

II

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

COMMISSION

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 25 février 1991

fixant les protocoles de normalisation des matériels et modes opératoires relatifs à des tests vétérinaires et les conditions d'agrément des marchés en liaison avec l'importation d'animaux domestiques des espèces bovine et porcine en provenance de pays tiers

(91/189/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu la directive 72/462/CEE du Conseil, du 12 décembre 1972, concernant des problèmes sanitaires et de police sanitaire lors de l'importation d'animaux des espèces bovine et porcine, de viandes fraîches ou de produits à base de viande en provenance de pays tiers ⁽¹⁾, modifiée en dernier lieu par la directive 91/69/CEE ⁽²⁾, et en particulier son article 8 paragraphe 1,

considérant que la directive 72/462/CEE autorise l'importation d'animaux domestiques des espèces bovine et porcine en provenance de pays tiers figurant sur la liste annexée à la décision 79/542/CEE du Conseil ⁽³⁾, modifiée en dernier lieu par la décision 90/485/CEE ⁽⁴⁾ ;

considérant que les conditions sanitaires à appliquer en ce qui concerne les importations d'animaux vivants en provenance d'un pays tiers doivent être établies en fonction de la situation sanitaire dudit pays;

considérant que, bien que ces conditions sanitaires puissent varier d'un pays à l'autre, les protocoles des tests vétérinaires et les conditions d'agrément des marchés dans les pays tiers pour les échanges d'animaux destinés à être exportés vers la Communauté sont applicables à tous les pays tiers;

considérant que, pour simplifier les décisions relatives aux conditions sanitaires applicables aux importations d'animaux domestiques des espèces bovine et porcine en provenance de pays tiers, il s'avère opportun de se référer à une seule décision commune contenant les protocoles des tests vétérinaires et les conditions d'agrément des marchés;

considérant qu'une décision établissant les protocoles des tests vétérinaires et les conditions d'agrément des marchés dans les pays tiers ne peut s'appliquer qu'à un pays tiers pour lequel a été adoptée une décision prenant en compte les conditions sanitaires régnant dans ledit pays;

considérant que les mesures arrêtées dans la présente décision sont conformes à l'avis du comité vétérinaire permanent,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

1. La présente décision fixe les protocoles des tests vétérinaires et les conditions d'agrément des marchés dans les

⁽¹⁾ JO n° L 302 du 31. 12. 1972, p. 28.

⁽²⁾ JO n° L 46 du 19. 2. 1991, p. 37.

⁽³⁾ JO n° L 146 du 14. 6. 1979, p. 15.

⁽⁴⁾ JO n° L 276 du 27. 9. 1990, p. 46.

pays tiers pour les échanges d'animaux destinés à l'exportation vers la Communauté, en liaison avec l'importation d'animaux domestiques des espèces bovine et porcine en provenance de pays tiers figurant sur la liste annexée à la décision 79/542/CEE.

2. Les exigences prévues aux annexes I et II ne s'appliquent qu'aux pays tiers pour lesquels des décisions ont été adoptées précisant les conditions de police sanitaire applicables dans chaque cas conformément aux dispositions de l'article 8 de la directive 72/462/CEE.

Article 2

Les États membres sont destinataires de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 25 février 1991.

Par la Commission

Ray MAC SHARRY

Membre de la Commission

ANNEXE I

PROTOCOLES DE NORMALISATION DES MATÉRIELS ET MÉTHODES DE TESTAGE

CHAPITRE PREMIER

Animaux de l'espèce bovine

1. *Tuberculose*

La seule épreuve d'intradermo-tuberculation avec de la tuberculine bovine est effectuée conformément à l'annexe B de la directive 64/432/CEE, du Conseil du 26 juin 1964, relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine ⁽¹⁾.

2. *Brucellose*

L'épreuve de séro-agglutination et l'épreuve de fixation du complément sont effectuées conformément aux paragraphes A et B de l'annexe C de la directive 64/432/CEE.

3. *Leucose bovine enzootique*

L'épreuve d'immunodiffusion sur gélose est effectuée conformément à l'annexe G de la directive 64/432/CEE.

4. *Fièvre catarrhale*

A. L'épreuve ELISA bloquante ou concurrente est effectuée conformément au protocole suivant:

L'épreuve ELISA concurrente avec l'anticorps monoclonal 3-17-A3 permet de détecter les anticorps de tous les sérotypes connus du virus de la fièvre catarrhale (VFC).

Le principe de l'épreuve consiste dans l'interruption de la réaction entre l'antigène du VFC et un anticorps monoclonal spécifique au groupe (3-17-A3) par l'addition de dilutions du sérum à tester. Les anticorps du VFC présents dans le sérum à tester bloquent la réactivité de l'anticorps monoclonal (AMC) et entraînent une réduction du développement escompté de la couleur à l'addition du substrat enzymatique.

Matériels et réactifs

1. Plaques microtitres à fond plat.
2. Antigène: préparé selon la procédure décrite ci-dessous.
3. Tampon bloquant: 5 % (p/v) de poudre de lait séché «Marvel», 0,1 % (v/v) de Tween-20 (fourni sous forme de sirop de polyoxyéthylène sorbiton monolaurate) dans du PBS.
4. Anticorps monoclonal (AMC): 3-17-A3 (fourni sous forme de surnageant de culture tissulaire hybridome) stocké à -20 °C ou lyophilisé, dilué à 1/50 avec un tampon bloquant avant utilisation, dirigé contre le polypeptide p₇ spécifique au groupe.
5. Conjugué: globuline de lapin antisouris (absorbé et élué), conjugué à la peroxydase de raifort et conservé à l'obscurité à 4 °C.
6. Substrat et chromogène: 0,2 g d'orthophénylène (OPD) dissoute dans un tampon composé de 2,553 g d'acide citrique et 4,574 g de di-sodium hydrogénorthophosphate porté à 500 ml de l'eau distillée, divisé en aliquotes de 25 ml et conservé à l'obscurité à -20 °C, additionné de 12 µl/25 ml de peroxyde d'hydrogène (30 % d/v) immédiatement avant utilisation.

Manipuler l'OPD avec précaution — Porter des gants en caoutchouc — produit suspect d'être mutagène.

7. Acide sulfurique à 1 mole: 26,6 ml d'acide ajouté à 473,4 ml d'eau distillée.

Attention: toujours ajouter l'acide à l'eau, jamais l'eau à l'acide.

(1) JO n° 121 du 29. 7. 1964, p. 1977/64.

8. Agitateur orbital.

9. Lecteur de plaque ELISA (l'épreuve peut être lue visuellement).

Schéma de l'épreuve

	H	G	F	E	D	C	B	A	
Blanc			Antigène + conjugué						1
Témoin AMC			Antigène + AMC + conjugué						2
Témoin positif	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	3
	1/2	1/4	1/8	Sérums à tester		1/4	1/8	1/16	4
									5
									6
Sérums à tester									7
									8
									9
									10
									11
									12

Protocole d'essai

Contrôle à blanc

La ligne 1, de A à H, est un contrôle à blanc comprenant l'antigène du VFC et un conjugué. Il peut être utilisé pour étalonner le lecteur ELISA.

Contrôle de l'AMC

La ligne 2, de A à H, est le contrôle à blanc de l'anticorps monoclonal et comprend l'antigène du VFC, l'anticorps monoclonal et le conjugué. Il s'agit d'un contrôle négatif. La moyenne des valeurs de la densité optique de cette ligne de contrôle représente la valeur d'inhibition de 0 %.

Contrôle positif

La ligne 3, de A à H, est le contrôle positif. Il comprend l'antigène du VFC, des dilutions d'antisérum positif du VSC, d'AMC et le conjugué. Il est inclus pour indiquer que l'épreuve se déroule normalement et que des niveaux similaires d'inhibition devraient être obtenus d'une épreuve à une autre.

Sérums à tester

Dans le schéma de l'épreuve indiquée ci-dessus, 18 sérums peuvent être testés dans des dilutions de 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16. Il en ressortira des informations sur le titre de l'anticorps contenu dans les sérums à tester. La gamme de dilutions pourrait être élargie encore pour obtenir des titres finaux de dilutions du sérum. À l'inverse, pour des études sérologiques à grande échelle, le sérum pourrait être testé à une dilution unique (1/4) ou à deux dilutions (1/2 et 1/4) en tant qu'épreuve de contrôle rapide.

Mode opératoire

1. Diluer l'antigène du VFC à la concentration prétitrée dans du PBS. Agiter brièvement (par agitateur à ultrasons) pour disperser les agrégats de virus (à défaut de cet appareil, agiter vigoureusement à la pipette) et en ajouter 50 µl dans toutes les loges de la plaque ELISA. Tapoter les bords de la plaque pour disperser l'antigène.
2. Incuber à 37 °C pendant 60 minutes à l'aide d'un agitateur orbital. Laver les plaques trois fois par rinçage et vider les loges avec du PBS non stérile et sécher à l'aide de papier buvard.
3. Ajouter 50 µl par loge de tampon bloquant. Ajouter des sérums à tester et un sérum positif dans les loges en cause et diluer le contenu de la plaque à l'aide d'une pipette à canaux multiples. Ne pas ajouter de sérum au contrôle à blanc ou au contrôle le l'AMC.
4. Immédiatement après l'addition des sérums à tester, diluer l'AMC dans un tampon bloquant (à une dilution prétitrée) et ajouter 50 µl à toutes les loges de la plaque, sauf le contrôle à blanc.
5. Incuber à 37 °C pendant 60 minutes dans un agitateur orbital. Laver trois fois avec du PBS et sécher à l'aide de papier buvard.
6. Diluer le concentré de lapin anti-souris à 1/5 000 dans un tampon bloquant et ajouter 50 µl dans toutes les loges de la plaque.
7. Incuber à 37 °C pendant 60 minutes sur un agitateur orbital. Laver trois fois avec du PBS et sécher à l'aide de papier buvard.
8. Décongeler l'OPD et, immédiatement avant utilisation, ajouter 12 µl de peroxyde d'hydrogène à 30 % à chaque quantité de 25 ml d'OPD. Ajouter 50 µl dans toutes les loges de la plaque. Attendre le développement de la couleur pendant environ 10 minutes et arrêter la réaction à l'aide de l'acide sulfurique à IM (50 µl par loge). La couleur devrait se développer dans les loges de contrôle AMC et dans les loges contenant des sérums sans anticorps du VFC.
9. Examiner et enregistrer les plaques soit visuellement, soit à l'aide d'un lecteur spectrophotométrique.

Analyse des résultats

Calculer la valeur moyenne de DO à partir des contrôles AMC. Cela représente la valeur d'inhibition 0 %. Les valeurs de densité optique des sérums à tester sont exprimées en pourcentage des valeurs d'inhibition à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Pourcentage de la valeur d'inhibition} = 100 - \frac{\text{DO en présence du sérum à tester}}{\text{DO en l'absence de sérum à tester}} \times 100.$$

Les valeurs d'inhibition supérieures à 40 % à une dilution du sérum de 1/4 sont considérées comme positives. La lecture visuelle est possible étant donné qu'une inhibition de 40 % est la valeur la plus faible bien visible.

Préparation de l'antigène VFC pour la technique ELISA

1. Laver trois fois 10 rous de cellules BHK-21 confluentes à l'aide d'un milieu Eagle exempt de sérum et infecter au moyen du sérotype 1 du virus de la fièvre catarrhale dans un milieu Eagle exempt de sérum.
2. Incuber à 37 °C et examiner l'effet cytopathique (ecp) chaque jour.
3. Lorsque l'ecp devient évident dans 80 à 90 % de la plaque de cellules de chaque rous, récolter le virus par agitation pour détacher les cellules adhérant à la paroi.

4. Centrifuger à 2 ou 3 000 tours/minute pour réduire les cellules en granules.
5. Jeter la fraction supernageante et remettre en suspension les cellules dans environ 30 ml de PBS contenant 1 % de «sarkosyl» et 2 ml de fluorure de phénométhylsulphonyl (tampon lyse). Cela peut provoquer une gélification des cellules; auquel cas, il faut ajouter davantage de tampon lyse pour réduire cet effet.
NB: le fluorure de phénylméthylsulphonyl est dangereux; le manipuler avec une extrême prudence.
6. Dissocier les cellules pendant 60 secondes à l'aide d'une sonde ultrasonique fonctionnant à une amplitude de 30 microns.
7. Centrifuger à 10 000 tours/minute pendant dix minutes.
8. Stocker la fraction surnageante à +4 °C et remettre en suspension le granulé de cellules restant dans 10 à 20 ml de tampon lyse.
9. Agiter à l'aide d'un appareil à ultrasons et clarifier, stocker la fraction surnageante à chaque stade, trois fois au total.
10. Réunir les fractions surnageantes et centrifuger à 24 000 tours/minute pendant 120 minutes à une température de 40 °C sur un coussin de 5 ml de sucrose à 40 % (p/v dans PBS) en utilisant des tubes de centrifugation Beckmann de 30 ml et un rotor SW 28.
11. Jeter la fraction surnageante, laisser s'égoutter les tubes soigneusement et remettre en suspension le granulé dans du PBS par ultrasons. Stocker l'antigène dans des aliquotes à - 70 °C.

Titration de l'antigène VFC pour la technique ELISA

L'antigène de la fièvre catarrhale pour la technique ELISA est titré par la technique ELISA indirecte. Titre des doubles dilutions d'antigène à l'aide d'une dilution constante (1/50) d'anticorps monoclonal 3-17-A3. Le protocole est le suivant:

Mode opératoire:

1. Diluer l'antigène VFC dans PBS à travers une plaque microtitre dans une série de dilutions doubles (50 µl/loge) en utilisant une pipette multiple.
2. Incuber pendant une heure à 37 °C à l'aide d'un agitateur orbital.
3. Laver trois fois les plaques avec du PBS.
4. Ajouter 50 µl d'anticorps monoclonal 3-17-A3 (dilué à 1/50) dans chaque loge de la plaque microtitre.
5. Incuber pendant une heure à 37 °C à l'aide d'un agitateur orbital.
6. Laver trois fois les plaques à l'aide de PBS.
7. Mettre 50 µl de globuline de lapin antisouris conjugué à de la peroxidase de raifort, diluée à une concentration prétitrée optimale dans chaque loge de la plaque microtitre.
8. Incuber pendant une heure à 37 °C à l'aide d'un agitateur orbital.
9. Ajouter un substrat et un chromogène comme ci-dessus. Arrêter la réaction après dix minutes par addition d'acide sulfurique à 1 M (50 µl/loge).

Dans l'essai concurrent, l'anticorps monoclonal doit se trouver en excédent; c'est pourquoi il est choisi une dilution d'antigène qui se trouve sur la courbe de titrage (non dans la zone de plateau) qui donne approximativement une DO de 0,8 après dix minutes.

- B. Le test d'immunodiffusion sur gel d'agar est effectué selon le protocole suivant:

Matériels et réactifs

Antigène

Préparer l'antigène précipitant dans un quelconque système de culture cellulaire compatible avec la multiplication rapide du (des) sérotype(s) approprié(s) du virus de la maladie hémorragique épizootique. Les cellules BHK ou Vero sont recommandées. L'antigène est présent dans le fluide supernageant à la fin de la croissance virale mais doit être concentré de 50 à 100 fois pour être efficace. On y parvient à l'aide d'une quelconque méthode de concentration protéique type; le virus de l'antigène peut être inactivé par addition de 0,3 % (v/v) de bêta-propolactone.

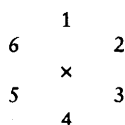
Sérum de contrôle positif connu

À l'aide d'un sérum de référence international et d'antigène un sérum type national est produit, standardisé en vue d'obtenir une proportion optimale par rapport au sérum de référence international, lyophilisé et utilisé comme sérum de contrôle connu dans chaque test.

Sérum à tester**Mode opératoire**

Verser l'agarose à 1 % dans un tampon de borate ou de barbitol de sodium, pH 8,5 à 9,0, dans une boîte de Petri à une profondeur minimale de 3,0 mm.

Un ensemble à tester de sept loges exemptes d'humidité, de 5,0 mm de diamètre, est creusé dans l'agar. Le schéma comprend une loge centrale et six loges disposées dans un cercle d'un rayon de 3 mm.



Remplir la loge centrale à l'aide d'antigène standard. Remplir les loges périphériques 2, 4 et 6 avec des sérums positifs connus, les loges 1, 3 et 5 avec des sérums à tester.

Le système est incubé pendant 72 heures au maximum à température ambiante dans une chambre humide fermée.

Interprétation

Un sérum à tester est positif s'il forme une ligne de précipitine spécifique avec l'antigène ainsi qu'une ligne complète d'identité avec le sérum de contrôle. Un sérum à tester est négatif, s'il ne forme pas de ligne spécifique avec l'antigène et n'infléchit pas la courbe du sérum de contrôle. Les boîtes de Petri doivent être examinées sur fond sombre et en éclairage indirect.

5. Maladie hémorragique épizootique

Le test d'immunodiffusion sur gel d'agar est effectué selon le protocole suivant:

Matériels et réactifs**Antigène**

Préparer l'antigène précipitant dans un quelconque système de culture cellulaire compatible avec la multiplication rapide du (des) sérotype(s) approprié(s) du virus de la maladie hémorragique épizootique. Les cellules BHK ou Vero sont recommandées. L'antigène est présent dans le fluide supernageant à la fin de la croissance virale mais doit être concentré de 50 à 100 fois pour être efficace. On y parvient à l'aide d'une quelconque méthode de concentration protéique type; le virus de l'antigène peut être inactivé par addition de 0,3 % (v/v) de bêta-propiolactone.

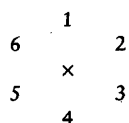
Sérum de contrôle positif connu

À l'aide d'un sérum de référence international et d'antigène, un sérum type national est produit, standardisé en vue d'obtenir une proportion optimale par rapport au sérum de référence international, lyophilisé et utilisé comme sérum de contrôle connu dans chaque test.

Sérum à tester**Mode opératoire**

Verser de l'agarose à 1 % dans un tampon de borate ou de barbitol de sodium, pH 8,5 à 9,0, dans une boîte de Petri à une profondeur minimale de 3,0 mm.

Un ensemble à tester de sept loges exemptes d'humidité de 5,0 mm de diamètre, est creusé dans l'agar. Le schéma comprend une loge centrale et six loges disposées dans un cercle d'un rayon de 3 mm.



Remplir la loge centrale à l'aide d'antigène standard. Remplir les loges périphériques 2, 4 et 6 avec des sérums positifs connus, les loges 1, 3 et 5 avec des sérums à tester.

Le système est incubé pendant 72 heures au maximum à température ambiante dans une chambre humide fermée.

Interprétation

Un sérum à tester est positif s'il forme une ligne de précipitine spécifique avec l'antigène ainsi qu'une ligne complète d'identité avec le sérum de contrôle. Un sérum à tester est négatif s'il ne forme pas de ligne spécifique avec l'antigène et n'infléchit pas la courbe du sérum de contrôle. Les boîtes de Petri doivent être examinées sur fond sombre et en éclairage indirect.

6. *Leptospirose*

Le test de micro-agglutination doit être effectué conformément au mode opératoire suivant:

Cultures

Doivent être maintenues dans un milieu de Korthof et EMJH à une température de 30 °C.

Antigène

Doit contenir 2×10^8 d'organismes par millilitre de milieu de culture.

Procédé

Utiliser des quantités égales d'antigène et de sérum dans des boîtes à fond plat pour microtitration, mélanger et incubé à 30 °C pendant 2 heures ou à 37 °C pendant 1 à 1 1/2 heure, lire les résultats dans un éclairage à faible voltage sur fond sombre, avec un grossissement compris entre 60 et 100.

Interprétation

Le résultat est négatif lorsque l'agglutination est inférieure à 50 % à une dilution de 1/50.

7. *Rhinotrachéite infectieuse des bovins/vulvo-vaginite pustuleuse infectieuse*

Le test de séroneutralisation doit être effectué conformément au mode opératoire suivant:

Sérum

Tous les sérums sont inactivés à 56 °C pendant 30 minutes avant utilisation.

Mode opératoire

Pour le test de séroneutralisation constante sur différents types de virus sur plaques microtitres, on emploie des cellules MDBK ou d'autres cellules appropriées. La souche Colorado, Oxford ou toute autre souche de référence du virus est utilisée à une dose de 100 DICT₅₀ pour 0,025 ml; mélanger des échantillons de sérum non dilué, inactivé avec un volume égal (0,025 ml) de suspension du virus. Incuber des mélanges virus/sérum pendant 2 heures à 37 °C sur les plaques microtitres avant addition des cellules MDBK. Utiliser les cellules à une concentration formant une monocouche complète après 24 heures.

Contrôles à effectuer

Contrôle de l'infectiosité du virus.
Contrôle de la toxicité du sérum.
Contrôle sur culture de cellules non inoculées.
Antisérums de référence.

Interprétation

Les résultats du test de neutralisation et le titre du virus utilisé sont enregistrés après 3 à 6 jours d'incubation à 37 °C. Le sérum est considéré comme négatif s'il n'y a pas de neutralisation à une dilution de 1/2 (sérum non dilué)

8. *Diarrhée virale des bovins (DVB)*

A. Effectuer le test d'isolement du virus conformément au protocole suivant:

Matériel à tester et méthodes de dépistage

Utiliser des suspensions de sérum, de couenne inflammatoire ou de caillots de sang provenant d'échantillons de sang fraîchement prélevés qui n'ont pas été inactivés à la chaleur, prélevés sur des bovins de plus de six mois. Appliquer une procédure de coloration immunologique telle que la technique de l'anticorps fluorescent (AF) ou une épreuve enzymatique à l'anticorps, par exemple l'immunoperoxydase (IPX) pour détecter le virus de la BVD dans des cultures inoculées.

Réactifs

Pour l'épreuve AF, il faut un antiserum spécifique de la BVD conjugué à FITC. Pour l'épreuve IPX, il faut un sérum anti-BVD spécifique non conjugué, d'origine bovine, un antiserum antibovine conjugué à la peroxydase et un substrat enzymatique approprié (tel que 3-amino-9-éthylcarbazole). Un sérum anti-BVD cultivé sur une espèce autre que l'espèce bovine peut être utilisé pour autant que le conjugué à la peroxydase soit dirigé contre les globulines sériques de ladite espèce. Tous les sérums antiviraux doivent être d'une spécificité prouvée et présenter une large réactivité.

Mode opératoire

Pour l'épreuve, utiliser des cellules sensibles telles que des cellules turbinées de bovins, du rein de veau ou de testicule de veau indemne de virus endogène de la BVD.

Échantillons de sérum — le sérum à tester et les cellules de culture tissulaire sont versés dans des cultures sur porte-objet ou dans des loges de plaques microtitres ou autres contenants de sorte que la dilution finale du sérum soit de 10 %.

Couenne inflammatoire et caillot de sang — les échantillons sont ajoutés aux cultures cellulaires monocouches confluentes et laissés pendant une heure à une température de 37 °C, puis les cultures sont lavées et recouvertes d'un milieu de culture contenant 10 % de sérum de fœtus de veau indemne de BVD.

Les cultures incubent ensuite à 37 °C, sont fixées et colorées selon la méthode AF ou IPX.

Contrôles à effectuer

Contrôle positif du virus de la BVD.
Contrôle négatif sans addition de virus.

Interprétation

L'épreuve AF est colorée après incubation de 4 à 6 jours et lue à la lumière ultraviolette. Une fluorescence dans les cellules incubées avec l'échantillon à tester est considéré comme un résultat positif.

Le test IPX coloré après quatre jours d'incubation et lu par microscopie lumineuse. Une coloration brun foncé du cytoplasme de certaines des cellules est considérée comme un résultat positif.

B. Effectuer l'épreuve de séroneutralisation conformément au protocole suivant:

Sérum

Tous les sérums sont inactivés à une température de 56 °C pendant 30 minutes avant utilisation.

Mode opératoire

Le test de séroneutralisation constante sur différents types de virus sur plaques microtitres utilise des cellules bovines appropriées, multipliées en série (par exemple cellules turbinées de bovins, décrites par Mc Clurkin et autres, 1974, Arch. ges. Virusforsch., 45, 285 à 289).

Il importe que tous les réactifs et les cellules soient indemnes de virus non cytopathique adventices contaminants de BVD/MD.

Le virus à tester que peut être une quelconque souche de référence cytopathique appropriée (telle que la souche NADL) est utilisé à une concentration de 100 doses infectieuses de culture cellulaires moyennes pour 0,025 ml. Mélanger des dilutions de sérums inactivés avec des volumes égaux de suspension virale (0,025 ml) et faire incuber les mélanges virus/sérum pendant 1 heure à 37 °C avant d'ajouter des volumes semblables de suspension cellulaire. Les cellules sont utilisées à une concentration qui doit former une monocouche complète après deux jours.

Contrôles à effectuer

Contrôle de l'infectiosité du virus.
Contrôle de la toxicité du sérum.
Contrôle sur culture de cellules non inoculées.
Antisérums de référence.

Interprétation

Avec le virus de la souche NADL, le délai optimal de lecture se situe après cinq jours d'incubation à 37 °C.

Un titre de neutralisation moyen de 1/10 est considéré comme indiquant une réaction immunitaire à une infection antérieure aiguë.

9. Analyse du lait mammité

L'analyse du lait doit être effectuée conformément à l'annexe de la directive 64/432/CEE.

10. Fièvre aphteuse

A. Le prélèvement d'échantillons de l'œsophage/du pharynx et leur testage doivent être effectués conformément au protocole suivant:

Réactifs

Avant l'échantillonnage, préparer le milieu de transport. Mettre une quantité de 2 ml dans un nombre de contenants aussi grand que le nombre d'animaux à échantillonner. Les contenants doivent résister à la congélation au CO₂ solide ou à l'azote liquide.

L'échantillonnage se fait à l'aide d'une cuvette conçue à cet effet ou par la technique «probang».

Pour prélever un échantillon, la cuvette est placée dans la bouche sur le dos de la langue et à l'arrière dans la partie supérieure de l'œsophage. Essayer de gratter l'épithélium de la partie supérieure de l'œsophage et pharynx par grattage des faces latérales et supérieures. L'appareil probang est ensuite retiré, de préférence après que l'animal a dégluti, la coupelle doit être pleine et contenir un mélange de mucus, de salive, de liquide œsophagien et de débris cellulaires. Vérifier que chaque spécimen contienne du matériel cellulaire visible. Éviter des mouvements brutaux qui peuvent provoquer un saignement.

Des échantillons prélevés sur certains animaux peuvent être fortement contaminés par le contenu du rumen. Dans ce cas, jeter ces échantillons et laver la bouche de l'animal à l'eau ou, de préférence, avec un liquide physiologique, avant de recommencer l'opération.

Traitement des échantillons

Examiner la qualité de chaque échantillon recueilli dans la cuvette probang, ajouter 2 ml de ce contenu à un volume égal de milieu de transport et transférer le tout dans un contenant résistant à la congélation. Fermer hermétiquement, sceller, désinfecter et étiqueter les contenants. Conserver les échantillons au frais (+ 4 °C) et les examiner quotidiennement pendant 48 heures en vue d'y déceler la présence de l'effet cytopathique (ECP). Si elles sont négatives, passer les cultures en aveugle sur de nouvelles cultures et les réexaminer pendant 48 heures. Confirmer la spécificité de tout ECP.

Entre deux prélèvements, nettoyer l'appareil probang et le laver trois fois à l'eau claire.

Épreuve de dépistage du virus de la fièvre aphteuse

Des cultures cellulaires de thyroïde bovine primaire sont inoculées à l'aide des échantillons à raison de trois tubes par échantillon. D'autres cellules appropriées, par exemple des cellules primaires de rein de bovin ou de porc peuvent aussi être utilisées, mais il faut se rappeler que ces cellules sont moins sensibles à certaines souches du virus de la fièvre aphteuse. Faire incuber les tubes à 37 °C sur un appareil à rouleaux et les examiner quotidiennement pendant 48 heures en vue d'y déceler la présence de l'effet cytopathique (ECP). Si elles sont négatives, passer les cultures en aveugle sur de nouvelles cultures et les réexaminer pendant 48 heures. Confirmer la spécificité de tout ECP.

Milieux de transport recommandés

1. Tampon de phosphate à 0,08 M, pH 7,2, contenant 0,01 % d'albumine de sérum bovin, du rouge de phénol à 0,002 % et des antibiotiques.
2. Milieu de culture tissulaire (par exemple Eagle's MeM) contenant un tampon HEPES à 0,04 M, 0,01 % d'albumine ou de sérum bovin et des antibiotiques, pH 7,2.

Ajouter les quantités suivantes d'antibiotiques par ml final de milieu de transport:

— pénicilline	1 000 UI,
— sulfate de néomycine	100 UI,
— sulfate B de polymyxine	50UI,
— mycostatine	100 UI.

B. Le test de séroneutralisation doit être effectué selon le protocole suivant:

Réactifs

Préparer de l'antigène de stock contre le virus de la fièvre aphteuse dans des cultures cellulaires ou sur des langues de bovin et le stocker à une température de -70°C ou à une température inférieure ou à -20°C après addition de 50 % de glycérol. Cela constitue l'antigène de stock. Le virus de la fièvre aphteuse est stable dans ces conditions et les titres ne varient guère au cours des mois.

Mode opératoire

Effectuer l'épreuve sur des plaques microtitres à fond plat, prévues pour des cultures tissulaires, en utilisant des cellules sensibles telles que IB-RS-2, BHK-21 ou des cellules de rein de veau.

Diluer à 1/4 les sérums à tester dans un milieu de culture cellulaire exempt de sérum en y additionnant 100 UI/ml de néomycine ou d'autres antibiotiques appropriés. Inactiver les sérums à 56°C pendant 30 minutes et en utiliser des quantités de 0,05 ml pour préparer des séries doubles sur des plaques microtitres en utilisant des anneaux diluants de 0,05 ml.

Ajouter ensuite dans chaque loge du virus pré-titré, également dilué dans un milieu de culture exempt de sérum et contenant 100 DICT₅₀/0,05 ml. Après incubation à 37°C pendant une heure pour permettre la réaction de neutralisation, ajouter dans chaque loge 0,05 ml d'une suspension de cellules contenant $0,5$ à $1,0 \times 10^6$ cellules par ml dans un milieu de culture cellulaire contenant du sérum exempt d'anticorps de la fièvre aphteuse et sceller les plaques.

Faire incuber les plaques à 37°C . Les monocouches deviennent normalement confluentes dans les 24 heures. L'ECP est habituellement suffisamment développé à 48 heures pour permettre une lecture *microscopique* de l'épreuve. À ce moment, une lecture *microscopique* finale peut être faite ou les plaques peuvent être fixées et colorées en vue d'une lecture *macroscopique*, par exemple à l'aide d'un liquide physiologique à 10 % de formol et de bleu de méthylène à 0,05 %.

Contrôles à effectuer

Les contrôles relatifs à chaque épreuve comprennent de l'antisérum homologue de titre connu, un contrôle des cellules, un contrôle de la toxicité du sérum, un contrôle du milieu et un titrage du virus à partir duquel est calculée la quantité réelle de virus contenue dans l'épreuve.

Interprétation

Les loges faisant apparaître un ECP sont considérées comme infectées et les titres de neutralisation sont exprimés comme représentant la réciproque de la dilution finale du sérum présent dans les mélanges sérum/virus au point final de 50 % estimé selon la méthode Spearman-Kärber (Karber, G. 1931, *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 162, 480).

Les épreuves sont considérées comme valables lorsque la quantité réelle de virus utilisée par loge s'établit, dans l'épreuve, entre $10^{1,5}$ et $10^{2,5}$ DICT₅₀ et lorsque le titre du sérum de référence se trouve dans une zone double du titre escompté, estimé selon le mode des titrations précédentes. Lorsque les témoins se trouvent en dehors de ces limites, répéter les épreuves.

Un titre final de 1/11 ou inférieur est considéré comme négatif.

C. La détection et la quantification de l'anticorps par la technique ELISA s'effectuent selon la procédure suivante:

Réactifs

Des antisérums de lapin contre l'antigène 146S de sept types de virus de la fièvre aphteuse utilisés à une concentration optimale prédéterminée dans un tampon de carbonate/bicarbonate de pH 9,6.

Préparer les antigènes à partir de souches sélectionnées de virus cultivées sur des monocouches de cellules BHK-21. Utiliser les fractions surnageantes, non purifiées et les pré-titrer conformément au protocole, mais sans sérum, pour donner une dilution qui, après addition d'un volume égal de PBST (liquide physiologique tamponné au phosphate, contenant 0,05 % de Tween-20 et un révélateur au rouge de phénol) donnerait une densité optique de 1,2 à 1,5. Les virus peuvent être utilisés sous forme inactivée. Utiliser le PBST comme diluant. Préparer des antisérums de cobaye en inoculant à des cobayes l'antigène 146S de chaque sérotype. Préparer une concentration optimale prédéterminée dans du PBST contenant 10 % de sérum de bovin normal et 5 % de sérum de lapin normal.

Utiliser de l'immunoglobuline de porc anticobaye conjuguée à de la peroxidase de raifort à une concentration optimale prédéterminée dans du PBST contenant 10 % de sérum de bovin normal et 5 % de sérum de lapin normal.

Diluer les sérums à tester dans du PBST.

Mode opératoire

1. Recouvrir les plaques ELISA avec 50 µl de sérums antiviraux de lapin et les laisser pendant une nuit dans une enceinte humide à température ambiante.
2. Préparer 50 microlitres d'une duplication, des séries doubles de chaque sérum à tester en commençant à 1/4 dans des plaques à loges multiples à fond en U (plaques portantes). Ajouter 50 microlitres d'une dose constante d'antigène dans chaque loge et laisser les mélanges pendant la nuit à 4 °C. L'addition de l'antigène réduit la dilution sérique de départ à 1/8.
3. Laver cinq fois les plaques à l'aide de PBST.
4. Transférer ensuite 50 microlitres de mélanges sérum/antigène des plaques porteuses vers les plaques ELISA enduites de sérum de lapin et les faire incuber à 37 °C pendant une heure sur un agitateur rotatif.
5. Après lavage, ajouter dans chaque loge 50 µl d'antisérum de cobaye à l'antigène utilisé en 4. Faire incuber les plaques à 37 °C pendant une heure sur un agitateur rotatif.
6. Laver les plaques et ajouter dans chaque loge 50 µl d'immunoglobuline de porc anticobaye conjuguée à de la peroxidase de raifort. Faire incuber les plaques à 37 °C pendant une heure sur un agitateur rotatif.
7. Laver les plaques et ajouter dans chaque loge 50 µl d'orthophénylène diamine contenant 0,05 % de H₂O₂ (30 %) p/v.
8. Arrêter la réaction après 15 minutes à l'aide de H₂SO₄ à 1,25 M.

Effectuer une lecture spectrophotométrique des plaques à 492 nm à l'aide d'un lecteur ELISA couplé à un micro-ordinateur.

Contrôles à effectuer

Pour chaque antigène utilisé, 40 loges ne contiennent pas de sérum, mais de l'antigène dilué dans du PBST.

Une série double de 2 dilutions d'antisérum bovin homologue de référence.

Une série double de 2 dilutions d'un sérum bovin négatif.

Interprétation

Les titres d'anticorps sont exprimés comme représentant la dilution finale des sérums à tester donnant 50 % de la valeur moyenne de la DO notée dans les loges de contrôle du virus en l'absence du sérum à tester. Des titres supérieurs à 1/40 sont considérés comme positifs.

Références:

Hamblin C., Barnett ITR et Hedger RS (1986) — «A new enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA.» [Une nouvelle épreuve d'immunoabsorption enzymatique (ELISA) pour la détection des anticorps du virus de la fièvre aphteuse. I.] *Journal of Immunological Methods*, 93, 115-121.11.

CHAPITRE II

Animaux de l'espèce porcine

1. Tuberculose

La tuberculination intradermique simple à l'aide de tuberculine aviaire doit être effectuée conformément à l'annexe B de la directive 64/432/CEE, à l'exception du fait que le point d'injection se situe sur la peau flasque à la base de l'oreille.

2. *Brucellose*

La séroagglutination et la réaction de fixation du complément doivent être effectuées conformément à l'annexe C, chapitres A et B de la directive 64/432/CEE.

3. *Maladie d'Aujeszky*

Le test de séroneutralisation doit être effectué conformément au protocole suivant:

Sérum

Tous les sérums sont inactivés à 56 °C pendant 30 minutes avant utilisation.

Mode opératoire

Le test de séroneutralisation constante sur différents types de virus sur plaques microtitres est effectuée avec le système de cellules Vero ou un autre système de cellules sensibles. Utiliser du virus de la maladie d'Aujeszky à 100 DICT₅₀ pour 0,025 ml; mélanger les échantillons de sérum non dilué, inactivé avec une quantité égale (0,025 ml) de suspension du virus. Faire incuber les mélanges virus/sérum pendant 2 heures à 37 °C dans les plaques microtitres avant d'ajouter les cellules appropriées. Utiliser les cellules à une concentration formant une monocouche complète après 24 heures.

Contrôles à effectuer

Contrôle de l'infectiosité du virus.
Contrôle de la toxicité du sérum.
Contrôle sur culture de cellules non inoculées.
Antisérums de référence.

Interprétation

Enregistrer les résultats de l'épreuve de neutralisation et le titre du virus utilisé après 3 à 7 jours d'incubation à 37 °C. Les titres sériques inférieurs à 1/2 (semence non diluée) sont considérés comme négatifs.

4. *Gastro-entérite transmissible*

Le test de séroneutralisation doit être effectué conformément au protocole suivant:

Sérum

Tous les sérums sont inactivés à 56 °C pendant 30 minutes avant utilisation.

Mode opératoire:

Le test de séroneutralisation sur différents types de virus effectué sur plaques microtitres utilise des cellules A72 (tumeur du chien) ou un autre système de cellules sensibles. Le virus TGE est utilisé à 100 DICT₅₀ pour 0,025 ml; mélanger des échantillons de sérum non dilués, inactivés avec une quantité égale (0,025 ml) de suspension virale. Faire incuber les mélanges virus/sérum pendant 30-60 minutes à 37 °C sur les plaques microtitres avant d'ajouter les cellules appropriées. Utiliser les cellules à une concentration qui forme une monocouche complète après 24 heures. Verser 0,1 ml de suspension de cellules dans chaque loge.

Contrôles à effectuer

Contrôle de l'infectiosité du virus.
Contrôle de la toxicité du sérum.
Contrôle sur culture de cellules non inoculées.
Antisérums de référence.

Interprétation

Enregistrer les résultats de l'épreuve de neutralisation et le titre du virus utilisé pour l'épreuve après 3 à 5 jours d'incubation à 37 °C. Les titres sériques inférieurs à 1/2 (dilution finale) sont considérés comme négatifs. Si des échantillons de sérum non dilués sont toxiques pour les cultures tissulaires, ces sérums peuvent être dilués dans la proportion de 1/2 avant d'être utilisés pour l'épreuve. Cela correspond à une dilution finale du sérum d'un quart. Des titres sériques inférieurs à 1/4 (dilution finale) sont considérés comme négatifs en l'occurrence.

5. Grippe des porcelets

Le test de l'agglutination-hémoagglutination doit être effectué conformément au protocole suivant:

Mode opératoire

Les épreuves s'effectuent selon des méthodes types (*US Department of Health, Education and Welfare, Immunology series n° 6*).

En vue de détruire des inhibiteurs non spécifiques, les sérums de porc doivent être soumis à l'action d'une enzyme détruisant les récepteurs (filtrat de *Vibrio cholera*) pendant une nuit à 37 °C, ce traitement étant suivi d'un réchauffement à 56 °C pendant 30 minutes en vue de détruire toute activité enzymatique résiduaire, soit à un traitement au kaolin à 25 % pendant une nuit à 4 °C (Clark et Casals, 1958, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 7, 561).

Après absorption à l'aide d'une suspension à 10 % d'érythrocytes de poulet pendant une heure à 37 °C, contrôler les sérums au moyen de quatre unités de virus hémagglutinants appropriés en utilisant 1 % d'érythrocytes de poulet. Laisser le virus et le sérum en contact pendant 60 minutes à température ambiante avant d'ajouter les érythrocytes.

Interprétation

Les titres égaux ou supérieurs à 1/10 sont considérés comme positifs.

6. Fièvre aphteuse

Les tests de dépistage de la fièvre aphteuse sur des animaux de l'espèce porcine doivent être effectués conformément aux protocoles fixés au chapitre 1^{er} point 10.

7. Maladie vésiculeuse du porc

L'épreuve de séroneutralisation doit être effectuée conformément au protocole suivant:

Sérum

Tous les sérums sont inactivés à 56 °C pendant 30 minutes avant utilisation.

Mode opératoire:

Le test de séroneutralisation constante sur différents types de virus sur plaques microtitres utilise des cellules IB-RS-2 ou un autre système de cellules sensibles. La souche virale UKG 27/72 ou toute autre souche de référence est utilisée à 100 DICT₅₀ pour 0,025 ml. Diluer à 1/4 les sérums à tester et préparer une série de dilutions doubles. Mélanger les échantillons de sérum avec un volume égal de suspension virale et faire incuber pendant 1 heure à 37 °C sur les plaques microtitres avant d'ajouter 0,025 ml de la suspension de cellules contenant 3×10^6 cellules/ml.

Contrôles à effectuer:

Contrôle de l'infectiosité du virus.

Contrôle de la toxicité du sérum.

Contrôle sur culture de cellules non inoculées.

Antisérums de référence.

Interprétation

Enregistrer les résultats de l'épreuve de neutralisation et le titre du virus utilisé pour l'épreuve après 3 jours d'incubation à 37 °C. Les titres sériques sont considérés comme négatifs s'il n'y a pas de neutralisation à une dilution de 1/11.

8. Peste porcine

Les épreuves de dépistage de la peste porcine classique sont effectuées conformément à l'annexe I de la directive 80/217/CEE du Conseil (1).

9. Leptospirose

Les épreuves de dépistage de la leptospirose sur les animaux de l'espèce porcine sont effectuées conformément au chapitre 1^{er} point 6 de la présente annexe.

(1) JO n° L 47 du 21. 2. 1980, p. 11.

ANNEXE II

CONDITIONS MINIMALES D'AGRÈMENT DES MARCHÉS POUR LES ÉCHANGES D'ANIMAUX DES ESPÈCES BOVINE OU PORCINE DESTINÉS AUX EXPORTATIONS VERS LA COMMUNAUTÉ EUROPÉENNE

1. Les marchés doivent être supervisés par un vétérinaire officiel.
2. Les marchés doivent être situés au centre d'une zone de 20 km de rayon dans laquelle, selon des constatations officielles, ne se sont déclarés au cours des trente jours précédant leur utilisation comme marchés agréés, aucun cas de fièvre aphteuse ni, lorsque les marchés sont agréés pour les porcins, aucun cas de peste porcine, de maladie vésiculeuse du porc ou d'encéphalomyélite entérovirale du porc (maladie de Teschen).
3. Les marchés doivent, avant leur utilisation comme marchés agréés, être nettoyés et désinfectés à l'aide d'un désinfectant officiellement autorisé dans le pays exportateur comme permettant de lutter efficacement contre les maladies mentionnées au point 2 ci-dessus.
4. Les centres de rassemblement, lieux d'embarquement ou autres lieux par lesquels passent des animaux des espèces bovine ou porcine destinés à l'exportation vers la Communauté européenne doivent répondre aux conditions mentionnées aux points 1, 2 et 3 de la présente annexe.
5. Tous les animaux des espèces bovine ou porcine passant par des marchés agréés doivent répondre aux conditions sanitaires prévues pour l'importation dans la Communauté européenne de la catégorie considérée d'animaux.
6. Les animaux destinés à être exportés vers la Communauté européenne passant par des marchés agréés doivent, dans les six jours qui suivent, être embarqués et acheminés directement vers la frontière du pays exportateur:
 - a) sans entrer en contact avec des animaux biongulés autres que des animaux des espèces bovine ou porcine répondant aux conditions sanitaires prévues pour l'importation dans la Communauté européenne de la catégorie considérée d'animaux;
 - b) répartis en lots de telle sorte qu'aucun lot ne contienne à la fois des animaux d'élevage ou de rente et des animaux destinés à l'abattage immédiat;
 - c) dans des véhicules de transport ou des conteneurs préalablement nettoyés et désinfectés à l'aide d'un désinfectant officiellement autorisé dans le pays exportateur comme permettant de lutter efficacement contre les maladies énumérées au point 2 ci-dessus, et construits de telle manière que les fèces, l'urine, les litières ou les aliments ne puissent s'échapper ou tomber du véhicule pendant le transport.
7. Lorsque les conditions prévues pour l'exportation d'animaux vers la Communauté exigent qu'un test soit effectué dans un délai spécifié avant l'embarquement, ledit délai englobe toute période de rassemblement, limitée à six jours, consécutive au passage des animaux par des marchés agréés.
8. Le pays exportateur désigne les marchés agréés pour les animaux d'élevage ou de rente ainsi que les marchés agréés pour les animaux de boucherie et notifie à la Commission ainsi qu'aux autorités centrales compétentes des États membres les noms et adresses desdits marchés.
9. Le pays exportateur arrête la procédure de supervision officielle des marchés, centres de rassemblement et lieux d'embarquement et veille à ce que ladite supervision soit effectuée.
10. Le pays exportateur veille à ce que des informations relatives aux marchés et centres de rassemblement soient incluses dans la section y relative des certificats sanitaires qui accompagnent les animaux exportés vers la Communauté européenne.