

Este documento constitui um instrumento de documentação e não vincula as instituições

► **B**

DIRECTIVA DO CONSELHO

de 26 de Junho de 1990

relativa às condições de polícia sanitária que regem a circulação de equídeos e as importações de equídeos provenientes de países terceiros

(90/426/CEE)

(JO L 224 de 18.8.1990, p. 42)

Alterada por:

		Jornal Oficial		
		n.º	página	data
► <u>M1</u>	Directiva do Conselho 90/425/CEE, de 26 de Junho de 1990	L 224	29	18.8.1990
► <u>M2</u>	Directiva do Conselho 91/496/CEE, de 15 de Julho de 1991	L 268	56	24.9.1991
► <u>M3</u>	Decisão 92/130/CEE da Comissão de 13 de Fevereiro de 1992	L 47	26	22.2.1992
► <u>M4</u>	Directiva 92/36/CEE do Conselho de 29 de Abril de 1992	L 157	28	10.6.1992
► <u>M5</u>	Decisão 2001/298/CE da Comissão de 30 de Março de 2001	L 102	63	12.4.2001
► <u>M6</u>	Decisão 2002/160/CE da Comissão de 21 de Fevereiro de 2002	L 53	37	23.2.2002
► <u>M7</u>	Regulamento (CE) n.º 806/2003 do Conselho de 14 de Abril de 2003	L 122	1	16.5.2003
► <u>M8</u>	Directiva 2004/68/CE do Conselho de 26 de Abril de 2004	L 226	128	25.6.2004
► <u>M9</u>	Directiva 2006/104/CE do Conselho de 20 de Novembro de 2006	L 363	352	20.12.2006

Alterada por:

► <u>A1</u>	Acto de Adesão da Áustria, da Finlândia e da Suécia (adaptado pela Decisão 95/1/CE, Euratom, CECA do Conselho)	C 241 L 1	21 1	29.8.1994 1.1.1995
► <u>A2</u>	Acto relativo às condições de adesão da República Checa, da República da Estónia, da República de Chipre, da República da Letónia, da República da Lituânia, da República da Hungria, da República de Malta, da República da Polónia, da República da Eslovénia e da República Eslovaca e às adaptações dos Tratados em que se funda a União Europeia	L 236	33	23.9.2003

Rectificado por:

► <u>C1</u>	Rectificação, JO L 296 de 27.10.1990, p. 66 (90/426/EEC)
--------------------	--

▼B**DIRECTIVA DO CONSELHO****de 26 de Junho de 1990****relativa às condições de polícia sanitária que regem a circulação de equídeos e as importações de equídeos provenientes de países terceiros**

(90/426/CEE)

O CONSELHO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

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

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 os equídeos, enquanto animais vivos, são incluídos na lista dos produtos enumerados no anexo II do Tratado;

Considerando que, a fim de assegurar um desenvolvimento racional da produção de equídeos e de assim aumentar a produtividade do sector, é necessário fixar, a nível comunitário, as regras que regem a circulação de equídeos entre Estados-membros;

Considerando que a criação de equídeos, em especial de cavalos, se integra, geralmente, no âmbito das actividades agrícolas; que a mesma constitui uma fonte de rendimentos para uma parte da população agrícola;

Considerando que é conveniente eliminar as disparidades existentes nos Estados-membros em matéria de polícia sanitária, de modo a favorecer as trocas intracomunitárias de equídeos;

Considerando que, para permitir um desenvolvimento harmonioso das trocas intracomunitárias, é necessário definir um regime comunitário aplicável às importações provenientes de países terceiros;

Considerando que é conveniente, no que se refere aos equídeos registados acompanhados de um documento de identificação, regular igualmente as condições da sua circulação no território nacional;

Considerando que, para participar nas trocas, os equídeos devem satisfazer certos requisitos de polícia sanitária destinados a evitar a propagação de doenças contagiosas; que se afigura ser particularmente oportuno prever uma possível regionalização das medidas restritivas;

Considerando que, com o mesmo objectivo, é igualmente conveniente fixar as condições relativas ao transporte;

Considerando que, para garantir o respeito dos requisitos previstos, se revela necessário prever a emissão de um certificado sanitário por um veterinário oficial, destinado a acompanhar os equídeos até ao local de destino;

Considerando que a organização e o seguimento a dar aos controlos efectuados pelo Estado-membro de destino e as medidas de salvaguarda a aplicar devem ser fixados no âmbito da regulamentação a adoptar para os controlos veterinários nas trocas intracomunitárias de animais vivos na perspectiva da realização do mercado interno;

⁽¹⁾ JO n.º C 327 de 30. 12. 1989, p. 61.

⁽²⁾ JO n.º C 149 de 18. 6. 1990.

⁽³⁾ JO n.º C 62 de 12. 3. 1990, p. 46.

▼B

Considerando que é conveniente prever a possibilidade de controlos da Comissão; que esses controlos devem ser efectuados em colaboração com as autoridades nacionais competentes;

Considerando que a definição de um regime comunitário aplicável às importações provenientes de países terceiros pressupõe o estabelecimento de uma lista de países terceiros, ou de partes de países terceiros, a partir dos quais podem ser importados equídeos;

Considerando que a escolha destes países deve ser baseada em critérios de ordem geral, tais como o estado sanitário do gado, a organização e os poderes dos serviços veterinários e a regulamentação sanitária em vigor;

Considerando que além disso importa não autorizar as importações de equídeos provenientes de países infectados, ou indemnes desde há pouco tempo, por doenças contagiosas dos animais que apresentam um risco para o efectivo da Comunidade; que o mesmo se aplica às importações provenientes de países terceiros onde é efectuada vacinação contra essas doenças;

Considerando que as condições gerais aplicáveis às importações provenientes de países terceiros devem ser completadas por condições especiais, estabelecidas em função da situação sanitária de cada um dos mesmos; que o carácter técnico e a diversidade dos critérios em que se devem basear estas condições especiais exigem para a sua definição o recurso a um procedimento comunitário flexível e rápido, no decurso do qual se verifique uma estreita colaboração entre a Comissão e os Estados-membros;

Considerando que, quando da importação de equídeos, a apresentação de um certificado conforme com um modelo comum constitui um dos meios eficazes para verificar a aplicação da regulamentação comunitária; que esta regulamentação pode incluir disposições especiais susceptíveis de variar consoante o país terceiro e que esse facto deve ser tomado em consideração ao estabelecer-se os modelos do certificado;

Considerando que é conveniente encarregar peritos veterinários da Comunidade da verificação, nomeadamente nos países terceiros, do cumprimento dos requisitos da presente directiva;

Considerando que o controlo da importação deve incidir sobre a origem e o estado sanitário dos equídeos;

Considerando que as regras gerais aplicáveis aos controlos a efectuar aquando da importação devem ser definidos num contexto global;

Considerando que qualquer Estado-membro deve ter a possibilidade de proibir imediatamente as importações provenientes de um país terceiro sempre que estas possam apresentar um perigo para a saúde dos animais; que, nesse caso é necessário, sem prejuízo de eventuais alterações da lista dos países autorizados a exportar para a Comunidade, assegurar imediatamente a coordenação da atitude dos Estados-membros em relação a esse país terceiro;

Considerando que as disposições da presente directiva deverão ser revistas no âmbito da realização do mercado interno;

Considerando que é necessário prever um procedimento que institua uma cooperação estreita e eficaz entre os Estados-membros e a Comissão no seio do Comité Veterinário Permanente,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:



CAPÍTULO I

Disposições gerais

Artigo 1.º

A presente directiva define as condições de polícia sanitária que regem a circulação de equídeos entre Estados-membros e as importações de equídeos provenientes de países terceiros.

Artigo 2.º

Para efeitos da presente directiva, entende-se por:

- a) «Exploração»: o estabelecimento agrícola ou de treino, a cavalaria ou, de um modo geral, qualquer local ou instalação em que os equídeos são mantidos ou criados da forma habitual, qualquer que seja a sua utilização;
- b) «Equídeos»: os animais domésticos ou selvagens das espécies equina — incluindo as zebras — e asinina ou animais resultantes dos seus cruzamentos;
- c) «Equídeos registados»: qualquer equídeo registado, tal como definido na Directiva 90/427/CEE ⁽¹⁾, identificado através de um documento de identificação emitido pela autoridade de criação ou qualquer outra autoridade competente do país de origem do equídeo responsável pelo livro genealógico ou pelo registo da raça desse equídeo ou qualquer associação ou organização internacional responsável por cavalos para concursos ou corridas;
- d) «Equídeos de talho»: os equídeos destinados a serem conduzidos ao matadouro, directamente ou após passagem por um mercado ou centro de concentração aprovados, para aí serem abatidos;
- e) «Equídeos de criação e de rendimento»: os equídeos que não os mencionados nas alíneas c) e d);
- f) «Estado-membro ou país terceiro indemne de peste equina»: qualquer Estado-membro ou país terceiro em cujo território nenhuma evidência clínica, serológica (nos equídeos não vacinados) ou epidemiológica permitiu constatar a existência de peste equina durante os últimos dois anos e no qual a vacinação contra esta doença não foi efectuada durante os últimos doze meses;
- g) «Doenças de declaração obrigatória»: as doenças mencionadas no anexo A;
- h) «Veterinário oficial»: o veterinário designado pela autoridade central competente do Estado-membro ou de um país terceiro;
- i) «Admissão temporária»: o estatuto de um equídeo registado proveniente de um país terceiro e autorizado a permanecer no território da Comunidade durante um período inferior a noventa dias, a fixar pela Comissão de acordo com o procedimento previsto no artigo 24.º em função da situação sanitária do país de origem.

⁽¹⁾ JO n.º L 224 de 18. 8. 1990, p. 55.



CAPÍTULO II

Regras para a circulação de equídeos

Artigo 3.º

Um Estado-membro apenas autorizará a circulação de equídeos registados no seu território e apenas expedirá equídeos para o território de outro Estado-membro se estes preencherem as condições previstas nos artigos 4.º e 5.º

Todavia, as autoridades competentes dos Estados-membros de destino podem conceder derrogações gerais ou limitadas para a circulação de equídeos:

- que sejam montados ou conduzidos, para fins desportivos ou recreativos, em estradas que se encontrem na proximidade das fronteiras internas da Comunidade,
- que participem em manifestações culturais ou afins ou em actividades organizadas por organismos locais habilitados situados na proximidade das fronteiras internas da Comunidade,
- destinados exclusivamente ao pasto ou ao trabalho, a título temporário, na proximidade das fronteiras internas da Comunidade.

Os Estados-membros que fizerem uso desta autorização deverão informar a Comissão do teor das derrogações concedidas.

Artigo 4.º

1. Os equídeos não devem apresentar qualquer sintoma clínico de doença aquando da inspecção. A inspecção deve ser efectuada nas quarenta e oito horas anteriores ao embarque ou carregamento dos equídeos. Contudo, para os equídeos registados, esta inspecção, sem prejuízo do artigo 6.º, só é exigida no caso das trocas intracomunitárias.

2. Sem prejuízo dos requisitos previstos no n.º 5 para as doenças de declaração obrigatória, o veterinário oficial deve, durante a inspecção, verificar que nenhum facto — inclusive a partir das declarações do proprietário ou do criador — permite concluir que os equídeos estiveram em contacto com equídeos que apresentem uma infecção ou doença contagiosa no decurso dos quinze dias anteriores à inspecção.

3. Os equídeos não devem ser destinados a eliminação no âmbito de um programa de erradicação de uma doença contagiosa aplicado num Estado-membro.

4. Os equídeos devem ser objecto de uma identificação que deverá ser efectuada:

- i) No que se refere aos cavalos registados, através do documento de identificação previsto na Directiva 90/427/CEE (1), documento esse que deve designadamente comprovar a observância dos n.ºs 5 e 6 do artigo 5.º A validade desse documento deverá ser suspensa pelo veterinário oficial enquanto durarem as proibições previstas no n.º 5 ou no artigo 5.º O documento deverá ser restituído à autoridade que o emitiu após o abate do cavalo registado. As regras de aplicação desta alínea serão adoptadas pela Comissão segundo o procedimento previsto no artigo 24.º;
- ii) No que se refere aos equídeos de criação e de rendimento, segundo um método de identificação a determinar pela Comissão, segundo o procedimento previsto no artigo 24.º

Até se iniciar a aplicação desse método, continuarão a ser aplicáveis os métodos de identificação nacionais oficialmente aprovados, na

(1) JO n.º L 224 de 18. 8. 1990, p. 55.

▼B

condição de serem notificados à Comissão e aos outros Estados-membros no prazo de três meses a contar da data de adopção da presente directiva.

5. Para além do requisito previsto no artigo 5.º, os equídeos não devem provir de uma exploração que seja objecto de uma das seguintes medidas de proibição:

a) Se nem todos os animais das espécies sensíveis à doença presentes na exploração tiverem sido abatidos ou mortos, o período de proibição aplicado à exploração de origem deverá ser pelo menos igual:

- no caso de equídeos suspeitos de tripanosomose, a seis meses a partir da data do último contacto ou possibilidade de contacto com um equídeo doente. Todavia, se se tratar de um animal de cobrição, a proibição deve ser aplicada até à sua castração,
- em caso de mormo ou de encefalomielite equina, a seis meses a partir da data em que os equídeos atingidos tiverem sido eliminados,
- em caso de anemia infecciosa, ao período necessário para que, após a data de eliminação dos equídeos atingidos, os restantes animais reagissem negativamente a dois testes de Coggins efectuados com um intervalo de três meses,
- a seis meses a partir do último caso de estomatite vesicular,
- a um mês, a partir do último caso de raiva verificado,
- a quinze dias a partir do último caso de carbúnculo bacteridiano verificado.

b) Se todos os animais das espécies sensíveis presentes na exploração tiverem sido abatidos ou mortos e as instalações desinfectadas, o período de proibição é de trinta dias, a contar da data em que os animais foram eliminados e as instalações desinfectadas, excepto no caso do carbúnculo bacteridiano, para o qual o período de proibição é de quinze dias.

As autoridades competentes podem estabelecer interrogações a estas medidas de proibição para os hipódromos e terrenos de corrida e informarão a Comissão sobre a natureza das interrogações concedidas.

6. No caso de um Estado-membro estabelecer ou ter estabelecido um programa facultativo ou obrigatório de luta contra uma doença a que os equídeos sejam sensíveis, pode submeter esse programa à Comissão, nos seis meses seguintes à notificação da presente directiva, indicando, nomeadamente:

- a situação da doença no seu território,
- a justificação do programa, tendo em conta a importância da doença e as suas vantagens custos/benefícios,
- a zona geográfica em que o programa vai ser aplicado,
- os diferentes estatutos aplicáveis aos estabelecimentos, as normas que devem ser respeitadas para cada espécie e os processos de testagem,
- os processos de controlo do programa,
- as ilações a tirar da perda do estatuto da exploração, seja por que motivo for,
- as medidas a tomar em caso de resultados positivos verificados em controlos efectuados nos termos do programa,
- o carácter não discriminatório entre as trocas em território do Estado-membro em causa e as trocas intracomunitárias.

Os programas comunicados pelos Estados-membros serão analisados pela Comissão. Se for caso disso, a Comissão aprovará esses programas,

▼B

respeitando os critérios enunciados no parágrafo anterior, de acordo com o processo previsto no artigo 24.º De acordo com o mesmo processo, podem ser indicadas as garantias complementares, gerais ou limitadas, que poderão ser exigidas. Essas garantias devem ser, no máximo, equivalentes às que o Estado-membro aplica no âmbito nacional.

Os programas apresentados pelos Estados-membros podem ser alterados ou completados de acordo com o processo previsto no artigo 25.º De acordo com o mesmo processo, pode ser aprovada uma alteração ou um complemento a um programa anteriormente aprovado e às garantias definidas nos termos do segundo parágrafo deste número.

▼M4*Artigo 5.º*

1. Os Estados-membros não indenes da peste equina, na acepção do alínea f) do artigo 2.º, só poderão expedir equídeos provenientes da parte do território considerada infectada, na acepção do n.º 2 deste artigo, nas condições fixadas no n.º 3 deste artigo.

2. a) Uma parte do território de um Estado-membro será considerada infectada pela peste equina se:

— no decorrer dos dois últimos anos, uma evidência clínica, serológica (em animais não vacinados) e/ou epidemiológica tiver permitido verificar a existência de peste equina,

ou

— no decorrer dos últimos 12 meses, tiver sido feita a vacinação contra a peste equina.

b) A parte do território considerada infectada pela peste equina deve incluir, no mínimo:

— uma zona de protecção com um raio de, pelo menos, 100 quilómetros em redor do foco de infecção,

— uma zona de vigilância com uma extensão mínima de 50 quilómetros para além dos limites da zona de protecção e na qual não tenha sido feita qualquer vacinação no decorrer dos últimos 12 meses.

c) As regras de controlo das medidas de luta relativas aos territórios e zonas a que se referem as alíneas a) e b), assim como as derrogações que lhes digam respeito, serão precisadas na Directiva 92/35/CEE ⁽¹⁾.

d) Todos os equídeos vacinados que se encontrem na zona de protecção devem ser registados e identificados nos termos do n.º 1 do artigo 6.º da Directiva 92/35/CEE.

O documento de identificação e/ou o certificado sanitário devem incluir uma referência clara a essa vacinação.

3. Um Estado-membro só poderá expedir do território referido na alínea b) do n.º 2 os equídeos que satisfaçam as seguintes exigências:

a) Serem expedidos unicamente durante determinados períodos do ano, em função da actividade dos insectos vectores, a fixar pelo processo previsto no artigo 25.º;

b) Não apresentarem qualquer sinal clínico de peste equina no dia da inspecção referida no n.º 1 do artigo 4.º;

c) — caso não tenham sido vacinados contra a peste equina, terem sido submetidos e reagido negativamente, por duas vezes, a um teste de fixação do complemento para a peste equina descrito no anexo D, com um intervalo compreendido entre 21 e 30 dias,

⁽¹⁾ JO n.º L 157 de 10. 6. 1992, p. 19

▼M4

devendo o segundo teste ter sido efectuado nos 10 dias anteriores à expedição,

- caso tenham sido vacinados, a vacinação não se ter realizado durante os dois últimos meses e terem sido submetidos ao teste de fixação descrito no anexo D, com os intervalos acima referidos, sem que se tenha verificado um aumento de anticorpos. De acordo com o processo previsto no artigo 24.º, a Comissão, após parecer do Comité científico veterinário, pode reconhecer outros métodos de controlo;
- d) Terem sido mantidos num centro de quarentena durante um período mínimo de 40 dias antes da expedição;
- e) Terem sido protegidos dos insectos vectores durante o período de quarentena e de transporte do centro de quarentena para o local de expedição.

▼B*Artigo 6.º*

Os Estados-membros que aplicam um regime alternativo de controlo que oferece garantias equivalentes às previstas no n.º 5 do artigo 4.º para a circulação no seu território de equídeos e de equídeos registados, nomeadamente por meio do documento de identificação, podem conceder mutuamente, numa base de reciprocidade, uma derrogação ao n.º 1, segunda frase, do artigo 4.º e ao n.º 1, segundo travessão do artigo 8.º

Do facto informarão a Comissão.

Artigo 7.º

1. Os equídeos devem ser conduzidos, no mais curto espaço de tempo, da exploração de proveniência para o local de destino, quer directamente quer após passagem por um mercado ou centro de concentração aprovados tal como definidos no n.º 6 do artigo 3.º da Directiva 64/432/CEE, num meio de transporte e num espaço regularmente limpos e desinfectados com um desinfectante e segundo uma frequência a definir pelo Estado-membro de expedição. Os veículos de transporte devem ser construídos de modo a que as fezes, as camas de palha ou as forragens dos equídeos não possam verter ou cair para fora do veículo durante o transporte. O transporte deve ser efectuado de forma a assegurar uma protecção sanitária eficaz e o bem-estar dos equídeos.

2. O Estado-membro de destino pode, de uma maneira geral ou limitada, conceder uma derrogação a alguns dos requisitos do n.º 5 do artigo 4.º, desde que o animal apresente uma marca particular esclarecendo que se destina a abate e que o certificado sanitário faça referência a essa derrogação.

Em caso de concessão de tal derrogação, os equídeos para abate devem ser conduzidos directamente ao matadouro designado, para serem abatidos num prazo não superior a cinco dias após a chegada ao matadouro.

3. O veterinário oficial deve anotar num registo o número de identificação ou o número do documento de identificação do equídeo abatido e enviar à autoridade competente do local de expedição, a pedido desta, uma certidão que ateste o abate do equídeo.

Artigo 8.º

1. Os Estados-membros velarão por que:
- os equídeos registados sejam acompanhados, ao abandonarem a exploração respectiva, do documento de identificação previsto no n.º 4 do artigo 4.º e, se se destinarem às trocas intracomunitárias,

▼B

desse documento de identificação completado pelo atestado previsto no anexo B,

- os equídeos de criação, rendimento ou de talho sejam acompanhados, durante o transporte, de um certificado de inspecção sanitária em conformidade com o anexo C.

O certificado ou, no caso de um documento de identificação, o boletim que contém as informações sanitárias devem ser emitidos — sem prejuízo do artigo 6.º — nas quarenta e oito horas ou, o mais tardar, no último dia útil antes do embarque, na ou nas línguas oficiais do Estado-membro de expedição e de destino. A validade do certificado é de dez dias. O certificado deve consistir num só folha.

2. As importações de equídeos que não os equídeos registados podem ser efectuadas ao abrigo de apenas um certificado sanitário por lote, em vez de certificado individual a que se refere o segundo travessão do n.º 1.

▼M1*Artigo 9.º*

São aplicáveis as regras previstas na Directiva 90/425/CEE do Conselho, de 26 de Junho de 1990, relativa aos controlos veterinários aplicáveis ao comércio intracomunitário de certos animais vivos e produtos, na perspectiva da realização do mercado interno⁽¹⁾, nomeadamente no que se refere aos controlos na origem, à organização e ao seguimento a dar aos controlos a efectuar pelo Estado-membro de destino, e às medidas de salvaguarda a tomar.

▼B*Artigo 10.º*

Os peritos veterinários da Comissão podem, na medida em que tal seja necessária à aplicação uniforme da presente directiva e em colaboração com as autoridades nacionais competentes, efectuar controlos no local. A Comissão informará os Estados-membros do resultado dos controlos efectuados.

O Estado-membro em cujo território for efectuado tal controlo fornecerá aos peritos todo o apoio necessário para a realização da sua missão.

As regras de aplicação do presente artigo serão fixadas de acordo com o procedimento previsto no artigo 24.º

CAPÍTULO III

Regras para as importações provenientes de países terceiros*Artigo 11.º*

1. Os equídeos importados na Comunidade devem satisfazer as condições enunciadas nos artigos 12.º a 16.º

2. Até à data de entrada em vigor das decisões pertinentes adoptadas em aplicação dos artigos 12.º a 16.º, os Estados-membros aplicarão às importações de equídeos provenientes de países terceiros condições pelo menos equivalentes às que resultam da aplicação do capítulo II.

⁽¹⁾ JO n.º L 224 de 18. 8. 1990, p. 29.

▼M8

Artigo 12.º

1. A importação de equídeos na Comunidade apenas será autorizada quando estes forem provenientes dos países terceiros constantes de uma lista ou listas a estabelecer ou a alterar de acordo com o procedimento previsto no n.º 2 do artigo 24.º

Tendo em conta a situação sanitária e as garantias apresentadas pelo país terceiro no que diz respeito aos equídeos, pode ser decidido, de acordo com o procedimento previsto no n.º 2 do artigo 24.º, que a autorização prevista no primeiro parágrafo do presente número seja aplicável à totalidade do território do país terceiro ou apenas a parte deste.

Para esse fim, será tida em conta a forma como o país terceiro aplica e executa, no seu próprio território, as normas internacionais correspondentes, nomeadamente o princípio da regionalização, em função dos requisitos sanitários relativos às importações provenientes de outros países terceiros e da Comunidade.

2. Ao estabelecer ou alterar as listas previstas no n.º 1, serão tidas em conta, nomeadamente:

- a) O estado sanitário dos equídeos, dos outros animais domésticos e da fauna selvagem no país terceiro, dando especial atenção às doenças animais exóticas e a todos os aspectos da situação sanitária ambiental geral do país terceiro, na medida em que possa constituir um risco para a situação sanitária e ambiental da Comunidade;
- b) A legislação do país terceiro em matéria de saúde e bem-estar dos animais;
- c) A organização da autoridade veterinária competente e dos respectivos serviços de inspecção, os poderes desses serviços, a supervisão de que são alvo e os recursos de que dispõem, nomeadamente em termos de pessoal e de capacidade laboratorial, para aplicar eficazmente a legislação nacional;
- d) As garantias que a autoridade veterinária competente do país terceiro pode fornecer quanto ao cumprimento das condições de saúde animal pertinentes aplicáveis na Comunidade ou à aplicação de condições equivalentes;
- e) Se o país terceiro é membro da Organização Internacional das Epizootias (OIE), e a regularidade e rapidez com que fornece informações relativamente à existência de doenças infecciosas ou contagiosas dos equídeos no seu território, em especial das doenças repertoriadas pela OIE e no anexo A da presente directiva;
- f) As garantias fornecidas pelo país terceiro de informar directamente a Comissão e os Estados-Membros:
 - i) no prazo de 24 horas, da confirmação da ocorrência de doenças infecciosas dos equídeos enumeradas no anexo A e de qualquer alteração na política de vacinação relativa a essas doenças,
 - ii) num prazo adequado, de qualquer proposta de alteração das normas sanitárias nacionais relativas aos equídeos, nomeadamente, no que respeita à sua importação,
 - iii) a intervalos regulares, do estatuto zoossanitário do seu território no tocante aos equídeos;
- g) Toda a experiência adquirida com importações de equídeos vivos provenientes do país terceiro e os resultados dos controlos eventualmente efectuados à importação;
- h) Os resultados das inspecções e/ou auditorias comunitárias efectuadas no país terceiro, em especial os resultados da avaliação das autoridades competentes ou, sempre que a Comissão o solicite, o relatório

▼M8

apresentado pelas autoridades competentes sobre as inspecções que efectuaram;

- i) o teor das normas em vigor no país terceiro em matéria de prevenção e combate às doenças animais infecciosas ou contagiosas e a respectiva execução, incluindo as normas aplicáveis às importações de equídeos provenientes de outros países terceiros.

3. A Comissão deverá tomar as disposições necessárias para que sejam facultadas ao público versões actualizadas de todas as listas estabelecidas ou alteradas nos termos do n.º 1.

Essas listas podem ser combinadas com outras listas elaboradas para fins de protecção da saúde animal e da saúde pública e podem também incluir modelos de certificados sanitários.

4. Deverão ser estabelecidas condições especiais de importação para cada país terceiro ou grupo de países terceiros de acordo com o procedimento previsto no n.º 2 do artigo 24.º, tendo em conta a respectiva situação zoossanitária no que se refere aos equídeos.

5. As regras de execução do presente artigo e os critérios para a inclusão de países terceiros ou partes de países terceiros nas listas previstas no n.º 1 poderão ser adoptados, de acordo com o procedimento previsto no n.º 2 do artigo 24.º

▼B*Artigo 13.º*

1. Os equídeos devem provir de países terceiros:

- a) Indemnes da peste equina;
- b) Indemnes desde há dois anos da encefalomielite equina venezuelana (VEE);
- c) Indemnes desde há seis meses da tripanosomose e do mormo.

2. A Comissão, agindo de acordo com o procedimento previsto no artigo 24.º, pode:

- a) Decidir que o n.º 1 apenas se aplica a uma parte do território de um país terceiro.

No caso de regionalização dos requisitos relativos à peste equina, devem ser no mínimo respeitadas as medidas previstas nos n.ºs 2 e 3 do artigo 5.º;

- b) Exigir garantias adicionais em relação a doenças exóticas na Comunidade.

Artigo 14.º

Antes da data do seu embarque com vista a expedição para o Estado-membro de destino, os equídeos devem ter permanecido, sem interrupção, no território ou numa parte do território de um país terceiro ou, em caso de regionalização, na parte do território definida em aplicação do n.º 2, alínea a), do artigo 13.º, durante um período a fixar aquando da adopção das decisões a tomar em aplicação do artigo 15.º

Os equídeos devem provir de uma exploração colocada sob controlo veterinário.

Artigo 15.º

A importação de equídeos do território de um país terceiro, ou de uma parte do território de um país terceiro definida nos termos do n.º 2 alínea a), do artigo 13.º constante da lista elaborada nos termos do n.

▼B

o 1 do artigo 12.º, só será autorizada se, para além dos requisitos do artigo 13.º;

- a) Os equídeos em questão satisfizerem as condições sanitárias adoptadas, segundo o procedimento previsto no artigo 24.º, para as importações de equídeos desse país em função da espécie em causa e das categorias de equídeos.

Para fixar as condições de polícia sanitária em conformidade com o parágrafo anterior, a referência de base a utilizar é a das normas previstas nos artigos 4.º e 5.º; e

- b) Sempre que se trate de países terceiros não indemnes de estomatite vesicular ou de arterite viral durante pelo menos seis meses, os equídeos satisfizerem os requisitos seguintes:

- i) Os equídeos devem provir de uma exploração indemne de estomatite vesicular desde há pelo menos seis meses e ter reagido negativamente a um teste serológico antes da sua expedição;
- ii) Para a arterite viral, os equídeos machos devem ter reagido negativamente — sem prejuízo da alínea ii) do artigo 19.º — a um teste serológico ou a um vírus de isolamento ou a qualquer outro teste aprovado nos termos do procedimento do artigo 24.º, que garanta que o animal se encontra indemne dessa doença.

A Comissão agindo nos termos do procedimento previsto no artigo 24.º, e após parecer do Comité Veterinário Científico, pode delimitar as categorias de equídeos machos a que esta exigência será aplicável.

Artigo 16.º

1. Os equídeos devem ser identificados nos termos do n.º 4 do artigo 4.º, e ser acompanhados de um certificado passado por um veterinário oficial do país terceiro exportador. O certificado deve:

- a) Ser emitido no dia do carregamento dos equídeos com vista à expedição para o Estado-membro de destino, ou no caso de cavalos registados, no último dia útil antes do embarque;
- b) Ser redigido pelo menos numa das línguas oficiais do Estado-membro de destino e numa das do Estado-membro onde se efectua o controlo da importação;
- c) Acompanhar os equídeos no seu exemplar original;
- d) Atestar que os equídeos satisfazem as condições previstas pela presente directiva e as fixadas em aplicação da mesma para a importação proveniente do país terceiro;
- e) Ser constituído de uma única folha;
- f) Ser previsto para um único destinatário ou, no caso de equídeos para abate, para um lote devidamente marcado e identificado.

Os Estados-membros informarão a Comissão no caso de fazerem uso dessa possibilidade.

2. Este certificado deve ser redigido num formulário conforme com o modelo elaborado de acordo com o procedimento previsto no artigo 24.º

Artigo 17.º

Serão efectuados controlos no local por peritos veterinários dos Estados-membros e da Comissão, a fim de verificar a efectiva aplicação das disposições da presente directiva e, nomeadamente, as do n.º 2 do artigo 12.º

▼B

Se, durante uma inspecção efectuada em aplicação do presente artigo, forem constatados factos graves contra uma exploração, a Comissão informará imediatamente os Estados-membros desse facto e adoptará imediatamente uma decisão que inclua a suspensão provisória da aprovação. Será tomada uma decisão definitiva a este respeito de acordo com o procedimento previsto no artigo 25.º

Os peritos dos Estados-membros encarregados dos controlos são nomeados pela Comissão sob proposta dos Estados-membros.

Os controlos são efectuados por conta da Comunidade, que assume as despesas correspondentes.

A periodicidade e as modalidades dos controlos são determinadas de acordo com o procedimento previsto no artigo 24.º

Artigo 18.º

1. À chegada ao Estado-membro de destino, os equídeos para abate devem ser conduzidos a um matadouro, directamente ou após passagem por um mercado ou por um centro de concentração e, em conformidade com as exigências de polícia sanitária, ser abatidos num prazo a fixar aquando da adopção das decisões a tomar em aplicação do artigo 15.º

2. Sem prejuízo das condições especiais eventualmente fixadas de acordo com o procedimento previsto no artigo 24.º, a autoridade competente do Estado-membro de destino pode, devido a requisitos de polícia sanitária, designar o matadouro para o qual devem ser encaminhados estes equídeos.

Artigo 19.º

A Comissão, agindo de acordo com o procedimento previsto no artigo 24.º:

- i) Pode limitar a importação proveniente de um país terceiro, ou de uma parte de um país terceiro, a espécies ou categorias especiais de equídeos;
- ii) Define, em derrogação ao artigo 15.º, as condições especiais em que se pode efectuar a admissão temporária no território da Comunidade ou a reintrodução nesse território após exportação temporária de equídeos registados ou de equídeos destinados a utilizações especiais;
- iii) Determina as condições que permitem converter uma admissão temporária em admissão definitiva;

▼M8

- iv) pode designar um laboratório comunitário de referência para uma ou mais das doenças dos equídeos mencionada(s) no anexo A e definir as funções, tarefas e procedimentos para a colaboração com os laboratórios encarregados de diagnosticar doenças infecciosas dos equídeos nos Estados-Membros.

▼M2

▼B

CAPÍTULO IV

Disposições finais*Artigo 22.º*

As disposições da presente directiva e, nomeadamente, as do n.º 1, segunda frase do artigo 4.º e dos artigos 6.º, 8.º e 21.º, serão objecto de reanálise antes de 1 de Janeiro de 1993, no âmbito das propostas destinadas a assegurar a realização do mercado interno e sobre as quais o Conselho se pronunciará por maioria qualificada.

Artigo 23.º

Os anexos da presente directiva serão alterados pela Comissão de acordo com o procedimento previsto no artigo 25.º

▼M7*Artigo 24.º*

1. A Comissão é assistida pelo Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal, instituído pelo artigo 58.º do Regulamento (CE) n.º 178/2002 ⁽¹⁾.

2. Sempre que se faça referência ao presente artigo, são aplicáveis os artigos 5.º e 7.º da Decisão 1999/468/CE ⁽²⁾.

O prazo previsto no n.º 6 do artigo 5.º da Decisão 1999/468/CE é de três meses.

3. O comité aprovará o seu regulamento interno.

Artigo 25.º

1. A Comissão é assistida pelo Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal.

2. Sempre que se faça referência ao presente artigo, são aplicáveis os artigos 5.º e 7.º da Decisão 1999/468/CE.

O prazo previsto no n.º 6 do artigo 5.º da Decisão 1999/468/CE é de 15 dias.

▼B*Artigo 26.º*

O artigo 34.º da Directiva 72/462/CEE é aplicável aos requisitos previstos no capítulo III da presente directiva.

Artigo 27.º

Os Estados-membros porão em vigor as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva, o mais tardar em 1 de Janeiro de 1992. Desse facto informarão a Comissão.

⁽¹⁾ JO L 31 de 1.2.2002, p. 1.

⁽²⁾ JO L 184 de 17.7.1999, p. 23 (Rectificação: JO L 269 de 19.10.1999, p. 45).

▼B

Artigo 28.º

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

▼B

ANEXO A

DOENÇAS CUJA DECLARAÇÃO É OBRIGATÓRIA

As seguintes doenças estão sujeitas a uma declaração obrigatória:

- tripanosomose dos equídeos,
- mormo,
- encefalomielite equina (sob todas as formas incluindo a VEE),
- anemia infecciosa,
- raiva,
- carbúnculo bacteridiano,
- peste equina,
- estomalite vesicular.

▼ M3

ANEXO B

INFORMAÇÕES SANITÁRIAS⁽¹⁾

Passaporte nº

Eu, abaixo assinado, certifico ⁽²⁾ que o equídeo anteriormente indicado satisfaz as seguintes condições :

- a) Foi examinado nesta data e não apresenta qualquer sinal clínico de doença ;
- b) Não é destinado ao abate no âmbito de um programa de erradicação de uma doença contagiosa aplicado no Estado-membro ;
- c) — não provém do território ou de uma parte do território de um Estado-membro/país terceiro objecto de medidas restritivas devido à peste equina ⁽³⁾ ou provém do território ou de uma parte do território de um Estado-membro objecto de medidas restritivas devido à peste equina e foi submetido, com resultados satisfatórios, na estação de quarentena de, entre e, aos testes previstos no nº 3 do artigo 5º da Directiva 90/426/CEE ⁽⁴⁾ ;
- não foi vacinado contra a peste equina ou foi vacinado contra a peste equina em ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾ ;
- d) Não é proveniente de uma exploração objecto de medidas de proibição por motivos de polícia sanitária e não esteve em contacto com equídeos de uma exploração objecto de uma proibição por motivos de polícia sanitária :
- no caso dos equídeos suspeitos de terem tripanosomose, nos seis meses a contar da data do último contacto ou da possibilidade de contacto com um equídeo doente. No entanto, caso se trate de um macho reprodutor, a proibição deve ser aplicada até à sua castração,
- no caso do mormo ou da encefalomielite equina, nos seis meses a contar da data em que foram eliminados os equídeos atingidos,
- no caso da anemia infecciosa, no período necessário para que, a partir da data em que foram eliminados os equídeos atingidos, os restantes animais tenham reagido negativamente a dois testes Coggins efectuados com um intervalo de três meses,
- no caso da estomatite vesiculosa, nos seis meses a contar do último caso,
- no caso da raiva, no mês a contar do último caso,
- no caso do carbúnculo bacteridiano, nos 15 dias a contar do último caso,
- no caso de todos os animais de espécies sensíveis presentes na exploração terem sido abatidos ou mortos e os locais desinfectados, nos 30 dias a contar da data de eliminação dos animais e de desinfectação dos locais, excepto no caso do carbúnculo bacteriano, relativamente ao qual a proibição é de 15 dias ;
- e) O equídeo, tanto quanto me é dado conhecer, não esteve em contacto com equídeos atingidos por uma doença ou infecção contagiosa durante os últimos 15 dias;
- ⁽⁷⁾ f) Quando da inspecção, os animais supramencionados estavam aptos para serem transportados na viagem prevista, em conformidade com as disposições da Directiva 91/628/CEE ⁽⁸⁾ . ◀

Data	Local	Carimbo e assinatura do veterinário oficial ⁽⁹⁾

⁽¹⁾ Apelido em maiúsculas e qualidade.⁽²⁾ Estas informações não são exigidas em caso de acordo bilateral concluído nos termos do artigo 6º da Directiva 90/426/CEE.⁽³⁾ Válido por 10 dias.⁽⁴⁾ Riscar a menção inútil.⁽⁵⁾ A menção da vacinação deve constar do passaporte.⁽⁶⁾ A presente declaração não isenta os transportadores das suas obrigações em conformidade com as disposições comunitárias em vigor, nomeadamente no que diz respeito à aptidão dos animais para serem transportados.► ⁽¹⁾ M5

▼ M3

ANEXO C

MODELO

CERTIFICADO SANITÁRIO

para o comércio entre os Estados-membros da CEE

EQUÍDEOS

Nº

Estado-membro expedidor

Ministério competente

Serviço territorial competente

I. Número de equídeos

II. Identificação dos equídeos

Número de equídeos ⁽¹⁾	Espécies cavalos, burros, muares	Raça Idade Sexo	Método de identificação e identificação ⁽²⁾

⁽¹⁾ Caso se trate de animais para abate, indicar a natureza da marca especial.⁽²⁾ Pode ser junto ao presente certificado um documento de identificação do equídeo, desde que seja indicado o seu número.

III. Origem e destino do equídeo/dos equídeos

O equídeo/os equídeos é/são expedido(s):

de

(local de expedição)

para

(Estado-membro e local de destino)

Nome e endereço do expedidor

Nome e endereço do destinatário

IV. Informações sanitárias^(*)

Eu, abaixo assinado, certifico que o equídeo/os equídeos anteriormente indicado(s) satisfaz(em) as seguintes condições:

1. Foi/foram examinado(s) nesta data e não apresenta(m) qualquer sinal clínico de doença.
2. Não é/ não são destinado(s) ao abate no âmbito de um programa de erradicação de uma doença contagiosa aplicado no Estado-membro.

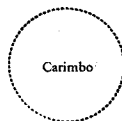
^(*) Estas informações não são exigidas em caso de acordo bilateral concluído nos termos do artigo 6º da Directiva 90/426/CEE.

▼ M3

3. — não provém/não provém do território ou de uma parte do território de um Estado-membro/país terceiro objecto de medidas restritivas devido à peste equina ou
- provém/provém do território ou de uma parte do território de um Estado-membro objecto de medidas restritivas devido à peste equina e foi/foram submetido(s), com resultados satisfatórios, na estação de quarentena de entre e aos testes previstos no n.º 3 do artigo 5.º da Directiva 90/426/CEE (1),
 - não foi/não foram vacinado(s) contra a peste equina ou
 - foi/foram vacinado(s) contra a peste equina em (2).
4. Não é/não são proveniente(s) de uma exploração objecto de medidas de proibição por motivos de polícia sanitária e não esteve/não estiveram em contacto com equídeos de uma exploração objecto de uma proibição por motivos de polícia sanitária :
- no caso dos equídeos suspeitos de terem tripanosomose, nos seis meses a contar da data do último contacto ou da possibilidade de contacto com um equídeo doente. No entanto, caso se trate de um macho reprodutor, a proibição deve ser aplicada até à sua castração,
 - no caso do mormo ou da encefalomielite equina, nos seis meses a contar da data em que foram eliminados os equídeos atingidos,
 - no caso da anemia infecciosa, no período necessário para que, a partir da data em que foram eliminados os equídeos atingidos, os restantes animais tenham reagido negativamente a dois testes Coggins efectuados com um intervalo de três meses,
 - no caso da estomatite vesiculosa, nos seis meses a contar do último caso,
 - no caso da raiva, no mês a contar do último caso,
 - no caso do carbúnculo bacteriano, nos 15 dias a contar do último caso,
 - no caso de todos os animais de espécies sensíveis presentes na exploração terem sido abatidos ou mortos e os locais desinfectados, nos 30 dias a contar da data de eliminação dos animais e de desinfectação dos locais, excepto no caso do carbúnculo bacteriano, relativamente ao qual a proibição é de 15 dias.
5. O equídeo/os equídeos, tanto quanto me é dado conhecer, não esteve/não estiveram em contacto com equídeos atingidos por uma doença ou infecção contagiosa durante os últimos 15 dias.
- (2) 6. Aquando da inspecção, os animais supramencionados estavam aptos para serem transportados na viagem prevista, em conformidade com as disposições da Directiva 91/628/CEE (3). ◀

V. O presente certificado é válido por 10 dias.

Feito em, em



.....
(Assinatura)
(Apelido em letras maiúsculas e qualidade do veterinário) (4)

(1) Riscar a menção inútil.

(2) Na RF da Alemanha "Beamteter Tierarzt"; na Bélgica, "Inspecteur vétérinaire" ou "Inspecteur Dierenarts"; em França "Vétérinaire officiel"; em Itália, "Veterinario ufficiale"; no Luxemburgo, "Inspecteur vétérinaire"; nos Países Baixos, "Officier Dierenarts"; na Dinamarca, "Embedsdyrlæge"; na Irlanda, "Veterinary Inspector"; no Reino Unido, "Veterinary Inspector"; na Grécia, "Επίσημος κτηνίατρος"; em Espanha "Inspector Veterinario"; em Portugal, "Inspector veterinário"; (3) na Austria "Amtstierarzt"; na Finlândia "kunnaneläinlääkäri" ou "kaupungineläinlääkäri" ou "läänineläinlääkäri"; "kommunalveterinär" ou "stadsveterinär" ou "länsveterinär"; na Suécia "länsveterinär", "distriktsveterinär" ou "gränsveterinär"; (4) na República Checa "veterinární inspektor"; na Estónia "veterinaarjärelevalve ametnik"; em Chipre "Επίσημος Κτηνίατρος"; na Letónia "veterināris inspektors"; na Lituânia "veterinarijos inspektorius"; na Hungria "hatóság állatorvos"; em Malta "veterinarju ufficjali"; na Polónia "urzędowy lekarz weterynarii"; na Eslovénia "veterinarski inspektor"; na Eslováquia "veterinárny inspektor"; (5) na Bulgária "ветеринарен инспектор"; na Roménia "medic veterinar autorizat". ◀

(6) A presente declaração não isenta os transportadores das suas obrigações em conformidade com as disposições comunitárias em vigor, nomeadamente no que diz respeito à aptidão dos animais para serem transportados.

► (1) A1

► (2) M5

► (3) A2

► (4) M9

▼ **M6**

ANEXO D
PESTE EQUINA
DIAGNÓSTICO

Os reagentes a utilizar no ensaio imunoenzimático (ELISA) seguidamente descrito podem ser solicitados ao laboratório de referência da Comunidade Europeia ou aos laboratórios de referência do OIE para a peste equina.

1. ENSAIO ELISA COMPETITIVO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA PESTE EQUINA (AHSV) (ENSAIO RECOMENDADO)

O ensaio ELISA competitivo é utilizado para a detecção de anticorpos específicos de AHSV no soro de quaisquer espécies de equídeos. O imunossoro de cobaia anti-AHSV (adiante referenciado por «antissoro de cobaia»), de espectro largo e policlonal, é específico do serogrupo, sendo adequado à detecção de todos os serótipos do vírus AHS.

O princípio do ensaio consiste na competição entre um antissoro de cobaia e a amostra do soro em análise para o antígeno AHSV. Os anticorpos anti-AHSV da amostra de soro em análise competem com os anticorpos do antissoro de cobaia, resultando numa redução da coloração esperada por adição de anticorpo anti-cobaia marcado com enzima e de substrato. Podem utilizar-se soros com uma diluição única de 1: 5 (método de ensaio pontual) ou, em alternativa, diluir-se sucessivamente a amostra para determinar o título final (método de titulação do soro). São considerados positivos os valores de inibição superiores a 50 %.

O protocolo a seguir descrito é utilizado pelo laboratório regional de referência para a peste equina, em Pirbright, no Reino Unido.

1.1. **Procedimento**

1.1.1. *Preparação das placas*

1.1.1.1. Revestir placas ELISA com antígeno AHSV extraído de culturas de células infectadas diluído em tampão carbonato-bicarbonato a pH 9,6. Incubar as placas ELISA de um dia para o outro a 4 °C.

1.1.1.2. Lavar as placas três vezes, enchendo e esvaziando os alvéolos com tampão fosfato (PBS) a pH 7,2-7,4 e secar invertendo a placa sobre papel absorvente.

1.1.2. *Alvéolos-testemunha*

1.1.2.1. Distribuir ao longo da coluna 1 diluições sucessivas de 1: 2 a partir da diluição inicial, de 1: 5 até 1: 640, dos soros-testemunha positivos em tampão de bloqueio [PBS com 0,05 % (v/v) de Tween-20, 50 % (m/v) de leite em pó desnatado (Cadbury's MarvelTM) e 1 % (v/v) de soro de bovino adulto], de forma a obter um volume final de 50 µl/alvéolo.

1.1.2.2. Adicionar 50 µl de soro-testemunha negativo diluído a 1: 5 (10 µl de soro + 40 µl de tampão de bloqueio) aos alvéolos A e B da coluna 2.

1.1.2.3. Adicionar, por alvéolo, 100 µl de tampão de bloqueio nos alvéolos C e D da coluna 2 (branco).

1.1.2.4. Distribuir 50 µl de tampão de bloqueio nos alvéolos E, F, G e H da coluna 2 (testemunha de cobaia).

1.1.3. *Método de ensaio pontual (diluição única da amostra)*

1.1.3.1. Distribuir em duas séries de alvéolos das colunas 3 a 12 diluições a 1: 5 de cada soro em tampão de bloqueio (10 µl soro em análise + 40 µl tampão de bloqueio).

ou

1.1.4. *Método de titulação do soro (diluição seriada)*

1.1.4.1. Distribuir, em oito alvéolos de cada uma das colunas 3 a 12, diluições sucessivas para metade (de 1: 5 a 1: 640) de cada amostra em tampão de bloqueio.

seguidamente

▼ **M6**

- 1.1.5. Adicionar 50 µl de anti-soro de cobaia, previamente diluído com tampão de bloqueio, a todos os alvéolos da placa ELISA, com excepção dos alvéolos correspondentes ao ensaio em branco (desta forma, todos os alvéolos deverão conter um volume final de 100 µl).
 - 1.1.5.1. Incubar a 37 °C durante uma hora, utilizando um agitador orbital.
 - 1.1.5.2. Lavar as placas três vezes e secar do modo descrito anteriormente.
 - 1.1.5.3. Adicionar a cada alvéolo 50 µl de anticorpo de coelho anti-cobaia conjugado com peroxidase de rábano (HRP), previamente diluído em tampão de bloqueio.
 - 1.1.5.4. Incubar a 37 °C durante uma hora, utilizando um agitador orbital.
 - 1.1.5.5. Lavar as placas três vezes e secar do modo descrito anteriormente.
- 1.1.6. *Cromogénio*

Preparar a solução de cromogénio (OPD = orto-fenildiamina) de acordo com as instruções dos fabricantes (0,4 mg/ml em água destilada estéril), imediatamente antes da utilização. Adicionar substrato (peróxido de hidrogénio = H₂O₂) de forma a obter uma concentração final de 0,05 % (v/v) (1: 2000 numa solução de H₂O₂ a 30 %), no caso de uma solução a 30 %. Adicionar 50 µl de solução de OPD a cada alvéolo e deixar as placas durante 10 minutos à temperatura ambiente. Suspender a reacção por adição a cada alvéolo de 50 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M.

- 1.1.7. *Determinações espectrofotométricas*

Efectuar as determinações espectrofotométricas da densidade óptica (DO) a 492 nm.

1.2. Expressão dos resultados

- 1.2.1. Com recurso a um programa informático, obter os valores de DO e as percentagens de inibição (PI) correspondentes aos soros em análise e aos soros-testemunha, com base nos valores médios referentes aos quatro alvéolos com soro-testemunha de cobaia. Os valores de DO e PI são utilizados para determinar se os resultados dos ensaios se situam num intervalo aceitável. Os valores extremos (superior e inferior) de DO dos soros-testemunha de cobaia situam-se entre 1,4 e 0,4, respectivamente. Para uma PI de 50 %, o título final da testemunha positiva deverá ser de 1: 240 (variação de 1: 120 a 1: 480). As placas que não sejam conformes aos referidos critérios deverão ser rejeitadas. Todavia, se o título do soro-testemunha positivo exceder 1: 480 e as amostras em análise permanecerem negativas, são aceitáveis as amostras em análise negativas.

Ambos os alvéolos com soro-testemunha negativo e ambos os alvéolos correspondentes ao ensaio em branco deverão apresentar valores de PI compreendidos entre + 25 % e - 25 %, e entre + 95 e + 105 %, respectivamente. Se tal não suceder, não deverá rejeitar-se a placa, havendo contudo que ter em conta a possibilidade de estar a desenvolver-se uma coloração de fundo.

- 1.2.2. O limite positivo (*cut-off*) para os soros em análise é de 50 % (PI = 50 %). As amostras que apresentem valores de PI superiores a 50 % são consideradas positivas; as amostras que apresentem valores de PI inferiores a 50 % são consideradas negativas.

As amostras que apresentem, nos alvéolos repetidos, valores de PI superiores e inferiores ao limiar são consideradas duvidosas, podendo ser objecto de nova análise pelo método de ensaio pontual e por titulação. Poderão também titular-se as amostras positivas, de forma a obter indicações quanto ao grau de positividade.

▼M6

Representação esquemática do ensaio pontual

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ ve. Cont.		Soros em análise									
A	1:5	– ve. Cont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
B	1:10	– ve. Cont.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	1:20	Branco										
D	1:40	Branco										
E	1:80	GP Cont.										
F	1:160	GP Cont.										
G	1:320	GP Cont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	1:640	GP Cont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

– ve. Cont. = testemunha negativa
+ ve. Cont. = testemunha positiva
GP Cont. = testemunha de cobaia

Representação esquemática do método de titulação sérica

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ ve. Cont.		Soros em análise									
A	1:5	– ve. Cont.	1:5									1:5
B	1:10	– ve. Cont.	1:10									1:10
C	1:20	Branco	1:20									1:20
D	1:40	Branco	1:40									1:40
E	1:80	GP Cont.	1:80									1:80
F	1:160	GP Cont.	1:160									1:160
G	1:320	GP Cont.	1:320									1:320
H	1:640	GP Cont.	1:640									1:640

– ve. Cont. = testemunha negativa
+ ve. Cont. = testemunha positiva
GP Cont. = testemunha de cobaia

2. ENSAIO ELISA INDIRECTO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA PESTE EQUINA (AHSV) (MÉTODO RECOMENDADO)

O ensaio seguidamente descrito é conforme à descrição apresentada no ponto 2.1.11 do Manual de normas para ensaios de diagnóstico e vacinas do OIE (quarta edição, 2000).

A proteína recombinante VP7 tem sido utilizada como antigénio para a determinação de anticorpos contra o vírus AHS com um elevado grau de sensibilidade e especificidade. O facto de a proteína em causa ser estável e não ser infecciosa constitui outra vantagem.

2.1. Procedimento

2.1.1. Fase sólida

2.1.1.1. Revestir as placas ELISA com proteína recombinante VP7 de AHSV-4 diluída em tampão de carbonato/bicarbonato a pH 9,6. Incubar as placas de um dia para o outro a 4 °C.

▼ **M6**

- 2.1.1.2. Lavar as placas cinco vezes com água destilada contendo 0,01 % (v/v) de Tween 20 (solução de lavagem). Inverter e bater levemente com as placas num material absorvente, para a remoção de resíduos da solução de lavagem.
- 2.1.1.3. Bloquear as placas mediante a adição a cada alvéolo de 200 µl de PBS com 5 % (m/v) de leite desnatado (leite em pó desnatado Nestlé™, incubando a 37 °C durante uma hora.
- 2.1.1.4. Remover a solução de bloqueio; inverter e bater levemente com as placas num material absorvente.

2.1.2. *Amostras em análise*

- 2.1.2.1. Diluir as amostras de soro em análise, bem como os soros das testemunhas positiva e negativa, na proporção 1: 25, em PBS + 5 % (m/v) leite desnatado + 0,05 % (v/v) Tween 20, adicionando 100 µl a cada alvéolo. Incubar a 37 °C durante uma hora.

Preparar nos alvéolos de cada coluna (100 µl/alvéolo) diluições sucessivas para metade de cada soro (diluição inicial 1: 25), procedendo da mesma forma com as testemunhas positiva e negativa. Incubar a 37 °C durante uma hora.

- 2.1.2.2. Lavar as placas do modo descrito em 2.1.1.2.

2.1.3. *Conjugado*

- 2.1.3.1. Distribuir por cada alvéolo 100 µl de anti-gama globulina de cavalo conjugada com peroxidase de rábano (HRP) diluída em PBS + 5 % de leite + 0,05 % Tween 20 a pH 7,2. Incubar a 37 °C durante uma hora.

- 2.1.3.2. Lavar as placas do modo descrito em 2.1.1.2.

2.1.4. *Cromogénio/Substrato*

- 2.1.4.1. Distribuir por cada alvéolo 200 µl de solução cromogénio/substrato [10 ml DMAB (dimetilaminobenzaldeído) + 10 ml MBTH (cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolino-hidrazona) + 5 µl H₂O₂].

O desenvolvimento da coloração é suspenso pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 3N decorridos 5-10 minutos (antes do início da coloração da testemunha negativa).

Podem utilizar-se outros cromogénios, tais como ABTS (ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico]), TMB (tetrametil-benzidina) ou OPD (orto-fenildiamina).

- 2.1.4.2. Efectuar as leituras espectrofotométricas da densidade óptica (DO) a 600 nm (ou 620 nm).

2.2. **Interpretação dos resultados**

- 2.2.1. Calcular o valor-limite (cut-off) adicionando 0,6 ao valor obtido para a testemunha negativa (0,6 é o desvio-padrão obtido com um grupo de 30 soros negativos).
- 2.2.2. As amostras que apresentarem valores de absorvância inferiores ao valor-limite são consideradas negativas.
- 2.2.3. As amostras que apresentarem valores de absorvância superiores ao valor-limite acrescido de 0,15 são consideradas positivas.
- 2.2.4. As amostras que apresentem valores de absorvância intermédios são duvidosas, devendo utilizar-se outra técnica para confirmar o resultado.

3. **ENSAIO ELISA DE BLOQUEIO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA PESTE EQUINA (AHSV) (ENSAIO RECOMENDADO)**

O ensaio ELISA de bloqueio é concebido para a detecção de anticorpos específicos anti-AHSV em soros de quaisquer espécies sensíveis. A VP7 constitui a principal proteína antigénica vírica do AHSV, sendo conservada nos nove serótipos. Uma vez que o anticorpo monoclonal (Mab) também é dirigido contra o VP7, o ensaio apresenta um elevado nível de sensibilidade

▼M6

e especificidade. Além disso, o antígeno recombinante VP7 é totalmente inócuo, proporcionando, assim, um elevado grau de segurança.

O princípio do ensaio consiste no bloqueio por anticorpos da amostra da reacção entre o antígeno recombinante VP7, ligado à placa ELISA, e o Mab conjugado específico da proteína recombinante VP7. Os anticorpos do soro da amostra em análise bloqueiam a reacção entre o antígeno e o Mab, resultando numa redução da coloração.

O ensaio seguidamente descrito é utilizado no laboratório de referência da Comunidade Europeia para a peste equina, em Algete (Espanha).

3.1. Procedimento**3.1.1. Placas ELISA**

3.1.1.1. Revestir as placas ELISA com proteína recombinante AHSV-4 VP7 diluída em tampão de carbonato-bicarbonato a pH 9,6. Incubar a 4 °C de um dia para o outro.

3.1.1.2. Lavar as placas cinco vezes com PBS contendo 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST).

3.1.1.3. Estabilizar as placas revestidas com o antígeno por tratamento com uma solução adequada (de forma a permitir a armazenagem a seco, a 4 °C, por períodos longos, sem perda de actividade) e secar invertendo a placa sobre um material absorvente.

3.1.2. Amostras em análise e testemunhas

3.1.2.1. Para rastreio: Diluir em PBST, directamente na placa, os soros em análise e soros-testemunha na proporção 1: 10, de modo a obter um volume final de 100 µl/alvéolo. Incubar a 37 °C durante uma hora.

3.1.2.2. Para titulação: Distribuir por oito alvéolos (100 µl/alvéolo) diluições sucessivas para metade (de 1: 10 a 1: 1 280) dos soros em análise e soros-testemunha positivos. As testemunhas negativas são analisadas numa diluição de 1: 10.

3.1.3. Conjugado

Adicionar a cada alvéolo 50 µl de Mab (anticorpo monoclonal específico de VP7) anti-VP7) conjugado com HRP, previamente diluído, e misturar suavemente de forma a garantir a homogeneidade. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.

3.1.4. Lavar as placas cinco vezes com PBST e secar do modo atrás descrito.

3.1.5. Cromogénio/Substrato

Adicionar a cada alvéolo 100 µl de solução cromogénio/substrato constituída por 1 ml de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis[3-*etilbenzotiazolino-6-sulfónico*]) na concentração de 5 mg/ml e 9 ml de tampão-substrato (0,1M tampão de fosfato-citrato de pH 4 com 0,03 % H₂O₂) e incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos. O desenvolvimento da coloração é suspenso mediante a adição, a cada alvéolo, de 100 µl de SDS (dodecilsulfato de sódio) a 2 % (m/v).

3.1.6. Determinações

Efectuar a leitura da DO a 405 nm com recurso a um leitor para placas ELISA.

3.2. Interpretação dos resultados**3.2.1. Validação do ensaio**

O ensaio é válido se a densidade óptica (DO) da testemunha negativa (TN) for superior a 1,0 e a DO da testemunha positiva (TP) for inferior a 0,2.

▼M63.2.2. *Cálculo dos valores-limite*

Valor-limite positivo $TN - [(TN - TP) \cdot 0.3]$

Valor-limite negativo $TN - [(TN - TP) \cdot 0.2]$

Em que TN representa a DO da testemunha negativa e TP a DO da testemunha positiva.

3.2.3. *Interpretação dos resultados*

As amostras com DO inferior ao valor-limite positivo devem ser consideradas positivas em relação aos anticorpos anti-AHSV.

As amostras com DO superior ao valor-limite negativo devem ser consideradas negativas em relação aos anticorpos anti-AHSV.

As amostras com DO compreendida entre os dois valores referidos deverão ser consideradas duvidosas, devendo recolher-se novas amostras decorridas duas a três semanas.