

Règlement grand-ducal du 21 janvier 1993 relatif à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine.

Nous JEAN, par la grâce de Dieu, Grand-Duc de Luxembourg, Duc de Nassau;

Vu la loi modifiée du 29 juillet 1912 concernant la police sanitaire du bétail et l'amélioration des chevaux, des bêtes à cornes et des porcs;

Vu la directive du Conseil no 64/432/CEE du 26 juin 1964 relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine, telle qu'elle a été modifiée par la suite et en dernier lieu par la directive du Conseil 91/499/CEE du 26 juin 1991 concernant le diagnostic de la brucellose bovine et de la leucose bovine enzootique;

Vu la directive du Conseil no 90/422/CEE du 26 juin 1990 modifiant la directive 64/432/CEE en ce qui concerne la leucose bovine enzootique;

Vu la directive du Conseil no 90/423/CEE du 26 juin 1990, modifiant la directive 85/511/CEE établissant des mesures communautaires de lutte contre la fièvre aphteuse, la directive 64/432/CEE relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine;

Vu l'avis de la Chambre d'Agriculture;

Vu l'avis du Collège Vétérinaire;

Vu l'article 27 de la loi du 8 février 1961 portant organisation du Conseil d'Etat et considérant qu'il y a urgence;

Sur le rapport de Notre Ministre de l'Agriculture, de la Viticulture et du Développement rural et de Notre Ministre de la Justice et après délibération du Gouvernement en Conseil;

Arrêtons:

Art. 1^{er}. Le présent règlement concerne les échanges entre le Grand-Duché de Luxembourg et les autres Etats membres des animaux d'élevage, de rente ou de boucherie des espèces bovine et porcine.

Art. 2. Au sens du présent règlement on entend par:

- a) exploitation: l'établissement agricole ou l'étable de négociant officiellement contrôlée dans lequel des animaux d'élevage, de rente ou de boucherie sont détenus ou sont élevés de façon habituelle;
- b) animal de boucherie: l'animal des espèces bovine et porcine destiné à être conduit directement à l'abattoir ou sur un marché;
- c) animaux d'élevage ou de rente: les animaux des espèces bovine et porcine autres que ceux mentionnés à l'alinéa b), notamment ceux destinés à l'élevage, à la production de lait, de viande ou au travail;
- d) cheptel bovin officiellement indemne de tuberculose: le cheptel bovin qui satisfait aux conditions énumérées à l'annexe A point I;
- e) cheptel bovin officiellement indemne de brucellose: le cheptel qui satisfait aux conditions énumérées à l'annexe A point II sous A sous 1 ou 1 bis;
- f) cheptel bovin indemne de brucellose: le cheptel bovin qui satisfait aux conditions énumérées à l'annexe A point II A 2;
- g) animal de l'espèce porcine indemne de brucellose: l'animal de l'espèce porcine qui satisfait aux conditions énumérées à l'annexe A point II B 1;
- h) cheptel porcin indemne de brucellose: le cheptel porcin qui satisfait aux conditions énumérées à l'annexe A point II B 2;
- j) zone indemne d'épizootie: une zone d'un diamètre de 20 km, dans laquelle selon des constatations officielles il n'y a pas eu, depuis 30 jours au moins avant l'embarquement:
 - i) pour les animaux de l'espèce bovine: aucun cas de fièvre aphteuse,
 - ii) pour les animaux de l'espèce porcine: aucun cas de fièvre aphteuse, de maladie vésiculeuse du porc ou de paralysie porcine contagieuse (maladie de Teschen);
- k) maladies à déclaration obligatoire: les maladies énumérées à l'annexe E;
- l) vétérinaire officiel: le vétérinaire désigné par l'autorité centrale compétente d'un Etat membre. Au Grand-Duché de Luxembourg: le vétérinaire-inspecteur;
- m) pays expéditeur: l'Etat membre à partir duquel des animaux des espèces bovine et porcine sont expédiés vers un autre Etat membre;
- n) pays destinataire: l'Etat membre à destination duquel sont expédiés des animaux des espèces bovine et porcine provenant d'un autre Etat membre;
- o) région: partie du territoire d'un Etat membre dont la superficie est d'au moins 2.000 kilomètres carrés et qui est soumise à un contrôle des autorités compétentes et inclut au moins l'une des circonscriptions administratives suivantes:

- pour la Belgique: province/province,
 - pour la République Fédérale d'Allemagne: Regierungsbezirk,
 - pour le Danemark: Amt ou île,
 - pour la France: département,
 - pour l'Italie: provincia,
 - pour le Luxembourg: l'ensemble du territoire,
 - pour les Pays-Bas: keuring
 - pour le Royaume-Uni:
 - pour l'Angleterre, le Pays de Galles et l'Irlande du Nord: county,
 - pour l'Ecosse: district ou island area,
 - pour l'Irlande: county,
 - pour la Grèce: Nomos,
 - pour l'Espagne: provincia,
 - pour le Portugal continental: distrito, et pour le reste du territoire: regio autonoma.
- s) cheptel indemne de leucose bovine enzootique: le cheptel qui satisfait aux conditions énumérées à l'annexe G chapitre 1er rubrique A;
- t) Etat membre ou région indemne de leucose bovine enzootique: une région ou un Etat membre satisfaisant aux exigences fixées à l'annexe G chapitre 1er rubrique B;
- u) Ministre: le Ministre ayant dans ses attributions l'Administration des services vétérinaires;
- v) Directeur: le Directeur de l'Administration des services vétérinaires.

Art. 3.

1. Seul peuvent faire l'objet d'une expédition vers un Etat membre de la CE les animaux des espèces bovine et porcine, qui remplissent les conditions générales fixées au paragraphe 2, compte tenu le cas échéant des dispositions du paragraphe 7, ainsi que les conditions spéciales fixées pour certaines catégories d'animaux des espèces bovine et porcine aux paragraphes 3 à 6.
2. Les animaux des espèces bovine et porcine visés par le présent règlement doivent:
 - a) ne présenter, au jour d'embarquement, aucun signe clinique de maladie;
 - b) ne pas avoir été acquis dans une exploitation faisant l'objet d'une interdiction pour des motifs de police sanitaire par suite de l'apparition des maladies suivantes auxquelles les animaux en cause sont réceptifs: fièvre aphteuse, maladie vésiculeuse du porc, peste porcine, paralysie contagieuse des porcs, brucellose bovine, brucellose porcine, charbon bactérien.

Pour autant que tous les animaux des espèces sensibles à la maladie n'ont pas été abattus et les locaux désinfectés, la durée de l'interdiction doit être, à compter du dernier cas constaté, d'au moins trente jours dans le cas de fièvre aphteuse ou de maladie vésiculeuse du porc, d'au moins quarante jours dans le cas de paralysie contagieuse des porcs, d'au moins six semaines dans le cas de brucellose bovine ou porcine et d'au moins quinze jours dans le cas de charbon bactérien.

Les animaux des espèces sensibles à la maladie constatée dans la zone de protection ne peuvent en sortir que s'ils sont conduits à un abattoir sous contrôle officiel en vue de l'abattage immédiat;

 - c) pour autant qu'il s'agit d'animaux d'élevage ou de rente, avoir été acquis dans une exploitation répondant officiellement aux conditions suivantes:
 - i) être située au centre d'une zone indemne d'épizootie,
 - ii) être indemne depuis 3 mois au moins avant l'embarquement de fièvre aphteuse et de brucellose bovine pour les animaux de l'espèce bovine et pour les animaux de l'espèce porcine, de fièvre aphteuse, de maladie vésiculeuse du porc, de brucellose bovine et de brucellose porcine et de paralysie contagieuse des porcs (maladie de Teschen),
 - iii) être indemne depuis au moins 30 jours avant l'embarquement de toute autre maladie contagieuse pour l'espèce animale considérée et soumise à déclaration obligatoire;
 - d) avoir séjourné dans l'exploitation visée à l'alinéa c) pendant les 30 derniers jours avant l'embarquement ou depuis leur naissance en ce qui concerne les animaux d'élevage et de rente. Le vétérinaire officiel pourra attester le séjour des animaux dans l'exploitation au cours des 30 derniers jours avant l'embarquement ou depuis leur naissance lorsqu'il s'agit d'animaux identifiés dans les conditions visées à l'alinéa e) et placés sous contrôle vétérinaire officiel permettant de certifier l'appartenance des animaux à l'exploitation;
 - e) être identifiés par une marque officielle ou agréée officiellement qui peut être remplacée chez les animaux de l'espèce porcine par une estampille durable permettant l'identification;
 - f) être acheminés directement de l'exploitation au lieu précis d'embarquement:
 - i) sans entrer en contact avec des animaux biongulés autres que des animaux des espèces bovine et porcine répondant aux conditions prévues pour les échanges intracommunautaires;
 - ii) en les séparant, animaux d'élevage ou de rente d'une part, animaux de boucherie d'autre part;
 - iii) à l'aide de moyens de transport et de contention préalablement nettoyés et désinfectés avec un désinfectant officiellement autorisé;

- g) être embarqués, en vue de leur transport, conformément aux conditions de l'alinéa e) en un lieu précis situé au centre d'une zone indemne d'épizootie; les véhicules de transport doivent être aménagés de telle sorte que les fèces, la litière ou le fourrage des animaux ne puissent pas couler ou tomber hors du véhicule pendant le transport;
 - h) être, après l'embarquement, acheminés directement et dans les délais les plus brefs vers le pays destinataire;
 - i) être accompagnés au cours de leur transport vers le pays destinataire d'un certificat sanitaire, conforme à l'annexe F (modèles I à IV), qui devra être établi le jour de l'embarquement, au moins dans la langue du pays destinataire, et dont la durée de validité sera de 10 jours. Ce certificat doit comporter un seul feuillet.
3. Les bovins d'élevage ou de rente doivent en outre:
- a) provenir d'un cheptel bovin officiellement indemne de tuberculose et notamment lorsqu'il s'agit d'animaux âgés de plus de 6 semaines avoir réagi négativement à une intradermotuberculation effectuée dans les trente jours précédant l'embarquement et pratiquée conformément aux dispositions de l'annexe B.
 - b) provenir d'un cheptel bovin officiellement indemne de brucellose et notamment lorsqu'il s'agit d'animaux âgés de plus de 12 mois, avoir présenté un titre brucellique inférieur à 30 unités internationales agglutinantes par millilitre, lors d'une séro-agglutination effectuée dans les trente jours précédant l'embarquement et pratiquée conformément aux dispositions de l'annexe C point A.
 - c) lorsqu'il s'agit de vaches laitières, ne pas présenter de signe clinique de mammite; en outre, l'analyse de leur lait, pratiquée conformément aux dispositions de l'annexe D, ne doit avoir décelé ni indice d'un état inflammatoire caractérisé, ni germe spécifiquement pathogène.
 - d) provenir d'un cheptel indemne de leucose bovine enzootique au sens de l'article 2 point s).
 - e) outre la condition prévue au point d), lorsqu'ils sont âgés de plus de douze mois et lorsqu'ils proviennent d'une région ou d'un Etat membre n'ayant pas le statut d'indemne de leucose bovine enzootique, avoir présenté un résultat négatif à un test individuel qui a été pratiqué conformément à l'annexe G chapitre II, dans les trente jours précédant leur embarquement.
 - f) ne pas être soumis aux exigences des points d) et e) s'il s'agit de bovins âgés de moins de 30 mois, destinés à la production de viande et s'ils
 - i) proviennent d'un cheptel dans lequel aucun cas de leucose bovine enzootique n'a été notifié et confirmé au cours des deux dernières années,
 - ii) sont identifiés par une marque particulière lors de leur embarquement et restent sous contrôle jusqu'à leur abattage, pour autant que l'Etat membre de destination prenne toutes les mesures pour éviter la contamination des cheptels indigènes.
4. Les porcs d'élevage ou de rente doivent en outre provenir d'un cheptel porcin indemne de brucellose. Lorsqu'il s'agit de porcs reproducteurs âgés plus de 4 mois, ils doivent avoir présenté, lors d'épreuves effectuées dans les trente jours précédant l'embarquement:
- i) un titre brucellique inférieur à 30 unités internationales agglutinantes par millilitre, lors d'une séroagglutination pratiquée conformément aux dispositions de l'annexe C point A;
 - ii) une réaction de fixation du complément négative, lors d'un examen sérologique pratiqué conformément aux dispositions de l'annexe C.
5. Les animaux de boucherie ne doivent en outre pas être des animaux des espèces bovine ou porcine à éliminer dans le cadre d'un programme d'éradication des maladies contagieuses.
6. Les bovins de boucherie, pour autant qu'ils soient âgés de plus de 4 mois doivent en outre:
- a) Lorsqu'ils ne proviennent pas d'un cheptel bovin officiellement indemne de tuberculose, avoir réagi négativement à une intradermotuberculation effectuée dans les 30 jours précédant l'embarquement et pratiquée conformément aux dispositions de l'annexe B;
 - b) Lorsqu'ils ne proviennent pas d'un cheptel bovin officiellement indemne de brucellose, ni d'un cheptel bovin indemne de brucellose, avoir présenté, lors d'une séroagglutination effectuée dans les 30 jours précédant l'embarquement et pratiquée conformément aux dispositions de l'annexe C point B), un titre brucellique inférieur à 30 unités internationales agglutinantes par millilitre.
- 7) Sont également admis pour les échanges intracommunautaires: les animaux d'élevage ou de rente ou les animaux de boucherie acquis sur un marché officiellement agréé pour les échanges intracommunautaires. Ce marché doit répondre aux conditions suivantes:
- a) être placé sous le contrôle d'un vétérinaire officiel;
 - b) être situé au centre d'une zone indemne d'épizootie;
 - c) ne servir après désinfection, soit qu'à des animaux d'élevage ou de rente, soit qu'à des animaux de boucherie, répondant aux conditions des échanges intracommunautaires, telles qu'elles sont prévues aux paragraphes 2 à 6 et à l'article 4, pour autant que ces conditions soient applicables à l'espèce animale considérée. En particulier ces animaux doivent avoir été acheminés vers le marché conformément aux dispositions du paragraphe 2 alinéa e).

Toutefois, l'intradermotuberculation et la séroagglutination prescrites aux termes du paragraphe 3 sous a) et b) ne doivent pas nécessairement avoir été effectuées avant l'introduction sur le marché. Avant d'être amenés de l'exploitation ou d'un marché, répondant aux dispositions du présent paragraphe, vers le lieu d'embarquement, ces animaux peuvent conformément aux dispositions du paragraphe 2 alinéa f), être conduits dans un lieu de rassemblement officiellement contrôlé si celui-ci satisfait aux conditions fixées pour le marché.

Les animaux acquis sur de tels marchés doivent être directement acheminés du marché ou du lieu de rassemblement au lieu précis d'embarquement conformément aux dispositions du paragraphe 2 alinéas f) et h) et expédiés vers le pays destinataire.

La durée du rassemblement desdits animaux en dehors de l'exploitation d'origine, notamment sur le marché, dans le lieu de rassemblement ou dans le lieu précis d'embarquement, doit être imputée sur le délai de 30 jours prévu au paragraphe 2 alinéa c), sans que cette durée puisse excéder 6 jours.

8. Le Ministre désigne les marchés agréés d'animaux d'élevage ou de rente et les marchés agréés d'animaux de boucherie prévus au paragraphe 7. Il communique ces agréments aux autorités centrales compétentes des autres Etats membres et à la Commission.
9. Un règlement ministériel peut fixer les modalités selon lesquelles le contrôle officiel des marchés et des lieux de rassemblement prévus au paragraphe 7 doit être effectué.
10. Dans le cas prévu au paragraphe 7, des mentions correspondantes doivent être portées sur les certificats sanitaires, conformément à l'annexe F (modèles I à IV).
11. Un règlement ministériel peut fixer les modalités selon lesquelles le contrôle officiel des étables de marchands doit être effectué.
12. Si l'exploitation ou la zone où elle se trouve était frappée de mesures d'interdiction officielles prises à la suite de l'apparition d'une maladie contagieuse pour l'espèce animale considérée, les délais indiqués au paragraphe 2 alinéa c) sub ii) et iii) et à l'article 2 alinéa i) prennent effet à partir de la date à laquelle ces mesures d'interdiction ont été officiellement levées.

Art. 4.

1. Tous les animaux destinés aux échanges intracommunautaires doivent avoir séjourné sur le territoire de l'Etat membre expéditeur avant le jour de l'embarquement:
 - a) depuis au moins 6 mois s'il s'agit d'animaux d'élevage ou de rente;
 - b) depuis au moins 3 mois s'il s'agit d'animaux de boucherie.

Lorsque ces animaux sont âgés respectivement de moins de 6 ou 3 mois, le séjour sur le territoire de l'Etat membre expéditeur est imposé depuis la naissance.
2. Dans tous les cas prévus au paragraphe 1, des mentions correspondantes doivent être portées sur les certificats sanitaires, conformément à l'annexe F (modèles I à IV)

Art. 5.

1. Les animaux de boucherie, qui ont été conduits, sitôt arrivés au Grand-Duché de Luxembourg, soit directement, soit à travers un marché ou un centre de rassemblement agréé, dans un abattoir, doivent y être abattus dans les délais les plus brefs, conformément aux exigences de police sanitaire.
 2. Les animaux de boucherie qui ont été conduits, sitôt arrivés au Grand-Duché de Luxembourg, sur un marché attenant à un abattoir dont la réglementation ne permet la sortie des animaux présents que vers un autre abattoir, doivent être abattus dans cet abattoir cinq jours au plus tard après leur entrée dans le marché.
- Le directeur peut, pour des raisons de police sanitaire, désigner l'abattoir vers lequel ces animaux doivent être acheminés.

Art. 6. Les règles prévues par la directive 90/425/CEE du Conseil, du 26 juin 1990, relative aux contrôles vétérinaires et zootechniques applicables dans les échanges intracommunautaires de certains animaux vivants et de leurs produits, sont applicables notamment en ce qui concerne les contrôles à l'origine, l'organisation et les suites à donner aux contrôles à effectuer par le pays destinataire et les mesures de sauvegarde à mettre en oeuvre.

Art. 7. Les annexes du présent règlement en font partie intégrante et peuvent être modifiées par règlement ministériel.

Art. 8. Les décisions prises par les instances communautaires selon la procédure du Comité Vétérinaire Permanent sont directement applicables au Grand-Duché de Luxembourg.

Art. 9. Les infractions aux dispositions du présent règlement sont punies d'un emprisonnement de huit jours à trois mois, et d'une amende de deux mille cinq cent un à vingt mille francs, ou d'une de ces peines seulement. Les dispositions légales sur les circonstances atténuantes sont applicables à ces infractions.

Art. 10. Les articles 10 à 20 ainsi que les annexes I, II, III, IV, V, VI et VII du règlement grand-ducal du 3 décembre 1986 fixant les conditions sanitaires spéciales d'importation, de transit et d'exportation des animaux et des produits d'animaux sont abrogés.

Art. 11. Notre Ministre de l'Agriculture, de la Viticulture et du Développement rural et Notre Ministre de la Justice sont chargés de l'exécution du présent règlement qui sera publié au Mémorial.

*Le Ministre de l'Agriculture,
de la Viticulture
et du Développement rural,
Marie-Josée Jacobs
Le Ministre de la Justice,
Marc Fischbach*

Château de Berg, le 21 janvier 1993.
Jean

Dir. 90/422 et 90/423/CEE.

ANNEXE

I. Cheptel bovin indemne de tuberculose

Est considéré comme officiellement indemne de tuberculose, un cheptel bovin dans lequel :

- a) tous les bovins sont exempts de manifestations cliniques de tuberculose ;
- b) tous les bovins de plus de six semaines ont réagi négativement à au moins deux intradermotuberculinations officielles pratiquées selon les dispositions de l'annexe B, la première se situant six mois après la fin des opérations d'assainissement du cheptel, la deuxième six mois après la première, et les suivantes à intervalle d'un an. Lorsque la totalité des cheptels bovins est soumise aux opérations officielles de lutte contre la tuberculose, le pourcentage des cheptels bovins infectés de tuberculose n'est pas supérieur à 1 au cours de deux périodes de contrôle se succédant à un an d'intervalle, cet intervalle peut être porté à deux ans. Si le pourcentage des cheptels bovins infectés n'est pas supérieur à 0,2 au cours de deux périodes de contrôle se succédant à deux ans d'intervalle, cet intervalle peut être porté à trois ans. Lorsque le pourcentage des cheptels bovins infectés n'est pas supérieur à 0,1 à l'occasion de deux périodes de contrôles se succédant à trois ans d'intervalle, l'intervalle entre les tuberculinations ultérieures peut être porté à quatre ans et/ou l'âge auquel les animaux devront être soumis à ces contrôles peut être porté à vingt-quatre mois ;
- c) aucun bovin n'a été introduit sans qu'une attestation d'un vétérinaire officiel ne certifie que cet animal provient d'un cheptel bovin officiellement indemne de tuberculose et, s'il est âgé de plus de six semaines, a donné à l'intradermotuberculation une réaction négative appréciée selon les critères définis à l'annexe B 32 a).
 - i) Toutefois, l'intradermotuberculation n'est pas requise lorsque le pourcentage des cheptels bovins infectés de tuberculose est inférieur à 0,2 et s'il résulte d'une attestation du vétérinaire officiel que l'animal :
 - 1) est dûment identifié ;
 - 2) provient d'un cheptel bovin officiellement indemne de tuberculose ;
 - 3) n'est pas entré en contact, à l'occasion du transport, avec des bovins ne provenant pas de cheptels bovins officiellement indemnes de tuberculose.
 - ii) L'attestation prévue sous i) peut ne pas être exigée lorsque, depuis quatre ans au minimum :
 - 99,80 % au moins des cheptels bovins sont reconnus officiellement indemnes de tuberculose et où
 - les cheptels qui ne sont pas officiellement indemnes se trouvent sous contrôle officiel, le transfert des bovins hors de ces cheptels étant interdit, sauf s'ils sont conduits sous contrôle officiel à l'abattage.

Si, dans un troupeau de bovins officiellement indemne de tuberculose, un animal est considéré avoir réagi positivement à une tuberculation de routine ou si dans ce troupeau un cas clinique de tuberculose a été diagnostiqué lors de l'inspection post-mortem de routine sur un animal venant d'un troupeau officiellement indemne de tuberculose, le statut de troupeau officiellement indemne doit être suspendu jusqu'à ce que tous les animaux restants, âgés de plus de six semaines, aient réagi négativement à au moins deux intradermotuberculinations officielles conformément à l'annexe B, la première ayant lieu deux mois au moins après l'élimination de l'animal en question du troupeau et la seconde au moins quarante-deux jours après la première.

II. Animaux de l'espèce porcine et cheptels bovin et porcin indemnes de brucellose

A. Cheptel bovin

- 1) Est considéré comme officiellement indemne de brucellose un cheptel bovin dans lequel :
 - a) ne se trouvent pas d'animaux de l'espèce bovine vaccinés contre la brucellose, à moins qu'il ne s'agisse de femelles ayant été vaccinées depuis au moins trois ans ;
 - b) tous les bovins sont exempts de manifestations cliniques de brucellose depuis six mois au moins ;
 - c) tous les bovins âgés de plus de douze mois :
 - i) ont présenté, à l'occasion de deux séro-agglutinations pratiquées officiellement à des intervalles de trois mois au moins et de douze mois au plus et selon les dispositions de l'annexe C point A, un titre brucellique inférieur à 30 unités internationales agglutinantes par millilitre, étant entendu que :
 - la première séro-agglutination peut être remplacée par trois épreuves de l'anneau (ring-test) effectuées à intervalle de trois mois, à la condition toutefois que la seconde séro-agglutination soit effectuée six semaines au moins après la troisième épreuve de l'anneau ;

les épreuves de séro-agglutination visées au paragraphe 1 peuvent être remplacées par deux épreuves à l'antigène brucellique tamponné pratiquées officiellement ou par deux épreuves de micro-agglutination pratiquées conformément à l'annexe C points D et G. Ces épreuves sont effectuées à intervalle de trois mois au moins et de douze mois au plus;

- ii) sont contrôlés annuellement pour déterminer l'absence de brucellose par trois épreuves de l'anneau ou trois épreuves ELISA sur le lait, effectuées à des intervalles d'au moins trois mois, ou deux épreuves de l'anneau ou deux épreuves ELISA sur le lait, effectuées à des intervalles d'au moins trois mois, et une épreuve sérologique (épreuve de séroagglutination, épreuve à l'antigène brucellique tamponné, épreuve de plasmagglutination, épreuve de l'anneau de lait sur plasma sanguin, épreuve de micro-agglutination ou épreuve ELISA individuelle sur le sang), pratiquée six semaines au moins après la deuxième épreuve de l'anneau ou la deuxième épreuve ELISA sur le lait. Lorsque les épreuves de l'anneau ou épreuves ELISA sur le lait ne sont pas pratiquées, deux épreuves sérologiques (épreuve de séro-agglutination, épreuve à l'antigène brucellique tamponné, épreuve de plasmagglutination, épreuve de l'anneau de lait sur plasma sanguin, épreuve de micro-agglutination ou épreuve ELISA individuelle sur le sang) sont effectuées chaque année à des intervalles de trois mois au moins ou de six mois au plus.

Lorsque la totalité des cheptels bovins est soumise aux opérations officielles de lutte contre la brucellose et que le pourcentage des cheptels bovins infectés n'est pas supérieur à un, il suffit de procéder annuellement à deux épreuves de l'anneau ou deux épreuves ELISA sur le lait, à des intervalles d'au moins trois mois, ou à une épreuve sérologique (épreuve de séro-agglutination ou épreuve à l'antigène brucellique tamponné, épreuve de plasmagglutination, épreuve de l'anneau de lait sur plasma sanguin, épreuve de micro-agglutination ou épreuve ELISA sur le sang).

En cas de contrôle de citernes, le nombre des épreuves de l'anneau visées aux alinéas précédents est à doubler, les intervalles étant réduits de moitié.

- iii) Il peut être renoncé aux exigences concernant le contrôle annuel de l'absence de brucellose prévu sous ii) lorsqu'au moins 99,8 % du cheptel bovin sont reconnus officiellement indemnes de brucellose depuis quatre ans au minimum; dans ce cas, l'intervalle entre les contrôles peut être porté à deux ans et les contrôles doivent être effectués à l'aide de l'une des épreuves sérologiques citées sous ii).
 - d) Aucun bovin n'a été introduit sans qu'une attestation d'un vétérinaire officiel ne certifie que cet animal provient d'un cheptel bovin officiellement indemne de brucellose, et, s'il est âgé de plus de douze mois, qu'il a présenté un titre brucellique inférieur à 30 unités internationales agglutinantes par millilitre, lors d'une séro-agglutination pratiquée selon les dispositions de l'annexe C, dans les trente jours avant l'introduction dans le cheptel.
 - i) Toutefois, la séro-agglutination ne peut pas être exigée lorsque le pourcentage des cheptels bovins infectés de brucellose n'est pas, depuis deux ans au moins, supérieur à 0,2 et s'il résulte d'une attestation d'un vétérinaire officiel que l'animal:
 1. est dûment identifié,
 2. provient d'un cheptel bovin officiellement indemne de brucellose,
 3. n'est pas entré en contact, à l'occasion de son transport, avec des bovins ne provenant pas de cheptels bovins officiellement indemnes.
 - ii) L'attestation prévue sous i) peut ne pas être exigée lorsque, depuis quatre ans au minimum:
 - 99,80 % au moins des cheptels bovins sont reconnus officiellement indemnes de brucellose; et que
 - les cheptels qui ne sont pas officiellement indemnes se trouvent sous contrôle officiel, le transfert des bovins hors de ces cheptels étant interdit, sauf s'ils sont conduits sous contrôle officiel à l'abattage.
 - 2) Est également considéré comme officiellement indemne de brucellose, un cheptel bovin:
 - se trouvant dans un Etat membre où, à la date du 1^{er} janvier 1979, aucun cas de brucellose bovine n'a été officiellement constaté depuis au moins dix ans;
 - ayant satisfait pendant cette période aux dispositions du paragraphe 1 à l'exception, si tous les cheptels bovins de l'Etat membre concerné ont été soumis pendant la même période à des tests de contrôle périodiques officiels, à celles visées au point c) sous ii).
 - 3) 1. Un cheptel bovin est considéré comme indemne de brucellose si:
 - a) il ne comporte pas de bovins mâles ayant été vaccinés contre la brucellose;
 - b) toutes les femelles de l'espèce bovine, ou une partie d'entre elles, ont été vaccinées:
 - à l'âge de 6 mois au plus, à l'aide du vaccin vivant Buck 19 ou d'autres vaccins agréés par les instances communautaires;
 - à l'âge de 15 mois au plus, à l'aide du vaccin tué adjuvé 45/20 contrôlé et reconnu officiellement.
 - c) Tous les bovins satisfont aux conditions indiquées au point 1 sous b) et c), étant entendu que les bovins âgés de moins de trente mois qui ont été vaccinés à l'aide du vaccin vivant Buck 19 peuvent présenter un titre brucellique égal ou supérieur à 30 unités internationales agglutinantes par millilitre mais inférieur à 80 unités internationales agglutinantes par millilitre, pour autant qu'ils présentent, lors de la réaction de fixation du complément
 - un titre inférieur à 30 unités CEE, s'il s'agit de femelles vaccinées depuis moins de douze mois,
 - un titre inférieur à 20 unités CEE dans tous les autres cas.
- Les épreuves de séro-agglutination visées au paragraphe 1 point c) sous i) premier tiret peuvent être remplacées par des épreuves à l'antigène brucellique tamponné effectuées conformément à l'annexe C point D ou par des épreuves de micro-agglutination effectuées conformément à l'annexe C point G.

- d) Aucun animal de l'espèce bovine n'a été introduit sans une attestation d'un vétérinaire officiel certifiant ou qu'il se trouve dans les conditions prévues au point 1 sous d), ou qu'il provient d'un cheptel bovin reconnu indemne de brucellose, et, dans ce cas, s'il est âgé de plus de douze mois, qu'il a présenté dans les trente jours avant l'introduction dans le cheptel selon les dispositions de l'annexe C, un titre brucellique inférieur à 30 unités internationales agglutinantes par millilitre et une réaction de fixation du complément négative.
- Toutefois, s'il s'agit d'un bovin vacciné à l'aide du vaccin vivant Buck 19 et âgé de moins de trente mois, il peut présenter un titre brucellique égal ou supérieur à 30 unités internationales agglutinantes par millilitre, mais inférieur à 80 unités internationales agglutinantes par millilitre, pour autant qu'il présente, lors de la réaction de fixation du complément :
- un titre inférieur à 30 unités CEE, s'il s'agit d'une femelle vaccinée depuis moins de douze mois ;
 - un titre inférieur à 20 unités CEE, après le douzième mois suivant la vaccination.
- 4) Un cheptel bovin indemne de brucellose peut acquérir la qualification de cheptel bovin officiellement indemne de brucellose après un délai minimum de trois ans, si :
- a) il ne s'y trouve aucun animal vacciné contre la brucellose depuis moins de trois ans ;
 - b) les conditions prévues au point 2 sous c) ont été respectées sans interruption pendant ces trois années ;
 - c) à l'issue de la troisième année, les animaux de plus de douze mois ont présenté un titre brucellique inférieur à 30 unités internationales agglutinantes par millilitre lors d'une séro-agglutination et un résultat négatif lors de la réaction de fixation de complément, ces épreuves étant pratiquées selon les dispositions de l'annexe C.
- 5) Dans un cheptel bovin reconnu officiellement indemne de brucellose peuvent être introduits également des bovins provenant d'un cheptel bovin indemne de brucellose, si :
- au moment de leur introduction, ils sont âgés d'au moins dix-huit mois ;
 - au cas où ils ont été vaccinés contre la brucellose, cette vaccination a été effectuée depuis plus d'un an ;
 - dans les trente jours avant leur introduction, ils ont présenté, conformément aux dispositions de l'annexe C, un titre brucellique inférieur à 30 unités internationales agglutinantes par millilitre, ainsi qu'un résultat négatif lors de la réaction de fixation du complément.
- Si, conformément au premier alinéa, un bovin est introduit dans un cheptel bovin reconnu officiellement indemne de brucellose, pour les échanges intracommunautaires, ce dernier est considéré comme indemne de brucellose pendant deux ans à partir de la date d'introduction de l'animal.
- 6) Si dans un cheptel officiellement indemne de brucellose, on a constaté une suspicion de brucellose chez un ou plusieurs bovins, au lieu du retrait de la qualification de ce cheptel, celle-ci peut provisoirement être suspendue, si l'animal ou les animaux sont immédiatement éliminés ou isolés.
- La suspicion provisoire peut être levée si deux séroagglutinations effectuées, selon les dispositions de l'annexe C, à intervalle de six à huit semaines, chez tous les animaux âgés de plus de douze mois, donnent un titre inférieur à 30 unités internationales agglutinantes par millilitre.
- Les animaux isolés peuvent être réintroduits dans le cheptel si, dans l'intervalle de six à huit semaines, deux séroagglutinations ont donné un titre inférieur à 30 unités internationales agglutinantes par millilitre et deux fixations du complément ont donné un résultat négatif, ces épreuves étant pratiquées selon les dispositions de l'annexe C.
- Les dispositions prévues ci-dessus sont également applicables aux cheptels indemnes de brucellose lorsqu'une suspicion de la maladie a été constatée chez un ou plusieurs bovins âgés de plus de trente mois.
- 7) Les dispositions prévues ci-dessus pour les animaux appartenant à un cheptel indemne de brucellose sont également applicables aux animaux qui, avant la date de la mise en application des dispositions du présent règlement, ont été vaccinés pendant cinq et huit mois d'âge.

B. Porcs et cheptel porcin

1. Est considéré comme indemne de brucellose un porc qui :
 - a) ne présente pas de manifestations cliniques de la maladie ;
 - b) s'il pèse plus de 25 kilogrammes, présente, lors d'épreuves sérologiques effectuées simultanément et selon les dispositions de l'annexe C :
 - i) un titre brucellique inférieur à 30 UI agglutinantes par millilitre, lors d'une séro-agglutination ;
 - ii) un résultat négatif lors de la réaction de fixation du complément.
2. Est considéré comme indemne de brucellose un cheptel porcin dans lequel :
 - a) tous les porcs sont exempts de manifestations cliniques de la maladie depuis un an au moins ;
 - b) les bovins se trouvant en même temps dans l'exploitation appartiennent à un cheptel officiellement indemne ou à un cheptel indemne de brucellose.
3. Les tests prévus aux points 1 à 6 ne sont pas requis pour les animaux mâles castrés avant l'âge de quatre mois.

ANNEXE B

-

Normes en matière de fabrication et d'utilisation des tuberculines aviaires et bovines

1. Les tuberculinations contrôlées officiellement doivent être effectuées au moyen de tuberculines PPD ou HSCM.
2. Les normes de fabrication appliquées pour le contrôle des tuberculines bovines PPD et HSCM doivent être établies en unités communautaires de tuberculine (UCT), sur la base d'essais biologiques effectués avec la tuberculine standard communautaire appropriée.
3. Pour le contrôle des tuberculines aviaires, les normes de fabrication doivent être établies en unités internationales après essai biologique par rapport à la norme CEE pour la tuberculine PPD aviaire.
4. La norme CEE de la tuberculine PPD bovine est celle du Centraal Diergeneeskundig Instituut, afdeling Rotterdam, Pays-Bas.
5. La norme CEE de la tuberculine HSCM bovine est celle de l'Institut Pasteur de Paris, France.
6. La norme CEE de la tuberculine aviaire est celle du Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, Angleterre.
7. Les tuberculines bovines doivent être préparées avec une des souches de *Mycobacterium bovis* ci-après:
 - a) AN 5;
 - b) Vallee.
8. Les tuberculines aviaires doivent être préparées avec l'une des souches de *Mycobacterium avium* indiquées ci-après:
 - a) D 4 ER;
 - b) TB 56.
9. Le pH des tuberculines doit se situer entre 6,5 et 7,5.
10. Il doit avoir été établi, à la satisfaction de l'Institut d'Etat responsable du contrôle officiel de la tuberculine, que les agents conservateurs spécifiquement antimicrobiens ou autres substances qui peuvent avoir été ajoutés à la tuberculine n'altèrent ni l'innocuité ni l'efficacité du produit.
Les concentrations maximales autorisées sont les suivantes pour le phénol et le glycérol:
 - a) phénol: 0,5 % M/v;
 - b) glycérol: 10 % v/v.
11. A condition d'avoir été conservées à l'abri de la lumière, à une température comprise entre 2 et 8° C, les tuberculines peuvent être utilisées jusqu'à la fin des périodes suivantes après que le dernier test d'activité a été jugé satisfaisant:
 - a) tuberculines liquides PPD: deux ans,
tuberculines lyophilisées PPD: huit ans;
 - b) tuberculines HSCM diluées: deux ans.
12. Les instituts d'Etat désignés ci-après sont chargés du contrôle officiel des tuberculines dans leur pays respectif:

a) République fédérale d'Allemagne:	Paul-Ehrlich Institut, Francfort-sur-le-Main;
b) Belgique:	Institut d'hygiène et de l'épidémiologie, rue J. Wytsman 14, 1050 Bruxelles;
c) France:	Laboratoire national des médicaments vétérinaires, Fougères;
d) Grand-duché de Luxembourg:	Institut du pays fournisseur;
e) Italie:	Istituto superiore di sanità, Rome;
f) Pays-Bas:	Centraal Diergeneeskundig Instituut, afdeling Rotterdam;
g) Danemark:	Statens Veterinære Serumlaboratorium, Copenhague V;
h) Irlande:	institut du pays fournisseur
i) Royaume-Uni:	The Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey;
j) Grèce:	Ktiniatrikon Instituton Limodon Ke Parasitikon Nosimaton Iepa Odos, 75 Athènes, 301;
k) Espagne:	Laboratorio de Sanidad y Produccion Animal de Granada;
l) Portugal:	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária - Lisboa.
13. Le contrôle officiel doit être effectué sur chacun des lots de tuberculines mises en flacons et prêtes à l'emploi.
14. Le contrôle de tuberculines doit être effectué par des méthodes biologiques ainsi que par des méthodes chimiques.
15. Les tuberculines doivent être stériles. Les tests de stérilité doivent être effectués selon les prescriptions de la pharmacopée européenne.
16. Un contrôle visant à établir l'absence de toxicité ou de propriétés irritantes doit être effectué selon les prescriptions de la pharmacopée européenne.

17. Les tuberculines doivent être soumises à une analyse chimique permettant de déterminer la concentration de glycérol et/ou de phénol ainsi que la concentration de tout autre agent conservateur qui aurait pu être ajouté.
18. Une épreuve de non sensibilisation à la tuberculine doit être effectuée selon les spécifications de la pharmacopée européenne.
19. L'activité des tuberculines doit être appréciée par des méthodes biologiques. Ces méthodes doivent être utilisées pour les tuberculines HCSCM et PPD; elles sont fondées sur une comparaison entre les tuberculines standard et les tuberculines à tester.
20. La teneur en protéine de la tuberculine PPD doit être appréciée par la méthode de Kjeldahl. Le facteur de conversion de l'azote en tuberculo-protéine est de 6,25.
21. La tuberculine bovine HCSCM de norme CEE a une activité de 65.000 unités communautaires provisoires par ml et est présentée en ampoules de 5 ml.
22. La tuberculine bovine PPD de norme CEE a une activité de 50.000 unités communautaires de tuberculine (UCT) par mg de PPD et est présentée à l'état lyophilisé, en ampoules contenant 1,8 mg de PPD, c'est-à-dire que 0,00002 mg de PPD a une activité égale à une unité communautaire de tuberculine.
23. La tuberculine aviaire PPD de norme CEE a une activité de 50.000 unités internationales (UI) par mg de matière sèche du dérivé protéique purifié et est présentée à l'état lyophilisé en ampoules contenant 10 mg de PPD plus de 26,3 mg de sels, c'est-à-dire que 0,0000726 mg de standard a une activité égale à une unité internationale.
24. Les tuberculines soumises par les fabricants au contrôle des instituts d'Etat cités au point 12 doivent d'abord subir un contrôle de l'activité comportant un essai biologique, effectué par rapport aux standards appropriés indiqués aux points 2 et 3.
25. a) Contrôle d'activité sur les cobayes

On doit faire usage de cobayes albinos dont le poids doit être compris entre 400 et 600 g. Ces cobayes doivent être en bonne santé au moment de l'injection de la tuberculine. Le nombre de cobayes à utiliser pour chaque essai ne doit pas être inférieur à huit. L'essai ne devrait pas être réalisé moins d'un mois après la sensibilisation.

 - aa) Pour tester les tuberculines bovines, les cobayes seront sensibilisés selon l'une des méthodes suivantes:
 1. Injection de *Mycobacterium bovis* de souche AN 5, tués par la chaleur, dans un adjuvant huileux;
 2. Injection de *Mycobacterium bovis* de souche AN 5, vivants, dans une émulsion saline physiologique;
 3. Injection de vaccin BCG.
 - bb) Pour tester les tuberculines aviaires, la sensibilisation des cobayes doit se faire par une injection de 2 mg de bacilles tuberculeux tués par la chaleur, de type aviaire, en suspension dans environ 0,5 ml de paraffine liquide stérile ou par l'injection de bacilles tuberculeux vivants de type aviaire en émulsion saline physiologique. A cet effet, il y a lieu d'utiliser une souche de type aviaire D 4.
 - cc) Chaque tuberculine à contrôler doit être testée par rapport à la tuberculine standard appropriée à l'aide d'une injection intradermique, sur des groupes de cobayes convenablement sensibilisés. Les flancs des cobayes doivent avoir été rasés. L'essai doit être basé sur une comparaison entre les réactions provoquées par une série d'injections intracutanées de doses de 0,2 ml au plus de dilutions de tuberculine standard en solution saline isotonique tamponnée contenant 0,0005 % de Tween 80 et par une série correspondante d'injections de la tuberculine à tester. Les dilutions se feront selon les séries géométriques et seront injectées aux cobayes selon un carré latin aléatoire (quatre cases sur chaque côté d'un essai en huit points). Les diamètres des réactions dans chaque case doivent être mesurés et notés après 24 à 28 heures.

Pour chaque échantillon de tuberculine à tester, il y a lieu de faire une estimation de son activité relative selon la norme appropriée et de ses limites de fiabilité à l'aide de méthodes statistiques, en utilisant les diamètres des réactions et des logarithmes des doses comme métamètres. La tuberculine à tester est acceptable si son activité estimée garantit par doses bovines 2.000 unités communautaires de tuberculine (+ 25 %) dans les bovins. L'activité de chaque tuberculine doit être exprimée, selon le cas, en unités communautaires de tuberculine ou en unités internationales par ml.
- b) Contrôle d'activité sur les bovins

Un contrôle périodique de l'activité des tuberculines bovines peut être effectué sur des animaux atteints de tuberculose, naturellement ou artificiellement. Ces contrôles de l'activité sur les groupes de bovins tuberculeux doivent comporter une injection intradermique (en quatre ou six points) de la tuberculine à tester; ils se feront par rapport au standard adéquat et l'activité de la tuberculine sera estimée par des méthodes statistiques comme dans l'essai sur les cobayes.
26. L'étiquetage des récipients et des emballages de tuberculine doit répondre aux conditions suivantes. L'étiquette du récipient et l'étiquette de l'emballage doivent indiquer:
 - le nom de la préparation,
 - pour les préparations liquides, le volume total du récipient,
 - le nombre d'unités communautaires ou d'unités internationales par ml ou par mg,
 - le nom du fabricant,

- le numéro de lot,
 - la nature et la quantité du liquide de reconstitution pour les préparations lyophilisées.
- L'étiquette du récipient ou l'étiquette de l'emballage doit indiquer:
- la date de péremption,
 - les conditions de conservations,
 - la dénomination et, si possible, la proportion de toute substance ajoutée,
 - le type de bacille utilisé pour la préparation de la tuberculine.
27. Des laboratoires communautaires désignés conformément à l'article 3 seront chargés de l'examen complémentaire des tuberculines utilisées normalement sur le terrain dans les Etats membres pour garantir que l'activité de chacune de ces tuberculines est appropriée, compte tenu de la tuberculine standard communautaire adéquate. Ces analyses doivent être effectuées sur des bovins tuberculeux, sur des cobayes convenablement sensibilisés et par des essais chimiques appropriés.
28. Sont considérées comme intradermo-tuberculinations officielles:
- a) l'intradermo-tuberculation simple: cette tuberculation comporte une seule injection de tuberculine bovine;
 - b) l'intradermo-tuberculation de comparaison: cette tuberculation comporte une seule injection de tuberculine bovine et une seule injection de tuberculine aviaire, administrées simultanément.
29. La dose de tuberculine injectée sera:
- 1. 2.000 UCT au minimum de tuberculine bovine;
 - 2. 2.000 UI au minimum de tuberculine aviaire.
- Le volume de chaque injection ne dépassera pas 0,2 ml.
30. Les tuberculinations doivent être effectuées par injection de la ou des tuberculines dans la peau du cou. Les points d'injections seront situés à la limite du tiers antérieur et du tiers médian du cou. Si l'on injecte au même animal à la fois de la tuberculine aviaire et de la tuberculine bovine, le point d'injection de tuberculine aviaire doit être situé à quelque 10 cm. de la crête du cou et le point d'injection de tuberculine bovine doit se situer à 12,5 cm au-dessous d'une ligne plus au moins parallèle à la ligne de l'épaule ou en différents points du cou; chez les jeunes animaux où il n'est pas possible de séparer suffisamment les lieux d'injection sur un côté du cou, une injection sera faite de chaque côté du cou à des endroits identiques au centre du tiers médian du cou.
31. La technique de la tuberculation et l'interprétation des réactions seront les suivantes:
- a) Technique
Les zones d'injection seront rasées et nettoyées. Un pli de la peau dans chaque zone rasée sera pris entre l'index et le pouce et mesuré à l'aide d'un compas et noté. Une petite aiguille stérile, avec le bord biseauté à l'extérieur, reliée à une seringue graduée contenant de la tuberculine, sera introduite obliquement dans les couches les plus profondes de la peau. La dose de tuberculine sera ensuite injectée. L'injection bien faite donnera, à la palpation, un léger renflement de la grosseur d'un petit pois à chaque point d'injection. L'épaisseur du pli de la peau sur chaque point d'injection sera remesurée 72 heures après l'injection et notée.
 - b) Interprétation des réactions
L'interprétation des réactions se fondera sur l'observation clinique et sur l'accroissement ou les accroissements notés dans l'épaisseur du pli de la peau aux points d'injection, 72 heures après l'injection de la ou des tuberculines.
 - ba) Réaction négative: si l'on n'observe qu'un gonflement limité, avec un accroissement maximal de 2 mm de l'épaisseur du pli de la peau, sans signes cliniques tels que oedèmes diffus ou étendu, exsudation, nécrose, douleur ou réaction inflammatoire des lymphatiques de la région ou des ganglions.
 - bb) Réaction douteuse: si l'on n'observe aucun des signes cliniques indiqués sous ba), mais que l'augmentation d'épaisseur du pli de la peau soit supérieure à 2 mm et inférieure à 4 mm.
 - bc) Réaction positive: si l'on observe les signes cliniques indiqués sous ba) ou une augmentation d'épaisseur du pli de la peau de 4 mm ou plus à l'endroit de l'injection.
32. L'interprétation des intradermo-tuberculinations officielles est la suivante:
- a) Intradermo-tuberculation simple
Positive: réaction telle qu'elle est définie au point 31 sous bc).
Douteuse: réaction comme celle qui est définie au point 31 sous bb).
Négative: réaction telle qu'elle est définie au point 31 sous ba).
Les animaux chez qui l'intradermo-tuberculation simple a donné des résultats douteux seront soumis à une autre tuberculation après un délai minimal de 42 jours.
Les animaux chez qui cette seconde tuberculation ne donne pas de résultats négatifs doivent être considérés comme ayant réagi positivement à la tuberculation.
Les animaux positifs à l'intradermo-tuberculation intradermique simple peuvent être soumis à une intradermo-tuberculation de comparaison.
 - b) Intradermo-tuberculation de comparaison pour la détermination et le maintien de la qualification de troupeau officiellement indemne de tuberculose.
Positive: réaction bovine supérieure de plus de 4 mm à la réaction aviaire ou présence de signes cliniques.

Douteuse: réaction bovine positive ou douteuse et supérieure de 1 à 4 mm à la réaction aviaire et absence de signes cliniques.

Négative: réaction bovine négative ou réaction bovine positive ou douteuse mais égale ou inférieure à une réaction aviaire positive ou douteuse et absence de signes cliniques dans les deux cas.

Les animaux chez qui l'intradermo-tuberculation de comparaison a donné des résultats douteux doivent être soumis à une autre tuberculation après un délai minimal de 42 jours. Les animaux chez qui cette seconde tuberculation ne donne pas de résultats négatifs seront considérés comme ayant réagi positivement à la tuberculation.

- c) La qualification de troupeau officiellement indemne de tuberculose peut être suspendue jusqu'à ce que le statut des animaux suivants ait été réglé:

1. animaux qui ont été considérés comme ayant eu une réaction douteuse à l'intradermo-tuberculation simple;
2. animaux qui ont été considérés comme ayant réagi positivement à l'intradermo-tuberculation simple, mais qui doivent être testés à nouveau par intradermo-tuberculation de comparaison;
3. animaux qui ont été considérés comme ayant eu une réaction douteuse à l'intradermo-tuberculation de comparaison.

33. Les animaux destinés au commerce intracommunautaire seront soumis à une intradermo-tuberculation simple dans les trente jours avant tout mouvement. Les animaux sur lesquels on observe une augmentation du pli de la peau de plus de 2 mm ou des signes cliniques ne peuvent être admis dans les échanges intracommunautaires.

Les animaux provenant des cheptels visés au point 32 sous c) sont exclus des échanges intracommunautaires jusqu'à ce que l'état sanitaire des animaux qui y sont visés ait été éclairci.

ANNEXE C

—

Brucellose

A. Séro-agglutination

1. Le sérum agglutinant standard doit être conforme au sérum étalon préparé par le Veterinary Laboratory, à Weybridge, Surrey, Angleterre.
L'ampoule doit contenir 1.000 unités internationales (UI) agglutinantes provenant de la lyophilisation de 1 millilitre de sérum bovin.
2. La fourniture du sérum standard doit être assurée par le Bundesgesundheitsamt, à Berlin.
3. Le taux des agglutines brucelliques d'un sérum doit être exprimé en unités internationales par millilitre (par exemple: sérum X = 80 unités internationales par millilitre).
4. La lecture de la séro-agglutination lente en tubes doit se faire à 50 ou à 75 % d'agglutination, l'antigène utilisé devant avoir été titré dans des conditions identiques en présence de sérum standard.
5. L'agglutinabilité des divers antigènes à l'égard du sérum standard doit être comprise dans les limites suivantes:
 - si la lecture est faite à 50%: entre $1/_{400}$ et $1/_{1000}$,
 - si la lecture est faite à 75%: entre $1/_{80}$ et $1/_{750}$.
6. Pour la préparation de l'antigène destiné à la séro-agglutination en tubes (méthode lente), les souches Weybridge n° 99 et USDA 1119 ou toute autre souche de sensibilité équivalente doivent être utilisées.
7. Les milieux de culture utilisés tant pour l'entretien de la souche en laboratoire que pour la production de l'antigène doivent être choisis de manière qu'ils ne favorisent pas la dissociation bactérienne (S – R); de préférence, on doit employer la gélose à la pomme de terre.
8. L'émulsion bactérienne doit être faite au sérum physiologique (NaCl 8,5‰ phénique à 0,5 %. Le formol ne doit pas être employé.
9. Les instituts officiels indiqués ci-après doivent être chargés du contrôle officiel des antigènes:

a) Allemagne:	Bundesgesundheitsamt, Berlin;
b) Belgique:	Institut national de recherches vétérinaires, Bruxelles;
c) France:	Laboratoire central de recherches vétérinaires, Alfort;
d) Grand-duché de Luxembourg:	Institut du pays fournisseur;
e) Italie:	Istituto superiore di sanità, Rome;
f) Pays-Bas:	Centraal Diergeneeskundig Instituut afdeling, Rotterdam;
g) Danemark:	Statens Veterinære Serumlaboratorium, Copenhague V;
h) Irlande:	The Veterinary Research Laboratory, Department of Agriculture and Fisheries, Thorndale, Beaumont Road, Dublin 9;
i) Royaume-Uni:	
— Grande-Bretagne:	The Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, Angleterre;
— Irlande du Nord:	The Veterinary Research Laboratory, Stormont, Belfast;
j) Grèce:	Ktiniatrikon Institutouon Limodon Ke Parasitikon Nosimaton Iepa Odos, 75 Athènes 301;
k) Espagne:	Centro Nacional de Brucelosis de Murcia;
l) Portugal:	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária – Lisboa.

10. Les antigènes peuvent être livrés à l'état concentré pour autant que le facteur de dilution à utiliser soit mentionné sur l'étiquette du flacon.
11. Pour effectuer une séro-agglutination, on doit préparer au moins trois dilutions pour chaque sérum. Les dilutions du sérum suspect doivent être effectuées de telle manière que la lecture de la réaction à la limite d'infection se fasse dans le tube médian. En cas de réaction positive dans ce tube, le sérum suspect contient donc au moins la quantité de 30 unités internationales agglutinantes par millilitre.

B. Réaction de fixation du complément

1. Le sérum standard est le même que celui figurant à la présente annexe au point A 1. Outre sa teneur en unités internationales agglutinantes, 1 millilitre de ce sérum bovin lyophilisé doit contenir 1.000 unités sensibilisatrices assurant la fixation du complément. Ces unités sensibilisatrices sont appelées unités CEE sensibilisatrices.
2. La fourniture du sérum standard doit être assurée par le Bundesgesundheitsamt de Berlin.
3. Le taux d'un sérum en anticorps fixateurs du complément doit être exprimé en unités CEE sensibilisatrices (par exemple: sérum X = 60 unités CEE sensibilisatrices par millilitre).
4. Un sérum contenant 20 unités CEE sensibilisatrices ou plus (soit une activité égale à 20‰ de celle du sérum standard) par millilitre doit être considéré comme positif.
5. Les sérums doivent être inactivés de la façon suivante:
 - a) sérum bovin: 56 à 60° C pendant 30 à 50 minutes;
 - b) sérum porcin: 60° C pendant 30 à 50 minutes.
6. Pour la préparation de l'antigène, les souches Weybridge n° 99 ou USDA 1119 doivent être utilisées. L'antigène représente une suspension bactérienne dans un sérum physiologique à 0,85 % ou dans une solution tampon véronal.
7. Pour effectuer la réaction, il convient d'utiliser une dose de complément supérieure au minimum nécessaire pour une hémolyse totale.
8. Lorsqu'on effectue la réaction de fixation du complément, il est nécessaire de procéder chaque fois aux contrôles suivants:
 - a) contrôle de l'effet anticomplémentaire du sérum;
 - b) contrôle de l'antigène;
 - c) contrôle des hématies sensibilisées;
 - d) contrôle du complément;
 - e) contrôle à l'aide d'un sérum positif, de la sensibilité au déclenchement de la réaction;
 - f) contrôle de la spécificité de la réaction à l'aide d'un sérum négatif.
9. La surveillance et le contrôle officiel des sérums standard et des antigènes sont assurés par les organismes visés au point A 9 de la présente annexe.
10. Les antigènes peuvent être livrés à l'état concentré, pour autant que le facteur de dilution à utiliser soit mentionné sur l'étiquette du flacon.

C. Epreuve de l'anneau

1. L'épreuve de l'anneau doit être exécutée sur le contenu de chaque bidon de lait ou le contenu de chaque citerne à lait de l'exploitation.
2. L'antigène standard à utiliser doit provenir d'un des instituts nommés au point A. 9 a) à j). Il est conseillé de procéder à la standardisation des antigènes selon les recommandations de l'OMS/FAO.
3. L'antigène ne peut être coloré qu'à l'hématoxyline ou au tétrazolium: il faut donner la préférence à l'hématoxyline.
4. Si aucune mesure de conservation n'est prise, la réaction doit être pratiquée entre la 18^{me} et la 24^{me} heure à compter du prélèvement de l'échantillon sur la vache. Si l'épreuve est effectuée plus de 24 heures après le prélèvement de l'échantillon de lait, il faut assurer la conservation de celui-ci; les agents conservateurs pouvant être utilisés sont le formol et le chlorure mercurique et le délai dans lequel l'épreuve doit être effectuée après l'utilisation d'un de ces deux agents conservateurs est de 14 jours suivant le jour du prélèvement. En cas d'utilisation de formol, la dilution finale dans l'échantillon de lait est de 0,2%; la proportion entre la quantité de lait et la solution de formol doit être d'au moins 10 à 1. A la place du formol, on peut utiliser du chlorure mercurique: la dilution finale dans le lait est alors de 0,2% et la proportion entre la quantité de lait et la solution de chlorure mercurique de 10 à 1.
5. La réaction doit être pratiquée selon une des méthodes suivantes:
 - sur une colonne de lait d'au moins 25 mm de haut et un volume de lait d'1 ml additionné de 0,03 ml d'un des antigènes standardisés colorés;
 - sur une colonne de lait d'au moins 25 mm de haut et un volume de lait d'1 ml additionné de 0,05 ml d'un des antigènes standardisés colorés;
 - sur une colonne de lait d'au moins 8 ml additionné de 0,08 ml d'un des antigènes standardisés colorés;
 - sur une colonne de lait d'au moins 25 mm de haut et un volume de lait de 2 ml additionné de 0,05 ml d'un des antigènes standardisés colorés;
6. Le mélange de lait et d'antigène doit être mis à l'étuve à 37°C pendant 45 minutes au moins et 60 minutes au plus. L'évaluation doit avoir lieu dans un délai de 15 minutes à compter de la sortie de l'étuve;
7. La réaction est appréciée selon les critères suivants:

- a) réaction négative: lait coloré, crème décolorée;
- b) réaction positive: lait et crème colorés de façon identique ou lait décoloré et crème colorée.

D. Epreuve à l'antigène brucellique tamponné

L'épreuve à l'antigène brucellique tamponné peut être réalisée selon l'une des méthodes suivantes

a) Méthode manuelle

1. Le sérum standard est le deuxième sérum standard international contre l'avortement brucellique fourni par le Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, Angleterre.
2. L'antigène est préparé sans référence à la concentration cellulaire, mais sa sensibilité doit être étalonnée par rapport au deuxième sérum standard international contre l'avortement brucellique de manière à ce que l'antigène produise une réaction positive pour une dilution de sérum de 1:47,5 et une réaction négative pour une dilution de 1:55.
3. L'antigène est mis en suspension dans du diluant à l'antigène brucellique tamponné de pH 3,65 + 0,5 et peut avoir été marqué au moyen d'une teinture au rose de Bengale.
4. Pour préparer l'antigène, utiliser la souche n° 99 de Weybridge ou la souche USDA 1119 ou toute souche de sensibilité équivalente.
5. Les milieux de culture utilisés pour conserver la souche en laboratoire et pour produire l'antigène doivent ne pas provoquer de dissociation bactérienne (S – R); utiliser de la gélose à la pomme de terre ou des méthodes de culture continue.
6. L'antigène est testé au moyen de 8 sérums séchés par procédé frigorifique, dont on sait qu'ils sont respectivement positifs et négatifs.
7. La surveillance et le contrôle officiels du sérum et de l'antigène standard sont effectués par les instituts officiels énumérés à l'annexe C point A 9.
8. L'antigène est fourni prêt à l'emploi.
9. L'épreuve à l'antigène brucellique tamponné doit être réalisée de la manière suivante:
 - a) mettre une goutte (0,03 ml) d'antigène et une goutte (0,03 ml) de sérum sur une plaque blanche;
 - b) à l'aide d'un agitateur mélanger d'abord sur une ligne droite puis dans un mouvement circulaire d'un diamètre de 10 à 12 mm environ;
 - c) agiter ensuite la plaque alternativement en avant et en arrière pendant 4 minutes (environ 30 mouvements par minute);
 - d) effectuer la lecture sous un bon éclairage; en l'absence d'agglutination l'épreuve est considérée comme négative; toute agglutination permet de considérer l'épreuve comme positive, à moins que le séchage soit excessif sur les bords.

b) Méthode automatisée

La méthode automatisée doit être au moins aussi sensible que la méthode manuelle.

E. Epreuve de l'anneau de lait effectuée sur le plasma sanguin

a) Obtention du plasma sanguin

Les éprouvettes contenant le sang rendu incoagulable par adjonction d'EDTA sont centrifugées pendant 3 minutes à 3000 tours/minute et sont ensuite conservées pendant 12 à 24 heures à une température de 37° C;

b) Utilisation diagnostique

On verse 0,2 ml de plasma stabilisé dans une éprouvette contenant 1 ml de lait cru. Après agitation, on ajoute une goutte (0,05 ml) d'antigène ABR et on agite à nouveau. L'antigène est normalisé d'après un antigène standard mis à disposition par l'institut visé au point A 9 a).

Après avoir laissé reposer pendant 45 minutes à une température de 37° C, on examine le résultat dans un délai de 15 minutes. L'épreuve est considérée comme positive si l'anneau de lait présente la même coloration ou une coloration plus prononcée que celle de la colonne de lait.

F. Agglutination du plasma sanguin

Le plasma sanguin obtenu conformément à la méthode visée à la section E point a) peut être utilisé immédiatement après centrifugation sans qu'il soit nécessaire de procéder à une stabilisation thermique.

On mélange 0,05 ml de plasma à 1 ml d'antigène pour la séro-agglutination à 50%, ce qui correspond à un degré de dilution de 1:20 dans le cas de la séro-agglutination. On examine le résultat après avoir laissé reposer pendant 18 à 24 heures à une température de 37° C. L'épreuve est considérée comme positive si l'agglutination est égale ou supérieure à 50%.

G. Epreuve de micro-agglutination

1. Les diluants sont composés d'une solution saline physiologique à 0,85% phénolée à 0,5%.
2. L'antigène est préparé conformément aux indications des points 6, 7 et 8 de l'annexe C point A et le titrage doit être effectué conformément aux indications du point A. 5 de l'annexe C. Au moment de l'utilisation de l'antigène, on ajoute de la safranine O à 0,02% (dilution finale).
3. Le sérum standard est le même que celui du point A.1 de l'annexe C.
4. La fourniture du sérum standard doit être assurée par le Bundesgesundheitsamt, Berlin.

5. L'épreuve de micro-agglutination est pratiquée sur des plaques comportant des cupules à fond conique et dont le volume est égal à 0,250 ml. L'épreuve est exécutée de la manière suivante:
- Prédilutions des sérums: on ajoute dans chaque cupule contenant 0,075 ml de diluant 0,050 ml de chaque sérum en examen. Les mélanges sont agités pendant 30 secondes.
 - Dilutions graduelles des sérums: préparer au moins trois dilutions pour chaque sérum. A cet effet, à partir des prédilutions (1:2,5) on prélève 0,025 ml de chaque sérum et on les transfère sur une plaque contenant 0,025 ml de diluant. De cette manière, la première dilution est portée à la valeur de 1:5 et les dilutions suivantes sont effectuées par redoublement.
 - Ajout de l'antigène: on ajoute dans chaque cupule contenant les différentes dilutions des sérums en examen de l'antigène à raison de 0,025 ml. Après agitation pendant 30 secondes, les plaques sont fermées par leur couvercle respectif et sont placées à 37° C pendant 20 à 24 heures en atmosphère humidifiée.
 - Lecture des résultats: on évalue l'aspect de la sédimentation de l'antigène par un examen du fond de la cupule réfléchi par un miroir concave placé au-dessous de celle-ci. En cas de réaction négative, l'antigène forme des sédiments sous forme d'un bouton compact, aux bords nets et de couleur rouge intense. En cas de réaction positive, par contre, il se forme un voile diffus, de couleur rose et uniformément réparti. Les différents pourcentages d'agglutination sont déterminés par comparaison avec des contrôles de l'antigène indiquant 0, 25, 50, 75 et 100 % d'agglutination. Le titre de chaque sérum est exprimé en unités internationales agglutinantes par ml. Il convient d'inclure dans l'épreuve des contrôles à l'aide de sérum négatif et de sérum positif dilué de façon à contenir 30 unités internationales agglutinantes par ml.

H. L'épreuve ELISA de dépistage de la brucellose bovine, décrite à l'annexe G.

ANNEXE D

Analyse du lait

- Toutes les analyses de lait doivent être effectuées dans des laboratoires officiels ou officiellement agréés.
- Les échantillons de lait doivent être prélevés en observant les conditions suivantes:
 - les rayons doivent être désinfectés au préalable avec de l'alcool à 70 %;
 - pendant leur remplissage, les tubes doivent être maintenus en position inclinée;
 - les échantillons de lait doivent être prélevés au début de la traite, après élimination des premiers jets de chaque trayon;
 - un échantillon doit être prélevé sur chaque quartier; les laits de ces échantillons ne peuvent pas être mélangés;
 - chaque échantillon doit comporter au moins 10 millilitres de lait;
 - si un agent conservateur est nécessaire, on doit utiliser l'acide borique à 0,5 %;
 - chaque tube doit être muni d'une étiquette portant les indications suivantes:
 - le numéro de la marque auriculaire ou tout autre moyen d'identification de l'animal,
 - la désignation du quartier,
 - la date et l'heure du prélèvement;
 - les échantillons sont accompagnés d'un document qui doit comporter les indications suivantes:
 - le nom et l'adresse du vétérinaire officiel,
 - le nom et l'adresse du propriétaire,
 - les éléments d'identification de l'animal,
 - le stade de lactation.
- L'analyse du lait doit être pratiquée 30 jours au plus avant l'embarquement et doit toujours comporter un examen bactériologique ainsi qu'un White-Side-Test (WST) ou un California-Mastitis-Test (CMT). Les résultats de ces deux examens doivent être négatifs, sous réserve des dispositions suivantes.
 - Si le résultat de l'examen bactériologique est positif – même en l'absence d'un état inflammatoire caractérisé – alors que le résultat du WST (ou du CMT) est négatif, un second examen bactériologique doit être effectué au moins 10 jours plus tard – dans la limite de 30 jours prévue ci-dessus. Ce second examen doit établir:
 - la disposition des germes pathogènes;
 - l'absence d'antibiotiques.
 En outre, l'absence d'état inflammatoire doit être constatée par un nouveau WST (ou un nouveau CMT) qui doit donner un résultat négatif.
 - Si l'examen bactériologique est négatif, alors que le WST (ou le CMT) est positif, on doit procéder à un examen cytologique complet qui doit donner un résultat négatif.

4. L'examen bactériologique doit comporter:

- a) l'ensemencement du lait, en boîte de Petri, sur gélose au sang de boeuf ou de mouton;
- b) l'ensemencement du lait en milieu TKT ou en milieu d'Edwards.

L'examen bactériologique doit viser à l'identification de tout germe pathologique et ne peut se limiter à la mise en évidence de streptocoques et de staphylocoques spécifiquement pathogènes. Dans ce but, l'identification des colonies suspectes obtenues par ensemencement sur les milieux précités doit être poursuivie par les techniques classiques de différenciation de la bactériologie, telles que l'emploi du milieu de Chapman pour l'identification des staphylocoques et de divers milieux sélectifs pour la détection des entérobactéries.

5. L'examen cytologique complet est destiné à mettre en évidence, le cas échéant, un état inflammatoire caractérisé, indépendamment de tout symptôme clinique.

Cet état inflammatoire est établi lorsque la numération leucocytaire selon la technique de Breed atteint 1 million de leucocytes par millilitre et que le rapport entre mononucléaires et polynucléaires est inférieur à 0,5.

ANNEXE E

—

Sont soumises à déclaration obligatoire les maladies suivantes:

a) maladies de l'espèce bovine:

- rage,
- tuberculose,
- brucellose,
- fièvre aphteuse,
- charbon bactérien,
- peste bovine,
- péripneumonie,
- leucose bovine enzootique;

b) maladies de l'espèce porcine:

- rage,
- brucellose,
- charbon bactérien,
- fièvre aphteuse,
- peste porcine classique,
- peste porcine africaine,
- maladie vésiculeuse du porc,
- paralysie contagieuse des porcs (maladie de Teschen).

ANNEXE F

Des modèles de certificats sont mis à la disposition des intéressés par l'Administration des services vétérinaires.

ANNEXE G

«CHAPITRE PREMIER

CHEPTELS, ÉTATS MEMBRES OU RÉGIONS INDEMNES DE LEUCOSE BOVINE ENZOOTIQUE

A. Cheptel indemne de leucose bovine enzootique:

1) un cheptel dans lequel:

- i) aucun cas de leucose bovine enzootique n'a été mis en évidence, que ce soit cliniquement ou à la suite de l'un des tests pratiqués conformément au chapitre II, ni confirmé au cours des deux dernières années

et

- ii) tous les animaux de plus de vingt-quatre mois ont antérieurement réagi négativement au cours des douze derniers mois à deux tests pratiqués conformément à la présente annexe, à un intervalle de quatre mois au moins

et

- iii) après achèvement des tests visés au point ii), ne se trouvent plus que les animaux qui y sont nés ou qui proviennent d'un cheptel indemne de leucose bovine enzootique,

et dans lequel, après sa qualification, les animaux de plus de vingt-quatre mois ont continué de réagir négativement à l'un des tests pratiqués conformément au chapitre II à un intervalle de trois ans et les conditions prévues aux points i) et iii) continuent d'être remplies;

- 2) un cheptel situé dans un État membre ou une région indemne de leucose bovine enzootique.

B. État membre ou région indemne de leucose bovine enzootique .

Un État membre ou une région au sens de l'article 2 point o) de cet État membre:

- 1) dans lequel ou laquelle:

- a) au moins 99,8 % des cheptels bovins sont des cheptels indemnes de leucose bovine enzootique au sens du point s)

ou

- b) d'une part, au cours des cinq dernières années précédant la date de notification de la présente directive ou au cours des trois dernières années après cette date, aucun cas de leucose bovine enzootique n'a été notifié ni confirmé de quelque manière que ce soit et, d'autre part, au cours des deux dernières années:

- i) les contrôles aléatoires pratiqués sur tout le territoire conformément au chapitre II et effectués pendant une période de deux ans sur tous les animaux de plus de vingt-quatre mois dans au moins 10 % des cheptels ont donné des résultats négatifs

et

- ii) tous les animaux de plus de vingt-quatre mois ont réagi négativement au moins une fois à l'un des tests prévus au chapitre II;

- 2) dans lequel ou laquelle, après avoir satisfait aux conditions prévues au point 1):

- i) chaque année, soit un échantillon aléatoire donnant un taux de certitude de 99 % a démontré que moins de 0,2 % des cheptels étaient infectés, soit au moins 20 % des bovins de plus de deux ans a donné un résultat négatif à un des tests pratiqués conformément au chapitre II

et

- ii) les conditions énoncées au point A 1) sont toujours remplies.

C. Suspension du statut d'indemne après l'apparition de la leucose

- 1) Au cas où, dans un cheptel indemne de leucose bovine enzootique, un animal a réagi positivement à l'un des tests visés sous ii), le statut de ce cheptel est suspendu jusqu'à ce que les mesures suivantes aient été prises:

- i) l'animal ayant réagi positivement et, s'il s'agit d'une vache, son éventuel veau doivent quitter le cheptel pour abattage, sous contrôle des autorités vétérinaires;

- ii) les animaux restants ont été soumis avec un résultat négatif à un test sérologique individuel effectué conformément au chapitre II trois mois au moins après élimination de l'animal positif et de sa descendance éventuelle;

- iii) une enquête épidémiologique doit être menée et les cheptels épidémiologiquement reliés au cheptel infecté doivent être soumis aux mesures prévues sous ii).

Toutefois, l'autorité compétente peut accorder une dérogation à l'obligation d'abattage du veau d'une vache infectée lorsque ce veau a été séparé de sa mère après vêlage. Dans ce cas, le veau doit être soumis aux exigences prévues au point 2 sous ii).

- 2) Au cas où plus d'un animal d'un cheptel indemne de leucose bovine enzootique a réagi positivement, le statut de ce cheptel est suspendu jusqu'à ce que les mesures suivantes aient été prises:

- i) les animaux infectés et, s'il s'agit d'une vache infectée — sauf dérogation accordée par l'autorité compétente conformément au point 1) sous iii) deuxième alinéa —, leurs veaux éventuels doivent quitter le cheptel pour abattage sous contrôle des autorités vétérinaires;

- ii) les animaux restants — y inclus, le cas échéant, les veaux des animaux infectés — de moins de six mois doivent, après identification, rester sur l'exploitation jusqu'à ce qu'ils aient satisfait aux tests visés au point A 1) sous ii);

- iii) le cheptel doit rester sous contrôle officiel jusqu'à ce que les conditions prévues aux points A 1) sous ii) et iii) soient à nouveau remplies;

- iv) une enquête épidémiologique doit être menée et les cheptels épidémiologiquement reliés au cheptel infecté doivent être soumis aux mesures prévues au point A 1) sous ii).

- 3) Au cas où la leucose bovine enzootique a été constatée et confirmée sur plus de 0,2 % des cheptels de la région ou de l'État membre, le statut de cette région ou de cet État membre est suspendu et, outre les mesures prévues aux points 1) ou 2), 20 % des autres cheptels de la région ou de l'État membre doivent, dans les délais prévus au point A 1) sous ii), être soumis à un des tests prévus au chapitre II.

Le statut est rétabli lorsque, après achèvement des mesures prévues sous les points précédents, un résultat négatif aux tests qui y sont prévus a été constaté.

CHAPITRE II

Epreuves pour la recherche de la leucose bovine enzootique et de la brucellose bovine

La recherche de la leucose bovine enzootique est effectuée au moyen de l'épreuve d'immunodiffusion dans les conditions décrites aux points A et B ci-après ou par l'épreuve d'immuno-absorption enzymatique (ELISA) dans les conditions décrites au point C ci-après. La méthode d'immunodiffusion est réservée aux tests individuels.

Si les résultats des tests font l'objet d'une contestation motivée, un contrôle complémentaire est pratiqué au moyen d'une épreuve d'immunodiffusion.

A. Épreuves d'immunodiffusion sur plaque de gélosé

1. L'antigène à utiliser dans cette épreuve doit contenir des glycoprotéines du virus de la leucose bovine. L'antigène doit être standardisé par rapport à un sérum étalon (sérum E I) fourni par le Statens Veterinære Serum Laboratorium de Copenhague.
2. Les instituts d'États désignés ci-après doivent être chargés d'étalonner l'antigène standard de travail du laboratoire par rapport au sérum étalon officiel CEE (sérum E I) fourni par le Statens Veterinære Serum Laboratorium de Copenhague.

a) Allemagne (RF):	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen;
b) Belgique:	Institut national de recherches vétérinaires, Bruxelles;
c) France:	Laboratoire national de pathologie bovine, Lyon;
d) Grand-duché de Luxembourg:	—
e) Italie:	Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Perugia;
f) Pays-Bas:	Centraal Diergeneeskundig Instituut, afdeling Rotterdam;
g) Danemark:	Statens Veterinære Serum Laboratorium, København;
h) Irlande:	Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Dublin;
i) Royaume-Uni:	
1. Grande-Bretagne:	Central Veterinary Laboratory, Weybridge, England;
2. Irlande du Nord:	Veterinary Research Laboratory, Stormont, Belfast;
j) Espagne:	Subdirección general de sanidad animal. Laboratorio de sanidad y producción animal ALGETE (Madrid).
k) Portugal:	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Lisboa.
3. Les antigènes étalons utilisés au laboratoire doivent être présents au moins une fois par an aux laboratoires de référence CEE énumérés au paragraphe 2 ci-dessus pour y être testés par rapport au sérum étalon CEE. Indépendamment de cette standardisation, l'antigène utilisé peut être étalonné conformément à la lettre B.
4. L'épreuve met en œuvre les réactifs suivants:
 - a) antigène: l'antigène doit contenir des glycoprotéines spécifiques du virus de leucose bovine enzootique qui a été standardisé par rapport au sérum officiel CEE;
 - b) le sérum à tester;
 - c) un sérum de contrôle positif connu;
 - d) gélose;
 - 0,8 % agar
 - 8,5 % NaCl
 - tampon Tris 0,05 M, pH 7,2
 15 millilitres de cette gélose doivent être coulés dans une boîte de Petri de 85 millimètres de diamètre, ce qui donne une profondeur de 2,6 millimètres de gélose.

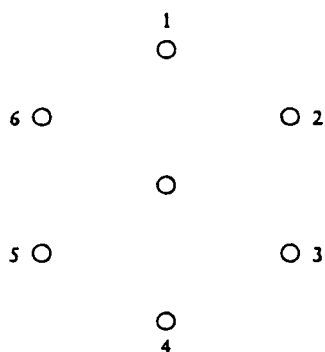
5. Un dispositif expérimental de sept loges exemptes d'humidité doit être réalisé par perforation de la gélose jusqu'au fond de la plaque; ce réseau consiste en une loge centrale autour de laquelle s'ordonnent six loges périphériques disposées en cercle.

Diamètre de la loge centrale: 4 millimètres

Diamètre des loges périphériques: 6 millimètres

Distance entre les loges centrales et périphériques: 3 millimètres

6. La loge centrale doit être remplie de l'antigène étalon. Les loges périphériques 1 et 4 (voir schéma ci-dessous) sont remplies avec le sérum positif connu, les loges 2, 3, 5 et 6 avec les sérums à tester. Les loges doivent être emplies jusqu'à disparition du ménisque.



7. Les quantités obtenues sont les suivantes:

antigène: 32 microlitres,

sérum de contrôle: 73 microlitres,

sérum à tester: 73 microlitres.

8. L'incubation doit durer 72 heures à température ambiante (20-27 °C) dans une enceinte humide fermée.
9. L'épreuve peut être lue après 24 heures, puis après 48 heures, mais aucun résultat final ne peut être obtenu avant 72 heures:
- un sérum à tester est positif s'il forme une courbe de précipitation, spécifique avec l'antigène du virus de la leucose bovine et si cette courbe coïncide avec celle du sérum de contrôle;
 - un sérum à tester est négatif s'il ne donne pas une courbe de précipitation spécifique avec l'antigène du virus de la leucose bovine et s'il n'infléchit pas la courbe du sérum de contrôle;
 - la réaction ne pourrait être considérée comme concluante si:
 - elle infléchit la courbe du sérum de contrôle vers la loge de l'antigène du virus de la leucose bovine sans former une courbe de précipitation visible avec l'antigène
 - ou
 - s'il n'est pas possible de l'interpréter comme négative ou comme positive.
- Pour les réactions non concluantes, on peut répéter l'épreuve et utiliser du sérum concentré.

B. Méthode de standardisation de l'antigène

Solutions et matériels nécessaires

- 40 millilitres de gélose à 1,6 % dans un tampon Tris 0,05 M/HCl, pH 7,2 avec 8,5 % de NaCl;
- 15 millilitres d'un sérum de leucose bovine n'ayant d'anticorps qu'à l'égard des glycoprotéines du virus de la leucose bovine, sérum dilué au 1/10 dans un tampon Tris 0,05 M/HCl, pH 7,2 avec 8,5 % de NaCl;
- 15 millilitres d'un sérum de la leucose bovine n'ayant d'anticorps qu'à l'égard des glycoprotéines du virus de la leucose bovine, sérum dilué au 1/15 dans un tampon Tris 0,05 M/HCl, pH 7,2 avec 8,5 % de NaCl;
- quatre boîtes de Petri en matière plastique, d'un diamètre de 85 millimètres;
- un poinçon d'un diamètre de 4 à 6 millimètres;
- un antigène de référence;
- l'antigène à standardiser;
- un bain d'eau chaude (56 °C).

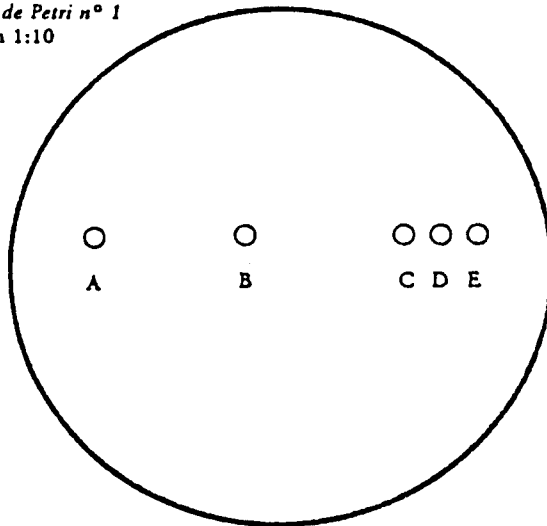
Mode opératoire

Dissoudre la gélose (1,6 %) dans le tampon Tris/HCl en chauffant avec précaution jusqu'à 100 °C. Mettre en place le bain d'eau à 56 °C pour environ 1 heure. Placer en outre les solutions du sérum de la leucose bovine dans le bain d'eau à 56 °C.

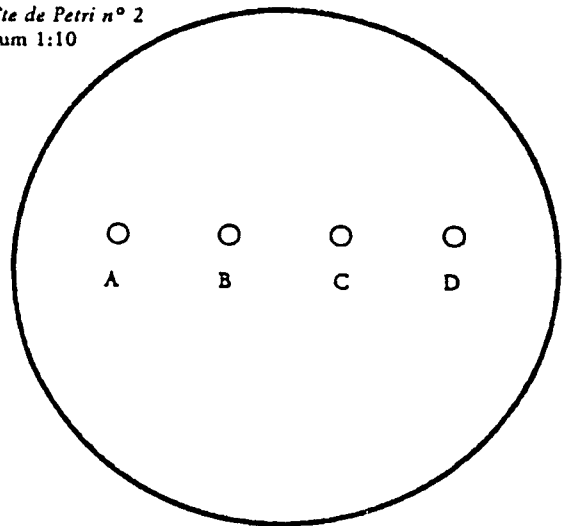
Mélanger ensuite 15 millilitres de la solution de gélose à 56 °C avec les 15 millilitres de sérum de la leucose bovine (1:10), agiter rapidement et verser dans deux boîtes de Petri, à raison de 15 millilitres par boîte. Recommencer les opérations précédemment décrites avec le sérum de la leucose bovine dilué au 1/5.

Lorsque la gélose a durci, les trous y sont pratiqués de la manière suivante:

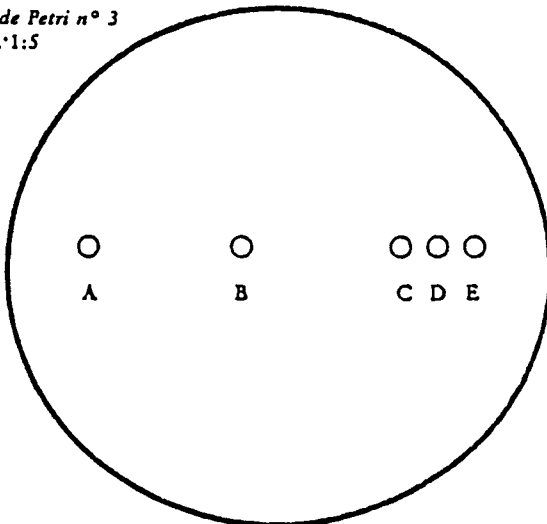
Boîte de Petri n° 1
Sérum 1:10



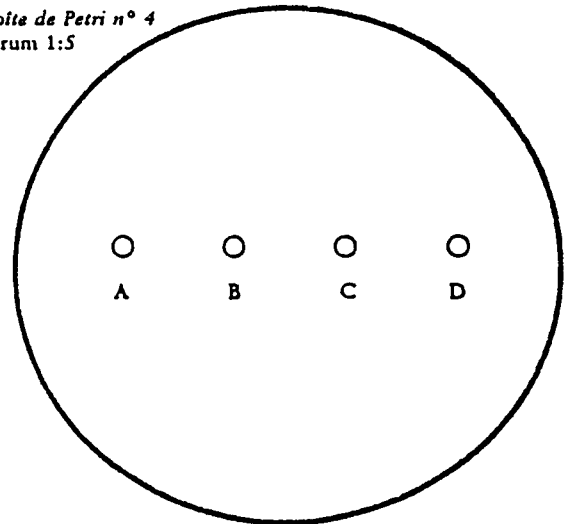
Boîte de Petri n° 2
Sérum 1:10



Boîte de Petri n° 3
Sérum 1:5



Boîte de Petri n° 4
Sérum 1:5



Addition d'antigènes

I. Boîtes de Petri n° 1 et 3:

- logé A = antigène de référence non dilué,
- logé B = antigène de référence dilué à 1/2,
- loges C + E = antigènes de référence,
- logé D = antigènes à tester, non dilué.

II. Boîtes de Petri n° 2 et 4:

- logé A = antigène à tester, non dilué,
- logé B = antigène à tester, dilué à 1/2,
- logé C = antigène à tester, dilué à 1/4,
- logé D = antigène à tester, dilué à 1/8.

Instructions complémentaires

1. L'expérience doit être effectuée avec deux degrés de dilution du sérum (1:5 et 1:10) afin d'obtenir la précipitation optimale.
2. Si le diamètre de précipitation est trop faible pour chacun des deux degrés de dilution, le sérum doit faire l'objet d'une dilution supplémentaire.
3. Si le diamètre de précipitation est excessif pour les deux degrés de dilution et si le précipité disparaît, un degré de dilution plus faible doit être choisi pour le sérum.
4. La concentration finale de la gélose doit s'établir à 0,8 % et celle des sérums à 5 % et à 10 % respectivement.
5. Noter les diamètres mesurés dans le système coordonné suivant. La dilution de travail est celle où on enregistre le même diamètre pour l'antigène à tester que pour l'antigène de référence.

Diamètre

mm

13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1

1:1

1:2

1:3

1:4

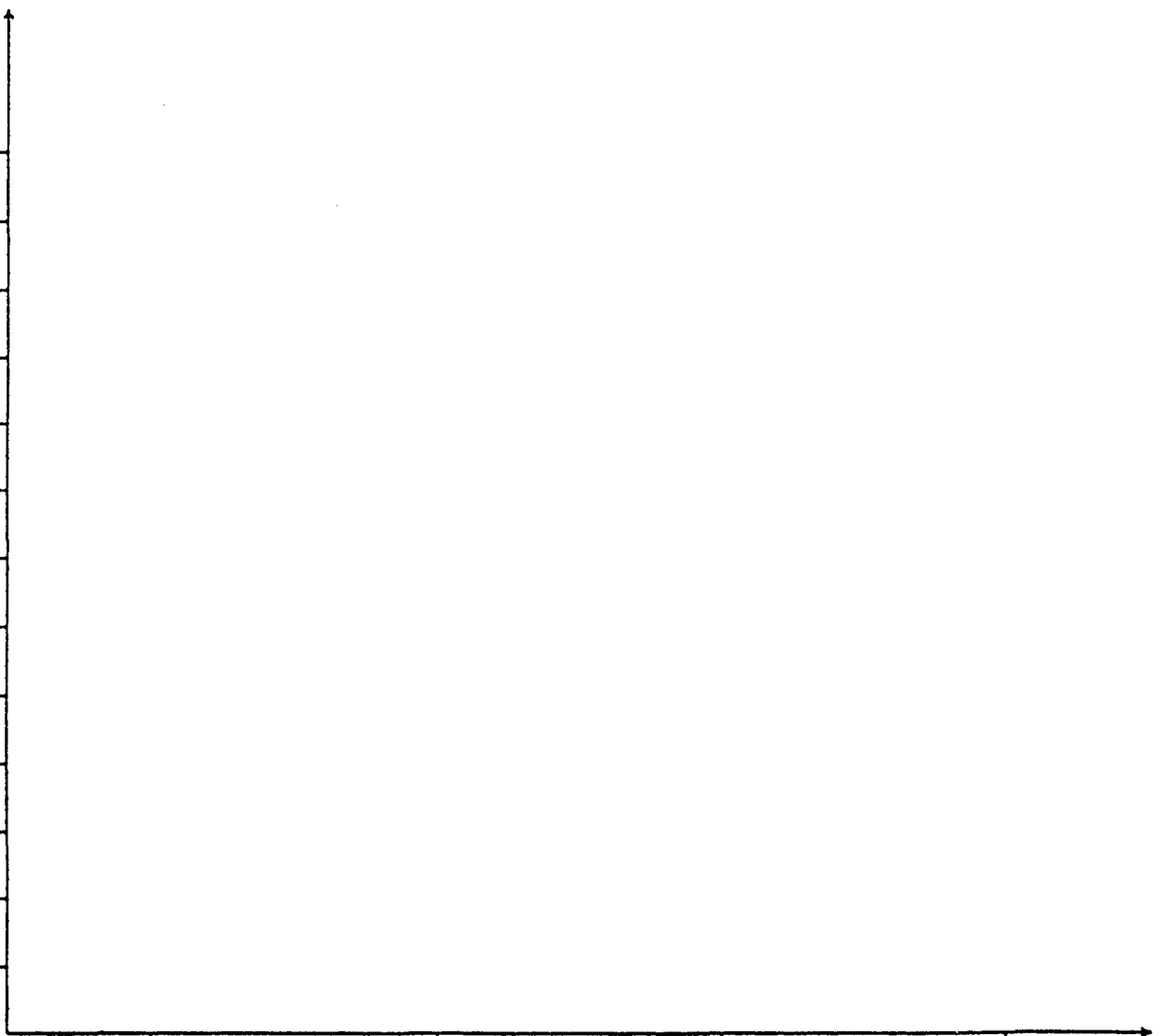
1:5

1:6

1:7

1:8

Dilutions des antigènes



C. Épreuve d'immuno-absorption enzymatique (ELISA) pour la recherche de la leucose bovine enzootique

1. Pour la méthode ELISA, les matériels et réactifs à utiliser sont les suivants:

- a) des microplaques pour phase solide, des cuvettes ou toute autre phase solide;
- b) l'antigène est fixé sur la phase solide avec ou sans l'aide d'anticorps de captage polyclonaux ou monoclonaux. Si l'antigène est associé directement à la phase solide, tous les échantillons soumis à l'examen présentant une réaction positive doivent être réexaminés par rapport à l'antigène de contrôle. Celui-ci devrait être identique à l'antigène examiné, sauf en ce qui concerne les antigènes BLV. Si des anticorps de captage sont associés à la phase solide, les anticorps ne doivent pas réagir à des antigènes autres que les antigènes BLV;
- c) le liquide biologique à examiner (sérum ou lait);
- d) un contrôle positif et négatif;
- e) le conjugué: une immunoglobine antibovine biotinylée ou enzyme conjuguée ou une immunoglobine biotinylée anti BLV ou une enzyme conjuguée;
- f) l'avidine: une enzyme pour essais utilisant des préparations d'immunoglobines biotinylées;
- g) un substrat adapté aux enzymes utilisées;
- h) une solution d'obturation;
- i) des solutions tampons pour la dilution des échantillons examinés, la préparation des réactifs et le lavage;
- j) un système de lecture avec filtres appropriés correspondant au substrat utilisé.

2. Épreuve de standardisation et de sensibilité

La sensibilité du test ELISA doit être d'un niveau tel que le sérum E 4 présente une réaction positive lorsqu'il est dilué 10 fois (échantillons de sérum) ou 250 fois (échantillons de lait) plus que la dilution obtenue à partir d'échantillons inis en commun.

Lors d'essais où les échantillons (sérum et lait) sont examinés individuellement, le sérum E 4, dilué à raison de 1 pour 10 (sérum négatif) ou à raison de 1 pour 250 (lait négatif) doit présenter une réaction positive, lorsqu'il est examiné dans la même dilution d'essai que celle utilisée pour les essais individuels.

Le sérum E 4 sera fourni par le laboratoire vétérinaire national de Copenhague.

3. Conditions d'utilisation du test ELISA

La méthode ELISA peut être utilisée sur un échantillon de lait prélevé sur la collecte de lait provenant d'une exploitation comprenant au moins 30 % de vaches laitières en lactation à la condition que l'échantillon porte sur le lait produit par moins de 50 vaches et sur une concentration du lactosérum du lait collecté sur un nombre de vaches compris entre 20 et 50 au maximum et que, lorsque la collecte de lait porte sur plus de 50 vaches, le nombre de prélèvements soit augmenté proportionnellement.

La méthode ELISA peut également être utilisée sur un échantillon de sang prélevé sur un maximum de 50 animaux.

En cas de recours à l'une des facultés précitées, des mesures doivent être prises pour assurer une correspondance entre les échantillons prélevés et les animaux dont proviennent le lait examiné ou les sérums.

En cas de résultat positif sur l'un des échantillons, le cheptel doit rester sous contrôle officiel jusqu'à ce qu'un résultat négatif ait pu être enregistré pour au moins deux tests individuels effectués, à un intervalle de quatre mois minimum, sur tous les bovins âgés de plus de six mois, conformément aux dispositions précitées, et dans un laboratoire directement supervisé par un laboratoire mentionné au point A.-