II

(Actos cuja publicação não é uma condição da sua aplicabilidade)

COMISSÃO

DECISÃO DA COMISSÃO

de 15 de Julho de 1994

que estabelece as condições de sanidade animal e a certificação veterinária para a importação de sémen de bovino de países terceiros

(94/577/CE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta a Directiva 88/407/CEE do Conselho, de 14 de Junho de 1988, que fixa as exigências de polícia sanitária aplicáveis às trocas comerciais intracomunitárias e às importações de sémen de animais da espécie bovina [1], com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 93/60/CEE [2], e, nomeadamente, os seus artigos 10º e 11º,

Considerando que a lista de países terceiros dos quais os Estados-membros autorizam a importação de sémen de bovinos domésticos, a seguir designada « a lista dos países terceiros », foi estabelecida pela Decisão 90/14/CEE da Comissão [3], alterada pela Decisão 91/276/CEE [4];

Considerando que a situação sanitária em Israel levou à proibição das importações desse país, estabelecida pela Decisão 91/277/CEE da Comissão [5];

Considerando que, pelas Decisões 91/479/CEE [6], 91/549/CEE [7], 92/123/CEE [8], 92/124/CEE [9], 92/125/CEE [10], 92/126/CEE [11], 92/127/CEE [12], 92/128/CEE [13], 92/386/CEE [14], 92/387/CEE [15] e 92/445/CEE [16] da Comissão, foram estabelecidas as condições de sanidade animal e a certificação veterinária para a importação de sémen de bovino dos Estados Unidos da América, Canadá, Polónia, Finlândia, Nova Zelândia, Áustria, Suíça, Suécia, Hungria, Noruega e Checoslováquia, respectivamente;

Considerando que a Directiva 93/60/CEE, que deve ser aplicada nos Estados-membros o mais tardar em 1 de Julho de 1994, altera a Directiva 88/407/CEE, o que implica, por sua vez, a necessidade de alterar as decisões acima mencionadas relativas a países terceiros; que, para simplificar e clarificar a legislação comunitária no domínio em questão, é necessário reunir numa só as decisões acima referidas e revogar as que estão em vigor para cada país individualmente;

Considerando que, atendendo ao disposto no Acordo sobre o Espaço Económico Europeu, não é necessário manter os certificados veterinários para as importações de sémen de animais da espécie bovina proveniente da Áustria, Finlândia, Noruega e Suécia;

Considerando que, em conformidade com o parecer do Comité científico veterinário, é exigido um teste suplementar para a doença hemorrágica epizoótica;

Considerando que relativamente ao Canadá só são efectuados, com intervalos de seis meses, testes de pré-colheita de rotina para essa doença; que é, pois necessário auto-

[1] JO nº L 194 de 22. 7. 1988, p. 10.
[2] JO nº L 186 de 28. 7. 1993, p. 28.
[3] JO nº L 8 de 11. 1. 1990, p. 71.
[4] JO nº L 135 de 30. 5. 1991, p. 58.
[5] JO nº L 135 de 30. 5. 1991, p. 60.
[6] JO nº L 258 de 16. 9. 1991, p. 1.
[7] JO nº L 298 de 29. 10. 1991, p. 6.
[8] JO nº L 48 de 22. 2. 1992, p. 1.
[9] JO nº L 48 de 22. 2. 1992, p. 10.
[10] JO nº L 48 de 22. 2. 1992, p. 19.
[11] JO nº L 48 de 22. 2. 1992, p. 28.
[12] JO nº L 48 de 22. 2. 1992, p. 37.
[13] JO nº L 48 de 22. 2. 1992, p. 46.
[14] JO nº L 204 de 21. 7. 1992, p. 13.
[15] JO nº L 204 de 21. 7. 1992, p. 22.
[16] JO nº L 247 de 27. 8. 1992, p. 1.

rizar um período de transição para a introdução da presente decisão relativamente ao Canadá, para que as autoridades veterinárias canadianas disponham de tempo suficiente para introduzir o novo teste no seu programa de rotina;

Considerando, ainda, que na sequência de progressos recentemente efectuados quanto à compreensão da epidemiologia da febre catarral, a importação de sémen de bovino da Austrália não pode ser permitida;

Considerando que se verifica existir, nos países constantes da lista dos países terceiros, uma boa situação sanitária, controlada por serviços veterinários bem estruturados e organizados no respeitante às doenças transmissíveis pelo sémen;

Considerando que as autoridades veterinárias responsáveis dos países terceiros se comprometeram a notificar, num prazo de 24 horas, por telex ou telefax, a Comissão e os Estados-membros da confirmação da ocorrência de quaisquer das doenças indicadas na lista A do Gabinete Internacional de Epizootias (OIE), bem como de quaisquer alterações na política de vacinações contra as mesmas, ou, num prazo adequado, da ocorrência de doenças constantes da lista B da OIE e de quaisquer propostas de alterações das normas de importação relativas a animais domésticos ou ao seu sémen ou embriões;

Considerando que as autoridades veterinárias responsáveis dos países constantes da lista dos países terceiros se comprometeram a controlar oficialmente a emissão de certificados prevista na presente decisão, bem como a garantir que todos os certificados, derrogações e resultados laboratoriais relevantes em que a certificação se possa ter baseado fiquem oficialmente arquivados durante, pelo menos, os doze meses seguintes à data de expedição do sémen a que dizem respeito;

Considerando que as autoridades veterinárias responsáveis dos países constantes da lista dos países terceiros se comprometeram a aprovar oficialmente centros de colheita de sémen para a exportação de sémen de bovino para a Comunidade, em conformidade com o disposto no artigo 9º da Directiva 88/407/CEE;

Considerando que as condições sanitárias e a certificação veterinária devem ser adaptadas em função da situação sanitária do país terceiro em questão;

Considerando que as medidas previstas na presente decisão estão em conformidade com o parecer do Comité veterinário permanente,

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

Artigo 1º

Os Estados-membros autorizarão apenas a importação de sémen de bovino que satisfaça as condições estabelecidas nos certificados da parte 1 dos anexos A, B, C e D, desde que seja proveniente dos países terceiros constantes da parte 2 dos anexos A, B, C e D, respectivamente.

No entanto, os Estados-membros autorizarão até 31 de Dezembro de 1994 a importação do Canadá de sémen de bovino colhido e transformado em conformidade com a Decisão 91/549/CEE.

Artigo 2º

São revogadas as Decisões 91/479/CEE, 92/123/CEE, 92/124/CEE, 92/125/CEE, 92/126/CEE, 92/127/CEE, 92/128/CEE, 92/386/CEE, 92/387/CEE e 92/445/CEE.

A Decisão 91/549/CEE é revogada com efeitos a partir de 1 de Janeiro de 1995.

Artigo 3º

O primeiro parágrafo do artigo 1º é aplicável a partir de 1 de Janeiro de 1995.

Artigo 4º

Os Estados-membros são os destinatários da presente decisão.

Feito em Bruxelas, em 15 de Julho de 1994.

Pela Comissão

René STEICHEN

Membro da Comissão

ANEXO A

PARTE 1

CERTIFICADO SANITÁRIO

para a importação de sémen de bovino

<table>
<tr><td colspan="2">1. Expedidor (nome e endereço completo)</td><td>Certificado sanitário nº
2. País terceiro de colheita</td></tr>
<tr><td colspan="2">3. Destinatário (nome e endereço completo)</td><td>4. Autoridade competente</td></tr>
<tr><td colspan="2"></td><td>5. Autoridade local competente</td></tr>
<tr><td colspan="2">6. Local de carregamento</td><td>7. Nome e endereço do centro de colheita de sémen</td></tr>
<tr><td colspan="2">8. Meio de transporte</td><td rowspan="3">10. Número de aprovação do centro de colheita de sémen</td></tr>
<tr><td colspan="2">9. Local e Estado-membro de destino</td></tr>
<tr><td colspan="2">11. Número do selo dos recipientes do sémen</td></tr>
<tr><td colspan="3">12. Identificação do sémen
Fresco ou congelado *
(* riscar o que não interessa)</td></tr>
<tr><td>a) Número de doses</td><td rowspan="2">b) Data de colheita</td><td rowspan="2">c) Raça</td></tr>
<tr><td>d) Identificação do dador</td></tr>
</table>

13. Eu, abaixo assinado, veterinário oficial, li e estou familiarizado com a Directiva 88/407/CEE do Conselho e declaro que :

a) ..... esteve indemne de peste

(país de exportação)

bovina e de febre aftosa durante os doze meses imediatamente anteriores à colheita do sémen para exportação e até à data da sua expedição, não tendo sido efectuada nenhuma vacinação contra essas doenças durante o mesmo período ;

b) O centro de colheita de sémen em que o sémen a exportar foi colhido :

i) foi aprovado ao abrigo das condições previstas no capítulo I do anexo A da Directiva 88/407/CEE,

ii) funcionava e era fiscalizado segundo as condições previstas no capítulo II do anexo A da Directiva 88/407/CEE,

iii) esteve, durante o período com início 30 dias antes da data de colheita do sémen a exportar e termo 30 dias após a colheita (ou até à data de expedição, no caso de sémen fresco), indemne de raiva, tuberculose, brucelose, carbúnculo bacteriano e peripneumonia contagiosa bovina ;

c) Os bovinos presentes no centro de colheita de sémen :

i) são provenientes de efectivos e/ou nasceram de mães que satisfazem as condições previstas no capítulo I do anexo B da Directiva 88/407/CEE,

ii) foram, antes de entrarem em isolamento, submetidos aos testes previstos no capítulo I do anexo B da Directiva 88/407/CEE,

iii) satisfizeram as condições de entrada em isolamento e reagiram negativamente aos testes previstos no capítulo I do anexo B da Directiva 88/407/CEE,

iv) foram submetidos, no caso de permanecerem no centro há pelo menos um ano, aos testes de rotina previstos no capítulo II do anexo B da Directiva 88/407/CEE ;

d) O sémen a exportar :

i) é proveniente de dadores residentes em

.....

(país de exportação)

no período de seis meses imediatamente anterior à colheita do sémen para exportação e que satisfazem as condições previstas no anexo C da Directiva 88/407/CEE,

ii) foi obtido de dadores que :

— se encontram num centro de colheita de sémen em que todos os bovinos foram, nos 12 meses imediatamente anteriores à colheita do sémen para exportação, submetidos, com resultados negativos, a um teste de seroneutralização ou a uma prova ELISA para a rinotraqueíte bovina infecciosa/vulvovaginite pustulosa infecciosa (1),

ou

— foram submetidos, com resultados negativos, a um teste de seroneutralização ou a uma prova ELISA para a rinotraqueíte bovina infecciosa/vulvovaginite pustulosa infecciosa nos 12 meses imediatamente anteriores à colheita de sémen para exportação (1),

ou

— são seropositivos, tendo sido vacinados em conformidade com o disposto no capítulo II do anexo B da Directiva 88/407/CEE e apresentado resultados negativos num teste de seroneutralização ou ELISA efectuado no centro aprovado de colheita de sémen antes da vacinação (1),

(1) Riscar o que não interessa.

ou

— apresentaram uma reacção positiva a um teste de seroneutralização ou a uma prova ELISA para a rinotraqueíte bovina infecciosa/vulvovaginite pustulosa infecciosa e não foram vacinados em conformidade com o disposto no capítulo II do anexo B da Directiva 88/407/CEE, tendo pelo menos 10 % de cada ejaculado de sémen para exportação (com um mínimo de cinco palhetas) sido submetido anteriormente à exportação, com resultados negativos, a um teste de inoculação animal ou de isolamento do vírus (1),

iii) foi transformado, armazenado e transportado de forma a satisfazer as condições previstas na Directiva 88/407/CEE.

Feito em ....., em .....
(local) (data)

(Carimbo) (2)

Assinatura (2) : .....

Nome em letras de imprensa : .....

Título oficial : .....

(1) Riscar o que não interessa.
(2) A assinatura e o carimbo devem ter uma cor diferente da dos caracteres impressos.

PARTE 2

Lista de países autorizados a utilizar o modelo de certificado sanitário constante da parte 1 do anexo A

REPÚBLICA CHECA

HUNGRIA

NOVA ZELÂNDIA

POLÓNIA

ROMÉNIA

SUÍÇA

REPÚBLICA ESLOVACA

ANEXO B

PARTE 1

CERTIFICADO SANITÁRIO

para a importação de sémen de bovino dos Estados Unidos da América

1. Expedidor (nome e endereço completo)		Certificado sanitário nº 2. País terceiro de colheita
3. Destinatário (nome e endereço completo)		4. Autoridade competente
		5. Autoridade local competente
6. Local de carregamento		7. Nome e endereço do centro de colheita de sémen
8. Meio de transporte 9. Local e Estado-membro de destino 11. Número do selo dos recipientes do sémen		10. Número de aprovação do centro de colheita de sémen
12. Identificação do sémen		Fresco ou congelado * (* riscar o que não interessa)
a) Número de doses d) Identificação do dador	b) Data de colheita	c) Raça

13. Eu, abaixo assinado, veterinário oficial, li e estou familiarizado com a Directiva 88/407/CEE do Conselho e declaro que :

a) ..... esteve indemne de peste
(país de exportação)

bovina e de febre aftosa durante os doze meses imediatamente anteriores à colheita do sémen para exportação e até à data da sua expedição, não tendo sido efectuada nenhuma vacinação contra essas doenças durante o mesmo período ;

b) O centro de colheita de sémen em que o sémen a exportar foi colhido :

i) foi aprovado ao abrigo das condições previstas no capítulo I do anexo A da Directiva 88/407/CEE,

ii) funcionava e era fiscalizado segundo as condições previstas no capítulo II do anexo A da Directiva 88/407/CEE,

iii) esteve, durante o período com início 30 dias antes da data de colheita do sémen a exportar e termo 30 dias após a colheita (ou até à data de expedição, no caso de sémen fresco), indemne de raiva, tuberculose, brucelose, carbúnculo bacteriano e peripneumonia contagiosa bovina ;

c) Os bovinos presentes no centro de colheita de sémen :

i) são provenientes de efectivos e/ou nasceram de mães que satisfazem as condições previstas no capítulo I do anexo B da Directiva 88/407/CEE,

ii) foram, antes de entrarem em isolamento, submetidos aos testes previstos no capítulo I do anexo B da Directiva 88/407/CEE,

iii) satisfizeram as condições de entrada em isolamento e reagiram negativamente aos testes previstos no capítulo I do anexo B da Directiva 88/407/CEE,

iv) foram submetidos, no caso de permanecerem no centro há pelo menos um ano, aos testes de rotina previstos no capítulo II do anexo B da Directiva 88/407/CEE ;

d) O sémen a exportar :

i) é proveniente de dadores residentes em

.....
(país de exportação)

no período de seis meses imediatamente anterior à colheita do sémen para exportação e que satisfazem as condições previstas no anexo C da Directiva 88/407/CEE,

ii) foi obtido de dadores que :

— se encontram num centro de colheita de sémen em que todos os bovinos foram, nos 12 meses imediatamente anteriores à colheita do sémen para exportação, submetidos, com resultados negativos, a um teste de seroneutralização ou a uma prova ELISA para a rinotraqueíte bovina infecciosa/vulvovaginite pustulosa infecciosa (1),

ou

— foram submetidos, com resultados negativos, a um teste de seroneutralização ou a uma prova ELISA para a rinotraqueíte bovina infecciosa/vulvovaginite pustulosa infecciosa nos 12 meses imediatamente anteriores à colheita de sémen para exportação (1),

ou

— são seropositivos, tendo sido vacinados em conformidade com o disposto no capítulo II do anexo B da Directiva 88/407/CEE e apresentado resultados negativos num teste de seroneutralização ou ELISA efectuado no centro aprovado de colheita de sémen antes da vacinação (1),

(1) Riscar o que não interessa.

ou

— apresentaram uma reacção positiva a um teste de seroneutralização ou a uma prova ELISA para a rinotraqueíte bovina infecciosa/vulvovaginite pustulosa infecciosa e não foram vacinados em conformidade com o disposto no capítulo II do anexo B da Directiva 88/407/CEE, tendo pelo menos 10 % de cada ejaculado de sémen para exportação (com um mínimo de cinco palhetas) sido submetido anteriormente à exportação, com resultados negativos, a um teste de inoculação animal ou de isolamento do vírus (1),

iii) foi transformado, armazenado e transportado de forma a satisfazer as condições previstas na Directiva 88/407/CEE,

iv) é proveniente de dadores que, num laboratório aprovado, foram submetidos por duas vezes, com um intervalo não superior a 12 meses, aos testes a seguir indicados, antes e depois da colheita (a amostra de sangue para o segundo dos testes referidos deve ser colhida pelo menos 21 dias após a colheita do sémen para exportação):

— uma prova ELISA do bloqueio para a febre catarral, em conformidade com o anexo E,

— uma prova de imunodifusão em ágar-gel em conformidade com o anexo E e um teste de neutralização do vírus para todos os serotipos da doença hemorrágica epizoótica cuja existência no país exportador é conhecida.

Feito em ....., em .....
(local) (data)

(Carimbo) (2)

Assinatura (2): .....

Nome em letras de imprensa: .....

Título oficial: .....

(1) Riscar o que não interessa.
(2) A assinatura e o carimbo devem ter uma cor diferente da dos caracteres impressos.

PARTE 2

Lista de países autorizados a utilizar o modelo de certificado sanitário constante da parte 1 do anexo B

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA

ANEXO C

PARTE 1

CERTIFICADO SANITÁRIO

para a importação de sémen de bovino

1. Expedidor (nome e endereço completo)	Certificado sanitário nº 2. País terceiro de colheita
3. Destinatário (nome e endereço completo)	4. Autoridade competente
	5. Autoridade local competente
6. Local de carregamento	7. Nome e endereço do centro de colheita de sémen
8. Meio de transporte	10. Número de aprovação do centro de colheita de sémen
9. Local e Estado-membro de destino	
11. Número do selo dos recipientes do sémen	
12. Identificação do sémen	Fresco ou congelado * (* riscar o que não interessa)
a) Número de doses / b) Data de colheita / c) Raça	
d) Identificação do dador	

13. Eu, abaixo assinado, veterinário oficial, li e estou familiarizado com a Directiva 88/407/CEE do Conselho e declaro que :

a) ..... esteve indemne de peste
(país de exportação)

bovina e de febre aftosa durante os doze meses imediatamente anteriores à colheita do sémen para exportação e até à data da sua expedição, não tendo sido efectuada nenhuma vacinação contra essas doenças durante o mesmo período ;

b) O centro de colheita de sémen em que o sémen a exportar foi colhido :

i) foi aprovado ao abrigo das condições previstas no capítulo I do anexo A da Directiva 88/407/CEE,

ii) funcionava e era fiscalizado segundo as condições previstas no capítulo II do anexo A da Directiva 88/407/CEE,

iii) esteve, durante o período com início 30 dias antes da data de colheita do sémen a exportar e termo 30 dias após a colheita (ou até à data de expedição, no caso de sémen fresco), indemne de raiva, tuberculose, brucelose, carbúnculo bacteriano e peripneumonia contagiosa bovina ;

c) Os bovinos presentes no centro de colheita de sémen :

i) são provenientes de efectivos e/ou nasceram de mães que satisfazem as condições previstas no capítulo I do anexo B da Directiva 88/407/CEE,

ii) foram, antes de entrarem em isolamento, submetidos aos testes previstos no capítulo I do anexo B da Directiva 88/407/CEE,

iii) satisfizeram as condições de entrada em isolamento e reagiram negativamente aos testes previstos no capítulo I do anexo B da Directiva 88/407/CEE,

iv) foram submetidos, no caso de permanecerem no centro há pelo menos um ano, aos testes de rotina previstos no capítulo II do anexo B da Directiva 88/407/CEE ;

d) O sémen a exportar :

i) é proveniente de dadores residentes em

.....
(país de exportação)

no período de seis meses imediatamente anterior à colheita do sémen para exportação e que satisfazem as condições previstas no anexo C da Directiva 88/407/CEE,

ii) foi obtido de dadores que :

— se encontram num centro de colheita de sémen em que todos os bovinos foram, nos 12 meses imediatamente anteriores à colheita do sémen para exportação, submetidos, com resultados negativos, a um teste de seroneutralização ou a uma prova ELISA para a rinotraqueíte bovina infecciosa/vulvovaginite pustulosa infecciosa (1),

ou

— foram submetidos, com resultados negativos, a um teste de seroneutralização ou a uma prova ELISA para a rinotraqueíte bovina infecciosa/vulvovaginite pustulosa infecciosa nos 12 meses imediatamente anteriores à colheita de sémen para exportação (1),

ou

— são seropositivos, tendo sido vacinados em conformidade com o disposto no capítulo II do anexo B da Directiva 88/407/CEE e apresentado resultados negativos num teste de seroneutralização ou ELISA efectuado no centro aprovado de colheita de sémen antes da vacinação (1),

(1) Riscar o que não interessa.

ou

— apresentaram uma reacção positiva a um teste de seroneutralização ou a uma prova ELISA para a rinotraqueíte bovina infecciosa/vulvovaginite pustulosa infecciosa e não foram vacinados em conformidade com o disposto no capítulo II do anexo B da Directiva 88/407/CEE, tendo pelo menos 10 % de cada ejaculado de sémen para exportação (com um mínimo de cinco palhetas) sido submetido anteriormente à exportação, com resultados negativos, a um teste de inoculação animal ou de isolamento do vírus (1),

iii) foi transformado, armazenado e transportado de forma a satisfazer as condições previstas na Directiva 88/407/CEE,

iv) foi obtido de de dadores que :

— se encontravam no centro aprovado em 1 de Julho de 1994, ou

— deram entrada no centro aprovado após 1 de Julho de 1994, tendo antes dessa entrada, sido submetidos, com resultados negativos, aos testes a seguir indicados para a febre catarral e a doença hemorrágica epizoótica num laboratório aprovado

e sido, em ambos os casos, submetidos de seis em seis meses num laboratório aprovado, com resultados negativos, aos testes seguintes :

— uma prova ELISA do bloqueio para a febre catarral, em conformidade com o anexo E,

— uma prova de imunodifusão em ágar-gel em conformidade com o anexo E e um teste de neutralização do vírus para todos os serotipos da doença hemorrágica epizoótica cuja existência no país exportador é conhecida.

Feito em ....., em .....
(local) (data)

(Carimbo) (2)

Assinatura (2) : .....

Nome em letras de imprensa : .....

Título oficial : .....

(1) Riscar o que não interessa.
(2) A assinatura e o carimbo devem ter uma cor diferente da dos caracteres impressos.

PARTE 2

Lista de países autorizados a utilizar o modelo de certificado sanitário constante da parte 1 do anexo C

CANADÁ: Com excepção da região de Okanagan Valley da British Columbia, definida como a área delimitada por uma linha traçada a partir de um ponto na fronteira do Canadá com os Estados Unidos da América de 120°15′ de longitude e 49 ° de latitude, para norte até um ponto de 199°35′ de longitude e 50°30′ de latitude, para nordeste até um ponto de 199 ° de longitude e 50°45′ de latitude e para sul até um ponto na fronteira do Canadá com os Estados Unidos da América de 188°15′ de longitude e 49 ° de latitude.

ANEXO D

PARTE 1

CERTIFICADO SANITÁRIO

para a importação de sémen de bovino

<table>
<tr><td colspan="2">1. Expedidor (nome e endereço completo)</td><td>Certificado sanitário nº
2. País terceiro de colheita</td></tr>
<tr><td colspan="2">3. Destinatário (nome e endereço completo)</td><td>4. Autoridade competente</td></tr>
<tr><td colspan="2"></td><td>5. Autoridade local competente</td></tr>
<tr><td colspan="2">6. Local de carregamento</td><td>7. Nome e endereço do centro de colheita de sémen</td></tr>
<tr><td colspan="2">8. Meio de transporte</td><td rowspan="3">10. Número de aprovação do centro de colheita de sémen</td></tr>
<tr><td colspan="2">9. Local e Estado-membro de destino</td></tr>
<tr><td colspan="2">11. Número do selo dos recipientes do sémen</td></tr>
<tr><td colspan="3">12. Identificação do sémen
Fresco ou congelado *
(* riscar o que não interessa)</td></tr>
<tr><td>a) Número de doses</td><td rowspan="2">b) Data de colheita</td><td rowspan="2">c) Raça</td></tr>
<tr><td>d) Identificação do dador</td></tr>
</table>

13. Eu, abaixo assinado, veterinário oficial, li e estou familiarizado com a Directiva 88/407/CEE do Conselho e declaro que :

a) ..... esteve indemne de peste

(país de exportação)

bovina e de febre aftosa durante os doze meses imediatamente anteriores à colheita do sémen para exportação e até à data da sua expedição, não tendo sido efectuada nenhuma vacinação contra essas doenças durante o mesmo período ;

b) O centro de colheita de sémen em que o sémen a exportar foi colhido :

i) foi aprovado ao abrigo das condições previstas no capítulo I do anexo A da Directiva 88/407/CEE,

ii) funcionava e era fiscalizado segundo as condições previstas no capítulo II do anexo A da Directiva 88/407/CEE,

iii) esteve, durante o período com início 30 dias antes da data de colheita do sémen a exportar e termo 30 dias após a colheita (ou até à data de expedição, no caso de sémen fresco), indemne de raiva, tuberculose, brucelose, carbúnculo bacteriano e peripneumonia contagiosa bovina ;

c) Os bovinos presentes no centro de colheita de sémen :

i) são provenientes de efectivos e/ou nasceram de mães que satisfazem as condições previstas no capítulo I do anexo B da Directiva 88/407/CEE,

ii) foram, antes de entrarem em isolamento, submetidos aos testes previstos no capítulo I do anexo B da Directiva 88/407/CEE,

iii) satisfizeram as condições de entrada em isolamento e reagiram negativamente aos testes previstos no capítulo I do anexo B da Directiva 88/407/CEE,

iv) foram submetidos, no caso de permanecerem no centro há pelo menos um ano, aos testes de rotina previstos no capítulo II do anexo B da Directiva 88/407/CEE ;

d) O sémen a exportar :

i) é proveniente de dadores residentes em

.....

(país de exportação)

no período de seis meses imediatamente anterior à colheita do sémen para exportação e que satisfazem as condições previstas no anexo C da Directiva 88/407/CEE,

ii) foi obtido de dadores que :

— se encontram num centro de colheita de sémen em que todos os bovinos foram, nos 12 meses imediatamente anteriores à colheita do sémen para exportação, submetidos, com resultados negativos, a um teste de seroneutralização ou a uma prova ELISA para a rinotraqueíte bovina infecciosa/vulvovaginite pustulosa infecciosa (1),

ou

— foram submetidos, com resultados negativos, a um teste de seroneutralização ou a uma prova ELISA para a rinotraqueíte bovina infecciosa/vulvovaginite pustulosa infecciosa nos 12 meses imediatamente anteriores à colheita de sémen para exportação (1),

ou

— são seropositivos, tendo sido vacinados em conformidade com o disposto no capítulo II do anexo B da Directiva 88/407/CEE e apresentado resultados negativos num teste de seroneutralização ou ELISA efectuado no centro aprovado de colheita de sémen antes da vacinação (1),

(1) Riscar o que não interessa.

ou

— apresentaram uma reacção positiva a um teste de seroneutralização ou a uma prova ELISA para a rinotraqueíte bovina infecciosa/vulvovaginite pustulosa infecciosa e não foram vacinados em conformidade com o disposto no capítulo II do anexo B da Directiva 88/407/CEE, tendo pelo menos 10 % de cada ejaculado de sémen para exportação (com um mínimo de cinco palhetas) sido submetido anteriormente à exportação, com resultados negativos, a um teste de inoculação animal ou de isolamento do vírus (1),

iii) foi transformado, armazenado e transportado de forma a satisfazer as condições previstas na Directiva 88/407/CEE,

iv) é proveniente de dadores que, num laboratório aprovado, foram submetidos por duas vezes, com um intervalo não superior a 12 meses, aos testes a seguir indicados, antes e depois da colheita (a amostra de sangue para o segundo dos testes referidos deve ser colhida pelo menos 21 dias após a colheita do sémen para exportação):

— uma prova ELISA do bloqueio para a febre catarral, em conformidade com o anexo E,

— uma prova de imunodifusão em ágar-gel em conformidade com o anexo E e um teste de neutralização do vírus para todos os serotipos da doença hemorrágica epizoótica cuja existência no país exportador é conhecida,

— um teste de seroneutralização para o vírus Akabane.

Feito em ....., em .....
(local) (data)

(Carimbo) (2)

Assinatura (2): .....

Nome em letras de imprensa: .....

Título oficial: .....

(1) Riscar o que não interessa.
(2) A assinatura e o carimbo devem ter uma cor diferente da dos caracteres impressos.

PARTE 2

Lista de países terceiros autorizados a utilizar o modelo de certificado sanitário constante da parte 1 do anexo D

AUSTRÁLIA

ANEXO E

Protocolo para uma prova de imunoabsorção enzimática de bloqueio ou competitiva utilizando um anticorpo monoclonal específico de grupo para a detecção dos anticorpos do vírus da febre catarral

PROVA ELISA COMPETITIVA UTILIZANDO O ANTICORPO MONOCLONAL 3-17-A3

A prova permite detectar anticorpos para todos os serotipos conhecidos do vírus da febre catarral (VFC).

O fundamento da prova é a interrupção da reacção entre o antigénio do VFC e um anticorpo monoclonal específico de grupo (3-17-A3) por adição de soro de ensaio a diferentes diluições. Os anticorpos do VFC presentes no soro de ensaio bloqueiam a reactividade do anticorpo monoclonal (AMC), o que origina uma redução do desenvolvimento esperado da cor resultante da adição de substrato enzimático.

MATERIAL E REAGENTES

1. Placas de microtítulo de fundo plano.
2. Antigénio : preparado conforme descrito.
3. Tampão de bloqueio : 5 % (p/v) pó de leite seco « Marvel », 0,1 % (v/v) *Tween*-20 (fornecido em xarope monolaurato de polioxietileno sorbitol) em sistema tampão fosfatado (STF).
4. Anticorpo monoclonal (AMC) : 3-17-A3 (fornecido na forma de sobrenadante da cultura de tecidos de hibridoma), armazenado a − 20° C ou liofilizado, diluído a 1/50 com um tampão de bloqueio antes da utilização, dirigido contra o polipeptido p7 específico do grupo.
5. Conjugado : globulina de coelho anti-rato (adsorvida e eluída), conjugada com peroxidase de rábano silvestre e mantida ao abrigo da luz a 4° C.
6. Substrato e cromogénio : 0,2 g de ortofenileno diamina (OFD) dissolvidos num tampão que consiste em 2,553 g de ácido cítrico e 4,574 g de hidrogenortofosfato dissódico perfazendo até 500 ml com água destilada, dividido em alíquotas de 25 ml e mantido ao abrigo da luz a − 20° C ; imediatamente antes da utilização, são adicionados 12 µl/25 ml de peróxido de hidrogénio (30 % p/v).

   MANIPULAR CUIDADOSAMENTE O OFD — UTILIZAR LUVAS DE BORRACHA — SUSPEITA DE EFEITO MUTAGÉNICO
7. Ácido sulfúrico 1 molar : 26,6 ml de ácido, adicionados a 473,4 ml de água destilada.

   NÃO ESQUECER — ADICIONAR SEMPRE O ÁCIDO À ÁGUA, *nunca* a água ao ácido.
8. Agitador orbital.
9. Leitor de placa ELISA (a prova pode ser lida visualmente).

FORMATO DE ENSAIO

	H	G	F	E	D	C	B	A	
Controlo em branco			Antigénio + Conjugado						1
Controlo do AMC			Antigénio + AMC + Conjugado						2
Controlo positivo	Antigénio + Soro positivo + AMC + Conjugado								3
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
	Soros de ensaio								
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	4
									5
									6
Soros de ensaio									7
									8
									9
									10
									11
									12

PROTOCOLO DE ENSAIO

Controlo em branco

A faixa 1, de A a H, representa um controlo em branco que compreende o antigénio do VFC e o conjugado. Pode ser utilizado para aferir o leitor ELISA.

Controlo do AMC

A faixa 2, de A a H, representa o controlo do AMC e compreende o antigénio do VFC, o AMC e o conjugado. Trata-se de um controlo negativo. A média dos valores da densidade óptica desta faixa de controlo corresponde ao valor de inibição de 0 %.

Controlo positivo

A faixa 3, de A a H, representa o controlo positivo. Compreende o antigénio do VFC, as diluições de antisoro positivo do VFC, o AMC e o conjugado. Trata-se de um indicador de que o ensaio está a decorrer com normalidade, devendo ser obtidos, de ensaio para ensaio, níveis de inibição equivalentes.

Soros de ensaio

No formato de ensaio atrás indicado podem ser ensaiados 18 soros com as diluições de 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16. Obter-se-ão, desta forma, informações relativas ao título do anticorpo nos soros a ensaiar. A gama de diluições poderia ser alargada para obter títulos finais de diluição do soro. Por outro lado, para estudos serológicos em grande escala, o soro pode ser ensaiado a uma única diluição (1/4) ou a duas diluições (1/2 e 1/4) como prova rápida de controlo.

TÉCNICA

1. Diluir o antigénio do VFC até à concentração pré-titulada em STF. Proceder à dissociação ultra-sónica para dispersar os agregados do vírus (não dispondo do aparelho necessário, pipetar vigorosamente) e adicionar 50 µl a todas as cavidades da placa ELISA. Bater ligeiramente nos bordos da placa para dispersar o antigénio.

2. Incubar a 37 °C durante 60 minutos num agitador orbital. Lavar as placas passando-as três vezes por água e esvaziar as cavidades com STF não estéril e secar com um papel absorvente.

3. Adicionar 50 µl de tampão de bloqueio por cavidade. Adicionar os soros de ensaio e um soro positivo nas cavidades apropriadas e diluir o conteúdo da placa com a ajuda de uma pipeta de canais múltiplos. Não adicionar soro nem ao controlo em branco nem ao controlo do AMC.

4. Imediatamente após a adição dos soros de ensaio, diluir o AMC em tampão de bloqueio (a uma diluição pré-titulada) e adicionar 50 µl a todas as cavidades da placa, excepto ao controlo em branco.

5. Incubar a 37 °C durante 60 minutos num agitador orbital. Lavar três vezes com STF e secar com um papel absorvente.

6. Diluir o concentrado de coelho anti-rato a 1/5 000 num tampão de bloqueio e adicionar 50 µl a todas as cavidades da placa.

7. Incubar a 37 °C durante 60 minutos num agitador orbital. Lavar três vezes com STF e secar com um papel absorvente.

8. Descongelar o OFD e, imediatamente antes da utilização, adicionar 12µl de peróxido de hidrogénio a 30 % por cada 25 ml de OFD. Adicionar 50 µl a todas as cavidades da placa. Aguardar que a cor se desenvolva durante aproximadamente 10 minutos e parar a reacção com ácido sulfúrico 1 molar (50µl por cavidade). A cor deve-se desenvolver nas cavidades de controlo AMC e nas cavidades que contêm soros sem anticorpos do VFC.

9. Examinar e registar as placas, ou visualmente ou com recurso a um leitor espectrofotométrico.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Calcular o valor médio da densidade óptica (DO) a partir dos controlos AMC. Esse valor representa o valor de inibição de 0 %. Os valores da densidade óptica dos soros a testar são expressos em valores de inibição percentuais e calculados por meio da fórmula seguinte :

$$\text{Valores de inibição percentuais} = 100 - \frac{\text{DO na presença do soro de ensaio}}{\text{DO na ausência do soro de ensaio}} \times 100$$

Os valores de inibição superiores a 40 % para uma diluição do soro a 1/4 são considerados positivos. A leitura visual é possível visto uma inibição de 40 % ser o mais baixo valor facilmente visível a olho nu.

PREPARAÇÃO DO ANTIGÉNIO DO VFC PARA O MÉTODO ELISA

1. Lavar três vezes dez roux de células BHK-21 confluentes com um meio « Eagle » isento de soro e infectar com o serotipo 1 do vírus da febre catarral num meio « Eagle » isento de soro.
2. Incubar a 37 °C e examinar diariamente o efeito citopatogénico (ECP).
3. Quando o ECP se tornar manifesto em 80 a 90 % da camada de células de cada roux, recolher o vírus por agitação, destacando as células aderentes ao vidro.
4. Centrifugar a 2 000 a 3 000 rpm (rotações por minuto) para agregar as células.
5. Eliminar a fracção sobrenadante e colocar novamente as células em suspensão em aproximadamente 30 ml de STF. que contenha 1 % de « Sarkosyl » e 2 ml de fluoreto de fenolmetilsulfonil (tampão lise). Isto pode provocar uma gelificação das células, podendo ser adicionado mais lise para reduzir esse efeito.

   Nota: o fluoreto de fenolmetilsulfonil é uma substância perigosa; manipular com muito cuidado.
6. Proceder à dissociação das células durante 60 segundos utilizando uma sonda ultra-sónica a uma amplitude de 30 mícrons.
7. Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 minutos.
8. Recolher a fracção sobrenadante a + 4 °C e colocar o agregado de células remanescente em 10 a 20 ml de lise.
9. Proceder à dissociação ultra-sónica e clarificar, recolher a fracção sobrenadante em cada fase, num total de três vezes.
10. Reunir as fracções sobrenadantes e centrifugar a 24 000 rpm durante 120 minutos a uma temperatura de + 4 °C sobre uma almofada de 5 ml de sucrose a 40 % (p/v em STF) utilizando tubos de centrifugação Beckmann de 30 ml e um rotor SW 28.
11. Eliminar a fracção sobrenadante, escorrer cuidadosamente os tubos e suspender novamente o agregado em STF por dissociação ultra-sónica. Recolher o antigénio em alíquotas a − 70 °C.

TITULAÇÃO DO ANTIGÉNIO DO VFC PARA O MÉTODO ELISA

A titulação do antigénio da febre catarral para o método ELISA é feita pelo método indirecto ELISA. Titulação de diluições a 1/2 do antigénio contra uma diluição constante (1/50) de anticorpo monoclonal 3-17-A3. O protocolo é o seguinte:

TÉCNICA

1. Diluir o antigénio da VFC em STF ao longo de uma placa de microtítulo numa série de diluições a 1/2 (50 µl/cavidade) utilizando uma pipeta de canais múltiplos.
2. Incubar durante uma hora a 37 °C num agitador orbital.
3. Lavar três vezes as placas com STF.
4. Adicionar 50 µl de anticorpo monoclonal 3-17-A3 (diluído a 1/50) a cada uma das cavidades da placa de microtítulo.
5. Incubar durante uma hora a 37 °C num agitador orbital.
6. Lavar três vezes as placas com STF.
7. Adicionar 50 µl de globulina de coelho anti-rato conjugada com peroxidase de rábano silvestre, diluída numa concentração pré-titulada óptima, a cada cavidade da placa de microtítulo.
8. Incubar durante uma hora a 37 °C num agitador orbital.
9. Adicionar um substrato e um cromogénio como indicado atrás. Parar a reacção após 10 minutos por meio da adição de ácido sulfúrico 1 molar (50 µl por cavidade).

No ensaio competitivo, o anticorpo monoclonal deve encontrar-se em excesso, devendo por essa razão ser escolhida uma diluição de antigénio que se encontre na curva de titulação (e não na zona de planalto) que resulte numa densidade óptica de aproximadamente 0,8 após 10 minutos.

Protocolo para uma prova de imunodifusão em ágar-gel para a detecção dos anticorpos da doença hemorrágica epizoótica

A prova de imunodifusão em ágar-gel é realizada de acordo com o protocolo seguinte:

MATERIAL E REAGENTES

1. Antigénio

   Preparar o antigénio, precipitando num sistema de cultura de células compatível com a multiplicação rápida serótipo(s) adequado(s) do vírus da doença epizoótica hemorrágica. São recomendadas as células BHK ou Vero. O antigénio está presente no fluido sobrenadante no termo do crescimento do vírus, mas, para ser eficaz, a sua concentração deve ser 50 a 100 vezes superior. Esta concentração obtém-se através de qualquer método padrão de concentração de proteínas; o vírus do antigénio pode ser inactivado por meio da adição de 0,3 % (v/v) de beta-propiolactona.

2. Soro de controlo positivo conhecido

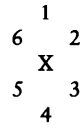
   Utilizando o soro internacional de referência e antigénio, é produzido um soro-tipo nacional, padronizado para obtenção de uma proporção óptima relativamente ao soro internacional de referência, liofilizado e utilizado como o soro de controlo conhecido em cada ensaio.

3. Soro de ensaio.

TÉCNICA

1. Deitar agarose a 1 % preparada num tampão de borato ou de barbitol de sódio, com um pH entre 8,5 e 9,0 numa placa de Petri a uma profundidade mínima de 3,0 mm.

2. Cria-se no ágar uma estrutura de sete cavidades isentas de humidade, cada uma com 5,0 mm de diâmetro. A estrutura consiste numa cavidade central e seis cavidades dispostas num círculo com um raio de 3 mm.



3. Preencher a cavidade central com o antigénio padrão. As cavidades circundantes 2, 4 e 6 são preenchidas com soro positivo e as 1, 3 e 5 com o soro de ensaio.

4. O sistema é colocado em incubação durante um período que pode ir até 72 horas à temperatura ambiente numa câmara húmida fechada.

INTERPRETAÇÃO

Um soro de ensaio é positivo caso resulte na formação de uma linha de precipitina específica com o antigénio e numa linha de identidade total com o soro de controlo. O soro de ensaio é negativo caso se não forme uma linha específica e caso não deforme a linha correspondente ao soro de controlo. As placas de Petri devem ser examinadas contra um fundo escuro e com uma iluminação indirecta.