

1 SEPTEMBRE 1995. - Arrêté royal modifiant l' arrêté royal du 23 janvier 1992 relatif aux conditions sanitaires de la collecte et du transfert des embryons de l' espèce bovine.

Article 1. § 1er. L' article 1er, point 1 de l' arrêté royal du 23 janvier 1992 relatif aux conditions sanitaires de la collecte et du transfert des embryons de l' espèce bovine, est remplacé par la disposition suivante :

"1. Embryon : le stade de développement initial d' un animal domestique de l' espèce bovine obtenu par fertilisation in vivo ou in vitro, ayant ou non été soumis à toute manipulation affectant l' intégrité de la zone pellucide, lorsqu'il peut être transféré chez un animal receveur."

§ 2. L' article 1er point 4 du même arrêté, est remplacé par la disposition suivante :

"4. Animal donneur : bovin femelle sur lequel sont récoltés des embryons, des oocytes ou des ovaires, ou bovin mâle ayant servi par insémination artificielle à la fécondation en vue de produire des embryons."

§ 3. L' article 1er du même arrêté, est complété comme suit :

"10. Equipe de production d' embryons : un groupe agréé composé d' un vétérinaire responsable assisté éventuellement d' un ou plusieurs vétérinaires et/ou de techniciens, compétents pour assurer la collecte, le traitement et le stockage d' embryons obtenus par fertilisation et/ou culture in vitro.

11. Lot de donneurs : femelles donneuses d' ovaires ou d' autres tissus prélevés après l' abattage, abattues au même moment, dans le même abattoir."

Art. 2. Un article 1erbis, rédigé comme suit, est inséré dans le même arrêté :

"Art. 1bis. Le présent arrêté ne s' applique pas aux embryons résultant d' un transfert de noyaux."

Art. 3. Un article 4bis, rédigé comme suit, est inséré dans le même arrêté :

"Art. 4bis. § 1er. Pour obtenir l' agrément, l' équipe de production d' embryons doit répondre aux conditions fixées à l' annexe I du présent arrêté et se soumettre à la surveillance permanente et à l' autorité du Service. Le vétérinaire responsable introduit la demande conformément au modèle fixé à l' annexe II du présent arrêté.

§ 2. L' abattoir dans lequel des ovaires et autres tissus sont prélevés par l' équipe de production d' embryons doit être agréé par le Ministre qui a la santé publique dans ses attributions et placé sous le contrôle sanitaire de l' inspecteur-expert responsable de l' examen ante et post mortem des animaux donneurs.

§ 3. Les ovaires et autres tissus ne peuvent entrer dans le laboratoire visé à l' annexe I, point 1) du présent arrêté avant l' achèvement de l' inspection post mortem du lot d' animaux donneurs.

Si une certaine pathologie est constatée dans le lot susvisé ou sur les animaux abattus le jour même dans l' abattoir, tous les tissus provenant de ce lot doivent être retrouvés et éliminés."

Art. 4. L' article 14 du même arrêté, est remplacé par la disposition suivante :

"Art. 14. § 1er. Les embryons destinés aux échanges intracommunautaires doivent provenir :

1° d' animaux donneurs qui :

a) ont séjourné sur le territoire de la Communauté européenne ou dans le pays tiers de collecte durant au moins les six derniers mois précédant la collecte d' embryons;

b) ont séjourné dans le troupeau d' origine pendant au moins les trente

derniers jours précédant la collecte;

c) proviennent de troupeaux :

officiellement indemnes de tuberculose; officiellement indemnes ou indemnes de brucellose; indemnes de leucose bovine enzootique.

En dérogation aux dispositions du point c), troisième alinéa, les animaux donneurs peuvent provenir d'un ou de troupeaux non indemnes de leucose bovine enzootique mais dont il est certifié qu'aucun cas clinique de leucose bovine enzootique n'y a été enregistré au cours des trois dernières années;

d) proviennent de troupeaux n'ayant présenté durant l'année précédente, aucun signe clinique de rhinotrachéite infectieuse bovine/vulvovaginite pustuleuse infectieuse;

2° de femelles donneuses qui, le jour de la collecte, ne peuvent :

a) séjourner dans une exploitation faisant l'objet de mesures de restriction ou de quarantaine;

b) présenter de signes cliniques de maladie;

3° de femelles donneuses sur lesquelles sont prélevés des oocytes par ponction ovarienne ou ovariectomie répondant aux dispositions des points 1° et 2° du présent paragraphe;

4° de femelles donneuses d'ovaires ou d'autres tissus prélevés après l'abattage, n'ayant pas fait l'objet d'un ordre d'abattage dans le cadre d'un programme d'éradication de maladie ou provenant d'une exploitation non soumise à des restrictions de police sanitaire, dans un abattoir situé dans une zone non soumise à des mesures de quarantaine ou d'interdiction.

§ 2. Les embryons destinés à la mise sur le marché national doivent provenir :

1° de femelles donneuses ayant séjourné durant les six mois précédant la collecte d'embryons dans au maximum deux troupeaux différents répondant aux conditions suivantes :

- officiellement indemne de tuberculose;

- officiellement indemne de brucellose ou indemne de brucellose;

- indemne de leucose bovine enzootique, ou n'ayant présenté durant les trois dernières années aucun signe clinique de leucose bovine enzootique;

2° de femelles donneuses d'ovaires ou d'autres tissus prélevés après l'abattage, n'ayant pas fait l'objet d'un ordre d'abattage dans le cadre d'un programme d'éradication de maladie et provenant d'une exploitation non soumise à des restrictions de police sanitaire.

§ 3. Seuls des embryons congelés peuvent être importés de pays tiers qui procèdent à la vaccination contre la fièvre aphteuse. Ces embryons doivent être stockés dans des conditions agréées pendant une période minimale de trente jours avant l'expédition.

Les animaux donneurs doivent provenir d'une exploitation dans laquelle aucun animal n'a été vacciné contre la fièvre aphteuse dans les trente jours précédant la collecte et qui ne fasse l'objet d'aucune mesure d'interdiction ou de quarantaine."

Art. 5. Un article 15bis, rédigé comme suit, est inséré dans le même arrêté :

"Art. 15bis. Les embryons destinés aux échanges intracommunautaires doivent avoir été conçus à la suite d'une insémination artificielle ou d'une fertilisation in vitro avec du sperme d'un donneur d'un centre de collecte de sperme agréé pour la collecte, le traitement et le stockage de spermes, ou, par du sperme importé conformément à la directive 88/407/CEE."

Art. 6. L'article 19 du même arrêté, est remplacé par la disposition suivante :

"Art. 19. Les réceptacles visés à l'article 18 ne peuvent contenir que des embryons appartenant à un même lot. Chaque réceptacle doit être

accompagné du certificat sanitaire conforme à l'annexe VI du présent arrêté."

Art. 7. Les annexes I, II et IV de l'arrêté royal du 23 janvier 1992 relatif aux conditions sanitaires de la collecte et du transfert des embryons de l'espèce bovine sont remplacées par respectivement les annexes I, II et III au présent arrêté.

Art. 8. L'annexe IV au présent arrêté est insérée comme annexe VI dans l'arrêté royal du 23 janvier 1992 relatif aux conditions sanitaires de la collecte et du transfert des embryons de l'espèce bovine.

Art. 9. Le présent arrêté entre en vigueur le jour de sa publication au Moniteur belge.

Art. 10. Notre Ministre de l'Agriculture et des Petites et Moyennes Entreprises est chargé de l'exécution du présent arrêté.

Donné à Châteauneuf-de-Grasse, le 1^{er} septembre 1995.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de l'Agriculture et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

ANNEXES.

Art. N1. Annexe I. Conditions d'agrément des équipes de collecte et de transfert d'embryons et des équipes de production d'embryons.

Pour pouvoir être agréée, chaque équipe doit satisfaire aux exigences suivantes :

a) la collecte, le traitement, le transfert et le stockage d'embryons doivent être effectués soit par un médecin-vétérinaire responsable, soit sous sa responsabilité, par un ou plusieurs vétérinaires ou techniciens compétents et formés aux méthodes et techniques d'hygiène;

b) elle doit avoir à sa disposition, afin d'examiner, de traiter et d'emballer les embryons, des installations permanentes et éventuellement mobiles de laboratoire se composant d'au moins une surface de travail, un microscope et un équipement cryogénique;

c) elle doit, disposer :

- d'un local où les embryons peuvent être manipulés, voisin mais physiquement séparé de la zone utilisée pour la manipulation des animaux donneurs pendant la collecte;

- d'un local ou d'une zone équipés pour le nettoyage et la stérilisation des instruments et du matériel utilisés pour la collecte ou la manipulation des embryons.

Elle doit avoir à sa disposition, lorsqu'il s'agit d'un laboratoire mobile, une partie spécialement équipée du véhicule se composant de deux sections séparées dont :

- l'une pour l'examen et la manipulation des embryons, qui doit être une section propre et;

- l'autre pour accueillir l'équipement et le matériel utilisés en contact avec les animaux donneurs;

- un laboratoire mobile doit toujours maintenir le contact avec un laboratoire en site permanent, afin d'assurer la stérilisation de ses équipements et de pouvoir s'y approvisionner en liquides et autres produits nécessaires pour la collecte et la manipulation des embryons;

d) lorsqu'une micromanipulation de l'embryon qui implique une pénétration de la zone pellucide doit être mise en oeuvre, cette opération doit se faire à l'aide d'un dispositif de flux laminaire. Ce dispositif doit être convenablement nettoyé et désinfecté entre chaque lot;

e) chaque équipe de collecte doit consigner ses activités de collecte d'embryons pendant les douze mois précédant et suivant le stockage et noter :

- la race, l'âge et l'identification des donneurs et des donneuses concernés;

- le lieu de collecte, de traitement et de stockage des embryons collectés par l'équipe;
- l'identification des embryons avec le détail de leur destination si celle-ci est connue;
- les modalités des techniques de micromanipulation qui impliquent la pénétration de la zone pellucide ou d'autres techniques telles que la fertilisation in vitro et/ou la culture in vitro qui ont été mises en oeuvre sur les embryons;
- dans le cas des embryons résultant d'une fertilisation in vitro, l'identification peut être effectuée par lot, mais elle doit être accompagnée de la date et du lieu de la récolte des ovaires et/ou des oocytes. Il doit être possible d'identifier le troupeau d'origine des animaux donateurs;
- f) pour être agréée comme équipe de production et de traitement des embryons résultant d'une fertilisation in vitro, et/ou d'une culture in vitro, l'équipe de collecte d'embryons doit satisfaire aux exigences complémentaires suivantes :
 - le personnel doit être formé aux techniques appropriées de contrôle des maladies et de laboratoire notamment aux procédures relatives au travail en milieu stérile;
 - elle doit disposer d'un laboratoire en site permanent qui doit :
 - i) avoir les installations et les équipements appropriés y compris des locaux séparés pour la récupération des oocytes dans les ovaires et des locaux ou des zones séparées pour traiter les oocytes et les embryons et pour stocker les embryons;
 - ii) avoir des dispositifs de flux laminaire sous lesquels tous les oocytes. Le sperme et les embryons doivent être traités; toutefois, le sperme pourra être centrifugé hors du dispositif à flux laminaire à condition que les règles d'hygiène soient respectées;
 - Lorsque des oocytes et d'autres tissus doivent être collectés dans un abattoir, l'équipe doit avoir à sa disposition un équipement approprié garantissant la collecte et le transport des ovaires et autres tissus jusqu'au laboratoire de traitement dans des conditions d'hygiène et de sécurité.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 1er septembre 1995.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de l'Agriculture et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Art. N2. Annexe II. Demande d'agrément.

(Formulaire non repris pour des raisons techniques. Voir M.B. 09-11-1995, p. 30991 - 30992).

Art. N3. Annexe III. Conditions de traitement et de stockage des embryons.

Art. 1N3. I. Exigences générales :

1. La chambre où les embryons sont traités, c'est-à-dire lavés, examinés et le cas échéant congelés, doit être propre, désinfectée, elle ne peut contenir d'animaux (aucun animal de laboratoire).

(2. Tous les milieux de culture et les solutions doivent être rendus stériles suivant des méthodes reconnues, conformément aux recommandations du manuel de la " International Embryo Transfert Society" (IETS). Des antibiotiques peuvent être ajoutés aux milieux de culture conformément au manuel IETS.

Tous les conteneurs, les équipements et les ampoules utilisés au cours du processus de traitement des embryons doivent être stériles.) (Le texte français du Mon. B. étant erroné, on a traduit le texte néerlandais.)

3. Seuls les embryons provenant d'une même donneuse doivent être manipulés, traités et stockés ensemble, ils constituent une seule entité

sur le plan sanitaire.

4. Dans le cas des embryons produits par fécondation in vitro à partir d'ovaires récoltés après l'abattage, seuls les embryons provenant du même lot de donneurs peuvent être stockés dans la même ampoule ou paillette.

Art. 2N3. II. Lavage des embryons :

5. Les embryons d'une même donneuse doivent être lavés par groupe de dix au maximum et le milieu de lavage doit être changé dix fois. La micro-pipette utilisée pour transférer les embryons doit être changée à chaque transfert dans un milieu frais. Chaque lavage doit correspondre à une dilution au 100e par rapport au précédent lavage.

6. Le lavage des embryons doit précéder la congélation, le cas échéant.

7. Le lavage des embryons obtenus par fertilisation et culture in vitro, doit être réalisé après achèvement du processus de culture.

Art. 3N3. III. Examen des embryons :

8. La zone pellucide de chaque embryon doit être examinée sur l'entière surface à un grossissement de minimum 50 fois : elle doit être intacte et libre de matériel adhérent.

9. L'examen de la zone pellucide doit être réalisé après le lavage et avant la congélation.

10. L'examen des embryons obtenus par fertilisation et culture in vitro, doit être réalisé après achèvement du processus de culture.

11. Toute micromanipulation qui implique la pénétration de la membrane pellucide doit être mise en œuvre conformément aux dispositions prévues sous III, 8, après le processus de lavage visé sous II, 5.

Art. 4N3. IV. Traitement à la trypsine :

12. Lorsque les autorités sanitaires du pays destinataire l'exigent, les embryons destinés aux échanges et à exportations vers les pays tiers seront traités à la trypsine selon la procédure suivante :

Les embryons sont transférés dans cinq bains successifs de tampon phosphate (PBS) sans Ca^{++} ni Mg^{++} mais qui contiennent des antibiotiques et 0,4 % d'albumine sérique bovine (BSA). Ensuite les embryons sont plongés dans deux bains de parties aliquotes de trypsine pH 7,6-7,8 pendant 60 à 90 secondes. La trypsine stérile (1:250) qui a une activité telle que 1 g hydrolyse 250 g de caséine à 25 °C pH 7,6 en dix minutes dans une solution salée équilibrée de HANK sans Ca^{++} ni Mg^{++} est utilisée à une concentration de 0,25 %.

Après le traitement à la trypsine les embryons sont transférés dans cinq bains successifs de PBS contenant des antibiotiques et 2 % de sérum. Il est important de remplacer la BSA avec le sérum dans ces bains après la trypsinisation. Afin de s'assurer de l'inactivation de la trypsine.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 1er septembre 1995.

ALBERT

Par le Roi :

Le Ministre de l'Agriculture et des Petites et Moyennes Entreprises,

K. PINXTEN

Art. N4. Annexe IV. Certificat sanitaire. - Echanges d'embryons d'animaux domestiques de l'espèce bovine.

(Modèle non repris pour des raisons techniques. Voir M.B. 09-11-1995, p. 30994 - 30995).