Tabel 1) een classificatie van rundveebedrijven en/of individuele runderen in te voeren naar gelang hun risico voor bTB. Ook voor het nemen van maatregelen na een verdenking is het aangeraden rekening te houden met het risicoprofiel van de bedrijven/individuele runderen (instellen van proportionele maatregelen).

#### 6.1.4 *Is de opvolging van melkproducerende dieren op beslagen met de verkoop van rauwe melk nog zinvol in de huidige epidemiologische situatie?*

De consumptie van rauwe melk is de belangrijkste bron van infectie met bTB voor de mens in het algemeen (OIE, 2009). Bovendien werd hoger reeds aangetoond dat een bTB infectie soms lange tijd ongemerkt op een bedrijf kan aanwezig zijn en dat de efficiëntie van het huidige bewakingsprogramma soms onvoldoende is. Vanuit het oogpunt van de volksgezondheid is het bijgevolg ten stelligste aangeraden om de bedrijven met verkoop van rauwe melk van nabij te blijven opvolgen.

#### 6.1.5 *Met welke risicofactoren (leeftijd, categorie dieren, type bedrijf o.a. zuivere vestmesting, ...) zou rekening kunnen worden gehouden bij de opvolging via staltuberculinatie van vroegere haarden, contactbeslagen of verdachte beslagen en kan deze peiler uit de bewaking worden geoptimaliseerd?*

Zoals reeds hoger gesteld is het aangeraden om op basis van gekende risicofactoren (zie Tabel 1) een classificatie van rundveebedrijven en/of individuele runderen in te voeren naar gelang hun risico voor bTB om zodoende een meer gerichte bewaking van hoog-risico bedrijven/dieren te verkrijgen.

#### 6.1.6 *Is het risico bij aanvoer van runderen afkomstig uit officiële vrije lidstaten met een belangrijk aantal haarden of zones met een verhoogde tuberculoseproblematiek groter dan bij aanvoer van runderen uit de nationale handel?*

Het risico op aanvoer van bTB positieve runderen is voornamelijk een functie van de epidemiologische situatie van het land of regio van herkomst. Wederom wordt er aangeraden om op basis van gekende risicofactoren (zie Tabel 1) een classificatie van rundveebedrijven en/of individuele runderen in te voeren naar gelang hun risico voor bTB om zodoende een meer gerichte bewaking van hoog-risico bedrijven/dieren te verkrijgen. Indien de benodigde informatie voor deze classificatie niet voorhanden is voor runderen afkomstig van andere lidstaten, is het aangewezen om deze runderen uit voorzorg aan een verhoogde controle te onderwerpen.

### 6.2 *Evaluatie van de huidige diagnostische methoden voor de detectie van rundertuberculose op basis van de analytische en diagnostische performantie-eigenschappen van de verschillende testen en het 'fit-for-purposegebruik' teneinde de bewaking zo efficiënt mogelijk te laten verlopen.*

#### 6.2.1 *Intradermale huidtest (tuberculinatie):*

##### 6.2.1.1 *Moet de tuberculinatie nog steeds als standaard worden aanvaard of bestaan er een andere diagnostische methoden die de tuberculinatie kunnen vervangen?*

Reeds geruime tijd is de intradermale huidtest (tuberculinatie) de standaardmethode voor de detectie van bTB. Deze test omvat de intradermale injectie van boviene tuberculine 'purified protein derivative' (PPD) en vervolgens de detectie van eventuele zwelling (vertraagde hypersensitiviteit) op de injectieplaats 72 uur later. In de literatuur wordt een grote variatie voor de sensitiviteit (Se) en specificiteit (Sp) van de test gerapporteerd: Se tussen 53% (27.3-81.5, 95% CI) en 69.4% (40.1-92.2, 95% CI); Sp tussen 55.1% en meer 99% met een mediane waarde boven de 95%. Een groot aantal technische en socio-economische parameters kunnen inderdaad de resultaten van de intradermale huidtest beïnvloeden.

Niettegenstaande de intradermale huidtest, indien lege artis uitgevoerd, een zeer goede test blijft voor de detectie van bTB wordt er aangeraden om ook de IFN- $\gamma$  test en de ELISA test te gebruiken in de bTB bewaking in België. Voor meer details over deze 2 testen kan verwezen worden naar paragraaf 4 en Bijlage I.

#### 6.2.1.2 De tuberculatie wordt momenteel verplicht uitgevoerd in de halsstreek. Kunnen er andere locaties op het dier worden gebruikt voor een meer 'praktische' uitvoering van de tuberculatie (bv. staartbasis, bilnaad, ...).

Traditioneel wordt de intradermale huidtest uitgevoerd in de nek of ter hoogte van de staartbasis. In de USA, Canada en Nieuw-Zeeland wordt de intradermale huidtest uitgevoerd ter hoogte van de staartbasis omwille van het praktisch gemak in de grote rundveebedrijven (Casal et al., 2015), terwijl de nek de geprefereerde locatie is in de kleinere bedrijven in Europa (EU richtlijn 64/432/EEC).

Volgens de wetenschappelijke literatuur resulteert injectie ter hoogte van de staartbasis in een lagere sensitiviteit van de test vergeleken met injectie in de nek (Francis et al., 1978; Whipple et al., 1995; Norby et al., 2004; Farnham et al., 2012). Bovendien werd er in een veldstudie (Casal et al., 2015) aangetoond dat de probabiteit om een positief reagerend dier te detecteren werd beïnvloed door de positie in de nek waar de intradermale huidtest werd uitgevoerd. Daarbij was de sensitiviteit hoger in de craniale nekzones vergeleken met de caudale nekzones. Een mogelijke verklaring voor dit fenomeen is de grotere nabijheid van regionale lymfeknopen (submandibulaire, retropharyngeale, parotis and cervicale lymfeknopen) in de craniale nekzones in vergelijking met de caudale zones wat kan leiden tot een verhoogde cellulaire influx ter hoogte de plaats van injectie met een hogere lokale reactie als gevolg (Kindt et al., 2006; Flynn and Chan, 2001).

Als besluit kan dus gesteld worden dat de intradermale huidtest dient te worden uitgevoerd in de craniale nekzones om de hoogst mogelijk sensitiviteit van de test te verkrijgen.

#### 6.2.1.3 Is het nog praktisch haalbaar onder de huidige bedrijfsomstandigheden waarbij de rundveebeslagen steeds groter worden, waarbij de dieren permanent loslopen en waarbij de dieren algemeen steeds minder worden gefixeerd om de tuberculaties nog 'secundem artem' uit te voeren? Bestaan er moderne installaties om de runderen voldoende te fixeren om een tuberculatie en de aflezing correct uit te voeren?

Het Wetenschappelijk Comité erkent de praktische moeilijkheden die dierenartsen en veldmedewerkers ondervinden tijdens het toepassen van diagnostische testen op niet (goed) gefixeerde runderen, in het bijzonder tijdens het toepassen van de (vergelijkende) intradermale huidtest (ter hoogte van de nek). Niettemin zijn er voldoende fixatiesystemen van runderen op de markt (voor enkele voorbeelden zie Dudouet (2015)). Rundveehouders moeten aangemoedigd worden om dergelijke fixatiesystemen te voorzien op de bedrijven om dierenartsen toe te laten te werken onder veilige en praktische omstandigheden.

Niettemin zal de aanbeveling om de intradermale huidtest bij aankoop te vervangen door een gecombineerde IFN- $\gamma$  test en ELISA test (zie hoger) de staalname bij bewaking bij aankoop, die een substantieel aantal van het jaarlijkse aantal diagnostische testen uitmaken, veel gemakkelijker maken aangezien de bloedname aan de staartbasis kan worden uitgevoerd.

#### 6.2.1.4 Wordt de gevoeligheid en de specificiteit van de intradermale tuberculatie beïnvloed door het type tuberculinespuit (klassieke tuberculinespuit, dermojet)?

Alhoewel er weinig gegevens beschikbaar zijn in de wetenschappelijke literatuur is het Wetenschappelijk Comité van mening dat de sensitiviteit en specificiteit van de intradermale huidtest niet beïnvloed wordt door het gebruikte instrument voor de injectie (klassieke spuit versus dermojet). Menselijke factoren zoals het niet naleven van de 'goede diergeneeskundige praktijk' tijdens het uitvoeren en controleren van de intradermale huidtest hebben een veel grotere impact op het resultaat van de test.

#### 6.2.1.5 Is de huidige tuberculine geproduceerd op basis van een historisch isolaat nog aangepast om de huidige mycobacteria te detecteren?

De verschillende PPD's die momenteel gebruikt worden in diagnostische testn hebben veel proteïnen gemeenschappelijk die bovendien belangrijk zijn voor de infectiviteit en overleving van Mycobacteria. Deze proteïnen zullen bijgevolg waarschijnlijk geconserveerd blijven (Prada, 2013).

Verder is het genoom van de leden van het *M. tuberculosis* complex voor 99,95% identiek en zeer stabiel (Lu et al., 1987; Garnier, 2003). Bovendien blijkt dat het historisch isolaat van *M. bovis* dat gebruikt wordt voor de productie van PPD van *M. bovis* geen significant verlies aan genetische informatie heeft geleden tijdens *in vitro* cultuur in vergelijking met recente veldisolaten (Inwald, 2003).

Er kan dus besloten worden dat de 'huidige' PPD's (purified protein derivative) nog steeds geschikt zijn voor de detectie van een contact met een bacterie van het *M. tuberculosis* complex. De belangrijkste bezorgdheid is eerder de kwaliteit van de PPD productie dan de samenstelling (Rangel-Frausto, 2001; Schiller, 2010).

#### 6.2.1.6 Bij welke diersoorten buiten runderen kan de tuberculinatie worden toegepast?

Het Wetenschappelijk Comité heeft een uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd met betrekking tot het gebruik van de intradermale huidtest bij andere diersoorten dan runderen. In het algemeen kan gesteld worden dat er relatief weinig publicaties terug te vinden zijn over dit onderwerp en dat het aantal dieren dat gebruik werd in deze studies relatief beperkt is. Meer details hierover kunnen gevonden in Appendix V van Bijlage I.

Als besluit kan gesteld worden dat alhoewel de intradermale huidtest goed lijkt te werken bij geiten, schapen en sommige wilde dieren zoals het hert, de test eerder onbetrouwbaar is bij andere species zoals dassen, varkens, everzwijnen, oryx en grote zoodieren en bovendien onpraktisch is bij vrijlopende dieren.

#### 6.2.2 Kan de huidige cultuurmethode worden geoptimaliseerd om de groei van *Mycobacterium bovis* te versnellen en een vroegere ontkenning of bevestiging door kiemgroei met isolatie en identificatie te bekomen?

De isolatie van *M. bovis* door bacteriële cultuur is de gouden standaard voor de diagnose van bTB. Volgens de huidige Belgische wetgeving is enkel de isolatie van de bacterie het definitieve bewijs voor de bevestiging van een uitbraak. Niettemin is de bacteriële cultuur tijdrovend en kan 8 tot 12 weken in beslag nemen. Methoden die een sneller resultaat (in 2-3 weken) toelaten bestaan, maar zijn niet gevalideerd in de diergeneeskunde. De ontwikkeling van nieuwe bacteriële media of methoden dient steeds in het perspectief geplaatst te worden van de ontwikkeling van moleculaire methoden (real-time PCR). Moleculaire methoden zullen de bacteriologische cultuur steeds overtreffen voor wat betreft snelheid.

#### 6.2.3 Voldoen de testkarakteristieken van de huidige PCR's om als screenings- of bevestigingstest te gebruiken zonder de resultaten van de cultuur af te wachten?

Er bestaan verschillende moleculaire methoden om *M. bovis* te detecteren, b.v. in aangetaste lymfeknopen. De beste moleculaire methode in termen van Se en Sp is de real-time PCR (RT-PCR): Se 87% en Sp 97%. Deze methode is een goede optie om een snelle en kwaliteitsvolle diagnose van bTB te kunnen stellen. Daarom is het aangeraden om de RT-PCR te overwegen als officiële test voor de diagnose van bTB. Echter, de isolatie van *M. bovis* blijft steeds relevant voor moleculaire typering van de stammen en om epidemiologisch onderzoek toe te laten.

#### 6.2.4 Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) test

##### 6.2.4.1 Voldoen de testkarakteristieken van de IFN- $\gamma$ test om routinematig te worden gebruikt onder Belgische omstandigheden ter vervanging van de tuberculinatie?

Zoals reeds hoger gesteld heeft literatuuronderzoek aangetoond dat de IFN- $\gamma$  test minstens even goed presteert als de intradermale huidtest in termen van sensitiviteit. Afhankelijk van de bron en de omstandigheden waarin de test wordt toegepast, wordt de specificiteit echter even hoog of lager dan de intradermale huidtest ingeschat. De IFN- $\gamma$  test laat echter toe om geïnfecteerde dieren in een vroeger stadium van infectie te detecteren dan de intradermale huidtest. Een mogelijk nadeel van de test is dat er gebruik wordt gemaakt van levende bloedcellen waardoor het aanbevolen is dat de

bloedstalen zo snel als mogelijk, en zeker niet later dan de dag van de staalname, het laboratorium bereiken. Als besluit kan gesteld worden dat de IFN- $\gamma$  test een zeer beloftevolle test is maar dat de verschillende kits en antigenen moeten gevalideerd worden onder Belgische veldomstandigheden alvorens de test op grote schaal te gebruiken. Concreet wordt er aanbevolen om de intradermale huidtest te vervangen door een IFN- $\gamma$  test bij bewaking bij aankoop.

#### 6.2.4.2 Zou de IFN- $\gamma$ test als screeningstest kunnen worden gebruikt in geval van herhaaldelijke positieve staltuberculinaties (met ongunstige resultaat) zonder dat bTB via cultuur kan worden bevestigd?

Alhoewel moeilijk te bewijzen, is de oorzaak van dit fenomeen vermoedelijk contact van de runderen met 'atypische of niet-tuberculeuze mycobacteria' die gemeenschappelijke antigenen hebben met *M. bovis*. Deze mycobacteria veroorzaken meestal geen letsels bij geïnfekteerde dieren en houden ook weinig of geen gevaar in voor de volksgezondheid. Runderen die in contact komen met deze atypische mycobacteria kunnen positief reageren bij zowel de intradermale huidtest als de IFN- $\gamma$  test zonder geïnfecteerd te zijn met *M. bovis* (vals positief resultaat).

Aangezien zowel de IFN- $\gamma$  test als de intradermale huidtest gebruik maken van PPD's (purified protein derivative) zullen beide testen deze vals-positieve reacties genereren ingeval van contact met atypische mycobacteria. Afhankelijk van de bron en de omstandigheden waarin de test wordt toegepast, wordt de specificiteit van de IFN- $\gamma$  test even goed of lager ingeschat dan de intradermale huidtest. Bijgevolg is de IFN- $\gamma$  test geen goede alternatieve test in deze specifieke situatie.

Echter, er wordt momenteel volop wetenschappelijk onderzoek verricht om specifieke antigenen (zoals ESAT-6 en CFP-10), die enkel voorkomen bij *M. bovis* (en bij andere leden van het *M. tuberculosis*-complex) en niet bij atypische mycobacteria, te gebruiken voor de IFN- $\gamma$  test. Dit zou gepaard gaan met een verhoogde specificiteit van de IFN- $\gamma$  test. Indien deze IFN- $\gamma$  test gebaseerd op specifieke antigenen in de toekomst commercieel zou beschikbaar komen, is het aangeraden om deze te gebruiken in deze specifieke situatie (en in de algemene bTB bewaking indien de sensitiviteit minstens even hoog is als de IFN- $\gamma$  test gebaseerd op PPD's).

#### 6.2.4.3 Voldoen de testkarakteristieken van deze IFN- $\gamma$ test om als bevestigingstest na een ongunstig resultaat bij tuberculatie gebruikt te worden?

De IFN- $\gamma$  test is een geschikte test om te worden gebruikt in serie (als bevestigingstest) na de intradermale huidtest indien men bezorgd is dat de routine ante-mortem test onvoldoende specificiteit heeft. Dit is bij uitstek het geval wanneer de intradermale huidtest wordt gebruikt in gebieden waar de waarschijnlijkheid om een werkelijk geïnfecteerd dier te vinden laag is (zoals in België met een zeer lage prevalentie van *M. bovis* en een relatief hoge prevalentie van *M. avium*). Deze strategie wordt ook toegepast in verschillende andere landen in de EU (zie Appendix VI in bijlage I). Concreet wordt er aangeraden om de IFN- $\gamma$  test als bevestigingstest te gebruiken bij de wintercampagne en bij tracing-back en tracing-on analyse.

Het Wetenschappelijk Comité heeft verder een simulatieoefening uitgevoerd om de theoretische sensitiviteit en specificiteit van verschillende combinaties van diagnostische testen te berekenen (zie Tabel 14 in bijlage I). Deze resultaten kunnen gebruikt worden door risicobeheerders voor het verkrijgen van de gewenste sensitiviteit en specificiteit voor toekomstige bTB bewaking.

#### 6.2.4.4 Welk(e) specifiek(e) antigen(en) dienen gebruikt te worden?

De huidige commercieel beschikbare IFN- $\gamma$  testen maken allemaal gebruik van PPD's (purified protein derivative afkomstig van *M. bovis* AN5 and *M. avium* D4). Zoals reeds hoger gesteld, is de sensitiviteit van deze test minstens even hoog als de intradermale huidtest. Afhankelijk van de bron en de omstandigheden waarin de test wordt toegepast, wordt de specificiteit van de IFN- $\gamma$  test even goed of lager ingeschat dan de intradermale huidtest. Het is echter zeer belangrijk om de verschillende kits en antigenen te valideren onder Belgische veldomstandigheden alvorens de test op grote schaal te gebruiken.

Echter, er wordt momenteel wetenschappelijk onderzoek verricht om specifieke antigenen (zoals ESAT-6 en CFP-10), die enkel voorkomen bij *M. bovis* (en bij andere leden van het *M. tuberculosis*-complex) en niet bij atypische mycobacteria, te gebruiken voor de IFN- $\gamma$  test. Dit zou gepaard gaan met een verhoogde specificiteit van de IFN- $\gamma$  test. Indien deze IFN- $\gamma$  test gebaseerd op specifieke antigenen in de toekomst commercieel zou beschikbaar komen, is het aangeraden om deze te gebruiken in de algemene bTB bewaking indien de sensitiviteit minstens even hoog is als de IFN- $\gamma$  test gebaseerd op PPD's.

#### 6.2.4.5 Kan de IFN- $\gamma$ test als bevestigingstest voor een ongunstig resultaat bij tuberculinatie serieel of parallel worden gebruikt?

Het parallel (gelijktijdig) gebruik van de IFN- $\gamma$  test en de intradermale huidtest zal de sensitiviteit van het diagnostisch protocol doen toenemen, terwijl het serieel gebruik van de IFN- $\gamma$  test (als bevestigingstest) na de intradermale huidtest de specificiteit van het diagnostisch protocol zal doen toenemen.

Het Wetenschappelijk Comité heeft verder een simulatieoefening uitgevoerd om de theoretische sensitiviteit en specificiteit van verschillende combinaties van diagnostische testen te berekenen (zie Tabel 14 in bijlage I). Deze resultaten kunnen gebruikt worden door risicobeheerders voor het verkrijgen van de gewenste sensitiviteit en specificiteit voor toekomstige bTB bewaking.

#### 6.2.4.6 Bij welke diersoorten buiten runderen kan de IFN- $\gamma$ test worden gebruikt?

Het gebruik van de IFN- $\gamma$  test is beschreven voor verschillende gedomesticeerde en wild levende species. Voor sommige species is een aanpassing van het protocol dat gebruikt wordt voor runderen noodzakelijk. Meer details over het gebruik van de IFN- $\gamma$  test in andere species dan runderen kan gevonden worden in Appendix VII van bijlage I.

Voor sommige diersoorten, in het bijzonder voor geiten, vertoont de IFN- $\gamma$  test veelbelovende resultaten. Niettemin dient er benadrukt te worden dat het aantal studies en het aantal dieren waarvan deze studies gebruik maken voor de schatting van de sensitiviteit en specificiteit beperkt is. Bijgevolg wordt het praktische gebruik van de IFN- $\gamma$  test bij andere dieren dan runderen momenteel niet aangeraden. De test dient eerste op grote schaal onder veldomstandigheden geëvalueerd te worden alvorens te worden gebruikt in een bewakingsprogramma.

#### 6.2.5 Kunnen de beschikbare commerciële Antistoffen ELISA's zinvol worden gebruikt in België?

Er bestaan verschillen serologische tests voor bTB. Van de antistof-detectie testen blijkt de ELISA de meest geschikte test te zijn. Deze test is complementair aan testen gebaseerd op cellulair immuniteit in het bijzonder om anergische dieren, die niet meer reageren op de intradermale huidtest of IFN- $\gamma$  test, te kunnen detecteren. De ELISA is een gemakkelijke, snelle, objectieve en kosten-effectieve optie in het kader van bTB bewaking. Niettemin is de sensitiviteit van de ELISA laag (geschatte waarde van 63% met een spreiding tussen 30% en 97%) terwijl de specificiteit geschat wordt op 98% (met een spreiding tussen 88% en 100%). Er wordt een boost van antistoffen na de intradermale huidtest gerapporteerd (na 2 weken).

Concreet wordt er aangeraden om de ELISA te gebruiken bij aankoopbewaking (parallel met de IFN- $\gamma$  test) en bij epidemiologisch onderzoek in een verdachte of bevestigde uitbraak naast de (vergelijkende) intradermale huidtest en de IFN- $\gamma$  test.

#### 6.2.6 Kan de voorgelegde beslissingsboom met gebruik van de tuberculinatie en de gamma-interferon test worden gevalideerd?

Het Wetenschappelijk Comité apprecieert het feit dat sommige van zijn aanbevelingen (zoals bv. het gebruik van de IFN- $\gamma$  test) reeds werden opgenomen in de beslissingsboom. Het is echter niet mogelijk om de voorgelegde beslissingsboom te valideren gezien er substantiële wijzigingen vereist zijn indien de aanbevelingen van dit advies zouden worden toegepast voor de verschillende componenten van het bewakingsprogramma (zie hoger).

### 6.3 Evaluatie van voorstellen tot wijzigingen in het huidige koninklijk besluit van 17 oktober 2002 betreffende de bestrijding van rundertuberculose:

6.3.1 *Invoegen van het verplicht melden van Mycobacterium bovis en tuberculosis bij diersoorten andere dan runderen. Dienen er bij vaststelling bij andere diersoorten (honden, katten, schapen, geiten, exotische dieren, wilde dieren, andere gedomesticeerde dieren, zoodieren (olifant)) maatregelen te worden genomen, onder andere als op hetzelfde bedrijf runderen worden gehouden?*

Er werd een literatuuronderzoek uitgevoerd naar diersoorten (gedomesticeerde en in het wild levende dieren) die gevoelig en/of receptief zijn voor *M. bovis* over de hele wereld. Resultaten hiervan kunnen gevonden worden in Appendix IX van bijlage I.

Als besluit kan gesteld worden dat *M. bovis* in staat is om een heel scala aan diersoorten te infecteren. Daarom is het sterk aangeraden om een meldingsplicht in te voeren voor alle diersoorten en niet enkel voor *M. bovis* maar ook voor andere leden van het *M. tuberculosis* complex. Deze diersoorten dienen ook in overweging genomen te worden in het geval er sanitaire maatregelen dienen te worden ingesteld, in het bijzonder als de betrokken diersoort een bron van infectie kan zijn voor runderen.

6.3.2 *Eventueel invoegen van andere mycobacteria buiten Mycobacterium bovis zoals nu enkel voorzien is in het huidige besluit: M. caprae, M. tuberculosis of andere Mycobacteria.*

De leden van het *Mycobacterium tuberculosis* complex (waartoe *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. orygis* and *M. mungi* behoren) zijn genetisch sterk verwant aan elkaar (99,9% similariteit op nucleotide niveau) en zijn allemaal in staat om tuberculose te veroorzaken bij mens en dier (Michelet et al., 2016; Rodriguez-Campos, 2014; Alexander, 2010; Van Ingen, 2012). Ook voor bTB zijn er verschillende publicaties die de betrokkenheid van verschillende leden van het *M. tuberculosis* complex aantonen, met als voornaamste *M. bovis*, *M. tuberculosis* and *M. caprae* (meer details in Tabel 20 in bijlage I).

Hierdoor ondersteunt het Wetenschappelijk Comité het voorstel om bij de wijziging van het KB *Mycobacterium bovis* te vervangen door *Mycobacterium tuberculosis* complex. Deze uitbreiding naar *Mycobacterium tuberculosis* complex werd reeds eerder doorgevoerd in andere landen (Oostenrijk, Kroatië, Nederland, Portugal, Ierland en Spanje) (Rodriguez-Campos, 2014).

6.3.3 *Samenvoeging van de definities ‘verdacht aangetast’ en ‘verdacht besmet’.*

Het Wetenschappelijk Comité is geen voorstander om beide definities samen te voegen aangezien zij 2 verschillende situaties weerspiegelen. Niettemin is de terminologie verwarrend en is het aangewezen de terminologie in de wetgeving aan te passen. De volgende definities worden voorgesteld.

- 1) **Vrij van tuberculose:** een dier dat behoort tot een kudde die officieel vrij is van tuberculose (dient te worden gedefinieerd in het KB)
- 2) **Verdacht geïnficeerd met tuberculose:** een dier dat behoort tot één van de volgende categorieën:
  - Een dier dat macroscopische letsels van tuberculose vertoont tijdens post-mortem inspectie of tijdens lijkschouwing
  - Een dier dat histologische letsels vertoont die wijzen op tuberculose
  - Een dier met een positief resultaat voor een diagnostische test voor tuberculose ((vergelijkende) intradermale huidtest, IFN-γ test of serologische test), om het even onder welke omstandigheden de test werd uitgevoerd
- 3) **Geïnficeerd met tuberculose:** in de volgende gevallen
  - Een dier dat klinische symptomen van tuberculose vertoont samen met een positief resultaat voor een diagnostische test voor tuberculose ((vergelijkende) intradermale huidtest, IFN-γ test of serologische test)



- Een dier na de isolatie en identificatie van een lid van het *Mycobacterium tuberculosis* complex door middel van een geaccrediteerde test
- Een dier na de detectie van een lid van het *Mycobacterium tuberculosis* complex door middel van een geaccrediteerde (RT-)PCR test
- Een dier met een positief resultaat voor een geaccrediteerde diagnostische test voor tuberculose ((vergelijkende) intradermale huidtest, IFN- $\gamma$  test of serologische test) samen met de isolatie en identificatie van een lid van het *Mycobacterium tuberculosis* complex door middel van een geaccrediteerde test
- Een dier met een positief resultaat voor een geaccrediteerde diagnostische test voor tuberculose ((vergelijkende) intradermale huidtest, IFN- $\gamma$  test of serologische test) samen met histologische letsels die typisch zijn voor tuberculose
- Een dier dat behoort tot een kudde die als geïnfecteerd met tuberculose wordt verklaard en dat behoort tot één van de categorieën onder 2)

**4) In contact met tuberculose:** Een dier dat behoort tot een kudde die als geïnfecteerd met tuberculose wordt verklaard en dat niet behoort tot één van de categorieën onder 3).

#### 6.3.4 *Voorstellen tot proportionele maatregelen in geval van een verdenking op dier- en op beslagniveau die gebaseerd zijn op het epidemiologisch onderzoek en op een risicobeoordeling.*

Zoals hoger uitgelegd, wordt er aangeraden om op basis van gekende risicofactoren (zie Tabel 1) een meer gerichte bewaking van hoogrisico bedrijven/dieren te verkrijgen. Ook voor het nemen van maatregelen na een verdenking is het aangeraden rekening te houden met risicoprofiel van de bedrijven/individuele runderen (proportionele maatregelen).

#### 6.3.5 *Diagnostiek: het wettelijk voorzien van het gebruik van de interferon-gamma test, PCR en moleculaire technieken voor genetische profilering.*

Er wordt aangeraden om het gebruik van nieuwe diagnostische testen zoals de IFN- $\gamma$  test, serologische testen, (RT-) PCR en andere moleculaire technieken in de wetgeving te voorzien.

#### 6.3.6 *Aanpassing en verduidelijking van de minimumleeftijd voor de tuberculatie bij aankoop en bij stal tuberculatie.*

Vleeskalveren worden traditioneel vrijgesteld van tuberculatie bij aankoop aangezien het als weinig waarschijnlijk wordt ingeschat dat ze besmet zijn met bTB (dead-end reservoir die direct naar het slachthuis vertrekken na afmesten). Recente gegevens van een uitbraak in 2015 tonen echter aan dat ook zeer jonge kalveren reeds kunnen geïnfecteerd zijn met bTB. Het testen van vleeskalveren bij aankoop kan mogelijks interessante informatie opleveren over de bTB status van de bedrijven van herkomst.

Daarom wordt aangeraden om alle leeftijden in beschouwing te nemen bij de bewaking bij aankoop. Voor het testen van een volledige stal tijdens de wintercampagne kan de minimumleeftijd van 6 weken worden aangehouden. In het geval van epidemiologisch onderzoek in een (verdachte) uitbraak dienen echter opnieuw alle leeftijden opgenomen te worden in het diagnostisch protocol.

Voor kalveren jonger dan 6 maanden oud is het echter aangewezen om een intradermale huidtest uit te voeren en geen IFN- $\gamma$  test wegens aspecifieke reacties. Alhoewel de oorzaak van dit fenomeen niet volledig gekend is, spelen  $\gamma\delta$  T immuuncellen, die belangrijk zijn in de vroege immuunrespons tegen *M. bovis*, een rol. Deze cellen, zowel van geïnfecteerde als niet-geïnfecteerde runderen, kunnen prolifereren en IFN- $\gamma$  produceren na stimulatie met *M. bovis* antigenen en daardoor verantwoordelijke zijn voor aspecifieke reacties (Plattner et al., 2009; Plattner and Hostetter, 2011; Welsh et al., 2002).

### 6.3.7 *Pijlers van de bewaking aanpassen met bijzondere aandacht voor de tuberculaties bij aankoop.*

Zoals hoger uitgelegd stelt het Wetenschappelijk Comité enkele wijzigingen voor aan het huidige bTB bewakingsprogramma. Deze wijzigingen dienen uiteraard ook in de wetgeving voorzien te worden.

## 6.4 *Evaluatie van het Tuberculose Actieplan*

Het Wetenschappelijk Comité stelt het op prijs dat sommige van zijn aanbevelingen (bv. verhogen van de waakzaamheid en educatie van de verschillende actoren in de bTB bewaking) al worden toegepast. Niettemin is het onmogelijk dit actieplan in zijn geheel te evalueren aangezien de aanbevelingen in dit advies substantiële aanpassingen vereisen.

## 7 **Aanbevelingen voor het toekomstige bTB bewakingsprogramma**

Het is belangrijk om de waakzaamheid van alle actoren die betrokken zijn bij de bTB bewaking te verhogen door middel van regelmatige informatieuitwisselingen en opleidingen. Elementaire bioveiligheidsmaatregelen (bv. quarantaine) dienen correct en standvastig te worden toegepast door rundveehouders in België, aangezien deze zeer belangrijk zijn in de preventie van de verspreiding van bTB. Veehouders en dierenartsen dienen daarom regelmatig aangemoedigd te worden om deze bioveiligheidsmaatregelen toe te passen.

Het Wetenschappelijk Comité beveelt aan het bewakingsprogramma voor bTB aan te passen door:

- de intradermale huidtest (tuberculatie) te vervangen door een gecombineerde IFN- $\gamma$  en serologische test (in parallel) bij aankoop. In het geval van een positief/twijfelachtig resultaat, wordt aangeraden dat de competente autoriteiten een intradermale huidtest uitvoeren als bevestigingstest;
- de intradermale huidtest, uitgevoerd door praktijkdierenartsen, te behouden voor de wintercampagne. In het geval van een positief/twijfelachtig resultaat, wordt aangeraden dat de competente autoriteiten een IFN- $\gamma$  test uitvoeren als bevestigingstest;
- in het geval van een verdenking of bevestigde uitbraak een (vergelijkende) intradermale huidtest, IFN- $\gamma$  test en serologische test uit te voeren op alle aanwezige runderen in het bedrijf.
- de intradermale huidtest, uitgevoerd door praktijkdierenartsen, te behouden voor 'tracing back en tracing on' analyse na een bevestigde uitbraak. In het geval van een positief/twijfelachtig resultaat, wordt aangeraden dat de competente autoriteiten een IFN- $\gamma$  test uitvoeren als bevestigingstest;
- een classificatie van rundveebedrijven en/of individuele runderen in te voeren naar gelang hun risico voor bTB om zodoende een meer gerichte bewaking van hoog risico bedrijven/dieren uit te voeren in het slachthuis.

Het is aanbevolen om epidemiologische data te bewaren in een centrale databank bij het FAVV die consulteerbaar is voor alle actoren van het bewakingsnetwerk om zodoende een risico-gebaseerde bewaking toe te laten gebaseerd op de bTB historiek.

Het is ook aanbevolen om de controlemaatregelen en hun duur (bv. blokkeren van veehouderijen) aan te passen aan indicatoren die toelaten een risicoprofiel van veehouderijen/dieren op te stellen.

Verder is het ook aanbevolen om de wetgeving aan te passen in functie van de huidige en toekomstige beschikbare diagnostische testen (inclusie van moleculaire methoden (RT-PCR), IFN- $\gamma$  test en serologische test of eventuele andere nieuwe methoden). RT-PCR dient te worden gebruikt in de eerstelijns-diagnostiek (in parallel met bacteriologische cultuur) om een snellere bevestiging van een positief geval toe te laten en om de tijd dat een veehouderij is geblokkeerd na een positieve of twijfelachtige test te reduceren.

Het recente bTB geval bij een geïmporteerde alpaca in België (<http://www.favv.be/dierengezondheid/tuberculose/default.asp>) toont aan dat waakzaamheid voor bTB in niet-boviene gedomesticeerde dieren zeer belangrijk is aangezien zij een bron van introductie kunnen zijn. Bovendien zijn er recente gevallen van bTB in dassen, herten en everzwijnen gemeld in Frankrijk, dichtbij de Belgische grens. Daarom is het ten stelligste aangeraden om een continu bewakingsprogramma, gebaseerd op gekende risicofactoren bij wilde fauna te installeren in België. Het is eveneens aangewezen om bij Camelidae een bewakingsprogramma uit te voeren. Tenslotte is aangeraden om de ontwikkeling en validatie van diagnostische testen die kunnen gebruikt worden bij niet-boviene gedomesticeerde dieren en wilde fauna te stimuleren. Deze testen kunnen van groot nut zijn wanneer deze dieren samen met runderen op hetzelfde bedrijf of in de nabijheid van rundveehouderijen worden gehouden.

## 8 Conclusie

Het Wetenschappelijk Comité heeft een grondige evaluatie van de bTB bewaking in België uitgevoerd. Hier bleek dat de effectiviteit van het huidige bewakingsprogramma, dat voornamelijk gesteund is op de intradermale huidtest (tuberculinatie) onvoldoende hoog is. Omwille van diverse redenen blijkt vooral de performantie van de bTB bewaking bij aankoop ondermaats. Verder heeft het Comité een grondig literatuurstudie uitgevoerd om de verschillende diagnostische technieken voor bTB, die kunnen gebruikt worden voor bTB bewaking in België, te karakteriseren en te evalueren. Op basis hiervan werden een aantal aanbevelingen geformuleerd voor toekomstige aanpassingen aan het bTB programma. Naast een algemene evaluatie werden ook een aantal specifieke vragen beantwoord.

Voor het Wetenschappelijk Comité,  
De Voorzitter,

Prof. Dr. E. Thiry (Get.)

Brussel, 08/08/2016

## Referenties

Adkin A, Brouwer A, Simons R.R.L., Smith R.P., Arnold M.E., Broughan J., Kosmider R., Downs S.H. Development of risk-based trading farm scoring system to assist with the control of bovine tuberculosis in cattle in England and Wales. *Prev Vet Med*, in press.

Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*. 2010 Aug;16(8):1296-9.

Bekara ME, Azizi L, Bénet JJ, Durand B, 2016. Spatial-temporal Variations of Bovine Tuberculosis Incidence in France between 1965 and 2000. *Transbound Emerg Dis*. 63(1):101-13. doi: 10.1111/tbed.12224. Epub 2014 Apr 16.

Casal C, Alvarez J, Bezos J, Quick H, Díez-Guerrier A, Romero B, Saez JL, Liandris E, Navarro A, Perez A, Domínguez L, Juan Ld, 2015. Effect of the inoculation site of bovine purified protein derivative (PPD) on the skin fold thickness increase in cattle from officially tuberculosis free and tuberculosis-infected herds. *Prev Vet Med*. 121(1-2):86-92.

Conlan AJ, McKinley TJ, Karolemeas K, Pollock EB, Goodchild AV, et al. (2012) Estimating the Hidden Burden of Bovine Tuberculosis in Great Britain. *PLoS Comput Biol* 8(10): e1002730 doi:10.1371/journal.pcbi.1002730.

Dudouet, C. Manipuler et contenir les bovins (3e édition). 26 Août 2015

Farnham, M.W., Norby, B., Goldsmith, T.J., Wells, S.J., 2012. Meta-analysis of field studies on bovine tuberculosis skin tests in United States cattle herds. *Prev. Vet. Med*. 103, 234–242.

Flynn, J.L., Chan, J., 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol*. 19, 93–129.

Francis, J., Seiler, R.J., Wilkie, I.W., O'Boyle, D., Lumsden, M.J., Frost, A.J., 1978. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet. Rec*. 103, 420–425.

Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 24;100(13):7877-82.

Gilbert, M., Mitchell, A., Bourn, D., Mawdsley, J., Clifton-Hadley, R., Wint, W., 2005. Cattle movements and bovine tuberculosis in Great Britain. *Nature* 435(7041), 491-496.

Guta S, Casal J, Napp S, Saez JL, Garcia-Saenz A, Perez de Val B, Romero B, Alvarez J, Allepuz A, 2014. Epidemiological Investigation of Bovine Tuberculosis Herd Outbreaks in Spain 2009/2011, et al. *PLoS ONE* 9(8): e104383. doi:10.1371/journal.pone.0104383

Humblet MF, Boschirolu ML, Saegerman C, 2009. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet Res*. 40(5): 50.

Humblet MF, Gilbert M, Govaerts M, Fauville-Dufaux M, Walravens K, Saegerman C, 2010. New assessment of bovine tuberculosis risk factors in Belgium based on nationwide molecular epidemiology. *J Clin Microbiol*. 48(8):2802-8.

Inwald J, Hinds J, Palmer S, Dale J, Butcher PD, Hewinson RG, Gordon SV. Genomic analysis of Mycobacterium tuberculosis complex strains used for production of purified protein derivative. J Clin Microbiol. 2003 Aug;41(8):3929-32.

Kindt, J.T., Goldsby, A.R., Osborne, B.A., Kuby, J., 2006. Kuby immunology 6th ed. New York, W.H. Freeman ©2007.

Lu M.C., Lien M.H., Becker R.E., Heine H.C., Buggs A.M., Lipovsek D., Gupta R., Robbins P.W., Grosskinsky C.M., Hubbard S.C., Young R.A. Genes for immunodominant protein antigens are highly homologous in Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium africanum, and the vaccine strain Mycobacterium bovis BCG. Infect. Immun. October 1987 vol. 55 no. 10 2378-2382.

Michelet L, de Cruz K, Phalente Y, Karoui C, Hénault S, Beral M, Boschirolu ML. Mycobacterium microti Infection in Dairy Goats, France. Emerg Infect Dis. 2016 Mar;22(3). doi: 10.3201/eid2203.151870

Norby, B., Bartlett, P.C., Fitzgerald, S.D., Granger, L.M., Bruning-Fann, C.S., Whipple, D.L., Payeur, J.B., 2004. The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. J. Vet. Diagn. Invest. 16, 126–131.

OIE 2009. Chapter 2.4.7 Bovine tuberculosis. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.07\\_BOVINE\\_TB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf). In OIE terrestrial Manual.

Plattner, B.L., Doyle, R.T., Hostetter, J.M., 2009. Gamma-delta T cell subsets are differentially associated with granuloma development and organization in a bovine model of mycobacterial disease. Int J Exp Pathol 90, 587-597.

Plattner, B.L., Hostetter, J.M., 2011. Comparative gamma delta T cell immunology: a focus on mycobacterial disease in cattle. Vet Med Int 214384, 16.

Rangel-Frausto MS, Ponce-De-León-Rosales S, Martínez-Abaroa C, Hasløv K. Tuberculosis and tuberculin quality: best intentions, misleading results. Infect Control Hosp Epidemiol. 2001 Aug;22(8):481-4.

Rodríguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. Res Vet Sci. 2014 Oct;97 Suppl:S5-S19.

Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, Palmer MV, Harris BN, Orloski KA, Buddle BM, Thacker TC, Lyashchenko KP, Waters WR, 2010. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. Transbound Emerg Dis. 57(4):205-20.

Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H.M., Palmer, M.V., Harris, B.N., Orloski, K.A., Buddle, B.M., Thacker, T.C., Lyashchenko, K.P., Waters, W.R., 2010, Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. Transbound Emerg Dis 57, 205-220.

van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, van Soolingen D. Characterization of Mycobacterium orygis as M. tuberculosis complex subspecies. Emerg Infect Dis. 2012 Apr;18(4):653-5.

Welby S, Fretin D, Vandewiele H, Imberechts H, Van der Stede Y, 2015. Bovine Tuberculosis Surveillance at Slaughterhouse and Purchase in Belgium: Approach towards Benchmarking. SVEPM Proceedings, SVEPM conference 2015, Ghent, Belgium

Welby S, Govaerts M, Vanholme L, Hooyberghs J, Mennens K, Maes L, Van Der Stede Y, 2012. Bovine tuberculosis surveillance alternatives in Belgium..Prev Vet Med. 106(2):152-61.

Welsh, M.D., Kennedy, H.E., Smyth, A.J., Girvin, R.M., Andersen, P., Pollock, J.M., 2002. Responses of bovine WC1(+) gammadelta T cells to protein and nonprotein antigens of Mycobacterium bovis. Infect Immun 70, 6114-6120.

Whipple, D.L., Bolin, C.A., Davis, A.J., 1995. Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial–interferon assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Am. J. Vet. Res* 56, 415–419.

## Voorstelling van het Wetenschappelijk Comité van het FAVV

Het Wetenschappelijk Comité is een adviesorgaan van het Belgisch Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV) dat **onafhankelijk wetenschappelijk advies** verschaft met betrekking tot risicobeoordeling en risicobeheer in de voedselketen en dit op vraag van de gedelegeerd bestuurder van het FAVV, de Minister die bevoegd is voor de voedselveiligheid of op eigen initiatief. Het Wetenschappelijk Comité wordt administratief en wetenschappelijk ondersteund door de Stafdirectie voor Risicobeoordeling van het Agentschap.

Het Wetenschappelijk Comité bestaat uit 22 leden die benoemd zijn bij koninklijk besluit op basis van hun wetenschappelijke expertise in domeinen die te maken hebben met de veiligheid van de voedselketen. Het Wetenschappelijk Comité kan bij de voorbereiding van een advies beroep doen op externe deskundigen die geen lid zijn van het Wetenschappelijk Comité. Net als de leden van het Wetenschappelijk Comité dienen zij in staat te zijn om onafhankelijk en onpartijdig te kunnen werken. Om de onafhankelijkheid van de adviezen te waarborgen worden potentiële belangenconflicten transparant beheerd.

De adviezen zijn gebaseerd op een wetenschappelijke beoordeling van de vraagstelling. Zij vertolken het standpunt van het Wetenschappelijk Comité dat in consensus is genomen op basis van risicobeoordeling en de bestaande kennis over het onderwerp.

De adviezen van het Wetenschappelijk Comité kunnen **aanbevelingen** bevatten voor het controlebeleid van de voedselketen of voor de belanghebbende partijen. De opvolging van de aanbevelingen voor het beleid behoort tot de verantwoordelijkheid van de risicomangers.

Vragen over een advies kunnen gericht worden aan het secretariaat van het Wetenschappelijk Comité: [Secretariaat.SciCom@favv.be](mailto:Secretariaat.SciCom@favv.be).

## Leden van het Wetenschappelijk Comité

Het Wetenschappelijk Comité is samengesteld uit de volgende leden:

D. Berkvens, A. Clinquart, G. Daube, P. Delahaut, B. De Meulenaer, S. De Saeger, L. De Zutter, J. Dewulf, P. Gustin, L. Herman, P. Hoet, H. Imberechts, A. Legrève, C. Matthys, C. Saegerman, M.-L. Scippo, M. Sindic, N. Speybroeck, W. Steurbaut, E. Thiry, M. Uyttendaele, T. van den Berg

## Belangenconflict

Wegens een belangenconflict gezien hun verantwoordelijkheden in een nationaal referentie laboratorium voor tuberculose namen T. van den Berg (CODA-CERVA), D. Fretin (CODA-CERVA) en V. Mathys (WIV-ISP) enkel deel aan de activiteiten van de werkgroep als ‘uitgenodigde gehoorde deskundigen’ voor wat betreft de delen over diagnostische technieken.

## Dankbetuiging

Het Wetenschappelijk Comité dankt de Stafdirectie voor Risicobeoordeling en de leden van de werkgroep voor de voorbereiding van het ontwerpadvies.



## Samenstelling van de werkgroep

De werkgroep was samengesteld uit:

|  |  |
|--|--|
| Leden van het Wetenschappelijk Comité: | C. Saegerman (verslaggever), D. Berkvens, J. Dewulf, H. Imberechts,  |
| Externe experts:                       | K. Huygen (WIV-ISP), J. Laureyns (UGent), A. Linden (Ulg), L. Rigouts (ITG), V. Roupie (CODA-CERVA), S. Welby (CODA-CERVA) |
| Uitgenodigde gehoorde experts:         | T. van den Berg (CODA-CERVA), D. Fretin (CODA-CERVA), V. Mathys (WIV-ISP)  |
| Dossierbeheerder:                      | P. Depoorter (FAVV)  |

De activiteiten van de werkgroep werden opgevolgd door volgende leden van de administratie (als waarnemers): J. Evers (FAVV), J. Hooyberghs (FAVV), E. Stoop (FAVV), L. Vanholme (FAVV).

## Wettelijk kader

Wet van 4 februari 2000 houdende oprichting van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, inzonderheid artikel 8;

Koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen;

Huishoudelijk reglement, bedoeld in artikel 3 van het koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, goedgekeurd door de Minister op 9 juni 2011.

## Disclaimer

Het Wetenschappelijk Comité behoudt zich, te allen tijde, het recht voor dit advies te wijzigen indien nieuwe informatie en gegevens ter beschikking komen na de publicatie van deze versie.