

Conditions d'agrément pour les équipes de collecte d'embryons et les équipes de production d'embryons de bovins

Annexe II. 9.1 (équipe de collecte d'embryons) et 9.5 (équipe de production d'embryons) de l'arrêté royal du 16 janvier 2006 fixant les modalités des agréments, des autorisations et des enregistrements préalables délivrés par l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire

Activité :

- la collecte, le traitement, le transfert et le stockage d'embryons destinés aux échanges nationaux
- la collecte, le traitement, le transfert et le stockage d'embryons destinés aux échanges intracommunautaires

Code d'activité :

- 24082930 équipe de collecte d'embryons pour marché national
- 24082910 équipe de production d'embryons pour marché national
 - 26 code espèce animale : bovins
- 24092930 équipe de collecte d'embryons pour échanges intracommunautaires
- 24092950 équipe de production d'embryons pour échanges intracommunautaires
 - 26 code espèce animale : bovins

Récapitulatif des conditions d'agrément

Pour obtenir et conserver un agrément pour la production, la collecte, le traitement, le stockage et la commercialisation d'embryons destinés au commerce national ou aux échanges intracommunautaires, une équipe de collecte ou de production d'embryons doit répondre aux conditions suivantes :

- a) disposer d'une infrastructure et d'un équipement qui répondent aux exigences fixées au point 1 ;
- b) avoir une convention écrite avec le vétérinaire d'équipe, dans laquelle le vétérinaire d'équipe déclare qu'il prend la responsabilité de cette équipe de collecte ou de production d'embryons ;
- c) satisfaire aux conditions sanitaires d'exploitation conformément aux dispositions du point 2 ;
- d) tenir quotidiennement les registres reprenant les opérations suivant les instructions fixées au point 5 ;
- e) suivre les instructions de l'Agence, notamment concernant le contrôle de qualité visé au point 6.

Tout changement majeur dans l'organisation de l'équipe est à signaler à l'Agence. L'agrément de l'équipe doit être renouvelé chaque fois que le vétérinaire d'équipe est remplacé ou que des changements majeurs sont apportés à l'organisation de l'équipe ou aux laboratoires et équipements dont elle dispose.

1. Conditions en matière d'infrastructure

L'équipe de collecte d'embryons doit avoir à sa disposition, afin d'examiner, de traiter et d'emballer les embryons, des installations permanentes ou mobiles de laboratoire se composant d'au moins une surface de travail, un microscope et un équipement cryogénique.

- a) Un laboratoire en site permanent doit disposer :
- d'un local où les embryons peuvent être manipulés, voisin mais physiquement séparé de la zone utilisée pour la manipulation des animaux donneurs pendant la collecte ;
 - d'un local ou d'une zone équipé pour le nettoyage et la stérilisation des instruments et du matériel utilisés pour la collecte ou la manipulation des embryons ;
 - lorsqu'une micromanipulation de l'embryon qui implique une pénétration de la zone pellucide doit être réalisée, cette opération doit se faire à l'aide d'un dispositif à flux laminaire qui est convenablement nettoyé et désinfecté entre deux lots ;
- b) Un laboratoire mobile doit disposer d'une partie spécialement équipée du véhicule se composant de deux sections séparées, dont :
- l'une pour l'examen et la manipulation des embryons, qui doit être une section propre, et
 - l'autre pour accueillir l'équipement et le matériel utilisés en contact avec les animaux donneurs.

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

Pour être agréée comme équipe de production et de traitement des embryons issus d'une fertilisation in vitro et/ou d'une culture in vitro, une équipe de production d'embryons doit satisfaire aux exigences complémentaires suivantes :

- c) le personnel doit être formé aux techniques appropriées de laboratoire et d'éradication de maladies, notamment aux procédures relatives au travail en milieu stérile ;
- d) elle doit disposer d'un laboratoire en site permanent, qui doit :
- avoir les installations et les équipements appropriés, y compris un local séparé pour la récupération des oocytes dans les ovaires, et des locaux ou zones séparés pour traiter les oocytes et les embryons et pour stocker les embryons ;
 - avoir des dispositifs à flux laminaire sous lesquels tous les oocytes, sperme et embryons doivent être traités; toutefois, la centrifugation du sperme peut avoir lieu en dehors du dispositif à flux laminaire, à condition que toutes les précautions d'hygiène soient prises ;
- e) lorsque des oocytes et d'autres tissus doivent être collectés dans un abattoir, l'équipe doit avoir à sa disposition un équipement approprié garantissant la collecte et le transport des ovaires et d'autres tissus jusqu'au laboratoire de traitement dans des conditions d'hygiène et de sécurité.

2. Conditions sanitaires d'exploitation

2.1. L'équipe de collecte d'embryons doit satisfaire aux exigences suivantes :

- a) la collecte, le traitement et le stockage d'embryons doivent être effectués soit par un vétérinaire d'équipe, soit sous sa responsabilité, par un ou plusieurs techniciens compétents et formés aux méthodes et techniques d'hygiène ;
- b) elle doit être placée sous la surveillance générale du vétérinaire officiel et sous son autorité ;
- c) au moins une fois par an, un contrôle doit être effectué par un vétérinaire officiel, lors duquel celui-ci vérifie que toutes les conditions en matière d'agrément et de surveillance sont encore respectées ;
- d) elle doit disposer d'au moins un local fermant à clé pour le stockage des oocytes et des embryons, et ce local doit pouvoir être nettoyé et désinfecté facilement. Ce local de stockage est placé sous la surveillance du vétérinaire de l'équipe agréée et fait l'objet d'un contrôle régulier par un vétérinaire officiel ;
- e) chaque équipe de collecte/production d'embryons doit tenir à jour des registres conformément aux dispositions du point 5.
- f) chaque équipe de collecte ou de production d'embryons veille à ce que les embryons soient stockés aux températures appropriées dans des locaux agréés à cet effet.
Pour être agréés, ces locaux doivent :
 - i. comporter au moins un local fermant à clé et destiné exclusivement au stockage d'embryons ;
 - ii. être faciles à nettoyer et à désinfecter ;
 - iii. faire l'objet d'une inspection par le vétérinaire officiel au moins une fois par année civile.

Il est permis que du sperme bovin répondant aux conditions de l'AR du 9 décembre 1992 soit stocké dans un local de stockage d'embryons à condition qu'il soit stocké dans des conteneurs distincts.

2.2. L'équipe de production d'embryons doit satisfaire aux exigences supplémentaires suivantes :

- a) le personnel doit être formé aux techniques appropriées de laboratoire et d'éradication de maladies, notamment aux procédures relatives au travail en milieu stérile.

3. Exigences applicables aux animaux donneurs

Pour la collecte des embryons ou oocytes, les animaux donneurs doivent remplir les conditions suivantes :

- a) ils doivent avoir passé au moins les 6 derniers mois sur le territoire de l'Union européenne ou dans le pays tiers où a lieu la collecte ;
- b) ils doivent se trouver dans le troupeau d'origine au moins 30 jours avant la collecte ;
- c) ils doivent provenir de troupeaux qui sont :
 - officiellement indemnes de tuberculose,
 - officiellement indemnes de brucellose,
 - indemnes de leucose bovine enzootique, ou au sein desquels aucun signe clinique de leucose bovine enzootique n'est apparu durant les trois dernières années.
- d) au cours de l'année précédente, ils ne doivent pas avoir appartenu à un troupeau (ou à des troupeaux) dans lequel (lesquels) le moindre signe clinique de rhinotrachéite infectieuse bovine/vulvovaginite pustuleuse infectieuse (IBR, IPV) a été détecté ;
- e) ils ont réagi négativement, durant la période de 30 jours précédant la collecte des embryons, à un test d'antigène ELISA ou PCR pour le BVD .

4. Exigences applicables à la collecte et au traitement des embryons

4.1. Exigences applicables aux embryons prélevés *in vivo*

- a) Les embryons sont collectés et traités par une équipe de collecte agréée, sans entrer en contact avec d'autres lots d'embryons ne répondant pas aux conditions du présent arrêté.
- b) Les embryons sont collectés dans un lieu qui est isolé des autres parties des locaux ou de l'exploitation et qui doit être en bon état et facile à nettoyer et à désinfecter .
- c) Les embryons sont traités (examinés, lavés, manipulés et placés dans des récipients identifiés et stériles), dans un laboratoire permanent ou dans un laboratoire mobile qui ne sont pas situés dans une zone faisant l'objet de mesures d'interdiction ou de quarantaine.
- d) Tous les outils entrant en contact avec les embryons ou avec l'animal donneur pendant la collecte et le traitement sont à usage unique ou sont convenablement désinfectés et stérilisés avant usage.
- e) Les produits d'origine animale utilisés pendant la collecte des embryons et dans le milieu de transport doivent provenir de sources ne présentant pas de risques pour la santé animale ou sont à traiter avant usage de manière à écarter ce risque. Tous les milieux et solutions doivent être stérilisés selon des méthodes agréées conformément aux recommandations de la dernière version du manuel de la « International Embryo Transfer Society » (IETS). Des antibiotiques peuvent être ajoutés aux milieux de culture conformément au manuel de l'IETS.
- f) Les récipients de stockage et de transport sont convenablement désinfectés ou stérilisés avant le début de chaque opération de remplissage.
- g) L'agent cryogénique utilisé ne doit pas avoir servi antérieurement pour d'autres produits d'origine animale.
- h) Chaque récipient pour embryons ainsi que le récipient dans lequel ils sont stockés et transportés sont munis d'une marque code distincte permettant d'établir aisément la date de collecte des embryons, la race et l'identification du donneur et de la donneuse et le numéro d'enregistrement de l'équipe.
- i) Lavage des embryons :
 - les embryons d'un même animal donneur sont lavés dans un liquide spécial pour embryon en groupe de dix maximum et le liquide de lavage est au moins remplacé dix fois ;
 - la micropipette stérile utilisée pour transférer les embryons est remplacée à chaque nouveau liquide de lavage ;
 - chaque lavage correspond à une dilution au 100^{ème} par rapport au précédent lavage.

- j) Examen des embryons : après le dernier lavage, la zone pellucide (zp) de chaque embryon est examinée sur l'entièreté de sa surface à un grossissement de minimum 50 fois afin de vérifier si elle est encore intacte et exempte de matériel adhérent. Cet examen se déroule après le lavage et avant la congélation. Une éventuelle micromanipulation qui implique la pénétration de la zp est uniquement réalisée dans l'infrastructure qui est destinée à cet effet et seulement après que l'embryon ait été lavé et examiné. Une telle micromanipulation n'est pas réalisée sur un embryon dont la zp n'est plus intacte.
- k) Chaque lot d'embryons qui a passé avec succès l'examen prévu au point j) est placé dans un récipient stérile, marqué conformément au point h) et immédiatement scellé .
- l) Le cas échéant, chaque embryon est congelé le plus rapidement possible et est stocké dans le local de stockage qui fait partie de l'infrastructure de l'équipe de production ou de collecte d'embryons.
- m) Traitement à la trypsine : dans le cas où les embryons sont collectés d'un animal donneur provenant d'une exploitation avec statut IBR I1 ou I2, ou lors d'exportation d'embryons vers un pays tiers et si les autorités sanitaires du pays destinataire exigent un traitement à la trypsine, ils doivent être soumis au traitement suivant : les embryons sont transférés dans cinq bains successifs de tampon phosphate (PBS) sans Ca^{++} ni Mg^{++} mais qui contiennent des antibiotiques et 0,4 % d'albumine sérique bovine (BSA). Ensuite les embryons sont plongés pendant 60 à 90 secondes dans deux bains successifs de parties aliquotes de trypsine de pH entre 7,6 et 7,8. La trypsine stérile (1:250) qui a une activité telle que 1 g hydrolyse 250 g de caséine à 25 C° pH 7,6 en dix minutes dans une solution salée équilibrée de HANK sans Ca^{++} ni Mg^{++} est utilisée à une concentration de 0,25 %. Après le traitement à la trypsine les embryons sont transférés dans cinq bains successifs de PBS contenant des antibiotiques et 2 % de sérum. Il est important de remplacer la BSA avec le sérum dans ces bains après la trypsinisation afin de s'assurer de l'inactivation de la trypsine.

4.2. Exigences supplémentaires applicables à la production d'embryons *in vitro*

Outre les conditions mentionnées au point 4.1, les exigences supplémentaires suivantes s'appliquent également aux embryons *in vitro* :

- o) Lorsque des ovaires et d'autres tissus doivent être collectés dans un abattoir, celui-ci doit être officiellement agréé et placé sous le contrôle d'un vétérinaire officiel qui est chargé de procéder à l'inspection ante mortem et post mortem des donneurs.
- p) Le matériel et l'équipement entrant en contact direct avec les ovaires et autres tissus doivent être stérilisés avant usage et, une fois stérilisés, utilisés exclusivement à ces fins. Un équipement distinct doit être utilisé pour manipuler les oocytes et les embryons provenant de différents lots d'animaux donneurs.
- q) Les ovaires et autres tissus ne peuvent être introduits dans le laboratoire de traitement avant l'achèvement de l'inspection post mortem du lot considéré. Si une pathologie est constatée dans le lot des donneurs ou chez tout animal abattu dans cet abattoir ce jour-là, tous les tissus provenant de ce lot doivent être retrouvés et éliminés.
- r) Les opérations de lavage et d'examen définies aux points i) et j) doivent être réalisées lorsque la culture est achevée.
- s) Toute micromanipulation qui implique la pénétration de la zone pellucide est réalisée conformément aux dispositions du point j) après achèvement des procédures définies au point r).

5. Registres

Chaque équipe de production d'embryons et chaque équipe de collecte d'embryons tient respectivement un registre de production ou de collecte avec les données relatives à la récolte d'oocytes et à la production ou la collecte, au traitement et au lieu de stockage d'embryons, ainsi qu'un registre reprenant tous les embryons mis en place. Ces registres contiennent au moins les informations suivantes par lot d'oocytes ou d'embryons :

- a) en cas de traitement de super-ovulation, la race et l'identification des animaux femelles donneurs chez lesquels, et la date à laquelle, un traitement de super-ovulation a été effectué ;
- b) la race - uniquement s'ils sont inscrits dans un livre de bovins reproducteurs d'une race pure – l'âge et l'identification des animaux femelles donneurs chez lesquels des oocytes sont récoltés ou des embryons sont collectés ;
- c) les données relatives au statut IBR du troupeau auquel appartient l'animal femelle donneur, et le résultat du test BVD réalisé sur l'animal femelle donneur, qui justifient son utilisation en tant qu'animal donneur ;
- d) la date et le lieu de récolte, de production, de collecte, de traitement et le lieu de stockage des oocytes et/ou embryons ;
- e) le traitement de l'embryon et les techniques éventuellement appliquées comme la micromanipulation lors de laquelle la zone pellucide est percée, fécondation in vitro, culture in vitro ;
- f) l'identification des embryons ;
- g) en cas d'implantation sur une vache éleveuse, la race et l'identification de la vache éleveuse sur laquelle est implanté un embryon.

Chaque équipe de production d'embryons et chaque équipe de collecte d'embryons tient un registre de stockage contenant au moins les informations suivantes :

- a) l'identification des embryons présents ;
- b) la date d'arrivée au local de stockage et la date de départ de celui-ci, pour chaque embryon ;
- c) la destination de chaque embryon qui quitte le local de stockage.

Ces registres sont conservés au moins douze mois après que l'embryon ait quitté le local de stockage.

6. Contrôle de qualité

a) Organisation du contrôle de qualité.

Chaque équipe de production ou de collecte d'embryons fournit une fois par an au laboratoire agréé les récoltes/collectes indiquées par un agent de l'UPC dans le registre de production ou de collecte (10% de toutes les récoltes/collectes congelées mentionnées dans le registre depuis le dernier contrôle de qualité officiel, avec un minimum de cinq collectes).

Chaque équipe de production/collecte d'embryons envoie à cet effet dans un délai déterminé par l'agent de l'UPC tous les échantillons visés au point b), et qui se rapportent aux récoltes/collectes indiquées, à un laboratoire agréé et ce dans un emballage adapté.

b) Echantillons à contrôler.

Embryons dégénérés, embryons dont la zone pellucide a été endommagée et oocytes non fécondés accompagnés de leur dernier liquide de lavage : après le lavage, réunir, identifier et conserver pour analyse selon la procédure standard, tous les oocytes non fécondés récoltés/collectés, les embryons dont la zone pellucide a été endommagée et les embryons dégénérés d'un même animal donneur.

c) Identification et conservation des échantillons.

Collecter tous les échantillons mentionnés au point b) dans des tubes 'ependorf' de 2 ml, identifier (numéro d'extraction/collecte, date de récolte/collecte, identification de l'animal donneur, numéro d'agrément de l'équipe) et conserver dans de l'azote liquide à une température de -196°C .

d) Analyses à réaliser sur les échantillons – Interprétation des résultats.

1. Analyse bactériologique quantitative :

On verse les échantillons accompagnés de leur dernier liquide de lavage sur agar Columbia enrichi avec 5% de globules rouges de mouton. Les plaques sont incubées pendant 24h à 37°C dans une atmosphère enrichie avec 5 – 10% CO_2 . Ensuite elles sont incubées pendant trois jours à température ambiante dans une atmosphère normale. Les résultats des comptages sont exprimés en unités formant colonie par ml (UFC/ml).

2. Les résultats sont interprétés comme suit :

- i. 500 UFC/ml ou moins : favorable ;
- ii. plus de 500 UFC/ml : défavorable.

En cas de résultat défavorable pour 60% ou plus des récoltes/collectes, le résultat global est considéré comme défavorable. Une deuxième série d'échantillons est alors demandée à l'équipe concernée : ceux-ci sont choisis par l'agent de l'UPC parmi les récoltes/collectes congelées mentionnées dans le registre depuis la communication des résultats des analyses sur la première série d'échantillons.

Dans le cas d'un résultat défavorable pour 50% ou plus des récoltes/collectes supplémentaires, la procédure de suspension et de retrait de l'agrément est d'application.

7. Embryons destinés à un usage au sein de l'exploitation bovine

L'AR embryons de bovins (AR du 3 août 2012 relatif aux conditions sanitaires pour la production, la collecte, le stockage, la mise en place, le commerce national, les échanges intracommunautaires et l'importation d'embryons d'animaux domestiques de l'espèce bovine) prévoit comme règle générale que les embryons ne peuvent être produits, traités, stockés et mis sur le marché que par des équipes de collecte (production) d'embryons agréées par l'Agence.

En dérogation à ces dispositions, le stockage d'embryons dans une exploitation bovine est autorisé pour autant que ces embryons soient exclusivement destinés à être implantés chez les bovins femelles de cette exploitation. Ces embryons ne peuvent donc pas être mis sur le marché, et l'éleveur ne doit pas introduire de demande d'agrément. La collecte, le traitement et la congélation de ces embryons sont pris en charge par une équipe de collecte d'embryons agréée.

Ces embryons sont stockés dans l'exploitation bovine dans un récipient spécifique au stockage et au transport d'embryons, destiné exclusivement à cet usage.

L'éleveur bovin responsable tient à jour quotidiennement :

1. un relevé journalier des embryons implantés
2. un inventaire actualisé du contenu de son récipient de stockage d'embryons.

8. Législation

- Arrêté royal du 3 août 2012 relatif aux conditions sanitaires pour la production, la collecte, le stockage, la mise en place, le commerce national, les échanges intracommunautaires et l'importation d'embryons d'animaux domestiques de l'espèce bovine ;
- Arrêté royal du 9 décembre 1992 portant des dispositions zootechniques et de police sanitaire vétérinaire concernant la production, le traitement, le stockage, l'usage, les échanges intracommunautaires et l'importation du sperme de bovin ;
- Décision 2006/168/CE de la Commission du 4 janvier 2006 établissant les conditions de police sanitaire et la certification vétérinaire relatives à l'importation dans la Communauté d'embryons de bovins.