

Arrêté royal portant des mesures de police sanitaire relatives à l'influenza aviaire et à la maladie de Newcastle. 28.11.1994 (M.B. 11.02.1995)

CHAPITRE I - Définitions

Art. 1. Pour l'application du présent arrêté, sont valables les définitions de l'article 1 de l'arrêté royal du 12 juin 1970 relatif à la lutte contre les maladies contagieuses des volailles et autres animaux de basse-cour ainsi qu'à la mise dans le commerce d'œufs à couver, de poussins d'un jour et de volailles d'élevage;

De plus, on entend par:

1° Pigeon voyageur: tout pigeon qui est transporté ou qui est destiné à être transporté hors de son pigeonnier pour être lâché de manière à ce qu'il puisse rejoindre librement, en volant, son pigeonnier ou toute autre destination;

2° Pigeonnier: toute installation utilisée en vue de la détention ou de l'élevage des pigeons voyageurs;

3° Exploitation: tout bâtiment ou complexe de bâtiments, y compris les terrains annexes, constituant une unité sur le plan épidémiologique et où des volailles ou d'autres oiseaux sont détenus ou élevés, ou qui sont destinés à cette fin, même s'il s'agit d'unités de production différentes utilisant cependant en commun les moyens de production;

4° Volaille infectée d'influenza aviaire:

toute volaille sur laquelle la présence d'influenza aviaire a été officiellement confirmée à la suite d'un examen effectué à l'INRV tel que défini à l'annexe I;

toutefois s'il s'agit d'un ou de plusieurs nouveaux foyers, toute volaille sur laquelle des symptômes cliniques ou des lésions post mortem propres à l'influenza aviaire ont été constatés;

5° Volaille infectée de la maladie de Newcastle:

toute volaille sur laquelle la présence de la maladie de Newcastle a été officiellement confirmée à la suite d'un examen effectué à l'INRV tel que défini à l'annexe II;

toutefois s'il s'agit d'un ou de plusieurs nouveaux foyers, toute volaille sur laquelle des symptômes cliniques ou des lésions post mortem propres à la maladie de Newcastle ont été constatés;

6° Exploitation suspecte: exploitation où ont séjourné une ou plusieurs volailles suspectes d'être infectées ou d'être contaminées;

7° Volaille suspecte d'être infectée d'influenza aviaire: toute volaille présentant des symptômes cliniques ou des lésions post mortem permettant de suspecter une infection par l'influenza aviaire, ou toute volaille sur laquelle la présence du virus A, sous type H5 ou H7 de l'influenza a été détectée;

8° Volaille suspecte d'être infectée par la maladie de Newcastle: toute volaille présentant des symptômes cliniques ou des lésions post mortem permettant de suspecter une infection par la maladie de Newcastle;

9° Volaille suspecte d'être contaminée par l'influenza aviaire: toute volaille susceptible d'avoir été directement ou indirectement au contact du virus de l'influenza aviaire ou du Virus A, sous types H5 ou H7, de l'influenza;

10° Volaille suspecte d'être contaminée par la maladie de Newcastle: toute volaille susceptible d'avoir été directement ou indirectement au contact du virus de la maladie de Newcastle;

11° Foyer: exploitation où une ou plusieurs volailles infectées par l'influenza aviaire ou la maladie de Newcastle séjournent ou ont séjourné, pour autant que les mesures n'aient pas été levées par le Service;

12° Foyer caché: exploitation où la présence de l'influenza aviaire ou de la maladie de Newcastle a été constatée chez des volailles cliniquement malades dont le détenteur dissimule l'état en négligeant de déclarer la maladie ou de faire examiner ses volailles;

13° Bourgmestre: le bourgmestre de la commune où se situe le foyer ou de la commune où se trouve la volaille et, pour autant que des mesures doivent être prises sur le territoire d'autres communes, les bourgmestres de ces communes;

14° Rassemblement: le rassemblement de volailles de provenances différentes, même si elles restent chargées dans des véhicules, en particulier sur les marchés, dans les expositions, concours et expertises;

15° Responsable: le propriétaire ou le détenteur, qui exerce habituellement une gestion et une surveillance directe sur la volaille;

16° INRV: l'Institut national de Recherches vétérinaires du Ministère de l'Agriculture;

17° Ministre: le Ministre qui a l'Agriculture dans ses attributions;

18° Inspecteur vétérinaire: l'inspecteur vétérinaire compétent pour la circonscription où se situe l'exploitation ou celle où se trouvent les volailles;

19° Loi: sauf stipulation contraire, la loi du 24 mars 1987 relative à la santé des animaux;

20° Service: le Service de l'Inspection vétérinaire du Ministère de l'Agriculture;

21° Fédération: Fédération de lutte contre les maladies des animaux visée au chapitre II de la loi;

22° Fonds: le Fonds de la Santé et de la Production des Animaux.

CHAPITRE II - Déclaration

Art. 2. Quiconque suspecte ou constate la présence de l'influenza aviaire ou de la maladie de Newcastle chez les volailles ou autres oiseaux détenus en captivité, est tenu d'en informer sans délai l'inspecteur vétérinaire.

CHAPITRE III - Suspicion

Art. 3. § 1. Sans préjudice des dispositions de l'article 2, le responsable des volailles suspectes d'être infectées est tenu d'isoler toutes les volailles présentes dans son exploitation et de les faire examiner sans délai par un vétérinaire agréé.

§ 2. Le vétérinaire appelé en application du § 1 examine dans les 24 heures toutes les volailles de l'exploitation. Il transmet un ou plusieurs animaux vivants, cadavres, organes ou autre matériel de diagnostic au centre de dépistage compétent pour le territoire ou l'exploitation est située conformément à la répartition reprise à l'annexe III du présent arrêté. Il fait rapport par la voie la plus rapide de sa visite et de ses constatations à l'inspecteur vétérinaire.

Art. 4. § 1. Dès que l'inspecteur vétérinaire a été informé de la suspicion, lui ou son délégué visite sans retard l'exploitation suspecte et la place sous surveillance.

Il procède immédiatement à l'enquête épidémiologique conformément aux dispositions du chapitre VI.

Il peut prélever ou faire prélever tous les échantillons nécessaires au diagnostic, y compris une ou plusieurs volailles vivantes ou mortes.

§ 2. Il procède au recensement de toutes les catégories de volailles présentes à l'exploitation et indique le nombre de volailles qui sont mortes, le nombre de celles qui présentent des symptômes cliniques et le nombre de celles qui n'en présentent aucun.

Ce recensement doit être mis à jour par le responsable en tenant compte des volailles nées et mortes pendant la période de suspicion. Ces données tenues à jour peuvent être réclamées et contrôlées à chaque visite d'inspection.

§ 3. L'inspecteur vétérinaire ordonne l'isolement de toutes les volailles de l'exploitation dans leurs locaux d'hébergement ou leur confinement dans d'autres lieux permettant leur isolement hors du contact d'autres oiseaux. De plus, il peut ordonner de faire enfermer tous les oiseaux qui y sont détenus, ainsi que les chiens et les chats. Sauf avec son autorisation, le mouvement d'autres animaux vers l'exploitation ou à partir de celle-ci est interdit.

§ 4. Tout mouvement de volailles ou de poussins d'un jour en provenance ou à destination de l'exploitation est interdit.

§ 5. Il est interdit au responsable d'accorder l'accès à l'exploitation suspecte aux personnes et véhicules qui y sont étrangers. Cette interdiction n'est pas d'application au personnel du Service, aux préposés du clos d'équarrissage, à la police, aux personnes qui prodiguent des soins aux gens et aux animaux et aux personnes qui assurent l'approvisionnement normal des gens et des animaux.

Il est interdit à toutes les personnes qui séjournent dans l'exploitation suspecte ou qui y soignent les animaux de pénétrer dans une autre exploitation ou de se rendre dans n'importe quel lieu de rassemblement d'oiseaux.

Les roues et les pneus des véhicules qui quittent l'exploitation doivent être désinfectés au moyen d'un désinfectant désigné par l'inspecteur vétérinaire.

§ 6. Il est interdit au responsable de transporter en dehors de l'exploitation sans l'autorisation formelle et écrite de l'inspecteur vétérinaire, de la viande ou des cadavres de volailles, des aliments pour animaux, du matériel, des emballages, du fumier animal, de la litière ainsi que tous produits, objets ou déchets susceptibles de transmettre le virus de l'influenza aviaire ou de la maladie de Newcastle.

§ 7. Il est interdit de transporter des oeufs en dehors de l'exploitation à l'exception des oeufs qui sont directement envoyés dans un établissement agréé de fabrication et de traitement de produits à base d'oeufs et qui sont transportés conformément à une autorisation accordée par le Service.

§ 8. L'inspecteur vétérinaire peut imposer dans une exploitation suspecte toutes les mesures supplémentaires propres à empêcher une éventuelle propagation de la maladie.

§ 9. L'inspecteur vétérinaire peut faire appliquer toutes ces mesures à d'autres exploitations si leur localisation, la situation locale ou les contacts avec l'exploitation suspecte de présence de la maladie font craindre une contamination.

§ 10. Ces mesures restent d'application tant que la présence de l'influenza aviaire ou de la maladie de Newcastle n'a pas été officiellement infirmée.

§ 11. L'inspecteur vétérinaire responsable notifie au bourgmestre la suspicion et les mesures qui sont d'application dans l'exploitation suspecte, ainsi que leur levée.

CHAPITRE IV - Mesures dans le foyer

Art. 5. Dès que dans une exploitation, la présence de l'influenza aviaire ou de la maladie de Newcastle est confirmée sur base d'un examen de laboratoire ou de données cliniques ou épidémiologiques, l'inspecteur vétérinaire déclare sans délai l'exploitation comme étant un foyer et en détermine les limites. Il notifie le foyer et les mesures qui y sont d'application au responsable et au bourgmestre.

Art. 6. En complément des dispositions de l'article 4, les mesures suivantes sont d'application dans le foyer:

1° l'inspecteur vétérinaire ou son délégué dresse un inventaire complet de toutes les volailles et de tous les autres oiseaux de l'exploitation, si cela n'a pas encore été fait en application de l'article 4, § 2; il y mentionne pour chaque catégorie le nombre de volailles qui sont mortes, qui présentent des symptômes cliniques et le nombre de celles qui n'en présentent aucun;

2° l'inspecteur vétérinaire ordonne sans délai l'abattage de toutes les volailles de l'exploitation, conformément aux dispositions du chapitre V. Tous les animaux morts, tous les animaux abattus et tous les oeufs de l'exploitation doivent être détruits. Lors de l'abattage, les risques de propagation de la maladie doivent être réduits au minimum;

3° l'inspecteur vétérinaire ordonne soit de détruire toutes les matières ou tous les déchets, tels les aliments, litières et fumiers susceptibles d'être contaminés, soit de les soumettre à un traitement qui garantit la destruction du virus éventuellement présent.

La valeur des aliments pour animaux qui sont ainsi soumis à une nouvelle stérilisation ou à une destruction, peut être remboursée par le Fonds. Le Service de l'Inspection des Matières premières du Ministère de l'Agriculture est chargé du contrôle de ces opérations;

4° l'inspecteur vétérinaire recherche, en vue de leur destruction, les viandes de volailles qui ont été abattues dans la période comprise entre l'introduction présumée de la maladie dans l'exploitation et l'application des mesures officielles;

5° l'inspecteur vétérinaire procède à la recherche, en vue de leur destruction, de tous les oeufs à couver pondus pendant la période présumée d'incubation de la maladie et sortis de l'exploitation. Si des oeufs sont déjà éclos, les volailles issues de ces oeufs doivent être placés sous surveillance officielle. Les oeufs de consommation qui ont été pondus durant la période présumée d'incubation de la maladie et qui sont déjà sortis de l'exploitation doivent autant que possible être recherchés et détruits sauf s'ils ont été préalablement, correctement désinfectés et vendus en emballage perdu.

Art. 7. L'inspecteur vétérinaire effectue une enquête épidémiologique conformément aux dispositions du chapitre VI, pour autant qu'elle n'ait pas encore été effectuée, ou qu'elle ne l'ait été que de façon incomplète en application de l'article 4, § 1.

Art. 8. L'inspecteur vétérinaire peut faire prélever sur un nombre représentatif d'animaux des échantillons de sang en vue de la recherche d'anticorps contre l'influenza aviaire ou la maladie de Newcastle. L'INRV effectue ces analyses.

Art. 9. Après l'exécution des opérations visées à l'article 17, un vide sanitaire d'au moins vingt et un jours doit être respecté avant la réintroduction de volailles dans l'exploitation.

Art. 10. L'inspecteur vétérinaire notifie au responsable et au bourgmestre la levée des mesures prises dans le foyer.

Art. 11. Le Service peut étendre les mesures citées dans les articles 5 à 10 à d'autres exploitations dans le cas où leur implantation, leur topographie ou le contact avec l'exploitation où la présence de la maladie a été confirmée peuvent faire craindre une contamination éventuelle.

Art. 12. § 1. Dans le cas où une souche du virus de la maladie de Newcastle ayant un IPIC supérieur à 0,7 et inférieur à 1,2 a été isolée dans un troupeau de volailles ne présentant aucun signe clinique de la maladie de Newcastle, et qu'il a été démontré par le laboratoire communautaire de référence visé à l'annexe V de la directive 92/66/CEE que l'isolat du virus en question provient d'un vaccin vivant atténué de la maladie de Newcastle, le Service peut accorder une dérogation aux exigences des articles 4, 5, 6, 8 et 9.

§ 2. L'exploitation, où se trouve le troupeau visé au § 1, doit être placée sous surveillance officielle pendant une période de trente jours.

Pendant cette période, les mesures visées au chapitre III, article 4, §§ 2, 3, 5, 6 et 7 sont d'application et aucune volaille ne peut quitter l'exploitation, sauf pour être conduite directement à un abattoir désigné par l'inspecteur vétérinaire.

Le fonctionnaire de l'Institut d'Expertise vétérinaire responsable de cet abattoir doit être informé par l'inspecteur vétérinaire de l'envoi de ces volailles à abattre.

Art. 13. § 1. Dans le cas d'exploitations comprenant deux ou plusieurs unités de production distinctes, l'inspecteur vétérinaire peut, en concertation avec le Service, déroger aux exigences de l'article 6, 2°, en ce qui concerne les troupeaux sains d'un foyer, pour autant que l'inspecteur vétérinaire ait constaté que la structure et l'importance de ces troupeaux ainsi que les opérations qui sont effectuées à l'exploitation sont telles que les

unités de production dans lesquelles sont détenus ces troupeaux sont totalement séparées sur le plan de l'hébergement, de l'entretien et de l'alimentation de telle sorte que l'agent causal ne puisse pas se propager d'un troupeau à l'autre.

§ 2. Le Ministre peut imposer des conditions supplémentaires à l'application des dérogations visées au § 1.

CHAPITRE V - Abattage sur ordre

Art. 14. Pour l'application de l'article 6, 2°, l'inspecteur vétérinaire notifie au responsable l'ordre d'abattage; il en envoie une copie au bourgmestre.

Le modèle de l'ordre d'abattage est joint en annexe IV du présent arrêté.

Art. 15. Immédiatement après avoir donné l'ordre d'abattage, conformément aux dispositions de l'article 6, 2°, l'inspecteur vétérinaire avertit par téléphone:

1° le chef du Service;

2° Le directeur de l'INRV.

Il convoque l'expert mentionné à l'article 19.

Il précise la situation exacte du foyer et les nom et adresse du responsable et signale le nombre de volailles qui y sont détenues. Il confirme ces données par écrit.

Art. 16. Si nécessaire, l'inspecteur vétérinaire peut faire appel au bourgmestre pour prendre les mesures qui sont nécessaires à l'exécution de l'ordre d'abattage.

Art. 17. § 1. Les volailles concernées par l'ordre d'abattage sont mises à mort selon les instructions du Service, de manière telle que tout risque de propagation du virus causal soit évité. L'INRV y apporte sa coopération.

§ 2. Les cadavres des volailles mises à mort dans le foyer, les cadavres des volailles et des autres oiseaux morts à l'exploitation, la viande visée à l'article 6, 4°, ainsi que les oeufs visés à l'article 6, 5°, sont enlevés afin d'être détruits de telle manière que tout risque de propagation du virus causal soit évité.

§ 3. Après l'évacuation de toutes les volailles du foyer, l'INRV effectue le nettoyage et la désinfection provisoire des bâtiments où les volailles en question étaient hébergées, ainsi que du voisinage de ces bâtiments, des moyens de transport utilisés et de tout autre matériel susceptible d'avoir été contaminé.

Les opérations de nettoyage et de désinfection du foyer sont si nécessaire précédées d'une destruction des rongeurs présents effectuée sous la surveillance et selon les instructions de l'inspecteur vétérinaire.

Art. 18. § 1. Dans les limites des crédits budgétaires une indemnité est allouée au propriétaire des volailles mises à mort sur ordre et calculée comme suit:

$I = R.Vr.$

R = Coefficient de réfaction.

Vr = Valeur de remplacement.

L'indemnité est calculée sur base de l'inventaire dressé au moment de la première intervention de l'inspecteur vétérinaire conformément à l'article 4, § 2 ou à l'article 6, 1°.

La valeur de remplacement peut être plafonnée. Le coefficient de réfaction et le maximum sont fixés par le Ministre.

Pour les volailles qui montrent des symptômes cliniques, l'indemnité est diminuée de la moitié. Les oeufs à couvrir et les oeufs de consommation détruits en application du présent arrêté sont indemnisés selon les modalités appliquées à l'indemnisation des volailles. Pour les volailles mortes, aucune indemnité n'est octroyée.

§ 2. Le propriétaire perd tout droit à l'indemnité au cas où la vaccination contre la maladie de Newcastle était obligatoire dans la zone où se trouve le foyer, conformément à un arrêté pris en application de l'article 40, et que le responsable ne peut pas prouver au moyen de certificats de vaccination valables qu'au moment où la maladie est apparue, il avait satisfait aux dispositions en matière de vaccination obligatoire. Toutefois au cas où il ressort des examens visés à l'article 8 qu'il n'a pas été satisfait, ou alors de façon très incomplète, aux obligations de vaccination, aucune indemnité n'est octroyée.

Si le responsable des volailles refuse de donner suite à l'ordre d'abattage, ou si on constate une ou plusieurs infractions aux dispositions de l'article 3, de l'article 4, §§ 3 à 7, de l'article 21, § 4, de l'article 23, §§ 3 à 5, de l'article 25, §§ 3 et 4, des articles 39, 40, 43 ou d'un arrêté pris en exécution de l'article 41, ainsi qu'en cas d'un foyer caché, l'indemnité visée au § 1 n'est pas octroyée.

§ 3. Au cas où une ou plusieurs infractions aux autres dispositions que celles visées au § 2 sont constatées, l'indemnité visée au § 1 est diminuée de moitié.

§ 4. Au cas où, après l'octroi d'une indemnité, des infractions mentionnées aux §§ 2 et 3, sont constatées, qui nécessitent l'application des §§ 2 ou 3, le montant de l'indemnité allouée conformément au § 1 est adapté respectivement selon les modalités du § 2 ou du § 3. Dans ce cas, les sommes déjà payées seront entièrement ou partiellement recouvrées.

Art. 19. § 1. La valeur des volailles à abattre et des oeufs à détruire est fixée par un expert.

Les experts sont nommés par le Ministre sur proposition du Conseil du Fonds de la santé et de la production des animaux et révoqués par lui.

L'expert se rend sur place avec l'inspecteur vétérinaire ou son délégué, qui lui désigne les animaux à évaluer.

Il dépose son rapport d'expertise chez l'inspecteur vétérinaire dans les 24 heures de la première réquisition.

§ 2. Dans les cas urgents, l'inspecteur vétérinaire fixe lui-même la valeur des animaux à mettre à mort.

Art. 20. Les frais d'expertise sont fixés comme suit:

1° Vacations:

Il est alloué aux experts, une vacation de (7,5 EUR) par demi-heure; toute demi-heure commencée est comptée en entier. Les temps de déplacement ne rentrent pas en ligne de compte pour l'octroi de vacations. <AR 13.07.2001>

2° Frais de parcours:

Les débours réels en cas d'utilisation d'un moyen de transport en commun sont remboursés sur présentation des pièces justificatives. Lorsqu'une voiture personnelle est utilisée, sont allouées les indemnités prévues par l'arrêté royal du 18 janvier 1965 portant réglementation en matière de frais de parcours.

3° Frais de séjour:

Sont allouées les indemnités prévues pour les agents de l'Etat des rangs 10 à 14 par l'arrêté royal du 24 décembre 1964 fixant les indemnités pour frais de séjour des membres du personnel des Ministères.

CHAPITRE VI - Enquête épidémiologique

Art. 21. § 1. L'enquête épidémiologique visée à l'article 4, § 1 et à l'article 7, doit être effectuée dans toutes les exploitations dont on peut soupçonner, pour quelque raison que ce soit, qu'elles ont pu être la source de contamination pour une exploitation suspecte ou pour un foyer. Une même enquête aura lieu dans toutes les exploitations dont on peut soupçonner, pour quelque raison que ce soit, qu'elles auraient pu être contaminées à partir d'une exploitation suspecte ou d'un foyer.

§ 2. L'enquête épidémiologique porte notamment sur:

- a) la durée de la période pendant laquelle la maladie peut avoir existé dans l'exploitation avant que la maladie n'ait été signalée;
- b) l'origine possible de la maladie dans l'exploitation, et l'identification des autres exploitations dans lesquelles se trouvent des volailles et autres oiseaux qui ont pu être infectés ou contaminés à partir de la même source;
- c) les mouvements des personnes, des volailles, d'autres oiseaux maintenus en captivité ou d'autres animaux, des véhicules, des cadavres, des viandes ou des matières susceptibles d'avoir transporté le virus à partir ou en direction de l'exploitation.

§ 3. Dès qu'il ressort d'une des enquêtes réalisées conformément aux §§ 1 et 2, que l'exploitation examinée pourrait avoir été contaminée, elle est immédiatement placée sous contrôle officiel.

§ 4. Lorsqu'une exploitation a été placée sous contrôle officiel conformément au § 3, l'inspecteur vétérinaire interdit la sortie des volailles de l'exploitation, si ce n'est pour le transport direct et sous contrôle officiel vers un abattoir en vue de leur abattage immédiat. Préalablement à l'octroi de ladite autorisation, l'inspecteur vétérinaire doit avoir effectué un examen clinique des volailles permettant d'exclure la présence de l'influenza aviaire ou de la maladie de Newcastle dans l'exploitation.

Les restrictions de mouvements visées dans le présent article sont d'application pendant une période de 21 jours à compter du dernier jour de contamination potentielle, avec un minimum de 7 jours.

§ 5. Dans des cas particuliers, l'inspecteur vétérinaire peut limiter les mesures prévues au présent article à une partie de l'exploitation et aux volailles qui s'y trouvent, pour autant que lesdites volailles y aient été hébergées, entretenues et alimentées de façon totalement séparée et par un personnel distinct.

§ 6. Dans les exploitations qu'il a placées sous contrôle officiel, l'inspecteur vétérinaire peut imposer toutes les mesures supplémentaires qu'il juge nécessaires.

CHAPITRE VII - Mesures dans la zone de protection et dans la zone de surveillance

Art. 22. § 1. L'inspecteur vétérinaire délimite autour de chaque foyer d'influenza aviaire ou de la maladie de Newcastle une zone de protection d'un rayon minimal de 3 kilomètres et une zone de surveillance d'un rayon minimum de 10 km. Il en informe le bourgmestre.

§ 2. Pour l'installation de ces zones, il est tenu compte des éléments suivants:

- 1° les résultats des enquêtes épidémiologiques effectuées conformément au chapitre VI;
- 2° les données sérologiques disponibles;
- 3° la situation géographique notamment les frontières naturelles;
- 4° des données de nature écologique, la situation et la proximité des exploitations;
- 5° les échanges commerciaux de volailles et la présence d'abattoirs;
- 6° les équipements de contrôle présents ainsi que la nature des mesures de lutte qui sont appliquées.

§ 3. Si la zone de protection ou la zone de surveillance dépasse certaines parties du territoire belge, les zones sont délimitées en concertation avec l'autorité compétente du pays limitrophe concerné.

§ 4. Dans les cas particuliers fixés par le Ministre, la dimension et la durée d'application des zones de protection et de surveillance peuvent être réduites.

Art. 23. Dans la zone de protection, les mesures suivantes sont d'application:

§ 1. Le bourgmestre notifie la délimitation de la zone de protection aux responsables des exploitations situées dans cette zone. En même temps, il fait apposer sur toutes les routes à la limite de la zone de protection des panneaux d'avertissement blancs montés sur des poteaux à une hauteur minimale de deux mètres, portant l'inscription suivante en lettres capitales noires:

pour l'influenza aviaire:

" Influenza aviaire-zone de protection-transport et commerce de volailles et d'œufs à couvrir réglementés. "

pour la maladie de Newcastle:

" Maladie de Newcastle-zone de protection-transport et commerce de volailles et d'œufs à couvrir réglementés. "

§ 2. Le bourgmestre fait procéder à l'inventaire administratif des volailles dans toutes les exploitations situées dans la zone de protection. Toutes les exploitations sont identifiées.

L'inventaire est transmis à l'inspecteur vétérinaire dans les cinq jours ouvrables.

§ 3. Les responsables des exploitations sont tenus de faire examiner par un vétérinaire agréé toutes les volailles de leur exploitation une fois par semaine avec un intervalle d'au moins quatre jours entre les examens.

Le vétérinaire agréé effectue lors de sa visite un examen clinique et un recensement de toutes les volailles de l'exploitation. Si nécessaire, des échantillons sont prélevés en vue d'un examen de laboratoire. Les données et le résultat de ces visites doivent être enregistrés de la manière arrêtée par le Ministre.

§ 4. Le bourgmestre informe les responsables des exploitations situées dans la zone de protection de ce qu'ils sont tenus de respecter les mesures suivantes:

1° toute entrée ou sortie de volailles et d'œufs à couvrir des exploitations est interdite à l'exception:

a) du transport direct de volailles à destination d'un abattoir désigné par l'inspecteur vétérinaire et situé de préférence dans la zone de protection ou dans la zone de surveillance; ce transport doit avoir lieu dans les conditions suivantes:

i) le transport doit avoir lieu entre 6 et 17 heures;

ii) les véhicules servant au transport des volailles sont scellés par un délégué de l'inspecteur vétérinaire;

iii) le transport doit être accompagné d'une autorisation de transport délivrée par un vétérinaire agréé;

iv) l'expert de l'abattoir de destination vérifie l'uniformité du chargement, complète l'autorisation et la transmet dans les 24 heures à l'inspecteur vétérinaire de la circonscription de l'exploitation d'origine;

b) du transport direct de poussins d'un jour, de poulettes prêtes à la ponte et d'autres volailles ainsi que d'œufs à couvrir, vers une exploitation située dans la zone de protection ou la zone de surveillance, avec l'accord de l'inspecteur vétérinaire, dans les conditions suivantes:

i) il ne peut pas y avoir d'autres volailles à l'exploitation de destination;

ii) le transport doit être accompagné d'une autorisation de transport délivrée par un vétérinaire agréé;

iii) le véhicule et les caisses sont nettoyés et désinfectés à fond avant de quitter l'exploitation, ou dans une installation appropriée;

iv) avant l'expédition d'œufs à couvrir vers un couvoir désigné, les oeufs et leurs emballages définitifs doivent être désinfectés.

Dans des cas particuliers, l'inspecteur vétérinaire peut cependant autoriser le transport de poussins d'un jour, de poules pondeuses ou d'œufs à couvrir à destination d'une exploitation située en dehors de la zone de surveillance. Cette exploitation est alors mise sous contrôle officiel par l'inspecteur vétérinaire, en application des dispositions de l'article 23, § 4;

2° les volailles doivent être confinées dans leurs locaux d'hébergement ou dans tout autre lieu permettant leur isolement;

3° dans la zone de protection, les oiseaux des exploitations situées à moins de 500 mètres d'un foyer doivent être enfermés;

4° aux entrées et sorties des poulaillers et de l'exploitation doit être placé un pédiluve contenant un produit désinfectant autorisé par l'inspecteur vétérinaire;

5° sans préjudice des dispositions imposées par les gouvernements des Régions, il est interdit de transporter ou d'épandre des fumiers de volailles ou des litières usées sans l'autorisation de l'inspecteur vétérinaire.

§ 5. Sont interdits dans la zone de protection:

1° la circulation sur la voie publique et le transport de volailles; cette interdiction n'est pas applicable au transit de volailles par les autoroutes ou les lignes principales du réseau de chemins de fer, à condition que les animaux ne soient pas déchargés et qu'il n'y ait aucun arrêt;

2° les rassemblements de volailles et d'oiseaux;

3° l'accès aux bâtiments et terrains de toute exploitation et de toute installation où sont détenues des volailles, à des personnes étrangères à l'exploitation ou à l'installation en question; cette interdiction n'est pas d'application aux personnes suivantes:

a) le personnel du Service vétérinaire et de l'INRV ou les personnes réquisitionnées par l'inspecteur vétérinaire;

b) les préposés du clos d'équarrissage;

c) la police et la gendarmerie;

d) les personnes préposées aux soins des animaux et qui y sont appelées pour les besoins du service ou du ravitaillement;

4° l'accès aux poulaillers et aux volières, sauf pour:

- a) le responsable lui-même;
- b) le vétérinaire agréé;
- c) le personnel du Service vétérinaire, et de l'INRV.

Toutes ces personnes sont tenues de porter des vêtements de travail et de désinfecter leurs bottes avant d'entrer ou de sortir des poulaillers.

Art. 24. La levée des mesures en vigueur dans la zone de protection intervient au plus tôt 21 jours après l'exécution, dans l'exploitation infectée, des mesures de nettoyage et de désinfection sous la surveillance et selon les instructions de l'inspecteur vétérinaire.

Art. 25. Dans la zone de surveillance, les mesures suivantes sont d'application:

§ 1. Le bourgmestre notifie la délimitation de la zone de surveillance aux responsables des exploitations situées dans cette zone.

§ 2. Le bourgmestre fait procéder à l'inventaire administratif des volailles dans toutes les exploitations situées dans la zone de surveillance. Toutes les exploitations sont identifiées. L'inventaire est transmis à l'inspecteur vétérinaire dans les cinq jours ouvrables.

§ 3. Les responsables des exploitations sont tenus de faire examiner par un vétérinaire agréé toutes les volailles de leur exploitation une fois par semaine avec un intervalle d'au moins 4 jours entre les examens.

Le vétérinaire agréé effectue, lors de sa visite, un examen clinique et un recensement de toutes les volailles de l'exploitation. Si nécessaire, des échantillons sont prélevés en vue d'un examen de laboratoire. Les données et le résultat de ces visites doivent être enregistrés de la manière arrêtée par le Ministre.

§ 4. Le bourgmestre informe les responsables des exploitations situées dans la zone de surveillance des mesures en vigueur dans cette zone:

1° les volailles ne peuvent pas quitter la zone de surveillance pendant les quinze premiers jours, sauf pour être acheminées directement vers un abattoir désigné par l'inspecteur vétérinaire, situé en dehors de la zone de surveillance;

2° le transport direct de volailles à destination d'un abattoir désigné par l'inspecteur vétérinaire n'est autorisé qu'aux conditions suivantes:

- a) le transport doit avoir lieu entre 6 et 17 heures;
- b) les véhicules servant au transport des volailles sont scellés par un délégué de l'inspecteur vétérinaire;
- c) le transport doit être accompagné d'une autorisation de transport délivrée par un vétérinaire agréé;

3° le transport direct de poussins d'un jour, de poulettes prêtes à la ponte et d'autres volailles, ainsi que d'œufs à couver à destination d'une exploitation désignée par l'inspecteur vétérinaire n'est autorisé qu'aux conditions suivantes:

- a) le transport doit être accompagné d'une autorisation de transport délivrée par un vétérinaire agréé, conformément au modèle fixé par le Service;
- b) le véhicule et les caisses sont nettoyés et désinfectés à fond avant de quitter l'exploitation de destination ou dans une installation désignée;
- c) avant leur expédition, les oeufs et leurs emballages doivent être désinfectés.

Dans des cas particuliers, l'inspecteur vétérinaire peut autoriser le transport de poussins d'un jour, de poules pondeuses ou d'œufs à couver à destination d'une exploitation située en dehors de la zone de surveillance. Cette exploitation est alors mise sous contrôle officiel par l'inspecteur vétérinaire, en application des dispositions de l'article 21, § 4;

4° il est interdit d'acheminer des fumiers de volailles ou des litières usées en dehors de la zone de surveillance;

5° tout autre déplacement ou transport de volailles à l'intérieur de la zone de surveillance est interdit; cette interdiction ne s'applique pas au transit de volailles par les autoroutes ou les voies principales du réseau de chemin de fer, à condition que les animaux ne soient pas déchargés et qu'il n'y ait aucun arrêt;

6° les rassemblements de volailles et d'oiseaux sont interdits.

Art. 26. La levée des mesures en vigueur dans la zone de surveillance intervient au plus tôt 30 jours après l'exécution, dans l'exploitation infectée, des mesures de nettoyage et de désinfection.

CHAPITRE VIII - Mesures relatives à la maladie de Newcastle chez les pigeons voyageurs et autres oiseaux

Art. 27. § 1. Lorsque des pigeons voyageurs ou d'autres oiseaux maintenus en captivité sont suspectés d'être infectés par la maladie de Newcastle, l'inspecteur vétérinaire ordonne que soient prélevés sans délai les échantillons nécessaires aux examens de laboratoire.

§ 2. Dès la notification de la suspicion, l'inspecteur vétérinaire place l'exploitation ou le pigeonnier sous surveillance officielle et ordonne qu'aucun pigeon ou tout autre élément susceptible de transmettre la maladie de Newcastle ne quitte le pigeonnier ou l'exploitation.

§ 3. Les mesures de surveillance officielle ne sont levées que lorsque la suspicion de la maladie de Newcastle est infirmée.

Art. 28. § 1. Dès que l'infection est officiellement confirmée, l'inspecteur vétérinaire effectue une enquête épidémiologique conformément aux dispositions du chapitre VI.

§ 2. L'inspecteur vétérinaire fait appliquer les mesures de contrôle et d'éradication visées aux articles 6, 2° et 3°, 8 et 9 aux pigeons voyageurs ou aux oiseaux maintenus en captivité infectés par la maladie de Newcastle.

Art. 29. En dérogation aux dispositions de l'article 28, l'inspecteur vétérinaire peut décider d'appliquer les mesures suivantes:

i) que les pigeons ou les oiseaux maintenus en captivité ne quittent pas le pigeonnier ou l'exploitation durant au moins 60 jours après la disparition des symptômes cliniques de la maladie de Newcastle;

ii) que toutes les matières et déchets susceptibles d'avoir été contaminés soient détruits ou traités. Ce traitement doit garantir la destruction du virus de la maladie de Newcastle présent et de tous les déchets accumulés pendant la période de 60 jours citée au point i).

CHAPITRE IX - Mesures applicables d'office

Art. 30. Le bourgmestre est responsable de l'exécution des mesures prescrites par l'inspecteur vétérinaire dans le foyer, dans la zone de protection et dans la zone de surveillance.

Art. 31. Si le responsable d'une exploitation avicole, d'un pigeonnier, d'autres oiseaux ou d'un couvoir situé dans une zone de protection ou dans une zone de surveillance n'applique pas une ou plusieurs des mesures prescrites par le présent arrêté ou par ses arrêtés d'exécution ou imposées par l'inspecteur vétérinaire, le bourgmestre prend d'office ces mesures aux frais du détenteur, sous la surveillance de la police locale. Au besoin, il fait appel à la gendarmerie.

Les frais occasionnés par l'application d'office de mesures de police vétérinaire sont recouverts par l'administration communale.

Art. 32. L'inspecteur vétérinaire recherche les foyers cachés.

Tout responsable doit prêter son concours ou celui de son personnel à la première injonction orale ou écrite, pour l'examen par le Service de tous les animaux en sa possession.

Art. 33. Toutes les volailles dont la présence sur la voie publique, en un lieu public ou sur la propriété d'autrui constitue une infraction au présent arrêté, sont immédiatement mises à mort sur ordre de l'inspecteur vétérinaire sans expertise et sans indemnisation.

CHAPITRE X - Echanges, transport et rassemblements de volailles

Art. 34. Sans préjudice des dispositions de l'article 23, § 5 et de l'article 25, § 4, le Ministre peut interdire le rassemblement de volailles et d'oiseaux sur tout le territoire du Royaume ou sur une partie du territoire.

Art. 35. Le Ministre peut arrêter les conditions pour la vente publique de volailles et d'oiseaux sur les marchés et pour le rassemblement de volailles et d'oiseaux.

Art. 36. L'inspecteur vétérinaire interdit aux commerçants et transporteurs qui ont vendu ou transporté des volailles suspectes d'infection, l'usage de leurs véhicules durant le temps jugé nécessaire au nettoyage et à la désinfection.

CHAPITRE XI - Examen de diagnostic

Art. 37. Le Service vétérinaire peut prélever ou faire prélever dans toutes les exploitations de volailles ou abattoirs des échantillons en vue de la recherche de l'influenza aviaire ou de la maladie de Newcastle, ou en vue du contrôle du respect des décisions prises conformément à l'article 40.

Pour l'exécution des échantillonnages précités, l'inspecteur vétérinaire peut faire appel à un vétérinaire agréé. Pour ces opérations, le personnel du Service vétérinaire et de l'INRV et les vétérinaires agréés ont libre accès aux exploitations en cause. Les éleveurs de volailles sont tenus d'accorder leur aide aux personnes préposées à l'échantillonnage, et ils ne peuvent pas s'y opposer.

Art. 38. § 1. Le prélèvement d'échantillons et les examens de laboratoire en vue de la détection de l'influenza aviaire doivent se faire selon les techniques arrêtées à l'annexe I.

§ 2. Le prélèvement d'échantillons et les examens de laboratoire en vue de la détection de la maladie de Newcastle doivent se faire selon les techniques arrêtées à l'annexe II.

§ 3. Le Ministre peut adapter l'annexe I aux modifications apportées à l'annexe I de la directive 92/40/CEE, et il peut adapter l'annexe II aux modifications apportées à l'annexe I de la directive 92/66/CEE.

§ 4. L'INRV est désigné comme laboratoire national de référence pour l'harmonisation des techniques de laboratoire utilisées visées aux §§ 1 et 2.

CHAPITRE XII - Traitement préventif et curatif de l'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle

Art. 39. Tout traitement préventif ou curatif de l'influenza aviaire ou de la maladie de Newcastle est interdit.

Art. 40. § 1. Le Ministre peut, en dérogation de l'article 39 fixer les modalités qui sont d'application lorsqu'il décrète la vaccination obligatoire des volailles.

Il peut décréter la vaccination obligatoire pour l'ensemble ou pour une partie du Royaume.

Le cas échéant, il peut prévoir la possibilité d'une dispense de la vaccination obligatoire et autoriser des schémas de vaccination alternatifs.

§ 2. Le Ministre peut également arrêter un programme de vaccination contre la maladie de Newcastle pour des pigeons voyageurs, pigeons d'expositions et des autres oiseaux. Les organisateurs de concours et expositions prennent, en concertation avec le Service, les dispositions nécessaires afin que seuls soient admis aux compétitions ou expositions les pigeons voyageurs ou autres oiseaux qui ont été vaccinés contre la maladie de Newcastle par un vétérinaire agréé.

§ 3. Le Ministre détermine quelles souches de virus peuvent être autorisées pour la vaccination des volailles et des oiseaux contre la maladie de Newcastle.

CHAPITRE XIII - Dispositions générales

Art. 41. Lorsqu'il y a menace d'infection ou d'extension de la maladie, le Ministre peut prendre toutes mesures temporaires qu'il juge nécessaires en vue de combattre et d'éradiquer l'influenza aviaire ou la maladie de Newcastle.

Il peut à cette occasion, soit compléter la réglementation existante, soit s'en écarter entièrement ou partiellement.

Art. 42. Tous les vétérinaires agréés doivent suivre scrupuleusement les instructions données par l'inspecteur vétérinaire concernant l'influenza aviaire ou la maladie de Newcastle, et lui fournir à tout moment les renseignements demandés.

Art. 43. Les responsables et les personnes qui transportent ou font transporter des poussins d'un jour, des volailles et des oeufs à couver sont tenus de communiquer aux autorités compétentes qui en font la demande, tout renseignement concernant l'origine ou la destination des poussins d'un jour, volailles ou oeufs à couver qu'ils détiennent, transportent ou font transporter, en indiquant, selon le cas, les nom, prénom et adresse du vendeur ou du responsable précédent, le lieu ou s'est fait le transfert de propriété ou de possession et les lieux où ont séjourné les poussins d'un jour, volailles ou oeufs à couver depuis le transfert.

Le Ministre peut imposer la tenue de registres aux fins d'enregistrement de ces données.

Art. 44. Les aliments pour volailles, y compris les céréales destinées à l'alimentation des volailles, ne peuvent être livrés qu'en emballage perdu ou en vrac.

Art. 45. Les infractions aux dispositions du présent arrêté sont recherchées, constatées et punies conformément aux chapitres V et VI de la loi.

Art. 46. L'arrêté royal du 16 juillet 1981 portant des mesures de police sanitaire relatives à la peste aviaire et à la pseudo peste aviaire, modifié par l'arrêté royal du 13 mai 1992 est abrogé.

Art. 47. Notre Ministre de l'Agriculture est chargé de l'exécution du présent arrêté.

Modifications :

Arrêté royal du 13.07.2001 (M.B. 11.08.2001)

Annexe I

Méthodes de diagnostic pour la confirmation et le diagnostic différentiel de l'influenza aviaire.

Les méthodes d'isolement et de caractérisation des virus de l'influenza aviaire exposées ci-après doivent être considérées comme des orientations et comme les minima à appliquer pour les diagnostics de la maladie.

Aux fins des méthodes de diagnostic pour la confirmation et du diagnostic différentiel de l'influenza aviaire, on entend par:

" influenza aviaire ": l'infection des volailles causée par tout virus grippal de type A ayant, chez les poulets âgés de six semaines, un indice de pathogénicité intraveineux supérieur à 1,2 ou toute infection causée par des virus grippaux de type A et de sous-types H5 ou H7 pour lesquels le séquençage des nucléotides a prouvé la présence d'acides aminés basiques multiples au niveau du site de coupure de l'hémagglutinine.

CHAPITRE I. - Echantillonnage et traitement des échantillons.

1. Echantillons.

Écouvillonnages cloacaux (ou fèces) et écouvillonnages trachéaux d'oiseaux malades; fèces ou contenus des organes (intestin, encéphale, trachée, poumons, foie, rate et autres), manifestement affectés, provenant de cadavres frais d'oiseaux.

2. Traitement des échantillons.

Les organes et tissus mentionnés au paragraphe 1 peuvent être groupés, mais il est impératif que les matières fécales soient traitées séparément. Les écouvillonnages doivent être placés dans une quantité de milieu antibiotique suffisante pour assurer leur immersion totale. Les échantillons de fèces et d'organe doivent être homogénéisés (à l'aide d'un mélangeur fermé ou d'un pilon et d'un mortier et de sable stérile) dans un milieu antibiotique jusqu'à l'obtention de suspension à 10-20 % p/v dans le milieu. Laisser reposer les suspensions pendant deux heures environ à la température ambiante (ou plus longtemps à 4 °C), puis les clarifier par centrifugation (par exemple, 800 à 1 000 tours g pendant dix minutes).

3. Milieu antibiotique.

Diverses formulations de milieux antibiotiques ont été utilisées avec succès. Des concentrations élevées d'antibiotiques sont nécessaires pour les échantillons de fèces. Le mélange suivant est typique: 10 000 unités/ml de pénicilline, 10 mg/ml de streptomycine, 0,25 mg/ml de gentamycine et 5 000 unités/ml de mycostatine dans une solution tamponnée au phosphate (STP). Ces taux peuvent être cinq fois moins élevés pour les tissus et les écouvillonnages trachéaux. Pour le contrôle des Chlamydia, l'addition de 50 mg/ml d'oxytétracycline est autorisée. Lors de la confection du milieu, il est impératif que le pH soit contrôlé après addition des antibiotiques et ajusté pour obtenir un pH compris entre 7,0 et 7,4.

CHAPITRE II. - Isolement du virus.

Isolement du virus dans les oeufs embryonnés de poules.

Inoculer entre 0,1 et 0,2 ml du surnageant clarifié dans la cavité allantoïdienne d'au moins quatre oeufs embryonnés de poules, mis à incuber pendant 8 à 10 jours. Idéalement, ces oeufs devraient être issus d'un troupeau exempt d'organes pathogènes spécifiques, mais, si cela n'est pas possible, il est admis d'utiliser des oeufs issus d'un troupeau reconnu exempt d'anticorps du virus de l'influenza aviaire. Les oeufs inoculés sont conservés à 37 °C et mirés quotidiennement. Au fur et à mesure, les oeufs contenant des embryons morts ou mourants et tous les oeufs restant après six jours d'inoculation doivent être réfrigérés à 4 °C et faire l'objet d'une recherche d'hémagglutinines à partir du liquide allantoïdien/amniotique. En l'absence d'hémagglutination, on répète cette procédure en utilisant comme inoculum le liquide allantoïdien/amniotique non dilué.

Lorsqu'il y a hémagglutination, la présence de bactéries doit être exclue par culture. S'il y a des bactéries, il est admis de passer les liquides par un filtre à membrane de 450 nm, d'ajouter un complément d'antibiotiques et d'inoculer les oeufs embryonnés comme indiqué ci-dessus.

CHAPITRE III. - Diagnostic différentiel.

1. Différentiation préliminaire.

Étant donné qu'il est important de mettre en oeuvre, dès que possible, des mesures de lutte contre l'influenza aviaire visant à limiter la propagation du virus, l'INRV doit être en mesure d'identifier tout virus hémagglutinant isolé comme étant un virus grippal de sous-type H5 ou H7, en plus du virus de la maladie de Newcastle. Les

liquides hémagglutinants doivent donc être utilisés dans un test d'hémagglutination tel qu'il est décrit aux chapitres V et VI. Une inhibition positive, c'est-à-dire 2 4 ou plus, à l'aide d'antisérums polyclonaux spécifiques de sous-type H5 ou H7 de la grippe de type A, d'un titre d'au moins 2 9, pourra servir d'identification préliminaire permettant la mise en oeuvre de mesures de contrôle intermédiaires.

2. Confirmation.

L'INRV doit:

- i) confirmer le fait que l'isolat est un virus grippal de type A, à l'aide d'un test d'immunodiffusion double, afin de détecter les groupements d'antigènes, selon la méthode décrite au chapitre IX (le laboratoire national pourra utiliser, s'il le préfère, l'immunofluorescence ou les techniques ELISA pour détecter les groupements d'antigènes);
- ii) déterminer si l'isolat est ou n'est pas de sous-type H5 ou H7;
- iii) effectuer un test de recherche de l'indice de pathogénicité intraveineux chez les poulets âgés de six semaines, selon la méthode décrite au chapitre 7. Des indices de pathogénicité intraveineux supérieurs à 1,2 indiquent la présence du virus et exigent la pleine application des mesures de contrôle (il serait utile que l'INRV effectue également des tests, en vue de déterminer la capacité d'un isolat de produire des plages dans les cultures cellulaires, comme prévu au chapitre 8).

L'INRV doit immédiatement soumettre tous les isolats de l'influenza aviaire et les isolats de sous-type H5 ou H7 au laboratoire communautaire de référence à des fins de caractérisation complète.

CHAPITRE IV. - Tests sérologiques de détection des anticorps du virus de l'influenza aviaire.

1. Pendant les programmes d'éradication où le sous-type H du virus responsable est connu, ou lorsque le virus homologue est utilisé comme antigène, on peut procéder à un contrôle sérologique afin de prouver l'infection à l'aide de tests d'inhibition de l'hémagglutination, selon la méthode décrite aux chapitres V et VI.

Si le sous-type de l'hémagglutinine n'est pas connu, la présence de l'infection due aux virus grippaux de type A peut être prouvée en détectant des anticorps dirigés vers les antigènes spécifiques du groupe.

A cette fin, on procède soit à un test d'immunodiffusion double (tel que décrit au chapitre IX), soit à un test ELISA (un des inconvénients de ce test est la spécificité de ses hôtes, puisqu'il dépend de la détection des immunoglobulines hôtes). Les oiseaux aquatiques présentent rarement des résultats positifs aux tests d'immunodiffusion double, et, à moins que le sous-type soit connu, il est probablement possible d'examiner ces oiseaux uniquement afin de détecter la présence d'anticorps dans les sous-types H5 et H7.

2. a) Echantillons.

Les échantillons sanguins doivent être prélevés sur tous les oiseaux pour les troupeaux en comptant moins de 20 et sur 20 oiseaux pour les troupeaux plus importants (cela donne une probabilité de 99 % de déceler au moins 1 sérum positif si 25 % ou plus des animaux du troupeau sont positifs, quelle que soit la taille du troupeau). Pour le test, il convient de laisser coaguler le sang et d'enlever le sérum.

b) Recherche des anticorps.

Il conviendrait de rechercher la capacité des échantillons individuels de sérum à inhiber l'antigène hémagglutinant du virus grippal dans des tests standards d'inhibition de l'hémagglutination comme décrits au chapitre VI.

Le choix quant à la question de savoir s'il convient d'utiliser, pour le test d'inhibition de l'hémagglutination, 4 ou 8 unités hémagglutinantes doit être laissé à la discrétion de l'INRV.

Toutefois, l'antigène utilisé affectera le niveau auquel un sérum est considéré positif: pour 4 unités hémagglutinantes, est considéré positif tout sérum dont le titre est égal ou supérieur à 2 4, pour 8 unités hémagglutinantes, tout sérum dont le titre est égal ou supérieur à 2 3.

CHAPITRE V. - Test d'hémagglutination (HA).

Réactifs.

1. Solution isotonique tamponnée au phosphate (STP) (0,05 M), avec pH compris entre 7,0 et 7,4.

2. Prélever des hématies en mélange provenant d'au moins 3 poules exemptes d'organisation pathogènes spécifiques (si l'on n'en dispose pas, prélever du sang sur des oiseaux régulièrement contrôlés et reconnus exemptes d'anticorps du virus de l'influenza aviaire) et les placer dans un volume égal de solution d'Alsever. Laver les cellules trois fois dans la STP avant l'utilisation. Pour l'autre test, une suspension à 1 % (valeur hématocrite) dans le PBS est recommandée.

3. Le laboratoire de référence communautaire fournira ou recommandera les virus H5 et H7 de faible virulence pour servir d'antigènes standard.

Méthode.

1. Distribuer 0,025 ml de STP dans chaque puits d'une microplaque en plastique (utiliser des fonds en V).
2. Verser 0,025 ml de suspension du virus (c'est-à-dire de liquide allantoïdien) dans le premier puits.
3. Utiliser un microdilueur ou réaliser des dilutions par dédoublement du virus (1/2 à 1/4 096) de puits en puits.
4. Ajouter 0,025 ml de PBS dans chaque puits.
5. Ajouter 0,025 ml d'hématies à 1 % dans chaque puits.
6. Mélanger en tapotant doucement et laisser reposer à 4 °C.
7. Lire les plaques 30 à 40 minutes plus tard lorsque la sédimentation des témoins est achevée. Pour lire, incliner la plaque pour observer la présence ou l'absence d'un flux en forme de larme des hématies. Les puits sans hémagglutination devraient s'écouler au même rythme que les cellules témoins sans virus.
8. Le titre hémagglutinant correspond à la dilution la plus élevée entraînant l'agglutination des hématies. Cette dilution peut être considérée comme contenant une unité hémagglutinante. Une méthode plus précise pour déterminer le titre hémagglutinant consiste à réaliser les tests HA sur des virus provenant d'une gamme complète de dilution initiale du type 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, etc. Cette méthode est recommandée pour la préparation précise de l'antigène destiné aux tests d'inhibition de l'hémagglutination (chapitre VI).

CHAPITRE VI. - Test d'inhibition de l'hémagglutination (HI).**Réactifs.**

1. Solution tampon au phosphate (STP).
2. Liquide allantoïdien contenant le virus, dilué dans la STP et contenant 4 ou 8 unités hémagglutinantes par 0,025 ml.
3. Hématies de poulet à 1 %.
4. Sérum témoin négatif de poulet.
5. Sérum témoin positif.

Méthode.

1. Distribuer 0,025 ml de STP dans tous les puits d'une microplaque plastique (puits à fond en V).
2. Verser 0,025 ml de sérum dans le premier puits de la plaque.
3. Utiliser un microdilueur pour réaliser les dilutions doubles de sérum de puits en puits.
4. Ajouter (0,025 ml de liquide allantoïdien dilué contenant 4 ou 8 unités hémagglutinantes.
5. Mélanger en tapotant doucement et laisser reposer la plaque à 4 °C pendant un minimum de 60 minutes ou à la température ambiante pendant un minimum de 30 minutes.
6. Ajouter 0,025 ml d'hématies à 1 % dans tous les puits.
7. Mélanger en tapotant doucement et laisser reposer à 4 °C.
8. Lire les plaques après 30 à 40 minutes lorsque la sédimentation des hématies témoins est terminée. Lire en inclinant la plaque pour observer la présence ou l'absence d'un flux en forme de larme s'écoulant au même rythme que les puits témoins contenant des hématies (0,025 ml) et du PBS (0,05 ml) uniquement.
9. Le titre HI correspondant à la dilution la plus élevée d'antisérum entraînant une inhibition complète de 4 à 8 unités du virus (le titrage du HA pour confirmer la présence du nombre requis d'unités hémagglutinantes doit être inclus pour chaque test HI).

10. La validité des résultats dépend de l'obtention d'un titre inférieur à 2 3 pour 4 unités hémagglutinantes ou 2 2 pour 8 unités hémagglutinantes avec le sérum témoin négatif et d'un titre d'une dilution immédiatement supérieure ou immédiatement inférieure au titre connu du sérum témoin positif.

CHAPITRE VII. - Indice de pathogénicité intraveineux (IPIC).

1. Diluer à 10⁻¹ dans du liquide physiologique stérile du liquide allantoïdien infectieux dès le niveau de passage disponible le plus bas, de préférence dès l'isolement initial, sans sélection préalable.
2. Injecter par voie intraveineuse 0,1 ml du virus dilué à 10 poussins âgés de six semaines (les oiseaux utilisés doivent être indemnes d'organismes pathogènes spécifiques).
3. Examiner les sujets à 24 heures d'intervalle pendant 10 jours.
4. A chaque observation, attribuer un coefficient à chaque animal: 0 = normal, 1 = malade, 2 = gravement malade et 3 = mort.
5. Enregistrer les résultats et calculer l'indice selon l'exemple indiqué ci-dessous:

Signes cliniques	Jours suivant l'inoculation										Score total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Normaux	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12 x 0 = 0
Malades	0	4	2	2	0	0	0	0	0	0	6 x 1 = 6
Gravement malade*	0	4	2	2	0	0	0	0	0	0	6 x 2 = 12
Morts	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76 x 3 = 228
											Total = 246

Indice = résultat moyen par animal et par observation: $246/100 = 2,46$.

(*) Cette évaluation clinique doit être subjective, mais normalement elle suppose que les oiseaux présentent plusieurs des symptômes suivants: troubles respiratoires, abattement, diarrhée, cyanose de la peau exposée ou barbillons, oedème de la face et/ou de la tête, troubles nerveux.

CHAPITRE VIII. - Evaluation de la capacité à former des plages.

1. Il est généralement préférable d'utiliser une gamme de dilution du virus pour faire en sorte d'obtenir un nombre optimum de plages sur la plaque. Des dilutions décuples allant jusqu'à 10⁻⁷ dans le PBS devraient être suffisantes.
2. Des cultures monocouches confluentes de cellules d'embryon de poulet ou une lignée cellulaire appropriée (par exemple, Madin-Darby bovine kidney) sont préparées dans des boîtes de Petri de 5 cm de diamètre.
3. Ajouter 0,2 ml de chaque dilution du virus dans chacune des deux boîtes de Petri et laisser reposer 30 minutes pour l'absorption du virus.
4. Après avoir été lavées trois fois dans la STP, les cellules infectées sont recouvertes d'un milieu approprié contenant de l'agar à 1 % p/v et éventuellement 0,01 mg/ml de trypsine. Il est important de n'ajouter aucun sérum au milieu d'immersion.
5. Après une incubation de 72 heures à 37 °C, les plages devraient être d'une taille suffisante. Pour une meilleure observation, enlever la couverture d'agar et colorer la culture monocouche à l'aide de crystal violet (0,5 % p/v) dans 25 % p/v d'éthanol.
6. Tous les virus doivent présenter des plages claires lorsqu'ils sont incubés dans un milieu contenant de la trypsine. Lorsque les milieux de couverture ne contiennent pas de trypsine, seuls les virus virulents pour les poulets formeront des plages.

CHAPITRE IX. - Immunodiffusion double.

Pour démontrer la présence du virus grippal de type A, on préfère utiliser la méthode qui démontre le fait que la nucléocapside ou les antigènes de la matrice sont communs à tous les virus grippaux de type A. Cette méthode est généralement utilisée dans les tests d'immunodiffusion double qui supposent soit des préparations à base de virus concentré, soit des extraits de membranes chorio-allantoïdiennes infectées.

Des préparations appropriées à base de virus concentré peuvent être obtenues par simple centrifugation à vitesse de rotation élevée du liquide allantoïdien infectieux et par rupture du virus afin de libérer la nucléocapside interne, ainsi que les antigènes de la matrice, par traitement avec du détergent à base de sarcosinate-lauroyl de sodium. La précipitation à l'acide peut également être utilisée en ajoutant 1 N HCL à du liquide allantoïdien infectieux pour obtenir un pH final compris entre 3,5 et 4,0 et en procédant à la réfrigération à 0 °C pendant au moins un heure et à la centrifugation à faible vitesse à 1 000 g pendant dix minutes.

Le liquide surnageant peut être jeté et le précipité contenant du virus remis en suspension dans un volume minimum de tampon sarkosyl-glycine (1 % de sarcosinate-lauroyl de sodium tamponné à un pH de 9,0 avec 0,5 M de glycine). Ces préparations possèdent à la fois les nucléocapsides et les antigènes de la matrice.

Beard (1970) a décrit la préparation de l'antigène riche en nucléocapsides à partir de membranes chorio-allantoïdiennes retirées des oeufs infectés. Cette méthode suppose qu'il faut retirer les membranes chorio-allantoïdiennes des oeufs infectés présentant un résultat positif à l'hémagglutinine, les broyer ou les homogénéiser, les congeler et les décongeler trois fois, et ensuite les soumettre à une centrifugation à 1 000 g pendant dix minutes. La granule est jetée et le surnageant traité avec 0,1 % de formol afin qu'il puisse être utilisé comme antigène.

Chacun des deux antigènes peut être utilisé dans des tests d'immunodiffusion double en utilisant 1 % d'agrose ou de la gélose ou des gels contenant 8,0 % de chlorure de sodium obtenus à partir de 0,1 M de tampon phosphate de pH 7,2. Le virus grippal de type A est confirmé par les lignes de précipité formées à partir de l'antigène utilisé dans le test et de l'antigène connu comme étant positif contre un antisérum également positif, lesquels s'unissent afin de donner une ligne d'identité.

Annexe II

Méthodes de diagnostic pour la confirmation et diagnostics différentiels de la maladie de Newcastle.

Les procédures d'isolement et de caractérisation des virus de la maladie de Newcastle exposées ci-après doivent être considérées comme des orientations et comme les minima à appliquer pour les diagnostics de la maladie.

Le virus responsable de la maladie de Newcastle est le virus prototype des Paramyxoviridae. A l'heure actuelle, il existe neuf groupes de paramyxovirus aviaires pouvant être distingués sur le plan sérologique, dénommés en conséquence PMV-1, PMV-2, ..., PMV-9. Tous les virus de la maladie de Newcastle sont classés dans le groupe PMV-1. Pour les besoins des techniques de diagnostic permettant de confirmer la maladie de Newcastle et pour le diagnostic différentiel, la définition suivante est applicable:

On entend par maladie de Newcastle une infection provoquée par toute souche aviaire du paramyxovirus 1 ayant, chez les poussins d'un jour, un indice de pathogénie intracérébrale (ICPI) supérieur à 0,7.

CHAPITRE I. - Echantillonnage et traitement des échantillons.

1. Echantillons.

Écouvillonnages cloacaux (ou fèces) et écouvillonnages trachéaux d'oiseaux malades; fèces ou contenus des organes (intestin, encéphale, trachée, poumons, foie, rate et autres), manifestement affectés, provenant de cadavres frais d'oiseaux.

2. Traitement des échantillons.

Les organes et tissus mentionnés au paragraphe 1 peuvent être groupés, mais il est impératif que les matières fécales soient traitées séparément. Les écouvillonnages doivent être placés dans une quantité de milieu antibiotique suffisante pour assurer leur immersion totale. Les échantillons de fèces et d'organes doivent être homogénéisés (à l'aide d'un mélangeur fermé ou d'un pilon et d'un mortier et de sable stérile) dans un milieu antibiotique jusqu'à l'obtention de suspension à 10-20 % p/v dans le milieu. Laisser reposer les suspensions pendant deux heures environ à la température ambiante (ou plus longtemps à 4 °C), puis les clarifier par centrifugation (par exemple, 800 à 1 000 g pendant dix minutes).

3. Milieu antibiotique.

Diverses formulations de milieux antibiotiques ont été utilisées avec succès. Des concentrations élevées d'antibiotiques sont nécessaires pour les échantillons de fèces. Le mélange suivant est typique: 10 000 unités/ml de pénicilline, 10 mg/ml de streptomycine, 0,25 mg/ml de gentamycine et 5 000 unités/ml de mycostatine dans une solution tamponnée au phosphate (STP). Ces taux peuvent être cinq fois moins élevés pour les tissus et les écouvillonnages trachéaux. Pour le contrôle des Chlamydia, l'addition de 50 mg/ml d'oxytétracycline est autorisée. Lors de la confection du milieu, il est impératif que le pH soit contrôlé après addition des antibiotiques et ajusté pour obtenir un pH compris entre 7,0 et 7,4.

CHAPITRE II. - Isolement du virus.

Isolement du virus dans les oeufs embryonnés de poules.

Inoculer entre 0,1 et 0,2 ml du surnageant clarifié dans la cavité allantoïdienne d'au moins quatre oeufs embryonnés de poules, mis à incuber pendant 8 à 10 jours. Idéalement, ces oeufs devraient être issus d'un troupeau EOPS (exempt d'organes pathogènes spécifiques), mais, si cela n'est pas possible, il est admis d'utiliser des oeufs issus d'un troupeau reconnu exempt d'anticorps du virus de la maladie de Newcastle. Les oeufs inoculés sont conservés à 37 °C et mirés quotidiennement. Au fur et à mesure, les oeufs contenant des embryons morts ou mourants et tous les oeufs restant après six jours d'inoculation doivent être réfrigérés à 4 °C et faire l'objet d'une recherche d'hémagglutinines à partir du liquide allantoïdien/amniotique. En l'absence d'hémagglutination, on répète cette procédure en utilisant comme inoculum le liquide allantoïdien/amniotique non dilué.

Lorsqu'il y a hémagglutination, la présence de bactéries doit être exclue par culture. S'il y a des bactéries, il est admis de passer les liquides par un filtre à membrane de 450 nm, d'ajouter un complément d'antibiotiques et d'inoculer les oeufs embryonnés comme indiqué ci-dessus.

CHAPITRE III. - Diagnostic différentiel.

1. Différentiation préliminaire.

Tous les virus hémagglutinants sont soumis à l'INRV à des tests d'identification complète, de caractérisation et de tests de pathogénicité. Il est important de mettre en oeuvre, dès que possible, des mesures intérimaires de lutte contre la maladie de Newcastle visant à limiter la propagation du virus, et l'INRV devrait être en mesure d'identifier la présence du virus de cette maladie. Les liquides hémagglutinants doivent donc être utilisés dans un

test d'hémagglutination tel qu'il est décrit aux chapitres 5 et 6. Une inhibition positive, c'est-à-dire 2 4 ou plus, à l'aide d'un antisérum polyclonal spécifique du virus de la maladie de Newcastle, d'un titre d'au moins 2 9, pourra servir d'identification préliminaire permettant la mise en oeuvre de mesures de contrôle intermédiaires.

2. Confirmation.

L'INRV effectue le diagnostic différentiel complet et tout agent hémagglutinant. La confirmation du virus de la maladie de Newcastle doit à nouveau se faire par inhibition à l'aide de tests d'inhibition de l'hémagglutination avec des antisérums monospécifiques de poulet. Des tests de recherche de l'indice de pathogénicité intracérébral selon la procédure décrite au chapitre 7 doivent être effectués sur tous les isolats positifs. Des indices de pathogénicité supérieur à 0,7 indiquent la présence du virus et exigent la pleine application de mesures de contrôle.

Des développements récents dans le typage des virus de la maladie de Newcastle, notamment les techniques faisant appel à des anticorps monoclonaux, ont permis le groupage des souches et des isolats. En particulier, il existe des anticorps monoclonaux spécifiques des souches vaccinales utilisées dans la Communauté qui peuvent être employés dans des tests simples d'inhibition de l'hémagglutination.

Etant donné que des souches de vaccins vivants peuvent souvent être isolées à partir d'échantillons de volailles, les avantages que présente leur identification rapide par l'INRV sont évidents. Ces anticorps monoclonaux pourraient être obtenus du laboratoire communautaire de référence et être fournis à l'INRV pour permettre la confirmation de l'isolement des virus vaccinaux.

L'INRV soumet tous les agents d'hémagglutination au laboratoire communautaire de référence.

CHAPITRE IV. - Tests rapides de détection du virus et des anticorps de la maladie de Newcastle.

Tests rapides de détection du virus de la maladie de Newcastle chez les oiseaux vaccinés et de détection des anticorps chez les oiseaux non vaccinés.

1. Détection du virus de la maladie de Newcastle Différents tests rapides permettant de détecter directement les antigènes de la maladie de Newcastle ont été utilisés dans le diagnostic des infections chez les oiseaux vaccinés. Les plus couramment utilisés jusqu'à présent sont les tests aux anticorps fluorescents sur des sections longitudinales de la trachée et les tests aux anticorps à la peroxydase sur l'encéphale. Il n'y a aucune raison de douter que d'autres tests de détection directe de l'antigène puissent être utilisés pour les infections dues au virus de la maladie de Newcastle.

L'inconvénient de ces tests est que l'examen de tous les sites potentiels de réplication du virus de la maladie de Newcastle chez les oiseaux vaccinés est irréalisable. Par exemple, l'absence de l'évidence du virus dans la trachée n'exclut pas la réplication du virus dans l'intestin. Aucune méthode directe de détection de la maladie de Newcastle même si, dans des circonstances bien spécifiques, de tels tests peuvent jouer un rôle utile.

2. Détection d'anticorps chez les oiseaux non vaccinés.

L'INRV contrôle l'utilisation uniforme du test d'inhibition de l'hémagglutination dans des centres provinciaux de dépistage agréés.

a) Echantillons.

Les échantillons sanguins doivent être prélevés sur tous les oiseaux pour les troupeaux en comptant moins de 20 et sur 20 oiseaux pour les troupeaux plus importants (cela donne une probabilité de 99 % de détecter au moins un sérum positif si 25 % ou plus des animaux du troupeau sont positifs, quelle que soit la taille du troupeau). Pour le test, il convient de laisser coaguler le sang et d'enlever le sérum.

b) Recherche des anticorps.

Il convient de rechercher la capacité des échantillons individuels de sérum à inhiber l'antigène hémagglutinant du virus de la maladie de Newcastle dans des tests standards d'inhibition de l'hémagglutination comme décrits au chapitre VI.

Le choix pour le test d'inhibition de l'hémagglutination, quatre ou huit unités hémagglutinantes est laissé à la discrétion de l'INRV. Toutefois, l'antigène utilisé affectera le niveau auquel un sérum est considéré positif: pour quatre unités hémagglutinantes, est considéré positif tout sérum dont le titre est égal ou supérieur à 2 4 et, pour huit unités hémagglutinantes, tout sérum dont le titre est égal ou supérieur à 2 3.

CHAPITRE V. - Test d'hémagglutination (HA).

Réactifs.

1. Solution isotonique tamponnée au phosphate (STP) (0,05 M), avec pH compris entre 7,0 et 7,4.

2. Prélever des hématies en mélange provenant d'au moins 3 poules exemptes d'organisation pathogènes spécifiques (si l'on n'en dispose pas, prélever du sang sur des oiseaux régulièrement contrôlés et reconnus exempts d'anticorps antivirux de la maladie de Newcastle et les placer dans un volume égal de solution d'Alsever.

Laver les cellules trois fois dans la STP avant l'utilisation. Pour l'autre test, une suspension à 1 % (valeur hématocrite) dans le PBS est recommandée.

3. La souche Ulster 2C du virus de la maladie de Newcastle est recommandée pour servir d'antigènes standard.

Méthode.

- a) Distribuer 0,025 ml de STP dans chaque puits d'une microplaque en plastique (utiliser des fonds en V).
- b) Verser 0,025 ml de suspension du virus (c'est-à-dire de liquide allantoïdien) dans le premier puits.
- c) Utiliser un microdilueur ou réaliser des dilutions par dédoublement du virus (1/2 à 1/4 096) de puits en puits.
- d) Ajouter 0,025 ml de STP dans chaque puits.
- e) Ajouter 0,025 ml d'hématies à 1 % dans chaque puits.
- f) Mélanger en tapotant doucement et laisser reposer à 4 °C.
- g) Lire les plaques 30 à 40 minutes plus tard lorsque la sédimentation des témoins est achevée. Lire en inclinant la plaque pour observer la présence ou l'absence d'un flux en forme de larme des hématies. Les puits sans hémagglutination devraient s'écouler au même rythme que les cellules témoins sans virus.
- h) Le titre hémagglutinant correspond à la dilution la plus élevée entraînant l'agglutination des hématies. Cette dilution peut être considérée comme contenant une unité hémagglutinante. Une méthode plus précise pour déterminer le titre hémagglutinant consiste à réaliser les tests HA sur des virus provenant d'une gamme complète de dilution initiale du type 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, etc. Cette méthode est recommandée pour la préparation précise de l'antigène destiné aux tests d'inhibition de l'hémagglutination (chapitre 6).

CHAPITRE VI. - Test d'inhibition de l'hémagglutination (HI) test.

Réactifs (voir chapitre 5).

- a) Solution tamponnée au phosphate (STP).
- b) Liquide allantoïdien contenant le virus, dilué dans la STP et contenant quatre ou huit unités hémagglutinantes par 0,025 ml.
- c) Hématies de poulet à 1 %.
- d) Sérum témoin négatif de poulet.
- e) Sérum témoin positif.

Méthode.

- a) Distribuer 0,025 ml de STP dans tous les puits d'une microplaque plastique (puits à fond en V).
- b) Verser 0,025 ml de sérum dans le premier puits de la plaque.
- c) Utiliser un microdilueur pour réaliser les dilutions doubles de sérum de puits en puits.
- d) Ajouter 0,025 ml de liquide allantoïdien dilué contenant quatre ou huit unités hémagglutinantes.
- e) Mélanger en tapotant doucement et laisser reposer la plaque à 4 °C pendant un minimum de 60 minutes ou à la température ambiante pendant un minimum de 30 minutes.
- f) Ajouter 0,025 ml d'hématies à 1 % dans tous les puits.
- g) Mélanger en tapotant doucement et laisser reposer à 4 °C.
- h) Lire les plaques après 30 à 40 minutes lorsque la sédimentation des hématies témoins est terminée. Lire en inclinant la plaque pour observer la présence ou l'absence d'un flux en forme de larme s'écoulant au même rythme que les puits témoins contenant des hématies (0,025 ml) et du PBS (0,05 ml) uniquement.

i) Le titre HI correspondant à la dilution la plus élevée d'antisérum entraînant une inhibition complète de quatre à huit unités du virus (le titrage du HA pour confirmer la présence du nombre requis d'unités hémagglutinantes doit être inclus pour chaque test HI).

j) La validité des résultats dépend de l'obtention d'un titre inférieur à 2 3 pour quatre unités hémagglutinantes ou 2 2 pour huit unités hémagglutinantes avec le sérum témoin négatif et d'un titre d'une dilution immédiatement supérieure ou immédiatement inférieure au titre connu du sérum témoin positif.

CHAPITRE VII. - Indice de pathogénicité intraveineux (IPIC).

1. Diluer à 1:10 dans du liquide physiologique stérile du liquide allantoïdien infectieux fraîchement récolté (le titre HA doit être supérieur à 2 4) (l'emploi d'antibiotiques est interdits).

2. Injecter par voie intracérébrale 0,05 ml du virus dilué à dix poussins d'un jour (c'est-à-dire âgés de plus de 24 heures et de moins de 40 heures après l'éclosion); ces poussins doivent être issus d'œufs provenant d'un troupeau exempt d'organismes pathogènes spécifiques.

3. Examiner les sujets à 24 heures d'intervalle pendant huit jours.

4. A chaque observation, attribuer un coefficient à chaque animal (0: normal, 1: malade, 2: mort).

5. Calculer l'indice selon l'exemple indiqué ci-dessous:

Signes cliniques	Jours suivant l'inoculation								Score total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Normaux	10	4	0	0	0	0	0	0	14 x 0 = 0
Malades	0	10	6	4	0	0	0	0	20 x 1 = 20
Morts	0	0	0	6	10	10	10	10	46 x 2 = 92
									Total = 112

Indice = résultat moyen par animal et par observation: $112/80 = 1,4$.

CHAPITRE VIII. - Evaluation de la capacité à former des plages.

1. Il est généralement préférable d'utiliser une gamme de dilution du virus pour faire en sorte d'obtenir un nombre optimal de plages de plages sur la plaque. Des dilutions décuples allant jusqu'à 10⁷ dans la STP devraient être suffisantes.

2. Des cultures monocouches confluentes de cellules d'embryon de poulet ou une lignée cellulaire appropriée (par exemple, Madin-Darby bovine kidney) sont préparées dans des boîtes de Petri de 5 cm de diamètre.

3. Ajouter 0,2 ml de chaque dilution du virus dans chacune des deux boîtes de Petri et laisser reposer 30 minutes pour l'absorption du virus.

4. Après avoir été lavées trois fois dans la STP, les cellules infectées sont recouvertes d'un milieu approprié contenant de l'agar à 1 % p/v et éventuellement 0,01 mg/ml de trypsine. Il est important de n'ajouter aucun sérum au milieu d'immersion.

5. Après une incubation de 72 heures à 37 °C, les plages devraient être d'une taille suffisante. Pour une meilleure observation, enlever la couverture d'agar et colorer la culture monocouche à l'aide de crystal violet (0,5 % p/v) dans 25 % p/v d'éthanol.

6. Tous les virus doivent présenter des plages claires lorsqu'ils sont incubés dans un milieu contenant de la trypsine. Lorsque les milieux de couverture ne contiennent pas de trypsine, seuls les virus virulents pour les poulets formeront des plages.



Annexe III

Les centres provinciaux de dépistage désignés ci-après sont les seuls reconnus compétents sous le contrôle scientifique de l'Institut national de Recherches vétérinaires, pour mettre en application le programme de détection et de lutte contre l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle:

- pour le territoire de la province de Flandre occidentale: le centre de dépistage provincial à Torhout: Industrielaan, 15 - 8820 Torhout.

- pour le territoire de la province de Flandre orientale et celui de la douzième circonscription vétérinaire du Brabant: le centre de dépistage provincial à Drongen: Drongenstationsstraat, 71 - 9031 Drongen.

- pour le territoire des provinces d'Anvers et de Limbourg et celui de la treizième circonscription vétérinaire du Brabant: le centre de dépistage provincial à Lier: Hagenbroeksesteenweg, 167 - 2500 Lier.

- pour les provinces de Hainaut, de Liège, de Namur, de Luxembourg, et pour le territoire de la quatorzième circonscription du Brabant: le centre de dépistage provincial à Erpent: Chaussée de Marche, 604 - 5101 Erpent.

Annexe IV

(Pas encore disponible. Voir MB 11/02/1995, p. 3163)