II

(Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité)

COMMISSION

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 4 août 2006

portant approbation d'un manuel de diagnostic pour l'influenza aviaire conformément à la directive 2005/94/CE du Conseil

[notifiée sous le numéro C(2006) 3477]

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

(2006/437/CE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu la directive 2005/94/CE du Conseil du 20 décembre 2005 concernant des mesures communautaires de lutte contre l'influenza aviaire et abrogeant la directive 92/40/CEE [1], et notamment son article 50, paragraphe 1, deuxième alinéa,

considérant ce qui suit:

(1) La directive 2005/94/CE prévoit certaines mesures préventives relatives à la surveillance et à la détection précoce de l'influenza aviaire, ainsi que des mesures minimales de lutte à appliquer en cas d'apparition d'un foyer de cette maladie chez des volailles ou d'autres oiseaux captifs.

(2) Il est nécessaire d'établir, au niveau communautaire, des procédures de diagnostic, des méthodes d'échantillonnage et des critères d'évaluation des résultats des tests de laboratoire, aux fins de la confirmation de la présence d'un foyer d'influenza aviaire.

(3) L'annexe VII de la directive 2005/94/CE définit les fonctions et les tâches du laboratoire communautaire de référence pour l'influenza aviaire dans le but de coordonner, en consultation avec la Commission, les méthodes employées dans les États membres pour diagnostiquer cette maladie. Ces fonctions et ces tâches comprennent l'organisation de tests comparatifs périodiques et la fourniture de réactifs types au niveau communautaire.

(4) Des tests de laboratoire ont été récemment mis au point pour assurer un diagnostic rapide de l'influenza aviaire.

(5) L'expérience acquise ces dernières années dans la lutte contre l'influenza aviaire a permis d'identifier les procédures d'échantillonnage et les critères d'évaluation des résultats des tests de laboratoire les plus appropriés pour diagnostiquer correctement la maladie dans différentes situations.

(6) Les mesures prévues par la présente décision sont conformes à l'avis du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

Le manuel de diagnostic prévu par la directive 2005/94/CE et décrit à l'annexe de la présente décision est approuvé.

Article 2

Les États membres appliquent le manuel de diagnostic à compter de la date à laquelle ils transposent la directive 2005/94/CE ou à partir du 1er juillet 2007, si cette dernière date est antérieure.

[1] JO L 10 du 14.1.2006, p. 16.

Article 3

Les États membres sont destinataires de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 4 août 2006.

Par la Commission
Markos KYPRIANOU
Membre de la Commission

ANNEXE

MANUEL DE DIAGNOSTIC POUR L'INFLUENZA AVIAIRE

CHAPITRE I

Introduction, objectifs et définitions

1. Afin d'assurer l'uniformité des procédures utilisées pour le diagnostic de l'influenza aviaire (IA) dans la Communauté, le présent manuel de diagnostic établit:

   a) les orientations et les exigences minimales relatives aux procédures de diagnostic, aux méthodes d'échantillonnage et aux critères d'évaluation des résultats des tests de laboratoire, aux fins d'un diagnostic correct de l'IA;

   b) les tests de laboratoire à effectuer pour le diagnostic de l'IA et les techniques de laboratoire à utiliser pour le typage génétique des isolats de virus IA;

   c) les exigences en matière de biosécurité et les normes de qualité minimales devant être observées par les laboratoires de diagnostic et lors du transport des échantillons.

2. Le présent manuel de diagnostic s'adresse aux autorités chargées de la lutte contre l'IA. De ce fait, il porte essentiellement sur les principes et les applications des tests de laboratoire et l'évaluation de leurs résultats, ainsi que sur les techniques de laboratoire.

3. Aux fins du présent manuel de diagnostic, outre les définitions figurant à l'article 2 de la directive 2005/94/CE, on entend par:

   «échantillon de diagnostic» toute matière animale, y compris un cadavre entier, transportée à des fins de diagnostic ou de recherche, à l'exclusion des animaux infectés vivants.

4. La confirmation de l'IA chez les volailles et autres oiseaux captifs doit être effectuée conformément aux procédures, méthodes d'échantillonnage et critères d'évaluation des résultats des tests de laboratoire établis dans le présent manuel de diagnostic, et être fondée sur un ou plusieurs des critères mentionnés aux points a), b) et c):

   a) la détection du virus infectieux, de l'antigène ou de matériel génétique spécifique dans des échantillons de tissus, d'organes, de sang ou de matières fécales de volailles ou d'autres oiseaux;

   b) la détection, chez ces oiseaux, de signes cliniques et de lésions post mortem de la maladie;

   c) la mise en évidence de la formation d'anticorps spécifiques dans des échantillons de sang de ces oiseaux.

5. La confirmation de l'infection de mammifères par un virus influenza A d'origine aviaire hautement pathogène ou, s'il est faiblement pathogène, appartenant aux sous-types H5 et H7 doit être fondée sur un ou plusieurs des critères mentionnés aux points a) et b):

   a) la détection du virus infectieux de l'IA, de l'antigène ou de matériel génétique spécifique dans des échantillons de tissus, d'organes, de sang ou de matières fécales de mammifères;

   b) la mise en évidence de la formation d'anticorps spécifiques dirigés contre le virus IA dans des échantillons de sang de mammifères.

6. Les procédures, méthodes d'échantillonnage et critères d'évaluation des résultats des tests de laboratoire doivent être:

   a) ceux décrits dans le présent manuel de diagnostic, ou

   b) ceux autorisés par l'autorité compétente, sous réserve des conditions suivantes:

      i) il a été établi, à la suite d'un essai comparatif organisé par le laboratoire communautaire de référence pour l'influenza aviaire («laboratoire communautaire de référence»), que la sensibilité et la spécificité des tests de laboratoire autorisés sont appropriées, ou

      ii) lorsque le laboratoire communautaire de référence n'a organisé aucune évaluation de ce genre pour un certain type de test de laboratoire, la sensibilité et la spécificité du test de laboratoire autorisé ont été validées par le laboratoire national de référence, de telle sorte que le test de laboratoire est adapté au but dans lequel il est utilisé; les résultats de cette validation doivent être soumis au laboratoire communautaire de référence pour examen.

CHAPITRE II

Description de l'IA mettant l'accent sur le diagnostic différentiel

1. **Étiologie et virulence**

L'IA est une infection virale hautement contagieuse due à des virus de la famille des *orthomyxoviridés,* du genre *Influenzavirus A*. Les virus influenza A sont les seuls orthomyxovirus dont la capacité d'infecter les oiseaux a été établie. Il a été démontré que de nombreuses espèces d'oiseaux étaient sensibles à l'infection par des virus influenza A; si les oiseaux aquatiques constituent le premier réservoir de ces virus, une majorité écrasante des isolats était faiblement pathogène chez les poulets et les dindons, les principaux oiseaux économiquement importants touchés par la maladie.

Les virus influenza A ont des nucléoprotéines antigéniquement apparentées et des protéines matricielles antigéniquement apparentées, mais sont classés en sous-types en fonction des caractères antigéniques des glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). À ce jour, seize sous-types de HA (H1–H16) et neuf sous-types de NA (N1-N9) ont été identifiés. Chaque virus influenza A comporte un antigène HA et un antigène NA, apparemment combinés de toutes les manières possibles.

Les virus influenza A se divisent en deux groupes, selon leur capacité à provoquer la maladie chez les volailles sensibles:

a) les virus de l'**influenza aviaire hautement pathogène (IAHP),** qui provoquent une maladie extrêmement grave caractérisée par une infection généralisée des volailles contaminées et une mortalité très importante (pouvant aller jusqu'à 100 %) dans le troupeau;

b) les virus de l'**influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP),** qui provoquent une affection bénigne, essentiellement respiratoire, chez les volailles, sauf en cas d'exacerbation par d'autres coïnfections ou facteurs.

Les oiseaux sauvages, en particulier les oiseaux aquatiques migrateurs, jouent un rôle très important en tant que réservoir du virus influenza A, comme l'a montré l'isolement de presque toutes les combinaisons possibles des sous-types HA et NA chez les oiseaux sauvages. Généralement, seuls des virus IAFP sont détectés chez les oiseaux sauvages, sauf en cas de propagation de l'IAHP par des volailles infectées.

L'introduction initiale de virus IA dans les exploitations avicoles résulte très probablement d'un contact direct ou indirect avec des oiseaux sauvages.

Il est possible que ces virus d'IAFP introduits par un réservoir sauvage puissent circuler chez les volailles domestiques sans être détectés, étant donné que les signes cliniques sont souvent discrets, voire absents.

Une fois introduites chez les volailles, les souches de virus IAFP appartenant aux sous-types H5 et H7 peuvent alors muter pour produire des souches IAHP. À ce jour, il a été établi que seuls les virus des sous-types H5 et H7 provoquent l'IAHP.

Bien qu'il semble que plusieurs mécanismes interviennent dans la transformation du virus IAFP en virus IAHP, les facteurs à l'origine de cette mutation ne sont pas connus. Dans certains cas, la mutation semble s'être produite rapidement, au site primaire, après la transmission par des oiseaux sauvages, tandis que dans d'autres le virus IAFP a circulé chez les volailles pendant des mois avant de muter. Il est donc impossible de prédire si et quand une telle mutation va survenir. Cependant, on peut raisonnablement supposer que le risque de mutation vers le virus IAHP est d'autant plus élevé que la circulation du virus IAFP chez les volailles est importante.

La période d'incubation est difficile à estimer et varie probablement selon la souche du virus et l'hôte. Le chiffre de cinq à six jours est généralement cité; toutefois, la fourchette pour les différents oiseaux est vraisemblablement comprise entre quelques heures et environ sept jours.

2. **Signes cliniques chez les oiseaux infectés par un virus IAHP**

Les signes cliniques sont très variables et sont influencés par des facteurs tels que la virulence du virus à l'origine de l'infection, l'espèce touchée, l'âge, le sexe, la présence d'autres maladies et l'environnement.

Les signes précoces peuvent être les suivants: anorexie, diminution de la quantité d'eau ingérée et mortalité relativement faible. Néanmoins, il est également possible que la maladie apparaisse subitement dans un troupeau et provoque la mort d'un grand nombre d'oiseaux qui ne présentaient aucun signe avant-coureur ou présentaient des signes minimes tels que dépression, anorexie, plumes ébouriffées et fièvre. Généralement, plus les oiseaux survivent longtemps, plus les signes cliniques sont marqués. Le délai d'apparition des signes dépend du virus, de l'hôte et de la dose infectante initiale, ainsi que du système d'élevage. Le virus se propage plus lentement chez les poules pondeuses en cage ou les oiseaux vivant en plein air que dans les poulaillers d'engraissement.

Les poules infectées par le virus IAHP peuvent au départ pondre des œufs à coquille molle, mais cessent rapidement de pondre. Les oiseaux malades sont souvent dans un état semi-comateux, en position assise ou debout, leur tête touchant le sol. Les crêtes et caroncules sont cyanosées et œdémateuses, et peuvent présenter des hémorragies pétéchiales ou ecchymotiques à leurs extrémités. Une diarrhée aqueuse profuse est souvent présente et les oiseaux ont extrêmement soif. La respiration peut être difficile et un larmoiement excessif peut être observé. Des hémorragies peuvent être constatées sur des zones cutanées dépourvues de plumes. Les taux de mortalité au sein du troupeau varient de 50 à 100 %.

Chez les poulets de chair, les signes de l'IAHP sont souvent moins évidents que chez d'autres volailles et consistent généralement en une dépression sévère et de l'anorexie; une hausse très nette de la mortalité peut être la première anomalie observée. Un œdème de la tête et du cou ainsi que des signes neurologiques tels que torticolis et ataxie peuvent également être constatés.

L'IAHP chez les dindons est analogue à celle observée chez les volailles domestiques, mais certains virus IAHP semblent plus virulents chez les dindons et d'autres moins.

Chez les oies infectées par le virus IAHP, les signes de dépression, d'anorexie et de diarrhée sont comparables à ceux observés chez les poules pondeuses, mais s'accompagnent fréquemment d'un gonflement des sinus. Les jeunes oiseaux peuvent présenter des signes neurologiques.

Les canards infectés par un virus IAHP peuvent ne présenter aucun signe clinique. Néanmoins, il a été signalé que certaines souches induisaient chez eux des signes comparables à ceux observés chez les oies, s'accompagnant d'une certaine mortalité.

En ce qui concerne l'infection des autruches par un virus IAHP ou IAFP, les signes cliniques peuvent être absents. Lors des foyers d'IAHP tels que ceux apparus en Italie en 1999/2000, il a été indiqué que les pintades et les cailles japonaises étaient sensibles aux infections et présentaient des signes et une mortalité ressemblant à la maladie telle qu'elle se manifeste chez les poulets ou les dindons. Cependant, des études expérimentales ont établi que les cailles étaient résistantes à certaines souches IAHP. Pour tous les oiseaux, la présence d'anticorps dirigés contre le même sous-type H, qu'elle soit la conséquence d'une vaccination ou d'une infection naturelle, peut signifier que l'infection par le virus IAHP n'entraîne pas de signes cliniques patents.

3. **Lésions post mortem chez les oiseaux infectés par un virus IAHP**

Les oiseaux qui meurent en phase suraiguë peuvent présenter des lésions macroscopiques minimes, consistant en une déshydratation et en une congestion viscérale et musculaire.

Chez les oiseaux qui meurent après une évolution clinique prolongée, des hémorragies pétéchiales ou ecchymotiques sont présentes sur tout le corps, particulièrement dans le larynx, la trachée, le proventricule et le tissu adipeux de l'épicarde, ainsi que sur les surfaces séreuses adjacentes au sternum. On observe un important œdème sous-cutané, particulièrement autour de la tête et des jarrets. Le cadavre peut être déshydraté. Des foyers nécrotiques jaunes ou gris peuvent être présents dans la rate, le foie, les reins et les poumons. Le sac alvéolaire peut contenir un exsudat. La rate peut présenter une augmentation de volume et être hémorragique.

L'IA se caractérise histologiquement par des troubles vasculaires entraînant la formation d'un œdème, des hémorragies et une infiltration périvasculaire, en particulier dans le myocarde, la rate, les poumons, le cerveau, le pancréas et les caroncules. Des foyers nécrotiques sont présents dans les poumons, le foie et les reins. Gliose, prolifération vasculaire et dégénération neuronale peuvent être observées dans le cerveau.

4. **Diagnostic différentiel**

Dans le diagnostic différentiel de l'IAHP, il y a lieu de considérer, en particulier, les maladies suivantes:

a) autres maladies provoquant une forte mortalité subite:

   i) maladie de Newcastle;

   ii) laryngotrachéite infectieuse;

iii) peste du canard;

iv) intoxications aiguës;

b) autres maladies provoquant un gonflement des crêtes et des caroncules, telles que:

i) choléra aviaire (forme aiguë) et autres maladies septicémiques;

ii) cellulite bactérienne de la crête et des caroncules.

5. **Signes cliniques chez les oiseaux infectés par un virus IAFP**

La gravité de la maladie induite par les virus IAFP est largement influencée par:

a) la souche du virus;

b) l'espèce et l'âge de l'hôte;

c) l'état immunitaire de l'hôte à l'égard du virus et, en particulier, la présence d'autres agents infectieux, tels que:

i) *Pasteurella* spp. ;

ii) virus de la maladie de Newcastle (y compris des souches vaccinales);

iii) pneumovirus aviaire, virus de la bronchite infectieuse;

iv) *E. coli;*

v) *Mycoplasma* spp. ;

d) pathologies immunodéficitaires;

e) facteurs environnementaux (tels que excès d'ammoniaque, poussière, températures élevées ou basses).

À un extrême, les signes cliniques de la maladie peuvent être non apparents ou discrets, prenant uniquement la forme de signes respiratoires peu importants ou de problèmes de production d'œufs chez les volailles de ponte. À l'autre extrême, les infections par des virus IAFP peuvent aller de pair avec des signes cliniques sévères de la maladie, en particulier chez les dindons, consistant généralement en des râles, en une toux, en un gonflement des sinus infra-orbitaires et en un état fébrile associé à une perte d'appétit et à une mortalité élevée.

L'IAFP peut être confondue avec de nombreuses maladies provoquant des signes respiratoires ou intestinaux, ou être compliquée par celles-ci. Il y a lieu de suspecter la présence de l'IA chaque fois que les volailles sont atteintes d'une maladie qui ne disparaît pas malgré l'application de mesures préventives et thérapeutiques adaptées aux autres maladies.

6. **Signes cliniques chez les oiseaux captifs**

L'éventail des signes cliniques peut être très large et, comme pour les volailles, peut aller de signes non apparents à des signes sévères de la maladie, s'accompagnant d'une mortalité élevée.

Généralement, l'infection se propage plus lentement dans un ensemble d'oiseaux captifs, en raison de la diversité des espèces détenues: leurs sensibilités sont différentes, les taux d'excrétion du virus sont hétérogènes et la transmission est souvent relativement lente en raison d'un taux de contact peu élevé et de densités de peuplement relativement faibles.

CHAPITRE III

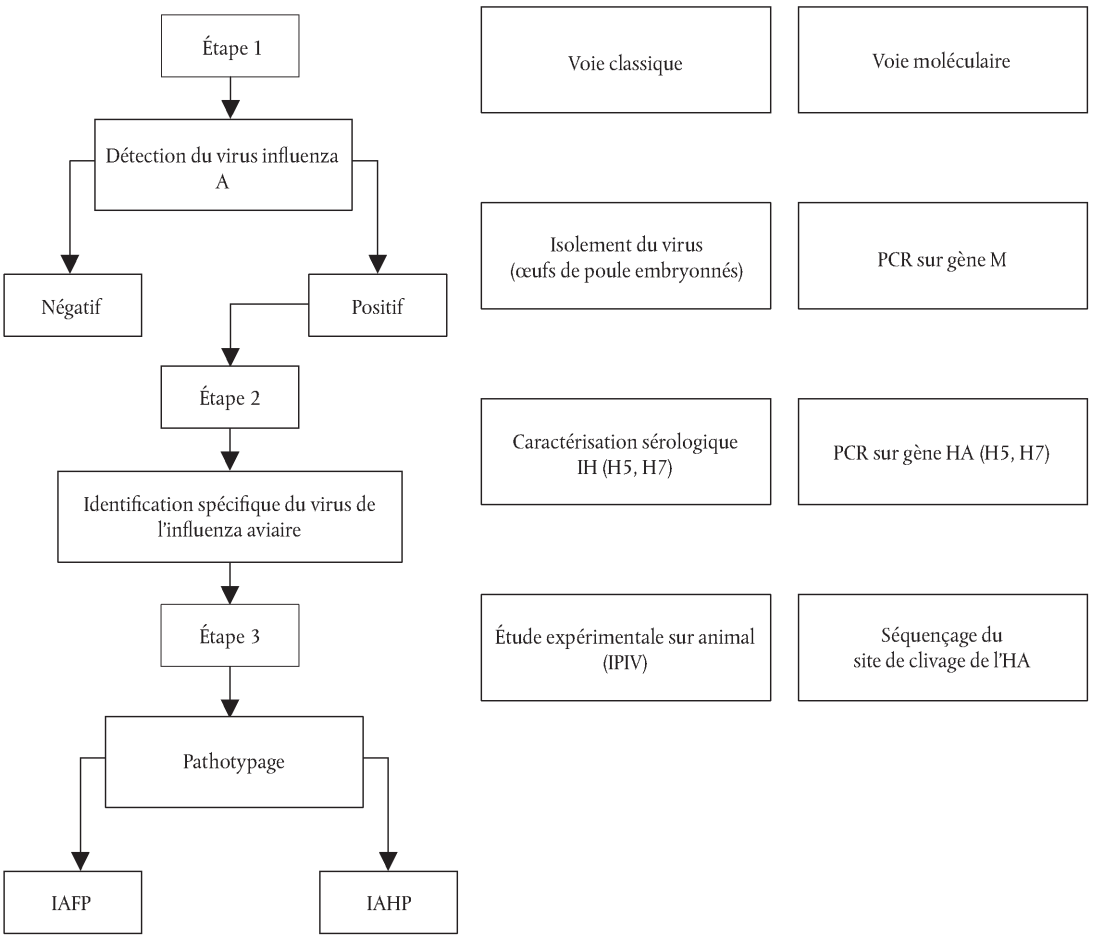
Orientations à prendre en compte en cas de suspicion d'IA dans une exploitation

La variabilité des signes cliniques, tant pour l'IAHP que pour l'IAFP, est telle qu'il est impossible d'établir des orientations clairement définies pour les foyers suspectés. Une mortalité élevée, subite, chez des volailles, accompagnée ou non des signes cliniques décrits au chapitre II, doit faire l'objet d'une enquête, consistant notamment en l'envoi d'échantillons pour des recherches en laboratoire. En revanche, en l'absence de mortalité élevée, il est plus difficile de suspecter ou d'exclure la présence de l'IA.

Étant donné qu'un diagnostic rapide de l'IAHP ou de l'IAFP causée par les sous-types H5 et H7 revêt une importance capitale pour une lutte rapide contre la maladie et son éradication, l'IA doit toujours être prise en compte dans le diagnostic différentiel de problèmes respiratoires, de problèmes de production d'œufs et d'élévation de la mortalité chez les volailles, et des échantillons appropriés doivent être soumis en vue de recherches en laboratoire.

Figure

Aperçu schématique des étapes diagnostiques conduisant à la confirmation de l'IA



CHAPITRE IV

Procédures générales pour le prélèvement et le transport des échantillons

1. **Directive 2005/94/CE et manuel de diagnostic**

Lorsque la directive 2005/94/CE fait référence au manuel de diagnostic, il y a lieu de procéder aux recherches et à l'échantillonnage ainsi que d'appliquer les procédures de surveillance conformément au présent chapitre du manuel de diagnostic.

2. **Procédures à suivre lorsque des foyers d'IA sont suspectés**

En cas de suspicion clinique d'un foyer d'IA par le vétérinaire officiel ou lorsque les résultats d'un test de laboratoire pour cette maladie ne sont pas négatifs, l'autorité compétente doit veiller à ce qu'une enquête, telle que décrite au présent chapitre du manuel de diagnostic, soit réalisée, conformément à l'article 7 de la directive 2005/94/CE, et menée à bonne fin, avant d'exclure la présence de la maladie.

3. **Interprétation des tests virologiques**

L'autorité compétente peut considérer que la présence du virus IA peut être exclue lorsqu'un nombre approprié d'oiseaux malades ou morts et d'écouvillons trachéaux/oropharyngés ou cloacaux ont été soumis, conformément au présent chapitre, pour la détection dudit virus ou de son génome et que des résultats négatifs ont été obtenus à l'issue des tests réalisés selon l'une des méthodes de détection du virus visées au chapitre V ou VI ou autorisées par l'autorité compétente conformément au point 6 b) du chapitre I.

4. **Ensemble standard d'échantillons pour les tests virologiques ou sérologiques en laboratoire**

Pour l'enquête relative à une exploitation suspectée d'être infectée par le virus IA, les échantillons, visés aux points a) et b), composant l'ensemble standard pour les tests virologiques ou sérologiques («les échantillons standard») doivent être prélevés et envoyés directement en vue des tests virologiques et sérologiques en laboratoire.

a) L'ensemble standard d'échantillons pour les tests virologiques se compose comme suit:

   i) au moins cinq oiseaux malades/morts, s'il y en a, et/ou

   ii) au moins vingt écouvillons trachéaux/oropharyngés et vingt écouvillons cloacaux.

   Les cadavres doivent provenir d'oiseaux morts peu de temps auparavant ou qui étaient gravement malades ou moribonds et ont été tués humainement.

   Les écouvillons doivent être prélevés sur le nombre d'oiseaux mentionné au point a) ou sur tous les oiseaux de l'exploitation suspectée, si elle en détient un nombre inférieur. Le prélèvement d'échantillons doit être effectué en priorité sur les oiseaux présentant des signes cliniques de la maladie.

   Les écouvillons cloacaux doivent être recouverts de fèces (quantité optimale: 1 g). Si, pour quelque raison que ce soit, il est impossible de prélever des écouvillons cloacaux sur des oiseaux vivants, des échantillons de fèces fraîches soigneusement collectées peuvent constituer une autre solution.

   Il est souvent plus pratique de prélever des écouvillons trachéaux/oropharyngés dans la cavité buccale.

   Dès que les caractéristiques de croissance du virus sont connues, l'autorité compétente peut décider de prélever des écouvillons soit trachéaux/oropharyngés soit cloacaux, au lieu des deux, selon que la réplication du virus est plus importante dans les voies respiratoires ou gastro-intestinales et en fonction également de l'espèce concernée.

b) L'ensemble standard d'échantillons pour les tests sérologiques se compose de vingt échantillons de sang au minimum.

   Les échantillons doivent être prélevés sur le nombre d'oiseaux mentionné au point b) ou sur tous les oiseaux de l'exploitation, si elle en détient un nombre inférieur. Le prélèvement d'échantillons doit être effectué en priorité sur les oiseaux qui semblent malades ou se sont apparemment rétablis.

   L'autorité compétente peut décider qu'il n'est pas nécessaire de prélever toute la série d'échantillons standard, mais uniquement un sous-ensemble de ces échantillons.

5. **Transport des échantillons**

Un soin particulier doit être accordé à la conservation des échantillons et à leur transport vers le laboratoire en vue des analyses.

Les écouvillons doivent être immédiatement réfrigérés dans de la glace ou au moyen de blocs réfrigérants et être transmis au laboratoire le plus rapidement possible. Sauf nécessité absolue, il y a lieu de ne pas congeler les échantillons. Si les échantillons ne peuvent être acheminés jusqu'au laboratoire dans les vingt-quatre heures, ils doivent être immédiatement congelés, stockés puis transportés dans de la neige carbonique.

En plus — et non en remplacement — de la réfrigération, les écouvillons doivent être placés dans un milieu antibiotique ou un milieu de transport viral spécifique à 4 °C, de manière à être totalement immergés. En l'absence d'un tel milieu, les écouvillons doivent être remis dans leur enveloppe et transmis à l'état sec au laboratoire en vue des analyses.

Le stockage et le transport des échantillons peuvent être influencés par divers facteurs. Il y a donc lieu d'adapter la méthode de transport en conséquence.

6. **Milieu antibiotique**

Le milieu antibiotique visé au point 5 doit être à base d'une solution saline tamponnée au phosphate dont le pH est compris entre 7,0 et 7,4 (à contrôler après l'ajout des antibiotiques).

Les milieux à base de protéines, tels que le bouillon cœur-cervelle ou le bouillon tryptose tamponné au tris, peuvent conférer une stabilité accrue au virus, en particulier pendant le transport. Les antibiotiques utilisés et leur concentration peuvent être modifiés en fonction des conditions locales et des disponibilités.

Des quantités très importantes d'antibiotiques peuvent être nécessaires pour les échantillons fécaux. Les quantités adéquates sont les suivantes: 10 000 UI/ml de pénicilline, 10 mg/ml de streptomycine, 0,25 mg/ml de gentamycine et 5 000 UI/ml de nystatine. Ces quantités peuvent être jusqu'à cinq fois moins élevées pour les tissus et les écouvillons trachéaux.

Si l'on souhaite neutraliser *Chlamydophila,* il y a lieu d'ajouter de 0,05 à 0,1 mg/ml d'oxytétracycline.

7. **Milieu bouillon cœur-cervelle**

La solution doit être préparée dans de l'eau et contenir 15 % p/v de poudre de bouillon cœur-cervelle, avant stérilisation (à l'autoclave à 121 °C/15 minutes).

Après stérilisation, les antibiotiques doivent être ajoutés comme suit: 10 000 UI/ml de pénicilline G, 20 µg d'amphotéricine B et 1 000 µg/ml de gentamycine. Les milieux peuvent être conservés à 4 °C pendant deux mois au maximum.

8. **Procédures devant être appliquées en ce qui concerne les dispositions correspondantes de la directive 2005/94/CE**

8.A. Foyers suspectés

8.1. *Article 7, paragraphe 1 — Mesures à appliquer dans les exploitations où des foyers sont suspectés*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation où un foyer est suspecté, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation, si de tels registres existent. Les données concernant la mortalité quotidienne et les données quotidiennes relatives à la production d'œufs ainsi qu'aux quantités d'aliments et/ou d'eau ingérées pour la période débutant une semaine avant la date d'apparition des signes cliniques de l'IA et se terminant le jour de l'inspection de l'exploitation par le vétérinaire officiel doivent être documentées dans le rapport d'inspection établi par le vétérinaire officiel;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs, en particulier ceux qui semblent malades;

c) les échantillons standard doivent être prélevés dans chaque unité de production, sauf si l'autorité compétente a pu établir qu'un foyer suspecté pouvait être exclu sur la base de l'inspection clinique réalisée conformément aux points a) et b);

d) indépendamment de résultats négatifs aux tests effectués sur les échantillons standard et en fonction de facteurs locaux, une inspection clinique des volailles doit être effectuée dans chaque unité de production avant que la surveillance officielle puisse être levée.

8.2. *Article 10, paragraphe 3 — Mesures supplémentaires justifiées par une enquête épidémiologique*

Les échantillons standard doivent être prélevés dans chaque unité de production sur les volailles ou autres oiseaux captifs mis à mort.

8.B. Influenza aviaire hautement pathogène (IAHP)

8.3. *Article 11, paragraphe 4 — Mesures à appliquer concernant les volailles issues d'œufs récoltés dans des exploitations où des foyers ont été confirmés*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation détenant des volailles déjà issues d'œufs récoltés pendant la période d'incubation dans une exploitation où la présence de l'IAHP a été confirmée, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation. Les données concernant la mortalité quotidienne et les données quotidiennes relatives aux quantités d'aliments et/ou d'eau ingérées, si elles sont disponibles, pour la période débutant une semaine avant la date d'apparition des signes cliniques de l'IAHP et se terminant le jour de l'inspection de l'exploitation par le vétérinaire officiel doivent être documentées dans le rapport d'inspection établi par le vétérinaire officiel;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production et d'un examen clinique des volailles, en particulier celles qui semblent malades ou dont la croissance ne se passe pas comme prévu;

c) les échantillons standard doivent être prélevés sur les volailles âgées de deux à trois semaines;

d) la surveillance officielle de l'exploitation peut être levée après un examen clinique des volailles de plus de vingt et un jours et l'obtention de résultats négatifs aux tests effectués sur les échantillons standard.

8.4. *Article 13, paragraphe 2, point b) — Dérogations concernant certaines exploitations*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation ayant reçu l'autorisation de déroger à l'article 11, paragraphe 2, premier alinéa, de la directive 2005/94/CE, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation, si de tels registres existent;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs, en particulier ceux qui semblent malades;

c) au lieu des échantillons standard, les échantillons à prélever dans chaque unité de production en vue des tests de laboratoire, vingt et un jours après la date du dernier résultat positif attestant la présence de l'IAHP et à des intervalles de vingt et un jours, sont les suivants:

i) des échantillons prélevés sur l'ensemble des volailles ou autres oiseaux captifs morts présents au moment du prélèvement d'échantillons;

ii) lorsque c'est réalisable, des écouvillons trachéaux/oropharyngés et cloacaux prélevés sur au moins soixante volailles ou autres oiseaux captifs ou sur l'ensemble des volailles ou autres oiseaux captifs lorsque l'exploitation en compte moins de soixante; ou, s'il s'agit de petits oiseaux exotiques non habitués à être manipulés, ou dont la manipulation serait dangereuse pour les personnes, des échantillons de fèces fraîches.

Toutefois, l'autorité compétente peut accorder des dérogations concernant la taille de l'échantillon visée aux points i) et ii), en se fondant sur les résultats d'une évaluation des risques;

d) le prélèvement d'échantillons visé au point c) et les analyses de ces échantillons en laboratoire doivent se poursuivre jusqu'à l'obtention de deux résultats de laboratoire négatifs consécutifs, à vingt et un jours d'intervalle au minimum.

8.5. *Article 15, paragraphes 1 et 3 — Mesures à appliquer dans les exploitations contacts*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation contact, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation, si de tels registres existent. Les données concernant la mortalité quotidienne et les données quotidiennes relatives aux quantités d'aliments et/ou d'eau ingérées, si elles sont disponibles, pour la période débutant une semaine avant la date du contact avec le troupeau suspecté d'être infecté par l'IA et se terminant le jour de l'inspection de l'exploitation par le vétérinaire officiel doivent être documentées dans le rapport d'inspection établi par le vétérinaire officiel;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs, en particulier ceux qui semblent malades;

c) en cas de signes cliniques chez les volailles ou autres oiseaux captifs ou d'éléments indiquant une augmentation de la mortalité quotidienne (taux de mortalité normal du troupeau multiplié par > 3) ou une baisse de la production d'œufs quotidienne (> 5 %) ou une diminution des quantités d'aliments et/ou d'eau ingérées quotidiennement (> 5 %), il y a lieu de prélever immédiatement les échantillons standard dans chaque unité de production;

d) en l'absence de signes tels que ceux visés aux points b) et c), les échantillons standard doivent être prélevés vingt et un jours après la date du dernier contact suspecté avec une exploitation infectée ou au moment de la mise à mort des volailles ou autres oiseaux captifs.

8.6. *Article 18, points b) et c) — Recensement, inspections effectuées par le vétérinaire officiel et surveillance des exploitations situées dans la zone de protection*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation commerciale, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation. En cas d'éléments indiquant une augmentation de la mortalité quotidienne (taux de mortalité normal du troupeau multiplié par > 3) ou une baisse de la production d'œufs quotidienne (> 5 %) ou une diminution des quantités d'aliments et/ou d'eau ingérées quotidiennement (> 5 %), il y a lieu de prélever les échantillons standard dans chaque unité de production;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles et autres oiseaux captifs, en particulier ceux qui semblent malades;

c) lorsqu'il est probable que les espèces de volailles ou autres oiseaux captifs ne présentent pas clairement les signes cliniques de la maladie, ou dans le cas d'oiseaux vaccinés, l'autorité compétente peut décider, en se fondant sur les résultats d'une évaluation des risques, que les échantillons standard doivent être prélevés dans chaque unité de production;

d) en fonction des résultats d'une évaluation des risques, l'autorité compétente doit décider si des mesures supplémentaires de surveillance officielle, sous la forme d'inspections cliniques et de prélèvements d'échantillons en vue des tests de laboratoire, doivent être prises à l'égard d'exploitations, de compartiments d'élevage ou de types de production ciblés.

8.7. *Article 19, point f) — Mesures à appliquer dans les exploitations situées dans les zones de protection*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation où une augmentation de la morbidité ou de la mortalité ou une modification des données de production a été signalée, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation. En cas d'éléments indiquant une augmentation de la mortalité quotidienne (taux de mortalité normal du troupeau multiple par > 3) ou une baisse de la production d'œufs quotidienne (> 5 %) ou une diminution des quantités d'aliments et/ou d'eau ingérées quotidiennement (> 5 %), il y a lieu de prélever les échantillons standard dans chaque unité de production;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs, en particulier ceux qui semblent malades.

8.8. *Article 23, point b) — Dérogations pour le transport direct de volailles en vue de l'abattage immédiat*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation ayant reçu l'autorisation de déroger à l'article 22 de la directive 2005/94/CE, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles, en particulier celles qui semblent malades, moins de vingt-quatre heures avant l'heure de leur départ;

c) sur la base des résultats d'une évaluation des risques réalisée par l'autorité compétente, il y a lieu de prélever dans chaque unité de production, au lieu des échantillons standard, au moins soixante écouvillons trachéaux/oropharyngés et/ou soixante écouvillons cloacaux sur les volailles destinées à l'abattage, moins de quarante-huit heures avant l'heure de leur départ.

8.9. *Article 25, point b) — Dérogations pour le transport direct de volailles prêtes à pondre*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation ayant reçu l'autorisation de déroger à l'article 22, les mesures à appliquer avant le transport direct de volailles prêtes à pondre sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles, en particulier celles qui semblent malades, moins de vingt-quatre heures avant l'heure de leur départ;

c) sur la base des résultats d'une évaluation des risques réalisée par l'autorité compétente, il y a lieu de prélever, au lieu des échantillons standard, au moins soixante écouvillons trachéaux/oropharyngés et/ou cloacaux sur les volailles de chaque unité de production destinées au transport, moins de quarante-huit heures avant l'heure de leur départ.

8.10. *Article 26, paragraphe 1, point a) — Dérogation pour le transport direct d'œufs à couver et d'œufs de table*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation de troupeaux reproducteurs ayant reçu l'autorisation de déroger à l'article 22, les mesures à appliquer avant le transport direct d'œufs à couver sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production tous les quinze jours;

c) les échantillons standard doivent être prélevés dans chaque unité de production.

8.11. *Article 29, paragraphe 1 — Durée des mesures*

Les mesures s'appliquant dans la zone de protection conformément à la section 3 du chapitre IV de la directive 2005/94/CE peuvent être levées au plus tôt vingt et un jours après la date d'achèvement des opérations préliminaires de nettoyage et de désinfection des exploitations infectées, moyennant le respect des conditions suivantes:

a) toutes les exploitations commerciales situées dans la zone de protection ont été inspectées par un vétérinaire officiel, et l'ensemble des contrôles, inspections cliniques et tests de laboratoire visés au point 8.6 a), b) et c) ainsi qu'au point 8.7 ont donné des résultats négatifs;

b) toutes les exploitations non commerciales identifiées situées dans la zone de protection ont été inspectées par un vétérinaire officiel, et ni l'examen clinique ni les résultats des tests de laboratoire effectués n'ont conduit à une suspicion d'infection par l'IA;

c) la surveillance officielle supplémentaire éventuellement effectuée conformément au point 8.6 d) n'a rien révélé de préoccupant.

8.12. *Article 30, point g) — Mesures à appliquer dans les zones de surveillance*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation où une augmentation de la morbidité ou de la mortalité ou une modification des données de production a été signalée, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs, en particulier ceux qui semblent malades;

c) les échantillons standard doivent être prélevés dans chaque unité de production.

8.13. *Article 35 — Enquête sur la présence suspectée de l'IAHP dans les abattoirs et les moyens de transport*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte l'exploitation d'origine de volailles présentes dans un abattoir ou un moyen de transport, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation, si de tels registres existent;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs, en concertation avec le vétérinaire officiel de l'abattoir, qui doit communiquer les éventuelles données d'inspection antérieures et les résultats des examens ante mortem et post mortem;

c) les échantillons standard doivent être prélevés dans chaque unité de production, sauf si l'autorité compétente a pu établir que la présence suspectée de l'IAHP pouvait être exclue sur la base de l'enquête vétérinaire réalisée conformément aux points a) et b);

d) outre les échantillons standard, des échantillons prélevés sur au moins cinq oiseaux malades, morts ou abattus présents dans l'abattoir et présentant des signes pathologiques doivent être envoyés en vue des tests de laboratoire.

8.14. *Article 36, paragraphe 1 — Mesures à appliquer dans les abattoirs*

Après l'achèvement de l'enquête visée au point 8.13, la supervision officielle peut être levée à condition que les résultats des tests de laboratoire soient négatifs et qu'il n'y ait pas de suspicion clinique de la présence de l'IAHP dans l'exploitation d'origine et l'abattoir.

8.15. *Article 37, paragraphes 1 et 2 — Mesures à appliquer dans les postes d'inspection frontaliers et les moyens de transport*

8.15.1. Lorsqu'un vétérinaire officiel examine des volailles ou autres oiseaux captifs maintenus en isolement, qui étaient présents dans un poste d'inspection frontalier ou un moyen de transport et ont été transportés ailleurs en raison d'une suspicion ou confirmation de la présence de l'IAHP, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des documents et registres correspondants, si de tels documents ou registres existent;

b) examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs maintenus en isolement et inspection clinique des autres volailles ou autres oiseaux captifs, en particulier ceux qui semblent malades;

c) les échantillons standard doivent être prélevés sur des volailles ou autres oiseaux captifs choisis dans différentes cages ou caisses de transport.

8.15.2. Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation d'origine identifiée en cas d'abattage des volailles ou autres oiseaux captifs, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation, si de tels registres existent;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs, en concertation avec le vétérinaire officiel de l'abattoir, qui doit communiquer les éventuelles données d'inspection antérieures et les résultats des examens ante mortem et post mortem;

c) les échantillons standard doivent être prélevés dans chaque unité de production, sauf si l'autorité compétente a pu établir que la présence suspectée de l'IAHP pouvait être exclue sur la base de l'enquête vétérinaire réalisée conformément aux points a) et b);

d) outre les échantillons standard visés au point c), des échantillons prélevés sur au moins cinq oiseaux malades, morts ou abattus présents dans l'abattoir et présentant des signes pathologiques doivent être envoyés en vue des tests de laboratoire;

e) la supervision officielle peut être levée à condition que les résultats des tests de laboratoire effectués sur les échantillons visés aux points c) et d) soient négatifs et qu'il n'y ait pas de suspicion clinique de la présence de l'IAHP dans l'exploitation d'origine et l'abattoir.

8.C. Influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP)

8.16. *Article 39, paragraphe 6, points b) et h) — Mesures à appliquer dans les exploitations où la présence de l'IAFP est confirmée*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation avant le transport de volailles vers l'abattoir ou une exploitation détenant des volailles déjà issues d'œufs récoltés pendant la période d'incubation, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs;

c) les échantillons standard doivent être prélevés dans chaque unité de production sur les oiseaux destinés à l'abattage, moins de quarante-huit heures avant l'heure de leur départ;

d) les échantillons standard doivent être prélevés dans chaque unité de production sur les volailles déjà issues d'œufs récoltés pendant la période d'incubation.

8.17. *Article 40, paragraphe 2, point b) — Dérogations accordées à certaines exploitations concernant les mesures à appliquer en cas de foyers confirmés*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation ayant reçu l'autorisation de déroger à l'article 39, paragraphe 2, et à l'article 39, paragraphe 5, point b), de la directive 2005/94/CE, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation, si de tels registres existent;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production à intervalles réguliers, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs, en particulier ceux qui semblent malades;

c) au lieu des échantillons standard, les échantillons à prélever dans chaque unité de production en vue des tests de laboratoire, vingt et un jours après la date du dernier résultat positif attestant la présence de l'IAFP et à des intervalles de vingt et un jours, sont les suivants:

i) des échantillons prélevés sur les volailles ou autres oiseaux captifs morts présents au moment du prélèvement d'échantillons;

ii) des écouvillons trachéaux/oropharyngés et cloacaux prélevés sur soixante volailles et autres oiseaux captifs ou sur l'ensemble des volailles et autres oiseaux captifs lorsque l'exploitation en compte moins de soixante; ou, s'il s'agit de volailles ou autres oiseaux captifs de petite taille, exotiques et non habitués à être manipulés, ou dont la manipulation serait dangereuse pour les personnes, des échantillons de fèces fraîches.

Toutefois, l'autorité compétente peut accorder des dérogations concernant la taille de l'échantillon visée aux points i) et ii), en se fondant sur les résultats d'une évaluation des risques;

d) le prélèvement d'échantillons visé au point c) et les analyses de ces échantillons en laboratoire doivent se poursuivre jusqu'à l'obtention de deux résultats de laboratoire négatifs consécutifs, à vingt et un jours d'intervalle au minimum.

8.18. *Article 42, paragraphes 1 et 3 — Mesures à appliquer dans les exploitations contacts*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation contact, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation contact, si de tels registres existent;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs, en particulier ceux qui semblent malades;

c) les échantillons standard doivent être prélevés dans chaque unité de production ou au moment de la mise en mort des volailles ou autres oiseaux captifs.

8.19. *Article 44, paragraphe 1, point b) — Mesures à appliquer dans les zones réglementées*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation commerciale dans une zone réglementée, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs, en particulier ceux qui semblent malades;

c) les échantillons standard doivent être prélevés dans chaque unité de production;

d) en fonction des résultats d'une évaluation des risques, l'autorité compétente doit décider si des mesures supplémentaires de surveillance officielle, sous la forme d'inspections cliniques et de prélèvements d'échantillons en vue des tests de laboratoire, doivent être prises à l'égard d'exploitations, de compartiments d'élevage ou de types de production ciblés.

8.20. *Article 45, points a) et b) — Durée des mesures*

Les mesures s'appliquant dans la zone réglementée conformément à la section 3 du chapitre V de la directive 2005/94/CE peuvent être levées au plus tôt vingt et un jours après la date d'achèvement des opérations préliminaires de nettoyage et de désinfection des exploitations infectées après le dépeuplement de l'exploitation, ou au plus tôt quarante-deux jours après la date de confirmation de la présence de l'IAFP, moyennant le respect des conditions suivantes:

a) toutes les exploitations commerciales situées dans la zone réglementée ont été inspectées par un vétérinaire officiel, et tous les tests de laboratoire pour les échantillons visés au point 8.13 c) et d) ont été effectués et leurs résultats sont disponibles;

b) les résultats des éventuels inspections cliniques et tests de laboratoire supplémentaires, qui peuvent porter sur des exploitations non commerciales afin de déterminer le risque de propagation de l'IAFP, sont disponibles;

c) l'autorité compétente a pu établir, en se fondant sur les résultats d'une évaluation des risques tenant compte de la situation épidémiologique et des résultats des tests de laboratoire visés aux points a) et b), que le risque de propagation de l'IAFP était négligeable; une telle évaluation peut conclure à la possibilité de lever les restrictions en cas de résultats sérologiques positifs et de résultats virologiques négatifs.

8.D. Mesures visant à éviter la propagation des virus influenza d'origine aviaire à d'autres espèces

8.21. *Article 47, paragraphes 1 et 6 — Tests de laboratoire et autres mesures applicables aux porcs et à d'autres animaux*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation détenant des porcs après la confirmation de la présence d'un foyer d'IA, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation, si de tels registres existent;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des porcs, en particulier ceux qui semblent malades;

c) des écouvillons nasaux/oropharyngés doivent être prélevés sur au moins soixante porcs de chaque unité de production ou sur l'ensemble des porcs lorsque l'unité de production en compte moins de soixante; ces prélèvements doivent être effectués avant ou le jour de la mise à mort des volailles ou autres oiseaux captifs infectés. Au moins soixante échantillons de sang doivent être prélevés sur les porcs, deux à quatre semaines après la date de la mise à mort. Les échantillons doivent être prélevés de telle sorte qu'au moins un échantillon soit obtenu pour chacun des groupes de porcs qui sont en contact direct les uns avec les autres;

d) le transfert de porcs vers d'autres exploitations peut être autorisé si au moins soixante écouvillons nasaux/oropharyngés et soixante échantillons de sang prélevés sur des porcs de chaque unité de production quatorze jours après la date du résultat positif attestant la présence de l'IA ont donné des résultats négatifs.

Le transfert de porcs vers un abattoir peut être autorisé si au moins soixante écouvillons nasaux/oropharyngés prélevés sur des porcs de chaque unité de production quatorze jours après la date du résultat positif attestant la présence de l'IA ont donné des résultats négatifs.

Si les résultats de laboratoire ne sont pas probants ou sont positifs, il y a lieu de procéder à toutes les recherches supplémentaires nécessaires pour exclure l'infection des porcs par l'IA ou la transmission de l'IA parmi les porcs;

e) lorsque le vétérinaire officiel soupçonne que d'autres mammifères domestiques présents dans l'exploitation, en particulier ceux dont la sensibilité à l'infection par des virus IA des sous-types H5 et H7 a été établie, pourraient avoir été en contact avec les volailles ou autres oiseaux captifs infectés, des échantillons doivent être prélevés en vue des tests de laboratoire.

8.E. Repeuplement

8.22. *Article 49, paragraphe 3, points b) et c) — Repeuplement des exploitations*

Lorsqu'un vétérinaire officiel inspecte une exploitation commerciale qui a fait l'objet d'un repeuplement, les mesures à appliquer sont les suivantes:

a) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation;

b) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs, en particulier ceux qui semblent malades;

c) les échantillons à prélever dans chaque unité de production, au lieu des échantillons standard, sont les suivants:

i) au moins vingt échantillons de sang à prélever dès que les volailles ont été placées dans l'exploitation, sauf dans le cas des poussins d'un jour; lorsque cela se justifie, le prélèvement des échantillons peut être effectué dans l'exploitation d'origine des volailles, avant leur transfert vers l'exploitation de repeuplement;

ii) des échantillons de volailles mortes ou des écouvillons prélevés sur leur cadavre, provenant de dix oiseaux morts par semaine au maximum pendant la période de vingt et un jours suivant la date du repeuplement;

d) lorsque l'exploitation a déjà été infectée précédemment par l'IAHP, vingt écouvillons trachéaux/oropharyngés et vingt écouvillons cloacaux doivent également être prélevés sur les oiseaux aquatiques (canards/oies) dans chaque unité de production, le cas échéant, pendant la dernière semaine de la période de vingt et un jours suivant la date du repeuplement;

e) lorsque l'exploitation a déjà été infectée précédemment par l'IAFP, vingt écouvillons trachéaux/oropharyngés et vingt écouvillons cloacaux ainsi que vingt échantillons de sang doivent être prélevés dans chaque unité de production.

8.F. Vaccination

8.23. *Article 56, paragraphe 2, point i) — Vaccination préventive des volailles ou autres oiseaux captifs*

Les tests de laboratoire prévus au chapitre IX de la directive 2005/94/CE doivent être effectués sur les volailles ou autres oiseaux captifs vaccinés au moyen d'essais DIVA approuvés, lorsque le virus sauvage est connu.

Lorsque des oiseaux sentinelles sont utilisés, ils doivent être présents dans chaque troupeau vacciné et faire l'objet d'une inspection clinique ainsi que d'un dépistage réalisé au moyen du test d'inhibition de l'hémagglutination (IH). À cette fin, vingt échantillons de sang doivent être prélevés au moins tous les soixante jours sur les oiseaux sentinelles non vaccinés, dans chaque exploitation où la vaccination a été pratiquée.

8.24. *Annexe IX — Dispositions applicables aux mouvements de volailles ou d'autres oiseaux captifs et de produits issus de volailles en cas de vaccination d'urgence*

Des mesures de suivi strictes doivent être appliquées aux mouvements des volailles et autres oiseaux captifs vivants ainsi que de leurs œufs, afin de réduire autant que possible le risque d'une nouvelle propagation de l'infection par l'IA.

Dans ce but, les mêmes mesures de suivi doivent être appliquées au début d'une campagne de vaccination d'urgence en ce qui concerne les mouvements des volailles et autres oiseaux captifs vivants ainsi que de leurs œufs, afin de réduire autant que possible le risque d'une nouvelle propagation de l'infection par l'IA à l'intérieur et en dehors de la zone de vaccination.

a) Avant le premier mouvement d'œufs à couver et d'œufs de table à l'intérieur et en dehors de la zone de vaccination et, par la suite, au moins tous les trente jours, le vétérinaire officiel est tenu d'appliquer les mesures suivantes:

   i) réalisation d'une inspection clinique des volailles reproductrices ou pondeuses non vaccinées dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles, en particulier celles qui semblent malades; les échantillons standard doivent être prélevés sur les volailles dans chaque unité de production, ou

   ii) réalisation d'une inspection clinique des volailles reproductrices ou pondeuses vaccinées dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des oiseaux sentinelles présents dans ces troupeaux; les échantillons standard doivent être prélevés sur ces oiseaux sentinelles.

b) Pour le transfert de volailles ou d'autres oiseaux captifs vaccinés vivants vers d'autres exploitations ou pour les mouvements de volailles vaccinées vivantes à l'intérieur et en dehors de la zone de vaccination, le vétérinaire officiel est tenu d'appliquer les mesures suivantes:

   i) contrôle des registres de production et des registres sanitaires de l'exploitation;

   ii) réalisation d'une inspection clinique dans chaque unité de production, comprenant une évaluation de son histoire clinique et un examen clinique des volailles ou autres oiseaux captifs dans les soixante-douze heures précédant l'heure du départ, une attention particulière étant accordée aux oiseaux sentinelles;

   iii) lorsque les résultats des contrôles ainsi que des inspections et examens cliniques visés aux points i) et ii) ne sont pas satisfaisants, les échantillons standard doivent être prélevés sur les oiseaux sentinelles; en revanche, lorsque ces résultats sont satisfaisants, il y a lieu de prélever les échantillons suivants sur:

      — les volailles ou autres oiseaux captifs vaccinés: au moins vingt écouvillons trachéaux/oropharyngés et vingt écouvillons cloacaux ainsi que vingt échantillons de sang, pour réaliser un essai DIVA approprié dans les soixante-douze heures précédant l'heure du départ, et

      — les oiseaux sentinelles: vingt écouvillons trachéaux/oropharyngés et vingt écouvillons cloacaux ainsi que vingt échantillons de sang, pour pratiquer des examens sérologiques au moyen du test IH avant l'heure du départ.

CHAPITRE V

Tests de diagnostic virologique et évaluation des résultats

1. Jusqu'à la découverte et au développement des tests de biologie moléculaire, l'isolement du virus par inoculation dans des œufs de poule embryonnés était considéré comme le test de diagnostic de l'IA de loin le plus sensible, essentiel pour l'identification et la caractérisation ultérieures du virus à l'origine de l'infection. Les étapes essentielles de cette méthode sont exposées dans le présent chapitre.

2. **Traitement des échantillons**

S'ils sont transmis à l'état sec, les écouvillons doivent être placés dans une quantité de milieu antibiotique suffisante pour assurer leur immersion totale. Les échantillons peuvent être groupés en lots de cinq pour autant qu'ils proviennent de la même espèce, de la même unité épidémiologique et qu'ils aient été prélevés à la même date.

Les cadavres apportés au laboratoire doivent faire l'objet d'une autopsie, et des échantillons des organes et contenus d'organes suivants doivent être prélevés: fèces ou contenu intestinal, tissus cérébraux, trachée, poumons, foie, rate et autres organes manifestement atteints. Ces organes et tissus peuvent être groupés, mais il est impératif que les matières fécales soient traitées séparément.

Les échantillons de fèces et d'organes doivent être homogénéisés (à l'aide d'un mélangeur fermé ou d'un pilon et d'un mortier et de sable stérile) dans un milieu antibiotique jusqu'à l'obtention de suspensions à 10-20 % p/v dans le milieu.

Il convient de laisser reposer les écouvillons immergés et les suspensions pendant deux heures environ à température ambiante (ou plus longtemps à 4 °C), puis de les clarifier par centrifugation (par exemple, 800 à 1 000 × g pendant dix minutes).

3. **Isolement du virus dans des œufs de poule embryonnés**

Inoculer entre 0,1 et 0,2 ml du surnageant clarifié dans la cavité allantoïdienne d'au moins quatre œufs de poule embryonnés, mis à incuber pendant neuf à onze jours. En principe, ces œufs doivent provenir d'un troupeau exempt d'agents pathogènes spécifiques, mais si cela est impossible, il est permis d'utiliser des œufs provenant d'un troupeau reconnu exempt d'anticorps anti-IA (séronégatif).

Les œufs inoculés sont conservés à 37 °C et mirés quotidiennement. Au fur et à mesure, les œufs contenant des embryons morts ou mourants et tous les œufs restant après six jours d'inoculation doivent être réfrigérés à 4 °C et leur liquide allantoïdien/amniotique doit être testé par hémagglutination. En l'absence d'hémagglutination, cette procédure doit être répétée en utilisant comme inoculum le liquide allantoïdien/amniotique non dilué. Lorsqu'il y a hémagglutination, la présence de bactéries doit être exclue par culture. Si des bactéries sont mises en évidence, il est admis de passer le liquide dans un filtre à membrane pourvu de pores de 450 nm, d'ajouter un complément d'antibiotiques et d'inoculer ce liquide dans les œufs embryonnés comme indiqué ci-dessus.

Pour accélérer le diagnostic, certains laboratoires ont réalisé deux passages de trois jours ou un passage de deux jours puis un passage de quatre jours et ont signalé des résultats comparables à deux passages de six jours, mais l'équivalence n'a pas encore été pleinement évaluée.

Les liquides positifs doivent faire l'objet d'un test excluant la présence de bactéries. Si des bactéries sont détectées, on peut passer les liquides dans un filtre à membrane (450 nm) ou les centrifuger pour les débarrasser des bactéries et les inoculer à nouveau dans les œufs après avoir ajouté des antibiotiques.

4. **Diagnostic différentiel**

a) Différentiation préliminaire

Comme il est important que les mesures de lutte visant à limiter la propagation du virus IA soient appliquées dès que possible, chaque laboratoire national de référence qui a isolé un virus hémagglutinant doit être en mesure d'identifier ce virus comme étant un virus grippal influenza A de sous-type H5 ou H7 ou un virus de la maladie de Newcastle. Les liquides hémagglutinants doivent être utilisés dans des tests d'inhibition d'hémagglutination, comme décrit au chapitre IX. Une inhibition positive, par exemple à un titre de 2 à 3 $\log_2$ d'un contrôle positif, avec des antisérums polyclonaux spécifiques des sous-types H5 ou H7 de l'influenza aviaire de type A, peut servir d'identification préliminaire et permettre la mise en place de mesures de lutte provisoires.

b) Confirmation de l'identification

Étant donné qu'il existe seize sous-types d'hémagglutinine et neuf sous-types de neuraminidase des virus grippaux et que chacun de ces sous-types présente des variations, il n'est ni possible ni rentable pour les laboratoires nationaux de référence de conserver des antisérums qui permettraient une identification complète des sous-types des isolats de la grippe. Cependant, chaque laboratoire national de référence doit au moins:

i) confirmer le fait que l'isolat est un virus influenza A, à l'aide d'une double immunodiffusion permettant de détecter les antigènes de groupe;

ii) déterminer si l'isolat est, ou non, de sous-type H5 ou H7, une identification positive nécessitant l'application de mesures de lutte contre l'IAFP des sous-types H5 et H7;

iii) soumettre immédiatement tous les isolats du virus de l'IAHP et tous les isolats des sous-types H5 et H7 au laboratoire communautaire de référence à des fins de confirmation et de caractérisation complète, à moins qu'une dérogation ne soit accordée conformément au point d).

En outre, il est souhaitable que les laboratoires possédant les équipements appropriés:

iv) effectuent un test de recherche de l'indice de pathogénicité intraveineuse chez des poulets âgés de 6 semaines, selon la méthode décrite au chapitre VII. Les indices de pathogénicité intraveineuse supérieurs à 1,2 indiquent la présence du virus et exigent la pleine application des mesures de lutte contre l'IAHP.

Les laboratoires nationaux de référence doivent aussi envisager de se doter des compétences spécifiques et des équipements nécessaires au séquençage des nucléotides du gène de l'hémagglutinine, afin de déterminer la présence ou l'absence d'acides aminés basiques multiples au niveau du site de clivage de la protéine précurseur de l'hémagglutinine, pour tout virus IAFP H5 ou H7. Bien que le laboratoire communautaire de référence procède en priorité à la détermination de l'indice de pathogénicité dans le cadre des missions définies à l'annexe VII, point 2 b), de la directive 2005/94/CE, une telle caractérisation du virus au niveau national diminuera substantiellement le temps nécessaire au diagnostic et, en cas de diagnostic positif, le temps nécessaire à la pleine application des mesures de lutte contre l'influenza aviaire hautement pathogène.

c) Poursuite du typage et caractérisation des isolats

Le laboratoire communautaire de référence doit recevoir tous les virus hémagglutinants des laboratoires nationaux de référence à des fins de complément d'études antigéniques et génétiques permettant de mieux comprendre l'épizootiologie de la ou des maladies touchant la Communauté, conformément aux fonctions et aux missions du laboratoire communautaire de référence définies à l'annexe VII de la directive 2005/94/CE.

En plus de ces fonctions et missions, le laboratoire communautaire de référence effectuera le typage antigénique complet de tous les virus inflenza qu'il reçoit. Pour les virus H5 et H7 dont l'indice de pathogénicité intraveineuse n'est pas supérieur à 1,2, il convient aussi d'effectuer immédiatement le séquençage des nucléotides du gène de l'hémagglutinine afin de déterminer la présence ou l'absence d'acides aminés basiques multiples au niveau du site de clivage de la protéine précurseur de l'hémagglutinine et d'informer le laboratoire national de référence ainsi que l'autorité compétente du pays d'origine dès que les résultats sont disponibles, pour que les mesures de lutte contre l'IAHP puissent être pleinement déployées.

d) Étant donné la situation épidémiologique changeante au regard de l'IAHP/IAFP, il est possible, moyennant l'accord de la Commission et du laboratoire communautaire de référence, d'accorder une dérogation aux laboratoires possédant toutes les capacités de caractérisation rapide des virus pour qu'ils soumettent un sous-groupe de ces virus après un examen des données, et de laisser le laboratoire communautaire de référence procéder à une sélection pertinente. Cette dérogation n'est permise que lorsque les données peuvent être rapidement générées par le laboratoire national de référence et partagées avec le laboratoire communautaire de référence.

CHAPITRE VI

Tests moléculaires et évaluation des résultats

La définition actuelle de l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) permet l'identification moléculaire de facteurs de virulence et valide l'utilisation de techniques moléculaires pour établir le diagnostic de l'IA. Dernièrement, une évolution a été enregistrée dans l'application de ces techniques pour la détection et la caractérisation du virus IA directement à partir d'échantillons cliniques prélevés sur des oiseaux infectés. Les techniques RT-PCR conventionnelles appliquées aux échantillons cliniques pourraient, si les amorces sont correctement définies, mener à une détection rapide et à une identification rapide du sous-type (au moins de H5 et de H7), ainsi qu'à un amplimère pouvant être utilisé pour le séquençage des nucléotides; il a aussi été démontré qu'elles pouvaient servir à identifier rapidement les foyers subséquents, après détection des premières installations touchées et caractérisation du virus. La RT-PCR en une étape «en temps réel» utilisant des systèmes de sonde fluorogénique/amorce (rRT-PCR) permettent un diagnostic encore plus rapide et sensible impliquant la détection des virus IA et la détermination du sous-type H5 ou H7 dans les échantillons cliniques.

Les techniques RT-PCR et rRT-PCR posent néanmoins problème, car, à ce jour, les divers laboratoires ont mis au point des systèmes différents qui, bien que parfaitement valables, n'ont pas été validés ou testés sur un grand nombre d'échantillons dans des laboratoires différents. Le laboratoire communautaire de référence et certains laboratoires nationaux de référence se sont penchés sur ce problème dans le cadre d'un projet financé par la Communauté (EU AVIFLU), en vue d'établir des protocoles ratifiés pour des techniques RT-PCR et rRT-PCR conventionnelles que les autres laboratoires nationaux de référence pourraient aussi adopter. Si les paramètres de test, tels que les temps de cycle et de rampe, diffèrent de ceux recommandés dans les protocoles spécifiés, leur adéquation doit être démontrée avant toute utilisation, conformément au chapitre I, paragraphe 6, du présent manuel de diagnostic.

Les protocoles standard pour ces tests moléculaires et leur évaluation tels qu'appliqués par le laboratoire communautaire de référence sont disponibles sur le site internet suivant:

http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm

CHAPITRE VII

Test de pathogénicité in vivo et évaluation des résultats

La virulence, pour les poulets, des virus influenza A isolés sur des oiseaux doit être évaluée au moyen d'un test d'indice de pathogénicité intraveineuse (IPIV) effectué comme suit:

a) Diluer à 1/10, dans une solution physiologique stérile, du liquide allantoïdien infecté frais possédant un titre hémagglutinant >1/16 (>2^4 ou > $\log_2$ 4, par la réciproque), dès le niveau de passage disponible le plus bas, et de préférence dès l'isolement initial, sans sélection préalable.

b) Injecter par voie intraveineuse 0,1 ml du virus dilué à dix poulets âgés de 6 semaines exempts d'agents pathogènes spécifiques ou séronégatifs.

c) Examiner les sujets à vingt-quatre heures d'intervalle pendant dix jours. À chaque observation, attribuer un coefficient à chaque oiseau: 0 = normal, 1 = malade, 2 = gravement malade, 3 = mort. L'appréciation «malade» ou «gravement malade» constitue une évaluation clinique subjective.

En principe, les oiseaux «malades» présentent l'un des symptômes suivants et les oiseaux «gravement malades», plusieurs des symptômes suivants: troubles respiratoires, dépression, diarrhée, cyanose de la peau exposée ou des caroncules, œdème facial et/ou de la tête, troubles nerveux. Les oiseaux morts se voient attribuer le coefficient 3 lors de chacune des autres observations quotidiennes après constatation de la mort.

Pour des raisons de bien-être, les oiseaux trop malades pour manger ou boire doivent être tués de façon humaine et répertoriés comme «morts» lors de l'observation suivante, puisqu'ils mourront dans les vingt-quatre heures sans intervention. Cette manière de procéder est jugée acceptable par les autorités d'agrément.

d) L'IPIV correspond au coefficient moyen par oiseau et par observation sur une période de dix jours. Un indice de 3,00 signifie que tous les oiseaux sont morts en vingt-quatre heures; un indice de 0,00, qu'aucun oiseau n'a présenté de signes cliniques au cours de la période d'observation de dix jours.

L'exemple suivant montre une méthode simple pour enregistrer les résultats et calculer les indices:

Signes cliniques	Jours suivant l'inoculation										Coefficient total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Normal	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12 x 0 = 0
Malade	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	6 x 1 = 6
Gravement malade	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	6 x 2 = 12
Mort	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76 x 3 = 228
											Total 246

Notes:

Dix oiseaux observés pendant dix jours = cent observations.

Indice = coefficient moyen par animal et par observation = 246/100 = 2,46.

Tout virus grippal de type A, indépendamment de son sous-type, qui obtient une valeur supérieure à 1,2 au test de l'IPIV est considéré comme un virus de l'influenza aviaire hautement pathogène.

CHAPITRE VIII

Tests sérologiques et évaluation des résultats

Pour démontrer la présence d'un virus influenza A, on utilise généralement la méthode qui consiste à mettre en évidence la présence d'antigènes nucléoprotéiniques ou matriciels, qui sont communs à tous les virus grippaux de type A.

À cette fin, on peut utiliser la double immunodiffusion impliquant soit des préparations de virus concentré, soit des extraits de membranes chorio-allantoïdiennes infectées.

Les méthodes de prédilection en ce qui concerne les tests sérologiques pour la mise en évidence d'anticorps du virus IA sont l'hémagglutination (HA) et l'inhibition de l'hémagglutination (IH).

Le chapitre 2.7.12 du manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'Office international des épizooties (OIE) contient des informations détaillées sur les techniques de laboratoire et l'évaluation des résultats.

Les protocoles standard pour les tests sérologiques et l'évaluation de leurs résultats, tels qu'appliqués par le laboratoire communautaire de référence, sont disponibles sur le site internet suivant:

http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm

CHAPITRE IX

Systèmes de suivi associés à la vaccination

1. **La directive 2005/94/CE et le manuel de diagnostic**

Les sections 2 et 3 du chapitre IX de la directive 2005/94/CE permettent le recours à une vaccination d'urgence et préventive à certaines conditions. L'une de ces conditions est d'employer une stratégie «DIVA» (différenciation des animaux infectés et des animaux vaccinés).

La vaccination doit servir à prévenir l'infection et la propagation subséquente du virus d'un troupeau à l'autre. Il est irréfutablement démontré que la vaccination accroît la quantité de virus nécessaire pour infecter les oiseaux et diminue la quantité de virus excrété. Toutefois, si les oiseaux vaccinés ne développent plus de signes cliniques, ils peuvent encore propager le virus lorsque leur organisme en est infecté. Par conséquent, des virus de l'IAHP des sous-types H5 et H7 pourraient circuler pendant un certain temps sans qu'on les remarque au sein d'un troupeau dont le niveau d'immunité n'est pas optimal, exactement comme des virus de l'IAFP dans un troupeau non vacciné. Il est dès lors nécessaire de pouvoir reconnaître les troupeaux vaccinés porteurs du virus sauvage afin de pouvoir mettre en œuvre d'autres mesures de lutte, telles que l'abattage sanitaire.

2. **Utilisation de sentinelles pour surveiller l'infection**

Au niveau du troupeau, une méthode simple consiste à contrôler régulièrement des oiseaux sentinelles non vaccinés au sein de troupeaux vaccinés, mais cette méthode pose quelques problèmes d'organisation, notamment pour reconnaître les sentinelles, en particulier dans les grands troupeaux. Le contact entre les sentinelles et les oiseaux vaccinés doit être assuré.

3. **Test de laboratoire DIVA pour le contrôle de l'infection**

En remplacement ou en complément de cette méthode, on peut déterminer si les oiseaux vaccinés ont subi une exposition naturelle en utilisant des tests de laboratoire DIVA. Plusieurs systèmes de tests permettant aussi la détection d'une infection naturelle chez les oiseaux vaccinés ont été mis au point ces dernières années. La méthode qui consiste à employer un vaccin contenant un virus du même sous-type hémagglutinant (H) que le virus sauvage observé mais porteur d'une neuraminidase (N) différente s'est avérée exploitable. Les anticorps développés contre la neuraminidase du virus sauvage agissent comme marqueurs naturels de l'infection.

Ce système a été utilisé en Italie à la suite de la résurgence d'un virus IAFP H7N1 en 2000. En vue de compléter les mesures de lutte directe, une stratégie DIVA utilisant un vaccin composé de H7N3 pour lutter contre une infection sauvage de type H7N1 a été mise en œuvre. On a différencié les oiseaux vaccinés des oiseaux naturellement exposés grâce à un test sérologique permettant de déceler les anticorps spécifiques anti-N1. La même technique a été utilisée en Italie pour contrôler un virus IAFP causé par H7N3 en 2002-2003, moyennant, en l'occurrence, un vaccin H7N1 et un test sérologique détectant les anticorps anti-N3. Dans les ceux cas, la vaccination accompagnée d'un abattage sanitaire sur la base de cette stratégie DIVA a permis d'éradiquer le virus sauvage.

Cette technique est prise en défaut si un virus sauvage apparaît, pourvu du même antigène N que le virus sauvage observé mais présentant un sous-type H autre que H5 ou H7, ou si des sous-types présentant les mêmes antigènes N circulent déjà sur le terrain. Les canards, en particulier, sont connus pour être porteurs de plusieurs sous-types. Il était également nécessaire de mettre au point un test adapté pour dépister systématiquement la présence d'anticorps anti-neuraminidase dans les troupeaux. L'Italie a mis au point et appliqué un test sérologique ad hoc fondé sur un test d'immunofluorescence indirecte utilisant, comme antigène N, des protéines exprimées par des baculovirus recombinants. Ces tests bénéficieront peut-être d'une application plus large et plus aisée lorsqu'un test ELISA aura été mis au point.

Le recours à des vaccins contenant seulement la substance HA, tels que les vaccins à vecteur recombinant, permet d'utiliser des tests AGID classiques ou des tests ELISA fondés sur une nucléoprotéine, une protéine non structurelle ou des protéines matricielles, pour détecter la contamination des oiseaux vaccinés.

Pour les vaccins inactivés, un test a été décrit, qui permet de détecter les anticorps contre la protéine non structurelle du virus produits uniquement lors de l'infection naturelle. Une telle technique doit encore être validée sur le terrain, mais est limitée par le fait que l'infection naturelle d'un troupeau par un virus grippal, quel que soit son sous-type, entraîne la production d'anticorps dirigés contre la protéine non structurelle.

L'élaboration de méthodes rapides et sensibles de détection des virus, pouvant en particulier être automatisées, telles que la RT-PCR en temps réel, signifie qu'il serait possible d'utiliser ces méthodes pour effectuer des tests simples, généralisés et réguliers, sur des oiseaux vaccinés, afin de détecter la présence de virus sauvages. Toutefois, la détection de l'agent concerné ne sera possible qu'au cours d'une brève période lors de la phase aiguë de l'infection et ne pourra aider à conclure qu'un troupeau n'a pas été exposé au virus par le passé. Cette méthode est particulièrement bien adaptée à la réalisation de tests sur des oiseaux vaccinés, avant leur déplacement, en vue de prouver qu'ils sont exempts d'infection.

Le nombre d'échantillons à analyser par les méthodes retenues doit permettre d'exclure une prévalence du virus IA supérieure à 15 % dans un troupeau, avec un intervalle de confiance de 95 %.

CHAPITRE X

Stratégies de diagnostic de l'IA

Comme établi à l'annexe IV de la directive 2005/94/CE, la décision d'appliquer des mesures dans certaines zones ou exploitations contacts et la sévérité de ces mesures peuvent varier fortement en fonction de l'ampleur des risques. De la même manière, la confirmation requise du diagnostic dépendra probablement de la situation sur le terrain, de l'ampleur du danger et du niveau de risque. S'appuyant sur les éléments du diagnostic, les autorités vétérinaires doivent prendre des décisions qui mettent en balance le contrôle et l'éradication rapides de la maladie, d'une part, et les conséquences potentielles d'un mauvais diagnostic, d'autre part. Ces appréciations doivent s'appuyer sur de nombreux facteurs existants, mais certaines situations peuvent également être prévues.

Situation zoosanitaire	Problème éventuel	Critères diagnostiques
Pas de signes particuliers, pas de suspicion officielle	Exploitation isolée	Détection rapide par la technique de la RT-PCR gène M. Diagnostic différentiel le cas échéant
Foyer primaire suspecté	Exploitation isolée	Tests complets de diagnostic, isolement et caractérisation du virus
Foyer primaire suspecté	Exploitation située dans une zone à forte densité de volailles	Tests complets de diagnostic, isolement et caractérisation du virus, mais en privilégiant les méthodes rapides de détection et de caractérisation, notamment celles qui se fondent sur la RT-PCR et le séquençage [1]
Foyers secondaires et ultérieurs suspectés	Exploitations isolées, liées d'un point de vue épidémiologique à un foyer primaire suspecté	Privilégier les méthodes rapides de détection et de caractérisation, en particulier celles qui se fondent sur la RT-PCR et le séquençage [1].
Foyers secondaires et ultérieurs suspectés	Exploitations situées dans des zones à forte densité de volailles ou qui possèdent de nombreux liens épidémiologiques	Méthodes rapides de détection démontrant le plus vite la présence d'un virus IA [1].
Foyers multiples suspectés ou propagation rapide de la maladie et surveillance	La propagation deviendra incontrôlable en l'absence d'une intervention rapide	Méthodes rapides de détection démontrant le plus vite la présence d'un virus IA ou appréciation des signes cliniques [1].

[1] Pour ce faire, un échantillonnage complet doit être effectué et les échantillons doivent être conservés en vue d'une évaluation ultérieure.

CHAPITRE XI

Diagnostic d'une infection par un virus IA chez le porc et d'autres mammifères

1. **L'IA chez le porc**

Les porcs sont vulnérables aux virus de l'IA et, bien que la réplication soit relativement limitée dans la plupart des cas, les porcs infectés pourraient transmettre la maladie à la volaille et à d'autres animaux prédisposés. À ce jour, il n'existe aucune preuve concrète que les porcs infectés transmettent le virus IA des sous-types H5 et H7.

L'expérience acquise au cours de l'épidémie qui a touché les Pays-Bas en 2003 indique que les porcs contaminés par le H7N7 ne montraient aucun signe clinique pouvant être attribué à une infection par le H7N7. De plus, aucun porc contaminé n'a été signalé à ce jour lors de l'épidémie de H5N1 qui a touché l'Asie et d'autres régions.

Par conséquent, on ne peut s'appuyer sur les signes cliniques pour déterminer si les porcs sont infectés, bien que des symptômes cliniques dus à une contamination des porcs par d'autres virus grippaux d'origine aviaire puissent apparaître une fois que le virus s'est adapté à son hôte. Le diagnostic d'une infection provoquée par le virus IA chez le porc est, dans l'ensemble, analogue au diagnostic pour les espèces aviaires: il s'appuie sur l'isolement du virus, les techniques moléculaires et la détection d'anticorps spécifiques au moyen de tests d'inhibition d'hémagglutination. Il existe cependant certaines différences, et aucun des tests n'est totalement validé pour permettre de confirmer une contamination des porcs par un virus IA.

2. **Échantillons utilisés pour l'isolement du virus**

Les infections des porcs dues au virus IA se limitent généralement à l'appareil respiratoire; dès lors, les échantillons doivent se composer de tissus de l'appareil respiratoire et, le cas échéant, d'écouvillons oropharyngés ou nasaux, de préférence prélevés sur des porcs présentant des symptômes de la maladie. Ces échantillons et écouvillons peuvent être traités en vue de l'isolement du virus ou de la détection moléculaire du virus, par les mêmes techniques que celles décrites ci-dessus pour les oiseaux. Toutefois, lors de l'utilisation des techniques PCR, des contrôles appropriés doivent avoir lieu pour garantir que l'amplification n'est pas inhibée par des substances présentes dans les échantillons prélevés sur les porcs.

3. **Inoculation et incubation des œufs**

Afin d'isoler les virus de l'influenza des mammifères dans des œufs de poule embryonnés âgés de 9 à 11 jours, il est d'usage d'inoculer chaque œuf par la cavité allantoïdienne et dans la cavité amniotique. Cependant, lors de tests de détection sur des porcs qui ont été en contact avec des virus IA, l'inoculation par la cavité allantoïdienne est probablement suffisante lorsque le virus a eu peu de temps pour s'adapter.

De la même manière, la température généralement recommandée pour l'incubation des œufs en vue de l'isolement des virus de l'influenza de type A des mammifères est de 35 °C, mais, à nouveau, pour les virus peu adaptés aux porcs, une température de 37 °C n'entraverait pas l'isolement.

4. **Détection d'anticorps spécifiques lors des tests IH**

L'isolement du virus ou la détection moléculaire constituent probablement les méthodes les plus sensibles pour déterminer la présence d'une infection due au virus IA chez le porc. Toutefois, des réponses sérologiques ont été décelées chez des porcs sans qu'un virus ait été isolé ou détecté. Les tests IH qui utilisent des sérums provenant de porcs nécessitent certaines modifications par rapport au test employé pour les sérums d'oiseaux, mentionné au chapitre VIII.

Les sérums de porcs sont connus pour leur propriété d'inhibition non spécifique lors des tests IH et, par conséquent, chaque échantillon de sérum doit être traité avec une enzyme détruisant le récepteur afin d'éviter ce phénomène. Il y a lieu d'utiliser la méthode suivante:

a) ajouter 400 µl d'enzyme détruisant le récepteur (dilution de travail prédéterminée) à 100 µl d'antisérum de porc et mélanger soigneusement;

b) laisser incuber à 37 °C pendant une heure;

c) laisser ensuite incuber pendant trente minutes à 56 °C;

d) laisser refroidir les échantillons à 4 °C pendant au moins quinze minutes;

e) ajouter 10 µl de globules rouges de poulet à 30 % (v/v de concentré globulaire) et mélanger énergiquement;

f) laisser incuber à 4 °C jusqu'au lendemain. S'il est indispensable d'utiliser les échantillons le jour même, laisser incuber à 37 °C pendant une heure et centrifuger à 300 × g pendant cinq minutes.

Le sérum ainsi traité peut alors être utilisé dans les tests IH comme décrit pour les sérums d'oiseaux au paragraphe [...], la dilution initiale étant de 1:10. Afin d'évaluer la spécificité du test IH pour la souche virale à utiliser (voir l'utilisation d'une souche virale provenant du foyer aux fins de la sérologie, chapitre VIII), il convient d'employer une série de sérums de porcs séronégatifs pour l'influenza aviaire. Lors de l'épisode de 2003 aux Pays-Bas, jusqu'à 2,6 % de réactions non spécifiques ont été détectées lors du test IH utilisant des sérums de porcs prélevés indépendamment de l'épidémie.

5. **Prélèvement d'échantillons sur les porcs**

En particulier dans les exploitations élevant des porcs et de la volaille, que ce soit dans des installations partagées ou séparées, les porcs risquent d'être infectés par l'IA, de façon directe ou indirecte, par contact avec les volailles ou les produits avicoles. Afin d'exclure une telle contamination, des écouvillons oropharyngés ou nasaux et des échantillons de sang doivent être prélevés suivant les procédures décrites au point 8.21 du chapitre IV. Ces échantillons doivent provenir de porcs présentant des signes cliniques de la maladie. Cependant, lorsque les porcs ne présentent pas de signes cliniques, les échantillons peuvent être prélevés au hasard dans toutes les zones de l'installation. Les écouvillons doivent être soumis à des tests moléculaires rapides et/ou à la procédure d'isolement du virus, pour autant que le laboratoire en ait la capacité. La RT-PCR doit avoir été validée de manière appropriée et avoir une sensibilité au moins équivalente à l'isolement du virus dans les œufs pour les virus grippaux de type A.

Deux à quatre semaines après l'abattage sanitaire des volailles infectées par l'IA, au moins soixante échantillons de sang doivent être prélevés sur les porcs de telle façon qu'au moins certains de ces échantillons proviennent de groupes de porcs en contact direct l'un avec l'autre. Les échantillons doivent être soumis à un test IH avec un virus provenant du foyer aviaire. Les échantillons prélevés lors de la phase aiguë et lors de la phase de convalescence doivent être testés en même temps. Les échantillons positifs peuvent faire l'objet d'une confirmation par le test de neutralisation virale et/ou de Western Blot.

En cas de résultat positif pour un des échantillons, une enquête épidémiologique devra être effectuée dans tous les élevages porcins situés dans la zone de protection, qu'ils soient du type mixte ou non (installations partagées ou non).

6. **Virus IA chez d'autres mammifères que le porc**

Outre les porcs, il convient d'examiner d'autres mammifères sensibles à l'IA, y compris les chats. S'agissant de l'IAHP H5N1, les modalités suivantes doivent être suivies pour l'examen des chats:

Étant donné que les lésions pathologiques flagrantes, accompagnées d'une réplication virale, se manifestent essentiellement au niveau des poumons et du foie, les échantillons devant servir aux examens virologiques seront, de préférence, prélevés sur ces organes, chez des animaux morts. Pour les animaux vivants, on préférera prélever des écouvillons trachéaux/oropharyngés aux fins de la détection du virus. En outre, on peut aussi prélever séparément des écouvillons fécaux.

Les échantillons de sang à soumettre à des tests IH nécessiteront un traitement thermique à 56 °C pendant trente minutes; un traitement par enzyme détruisant les récepteurs n'est pas nécessaire.

CHAPITRE XII

Exigences minimales de sécurité pour le transport des échantillons

1. Le transport d'échantillons contenant des germes pathogènes ou suspectés de contenir des germes pathogènes est soumis à une réglementation nationale et internationale stricte qui doit être respectée à tout instant. Les isolats de virus ne sont pas classés comme des échantillons diagnostiques, mais doivent être conditionnés en conformité avec les normes internationales.

Les instructions formulées dans le présent chapitre concernent le transport aérien, mais un emballage similaire doit être adopté pour le transport terrestre ou maritime des échantillons.

2. **Emballage des échantillons de diagnostic en vue de leur transport**

Les échantillons de diagnostic transportés conformément à la réglementation de l'Association internationale du transport aérien (IATA) reçoivent le numéro d'identification ONU 2814, 2900 ou 3373, suivant le cas.

L'expéditeur, et non la compagnie de transport, est responsable du colis jusqu'à ce qu'il arrive à destination.

3. **Conditionnement primaire**

a) Les récipients primaires doivent être étanches: par exemple, les couvercles filetés doivent être scellés par du Parafilm® ou de l'adhésif, ou des mesures de protection similaires doivent être prises.

b) Les différents récipients primaires doivent être emballés individuellement pour éviter qu'ils ne se cassent.

c) Avant de déterminer le volume d'échantillons de diagnostic à expédier, le milieu de transport viral doit être pris en considération.

d) Les récipients primaires ne peuvent pas contenir plus de 500 ml ou 500 g.

Le récipient primaire contient uniquement l'échantillon pour les analyses.

4. **Conditionnement secondaire**

a) Le récipient secondaire doit contenir suffisamment de matériau absorbant pour absorber l'intégralité du contenu des récipients primaires en cas de fuite ou d'endommagement.

b) Les conditionnements secondaires doivent respecter les prescriptions de l'IATA en matière d'emballage des échantillons de diagnostic, y compris la procédure d'essai de chute d'une hauteur de 1,2 m (3,9 pieds). Les exigences relatives à l'emballage des matières infectieuses (instruction d'emballage 602 de l'IATA) sont plus élevées que celles relatives à l'emballage des échantillons de diagnostic et peuvent dès lors servir de référence.

c) L'emballage d'une matière infectieuse doit porter le marquage spécifique requis («UN» entouré): par exemple,

«UN 4G/CLASS 6.2/99/GB/2450».

d) Le conditionnement secondaire doit être étanche. Il y a lieu de suivre les consignes d'emballage du fabricant de l'emballage ou de toute autre partie habilitée, incluses dans le conditionnement secondaire.

e) La dimension d'encombrement minimale du conditionnement secondaire doit atteindre au moins 100 mm (quatre pouces).

f) Le conditionnement secondaire doit être suffisamment grand pour contenir des documents, tels qu'une lettre de transport aérien.

5. **Emballage extérieur**

a) L'emballage extérieur ne doit pas contenir plus de 4 l ou 4 kg.

b) Au besoin, de la carboglace ou de la glace sera placée à l'extérieur du conditionnement secondaire. En cas d'utilisation de carboglace, l'emballage doit permettre l'évacuation du gaz carbonique et ne pas permettre une accumulation de pression susceptible de faire céder l'emballage. En cas d'utilisation de glace, l'emballage doit être étanche.

Chaque emballage ainsi que les lettres de transport aérien doivent porter la mention suivante exacte:

**«UN 3373 DIAGNOSTIC SPECIMEN
PACKED IN COMPLIANCE WITH
IATA PACKING INSTRUCTION 650».**

c) Une liste détaillée du contenu doit être placée entre le conditionnement secondaire et l'emballage extérieur.

d) L'emballage extérieur doit être placé dans un sac en plastique scellé pour le protéger de l'humidité.

e) Il n'est pas nécessaire de joindre une déclaration de marchandise dangereuse.

CHAPITRE XIII

Envoi de virus et d'échantillons au laboratoire communautaire de référence

1. Les échantillons à envoyer au laboratoire communautaire de référence doivent respecter les recommandations relatives au transport d'agents pathogènes dangereux à l'intérieur de la Communauté ainsi que les règlements et la législation en vigueur au Royaume-Uni.

Il convient de suivre les instructions fournies dans le présent chapitre.

2. **Envoi de virus ou d'autres matériels biologiques au laboratoire communautaire de référence**

a) Tous les matériels doivent être emballés conformément aux instructions fournies dans le présent chapitre.

b) L'emballage extérieur portera la mention suivante:

«ANIMAL PATHOGEN — PACKAGE ONLY TO BE OPENED AT THE AVIAN VIROLOGY SECTION, VLA, WEYBRIDGE. IMPORTATION AUTHORISED BY LICENCE NUMBER....*.....ISSUED UNDER THE IMPORTATION OF ANIMAL PATHOGENS ORDER.»

c) Il convient de mentionner l'un des numéros de licence suivants:

i) pour les virus IA: **«AHZ/2232/2002/5*»;**

ii) pour les tissus et autres matériels: **«AHZ/2074C/2004/3*».**

Comme des numéros de licence sont modifiés de temps à autre, les laboratoires qui envoient les échantillons veilleront à utiliser les numéros de licence d'actualité.

d) Le colis doit être envoyé à l'adresse suivante:

Avian Virology
VLA Weybridge,
New Haw, Addlestone,
Surrey KT15 3NB
Royaume-Uni

e) Une lettre contenant le plus d'informations possible concernant les isolats, tels que l'espèce concernée, l'âge, la zone/le pays d'isolement, tout antécédent clinique, etc., doit accompagner le colis.

f) Les colis seront envoyés par aéroposte ou fret aérien.

Si les colis sont expédiés par fret aérien, le numéro de la lettre de transport aérien doit être communiqué par télécopie, téléphone ou courrier électronique au laboratoire communautaire de référence avant l'arrivée des matériels.

Les colis expédiés par fret aérien porteront clairement l'étiquetage suivant:

«**CARE OF TRANSGLOBAL**», pour leur assurer une prise en charge rapide à l'aéroport.

Personnes de contact au laboratoire communautaire de référence

Ian H. Brown, directeur du laboratoire de référence
Tél. (44-1932) 35 73 39
Fax (44-1932) 35 72 39
Adresse électronique: i.h.brown@vla.defra.gsi.gov.uk

Ruth Manvell, responsable du laboratoire de référence
Tél. (44-1932) 35 77 36 ou (44-1932) 35 77 08
Fax (44-1932) 35 78 56
Adresse électronique: r.manvell@vla.defra.gsi.gov.uk

CHAPITRE XIV

Conditions minimales de sécurité pour les laboratoires de diagnostic de l'IA

1. Les prescriptions de sécurité dans les laboratoires de diagnostic manipulant des virus IA doivent couvrir à la fois le confinement du virus en tant que menace pour la santé animale et la protection du personnel travaillant dans le laboratoire (ainsi que des personnes extérieures) contre tout risque zoonotique.

Dans la Communauté, les exigences minimales en matière de sécurité pour les laboratoires sont fixées par plusieurs directives. Les aspects pratiques sont en outre décrits et fixés dans des normes européennes sous-jacentes (EN). Pour l'exploitation des laboratoires en vue de l'établissement de diagnostics, d'autres réglementations (EN) sont également applicables, telles que les bonnes pratiques de laboratoire.

2. **Directives communautaires concernant les laboratoires**

Directive 89/391/CEE du Conseil du 12 juin 1989 concernant la mise en œuvre de mesures visant à promouvoir l'amélioration de la sécurité et de la santé des travailleurs au travail (JO L 183 du 29.6.1989, p. 1).

Directive 90/679/CEE du Conseil du 26 novembre 1990 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail (septième directive particulière au sens de l'article 16, paragraphe 1, de la directive 89/391/CEE) (JO L 374 du 31.12.1990, p. 1).

Si un diagnostic est posé par PCR et clonage des produits de PCR dans un plasmide bactérien pour la propagation, par exemple aux fins d'un séquençage d'ADN, la directive et les normes européennes (EN) suivantes sont applicables en plus des deux directives susmentionnées:

Directive 90/219/CEE du Conseil du 23 avril 1990 relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés (JO L 117 du 8.5.1990, p. 1).

3. Outre les directives communautaires, il convient aussi de tenir compte des normes européennes (EN) suivantes:

EN 12128 Biotechnologie. Laboratoires de recherche, de développement et d'analyse. Niveaux de confinement des laboratoires de microbiologie, zones à risque, situations et exigences physiques de sécurité.

EN 12738 Biotechnologie. Laboratoire de recherche, développement et analyse. Guide pour le confinement des animaux inoculés avec des micro-organismes utilisés à des fins expérimentales.

EN 12740 Biotechnologie. Laboratoire de recherche, développement et analyse. Guide pour la manipulation, l'inactivation et le contrôle des déchets.

EN 12741 Biotechnologie. Laboratoire de recherche, développement et analyse. Guide pour les opérations de laboratoires biotechnologiques.

Pour exploiter/gérer un laboratoire, les conditions suivantes doivent être respectées:

4. **Conditions à observer par les laboratoires (niveaux de confinement 1 à 4)**

Directive 2000/54/CE du Parlement européen et du Conseil du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail (septième directive particulière au sens de l'article 16, paragraphe 1, de la directive 89/391/CEE) (JO L 262 du 17.10.2000, p. 21), directive 90/219/CEE et normes européennes EN 12128, EN 12740 et EN 12741.

Mesures de confinement	Niveau de confinement			
	1	2	3	4
Laboratoire: isolé	non	oui	oui	oui
Laboratoires séparés par des portes	non	oui	oui	oui
Présence d'une fenêtre d'observation ou d'un dispositif similaire pour permettre aux occupants d'être vus	facultatif	facultatif	facultatif	oui
Installations pour se laver les mains	oui	oui	oui	oui
Installations pour la désinfection des mains	facultatif	oui	oui	oui
Accès limité	non	oui	oui	oui
Mesures spécifiques pour maîtriser la diffusion d'aérosols	non	oui minimiser	oui empêcher	oui empêcher
Signe de danger biologique sur la porte	non	oui	oui	oui
Douche	non	non	facultatif	oui
Lave-yeux	oui	oui	oui	oui
Laboratoire: hermétique à la fumigation	non	non	oui	oui
Surfaces résistantes à l'eau, aux acides, aux alcalis, aux solvants, aux désinfectants, aux agents de décontamination et faciles à nettoyer	oui (plan de travail)	oui (plan de travail)	oui (plan de travail et sol)	oui (plan de travail et sol)
Entrée dans le laboratoire par un sas	non	non	facultatif	oui
Pression négative par rapport à la pression de l'environnement immédiat	non	non	facultatif	oui
L'air entrant dans le laboratoire et sortant du laboratoire doit être filtré par un filtre HEPA	non	non	oui (filtration de l'air sortant)	oui
Autoclave	site	bâtiment	salle attenante au laboratoire	laboratoire, à double entrée

Mesures de confinement	Niveau de confinement			
	1	2	3	4
Vêtements de protection	Vête-ments de protection appropriés	Vête-ments de protection appropriés	Vêtements de protection appropriés (chaussures appropriées facul-tatives)	changement complet de vête-ments
Gants	non	facultatif	oui	oui
Contrôle efficace des vecteurs (par exemple, rongeurs et insectes)	facultatif	oui	oui	oui
Sécurité du stockage des agents biologiques	oui	oui	oui	oui
Le laboratoire doit posséder son propre équipement	non	non	Recommandé	oui

Il existe encore d'autres normes européennes qui traitent de la gestion et de l'organisation des laboratoires.

Il existe également d'autres réglementations et recommandations nationales et internationales qui doivent être respectées. L'OMS a publié son Manuel de sécurité biologique en laboratoire, troisième édition, sur le site internet suivant:

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/

5. **Confinement en relation avec la santé animale**

Les autorités vétérinaires de chaque État membre doivent mettre en pratique les règles relatives au confinement des virus IA, en particulier l'IAHP, mais aussi pour tous les virus IA des sous-types H5 et H7. L'Office international des épizooties (OIE) fournit des conseils au chapitre 1.4.5 du Code sanitaire pour les animaux terrestres 2005, et l'influenza aviaire à déclaration obligatoire hautement pathogène est considérée comme un agent pathogène classé dans le groupe 4 de confinement de l'OIE.

Les dispositions régissant la manipulation des virus IA seront mises en œuvre par les autorités vétérinaires des États membres.

Les conditions minimales de sécurité appliquées par le laboratoire communautaire de référence, qui sont aussi les règles nationales du Royaume-Uni, peuvent être consultées à l'adresse suivante:

http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm

6. **Confinement en relation avec la santé humaine**

Les laboratoires qui manipulent des virus IA doivent constamment être attentifs au fait que ces virus constituent, au moins potentiellement, des agents pathogènes pour l'homme, et s'organiser de manière à éviter d'infecter leur personnel et de propager le virus à l'extérieur.

Des instructions pour la manipulation des échantillons suspectés de contenir un virus IA de type A sont disponibles sur le site web de l'Organisation mondiale de la santé (OMS):

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/