

PROTOCOLUL PRIVIND TESTUL DE TUBERCULINARE INTRADERMICĂ LA BOVINE

CUPRINS

1. SCOP

2. MATERIAL

3. DOCUMENTAȚIE DE REFERINȚĂ

4. DESCRIERE

4.1. Generalități

4.2. Reactivi și materiale

4.3. Proceduri de testare

4.3.1. Pregătirea locului de inoculare și măsurarea grosimii pielii.

4.3.2. Locul de inoculare.

4.3.3. Inoculare PPD.

4.3.4. Citirea testului.

4.4. Interpretarea rezultatelor

4.4.1. Test unic de tuberculinare intradermică (SIT).

4.4.2. Test comparativ de tuberculinare intradermică (CIT).

1. SCOP

Scopul acestei proceduri este de a descrie metodologia de realizare a testului de tuberculinare intradermică în vederea acordării și menținerii statusului indemn de infecția cu complexul *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) și pentru circulația bovinelor cu vârsta de cel puțin 6 săptămâni în cadrul Uniunii.

2. MATERIALE

Bovine

Conform articolului 3 din Regulamentul UE 2020/688 și articolului 2 din Regulamentul UE 2020/689, „bovină” sau „animal din specia bovină” reprezintă un animal din specia de ungulate aparținând genului *Bison*, *Bos*. (inclusiv subgenurile *Bos*, *Bibos*, *Novibos*, *Poephagus*) și *Bubalus* (inclusiv subgenul *Anoa*) și descendenții rezultați din încrucișarea acestor specii.

3. DOCUMENTAȚIA DE REFERINȚĂ

- Regulamentul (UE) 2016/429 al Parlamentului European și al Consiliului din 9 martie 2016 privind bolile transmisibile la animale și de modificare și abrogare a anumitor documente în domeniul sănătății animale („Legea privind sănătatea animală”).
- Regulamentul Delegat (UE) 2018/1629 al Comisiei de modificare a listei bolilor stabilite în anexa II la Regulamentul (UE) 2016/429 al Parlamentului European și al Consiliului privind bolile transmisibile ale animalelor și de modificare și de abrogare a anumitor acte din domeniul sănătății animalelor („Legea privind sănătatea animală”).
- Regulamentul de punere în aplicare (UE) 2018/1882 al Comisiei privind aplicarea anumitor norme de prevenire și control al bolilor în cazul categoriilor de boli listate și de stabilire a unei liste a speciilor și a grupurilor de specii care prezintă un risc considerabil de răspândire a bolilor listate respective.
- Regulamentul Delegat (UE) 2020/689 al Comisiei de completare a Regulamentului (UE) 2016/429 al Parlamentului European și al Consiliului în ceea ce privește normele privind supravegherea, programele de eradicare și statutul de indemn de boală pentru anumite boli listate și emergente.
- Regulamentul Delegat (UE) 2020/688 al Comisiei de completare a Regulamentului (UE) 2016/429 al Parlamentului European și al Consiliului în ceea ce privește cerințele de sănătate animală pentru circulația în interiorul Uniunii a animalelor terestre și a ouălor pentru incubație.
- Manualul terestru OIE. Capitolul 3.4.6. Tuberculoza bovină. 2018:1058-1074.
- Directiva Consiliului din 26 iunie 1964 privind problemele de sănătate animală care afectează comerțul intracomunitar cu bovine și porcine (64/432/CEE).
- Álvarez J., Pérez A., Bezos J., Marqués S., Grau A., Saéz JL, Mínguez O., de Juan L., Domínguez L. 2012. Evaluarea sensibilității și specificului testelor de diagnosticare a tuberculozei bovine la efectivele de bovine infectate în mod natural folosind o abordare bayesiană. *Vet Microbiol.* 155:38-43.
- Bezos J., Casal C., Romero B., Schroeder B., Hardegger R., Raeber A.J., López L., Rueda P., Domínguez L. 2014 Tehnici actuale ante-mortem pentru diagnosticul tuberculozei bovine. *Res Vet Sci.* 97 Suppl: S44-52.
- Casal C., Álvarez J., Bezos J., Quick H., Díez-Guerrier A., Romero B., Sáez JL, Liandris E., Navarro A., Perez A., Domínguez L., de Juan L. 2015. Efectul locului de inoculare al derivatului proteic purificat bovin (PPD) asupra creșterii grosimii pliului cutanat la bovinele din efectivele oficial indemne de tuberculoză și infectate cu tuberculoză. *Prev Vet Med.* 121(1-2):86-92.
- Chapinal N., Schumaker B.A., Joly D.O., Elkin B.T., Stephen C. 2015. Analiza bayesiană pentru evaluarea testelor în ceea ce privește detectarea infecției cu *Mycobacterium bovis* la zimbrii sălbatici liberi (*Bison bison athabasca*) în absența unui standard de aur. *J Wildl Dis.* 51(3):619-625.
- Chapinal N., Elkin B.T., Joly D.O., Schumaker B.A., Stephen C. 2012. Acord între testul pliului caudal și testele serologice pentru depistarea infecției cu *Mycobacterium bovis* la zimbrii. *Prev Vet Med.* 105(4):326-330.
- Kanameda M., Ekgatat M., Wongkasemjit S., Sirivan C., Pachimasiri T., Kongkrong C., Buchaphan K., Boontarat B. 1999. O evaluare a testelor de tuberculinare cutanate utilizate pentru a diagnostica tuberculoza la bivoli de mlaștină (*Bubalus bubalis*). *Prev Vet Med.* 39(2):129-135.
- Khattak I., Mushtaq M.H., Ahmad Mu., Khan M.S., Chaudhry M., Sadique U. 2016. Factori de risc asociați cu gradul de pozitivitate al pielii la *Mycobacterium bovis* la bovine și bivoli originari din Peshawar, Pakistan. *Trop Anim Health Prod.* 48(3):479-485.

- Maes, M., Gimenez, J.F., D'Alessandro, A., De Waard, J.H., 2011. Stabilitatea derivatului proteic purificat de tuberculină umană, bovină și aviară (PPD). J Infect. Dev Ctries. 5(11):781-785.
- Schiller I., Oesch B., Vordermeier HM, Palmer MV, Harris BN, Orloski KA, Buddle BM, Thacker TC, Lyashchenko KP, Waters WR 2010. Tuberculoza bovină: o revizuire a tehnicilor de diagnostic actuale și emergente, având în vedere relevanța lor pentru controlul și eradicarea bolilor. Transbound Emerg Dis. 57:205-220.
- Smith K., Bernitz N., Cooper D., Kerr TJ, de Waal CR, Clarke C., Goldswain S., McCall W., McCall A., Cooke D., Rambert E., Kleynhans L., Warren RM, van Helden P., Parsons SDC, Goosen WJ, Miller MA 2021. Optimizarea testului de tuberculinare cutanată pentru detectarea Mycobacterium bovis la bivoliile africani (Syncerus caffer). Prev Vet Med. 188:105254.
- Proceduri Operaționale Standard Interne de Laborator în vederea asigurării calității rezultatelor.

4. DESCRIERE

4.1. Generalități

Conform literaturii științifice, animalele infectate cu speciile complexului Mycobacterium tuberculosis dețin limfocite circulante sensibilizate la antigenele unor astfel de micobacterii. Testul intradermic de tuberculinare se bazează pe reacția locală de hipersensibilitate întârziată sau de tip IV (DTH) la animalele infectate. DTH este o reacție inflamatorie de bază celulară indusă de citokinele secretate de anumite subpopulații de limfocite helper (Th), în special subpopulația Th1, activată prin contactul anterior cu antigenul. Se caracterizează printr-o recrutare a mai multor celule inflamatorii care încearcă să izoleze infecția, producând o reacție inflamatorie locală. Macrofagele reprezintă celulele de tip predominant, dar sunt descrise și celulele Langerhans, limfocitele T și bazofilele.

În cadrul hipersensibilității întârziate sau de tip IV (DTH) există două faze principale. Inițial, o fază de sensibilizare în care se produce un contact inițial cu antigenul și nu se observă semne clinice. Durează între una și două săptămâni când există o recunoaștere antigenică de către celulele prezentatoare de antigen (APC) și activarea și diferențierea limfocitelor T.

A doua fază este cea când are loc un al doilea contact cu antigenul și sistemul imunitar reacționează încercând să elimine agentul patogen. Douăzeci și patru de ore după acest al doilea contact apar semne clinice, deși reacția maximă este la 48-72 de ore. În acest caz, dacă animalul a fost expus anterior (adică animalul infectat), se produce o reacție inflamatorie locală. În funcție de timpul de reacție și numărul de celule, s-au putut observa edeme, exsudație, necroză, durere, emfizem subcutanat și chiar mărirea ganglionilor limfatici regionali.

Antigenul pentru procedura de testare cutanată intradermică la tuberculină este un derivat proteic purificat (PPD) care este denumit și „tuberculină”. Acest reactiv este un preparat obținut din produsele de creștere și liză tratate termic ale Mycobacterium bovis (PPD bovin) sau M. avium (PPD aviar).

Următoarele teste de tuberculinare intradermice sunt incluse în legislația UE:

- Testul unic de tuberculinare intradermică (SIT): acest test necesită o singură inoculare intradermică de tuberculină bovină.
- Testul comparativ de tuberculinare intradermică (CIT): acest test necesită o injecție de tuberculină bovină și o injecție de tuberculină aviară administrate simultan.

4.2. Reactivi și materiale

- Aparat de tuns electric sau manual.
- Șubler cu arc.
- Seringi sterile sau sistem de injector intradermic automat validat cu multi-doze.
- Seringi sterile (5 ml) și ace sterile (20G).
- Derivați proteici purificați validați de la bovine și păsări (PPD). Consultați recomandările producătorului pentru condițiile de depozitare.
- Mănuși, prosop de hârtie, recipient bio-sanitar.
- Saci de transport termic.
- Sistem de înregistrare.

Echipamentul trebuie să se supună procedurilor de întreținere, calibrare și dezinfectare de rutină conform instrucțiunilor producătorului.

4.3. Proceduri de testare

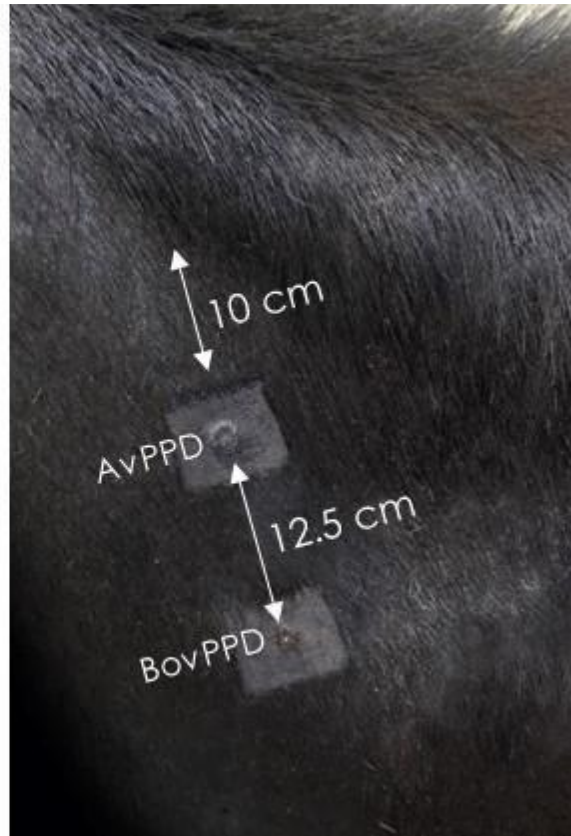
4.3.1. Pregătirea locului de inoculare și măsurarea grosimii cutanate.

Locurile de injectare sau de inoculare trebuie tuse corect (aproximativ o zonă de 5 cm² utilizând o mașină de tuns electrică sau un dispozitiv manual care garantează o tundere corespunzătoare) și curățate. Acest loc trebuie să fie lipsit de pete, răni sau alte modificări ale pielii care ar putea interfera cu rezultatele testului. Un pliu cutanat în fiecare zonă tunsă, trebuie luat între arătător și degetul mare și măsurat cu un șubler validat și înregistrat.

4.3.2. Locul de inoculare.

Locurile de injectare trebuie să fie situate la marginea treimii anterioare și mijlocii ale gâtului. Atunci când, atât tuberculinele aviare, cât și cele bovine sunt injectate aceluiași animal, locul de injectare al tuberculinei aviare trebuie să fie la aproximativ 10 cm de creasta gâtului și locul de injectare al tuberculinei bovine la aproximativ 12,5 cm mai jos pe o linie aproximativ paralelă cu linia umărului (Figura 1) sau pe diferite părți ale gâtului.

La animalele tinere la care nu există spațiu pentru a separa suficient locurile de inoculat pe o parte a gâtului, trebuie făcută o injecție pe fiecare parte a gâtului în locuri identice în centrul treimii mijlocii a gâtului.



4.3.3. Inoculare PPD.

Doza de tuberculinare trebuie injectată în regiunea centrală a zonei tunse printr-o metodă care să asigure administrarea intradermică a tuberculinei. Acest lucru s-ar putea realiza printr-un sistem injector intradermic automat validat cu multi-doze sau o seringă sterilă. În ultimul caz, se poate folosi un ac scurt steril, cu marginea teșită spre exterior, cu seringă gradată încărcată cu tuberculină, introdus oblic în straturile mai adânci ale pielii. Indiferent de sistemul utilizat, o injecție corectă trebuie confirmată prin palparea unei mici umflături asemănătoare unui bob de mazăre la fiecare loc de injectare. Volumul fiecărei inoculări trebuie să fie de 0,1 ml (nedepășind 0,2 ml) iar doza de tuberculină nu trebuie să fie mai mică de 2.000 de unități internaționale (UI).

4.3.4. Citirea testului.

Grosimea pliului cutanat al fiecărui loc de injectare trebuie re-măsurată la 72 de ore (± 4 ore) după inoculare și înregistrată.

4.4. Interpretarea rezultatelor

Interpretarea testelor SIT și CIT se bazează pe observațiile clinice și pe creșterea (creșterile) înregistrate ale grosimii pliurilor cutanate (mm) la locurile de inoculare la 72 de ore (± 4 ore) după injectarea PPD.

4.4.1. Test unic de tuberculinare intradermică (SIT).

Interpretarea testului SIT trebuie efectuată conform următoarelor criterii (tabelul 1):

a) Reacție negativă: dacă se observă doar o umflare limitată, cu o creștere de cel mult 2 mm a grosimii pliului cutanat fără să existe semne clinice precum edem difuz sau extins, exsudație, necroză, durere sau inflamație a căilor limfatice în acea regiune sau a ganglionilor limfatici.

b) Reacție neconcludentă: dacă nu se observă semne clinice precum cele menționate la punctul a) și dacă, creșterea grosimii pliului cutanat este mai mare de 2 mm și mai mică de 4 mm.

Animalele neconcludente vor fi supuse unui alt test după cel puțin 42 de zile. Animalele care nu au obținut rezultate negative la acest al doilea test sunt considerate pozitive la test.

c) Reacție pozitivă: dacă se observă semne clinice precum cele menționate la punctul a) sau există o creștere de 4 mm sau mai mare a grosimii pliului cutanat la locul injectării.

Animalele pozitive la testul intradermic unic pot fi supuse unui test comparativ intradermic dacă se suspectează o reacție fals pozitivă sau o reacție de interferență.

4.4.2. Test comparativ de tuberculinare intradermică (CIT).

Interpretarea testului CIT trebuie efectuată conform următoarelor criterii (tabelul 1):

a) Reacție negativă: o reacție bovină negativă, sau o reacție bovină pozitivă sau neconcludentă, dar care este egală sau mai mică decât o reacție aviară pozitivă sau neconcludentă și absența semnelor clinice în ambele cazuri.

b) Reacție neconcludentă: o reacție bovină pozitivă sau neconcludentă care este de la 1 până la 4 mm mai mare decât reacția aviară și absența semnelor clinice.

Animalele neconcludente la testul comparativ intradermic sunt supuse unui alt test după minim 42 de zile. Animalele care nu au obținut rezultate negative la acest al doilea test vor fi considerate pozitive la test.

c) Reacție pozitivă: o reacție bovină pozitivă care este cu peste 4 mm mai mare decât reacția aviară sau prezența semnelor clinice.

Tabel 1 Prezentare schematică a interpretării testelor SIT și CIT.

Test	Interpretare	Semne clinice	Creștere a grosimii pliului cutanat (mm)	Remarci
SIT	Negativ	Nu, doar umflătură limitată	$TI \leq 2$	
	Neconcludent	Nu	$2 < TI < 4$	Repetarea testului ≥ 42 zile Animalele care nu au obținut rezultate negative sunt considerate pozitive
	Pozitiv	Da	$TI \geq 4$	Animalele pot fi supuse unui test CIT dacă se suspectează o reacție fals pozitivă sau o reacție de interferență.
CIT	Negativ	Nu	Reacția bovină negativă sau [Reacția bovină pozitivă /neconcludentă] \leq [reacția aviară pozitivă/ neconcludentă]	
	Neconcludent	Nu	Reacția bovină pozitivă/ neconcludentă și 1-4 mm > reacția aviară	Repetarea testului ≥ 42 zile Animalele care nu au obținut rezultate negative sunt considerate pozitive
	Pozitiv	Da	Reacția bovină pozitivă > reacția aviară mai mare de 4 mm	

Semne clinice: edem difuz sau extins, exsudație, necroză, durere sau inflamație a canalelor limfatice din acea regiune sau a ganglionilor limfatici.

În această situație, animalelor nu li se permite să fie introduse în comerțul intra-comunitar până la soluționarea statusului lor.

Pentru a permite detectarea numărului maxim de animale infectate și bolnave într-o unitate sau într-o regiune, statele membre pot modifica respectivele criterii de interpretare a testului pentru a obține o sensibilitate îmbunătățită a testului, luând în considerare toate reacțiile neconcludente denumite reacții pozitive.

Statusul oficial de efectiv indemn de tuberculoză poate fi suspendat, iar animalelor din unitate nu li se va permite să fie introduse în comerțul intracomunitar până când nu se soluționează situația incertă a următoarelor animale:

- (a) animale care au fost considerate a fi neconcludente la testul unic de tuberculinare intradermică;
- (b) animale care au fost considerate pozitive la testul unic de tuberculinare intradermică, dar care așteaptă retestarea cu un test comparativ intradermic;
- (c) animale care au fost considerate a fi neconcludente la testul comparativ intradermic.

Astfel de animale trebuie izolate de celelalte animale ale unității până când statusul lor este soluționat, fie printr-un test suplimentar după 42 zile, fie prin examinare post-mortem și de laborator.

În plus, în cazul în care legislația comunitară prevede ca animalele să fie supuse unui test intradermic înainte de deplasare, testul trebuie interpretat astfel încât niciun animal care prezintă o creștere a grosimii pliului cutanat mai mare de 2 mm de reacție bovină sau prezența unei reacții clinice să nu fie introdus în comerțul intracomunitar.