



Technische Weisungen über die Untersuchungen auf bovine Tuberkulose

vom 27. September 2010 (redaktionelle Anpassung 22 Januar 2014)

Das Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (BLV),
gestützt auf die Artikel 159 und 297 Absatz 1 Buchstabe c der Tierseuchenverordnung vom
27. Juni 1995 (TSV; SR 916.401), auf die Artikel 29 bis 31 der Verordnung über das
Schlachten und die Fleischkontrolle vom 23. November 2005 (VSFK; SR 817.190) sowie auf
die Verordnung des EVD über die Hygiene beim Schlachten vom 23. November 2005
(VHyS; SR 817.190.1)

erlässt folgende Weisungen:

I. Geltungsbereich

1. Die Weisungen richten sich an die kantonalen Vollzugsorgane. Sie regeln die Untersu-
chung von lebenden Tieren (Tuberkulin-Hauttest) der Rinder-, Ziegen- und Schafgat-
tung und in Gefangenschaft gehaltenen Wildwiederkäuer sowie die *post mortem* Un-
tersuchung von Tuberkulose-Verdachtsfällen bei Schlachtungen oder Sektionen von
Wiederkäuern, Wildschweinen und Neuwelt-Kameliden.
2. Als bovine Tuberkulose gelten Infektionen mit *Mycobacterium (M.) bovis* (einschliess-
lich *M. caprae*) und *M. tuberculosis*.

II. Tuberkulin-Hauttest

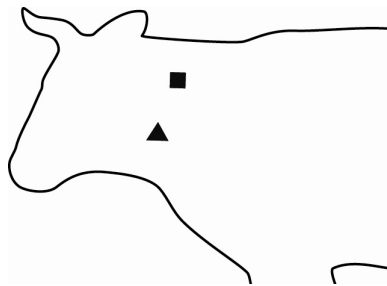
A. Zugelassene Untersuchungsmethode

3. Für den Tuberkulin-Hauttest darf nur standardisiertes PPD Tuberkulin verwendet wer-
den, das vom BLV zugelassen worden ist. Das BLV legt bei der Zulassung die Menge
und Konzentration an bovinem und aviärem Tuberkulin (Internationale Einheiten pro
Dosis) fest, in der das zugelassene Tuberkulin verwendet werden muss. Die injizierte
Menge an bovinem und aviärem Tuberkulin muss mindestens 2'000 und darf maximal
5'000 Internationale Einheiten pro Dosis betragen. Das injizierte Volumen pro Dosis
beträgt in der Regel 0.1 ml und darf 0.2 ml nicht überschreiten.
4. Das Tuberkulin muss intradermal am Hals injiziert werden. Der Test kann als Monotest
mit bovinem Tuberkulin oder als Simultantest mit bovinem und aviärem Tuberkulin
durchgeführt werden.
5. Der Tuberkulin-Hauttest an Exporttieren darf nach der vom Käuferland gewünschten
Methode durchgeführt werden.

B. Vorgehen und Beurteilung

6. Applikation des Tuberkulins

- a. Die Tiere müssen ausgeruht sein und sie dürfen nicht medikamentell immun-supprimiert sein.
- b. Die Tuberkulin-Injektionsstelle befindet sich in der Halsmitte am Uebergang zwischen dem ersten zum mittleren Halsdrittel. Beim Simultantest wird das aviäre Tuberkulin ca. 10 cm unterhalb der Nackenlinie und das bovine Tuberkulin ca. 12 cm unterhalb des aviären Tuberkulins injiziert. Falls bei jüngeren Tieren ein derartiger Abstand zwischen den beiden Injektionsstellen aus Platzgründen nicht eingehalten werden kann, muss die Injektion von bovinem und aviärem Tuberkulin an je einer Halsseite erfolgen. Die Injektionsstelle(n) wird (werden) auf einer Fläche von 3 x 4 cm geschoren und mit Watte trocken gereinigt. Die Hautdicke wird vor der Tuberkulin-Injektion mit einem Kutimeter gemessen. Das Tuberkulin wird intradermal injiziert. Nach der Injektion muss die korrekte Applikation des Tuberkulins überprüft werden, indem eine linsenförmige Erhebung sicht- und palpierbar ist.



Schema 1: Simultantest am Hals. ■ Aviäres Tuberkulin, ▲ Bovines Tuberkulin

7. Beurteilung

- a. Die Tierärztin / der Tierarzt kontrolliert die Reaktion an der bzw. den Injektionsstellen 72 Stunden (± 4 Stunden) nach der Injektion und misst die Hautdicke mit einem Kutimeter.
- b. Die Beurteilung sollte durch die gleiche Tierärztin / den gleichen Tierarzt erfolgen, die / der die erste Hautdickenmessung und die Injektion der Tuberkuline durchgeführt hat. Die Beurteilung muss unter Verwendung des gleichen Kutimeters, das für die erste Hautdickenmessung verwendet wurde, erfolgen.
- c. Beurteilung des einfachen Hauttests (Monotests)
 - Eine negative Reaktion liegt vor, wenn nur ein begrenztes Anschwellen der Hautfaltendicke um < 2 mm und keine klinischen Veränderungen (wie z.B. ausgedehnte Oedeme, blutig-seröse Ausschwitzungen, Schorf, Schmerzempfindlichkeit und Entzündungen der Lymphgefäße in der Umgebung der Injektionsstelle oder der Lymphknoten) festzustellen sind.

- Eine zweifelhafte Reaktion liegt vor, wenn ein Anschwellen der Hautfaltdicke um ≥ 2 mm und < 4 mm und keine klinischen Veränderungen (s. oben) festzustellen sind.
- Eine positive Reaktion liegt vor, wenn die Zunahme der Hautdicke ≥ 4 mm beträgt oder klinische Veränderungen (s. oben) festzustellen sind.

d. Beurteilung des Simultantestes

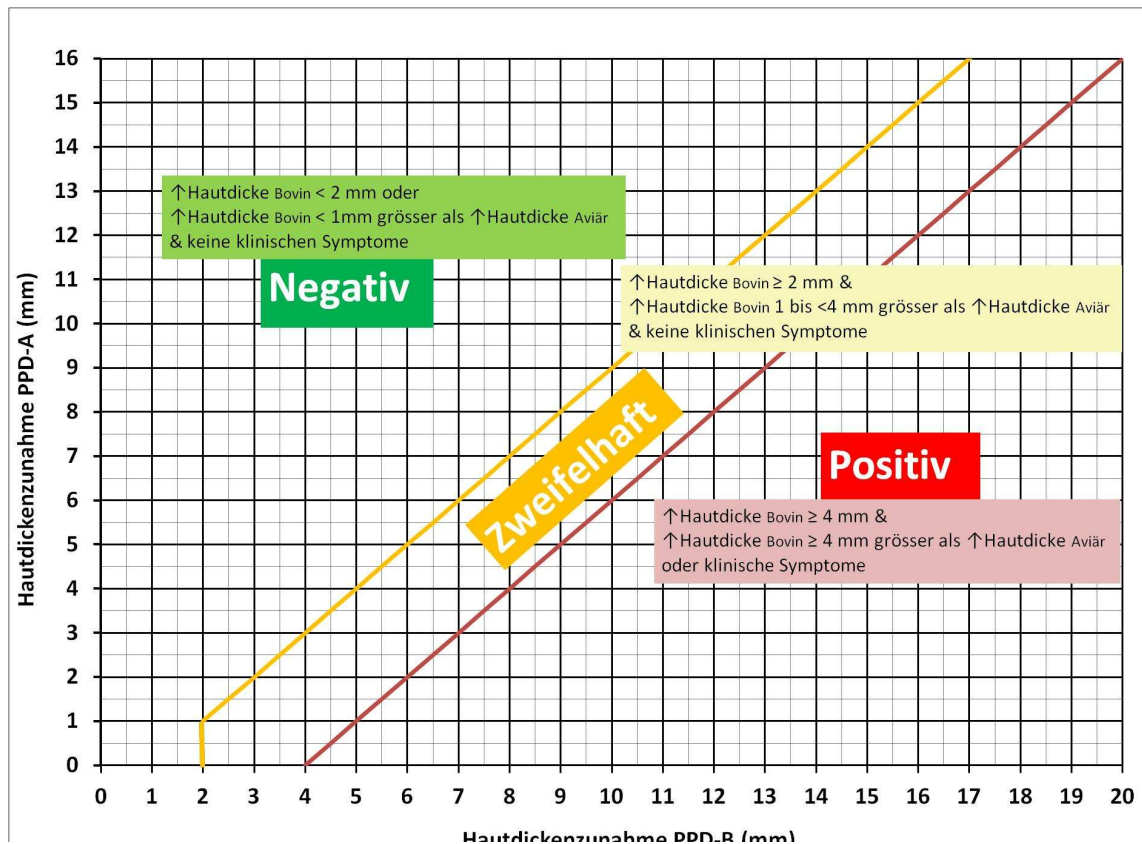
- Eine negative Reaktion liegt vor, wenn die Hautdickenzunahme an der bovinen Injektionsstelle < 2 mm beträgt oder wenn die Hautdickenzunahme an der bovinen Injektionsstelle gleich oder um < 1 mm grösser ist als an der aviären Injektionsstelle, und wenn keine klinischen Veränderungen (s. oben) festzustellen sind.
- Eine zweifelhafte Reaktion liegt vor, wenn die Hautdickenzunahme an der bovinen Injektionsstelle ≥ 2 mm beträgt, und wenn die Hautdickenzunahme an der bovinen Injektionsstelle 1 bis < 4 mm grösser ist als an der aviären Injektionsstelle, und wenn keine klinischen Veränderungen (s. oben) festzustellen sind.
- Eine positive Reaktion liegt vor, wenn die Hautdickenzunahme an der bovinen Injektionsstelle ≥ 4 mm, und wenn die Hautdickenzunahme an der bovinen Injektionsstelle ≥ 4 mm grösser ist als an der aviären Injektionsstelle oder wenn klinische Veränderungen (s. oben) festzustellen sind.

Zusammenfassung der Beurteilung:

Beurteilung	Monotest	Simultantest
Negativ	\uparrow Hautdicke < 2 mm & keine klinischen Symptome	\uparrow Hautdicke _{Bovin} < 2 mm oder \uparrow Hautdicke _{Bovin} < 1 mm grösser \uparrow Hautdicke _{Aviär} & keine klinischen Symptome
Zweifelhafte	\uparrow Hautdicke ≥ 2 mm und < 4 mm & keine klinischen Symptome	\uparrow Hautdicke _{Bovin} ≥ 2 mm & \uparrow Hautdicke _{Bovin} 1 bis < 4 mm grösser als \uparrow Hautdicke _{Aviär} & keine klinischen Symptome
Positiv	\uparrow Hautdicke ≥ 4 mm, oder klinische Symptome	\uparrow Hautdicke _{Bovin} ≥ 4 mm & \uparrow Hautdicke _{Bovin} ≥ 4 mm grösser als \uparrow Hautdicke _{Aviär} oder klinische Symptome

\uparrow Hautdicke = Hautdickenzunahme

Tabelle 1: Interpretation des Mono-und Simultantests



Grafik 1: Interpretation des Simultantests

C. Vorgehen im Fall von zweifelhaften Reaktionen

8. Bei zweifelhaften Reaktionen ordnet die Kantonstierärztin / der Kantonstierarzt die Wiederholung des Tuberkulin-Hauttests in Form eines Simultantests an. Der wiederholte Tuberkulin-Hauttest darf frühestens 42 Tage nach der vorangegangenen Tuberkulinprobe durchgeführt werden, um das Risiko einer möglichen Desensibilisierung zu minimieren. Die Durchführung und Beurteilung des Simultantests erfolgen gemäss den Ziffern 6 und 7.
9. Tritt beim wiederholten Tuberkulin-Hauttest erneut eine zweifelhafte Reaktion auf, so gilt die Reaktion als positiv. Tritt in einem Betrieb ein positives Testresultat auf, so müssen alle Tiere des Betriebes einem Tuberkulosestest unterzogen werden. Alle Tiere mit positivem Testresultat müssen geschlachtet werden. Der Zeitpunkt des Schlachtens wird vom Kantonstierarzt in Absprache mit dem BLV und basierend auf der Einschätzung der epidemiologischen Situation (Risikoabschätzung) bestimmt. Die geschlachteten Tiere sind zusätzlich zu einer sorgfältigen Fleischkontrolle einer gezielten bakteriologischen Untersuchung auf die Erreger der Rindertuberkulose zu unterziehen (siehe III, B und C). Der Seuchenfall liegt vor, wenn *M. bovis* (einschliesslich *M. caprae*) oder *M. tuberculosis* in einem Betrieb mittels Kultur und/oder PCR nachgewiesen wird.

D. Vorgehen im Fall von positiven Reaktionen

10. Bei einer positiven Reaktion im einfachen Hauttest (Monotest) ordnet die Kantonstierärztin / der Kantonstierarzt eine Wiederholung in Form eines Simultantests an. Der wiederholte Tuberkulin-Hauttest darf frühestens 42 Tage nach der vorangegangenen Tuberkulinprobe durchgeführt werden, um das Risiko einer möglichen Desensibilisierung zu minimieren. Die Durchführung und Beurteilung des Simultantests erfolgen gemäss den Ziffern 6 und 7.
11. Alle Tiere des Betriebes müssen einem Tuberkulosestest unterzogen werden. Alle Tiere mit positivem Testresultat müssen geschlachtet werden. Der Zeitpunkt des Schlachtens wird vom Kantonstierarzt in Absprache mit dem BLV und basierend auf der Einschätzung der epidemiologischen Situation (Risikoabschätzung) bestimmt. Die geschlachteten Tiere sind zusätzlich zu einer sorgfältigen Fleischkontrolle einer gezielten bakteriologischen Untersuchung auf die Erreger der Rindertuberkulose zu unterziehen (siehe III, B und C). Der Seuchenfall liegt vor, wenn *M. bovis* (einschliesslich *M. caprae*) oder *M. tuberculosis* in einem Betrieb mittels Kultur und/oder PCR nachgewiesen wird.

E. Bluttest

12. Die vom BLV zugelassenen Bluttests dürfen bei epidemiologischen Abklärungen entweder zur Erhöhung der Sensitivität oder der Spezifität verwendet werden. Der Verwendungszweck wird situationsabhängig vom BLV definiert. Die positiven Resultate müssen durch das Referenzlabor bestätigt werden

III. *Post mortem*-Untersuchungen von Tuberkulose-Verdachtsfällen bei Schlachtungen und Sektionen

A. Laboratorien

13. Die bakteriologische Untersuchung von Verdachtsfällen aus Schlachtungen und Sektionen wird vom Nationalen Referenzlabor für bovine Tuberkulose durchgeführt:

Institut für Veterinär bakteriologie
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Winterthurerstrasse 270
CH-8057 Zürich
Diagnostiklabor Tel. 044 63 58 610

Weitere Informationen zur Tuberkulosedagnostik finden sich auf der webpage des Instituts (<http://www.ivb.uzh.ch/>).

B. Gewinnung und Transport von Untersuchungsmaterial

14. Tuberkulinpositive oder anderweitig tuberkuloseverdächtige Rindern weisen oft einen negativen makroskopischen Schlachtbefund auf (No Gross Lesions reactors, NGL; No

Visible Lesions reactors, NVL). Von solchen „NVL-Tieren“ muss wenigstens je ein Lymphknoten aus dem Kopf-, Thorax- und Abdominalbereich entnommen werden.

Von makroskopisch verändertem (tuberkuloseverdächtigem) Gewebematerial genügt die Einsendung veränderter Bezirke unter möglicher Einbeziehung eines Teils des umschliessenden gesunden Gewebes. Die Probenmenge für die bakteriologische Untersuchung sollte mindestens 5 bis 10 g betragen. Für die Untersuchung von eitrigen Sekreten oder Punktaten werden Probenvolumina von mindestens 5 ml benötigt.

Probenmaterial von tuberkuloseverdächtigen Tieren gehört zur Kategorie B, UN 3373 (Probenmaterial, von dem bekannt oder anzunehmen ist, dass sie Krankheitserreger der Risikogruppe 2 oder 3 enthalten). Bei Verpackung und Versand solcher Proben sind besondere Regeln einzuhalten. Die Proben sind in einen sterilen dichtschiessenden Primärbehälter zu verbringen und zusammen mit saugfähigem Füllmaterial und Polstermaterial in einen verschliessbaren Sekundärbehälter zu verpacken. Dem Probenmaterial ist ein schriftlicher Untersuchungsantrag beizulegen. Dieser sollte gegen Durchfeuchtung und Verschmutzung geschützt sein (Plastikhülle). Sekundärbehälter und Untersuchungsantrag werden (in einer Plastikhülle) in einen speziellen Versandkarton gepackt, der aussen mit den Angaben „**Biologischer Stoff, Kategorie B**“ und dem Rautensignet „**UN 3373**“ gekennzeichnet ist. Das Verpackungs- und Versandmaterial kann ebenso wie der Vordruck für den Untersuchungsantrag am Referenzlabor bezogen werden (<http://www.ivb.uzh.ch/>).

Die Transportdauer von der Probenentnahme bis zur Verarbeitung im Labor sollte **24 Stunden** nicht überschreiten. Ideal ist der Versand per Express mit einer Transportfirma (z.B. SwissPost, DHL oder TNT). Der Probenversand sollte telefonisch im Untersuchungslabor angekündigt werden. Proben, die nicht sofort versendet werden können, sind bei 4°C aufzubewahren.

C. Zugelassene Untersuchungsmethoden

15. Jeder Tuberkulose-Verdachtsfall muss mittels Kultur untersucht werden. Parallel zur Kultur wird eine molekularbiologische Untersuchung (PCR) des klinischen Materials durchgeführt. Das Resultat der molekularbiologischen Untersuchung stellt die Grundlage für die Entscheidung zur Genusstauglichkeit des Schlachtkörpers dar.
16. Alle gezielten Tätigkeiten mit den Erregern der Rindertuberkulose, insbesondere das Arbeiten mit Kulturen, müssen in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 durchgeführt werden. Jeder Verdachtsfall muss nach einem wissenschaftlich anerkannten Vorgehen auf die Erreger der Rindertuberkulose untersucht werden. Dieses basiert auf dem kulturellen und molekularbiologischen Nachweis von Mykobakterien.
17. Der **kulturelle Nachweis von Mykobakterien** ist nach wie vor der bakteriologische Goldstandard. Das Probenmaterial wird homogenisiert und nach einem anerkannten Verfahren zur Abtötung der unspezifischen Begleitflora chemisch behandelt [3]. Für jede kulturelle Untersuchung werden mindestens drei verschiedene Nährmedien, davon ein flüssiges Nährmedium beimpft. Bei den festen Medien werden ein Nährboden auf Volleibasis (z.B. Nährboden nach Löwenstein-Jensen, L.-J.) und ein Nährboden auf Agarbasis (z.B. Middelbrook 7H11 Agar) kombiniert. Als flüssiges Nährmedium wird

Middlebrook 7H9 Bouillon empfohlen. Für die Anzucht von Mykobakterien aus Lymphknoten ist bei mindestens zwei der verwendeten Nährmedien der Zusatz von antimikrobiell wirksamen Supplementen wie PACT (Polymyxin B, Amphotericin B, Carbenicillin, Trimethoprim oder PANTA (Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin) erforderlich. Die Kulturen werden bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ bebrütet und wöchentlich kontrolliert. Die Beobachtung der Kulturen auf mykobakterielles Wachstum wird im allgemeinen nach acht Wochen abgeschlossen. Im Einzelfall ist eine Verlängerung der Bebrütungszeit auf 12 Wochen angezeigt, z.B. bei Diskrepanz zu mikroskopischen oder molekularbiologischen Befunden. Die Identifizierung von Erregern der Rindertuberkulose in bewachsenen Kulturen hat nach anerkannten molekularbiologischen Verfahren zu erfolgen, etwa durch DNS-Sequenzanalyse des *gyrB*-Gens.

18. Die **Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)** erlaubt die schnelle Detektion der DNA von Tuberkulosebakterien in Organproben. Die PCR zum Nachweis von Erregern der Rindertuberkulose sollte als **Real-Time PCR** durchgeführt werden. Es sollten nur PCR-Protokolle angewendet werden, deren Validierung wissenschaftlich dokumentiert ist. Amplifikationstechniken zum Nachweis von Erregern der Rindertuberkulose sollten in Laboratorien nur dann durchgeführt werden, wenn diese auch die konventionellen Methoden der Mykobakteriendiagnostik nach anerkannten Standards durchführen. Der Real-Time PCR Assay am Referenzlabor amplifiziert ein 91 bp-Fragment des hypothetischen Helicase-Gens von Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC). Zum sicheren Nachweis von MTC-DNA wird zudem die Insertionsequenz (IS) 1081 nachgewiesen. Als internes Kontrollsystem ist die Amplifizierung der genomischen DNA des Beta-Aktin-Gens integriert. Parallel sind in jedem Assay DNA-Extraktionskontrollen, Positivkontrollen (*M. bovis*-DNA) und Negativkontrollen mitzuführen. Die PCR wird als positiv bewertet, wenn beide MTC-Zielgene amplifiziert wurden und sämtliche Kontrollen regelgerecht ausgefallen sind.

IV. Interpretation

Die Tuberkulose-Diagnostik beim Rind ist durch die Tatsache erschwert, dass es keinen Gold-Standard gibt. Das Auffinden von typischen Läsionen am Schlachttierkörper mit nachfolgender kultureller Untersuchung gilt lediglich als Bestätigungstest. Die Sensitivität beträgt etwa 30%, die Spezifität liegt bei 100%. Mit der PCR lassen sich ca. 70% der kulturell positiven Proben nachweisen. Dennoch sind die Fleischkontrolle am Schlachthof und die kulturelle Untersuchung die wichtigsten Instrumente unserer Überwachung der Rindertuberkulose. Ohne eine zuverlässige Fleischkontrolle müsste der Rinderbestand regelmässig mit dem Tuberkulin-Hauttest untersucht werden.

Nachdem der Tuberkulin-Hauttest mit ca. 80% (Simultantest) eine wesentlich höhere Sensitivität aufweist als das Auffinden von typischen pathologischen Läsionen und der kulturelle Erregernachweis, kann der Tuberkulose-Status von Tieren mit positivem Hauttest und negativem Kulturresultat nicht bestimmt werden. Bei diesen Tieren kann es sich sowohl um *M. bovis*-infizierte Tiere als auch um nichtinfizierte Tiere handeln. Wichtig ist in diesem Fall, dass diese Tiere aus den Betrieben entfernt und geschlachtet werden, um die Infektion von weiteren Tieren zu verhindern. Es folgen keine weiteren tierseuchenrechtlichen Massnahmen in diesen Fällen; die Betriebe behalten ihren anerkannt Tuberkulose-freien Status.

<i>Ante mortem</i> Tests (Hauttest, Bluttest)	<i>Post mortem</i> Tests (pathologische Veränderungen, Kultur, PCR)	Tuberkulose-Status
negativ	negativ	negativ
positiv	positiv	positiv
negativ	positiv	positiv
positiv	negativ	nicht bestimmbar

Tabelle 2: Testresultate und daraus resultierender Tuberkulose-Status

Für den innergemeinschaftlichen Handel (EU) gilt, dass für den Export von Tieren die Hautdickenzunahme nicht mehr als 2 mm betragen und keine klinischen Veränderungen (s. oben) festzustellen sein dürfen.

V. Inkrafttreten

Diese Weisungen traten am 1. November 2010 in Kraft. Redaktionelle Anpassung am 22 Januar 2014

Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen

Literatur

1. Anon. 2009. Analysis of bovine tuberculosis surveillance in accredited free states. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, January 30, 7-23.
2. Anon. 2009. Richtlinie des Rates vom 26. Juni 1964 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen (64/432/EEC, mit späteren Änderungen und Ergänzungen).
3. Anon. 2009: Bovine Tuberculosis. Diagnostic techniques. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter 2.4.7.
4. Anon. 2010. Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit - Friedrich-Löffler Institut, Amtliche Methodensammlung, Kapitel 53. Tuberkulose der Rinder. http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Publikationen/Methodensammlung_2010-07-07.pdf.
5. De la Rúa-Domenech, R., A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen, and R. S. Clifton-Hadley. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res. Vet. Science 81:190-210.
6. Flournoy, D, and J. Twilley. 2001. Modified Middlebrook 7H9 broth for the rapid detection of mycobacteria. Clin. Lab. Sci. 14:85-88.
7. Lee, H., H.J. Park, S.N. Cho, G.H. Bai, and S.J. Kim. 2000. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the rpoB gene. J. Clin. Microbiol 38:2966-2971.
8. Liebana, E., A. Aranaz, A. Mateos, M. Vilafranca, E. Gomez-Mampaso, J. C. Tercero, J. Alemany, G. Suarez, M. Domingo, and L. Dominguez. 1995. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. J. Clin. Microbiol. 33:33-36.