DÉCISION DE LA COMMISSION

du 15 décembre 2009

modifiant l'annexe D de la directive 64/432/CEE du Conseil en ce qui concerne les tests de diagnostic pour la leucose bovine enzootique

[notifiée sous le numéro C(2009) 9951]

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

(2009/976/UE)

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union 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 16, paragraphe 2,

considérant ce qui suit:

(1) La directive 64/432/CEE s'applique aux échanges de bovins à l'intérieur de l'Union européenne, et son annexe D, chapitre II, établit les tests de diagnostic de la leucose bovine enzootique (LBE) qui doivent être utilisés dans la lutte contre cette maladie, à des fins d'éradication, de surveillance et de suivi, pour l'établissement et le maintien du statut de troupeau officiellement indemne de leucose bovine enzootique, ainsi que pour la certification nécessaire dans le cadre des échanges d'animaux de l'espèce bovine à l'intérieur de l'Union européenne.

(2) L'annexe D, chapitre II, de la directive 64/432/CEE prévoit que les tests de diagnostic de la LBE doivent être effectués soit par immunodiffusion en gélose (AGID), au moyen d'un antigène standardisé par rapport au sérum étalon officiel de la CE (le sérum EI), soit par un essai d'immuno-absorption enzymatique (ELISA), standardisé par rapport au sérum E4. Les deux sérums étalons sont fournis par le *National Veterinary Institute* de la *Technical University of Denmark*.

(3) Un nouveau sérum étalon pour la LBE (le sérum E05) a récemment été mis au point par le laboratoire allemand de référence de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) pour la leucose bovine enzootique (le *Friedrich-Loeffler-Institut*), en collaboration avec les laboratoires de référence de l'OIE au Royaume-Uni (*Veterinary Laboratories Agency*) et en Pologne (*National Veterinary Research Institute*), après avoir fait l'objet d'un essai circulaire dans ces laboratoires. Le sérum E05 a été validé par comparaison avec les sérums EI et E4 au moyen de différents tests AGID et ELISA et a dès lors été ajouté au chapitre 2.4.11, section B, point 2, du Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE, 2008, sixième édition, en tant que sérum étalon approuvé par l'OIE. Ce sérum est disponible auprès du laboratoire de référence de l'OIE en Allemagne pour la leucose bovine enzootique.

(4) Par ailleurs, le *National Veterinary Institute* de la *Technical University of Denmark* a fait savoir à la Commission qu'il n'était plus en mesure de remplir ses obligations concernant la fourniture des sérums étalons actuellement prévus par l'annexe D, chapitre II, de la directive 64/432/CEE.

(5) Les autorités compétentes allemandes et le *Friedrich-Loeffler-Institut* ont accepté de fournir le sérum E05, lequel devient par conséquent le nouveau sérum étalon officiel de l'Union européenne (UE) pour la LBE.

(6) Il y a donc lieu de modifier la directive 64/432/CEE en conséquence.

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

A ADOPTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

À l'annexe D de la directive 64/432/CEE, le chapitre II est remplacé par le texte figurant en annexe de la présente décision.

Article 2

Les États membres sont destinataires de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 15 décembre 2009.

Par la Commission
Androulla VASSILIOU
Membre de la Commission

[1] JO 121 du 29.7.1964, p. 1977/64.

ANNEXE

À l'annexe D de la directive 64/432/CEE, le chapitre II est remplacé par le texte suivant:

«CHAPITRE II

ÉPREUVES POUR LA RECHERCHE DE LA LEUCOSE BOVINE ENZOOTIQUE

La recherche de la leucose bovine enzootique est effectuée au moyen d'une épreuve d'immunodiffusion en gélose (AGID), dans les conditions décrites aux sections A et B ci-après, ou d'une épreuve d'immuno-absorption enzymatique (ELISA), dans les conditions décrites à la section C. La méthode de l'immunodiffusion en gélose est réservée aux échantillons 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 en gélose.

Les tests AGID et ELISA doivent être standardisés par rapport au sérum E05, sérum étalon officiel de l'Union européenne, qui sera fourni par l'organisme suivant:

Friedrich-Loeffler-Institut
Federal Research Institute for Animal Health
Laboratoire de référence de l'OIE pour la leucose bovine enzootique (LBE)
Südufer 10
17493 Greifswald — Insel Riems
ALLEMAGNE

A. **Épreuve d'immunodiffusion en gélose pour la recherche de la leucose bovine enzootique**

1. L'antigène à utiliser dans cette épreuve doit contenir la glycoprotéine du virus de la leucose bovine. L'antigène doit être standardisé par rapport au sérum E05.

2. Les instituts d'État, laboratoires nationaux de référence ou instituts officiels désignés conformément à l'article 6 *bis* pour coordonner les normes et les méthodes de diagnostic pour la recherche de la leucose bovine enzootique sont chargés d'étalonner l'antigène standard de travail du laboratoire par rapport au sérum E05.

3. Les antigènes étalons utilisés en laboratoire doivent être soumis au moins une fois par an aux instituts d'État, laboratoires nationaux de référence ou instituts officiels désignés conformément à l'article 6 *bis* pour y être testés par rapport au sérum E05. En dehors de cette standardisation, l'antigène utilisé peut être étalonné conformément à la méthode décrite à la section B.

4. L'épreuve met en œuvre les réactifs suivants:

   a) un antigène: cet antigène doit contenir la glycoprotéine spécifique du virus de la leucose bovine enzootique standardisé par rapport au sérum E05;

   b) le sérum à tester;

   c) un sérum de contrôle positif connu;

   d) une gélose:

      — 0,8 % d'agar-agar,

      — 8,5 % de NaCl,

      — un 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 épaisseur de 2,6 millimètres de gélose.

5. Un dispositif expérimental de sept puits exempts d'humidité est réalisé par perforation de la gélose jusqu'au fond de la plaque; ce dispositif consiste en un puits central autour duquel s'ordonnent six puits périphériques disposés en cercle.

   Diamètre du puits central: 4 millimètres.

   Diamètre des puits périphériques: 6 millimètres.

   Distance entre le puits central et les puits périphériques: 3 millimètres.

6. Le puits central est rempli de l'antigène étalon. Les puits périphériques 1 et 4 décrits à la section B, point 3, sont remplis avec le sérum positif connu, les puits 2, 3, 5 et 6 avec les sérums à tester. Les puits doivent être remplis 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 soixante-douze heures à température ambiante (20-27 °C) dans une enceinte humide fermée.

9. L'épreuve peut être lue après vingt-quatre heures, puis après quarante-huit heures, mais aucun résultat final ne peut être obtenu avant soixante-douze heures:

   a) un sérum d'essai 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;

   b) un sérum d'essai est négatif s'il ne forme 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;

   c) la réaction ne peut pas être considérée comme concluante si:

      i) elle infléchit la courbe du sérum de contrôle vers le puits de l'antigène du virus de la leucose bovine sans former une courbe de précipitation visible avec l'antigène; ou

      ii) s'il n'est pas possible de l'interpréter comme négative ou positive.

   Pour les réactions non concluantes, on peut répéter l'épreuve et utiliser du sérum concentré.

10. Toute autre configuration ou tout autre dispositif de puits peut être utilisé pour autant que le sérum E05 dilué au 1/10 dans du sérum négatif puisse être identifié comme positif.

B. **Méthode de standardisation de l'antigène**

1. Solutions et matériels nécessaires

   a) 40 millilitres de gélose à 1,6 % dans un tampon Tris 0,05 M/HCl, pH 7,2, avec 8,5 % de NaCl;

   b) 15 millilitres d'un sérum de leucose bovine n'ayant d'anticorps qu'à l'égard des glycoprotéines du virus de la leucose bovine et dilué au 1/10 dans un tampon Tris 0,05 M/HCl, pH 7,2, avec 8,5 % de NaCl;

   c) 15 millilitres d'un sérum de leucose bovine n'ayant d'anticorps qu'à l'égard des glycoprotéines du virus de la leucose bovine et dilué au 1/5 dans un tampon Tris 0,05 M/HCl, pH 7,2, avec 8,5 % de NaCl;

   d) quatre boîtes de Petri en matière plastique, d'un diamètre de 85 millimètres;

   e) un poinçon d'un diamètre de 4 à 6 millimètres;

   f) un antigène de référence;

   g) l'antigène à standardiser;

   h) un bain d'eau (à 56 °C).

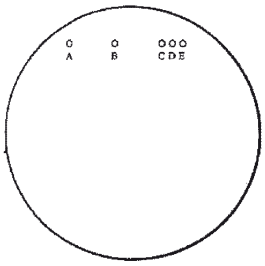
2. Mode opératoire

   Dissoudre la gélose (1,6 %) dans le tampon Tris/HCl en chauffant avec précaution jusqu'à 100 °C. Placer cette solution dans le bain d'eau à 56 °C pendant environ une heure. Placer aussi les dilutions de sérum de leucose bovine dans un bain d'eau à 56 °C.

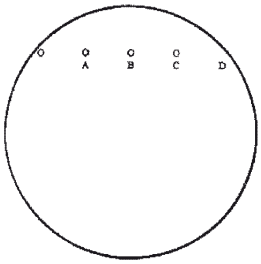
   Mélanger ensuite 15 millilitres de la solution de gélose à 56 °C avec les 15 millilitres de sérum de leucose bovine (1/10), agiter énergiquement et verser dans deux boîtes de Petri, à raison de 15 millilitres par boîte. Recommencer les opérations précédemment décrites avec le sérum de la leucose bovine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

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

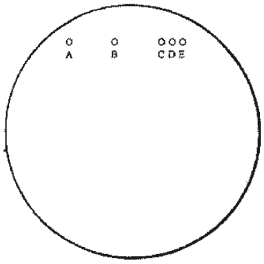
Boîte de Petri n° 1
Sérum 1/10



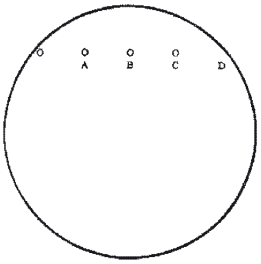
Boîte de Petri n° 2
Sérum 1/10



Boîte de Petri n° 3
Sérum 1/5



Boîte de Petri n° 4
Sérum 1/5



3. Addition d'antigènes

a) Boîtes de Petri n^{os} 1 et 3:

i) puits A = antigène de référence non dilué;

ii) puits B = antigène de référence dilué à 1/2;

iii) puits C et E = antigène de référence;

iv) puits D = antigène à tester, non dilué.

b) Boîtes de Petri n^{os} 2 et 4:

i) puits A = antigène à tester, non dilué;

ii) puits B = antigène à tester, dilué à 1/2;

iii) puits C = antigène à tester, dilué à 1/4;

iv) puits D = antigène à tester, dilué à 1/8.

4. Instructions complémentaires

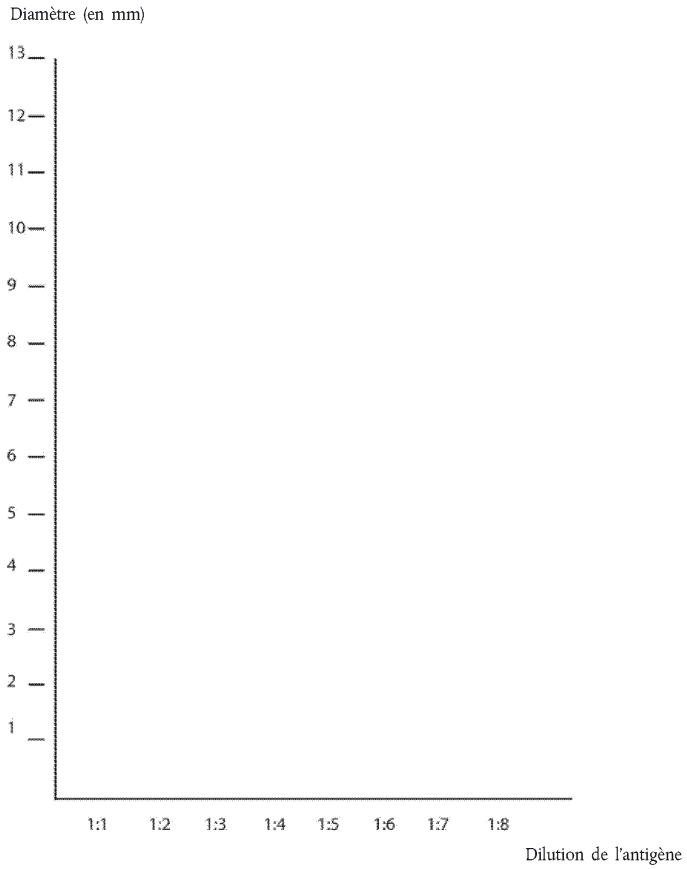
a) L'expérience doit être effectuée avec deux degrés de dilution du sérum (1/5 et 1/10) afin d'obtenir la précipitation optimale.

b) Si le diamètre de la précipitation est trop petit avec chacun des deux degrés de dilution, le sérum doit faire l'objet d'une dilution supplémentaire.

c) Si le diamètre de la précipitation est trop grand et trop peu visible avec les deux degrés de dilution, un degré de dilution plus faible doit être choisi pour le sérum.

d) La concentration finale de la gélose doit s'établir à 0,8 %, et celle des sérums respectivement à 5 % et à 10 %.

e) 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.



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

1. 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, fixé sur la phase solide avec ou sans l'aide d'anticorps de capture 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 que les antigènes du virus de la leucose bovine sont absents. Si des anticorps de capture sont associés à la phase solide, les anticorps ne doivent pas réagir à des antigènes autres que ceux du virus de la leucose bovine;

c) le liquide biologique à examiner;

d) des contrôles positif et négatif correspondants;

e) le conjugué;

f) un substrat adapté à l'enzyme utilisée;

g) une solution d'obturation, si nécessaire;

h) des solutions pour la dilution des échantillons examinés, la préparation des réactifs et le lavage;

i) un système de lecture approprié au substrat utilisé.

2. Standardisation et sensibilité du test

La sensibilité du test ELISA doit être d'un niveau tel que le sérum E05 présente une réaction positive lorsqu'il fait l'objet d'une dilution 10 fois plus importante (échantillons de sérum) ou 250 fois plus importante (échantillons de lait) que celle obtenue à partir d'échantillons individuels mélangés. Lors d'essais où les échantillons (sérum et lait) sont examinés individuellement, le sérum E05 dilué à raison de 1 pour 10 (sérum négatif) ou 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 échantillons individuels. Les instituts indiqués à la section A, point 2, sont responsables du contrôle de la qualité des tests ELISA; en particulier, ils devront déterminer, pour chaque lot de production, le nombre d'échantillons à mélanger en fonction du titre obtenu pour le sérum E05.

3. Conditions d'utilisation du test ELISA pour la recherche de la leucose bovine enzootique

a) La méthode ELISA peut être utilisée sur des échantillons de lait et de sérum.

b) Lorsque les tests ELISA sont utilisés à des fins de certification conformément à l'article 6, paragraphe 2, point c), ou pour l'établissement et le maintien du statut d'un troupeau conformément à l'annexe D, chapitre I, le mélange d'échantillons de sérum ou de lait doit être effectué de manière à ce que les échantillons prélevés en vue de l'examen puissent être reliés avec certitude aux différents animaux utilisés pour réaliser le mélange. Tout test de confirmation doit être effectué sur des échantillons individuels.

c) Quand les tests ELISA sont appliqués à un échantillon de lait en vrac, cet échantillon doit être prélevé sur du lait provenant d'un troupeau comptant au moins 30 % de vaches laitières en période de lactation. Tout test de confirmation doit être effectué sur des échantillons individuels de sérum ou de lait.»