



Directives techniques sur les examens de dépistage de la tuberculose bovine

du 27 septembre 2010 (adaptation rédactionnelle du 22 janvier 2014)

L'Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires (OSAV)

vu les articles 159 et 297, alinéa 1, lettre c de l'ordonnance du 27 juin 1995 sur les épizooties (OFE; RS 916.401), 29 à 31 de l'ordonnance du 23 novembre 2005 concernant l'abattage d'animaux et le contrôle des viandes (OAbCV; RS 817.190) ainsi que l'ordonnance du DFE du 23 novembre 2005 concernant l'hygiène lors de l'abattage (OHyAb; RS 817.190.1)

édicte les directives techniques suivantes:

I. Champ d'application

1. Les présentes directives techniques sont destinées aux autorités cantonales chargées de l'exécution. Elles définissent l'examen de dépistage de la tuberculose (test intradermique de sensibilité à la tuberculine) chez les animaux vivants des espèces bovine, ovine et caprine et chez les ruminants sauvages détenus en captivité ainsi que l'examen *post mortem* des cas de suspicion de tuberculose décelés à l'abattoir ou lors d'autopsies de ruminants, de sangliers et de camélidés du Nouveau-Monde.
2. Par tuberculose bovine, on entend les infections par *Mycobacterium (M.) bovis* (y compris *M. caprae*) et *M. tuberculosis*.

II. Test intradermique de sensibilité à la tuberculine

A. Méthodes de dépistage autorisées

3. Seule de la tuberculine PPD¹ standardisée, préalablement autorisée par l'OSAV, peut être utilisée pour pratiquer le test intradermique de sensibilité à la tuberculine. Lors de l'autorisation de la tuberculine, l'OSAV fixe la quantité et la concentration de tuberculine bovine et de tuberculine aviaire (exprimée en unités internationales U.I. par dose) à laquelle la tuberculine autorisée doit être utilisée. La quantité de tuberculine bovine ou aviaire doit être d'au moins de 2`000 U.I. mais ne doit pas dépasser les 5`000 U.I. par dose. Le volume injecté par dose est en général de 0,1 ml et ne doit pas dépasser 0,2 ml.
4. La tuberculine doit être injectée par voie intradermique au niveau du cou de la bête. Le test peut être effectué à l'aide d'une tuberculine bovine seule (monotest) ou au moyen

¹ (tuberculine PPD : tuberculine dérivée de protéines purifiées (PPD = Protein Purified Derivative))

de deux tuberculines, une tuberculine bovine et une tuberculine aviaire, à injecter à deux endroits différents (test simultané).

5. Pour les animaux destinés à l'exportation, le test intradermique de sensibilité à la tuberculine peut être pratiqué au moyen de la méthode préconisée par le pays importateur.

B. Procédure et interprétation des résultats

6. Application de la tuberculine
 - a. Les animaux doivent être reposés et ne pas avoir reçu de médicaments qui inhibent la réponse immunitaire.
 - b. Le site d'injection de la tuberculine se situe dans la région médiane du cou, entre le premier et le deuxième tiers du cou. En cas d'administration simultanée de deux tuberculines (test simultané), la tuberculine aviaire sera injectée à environ 10 cm sous la ligne de la nuque et la tuberculine bovine à environ 12 cm sous le site d'injection de la tuberculine aviaire. Si cette distance entre les sites d'injection ne peut pas être respectée pour des raisons de place (p. ex. chez les jeunes animaux), la tuberculine bovine sera injectée d'un côté du cou et la tuberculine aviaire de l'autre côté du cou. Le(s) site(s) d'injection doit/doivent être préalablement tondu(s) sur une surface de 3 x 4 cm et nettoyés à sec avec de la ouate. Avant d'injecter la tuberculine, il faut mesurer l'épaisseur du pli de peau au moyen d'un cutimètre. La tuberculine doit être injectée par voie intradermique. Après l'injection, il faut contrôler que la tuberculine a été appliquée correctement: une papule en forme de lentille doit être visible et palpable.

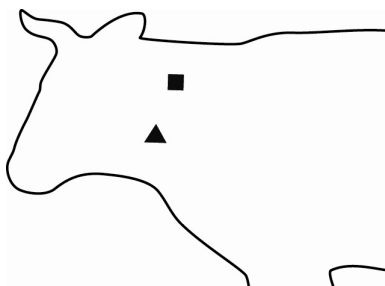


Schéma 1: Administration simultanée au cou ■ tuberculine aviaire, ▲ tuberculine bovine

7. Interprétation des résultats
 - a. Le ou la vétérinaire contrôle la réaction au niveau du/des site(s) d'injection 72 heures (\pm 4 heures) après l'injection et mesure l'épaisseur du pli de peau à l'aide d'un cutimètre.
 - b. L'interprétation des résultats devrait être effectuée par le vétérinaire qui a mesuré l'épaisseur du pli de peau avant la première injection et qui a injecté la première tuberculine. L'interprétation doit être effectuée au moyen du cutimètre qui a été utilisé pour la première mesure de l'épaisseur du pli de peau.
 - c. Interprétation du test intradermique à la tuberculine bovine seule (Monotest)

- la réaction est négative si on n'observe qu'une augmentation limitée de l'épaisseur du pli de peau de < 2 mm et pas de signes cliniques (p.ex. œdème diffus ou étendu, exsudation sanguine ou séreuse, escarre, sensibilité à la douleur, inflammation des vaisseaux lymphatiques tout autour du site d'injection ou inflammation des ganglions lymphatiques).
- la réaction est douteuse si on observe une augmentation de l'épaisseur du pli de peau de ≥ 2 mm et de < 4 mm et pas de signes cliniques (cf. plus haut).
- la réaction est positive si on observe une augmentation de l'épaisseur du pli de peau de ≥ 4 mm ou des signes cliniques (cf. plus haut).

d. Interprétation du test intradermique comparatif à 2 tuberculines (test simultané)

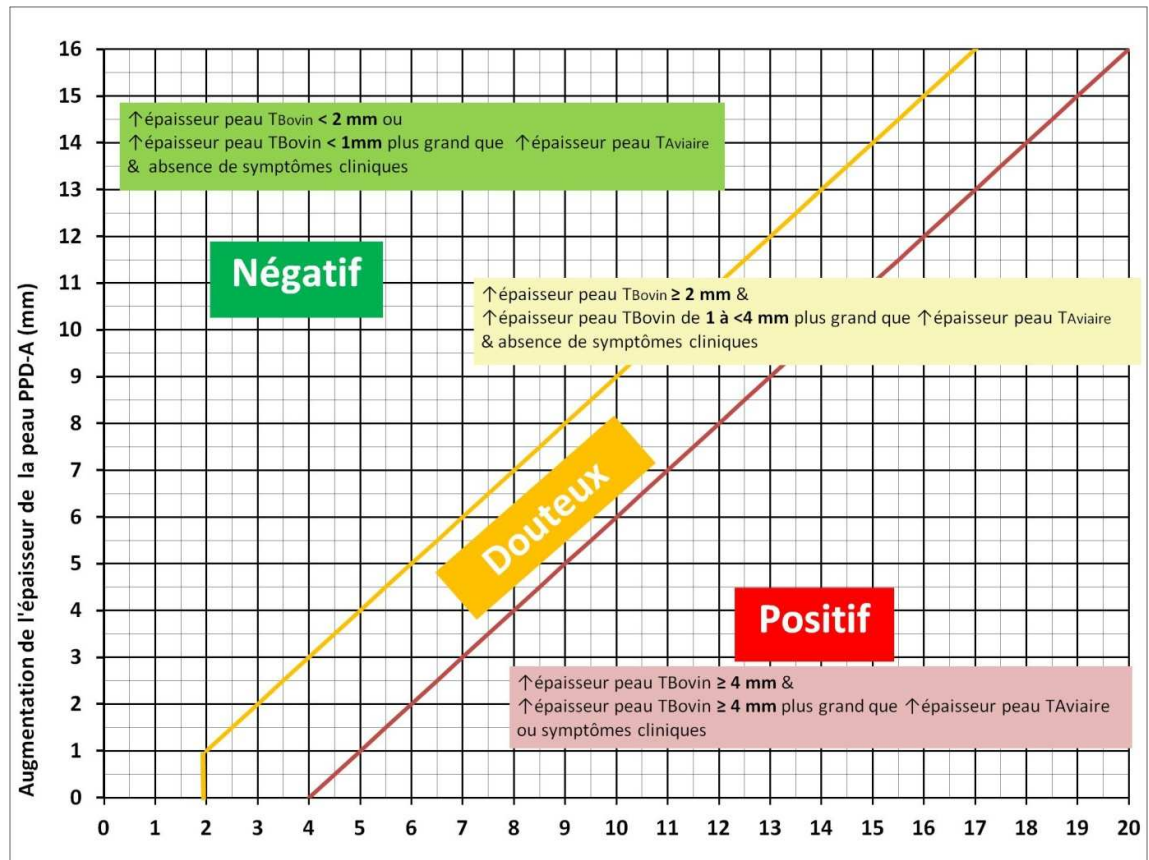
- la réaction est négative si l'augmentation de l'épaisseur du pli de peau au site d'injection de la tuberculine bovine est < 2 mm, ou si cette augmentation d'épaisseur est < 1 mm que celle mesurée au site d'injection de la tuberculine aviaire et qu'on n'observe pas de signes cliniques (cf. plus haut).
- la réaction est douteuse si l'augmentation de l'épaisseur du pli de peau au site d'injection de la tuberculine bovine est ≥ 2 mm et si cette augmentation d'épaisseur est de 1 à < 4 mm supérieur à celle mesurée au site d'injection de la tuberculine aviaire et qu'on n'observe pas de signes cliniques (cf. plus haut).
- la réaction est positive si l'augmentation de l'épaisseur du pli de peau au site d'injection de la tuberculine bovine est ≥ 4 mm et lorsque l'augmentation de l'épaisseur du pli de peau au site d'injection de la tuberculine bovine est ≥ 4 mm à celle mesurée au site d'injection de la tuberculine aviaire ou si on observe des signes cliniques (cf. plus haut).

Récapitulation de l'interprétation des résultats:

Interprétation	Monotest	Test simultané
négatif	↑ épaisseur du pli de peau < 2 mm & pas de symptômes cliniques	↑ épaisseur du pli de peau $T_{\text{bovine}} < 2$ mm ou ↑ épaisseur du pli de peau $T_{\text{bovine}} < 1$ mm ↑ épaisseur du pli de peau T_{aviaire} & pas de symptômes cliniques
douteux	↑ épaisseur du pli de peau ≥ 2 mm et < 4 mm & pas de symptômes cliniques	↑ épaisseur du pli de peau $T_{\text{bovine}} \geq 2$ mm & ↑ épaisseur du pli de peau T_{bovine} de 1 à < 4 mm plus grande que ↑ épaisseur du pli de peau T_{aviaire} & pas de symptômes cliniques
positif	↑ épaisseur du pli de peau ≥ 4 mm, ou symptômes cliniques	↑ épaisseur du pli de peau $T_{\text{bovine}} \geq 4$ mm (Monotest) & ↑ épaisseur du pli de peau $T_{\text{bovine}} \geq 4$ mm à ↑ épaisseur du pli de peau T_{aviaire} ou présence symptômes cliniques

↑ épaisseur du pli de peau = augmentation de l'épaisseur du pli de peau

Tableau 1 Interprétation du monotest et du test simultané



Grafique 1: Interprétation du test simultané

C. Procédure en cas de réactions douteuses

8. En cas de réactions douteuses, le vétérinaire cantonal ordonne la répétition du test intradermique de sensibilité à la tuberculine, qui sera pratiqué sous la forme d'un test comparatif à 2 tuberculines. Le test ne peut être répété que 42 jours au minimum après le premier test, afin de réduire à un minimum le risque d'une possible désensibilisation. L'exécution du test comparatif à 2 tuberculines et l'interprétation des résultats seront effectués selon la procédure fixée aux chiffres 6 et 7.
9. En cas de nouvelle réaction douteuse au test intradermique, la réaction sera considérée comme positive. Si un animal de l'exploitation est positif, tous les autres animaux de l'exploitation devront être soumis à un test de dépistage de la tuberculose. Tous les animaux positifs devront être abattus. La date d'abattage sera fixée par le vétérinaire cantonal d'entente avec l'OSAV et sur la base de l'évaluation de la situation épidémiologique (évaluation du risque). Les animaux abattus seront soumis non seulement à un contrôle des viandes soigneux mais aussi à un examen bactériologique de recherche des agents responsables de la tuberculose bovine (cf. section III, lettres B et C). Il y a épizootie lorsque *M. bovis* (y compris *M. caprae*) ou *M. tuberculosis* a été mis en évidence dans une exploitation par culture bactérienne et/ou par PCR.

D. Procédure en cas de réactions positives

10. En cas de réaction positive au test à la tuberculine bovine seule (monotest), le vétérinaire cantonal ordonne la répétition du test qui sera pratiqué sous la forme d'un test comparatif à 2 tuberculines (test simultané). Le test ne peut être répété que 42 jours au minimum après le premier test, afin de réduire à un minimum le risque d'une possible désensibilisation. L'exécution du test comparatif à 2 tuberculines et l'interprétation des résultats seront effectuées selon la procédure fixée aux chiffres 6 et 7.
11. Si un animal de l'exploitation est positif au test intradermique à deux tuberculines, tous les autres animaux de l'exploitation devront être soumis à un test de dépistage de la tuberculose. Tous les animaux positifs devront être abattus. La date d'abattage sera fixée par le vétérinaire cantonal d'entente avec l'OSAV et sur la base de l'évaluation de la situation épidémiologique (évaluation du risque). Les animaux abattus seront soumis non seulement à un contrôle des viandes minutieux mais aussi à un examen bactériologique de recherche des agents responsables de la tuberculose bovine (cf. section III, lettres B et C). Il y a épizootie lorsque *M. bovis* (y compris *M. caprae*) ou *M. tuberculosis* a été mis en évidence dans une exploitation par culture bactérienne et/ou par PCR.

E. Tests sanguins

12. Les tests sanguins autorisés par l'OSAV peuvent être utilisés, pour augmenter soit la sensibilité, soit la spécificité de la détection de la tuberculose bovine, en fonction des situations épidémiologiques. Le choix de l'utilisation est fixé par l'OSAV pour chaque situation. Les résultats positifs doivent être confirmés par le laboratoire de référence.

III. Examen *post mortem* des cas de suspicion de tuberculose décelés à l'abattoir ou lors d'autopsies

A. Laboratoires

13. L'examen bactériologique de dépistage de la tuberculose en cas de suspicion de la maladie à l'abattoir ou lors d'autopsies d'animaux morts est effectué par le laboratoire national de référence pour la tuberculose bovine:

Institut für Veterinärbakteriologie
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Winterthurerstrasse 270
CH-8057 Zürich Tél. 044 63 58 610 (laboratoire de diagnostic)

Pour plus d'informations sur la tuberculose bovine, voir aussi le site web de l'institut (<http://www.ivb.uzh.ch/>).

B. Prélèvement et transport des échantillons

14. Les bovins positifs au test de sensibilité à la tuberculine ou autrement suspectés de tuberculose ne présentent souvent pas de symptômes macroscopiques (pas de grosses lésions, pas de lésions visibles). Chez les animaux sans lésions visibles, il faut prélever au moins un ganglion lymphatique de la tête, du thorax et de l'abdomen.

Si l'échantillon présente des altérations macroscopiques (faisant suspecter une tuberculose), il suffit d'envoyer des morceaux de la partie altérée accompagnés d'une partie du tissu sain entourant la partie atteinte. La quantité d'échantillon nécessaire pour l'examen bactériologique devrait être d'au moins 5 à 10 g. Pour l'examen du pus ou du liquide ponctionné, le volume de prélèvement doit être d'au moins de 5 ml.

Les échantillons prélevés sur des animaux suspectés de tuberculose sont des substances biologiques classées dans la catégorie B, UN 3373 (échantillons dont on sait ou dont on présume qu'ils contiennent des agents pathogènes de catégorie de risque 2 ou 3). Des règles particulières doivent être respectées pour l'emballage et l'envoi de ces échantillons. Les échantillons doivent être placés dans un récipient primaire stérile à fermeture hermétique, puis dans un récipient secondaire contenant une matière absorbante et muni d'un couvercle étanche pouvant être fermé. Un matériau de rembourrage est à placer entre le récipient secondaire et l'emballage extérieur. La demande d'analyse doit être jointe aux échantillons et placée dans une chemise en matière plastique pour la protéger de l'humidité et des salissures. Le récipient secondaire et la demande d'analyse (glissée dans la chemise en plastique) seront placés dans un carton spécial destiné à l'envoi et sur lequel doivent figurer l'inscription suivante: **Substance biologique, catégorie B** et le losange avec à l'intérieur le code „**UN 3373**“. Les récipients, le matériel d'envoi et le formulaire de demande d'analyse peuvent être commandés au laboratoire de référence (<http://www.ivb.uzh.ch/>).

La durée du transport de l'échantillon, de son prélèvement à son analyse en laboratoire, ne devrait pas dépasser **24 heures**. L'idéal serait d'envoyer l'échantillon en courrier exprès par une entreprise de courrier rapide (p. ex. SwissPost, DHL ou TNT). Le laboratoire doit être avisé par téléphone de l'envoi de l'échantillon. Les échantillons qui ne peuvent pas être envoyés immédiatement doivent être conservés au réfrigérateur à 4°C.

Méthodes d'analyse autorisées

15. Tout cas de suspicion de tuberculose doit faire l'objet d'un examen par culture bactérienne.
16. Il est effectué, parallèlement à la culture bactérienne, une analyse de l'échantillon clinique à l'aide d'une méthode de biologie moléculaire (PCR). Le résultat de cette analyse servira de base pour décider si la carcasse est propre à la consommation humaine ou non.
17. Tous les travaux avec des agents pathogènes responsables de la tuberculose bovine, en particulier avec des cultures bactériennes, doivent être effectués dans un laboratoi-

re de niveau de sécurité 3. Tout cas de suspicion de tuberculose doit être élucidé à l'aide d'une méthode de recherche de l'agent pathogène scientifiquement reconnue. Cette méthode est la mise en évidence des mycobactéries par culture bactérienne et par une méthode de biologie moléculaire.

18. La **culture bactérienne** reste la méthode bactériologique de choix pour la mise en évidence des mycobactéries. L'échantillon est homogénéisé et traité chimiquement à l'aide d'un procédé reconnu qui tue la flore bactérienne non spécifique [3]. Trois milieux de culture sont utilisés pour le dépistage des mycobactéries, dont un milieu liquide qui est inoculé dans les milieux de culture solides. Les milieux de culture solides sont un milieu à base d'œufs entiers (p. ex. milieu de culture Löwenstein-Jensen, L—H.) et un milieu de culture agarosé (p.ex. Middelbrook 7H11 Agar). Il est recommandé d'utiliser le bouillon de culture Middelbrook 7H9 comme milieu de culture liquide. Pour cultiver les mycobactéries issues des ganglions lymphatiques, il est nécessaire d'ajouter des suppléments antimicrobiens efficaces dans au moins deux des milieux de culture utilisés. Ces suppléments antimicrobiens sont le PACT (Polymyxine B, Amphotéricine B, Carbenicilline, Triméthoprime) ou le PANTA (Polymyxins B, Amphotéricine B, acide Nalidixique, Triméthoprime, Azlocilline). Les cultures sont incubées à $36 \pm 1^\circ\text{C}$ et examinées une fois par semaine. On observe une croissance de mycobactéries généralement après 8 semaines. Dans certains cas, une incubation pendant 12 semaines peut être nécessaire, p. ex. si le résultat de la culture bactérienne est différent du résultat de l'examen microscopique ou du résultat de la PCR. L'identification des bactéries de la tuberculose bovine isolées de la culture doit être effectuée à l'aide de méthodes de biologie moléculaire reconnues, p. ex. par l'analyse de la séquence d'ADN du gène *gyrB*.
19. La **réaction en chaîne par polymérase (PCR)** permet une détection rapide de l'ADN des bactéries de la tuberculose présentes dans un échantillon d'organe par amplification de l'ADN de ces bactéries. Pour mettre en évidence l'agent responsable de la tuberculose bovine, la PCR à utiliser devrait être la **PCR en temps réel**. Il faudrait utiliser uniquement des protocoles PCR pour lesquels il existe une preuve scientifique de leur validation. Les techniques d'amplification en chaîne par polymérase ne devraient être utilisées que si les laboratoires utilisent également les méthodes conventionnelles de détection des mycobactéries selon des standards reconnus. La PCR en temps réel utilisée par le laboratoire de référence amplifie, s'il est présent, un fragment de 91 paires de base du gène de production de l'hélicase des bactéries du complexe *Mycobacterium-tuberculosis* (MTC). Pour établir avec certitude la présence de l'ADN du MTC, on dépiste également la séquence d'insertion (SI) 1081. L'amplification de l'ADN génomique du gène codant pour la bêta-actine est utilisée comme témoin. Lors de chaque analyse, il faut avoir parallèlement des témoins d'extraction d'ADN, des témoins positifs (ADN de *M. bovis*) et des témoins négatifs. Le résultat de la PCR est défini positif lorsque les deux gènes cibles du MTC ont été amplifiés et que tous les contrôles se sont révélés corrects.

IV. Interprétation des résultats

Le diagnostic de la tuberculose bovine est compliqué par le fait qu'il n'existe pas de méthode de diagnostic de référence (gold-standard). La découverte de lésions typiques sur la carcasse suivie d'un examen de l'échantillon par culture bactérienne constitue uniquement un test de confirmation. La sensibilité de ce test est d'environ 30% et sa spécificité est de 100%. La PCR ne permet de détecter qu'environ 70% des échantillons positifs à la culture. Le contrôle des viandes à l'abattoir et la culture bactérienne restent néanmoins les principaux instruments de surveillance de la tuberculose bovine. Si on ne disposait pas d'un contrôle des viandes fiable, il faudrait soumettre régulièrement tout le cheptel bovin au test intradermique de sensibilité à la tuberculine.

Il n'est pas possible de déterminer le statut tuberculeux des animaux positifs au test intradermique comparatif à 2 tuberculines et négatifs à la culture bactérienne, car le test intradermique à 2 tuberculines a une sensibilité (environ 80%) nettement plus élevée que la découverte de lésions pathologiques typiques sur les carcasses suivie de la culture bactérienne. Ces animaux peuvent être soit des bêtes infectées de tuberculose bovine (*M. bovis*) soit des bêtes non infectées. Dans ce cas, il est important que ces bêtes soient retirées des exploitations concernées et abattues, afin d'empêcher l'infection d'autres animaux. Dans ce cas, il n'y a pas d'autres mesures de police des épizooties à prendre et les exploitations concernées conservent leur statut d'exploitations reconnues indemnes de tuberculose.

Tests <i>ante mortem</i> (test intradermique, test sanguin)	Tests <i>post mortem</i> (altérations pathologiques, culture, PCR)	Statut tuberculeux
négatif	négatif	négatif
positif	positif	positif
négatif	positif	positif
positif	négatif	indéterminable

Tableau 2 : Résultats des tests et statut tuberculeux qui en résulte

Pour le commerce intracommunautaires (UE), l'exportation d'animaux n'est possible que si l'augmentation de l'épaisseur du pli de peau ne dépasse pas 2 mm et si les animaux ne présentent pas de signes cliniques de tuberculose (cf. plus haut).

V. Entrée en vigueur

Les présentes directives techniques sont entrées en vigueur le 1^{er} novembre 2010.
Adaptation rédactionnelle au 22 janvier 2014

Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires

Littérature

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. Directive 64/432/CEE du Conseil, du 26 juin 1964, relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine (version actualisée avec les modifications et compléments effectués depuis son adoption)
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 Rua-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.