

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 10 décembre 2008

modifiant l'annexe C de la directive 64/432/CEE du Conseil et la décision 2004/226/CE en ce qui concerne les tests de diagnostic de la brucellose bovine

[notifiée sous le numéro C(2008) 7642]

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

(2008/984/CE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu 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⁾, et notamment son article 6, paragraphe 2, point b), et son article 16, paragraphe 1, deuxième alinéa,

considérant ce qui suit:

- (1) L'annexe C de la directive 64/432/CEE décrit les méthodes de diagnostic de la brucellose bovine devant être utilisées pour la lutte contre cette maladie et son éradication, pour la surveillance et le contrôle, pour l'établissement et le maintien du statut de troupeau officiellement indemne de brucellose ainsi que pour la certification nécessaire dans le cadre des échanges intracommunautaires d'animaux de l'espèce bovine.
- (2) La décision 2004/226/CE de la Commission du 4 mars 2004 autorisant les essais de recherche d'anticorps contre la brucellose bovine dans le cadre de la directive 64/432/CEE du Conseil⁽²⁾ autorise, pour la brucellose bovine, certains essais pouvant être utilisés en remplacement de l'épreuve de séro-agglutination, obligatoire pour la certification des animaux de l'espèce bovine en vertu de l'article 6, paragraphe 2, point b), de la directive 64/432/CEE.
- (3) Le test de polarisation de fluorescence est un nouveau test de diagnostic qui a été inclus, en tant qu'épreuve prescrite pour les échanges internationaux, dans le chapitre 2.4.3 (brucellose bovine) du *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres*, sixième édition, 2008, de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE).
- (4) La Commission a invité l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) à émettre un avis scientifique visant à déterminer si le test de polarisation de fluorescence peut être inscrit à l'annexe C de la directive 64/432/CEE.
- (5) En outre, la Commission a prié l'EFSA d'évaluer la pertinence du test de polarisation de fluorescence et des essais énumérés à l'article 1^{er} de la décision 2004/226/CE aux fins de la certification des animaux de l'espèce bovine destinés aux échanges intracommunautaires.
- (6) Le 11 décembre 2006, le groupe sur la santé animale et le bien-être des animaux a adopté un avis scientifique concernant les méthodes de diagnostic de la brucellose chez les bovins⁽³⁾, dans lequel il conclut qu'à l'exception de l'épreuve de séro-agglutination, les tests de diagnostic de la brucellose bovine inscrits à l'annexe C de la directive 64/432/CEE demeurent des tests de référence adaptés aux fins de la certification des animaux de l'espèce bovine destinés aux échanges intracommunautaires.
- (7) Cependant, étant donné que l'épreuve de séro-agglutination est celle dont la réalisation, avant tout mouvement de bovins dans le cadre d'échanges, est expressément prescrite par l'article 6, paragraphe 2, point b), de la directive 64/432/CEE, il y a lieu de faire figurer une description technique de cette épreuve à l'annexe C de ladite directive.
- (8) En outre, l'avis scientifique du 11 décembre 2006 établit que le test de polarisation de fluorescence présente une sensibilité et une spécificité comparables à celles des tests inscrits à l'annexe C de la directive 64/432/CEE et peut être inscrit à ladite annexe en tant que test de référence pour le diagnostic de la brucellose chez les bovins destinés aux échanges intracommunautaires.
- (9) Les techniques récentes d'amplification en chaîne par polymérase, décrites au point 1 d) du chapitre 2.4.3 du *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres*, sixième édition, 2008, de l'OIE, constituent un moyen supplémentaire de détection et d'identification de *Brucella* spp. et devraient donc être inscrites à l'annexe C de la directive 64/432/CEE.
- (10) Il convient dès lors de modifier l'annexe C de la directive 64/432/CEE et la décision 2004/226/CE en conséquence.
- (11) Les mesures prévues par la présente décision sont conformes à l'avis du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale,

(1) JO L 121 du 29.7.1964, p. 1977/64.

(2) JO L 68 du 6.3.2004, p. 36.

(3) http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620727231.htm

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

L'annexe C de la directive 64/432/CEE est remplacée par le texte figurant à l'annexe de la présente décision.

Article 2

L'article 1^{er} de la décision 2004/226/CE est remplacé par le texte suivant:

«*Article premier*

L'épreuve de fixation du complément, l'épreuve à l'antigène brucellique tamponné (test au rose bengale), les tests ELISA et

le test de polarisation de fluorescence effectués conformément aux dispositions de l'annexe C de la directive 64/432/CEE sont autorisés aux fins de la certification.»

Article 3

Les États membres sont destinataires de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 10 décembre 2008.

Par la Commission

Androulla VASSILIOU

Membre de la Commission

ANNEXE

1) À l'annexe C de la directive 64/432/CEE, les points 1, 2 et 3 sont remplacés par le texte suivant:

«ANNEXE C

BRUCELLOSE

1. IDENTIFICATION DE L'AGENT

La démonstration par coloration acido-résistante modifiée ou immunospécifique de la présence d'organismes ayant la morphologie de *Brucella* dans des matières abortives, des sécrétions vaginales ou du lait indique la possibilité de brucellose, notamment lorsqu'elle est corroborée par des tests sérologiques. Les techniques d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) constituent un moyen supplémentaire de détection.

Les *Brucella* doivent, si possible, être recherchées par culture, sur des milieux sélectifs ou non, à partir de sécrétions utérines, d'avortons, de sécrétions mammaires ou d'organes comme les nœuds lymphatiques et les organes reproducteurs mâles et femelles.

Une fois les micro-organismes isolés, l'espèce et le biovar doivent être identifiés par lyse de phages et/ou des tests du métabolisme oxydatif selon des critères culturels, biochimiques et sérologiques. La PCR peut servir à la fois de technique complémentaire et de méthode de typage fondée sur des séquences génomiques spécifiques.

Les techniques et les milieux utilisés, leur standardisation et l'interprétation des résultats doivent être conformes aux indications figurant dans le *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres* de l'OIE, sixième édition, 2008, chapitre 2.4.3 (brucellose bovine), chapitre 2.7.2 (brucelloses caprine et ovine) et chapitre 2.8.5 (brucellose porcine).

2. TESTS IMMUNOLOGIQUES

2.1. Normes

2.1.1. La souche n° 99 de Weybridge ou la souche USDA 1119-3 du biovar 1 de *Brucella abortus* doit être utilisée pour la préparation de tous les antigènes employés dans le test au rose bengale, l'épreuve de séro-agglutination, l'épreuve de fixation du complément et l'épreuve de l'anneau sur le lait.

2.1.2. Le sérum étalon pour les tests susmentionnés est le sérum étalon international de l'OIE (OIEISS) antérieurement dénommé second sérum étalon international anti-*Brucella abortus* de l'OMS.

2.1.3. Les sérums étalons pour les épreuves d'immuno-absorption enzymatique (tests ELISA) sont les suivants:

- le sérum étalon de référence international de l'OIE (OIEISS),
- le sérum étalon ELISA faiblement positif de l'OIE (OIEELISA_{WP}SS),
- le sérum étalon ELISA fortement positif de l'OIE (OIEELISA_{SP}SS),
- le sérum étalon ELISA négatif de l'OIE (OIEELISA_NSS).

2.1.4. Les sérums étalons pour les tests de polarisation de fluorescence (tests FPA) sont les suivants:

- le sérum étalon ELISA faiblement positif de l'OIE (OIEELISA_{WP}SS),
- le sérum étalon ELISA fortement positif de l'OIE (OIEELISA_{SP}SS),
- le sérum étalon ELISA négatif de l'OIE (OIEELISA_NSS).

2.1.5. Les sérums étalons énumérés aux points 2.1.3 et 2.1.4 sont fournis par le laboratoire communautaire de référence pour la brucellose ou l'Agence des laboratoires vétérinaires ["Veterinary Laboratories Agency (VLA)"], de Weybridge (Royaume-Uni).

- 2.1.6. Les sérums étalons OIEISS, OIEELISA_{WP}SS, OIEELISA_{Sp}SS et OIEELISA_NSS sont des étalons primaires internationaux à partir desquels des étalons secondaires nationaux ("étalons de travail") doivent être établis pour chaque test visé au point 2.1.1 dans chaque État membre.
- 2.2. **Épreuves d'immuno-absorption enzymatique (ELISA) ou autres épreuves d'agglutination destinées à la détection de la brucellose bovine dans le sérum ou le lait**
- 2.2.1. *Matériel et réactifs*
- La technique utilisée et l'interprétation des résultats doivent avoir été validées conformément aux principes établis au chapitre 1.1.4 de la sixième édition de 2008 du *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres* de l'OIE et doivent comprendre au minimum des études de laboratoire et de diagnostic.
- 2.2.2. *Standardisation de l'épreuve*
- 2.2.2.1. Standardisation de la procédure de test pour les échantillons individuels de sérum:
- une prédilution du sérum OIEISS au 1/150 ⁽¹⁾ ou une prédilution du sérum OIEELISA_{WP}SS au 1/2 ou une prédilution du sérum OIEELISA_{Sp}SS au 1/16 réalisée dans un sérum négatif (ou dans un mélange de sérums négatifs) doit produire une réaction positive;
 - une prédilution du sérum OIEISS au 1/600 ou une prédilution du sérum OIEELISA_{WP}SS au 1/8 ou une prédilution du sérum OIEELISA_{Sp}SS au 1/64 réalisée dans un sérum négatif (ou dans un mélange de sérums négatifs) doit produire une réaction négative;
 - le sérum OIEELISA_NSS doit dans tous les cas produire une réaction négative.
- 2.2.2.2. Standardisation de la procédure de test pour les échantillons de sérums en mélange:
- une prédilution du sérum OIEISS au 1/150 ou une prédilution du sérum OIEELISA_{WP}SS au 1/2 ou une prédilution du sérum OIEELISA_{Sp}SS au 1/16 réalisée dans un sérum négatif (ou dans un mélange de sérums négatifs) et à nouveau diluée dans des sérums négatifs avec un facteur de dilution identique au nombre de sérums constituant le mélange doit produire une réaction positive;
 - le sérum OIEELISA_NSS doit dans tous les cas produire une réaction négative;
 - le test doit être en mesure de détecter la présence d'une infection chez un seul animal du groupe d'animaux dont des échantillons de sérum constituent le mélange.
- 2.2.2.3. Standardisation de la procédure de test pour les mélanges de lait ou de lactosérum:
- une prédilution du sérum OIEISS au 1/1 000 ou une prédilution du sérum OIEELISA_{WP}SS au 1/16 ou une prédilution du sérum OIEELISA_{Sp}SS au 1/125 réalisée dans un sérum négatif (ou dans un mélange de sérums négatifs) et diluée à nouveau au 1/10 dans du lait négatif doit produire une réaction positive;
 - le sérum OIEELISA_NSS dilué au 1/10 dans du lait négatif doit produire dans tous les cas une réaction négative;
 - le test doit être en mesure de détecter la présence d'une infection chez un seul animal du groupe d'animaux dont des échantillons de lait ou de lactosérum constituent le mélange.
- 2.2.3. *Conditions d'utilisation des tests ELISA dans le diagnostic de la brucellose bovine*
- 2.2.3.1. Si l'on utilise les conditions de standardisation mentionnées aux points 2.2.2.1 et 2.2.2.2 pour les tests ELISA sur des échantillons de sérum, la sensibilité diagnostique de l'ELISA doit être égale ou supérieure à celle du test au rose bengale ou de l'épreuve de fixation du complément compte tenu de la situation épidémiologique dans laquelle l'épreuve est utilisée.
- 2.2.3.2. Si l'on utilise les conditions de standardisation mentionnées au point 2.2.2.3 pour l'ELISA sur des échantillons de lait en mélange, la sensibilité diagnostique de l'ELISA doit être égale ou supérieure à celle de l'épreuve de l'anneau sur le lait compte tenu non seulement de la situation épidémiologique mais également des effectifs moyens ou élevés des élevages considérés.
- 2.2.3.3. Lorsque les tests ELISA sont utilisés à des fins de certification conformément à l'article 6, paragraphe 1, ou pour l'établissement et le maintien du statut d'un troupeau conformément à l'annexe A, titre II, point 10, le mélange d'échantillons de sérum doit être effectué de manière à ce que les résultats des tests puissent être rapportés de manière indiscutable aux différents animaux inclus dans le mélange. Tout test de confirmation doit être effectué sur des échantillons de sérum individuels.

⁽¹⁾ Aux fins de la présente annexe, les dilutions indiquées pour la préparation des réactifs liquides sont exprimées par exemple comme 1/150, c'est-à-dire une dilution de 1 pour 150.

2.2.3.4. Les tests ELISA peuvent être appliqués à un échantillon de lait prélevé sur le lait collecté dans une exploitation comptant au moins 30 % de vaches en période de lactation. Si cette méthode est utilisée, des mesures doivent être prises afin que les échantillons prélevés pour être examinés puissent être rapportés de manière indiscutable aux différents animaux dont provient le lait. Tout test de confirmation doit être effectué sur des échantillons de sérum individuels.

2.3. Test de fixation du complément (TFC)

2.3.1. L'antigène consiste en une suspension bactérienne dans une solution saline phénolée [NaCl à 0,85 % (m/v) et phénol à 0,5 % (v/v)] ou dans du tampon véronal. L'antigène peut être livré à l'état concentré pour autant que le facteur de dilution à utiliser soit mentionné sur l'étiquette du flacon. L'antigène doit être stocké à une température de 4 °C et ne doit pas être congelé.

2.3.2. Les sérums doivent être inactivés de la manière suivante:

— sérum bovin: à une température de 56 à 60 °C pendant 30 à 50 minutes,

— sérum porcin: à une température de 60 °C pendant 30 à 50 minutes.

2.3.3. Afin d'obtenir une réaction satisfaisante, il y a lieu d'utiliser une dose de complément supérieure à la dose minimale nécessaire pour une hémolyse complète.

2.3.4. Les contrôles suivants doivent être effectués lors de chaque série d'épreuves de fixation du complément:

- a) contrôle du pouvoir 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.

2.3.5. Calcul des résultats

Le sérum étalon OIEISS contient 1 000 unités internationales de FC (UIFC) par ml. Si le sérum étalon est testé dans une méthode donnée, le résultat est exprimé sous la forme d'un titre (c.-à-d. la dilution directe la plus élevée du sérum OIEISS provoquant une hémolyse à 50 %, T_{OIEISS}). Le résultat de l'épreuve pour un sérum exprimé sous la forme de titre ($T_{\text{SÉRUM}}$) doit être converti en UIFC par ml. De manière à convertir l'expression d'un titre en UIFC, le facteur F nécessaire à la conversion du titre d'un sérum inconnu ($T_{\text{SÉRUM}}$) éprouvé au moyen de cette méthode est obtenu au moyen de la formule suivante:

$$F = 1\,000 \times 1/T_{\text{OIEISS}}$$

et le contenu en UIFC par ml du sérum ($\text{UIFC}_{\text{SÉRUM}}$) par la formule:

$$\text{UIFC}_{\text{SÉRUM}} = F \times T_{\text{SÉRUM}}$$

2.3.6. Interprétation des résultats

Un sérum contenant 20 UIFC par ml ou plus est considéré comme positif.

2.4. Épreuve de l'anneau sur le lait

2.4.1. L'antigène consiste en une suspension bactérienne dans une solution saline phénolée [NaCl à 0,85 % (m/v) et phénol à 0,5 % (v/v)] colorée à l'hématoxyline. L'antigène doit être stocké à une température de 4 °C et ne doit pas être congelé.

2.4.2. La sensibilité de l'antigène doit être étalonnée par rapport au sérum étalon OIEISS de manière à obtenir une réaction positive avec une dilution au 1/500 de ce sérum étalon dans du lait négatif et une réaction négative à une dilution au 1/1 000 de ce même sérum.

- 2.4.3. L'épreuve de l'anneau doit être effectuée sur des échantillons représentatifs du contenu de chaque bidon de lait ou du contenu de chaque cuve de l'exploitation.
- 2.4.4. Les échantillons de lait ne doivent pas avoir été congelés, chauffés ni violemment agités.
- 2.4.5. La réaction doit être réalisée en utilisant l'une des méthodes suivantes:
- sur une colonne de lait d'au moins 25 mm de hauteur et un volume de lait de 1 ml additionné de 0,03 ou 0,05 ml d'un antigène coloré et titré,
 - sur une colonne de lait d'au moins 25 mm de hauteur et un volume de lait de 2 ml additionné de 0,05 ml d'un antigène coloré et titré,
 - sur un volume de lait de 8 ml additionné de 0,08 ml d'un antigène coloré et titré.
- 2.4.6. Le mélange de lait et d'antigène doit être incubé à 37 °C pendant 60 minutes et l'épreuve doit être effectuée parallèlement sur des laits de contrôle positif et négatif. La sensibilité de l'épreuve est améliorée si l'incubation est prolongée à 4 °C durant une période de 16 à 24 heures.
- 2.4.7. Interprétation des résultats:
- a) réaction négative: lait coloré, crème non colorée;
 - b) réaction positive:
 - lait et crème colorés de façon identique, ou
 - lait non coloré et crème colorée.

2.5. Épreuve à l'antigène brucellique tamponné (test au rose bengale)

- 2.5.1. L'antigène consiste en une suspension bactérienne dans un diluant d'antigène de *Brucella* tamponné à pH 3,65 ± 0,05 colorée au rose bengale. L'antigène doit être livré prêt à l'emploi, stocké à une température de 4 °C et ne doit pas être congelé.
- 2.5.2. L'antigène est préparé sans référence à la concentration cellulaire, mais sa sensibilité doit être étalonnée par rapport au sérum étalon OIEISS de manière à obtenir une réaction positive pour une dilution du sérum au 1/45 et une réaction négative pour une dilution au 1/55.
- 2.5.3. Le test au rose bengale est réalisé de la manière suivante:
- a) le sérum (20-30 µl) est mélangé avec un volume égal d'antigène sur un carreau blanc ou une plaque émaillée pour produire une zone d'un diamètre de 2 cm environ. Le mélange est agité délicatement pendant quatre minutes à la température ambiante puis est observé sous un bon éclairage pour visualiser toute agglutination;
 - b) une méthode automatisée peut être utilisée pour autant qu'elle soit au moins aussi sensible et exacte que la méthode manuelle.
- 2.5.4. *Interprétation des résultats*
- Toute réaction visible est considérée comme positive à moins que le séchage ne soit excessif sur les bords.
- Des sérums de contrôle positifs et négatifs doivent être inclus dans chaque série d'épreuves.

2.6. Épreuve de séro-agglutination

- 2.6.1. L'antigène consiste en une suspension bactérienne dans une solution saline au phénol [NaCl à 0,85 % (m/v) et phénol à 0,5 % (v/v)].

Le formaldéhyde ne doit pas être utilisé.

L'antigène peut être livré à l'état concentré pour autant que le facteur de dilution à utiliser soit mentionné sur l'étiquette du flacon.

De l'EDTA peut être ajouté à la suspension d'antigène jusqu'à l'obtention d'une dilution finale d'épreuve de 5 mM afin de réduire le taux de réactions faussement positives dans l'épreuve de séro-agglutination. Le pH doit ultérieurement être réajusté à 7,2 dans la suspension d'antigène.

- 2.6.2. Le sérum étalon OIEISS contient 1 000 unités internationales d'agglutination.
- 2.6.3. L'antigène est préparé sans référence à la concentration cellulaire mais sa sensibilité doit être étalonnée par rapport au sérum étalon OIEISS de manière à obtenir une agglutination de 50 % pour une dilution finale du sérum entre le 1/600 et le 1/1 000 ou une agglutination de 75 % pour une dilution finale du sérum entre le 1/500 et le 1/750.

Il peut également être utile de comparer la réactivité des nouveaux lots d'antigène et des lots d'antigène étalonnés antérieurement en utilisant un groupe de sérums définis.

- 2.6.4. Le test est effectué dans des tubes ou sur des microplaques. Le mélange d'antigène et de dilutions de sérum doit être incubé pendant une durée de 16 à 24 heures à une température de 37 °C.

Trois dilutions au moins doivent être préparées pour chaque sérum. Les dilutions de sérum suspect doivent être effectuées de manière à ce que la lecture de la réaction à la limite de la positivité soit réalisée dans le tube intermédiaire (ou le puits intermédiaire pour la méthode des microplaques).

- 2.6.5. *Interprétation des résultats*

Le degré d'agglutination de *Brucella* dans un sérum doit être exprimé en UI par ml.

Un sérum contenant 30 UI par ml ou plus est considéré comme positif.

2.7. Test de polarisation de fluorescence

- 2.7.1. Le test de polarisation de fluorescence peut être effectué dans des tubes de verre ou sur des microplaques 96 puits. La technique utilisée, sa standardisation et l'interprétation des résultats doivent être conformes aux indications figurant au chapitre 2.4.3 (brucellose bovine) du *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres* de l'OIE, sixième édition, 2008.

- 2.7.2. *Standardisation de l'épreuve*

Le test de polarisation de fluorescence est standardisé de manière à ce que:

- les sérums OIEELISA_{Sp}SS et OIEELISA_{Wp}SS donnent systématiquement un résultat positif;
- une prédilution du sérum OIEELISA_{Wp}SS au 1/8 ou une prédilution du sérum OIEELISA_{Sp}SS au 1/64 réalisée dans un sérum négatif (ou dans un mélange de sérums négatifs) produise dans tous les cas une réaction négative;
- le sérum OIEELISA_NSS produise dans tous les cas une réaction négative.

Doivent être inclus dans chaque lot de tests: des étalons de travail fortement positif, faiblement positif et négatif (étalonnés par rapport aux sérums étalons ELISA de l'OIE).

3. TESTS COMPLÉMENTAIRES

3.1. Test cutané de la brucellose

3.1.1. Conditions d'utilisation du test

- Le test cutané de la brucellose ne peut pas être utilisé à des fins de certification dans les échanges intracommunautaires.
- Le test cutané de la brucellose est l'une des épreuves les plus spécifiques pour la détection de la brucellose chez les animaux non vaccinés; le diagnostic ne doit toutefois pas reposer uniquement sur des réactions intradermiques positives.
- Les animaux de l'espèce bovine ayant produit un résultat négatif à l'un des tests sérologiques définis à la présente annexe et une réaction positive au test cutané de la brucellose sont considérés comme infectés ou soupçonnés être infectés.
- Les animaux de l'espèce bovine ayant donné un résultat positif à l'un des tests sérologiques définis à la présente annexe peuvent être soumis à un test cutané de la brucellose afin de confirmer l'interprétation des résultats des tests sérologiques, notamment quand une réaction croisée avec des anticorps dirigés contre d'autres bactéries ne peut être exclue dans le cas des troupeaux bovins officiellement indemnes de brucellose ou indemnes de brucellose.

- 3.1.2. L'épreuve doit être effectuée en utilisant une préparation allergénique standardisée et définie ne contenant pas d'antigène lipopolysidique (LPS) lisse, celui-ci pouvant provoquer des réactions inflammatoires non spécifiques ou interférer avec des tests sérologiques ultérieurs.

Les conditions applicables à la production de brucelline sont décrites en détail à la section C1 du chapitre 2.4.3 du *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres* de l'OIE, sixième édition, 2008.

3.1.3. *Procédure du test*

- 3.1.3.1. Un volume de 0,1 ml d'allergène de la brucellose est injecté par voie intradermique au pli caudal, au flanc ou sur le côté de l'encolure.

- 3.1.3.2. Le test est lu au bout de 48 à 72 heures.

- 3.1.3.3. Avant l'injection et lors du réexamen, l'épaisseur de la peau au site d'injection est mesurée avec un cutimètre.

3.1.3.4. *Interprétation des résultats*

Les réactions fortes sont facilement identifiables en raison d'une inflammation et d'une induration locales.

Un épaissement de la peau de 1,5 à 2 mm est considéré comme réaction positive au test cutané de la brucellose.

3.2. **Test d'immuno-absorption enzymatique de compétition (cELISA)**

3.2.1. *Conditions d'utilisation du test cELISA*

Le test cELISA ne peut pas être utilisé à des fins de certification dans les échanges intracommunautaires.

Les animaux de l'espèce bovine ayant donné un résultat positif à l'un des autres tests sérologiques définis à la présente annexe peuvent être soumis à un test cELISA afin de confirmer l'interprétation des résultats des autres tests sérologiques, notamment quand une réaction croisée avec des anticorps dirigés contre d'autres bactéries ne peut être exclue dans le cas des troupeaux bovins officiellement indemnes de brucellose ou indemnes de brucellose ou afin d'éliminer les réactions dues aux anticorps résiduels liés à la vaccination par le B19.

3.2.2. *Procédure du test*

Le test sera réalisé selon les prescriptions figurant à la section B2 du chapitre 2.4.3 du *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres* de l'OIE, sixième édition, 2008.»

- 2) À l'annexe C de la directive 64/432/CEE, le point 4.1 est remplacé par le texte suivant:

«4.1. **Tâches et responsabilités**

Les tâches des laboratoires nationaux de référence sont les suivantes:

- a) approbation des résultats des études de validation démontrant la fiabilité de la méthode de test utilisée dans l'État membre;
- b) détermination du nombre maximal d'échantillons pouvant constituer un mélange dans les kits ELISA utilisés;
- c) étalonnage des étalons de travail visés au point 2.1.6;
- d) contrôles de la qualité de tous les lots de kits ELISA et d'antigènes utilisés dans l'État membre;
- e) application des recommandations du laboratoire communautaire de référence pour la brucellose et coopération avec ce dernier.»