

CHAPITRE 4.7.

COLLECTE ET MANIPULATION DES EMBRYONS DU BÉTAIL ET D'ÉQUIDÉS COLLECTÉS *IN VIVO*

Article 4.7.1.

Objectifs du contrôle

L'objectif du contrôle sanitaire officiel des embryons collectés *in vivo* destinés aux *échanges internationaux* est de garantir l'absence de germes pathogènes spécifiques que pourraient véhiculer ces embryons, et d'éviter toute contamination des femelles receveuses et de leur descendance.

Article 4.7.2.

Conditions applicables à l'équipe de collecte d'embryons

L'équipe de collecte d'embryons est un groupe de techniciens qualifiés comprenant au moins un *vétérinaire* pour procéder aux opérations de collecte, de manipulation et de stockage des embryons. Les conditions précisées ci-après doivent être remplies :

1. L'équipe doit être titulaire d'un agrément délivré par l'*Autorité compétente*.
2. L'équipe doit comprendre un *vétérinaire* qui en assure la supervision.
3. Le *vétérinaire* de l'équipe est responsable de toutes les activités de l'équipe, notamment celles concernant la vérification de l'état sanitaire des *animaux* donneurs, le respect des conditions sanitaires lors des opérations de maniement des femelles donneuses et des soins chirurgicaux, et des procédures de *désinfection* et d'hygiène.
4. Le personnel de l'équipe doit être parfaitement formé aux techniques et principes du contrôle des *maladies* et appliquer des règles d'hygiène rigoureuses afin d'éviter toute contamination.
5. L'équipe de collecte doit disposer d'installations et d'équipements pour assurer :
 - a) la collecte des embryons ;
 - b) le traitement et la manipulation des embryons dans un laboratoire fixe ou mobile ;
 - c) le stockage des embryons.

Il n'est pas nécessaire que ces installations se trouvent sur le même site.

6. L'équipe de collecte des embryons devra tenir un registre de ses activités qui sera présenté à l'*Autorité vétérinaire* lors de tout contrôle pendant les deux années suivant l'exportation des embryons.
7. L'équipe de collecte des embryons doit être soumise, au moins une fois par an, à des contrôles réguliers effectués par un *vétérinaire officiel* pour s'assurer du respect des procédures d'hygiène lors de la collecte, de la manipulation et du stockage des embryons.

Article 4.7.3.

Conditions applicables aux laboratoires de manipulation

Tout laboratoire de manipulation, utilisé par l'équipe de collecte d'embryons, peut être fixe ou mobile. Il est défini comme une installation dans laquelle les embryons sont extraits de leur milieu de collecte, puis examinés et soumis à tous les traitements requis, tels que le lavage et examinés avant congélation et mise en conservation.

Un laboratoire fixe peut être soit une partie d'une unité conçue spécialement pour les opérations de collecte et de traitement, soit une partie d'un bâtiment existant, aménagée à cet effet. Il peut être situé sur le lieu d'entretien des femelles donneuses. Dans tous les cas, le laboratoire doit être physiquement séparé des *animaux*. Aussi bien dans les laboratoires fixes que dans les laboratoires mobiles, le secteur propre affecté aux manipulations doit être nettement séparé du secteur souillé (maniement des *animaux*).

En outre :

1. Le laboratoire de manipulation doit être placé sous la supervision directe du *vétérinaire* de l'équipe et contrôlé régulièrement par un *vétérinaire officiel*.
2. Lorsque des embryons destinés à l'exportation sont manipulés avant d'être conservés en ampoules, flacons ou paillettes, aucune opération ne doit être effectuée sur des embryons de qualité sanitaire inférieure.
3. Le laboratoire de manipulation doit être protégé contre les rongeurs et les insectes.
4. Le laboratoire de manipulation doit être construit avec des matériaux permettant un nettoyage et une *désinfection* efficaces. Ces opérations doivent être réalisées fréquemment et toujours avant et après chaque manipulation d'embryons destinés à l'exportation.

Article 4.7.4.

Conditions applicables aux animaux donneurs

1. Femelles donneuses
 - a) L'*Autorité vétérinaire* doit disposer d'informations et avoir autorité sur le *troupeau* ou le *cheptel* dont proviennent les femelles donneuses.
 - b) Les femelles donneuses ne doivent pas provenir d'un *troupeau* ou *cheptel* soumis à des mesures de restriction vétérinaire liées à la présence de *maladies* ou d'agents pathogènes inscrits sur la liste de l'OIE (voir chapitre 1.2. du *Code terrestre*) autres que ceux classés par l'PIETS dans la catégorie 1 pour l'espèce d'embryons faisant l'objet de la collecte (voir article 4.7.14. et note 1).
 - c) Au moment de la collecte, les femelles donneuses doivent être soumises à un examen clinique effectué par le *vétérinaire* de l'équipe ou par un *vétérinaire* responsable devant le *vétérinaire* de l'équipe, lequel certifiera que ces femelles sont indemnes de tout signe clinique de *maladies*.
2. Géniteurs ayant fourni la semence
 - a) La semence utilisée pour l'insémination artificielle des femelles donneuses doit être obtenue et traitée conformément aux dispositions prévues par le chapitre 4.6.

- b) Lorsque le géniteur ayant fourni la semence utilisée pour inséminer les femelles donneuses pour la production d'embryons est mort, ou que l'état sanitaire de ce géniteur vis-à-vis d'une ou plusieurs *maladies* infectieuses particulières, ou dont il convient de se protéger, n'était pas connu au moment du prélèvement de la semence, des examens complémentaires portant sur les femelles donneuses inséminées peuvent être exigés après la collecte des embryons, pour vérifier que ces *maladies* ne leur ont pas été transmises. Une autre méthode peut consister à procéder à des examens d'une partie aliquote de semence prélevée à la même date.
- c) En cas de monte naturelle ou d'utilisation de sperme frais, les géniteurs doivent satisfaire aux conditions sanitaires précisées au chapitre 4.6., selon l'espèce animale considérée.

Article 4.7.5.

Gestion du risque

Au regard de la transmission de *maladies*, le transfert d'embryons collectés *in vivo* constitue une méthode à très faible risque pour transférer du matériel génétique animal. Quelle que soit l'espèce animale considérée, il existe trois phases dans le processus de transfert d'embryons qui déterminent le niveau final de risque.

1. La première phase, qui s'applique aux *maladies* qui ne figurent pas dans la catégorie 1 de l'PIETS¹ (voir article 4.7.14.), concerne la probabilité de risque d'une *infection* des embryons, laquelle dépend :
 - a) de la situation zoosanitaire du *pays exportateur* et/ou de la zone d'exportation ;
 - b) de l'état sanitaire du *troupeau* ou *cheptel* et des femelles donneuses sur lesquelles les embryons sont prélevés ;
 - c) du pouvoir pathogène des agents pathogènes spécifiques dont l'*Autorité vétérinaire* du *pays importateur* cherche à se protéger.
2. La deuxième phase a trait à l'atténuation du risque grâce à l'utilisation de procédures, agréées au niveau international, de traitement des embryons qui sont définies dans le Manuel de l'PIETS². Ces procédures sont les suivantes :
 - a) Les embryons doivent être lavés au moins 10 fois à une dilution d'au moins 1/100 entre chaque lavage, et une nouvelle pipette doit impérativement être utilisée pour le transfert des embryons entre chaque lavage.
 - b) On ne doit laver ensemble que des embryons provenant d'une même femelle donneuse, et leur nombre ne doit pas excéder 10 par lavage.
 - c) Lorsque des opérations d'inactivation ou d'élimination de certains virus (herpesvirus-1 des bovins et virus de la maladie d'Aujeszky par exemple) sont rendues nécessaires, la procédure de lavage normalisée doit être modifiée pour inclure de nouveaux lavages avec addition de trypsine, comme indiqué dans le Manuel de l'PIETS².
 - d) Après le lavage, la zone pellucide de chaque embryon doit être examinée sur toute sa surface sous un grossissement d'au moins 50X et être certifiée intacte et exempte de toute matière adhérente.

[NOTE : toutes les expéditions d'embryons doivent être accompagnées d'une attestation signée par le vétérinaire de l'équipe responsable du laboratoire certifiant que ces procédures de traitement des embryons ont été réalisées.]
3. La troisième phase, qui s'applique aux *maladies* qui ne figurent pas dans la catégorie 1 de la classification de l'PIETS¹ (voir article 4.7.14.) et dont l'*Autorité vétérinaire* du *pays importateur* cherche à se protéger, concerne les moyens de réduction du risque résultant des opérations suivantes :
 - a) *surveillance*, après collecte, des *animaux* donneurs et des *troupeaux* ou *cheptels* d'origine de ces *animaux* en se fondant sur les durées normales d'incubation des *maladies* dont il convient de se protéger afin de déterminer rétrospectivement l'état sanitaire des *animaux* donneurs au moment où les embryons sont stockés dans le *pays exportateur* (pour les espèces pour lesquelles une mise en conservation par cryoconservation efficace est possible) ;

- b) examen des fluides de collecte des embryons (rinçage) et des embryons non viables, ou d'autres prélèvements, tel que le sang, au laboratoire pour détecter la présence d'agents pathogènes spécifiques.

Article 4.7.6.

Conditions applicables à la collecte et au stockage des embryons

1. Milieux

Tout produit biologique d'origine animale entrant dans la composition des milieux et solutions utilisés pour la collecte, le traitement, le lavage ou la conservation des embryons doit être exempt de micro-organismes pathogènes. Les milieux et solutions utilisés pour la collecte et la conservation des embryons doivent être stérilisés selon des méthodes agréées, comme indiqué dans le Manuel de l'IEETS², et manipulés de façon à rester stériles. Des antibiotiques doivent être ajoutés aux milieux utilisés pour la collecte, la manipulation, le lavage et la conservation, conformément aux recommandations du Manuel de l'IEETS².

2. Matériel

- a) Dans les conditions idéales, tout le matériel utilisé pour la collecte, la manipulation, le lavage, la congélation et la conservation des embryons devrait dans la mesure du possible être neuf ou au minimum stérilisé avant usage, conformément aux recommandations du Manuel de l'IEETS².
- b) Le matériel utilisé ne doit pas faire l'objet d'un transfert entre pays en vue d'une nouvelle utilisation par l'équipe de collecte.

Article 4.7.7.

Examens et traitements facultatifs

- 1. Un *pays importateur* peut demander que des tests soient réalisés sur des échantillons pour confirmer l'absence d'organismes pathogènes pouvant être transmis à partir des embryons collectés *in vivo*, ou pour aider à apprécier si le niveau des contrôles de qualité exercés par l'équipe de collecte (conformité aux procédures décrites dans le Manuel de l'IEETS²) réduit les risques à un niveau acceptable. Ces échantillons peuvent inclure :

- a) Ovocytes/embryons non viables

Lorsque des embryons viables, ayant une zone pellucide intacte et issus d'une femelle donneuse, sont destinés à l'exportation, tous les ovocytes non fécondés et tous les embryons dégénérés, ou dont la zone pellucide est altérée, collectés chez cette même femelle donneuse doivent être lavés comme indiqué dans le Manuel de l'IEETS² et être groupés en vue d'un éventuel contrôle si celui-ci est exigé par le *pays importateur*. Seuls les ovocytes/embryons non viables provenant de la même femelle donneuse doivent être manipulés en même temps et être conservés ensemble.

- b) Liquide de collecte de présaillie des embryons

Le liquide de collecte doit être placé dans un récipient stérile et fermé, et, si son volume est important, il doit être laissé au repos pendant une heure. Le liquide surnageant doit alors être retiré et les 10 à 20 ml du fond, contenant les débris accumulés, doivent être décantés dans un flacon stérile. Si on utilise un filtre pour la collecte des ovocytes/embryons, tous les débris retenus par le filtre doivent être ajoutés par rinçage au liquide conservé.

- c) Liquides de lavage

Les quatre derniers liquides de lavage des ovocytes/embryons doivent être groupés pour analyse (Manuel de l'IEETS²).

d) Prélèvements

Les prélèvements ci-dessus doivent être conservés à 4 °C et examinés dans les 24 heures. Si cela n'est pas possible, ils doivent être conservés à une température égale ou inférieure à -70 °C.

2. Lorsqu'elle est modifiée pour ajouter de nouveaux lavages avec de la trypsine (voir alinéa 2 c) de l'article 4.7.5.), la procédure de traitement des embryons viables doit être réalisée comme indiqué dans le Manuel de l'IETS² et un traitement enzymatique est nécessaire seulement s'il existe un risque de présence des agents pathogènes contre lesquels l'IETS recommande de procéder à ce nouveau traitement avec addition, par exemple, de trypsine). Il convient de noter que ce traitement n'a pas toujours des effets bénéfiques et qu'il ne doit pas être considéré comme un désinfectant en général. Il peut avoir des effets néfastes sur la viabilité des embryons, à titre d'exemple sur celle d'embryons d'équidés dont la capsule embryonnaire pourrait être altérée par l'enzyme.

Article 4.7.8.

Conditions applicables au stockage et au transport des embryons

1. Les embryons destinés à l'exportation doivent être conservés en ampoules, flacons ou paillettes stériles scellés, en respectant des conditions d'hygiène rigoureuses, dans un lieu de stockage agréé par l'*Autorité vétérinaire* du *pays exportateur*, où aucune contamination des embryons ne risque de se produire.
2. On ne doit conditionner ensemble en ampoule, flacon ou paillette que des embryons provenant d'une seule et même femelle donneuse.
3. Dans la mesure du possible et selon les espèces concernées, les embryons doivent être congelés et conservés dans l'azote liquide frais en flacons ou conteneurs nettoyés et stérilisés dans le plus strict respect des conditions d'hygiène sur le site de stockage agréé.
4. Les ampoules, flacons ou paillettes devront être scellés au moment de la congélation (ou avant l'exportation si le processus de cryoconservation n'est pas possible), et ils doivent être clairement identifiés au moyen d'étiquettes, conformément au système normalisé recommandé dans le Manuel de l'IETS².
5. Les conteneurs d'azote liquide doivent être scellés sous la supervision du *vétérinaire officiel* avant leur expédition du *pays exportateur*.
6. Les embryons ne doivent pas être exportés avant l'établissement définitif des certificats vétérinaires requis.

Article 4.7.9.

Procédure pour la micromanipulation

En cas de micromanipulation sur des embryons, l'opération doit de préférence être réalisée à l'issue des traitements décrits au point 2 de l'article 4.7.5., et conformément à la procédure décrite au chapitre 4.9.

Article 4.7.10.

Conditions spécifiques applicables aux embryons de porcins

Le *troupeau* d'origine doit être indemne de tout signe clinique de maladie vésiculeuse du porc et de brucellose.

L'élaboration de méthodes efficaces de cryoconservation applicables à la conservation d'embryons de porcins à zone pellucide intacte n'en est encore qu'à un stade précoce.

Article 4.7.11.

Conditions ou commentaires spécifiques applicables aux embryons d'équidés

Les recommandations s'appliquent principalement aux embryons des *animaux* qui résident en permanence dans les populations équines nationales. Elles peuvent, par conséquent, être jugées mal adaptées aux équidés qui participent couramment à des manifestations ou compétitions internationales. À titre d'exemple, les équidés en déplacement sous couvert d'un *certificat vétérinaire international* (chevaux de compétition par exemple) peuvent, dans certains cas, ne pas répondre à cette condition, sous réserve d'un accord bilatéral entre les *Autorités vétérinaires* respectives.

Article 4.7.12.

Conditions ou commentaires spécifiques applicables aux embryons de camélidés

Les embryons de camélidés sud-américains récupérés dans la cavité utérine par la technique classique, non chirurgicale, de rinçage 6,5 à 7 jours après l'ovulation, se trouvent presque toujours au stade blastocytaire éclo, alors que la zone pellucide a déjà disparu. Dans la mesure où les embryons de ces *animaux* ne pénètrent pas dans l'utérus et ne peuvent être récupérés qu'au bout de 6,5 à 7 jours, il ne serait pas réaliste de limiter leur utilisation, dans le cadre du commerce international, aux espèces dont la zone pellucide est intacte. Il faut noter cependant qu'en 2008, l'élaboration de méthodes de congélation applicables aux embryons de camélidés en est encore à un stade précoce, et qu'aucune étude n'a encore été réalisée sur les interactions entre les agents pathogènes et les embryons.

Article 4.7.13.

Conditions ou commentaires spécifiques applicables aux embryons de cervidés

Les recommandations s'appliquent principalement aux embryons d'*animaux* qui font en permanence partie des populations nationales de cervidés domestiques ou gardés en captivité. Elles peuvent, par conséquent, être jugées mal adaptées aux cervidés vivant à l'état sauvage ou aux situations dans lesquelles des efforts de conservation de la biodiversité ou de patrimoines génétiques sont consentis.

Article 4.7.14.

Recommandations relatives au risque de transmission des maladies à partir d'embryons collectés *in vivo*

Sur la base des conclusions tirées par le Sous-comité de recherche du Comité Consultatif Santé et Sécurité (HASAC) de l'IEETS, les *maladies* et les agents pathogènes qui suivent sont classés en quatre catégories. Cette classification ne s'applique qu'aux embryons collectés *in vivo*.

1. Catégorie 1

- a) Sont inscrits dans la catégorie 1 les *maladies* ou agents pathogènes pour lesquels les preuves réunies sont suffisantes pour affirmer que le risque de transmission est négligeable, à condition que les embryons soient manipulés correctement entre la collecte et la transplantation comme indiqué dans le Manuel de l'IEETS².
- b) Les *maladies* ou agents pathogènes figurant dans la catégorie 1 sont les suivants :
 - *Brucella abortus* (bovins)
 - Encéphalopathie spongiforme bovine (bovins)
 - Fièvre aphteuse (bovins)

- Fièvre catarrhale (bovins)
- Leucose enzootique bovine
- Maladie d'Aujeszky (porcins) : nécessite un traitement à la trypsine
- Rhinotrachéite infectieuse bovine : nécessite un traitement à la trypsine
- Tremblante (ovins).

2. Catégorie 2

- a) Sont inscrites dans la catégorie 2 les *maladies* pour lesquels des preuves substantielles ont été réunies, indiquant que le risque de transmission est négligeable, à condition que les embryons soient manipulés correctement entre la collecte et la transplantation comme indiqué dans le Manuel de PIETS², mais pour lesquelles les données existantes doivent être vérifiées par de nouvelles transplantations.
- b) Les *maladies* figurant dans la catégorie 2 sont les suivantes :
 - Arthrite/encéphalite caprine
 - Fièvre catarrhale du mouton (ovins)
 - Peste porcine classique.

3. Catégorie 3

- a) Sont inscrits dans la catégorie 3 les *maladies* ou agents pathogènes pour lesquels les résultats préliminaires indiquent que le risque de transmission est négligeable, à condition que les embryons soient correctement manipulés entre la collecte et la transplantation comme indiqué dans le Manuel de PIETS², mais pour lesquels ces constatations préliminaires doivent être corroborées par des données expérimentales complémentaires *in vitro* et *in vivo*.
- b) Les *maladies* ou agents pathogènes figurant dans la catégorie 3 sont les suivants :
 - Adénomatose pulmonaire ovine
 - *Campylobacter fetus* (ovins)
 - Encéphalopathie spongiforme bovine (caprins)
 - Fièvre aphteuse (porcins, ovins et caprins)
 - *Haemophilus somnus* (bovins)
 - Maedi-visna (ovins)
 - Maladie vésiculeuse du porc
 - *Mycobacterium paratuberculosis* (bovins)
 - *Neospora caninum* (bovins)
 - Peste bovine (bovins)
 - Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP)
 - Virus de l'immunodéficience bovine
 - Virus de la diarrhée virale bovine (bovins).

4. Catégorie 4

- a) Sont inscrits dans la catégorie 4 les *maladies* ou agents pathogènes pour lesquels des études ont été réalisées ou sont en cours, indiquant :
 - i) qu'aucune conclusion ne peut encore être tirée quant au niveau de risque de transmission, ou

- ii) que le risque de transmission par transfert d'embryons pourrait ne pas être négligeable, même si les embryons sont correctement manipulés entre la collecte et la transplantation, comme indiqué dans le Manuel de l'IETS².
- b) Les *maladies* ou agents pathogènes figurant dans la catégorie 4 sont les suivants :
- Anaplasmose bovine
 - *Chlamydia psittaci* (bovins, ovins)
 - Circovirus porcin de type 2 (porcins)
 - Dermatose nodulaire contagieuse
 - Entérovirus (bovins, porcins)
 - Épididymite ovine (*Brucella ovis*)
 - *Escherichia coli* O9:K99 (bovins)
 - Fièvre catarrhale (caprins)
 - Herpèsvirus-4 des bovins
 - *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjobovis* (bovins)
 - *Leptospira* sp. (porcins)
 - Maladie de Border (Border disease) (ovins)
 - Métrite contagieuse équine
 - *Mycobacterium bovis* (bovins)
 - *Mycoplasma* spp. (porcins)
 - Parvovirus (porcins)
 - Peste porcine africaine
 - Rhinopneumonie équine
 - Stomatite vésiculeuse (bovins, porcins)
 - Tremblante (caprins)
 - *Tritrichomonas foetus* (bovins)
 - *Ureaplasma/Mycoplasma* spp. (bovins, caprins)
 - Virus Akabane (bovins)
 - Virus para-influenza-3 (bovins).

1 À partir des informations en provenance de la recherche et du terrain, le Sous-comité de recherche du Comité Consultatif Santé et Sécurité (HASAC) de la Société internationale de transfert d'embryons a classé un certain nombre de *maladies*, en fonction de leur risque de diffusion à partir d'embryons collectés *in vivo* et convenablement manipulés et conservés. La liste exhaustive des *maladies* classées par l'IETS figure à l'article 4.7.14. du présent chapitre.

2 Manuel de la Société internationale de transfert d'embryons.