

RÈGLEMENT (CE) N° 1226/2002 DE LA COMMISSION
du 8 juillet 2002
modifiant l'annexe B de la directive 64/432/CEE du Conseil

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu la directive 64/432/CEE du Conseil du 26 juin 1964 relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intra-communautaires d'animaux des espèces bovine et porcine ⁽¹⁾, modifiée en dernier lieu par le règlement (CE) n° 535/2002 de la Commission ⁽²⁾ et notamment son article 16, paragraphe 1, deuxième alinéa,

considérant ce qui suit:

- (1) Le 11 octobre 1999, le comité scientifique de la santé et du bien être des animaux a adopté un rapport ⁽³⁾ sur la modification des annexes techniques de la directive 64/432/CEE en vue de tenir compte des progrès scientifiques en matière de tuberculose, de brucellose et de leucose bovine en zootique.
- (2) Selon ce rapport, les tests de recherche de la tuberculose doivent être réalisés conformément à la 3^e édition du manuel des normes pour les tests de diagnostic et les vaccins (édition 1996) de l'Office international des épizooties (OIE).
- (3) En août 2001, l'OIE a publié la 4^e édition dudit manuel (édition 2000) qui comporte certaines modifications en ce qui concerne la description des tests applicables à la tuberculose.

- (4) En janvier 2002, la direction européenne de la qualité des médicaments a publié la 4^e édition (édition 2002) de la Pharmacopée européenne, y compris les monographies 0535 et 0536 pour le dérivé protéique purifié de la tuberculine aviaire et bovine.
- (5) Il est par conséquent nécessaire de modifier l'annexe B de la directive 64/432/CEE de manière à définir des procédures de test applicables aux fins de la surveillance et des échanges à l'intérieur de la Communauté tout en tenant compte de l'avis du Comité scientifique vétérinaire.
- (6) Les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

L'annexe B de la directive 64/432/CEE est remplacée par l'annexe du présent règlement.

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes*.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 8 juillet 2002.

Par la Commission

David BYRNE

Membre de la Commission

⁽¹⁾ JO L 121 du 29.7.1964, p.1977/64.

⁽²⁾ JO L 80 du 23.3.2002, p. 22.

⁽³⁾ SANCO/B3/R10/1999.

ANNEXE

«ANNEXE B

TUBERCULOSE

1. IDENTIFICATION DE L'AGENT

La présence du *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), agent de la tuberculose bovine, sur des échantillons cliniques et post mortem peut être établie par l'examen de frottis colorés ou de techniques d'immunoperoxydase et confirmée par culture de l'organisme sur un milieu d'isolement primaire.

Le tissu pathologique pour la confirmation de la présence du *M. bovis* doit être prélevé sur des ganglions anormaux et des organes parenchymateux tels que les poumons, le foie, la rate, etc. Dans les cas où l'animal ne présente pas de lésions pathologiques, des échantillons devront être prélevés sur les ganglions rétropharyngiens, les ganglions pulmonaires, les ganglions médiastinaux, les ganglions lymphatiques supramammaires, les ganglions maxillaires et certains ganglions mésantériques et hépatiques, pour procéder à leur examen et à leur culture.

L'identification d'isolats peut habituellement se faire en déterminant les propriétés biochimiques et les spécificités de culture. La réaction en chaîne à la polymérase (PCR) peut aussi être utilisée pour détecter le complexe de tuberculose *M. tuberculosis*. Les techniques d'analyse de l'ADN peuvent se révéler plus rapides et plus fiables que les méthodes biochimiques pour différencier le *Mycobacterium bovis* des autres membres du complexe de tuberculose *M. tuberculosis*. Les empreintes génétiques permettent d'établir la différence entre les différentes souches du *Mycobacterium bovis* et elles permettront de décrire les modèles de l'origine ainsi que les modes de transmission et de contagion du *Mycobacterium bovis*.

Les techniques et les moyens utilisés, leur standardisation et l'interprétation des résultats doivent être conformes aux indications figurant au chapitre 2.3.1 (brucellose bovine) du manuel des normes pour les tests de diagnostic et les vaccins (4^e édition, 2000) de l'OIE.

2. TEST CUTANÉ À LA TUBERCULINE

Les dérivés protéiques purifiés de la tuberculine qui remplissent les conditions établies au point 2.1 seront utilisés pour réaliser le test cutané officiel à la tuberculine en suivant les procédures mentionnées au point 2.2.

2.1. Normes applicables à la tuberculine (bovine et aviaire)

2.1.1. Définition

Le dérivé protéique purifié (tuberculine PPD, bovine ou aviaire) est une préparation obtenue en faisant subir un traitement thermique à des produits de croissance et de lyse du *Mycobacterium bovis* et du *Mycobacterium avium* (selon le cas) capables de révéler une hypersensibilité retardée chez un animal sensibilisé à des micro-organismes de la même espèce.

2.1.2. Production

Elle est obtenue à partir de fractions solubles dans l'eau préparées en chauffant à la vapeur lâchée librement, puis en filtrant des cultures de *M. bovis* et *M. avium* (selon le cas) élevées dans un milieu synthétique liquide. La fraction active du filtrat, composée essentiellement de protéines, est isolée par précipitation, lavée et fait l'objet d'une nouvelle dissolution. On peut ajouter un produit de protection antimicrobien qui ne provoque pas de fausses réactions positives comme le phénol. La préparation stérile finale, exempte de mycobactéries, est répartie dans des conditions d'asepsie, dans des récipients en verre inviolables qui sont ensuite fermés afin d'éviter toute contamination. La préparation peut être lyophilisée.

2.1.3. Identification du produit

Injecter par voie intradermique plusieurs doses calibrées à différents endroits sur des cobayes albinos correctement sensibilisés, ne pesant pas moins de 250 grammes chacun. Après 24 à 28 heures, des réactions apparaissent sous forme d'œdèmes avec érythème, avec ou sans nécrose aux points d'injection. L'ampleur et la gravité des réactions varient selon la dose injectée. Les cobayes insensibilisés ne présentent aucune réaction à des injections de ce type.

2.1.4. Tests

2.1.4.1. pH: le pH est de 6,5 à 7,5.

- 2.1.4.2. Phénol: si la préparation à examiner contient du phénol, sa concentration ne doit pas être supérieure à 5 g/l.
- 2.1.4.3. Effet sensibilisant: utiliser un groupe de 3 cobayes qui n'ont été traités avec aucun matériel interférant avec le test. À trois reprises, à cinq jours d'intervalle, injecter par voie intradermique à chaque cobaye une dose de la préparation à examiner équivalente à 500 UI dans 0,1 ml. Quinze à vingt-et-un jours après la première injection, injecter la même dose (500 UI) par voie intradermique à ces animaux et à un groupe de contrôle de trois cobayes de même poids et n'ayant pas reçu au préalable d'injections de tuberculine. 24 à 48 heures après les dernières injections, les réactions des deux groupes ne présentent pas de grandes différences.
- 2.1.4.4. Toxicité: utiliser deux cobayes, pesant au moins 250 grammes chacun et n'ayant été traités au préalable avec aucun matériel interférant avec le test. Injecter par voie sous-cutanée à chaque cobaye 0,5 ml de la préparation à examiner. Observer les animaux pendant sept jours. Pendant la période d'observation, il ne se produit aucun effet anormal.
- 2.1.4.5. Stérilité: il convient d'effectuer le test de stérilité prescrit par la monographie sur les vaccins à usage vétérinaire, 4^e édition (2002), de la Pharmacopée européenne.
- 2.1.5. *Activité*

On détermine l'activité du dérivé protéique purifié de la tuberculine (bovine et aviaire) en comparant les réactions produites chez les cobayes sensibilisés par l'injection intradermique d'une série de dilutions de la préparation à examiner à celles produites par les concentrations connues d'une préparation de référence de dérivé protéique purifié de la tuberculine (bovine et aviaire, selon le cas) mesurée en unités internationales.

Pour tester l'activité, sensibiliser au moins neuf cobayes albinos, de 400 à 600 grammes chacun, par une injection intramusculaire profonde de 0,0001 mg de masse humide de *M. bovis* vivant de souche AN5, en suspension dans 0,5 ml d'une solution de 9 g/l de chlorure de sodium R pour la tuberculine bovine, ou une dose appropriée de *M. avium* inactivé ou vivant, pour la tuberculine aviaire. Quatre semaines au moins après la sensibilisation des cobayes, raser les flancs des animaux afin de disposer de l'espace nécessaire pour un maximum de quatre points d'injection de chaque côté. Préparer des dilutions de la préparation à examiner et de la préparation de référence en utilisant une solution saline isotonique tamponnée de phosphates (pH entre 6,5 et 7,5) contenant 0,005 g/l de polysorbate 80 R. Utiliser au moins trois doses de la préparation de référence et autant de la préparation à examiner. Choisir les doses de sorte que les lésions produites aient un diamètre de 8 à 25 mm. Répartir les dilutions de manière aléatoire sur les points en utilisant un carré latin. Injecter chaque dose par voie intradermique dans un volume constant de 0,1 ou 0,2 ml. Après 24 à 48 heures, mesurer les diamètres des lésions et calculer le résultat du test, en utilisant les méthodes statistiques habituelles et en se basant sur l'hypothèse que les diamètres des lésions sont directement proportionnels au logarithme de la concentration des tuberculines.

Le test ne sera valable que si les limites d'erreur ($P = 0,95$) sont supérieures à 50 % et inférieures à 200 % de l'activité estimée. L'activité estimée est supérieure à 66 % et inférieure à 150 % de la puissance déclarée de la tuberculine bovine. L'activité calculée sera supérieure à 75 % et inférieure à 133 % de la puissance déclarée de la tuberculine aviaire. L'activité déclarée sera supérieure à 20 000 UI/ml pour les deux tuberculines (bovine et aviaire).

2.1.6. *Stockage*

Stocker à l'abri de la lumière, à une température de 5 ± 3 °C.

2.1.7. *Étiquetage*

L'étiquette doit indiquer:

- l'activité en unités internationales par millilitre,
- le nom et la quantité des substances ajoutées,
- pour les préparations lyophilisées:
 - le nom et le volume du liquide de reconstitution à ajouter,
 - que le produit doit être utilisé immédiatement après reconstitution.

2.2. **Procédures de test**

2.2.1. Les tests suivants sont reconnus comme tuberculinations intradermiques officielles:

- le test intradermique simple: ce test requiert une seule injection de tuberculine bovine,
- le test intradermique comparatif: ce test requiert l'administration simultanée d'une injection de tuberculine bovine et d'une injection de tuberculine aviaire.

- 2.2.2. La dose de tuberculine injectée sera:
- égale ou supérieure à 2 000 UI de tuberculine bovine,
 - égale ou supérieure à 2 000 UI de tuberculine aviaire.
- 2.2.3. Le volume de chaque injection ne dépassera pas 0,2 ml.
- 2.2.4. Les tests de tuberculine seront réalisés en injectant la tuberculine dans la peau du cou. Les points d'injection se situeront à limite des tiers antérieur et médian du cou. Lorsque les deux types de tuberculine, bovine et aviaire, seront injectés à un même animal, le point d'injection de la tuberculine aviaire sera situé à 10 cm de la crête du cou et celui de la tuberculine bovine, 12,5 cm plus bas, sur une ligne à peu près parallèle à la ligne de l'épaule ou sur les côtés du cou; sur les animaux jeunes où il n'y a pas d'espace pour séparer suffisamment les points d'injection sur un côté du cou, on administrera une injection de chaque côté du cou, à des points identiques, au centre du tiers médian du cou.
- 2.2.5. La technique de tuberculination et l'interprétation des réactions seront les suivantes:
- 2.2.5.1. Technique
- Les points d'injection seront poinçonnés et nettoyés. Dans chaque zone de peau poinçonnée, on prendra un pli de peau entre le pouce et l'index, on le mesurera à l'aide d'un compas et on notera le résultat. La dose de tuberculine sera ensuite injectée par une méthode garantissant son administration par voie intradermique. On pourra utiliser pour cela l'aiguille courte et stérile, bord biseauté vers l'extérieur, d'une seringue graduée contenant de la tuberculine, que l'on introduira dans les couches les plus profondes de la peau. On s'assurera que l'injection a été faite correctement en palpant un petit gonflement de la taille d'un petit pois à chaque point d'injection. On mesurera à nouveau l'épaisseur du pli de la peau de chaque point d'injection 72 heures (+/- 4 h) après l'injection et on notera le résultat.
- 2.2.5.2. Interprétation des réactions
- L'interprétation des résultats se fera sur la base des observations cliniques et de la ou des augmentations enregistrées de l'épaisseur des plis de la peau notées aux points d'injection 72 heures après l'injection de la ou des tuberculines.
- a) Réaction négative: on qualifie la réaction de négative si on observe seulement un gonflement limité, avec une augmentation de l'épaisseur du pli de la peau ne dépassant pas 2 mm, sans signes cliniques tels qu'un œdème diffus ou étendu, une exsudation, une nécrose, une douleur ou une inflammation des canaux lymphatiques de cette région ou des ganglions lymphatiques.
 - b) Réaction douteuse: on qualifie la réaction de douteuse si on n'observe aucun des signes cliniques mentionnés au point a) et si l'augmentation de l'épaisseur du pli de la peau est supérieure à 2 mm et inférieure à 4 mm.
 - c) Réaction positive: on qualifie la réaction de positive si on observe des signes cliniques mentionnés au point a) ou une augmentation de 4 mm ou plus de l'épaisseur du pli de la peau au point d'injection.
- 2.2.5.3. L'interprétation des tuberculinations intradermiques officielles sera la suivante:
- 2.2.5.3.1. Test intradermique simple:
- a) positif: réaction positive chez le bovin comme celle décrite au point c) du point 2.2.5.2;
 - b) douteux: réaction douteuse comme celle décrite au point b) du point 2.2.5.2;
 - c) négatif: réaction négative chez le bovin comme celle décrite au point a) du point 2.2.5.2.
- Les animaux chez qui le test intradermique simple a donné des résultats douteux seront soumis à une autre tuberculination après un délai minimal de quarante-deux jours.
- Les animaux chez qui ce deuxième test ne donne pas de résultats négatifs seront considérés comme positifs.
- Les animaux chez qui le test intradermique simple donnera des résultats positifs pourront être soumis à un test intradermique comparatif si on soupçonne l'existence d'une réaction positive fautive ou d'une réaction d'interférence.
- 2.2.5.3.2. Test intradermique comparatif pour la détermination et le maintien du statut de troupeau officiellement indemne de tuberculose:
- a) positif: on assiste à une réaction positive chez le bovin lorsque l'on est en présence de signes cliniques ou que la tuberculine bovine a pour conséquence que l'épaisseur du pli de la peau est supérieure de plus de 4 mm à la réaction à la tuberculine aviaire;
 - b) douteux: on assiste à une réaction positive ou douteuse chez le bovin lorsqu'il y a absence de signes cliniques et que la tuberculine bovine entraîne une réaction positive ou douteuse dans laquelle l'épaisseur du pli de la peau est de 1 à 4 mm supérieure à la réaction à la tuberculine aviaire;
 - c) négatif: on assiste à une réaction négative chez le bovin lorsqu'il y a absence de signes cliniques et que la tuberculine bovine entraîne une réaction négative ou une réaction positive ou douteuse avec augmentation de l'épaisseur du pli de la peau égale ou inférieure à une réaction positive ou douteuse à la tuberculine aviaire.
- Les animaux chez qui les tests intradermiques comparatifs ont donné des résultats douteux devront être soumis à un autre test, après un délai minimal de quarante-deux jours. Les animaux chez qui le deuxième test ne donne pas de résultats négatifs seront considérés comme positifs.

- 2.2.5.3.3. Le statut de troupeau officiellement indemne de tuberculose pourra être suspendu et les animaux de ce troupeau ne pourront pas faire l'objet d'échanges commerciaux intracommunautaires jusqu'à ce que le statut des animaux suivants soit réglé:
- les animaux qui ont été considérés comme douteux lors du test intradermique simple;
 - les animaux qui ont été considérés comme positifs lors du test intradermique simple mais qui attendent de subir un nouvel examen sous forme de test intradermique comparatif;
 - les animaux qui ont été considérés comme douteux lors du test intradermique comparatif.
- 2.2.5.3.4. Lorsque la législation communautaire exige que les animaux soient soumis à un test intradermique avant un déplacement, le test sera interprété de sorte qu'aucun animal montrant une augmentation de l'épaisseur du pli de la peau supérieure à 2 mm ou présentant des signes cliniques ne fasse l'objet d'échanges commerciaux intracommunautaires.
- 2.2.5.3.5. Afin de permettre la détection du nombre maximal d'animaux infectés ou malades dans un troupeau ou dans une région, les États membres pourront modifier les critères d'interprétation du test afin d'en améliorer la sensibilité en considérant toutes les réactions douteuses mentionnées aux points b) des points 2.2.5.3.1. et 2.2.5.3.2. comme des réactions positives.

3. TESTS SUPPLÉMENTAIRES

Afin de permettre la détection du nombre maximal d'animaux infectés ou malades dans un troupeau ou dans une région, les États membres pourront autoriser, en plus de la tuberculination, l'utilisation du dosage de l'interféron gamma mentionné au chapitre 2.3.3 (tuberculose bovine) de la 4^e édition (2000) du manuel des normes pour les tests de diagnostic et les vaccins de l'Office international des épizooties (OIE).

4. INSTITUTS D'ÉTAT ET LABORATOIRES NATIONAUX DE RÉFÉRENCE

4.1. Tâches et responsabilités

Les instituts d'État et les laboratoires de référence repris au point 4.2 seront chargés du contrôle officiel des tuberculines ou des réactifs mentionnés aux points 2 et 3 dans leurs pays respectifs afin de garantir leur adéquation avec les normes mentionnées ci-dessus.

4.2. Liste des instituts d'État et des laboratoires nationaux de référence

- Allemagne
Paul-Ehrlich Institut (PEI), Bundesamt für Sera und Impfstoffe, D-23207 Langen; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin — Bereich Jena — D-07743 Jena
- Belgique
Institut scientifique de la santé publique — Louis Pasteur, rue Juliette Wytsman 14, B-1050 Bruxelles
- France
Laboratoire national des médicaments vétérinaires, Fougères
- Grand-Duché de Luxembourg
Institut du pays fournisseur
- Italie
Istituto superiore di Sanità, Rome
- Pays-Bas
Centraal Instituut voor Dierziekte Controle Lelystad (CIDC-Lelystad), Lelystad
- Danemark
Danmarks Veterinærinstitut, Bülowsvej 27, DK-1790 Copenhague
- Irlande
Institut du pays fournisseur
- Royaume-Uni
Veterinary Laboratory Agency, Addlestone, Weybridge
- Grèce
Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων, Νεαπόλεως 25, GR-153 10 Αθήνα

- 11) Espagne
Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Granada
 - 12) Portugal
Laboratório Nacional de Investigaçao Veterinária, Lisbonne
 - 13) Autriche
Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling
 - 14) Finlande
Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimuslaitos — Forskningsanstalten för veterinärmedicin och livsmedel,
Helsinki
 - 15) Suède
Satens veterinärmedicinska anstalt, Uppsala».
-