II

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

CONSELHO

DIRECTIVA DO CONSELHO

de 14 de Junho de 1988

que altera a Directiva 64/432/CEE no que diz respeito à leucose bovina enzoótica e revoga a Directiva 80/1102/CEE

(88/406/CEE)

O CONSELHO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta a Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia e, nomeadamente, o seu artigo 43º,

Tendo em conta a proposta da Comissão (1),

Tendo em conta o parecer do Parlamento Europeu (2),

Tendo em conta o parecer do Comité Económico e Social (3),

Considerando que uma das tarefas da Comunidade no domínio veterinário consiste em melhorar o estado sanitário do efectivo a fim de assegurar uma melhor rentabilidade da criação;

Considerando, a esse respeito, que se torna necessário proteger a Comunidade contra a leucose bovina enzoótica; que, por outro lado, a Comunidade, através das Directivas 77/391/CEE (4) e 78/52/CEE (5) e da Decisão 87/58/CEE (6), já iniciou uma acção com vista à erradicação dessa doença;

Considerando que esse tipo de acção deve contribuir para fazer desaparecer os entraves que ainda existem no comércio intracomunitário de animais vivos devido às diferenças de situação sanitária;

Considerando que, para esse efeito, foram introduzidas, até 31 de Dezembro de 1987, medidas de protecção contra a leucose bovina enzoótica a coberto da Directiva 64/432/CEE do Conselho, de 26 de Junho de 1964, relativa a problemas de fiscalização sanitária em matéria de comércio intracomunitário de animais das espécies bovina e suína (7), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 3805/87 (8);

Considerando que convém prolongar essas medidas não deixando de se reconhecer novos métodos de detecção da leucose bovina enzoótica;

Considerando que, no termo de um período transitório, convém pôr fim às regras particulares previstas pelo actual regime para os países que aplicavam programas nacionais de luta contra essa doença;

Considerando que se mostra oportuno prever regras relativas à qualificação dos efectivos no que respeita à leucose bovina enzoótica;

Considerando que os Estados-membros, para qualificar o seu efectivo, devem pôr em prática um programa destinado a submeter o seu efectivo a uma das provas de despistagem da leucose bovina previstas no Anexo G da Directiva 64/432/CEE;

Considerando que, com excepção dos animais de abate com mais de trinta meses, os animais destinados ao comércio intracomunitário devem provir de um efectivo testado que tenha sido submetido a uma prova individual,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1º

Com efeitos a partir de 1 de Julho de 1988, a Directiva 64/432/CEE é alterada do seguinte modo:

(1) JO nº C 5 de 9. 1. 1988, p. 5.
(2) JO nº C 49 de 22. 2. 1988, p. 164.
(3) JO nº C 80 de 28. 3. 1988, p. 34.
(4) JO nº L 145 de 13. 6. 1977, p. 44.
(5) JO nº L 15 de 19. 1. 1978, p. 34.
(6) JO nº L 24 de 27. 1. 1987, p. 51.
(7) JO nº 121 de 29. 7. 1964, p. 1977/64.
(8) JO nº L 357 de 19. 12. 1987, p. 1.

1. No artigo 2º, é aditada a seguinte alínea:

«s) Efectivo indemne de leucose bovina enzoótica: o efectivo em que:

i) Não tenha sido, durante os dois últimos anos, quer verificado, seja clinicamente, seja na sequência de uma das provas efectuadas nos termos do Anexo G, quer confirmado, qualquer caso de leucose bovina enzoótica;

ii) Todos os animais com mais de vinte e quatro meses tenham, durante os doze últimos meses, reagido negativamente a duas provas efectuadas nos termos do Anexo G, com um intervalo de quatro meses no mínimo, ou, no caso de um efectivo que tenha já satisfeito esse requisito, a uma só prova efectuada nos termos do referido anexo;

iii) A partir da data do primeiro controlo apenas se encontrem animais nascidos nesse efectivo ou provenientes de um efectivo indemne de leucose bovina enzoótica.»

2. Ao nº 2 do artigo 3º é aditada a alínea seguinte:

«j) Desde que se trate de bovinos de criação reprodutores de raça pura, tal como definidos no artigo 1º da Directiva 77/504/CEE, exclusivamente reservados à reprodução e de grande valor, provir de um efectivo:

i) Em que não tenha sido comunicado ao veterinário oficial, no decurso dos últimos dois anos, nenhum facto que permita concluir pela existência de casos de leucose bovina enzoótica;

ii) Cujo proprietário tenha declarado não ter tido conhecimento de tais factos e tenha além disso declarado por escrito que o animal ou os animais destinados ao comércio intracomunitário nasceram e foram criados no referido efectivo ou dele fizeram parte integrante durante os doze meses precedentes.»

3. O nº 3 do artigo 3º é completado pela alínea seguinte:

«d) Provir de um efectivo em que nada permita concluir pela existência de casos de leucose bovina enzoótica no decurso dos últimos dois anos e, se tiverem idade superior a doze meses, ter sido submetidos, com resultado negativo, nos trinta dias anteriores ao embarque, a uma prova individual efectuada nos termos do Anexo G.

Essa prova não será todavia exigida no caso dos bovinos machos e dos bovinos castrados com idade inferior a trinta meses e destinados à produção de carne, desde que esses animais sejam identificados com uma marca especial aquando do seu embarque e desde que o Estado-membro tome medidas para evitar a contaminação dos efectivos indígenas.»

4. No nº 1 do artigo 7º, é aditado o ponto seguinte:

«G. No que diz respeito aos bovinos fêmeas com idade inferior a trinta meses destinados a produção de carne, os que, em derrogação do nº 3, alínea d), do artigo 3º, não tenham sido submetidos a uma prova individual. Esses animais devem ostentar uma marca especial. O Estado-membro destinatário tomará todas as medidas para evitar a contaminação dos efectivos indígenas.»

5. O nº 2 do artigo 8º é completado pelo parágrafo seguinte:

«No que se refere, em particular, à leucose bovina enzoótica e tratando-se dos animais referidos no nº 2, alínea j), do artigo 3º, os Estados-membros são autorizados a exigir, além disso, sem desrespeito pelas disposições gerais do Tratado, que todos os animais do efectivo de origem, com idade superior a vinte e quatro meses na data da prova, tenham reagido negativamente a uma prova efectuada nos termos do Anexo G, no decurso dos últumos doze meses. Tais garantias não podem, todavia, ser exigidas relativamente à introdução de animais provenientes de Estados-membros reconhecidos como oferecendo suficientes garantias relativamente à leucose bovina enzoótica de acordo com o processo previsto no artigo 12º»

6. É inserido o seguinte artigo:

«Artigo 8ºA

1. Os Estados-membros que aplicam desde 1980 um programa nacional obrigatório de profilaxia da leucose bovina enzoótica podem subordinar a introdução no seu território de bovinos de criação e de rendimento, destinados a ser integrados em efectivos bovinos não suspeitos de leucose, à apresentação de um certificado emitido no dia de embarque por um veterinário oficial competente e redigido, pelo menos, na ou nas línguas do país destinatário, atestando que:

a) O referido veterinário não teve conhecimento de factos que permitam concluir pela existência de leucose bovina enzoótica no decurso dos últimos três anos no efectivo de origem e que o proprietário do efectivo declarou não ter tido conhecimento de tais factos e declarou, além disso, por escrito, que o animal ou os animais destinados ao comércio intracomunitário nasceram e foram criados no referido efectivo ou fizeram parte integrante desse efectivo durante os últimos doze meses;

b) No decurso dos últimos doze meses, todos os animais pertencentes ao efectivo de origem e com idade superior a vinte e quatro meses à data da prova, reagiram negativamente a uma prova efectuada nos termos do Anexo G.

2. De acordo com o processo previsto no artigo 12º, os Estados-membros com excepção dos referidos no nº 1, podem ser autorizados a aplicar as mesmas

exigências para o seu território ou, no que diz respeito ao Reino Unido, para a Irlanda do Norte, se aí estiver a ser posto em prática algum plano de erradicação da leucose bovina enzoótica, nos termos da Decisão 87/58/CEE, ou se se provar que, na data em que a questão foi apresentada ao Comité Veterinário Permanente, está aí a ser aplicado, há pelo menos dois anos, um programa mínimo de erradicação que inclua as seguintes exigências mínimas:

— todos os tumores nos orgãos e sistema linfático de bovinos devem ser notificados e examinados do ponto de vista histológico por um laboratório veterinário directamente supervisionado por um dos laboratórios mencionados no Anexo G,

— todos os bovinos dos efectivos que entraram em contacto contagioso com algum animal que se verifique ter contraído um tumor leucósico serão submetidos a uma prova de pesquisa da leucose bovina enzoótica efectuada em conformidade com o Anexo G num laboratório directamente supervisionado por um dos laboratórios mencionados no referido anexo,

— no caso de um efectivo em que tenha sido detectado um animal atingido por um tumor leucósico e relativamente ao qual tenha sido confirmado o diagnóstico de leucose bovina enzoótica, os animais infectados só podem deixar o referido efectivo para serem abatidos sob controlo das autoridades veterinárias competentes. O efectivo deve permanecer sob controlo oficial até que se registem resultados negativos em, pelo menos, duas provas efectuadas a intervalos de, pelo menos, quatro meses em todos os bovinos de idade superior a vinte e quatro meses, em conformidade com o Anexo G e num laboratório directamente supervisionado por um dos laboratórios mencionados no referido anexo.

As condições complementares a que pode ser subordinada essa extensão para cada Estado-membro ou parte do território em causa podem ser estabelecidas na decisão prevista no primeiro parágrafo.»

7. No fim da alínea a) do Anexo E é aditado o seguinte travessão:

«— leucose bovina enzoótica».

8. No modelo I do Anexo F:

a) No ponto V:

aa) Após a alínea d), é acrescentado o texto seguinte:

«e) — se mantiveram durante os últimos doze meses (5) ou, se tiverem idade inferior a doze meses, desde o nascimento, num efectivo em que, no decurso dos últimos três anos (5), segundo as informações de que dispõe o abaixo assinado e a garantia dada pelo proprietário, não se registou nenhum caso de leucose bovina enzoótica (2) (12),

— provêm de um efectivo em que nada permitiu concluir pela existência de leucose bovina enzoótica no decurso dos três últimos anos (2),

— à data do exame, todos os animais do efectivo com idade superior a vinte e quatro meses tinham sido submetidos (2) (12), no decurso dos últimos doze meses (5), com resultado negativo, a uma prova (13),

— reagiram negativamente (2) (5) (11), no prazo prescrito de trinta dias (5), a uma prova individual (13) de pesquisa da leucose bovina enzoótica,

— se destinam à engorda (2) (11);»

bb) As alíneas e) a i) passam respectivamente a f) a j);

b) Depois da nota de pé-de-página (10), são acrescentadas as seguintes notas de pé-de-página:

«(11) Esta excepção só é válida para animais machos de idade inferior a trinta meses destinados à engorda, desde que esses animais sejam marcados de modo distinto e submetidos a um controlo especial no país de destino.

(12) Esta indicação só é necessária para os animais reprodutores de raça pura exclusivamente reservados à reprodução de grande valor.

(13) A prova individual foi realizada em conformidade com o Anexo G da Directiva 64/432/CEE.»

9. É aditado o Anexo G que figura em anexo à presente directiva.

Artigo 2º

Com efeitos a partir de 1 de Julho de 1990, a Directiva 64/432/CEE é alterada do seguinte modo:

1. No nº 2 do artigo 3º, é suprimida a alínea j).

2. No nº 3 do artigo 3º, a alínea d) é substituída pela alínea d) que figura a seguir e são aditadas as alíneas e) e f):

«d) Provir de efectivo indemme de leucose bovina enzoótica na acepção da alínea s) do artigo 2º;

e) Para além da condição referida na alínea d), se tiverem uma idade superior a doze meses, ter tido reacção negativa a uma prova individual efectuada nos termos do Anexo G durante os trinta dias anteriores à data do embarque;

f) Não estar sujeitos às exigências referidas nas alíneas d) e e), se se tratar de bovinos de idade inferior a trinta meses destinados à produção de carne, e se:

i) provierem de um efectivo em que não tenha sido notificado e confirmado qualquer caso de leucose bovina enzoótica nos últimos dois anos,

ii) forem identificados com uma marcação especial na altura do embarque e se mantenham sob vigilância até ao abate,

desde que o Estado-membro de destino tome todas as medidas necessárias para evitar uma contaminação dos efectivos indígenas.»

3. No nº 1 do artigo 7º, é suprimido o ponto G.

4. No nº 2 do artigo 8º, o último parágrafo é suprimido.

5. É suprimido o artigo 8ºA.

6. No modelo I do Anexo F:

— no ponto V, a alínea e) passa a ter a seguinte redacção:

«e) — se mantiveram durante os últimos doze meses (5) ou, se tiverem idade inferior a doze meses (5), desde o seu nascimento, num efectivo indemne de leucose bovina enzoótica (2) (11),

— reagiram negativamente, no prazo prescrito de trinta dias (5), a uma prova individual (12) de pesquisa da leucose bovina enzoótica (2) (11),

— se destinam à engorda (11);»,

— a nota de pé-de-página (11) passa a ter a seguinte redacção:

«(11) Esta excepção só é válida para bovinos de idade inferior a trinta meses destinados à engorda, desde que esses animais:

— provenham de um efectivo no qual não tenha sido notificado e confirmado nos das últimos anos qualquer caso de leucose bovina enzoótica,

— sejam marcados de modo distinto e submetidos a um controlo especial no país de destino.»,

— é suprimida a nota de pé-de-página (12),

— a nota de pé-de-página (13) passa a (12).

Artigo 3º

1. Para qualificar os seus efectivos como estando oficialmente indemnes de leucose bovina enzoótica, os Estados-membros porão em prática um programa de forma a submeter os seus efectivos a uma das provas previstas no Anexo G da Directiva 64/432/CEE.

2. Os Estados-membros informarão a Comissão pelo menos uma vez por ano do andamento dos seus programas, bem como dos resultados obtidos com a respectiva aplicação.

Artigo 4º

O Conselho, deliberando sob proposta da Comissão, estabelecerá, antes de 1 de Janeiro de 1990, os critérios que permitam que um Estado-membro ou que uma parte do território de um Estado-membro sejam reconhecidos como indemnes da leucose bovina enzoótica e as condições a pôr em prática para garantir a manutenção desse estatuto, bem como as regras aplicáveis ao comércio a partir de regiões ou de Estados-membros indemnes da leucose bovina enzoótica.

Artigo 5º

Os Estados-membros porão em vigor as disposições necessárias para dar cumprimento às exigências

— dos artigos 1º a 3º, o mais tardar em 1 de Julho de 1988,

— do artigo 2º, o mais tardar em 1 de Julho de 1990.

Do facto informarão imediatamente a Comissão.

Artigo 6º

Fica revogada a Directiva 80/1102/CEE (1).

Artigo 7º

Os Estados-membros são os destinatários da presente directiva.

Feito no Luxemburgo, em 14 de Junho de 1988.

Pelo Conselho

O Presidente

I. KIECHLE

(1) JO nº L 325 de 1. 12. 1980, p. 18.

ANEXO

«ANEXO G

PROVAS PARA A PESQUISA DA LEUCOSE BOVINA ENZOÓTICA

A pesquisa da leucose bovina enzoótica efectua-se mediante a prova de imunodifusão nas condições descritas nos pontos A e B, ou mediante a prova de imunoabsorção enzimática (Elisa) nas condições descritas no ponto C. O método de imunodifusão só se aplica às provas individuais.

No caso de os resultados das provas serem objecto de uma contestação devidamente fundamentada, efectuar-se-á uma prova de imunodifusão como controlo complementar.

A. Provas de imunodifusão sobre placa de gelose

1. O antigénio a utilizar nesta prova deve conter glicoproteínas do vírus da leucose bovina. O antigénio deve ser padronizado em relação a um soro padrão (soro E I) fornecido pelo Statens Veterinaere Serum Laboratorium de Copenhaga.

2. Os institutos oficiais seguidamente indicados devem ser encarregados de calibrar o antigénio padrão de trabalho no laboratório por comparação com o soro padrão oficial (soro E I) fornecido pelo Statens Veterinaere Serum Laboratorium de Copenhaga.

   a) Alemanha (RF): Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere — Tübingen;

   b) Bélgica: Institut national de recherches vétérinaires, Bruxelles;

   c) França: Laboratoire national de pathologie bovine, Lyon;

   d) Grão-Ducado do Luxemburgo: —

   e) Itália: Istituto zooprofilattico sperimentale, Perugia;

   f) Países Baixos: Centraal Diergeneeskundig Instituut, Afdeling Rotterdam;

   g) Dinamarca: Statens Veterinære Serum Laboratorium, København;

   h) Irlanda: Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Dublin;

   i) Reino Unido:

      1. Grã Bretanha: The Central Veterinary Laboratory, Weybridge, England;

      2. Irlanda do Norte: The Veterinar Research Laboratory, Stormont, Belfast;

   j) Espanha: Laboratorio de Sanidad y Produción Animal de Barcelona;

   k) Portugal: Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Lisboa.

3. Os antigénios padrão utilizados no laboratório devem ser apresentados pelo menos uma vez por ano nos laboratórios de referência CEE enumerados no nº 2 acima, para aí serem testados por compração com o soro padrão CEE. Independentemente desta padronização, o antigénio utilizado pode ser padronizado em conformidade com a letra B.

4. Na prova serão utilizados os reagentes seguintes:

   a) Antigénio: o antigénio deve conter glicoproteínas específicas do vírus da leucose bovina enzoótica que foi padronizado por comparação com o soro padrão oficial CEE;

   b) O soro a testar;

   c) Um soro de controlo positivo conhecido;

   d) Gelose:

      0,8 % ágar

      8,5 % NaCl

      tampão Tris 0,05 M, pH 7,2

      devem-se colocar 15 mililitros desta gelose numa placa de Petri de 85 milímetros de diâmetro, o que dá uma altura de 2,6 milímetros de gelose.

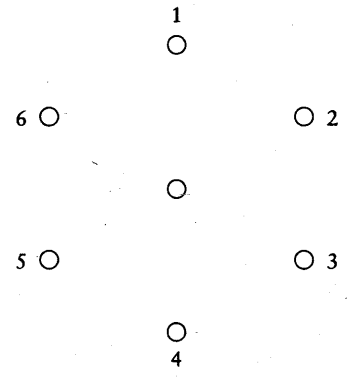
5. Preparar um dispositivo experimental de sete cavidades isentas de humidade por perfuração da gelose até ao fundo da placa; a rede assim obtida deverá ser constituída por uma cavidade central em torno da qual se ordenam seis cavidades periféricas dispostas em círculo.

   Diâmetro da cavidade central: 4 milímetros

   Diâmetro das cavidades periféricas: 6 milímetros

   Distância entre a cavidade central e as cavidades periféricas: 3 milímetros

6. Encher a cavidade central com o antigénio padrão. As cavidades periféricas 1 e 4 (ver esquema abaixo) são enchidas com o soro positivo conhecido e as cavidades 2, 3, 5 e 6 com os soros a testar. As cavidades devem ser enchidas até ao desaparecimento do menisco.



7. As quantidades obtidas são as seguintes:

antigénio:	32 microlitros,
soro de controlo:	73 microlitros,
soro a testar:	73 microlitros.

8. A incubação deve durar 72 horas à temperatura ambiente (20-27 °C) em atmosfera húmida num recipiente fechado.

9. A prova pode ser lida passadas 24 horas e em seguida passadas 48 horas, mas não se pode obter qualquer resultado final antes de passarem 72 horas:

   a) Um soro a testar é positivo se formar uma curva de precipitação específica com o antigénio do vírus da leucose bovina e se essa curva coindicir com a do soro de controlo;

   b) Um soro a testar é negativo se não der curva de precipitação específica com o antigénio do vírus da leucose bovina e se não inflectir a curva do soro de controlo;

   c) A reacção não pode ser considerada concludente se:

      i) Inflectir a curva do soro de controlo para a cavidade do antigénio do vírus da leucose bovina sem formar uma curva de precipitação visável com o antigénio, ou

      ii) Não for possível interpretá-la como negativa ou como positiva.

      No caso de as reacções não serem concludentes, pode-se repetir a prova e utilizar soro concentrado.

B. Método de padronização do antigénio

Soluções e materiais necessários:

1. 40 mililitros de gelose a 1,6 % num tampão Tris 0,05 M/HCl, pH 7,2, com 8,5 % de NaCl;
2. 15 mililitros de um soro de leucose bovina que só tenha anticorpos em relação às glicoproteínas do vírus da leucose bovina, soro diluído a 1/10 num tampão Tris 0,05 M/HCl, pH 7,2, com 8,5 % de NaCl;
3. 15 mililitros de um soro da leucose bovina que só tenha anticorpos em relação às glicoproteínas do vírus dà leucose bovina, soro diluído a 1/15 num tampão Tris 0,05 M/HCl pH 7,2, com 8,5 % de NaCl;
4. Quatro placas de Petri de plástico, com 85 milímetros de diâmetro;
5. Uma punção com 4 a 6 milímetros de diâmetro;
6. Um antigénio de referência;
7. O antigénio a padronizar;
8. Um banho-maria (56 °C).

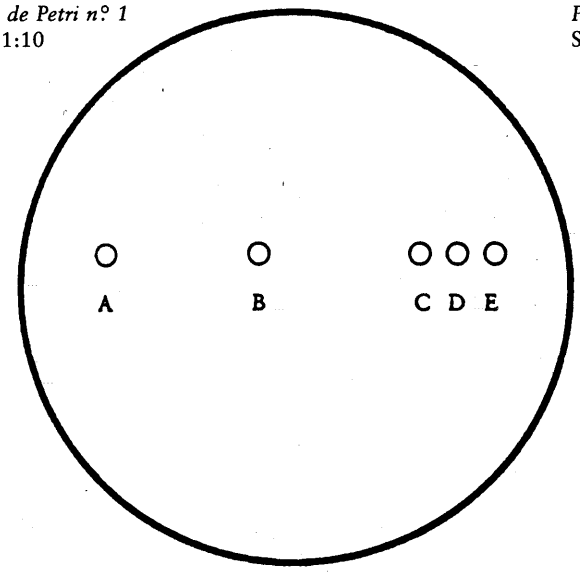
Modo de execução:

Dissolver a gelose (1,6 %) no tampão Tris/HCl aquecendo com cuidado até 100 °C. Pôr no banho-maria a 56 °C durante cerca de 1 hora. Colocar também as soluções do soro de leucose bovina no banho-maria a 56 °C.

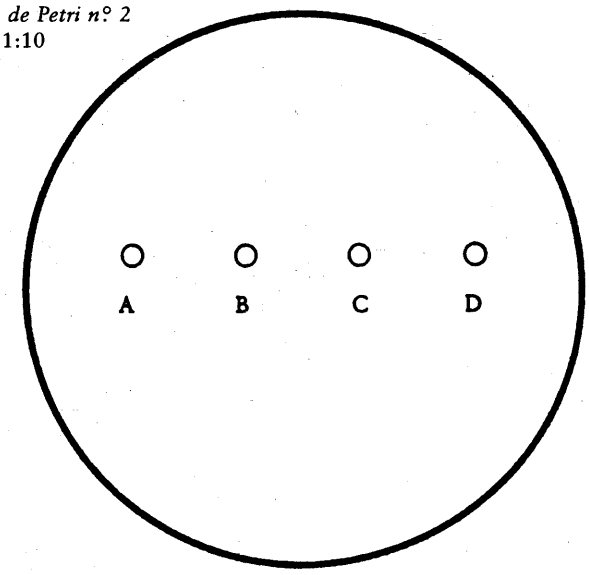
Misturar em seguida 15 mililitros de solução de gelose a 56 °C com os 15 mililitros de soro de leucose bovina (1:10), agitar rapidamente e deitar em duas placas de Petri, à razão de 15 mililitros por placa, repetir as operações atrás descritas com o soro de leucose bovina diluído a 1/5.

Quando a gelose tiver endurecido, fazer as cavidades do seguinte modo:

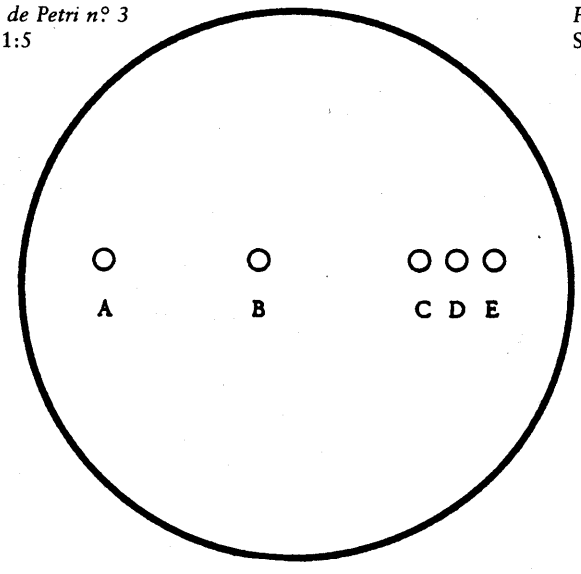
Placa de Petri nº 1
Soro 1:10



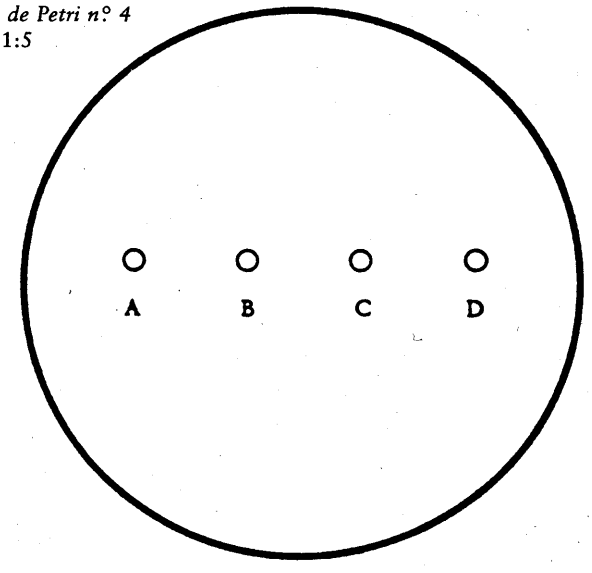
Placa de Petri nº 2
Soro 1:10



Placa de Petri nº 3
Soro 1:5



Placa de Petri nº 4
Soro 1:5



Adição de antigénios:

I. Placas de Petri nºs 1 e 3:

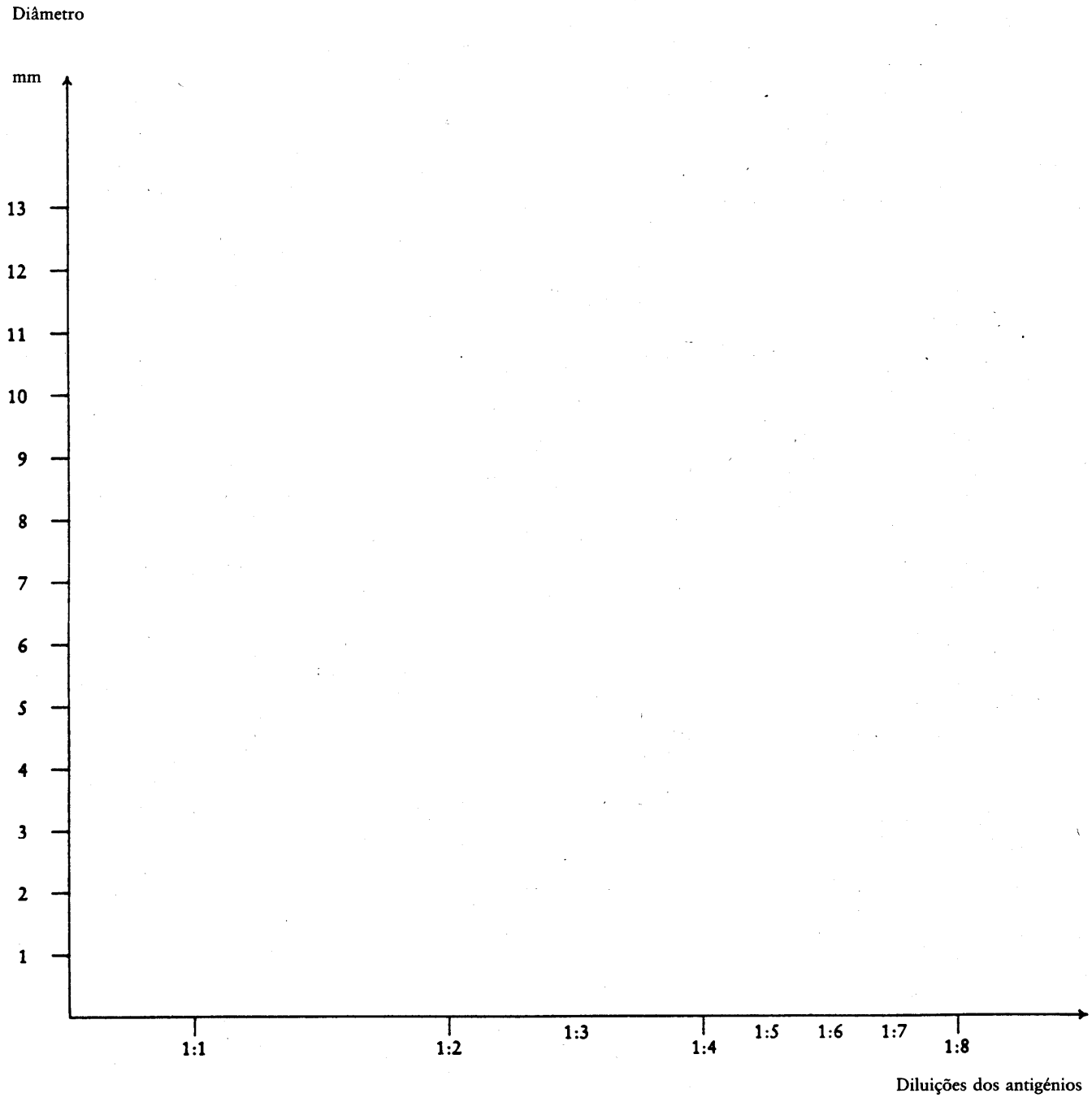
Cavidade A	— antigénio de referência não diluído,
Cavidade B	— antigénio de referência diluído a 1/2,
Cavidades C + E	— antigénio de referência,
Cavidade D	— antigénio a testar, não diluído.

II. Placas de Petri nºs 2 e 4:

Cavidade A	— antigénio a testar, não diluído,
Cavidade B	— antigénio a testar, diluído a 1/2,
Cavidade C	— antigénio a testar, diluído a 1/4,
Cavidade D	— antigénio a testar, diluído a 1/8.

Instruções complementares:

1. A experiência deve ser efectuada com dois graus de diluição do soro (1:5 e 1:10) a fim de obter a precipitação óptima.
2. Se o diâmetro de precipitação for muito pequeno para cada um dos dois graus de diluição, deve fazer-se uma diluição suplementar do soro.
3. Se o diâmetro de precipitação for excessivo para ambos os graus de diluição e se o precipitado desaparecer, deve-se escolher um grau de diluição mais fraco para o soro.
4. A concentração final de gelose deve ser de 0,8 % e a dos soros de 5 % de 10 %, respectivamente.
5. Anotar os diâmetros medidos no gráfico seguinte. A diluição de trabalho é aquela em que se registar o mesmo diâmetro para o antigénio a testar e para o antigénio de referência.



C. **Prova de imunoabsorção enzimática (Elisa) para a pesquisa da leucose bovina enzoótica**

1. Para o método Elisa , são os seguintes os materiais e os reagentes a utilizar:

   a) Microplacas para fase sólida, tinas ou qualquer fase sólida;

   b) O antigénio é fixado à fase sólida com ou sem a ajuda de anticorpos de captação policlonal ou monoclonal. Se o antigénio é directamente aplicado à fase sólida, todas as amostras que apresentem reacções positivas devem ser testadas de novo em relação ao antigénio de controlo. Este deve ser idêntico ao antigénio testado excepto no que respeita aos antigénios BLV. Se os anticorpos de captação forem aplicados à fase sólida, os anticorpos apenas devem reagir aos antigénios BLV;

   c) O líquido biológico a examinar (soro ou leite);

   d) Um controlo positivo e negativo;

   e) Conjugado: uma imunoglobulina antibovina biotinilada ou enzima conjugada ou uma imunoglobulina biotinilada anti-BLV ou uma enzima conjugada;

   f) Avidina: uma enzima para ensaios que utilizem preparados de imunoglobulina biotinilada;

   g) Um substrato adaptado à enzima utilizada;

   h) Uma solução de paragem;

   i) Soluções tampão para a diluição das amostras de ensaio, a preparação dos reagentes e a lavagem;

   j) Um sistema de leitura com filtros adequados para o substrato utilizado.

2. *Normalização e sensibilidade dos testes*

   A sensibilidade da prova Elisa utilizada deve ser de um nível tal que o soro E4 seja positivo quando diluído 10 vezes (amostras de soro) ou 250 vezes (amostras de leite) mais do que uma solução obtida a partir de amostras individuais colocadas em conjunto.

   Em provas em que as amostras (soro e leite) sejam examinadas individualmente, o soro E4, diluído à razão de 1 para 10 (para o soro negativo) ou à razão de 1 para 250 (para o leite negativo), deve dar uma reacção positiva quando for examinado na mesma diluição que é utilizada para as amostras individuais.

   O soro E4 é fornecido pelo Laboratório Veterinário Nacional de Copenhaga.

3. *Condições de utilização do teste Elisa*

   O método Elisa pode ser utilizado numa amostra de leite retirada de uma colheita de leite proveniente de uma exploração que compreenda pelo menos 30 % de vacas leiteiras em lactação, na condição de que a amostra seja retirada do leite produzido por menos de 50 vacas e de um concentrado de soro lácteo do leite colhido de um número de vacas compreendido entre 20 e, no máximo, 50 e na condição de que, se a colheita do leite incidir sobre mais de 50 vacas, o número da amostra retirada seja aumentado proporcionalmente.

   O método Elisa pode igualmente ser utilizado com base numa amostra de sangue proveniente de 50 animais, no máximo.

   Se se fizer uso de uma das possibilidades acima referidas, devem ser tomadas medidas que garantam a correspondência entre as amostras recolhidas e os animais de que provém o leite ou os soros analisados.

   Se uma das amostras fornecer um resultado positivo, o efectivo deve manter-se sob controlo oficial até que venha a registar-se um resultado negativo em, pelo menos, duas das provas efectuadas, com um intervalo mínimo de quatro meses, em todos os bovinos com mais de seis meses de idade, nos termos das disposições atrás mencionadas e num laboratório directamente supervisionado por um dos laboratórios referidos no ponto A.»