

Este texto es exclusivamente un instrumento de documentación y no surte efecto jurídico. Las instituciones de la UE no asumen responsabilidad alguna por su contenido. Las versiones auténticas de los actos pertinentes, incluidos sus preámbulos, son las publicadas en el Diario Oficial de la Unión Europea, que pueden consultarse a través de EUR-Lex. Los textos oficiales son accesibles directamente mediante los enlaces integrados en este documento

► **B**

**DIRECTIVA 2009/156/CE DEL CONSEJO**

**de 30 de noviembre de 2009**

**relativa a las condiciones de policía sanitaria que regulan los movimientos de équidos y las importaciones de équidos procedentes de terceros países**

**(versión codificada)**

**(Texto pertinente a efectos del EEE)**

**(DO L 192 de 23.7.2010, p. 1)**

Modificada por:

		Diario Oficial		
		nº	página	fecha
► <b><u>M1</u></b>	Directiva 2013/20/UE del Consejo de 13 de mayo de 2013	L 158	234	10.6.2013
► <b><u>M2</u></b>	Decisión de Ejecución (UE) 2016/1840 de la Comisión de 14 de octubre de 2016	L 280	33	18.10.2016

**DIRECTIVA 2009/156/CE DEL CONSEJO****de 30 de noviembre de 2009****relativa a las condiciones de policía sanitaria que regulan los movimientos de équidos y las importaciones de équidos procedentes de terceros países****(versión codificada)****(Texto pertinente a efectos del EEE)**

## CAPÍTULO I

## DISPOSICIONES GENERALES

*Artículo 1*

La presente Directiva define las condiciones de policía sanitaria que regulan los movimientos de équidos entre Estados miembros y las importaciones de équidos procedentes de terceros países.

*Artículo 2*

A efectos de la presente Directiva se aplicarán las siguientes definiciones:

- a) «explotación»: el establecimiento agrario o de entrenamiento, la cuadra o, en general, cualquier local o instalación en que se tengan o se críen habitualmente équidos, independientemente del uso al que se les destine;
- b) «équidos»: los animales domésticos o salvajes de las especies equinas —incluidas las cebras— y asnal y los animales resultantes del cruce de las mismas;
- c) «équidos registrados»: todo équido registrado tal como se define en la Directiva 90/427/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1990, relativa a las condiciones zootécnicas y genealógicas que regulan los intercambios intracomunitarios de équidos <sup>(1)</sup>, identificado mediante un documento de identificación expedido por:
  - i) la autoridad ganadera o cualquier otra autoridad competente del país de origen del équido encargada de la llevanza del libro genealógico o del registro de la raza de dicho équido, o
  - ii) toda asociación u organización internacional encargada del control de los caballos destinados a las competiciones o a las carreras;
- d) «équidos de abasto»: los équidos destinados al matadero para ser sacrificados, bien directamente o por un centro de concentración autorizado, contemplado en el artículo 7;
- e) «équidos de crianza y de renta»: los équidos no mencionados en las letras c) y d);
- f) «Estado miembro o tercer país indemne de peste equina»: cualquier Estado miembro o tercer país en cuyo territorio ninguna evidencia clínica, serológica en los équidos no vacunados, o epidemiológica haya permitido comprobar la presencia de peste equina durante los dos últimos años y en el que, durante los doce últimos meses, no se haya efectuado vacuna alguna contra dicha enfermedad;

<sup>(1)</sup> DO L 224 de 18.8.1990, p. 55.

**▼B**

- g) «enfermedades de declaración obligatoria»: las enfermedades enumeradas en el anexo I;
- h) «veterinario oficial»: el veterinario designado por la autoridad central competente del Estado miembro o de un tercer país;
- i) «admisión temporal»: situación de un équido registrado procedente de un tercer país y admitido en el territorio de la Comunidad por un período no superior a noventa días que se deberá determinar según el procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2, en función de la situación sanitaria del país de origen.

## CAPÍTULO II

**NORMAS SOBRE LOS MOVIMIENTOS DE ÉQUIDOS ENTRE ESTADOS MIEMBROS***Artículo 3*

Los Estados miembros solo podrán autorizar el movimiento de équidos registrados en su territorio y enviar a otro Estado miembro équidos que cumplan los requisitos definidos en los artículos 4 y 5.

No obstante, las autoridades competentes de los Estados miembros de destino podrán conceder dispensas generales o limitadas para los movimientos de équidos:

- que se monten o lleven con fines deportivos o recreativos por rutas situadas cerca de las fronteras interiores de la Comunidad,
- que participen en manifestaciones culturales o similares, o en actividades organizadas por organismos locales autorizados situados cerca de las fronteras interiores de la Comunidad,
- destinados exclusivamente al pasto o al trabajo, de forma temporal, cerca de las fronteras interiores de la Comunidad.

Los Estados miembros que hagan uso de esta autorización informarán a la Comisión sobre los términos de las dispensas concedidas.

*Artículo 4*

1. En el momento de la inspección, los équidos no deberán presentar ningún síntoma de enfermedad. La inspección deberá llevarse a cabo en el transcurso de las cuarenta y ocho horas anteriores al embarque o la carga. No obstante y sin perjuicio de lo dispuesto en el artículo 6, dicha inspección se exigirá en el caso de los équidos registrados únicamente para los intercambios intracomunitarios.

2. Sin perjuicio de los requisitos previstos en el apartado 5 para las enfermedades de declaración obligatoria, el veterinario oficial deberá asegurarse al hacer la inspección de que no existe ningún hecho —basándose incluso en las declaraciones del propietario o del criador— que permita concluir que los équidos hayan estado en contacto con équidos afectados por una infección o una enfermedad contagiosa en los últimos quince días anteriores a la inspección.

**▼B**

3. Los équidos no deberán estar incluidos entre los animales que haya que eliminar y destruir en cumplimiento de un programa de erradicación de enfermedad infecciosa o contagiosa aplicado en un Estado miembro.

4. Los équidos deberán ser sometidos a identificación, la cual se llevará a cabo:

a) para los équidos registrados, por medio de un documento de identificación establecido por la Directiva 90/427/CEE, que deberá certificar en particular que se cumple lo dispuesto en los apartados 5 y 6 del presente artículo y en el artículo 5 de la presente Directiva.

La validez del documento de identificación deberá ser suspendida por el veterinario oficial durante el periodo de las prohibiciones establecidas en el apartado 5 del presente artículo o en el artículo 5 de la presente Directiva. Deberá restituirse, una vez sacrificado el caballo registrado, a la autoridad que lo haya expedido. Las normas de desarrollo del presente apartado se aprobarán con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2;

b) para los équidos de reproducción o en producción, según el método elaborado con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2.

5. Además del requisito establecido en el artículo 5, los équidos no deberán proceder de una explotación que haya sido objeto de una de las medidas de prohibición siguientes:

a) en caso de animales de las especies expuestas a la enfermedad que se encuentren en la explotación no hayan sido sacrificados o suprimidos en su totalidad, la duración de la prohibición que recaerá sobre la explotación de procedencia deberá ser de al menos:

i) seis meses en el caso de équidos que infundan la sospecha de padecer durina, a partir de la fecha del último contacto o de la posibilidad de contacto con un équido enfermo. No obstante, si se trata de un semental, la prohibición deberá aplicarse hasta su castración,

ii) seis meses en el caso de muermo y encefalomiélitis equina, a partir de la fecha en que los équidos enfermos hayan sido eliminados,

iii) en el caso de anemia infecciosa, deberá terminar en la fecha en que, tras haber sido sacrificados los équidos afectados, los animales restantes hayan reaccionado negativamente a dos pruebas de Coggins efectuadas con un intervalo de tres meses,

iv) seis meses a partir del último caso de estomatitis vesiculosa comprobada,

v) un mes a partir del último caso de rabia comprobada,

vi) quince días a partir del último caso de enfermedad de carbunco bacteriano comprobada;

**▼B**

- b) en el caso de que se hayan sacrificado o suprimido todos los animales de las especies expuestas a la enfermedad que se encuentren en la explotación, y se hayan desinfectado todos los locales, la duración de la prohibición será de treinta días a partir de la fecha en que los animales hayan sido eliminados y desinfectados los locales, salvo si se trata del carbunco bacteridiano, en relación con el cual la prohibición tendrá una duración de quince días.

Las autoridades competentes podrán conceder dispensas a dichas medidas de prohibición para los hipódromos y campos de carreras y deberán informar a la Comisión del carácter de las dispensas concedidas.

6. ►**M1** En el supuesto de que un Estado miembro establezca o haya establecido un programa facultativo u obligatorio de lucha contra una enfermedad a la que sean sensibles los équidos podrá presentar dicho programa a la Comisión, dentro de un plazo de seis meses a partir del 4 de julio de 1990 para Bélgica, Dinamarca, Alemania, Irlanda, Grecia, España, Francia, Italia, Luxemburgo, los Países Bajos, Portugal y el Reino Unido, a partir del 1 de enero de 1995 para Austria, Finlandia y Suecia, a partir del 1 de mayo de 2004 para la República Checa, Estonia, Chipre, Letonia, Lituania, Hungría, Malta, Polonia, Eslovenia y Eslovaquia, a partir del 1 de enero de 2007 para Bulgaria y Rumanía, y a partir del 1 de julio de 2013 para Croacia, haciendo mención, en particular, a: ◀

- a) la situación de la enfermedad en su territorio;
- b) la justificación del programa, teniendo en cuenta la importancia de la enfermedad y sus ventajas desde el punto de vista de la relación coste/beneficio;
- c) la zona geográfica en la que se va a aplicar el programa;
- d) los diferentes estatutos aplicables a las granjas y las normas que deberán alcanzarse en cada categoría, así como los procedimientos de prueba;
- e) los procedimientos de control de dicho programa;
- f) las consecuencias que deben deducirse de la pérdida del estatuto de la explotación, por el motivo que fuere;
- g) las medidas a tomar en el caso de observarse resultados positivos durante los controles realizados con arreglo al programa;
- h) el carácter no discriminatorio entre los intercambios en el territorio del Estado miembro de que se trate y los intercambios intracomunitarios.

La Comisión examinará los programas comunicados por los Estados miembros. Los aprobará, en su caso, respetando los criterios enunciados en el párrafo primero con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2. Con arreglo al mismo procedimiento, podrán precisarse las garantías complementarias generales o limitadas que podrán exigirse en los intercambios intracomunitarios. Dichas garantías deberán equivaler, como máximo, a las que el Estado miembro aplique en el ámbito nacional.

**▼B**

Los programas presentados por el Estado miembro podrán modificarse o completarse con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 3. Con arreglo al mismo procedimiento, podrá aprobarse cualquier modificación o adición respecto de un programa anteriormente aprobado y respecto de las garantías definidas de conformidad con lo dispuesto en el párrafo segundo.

*Artículo 5*

1. Los Estados miembros que no estén indemnes de peste equina, solo podrán enviar équidos procedentes de la parte de territorio que se considere infectada con arreglo al apartado 2 del presente artículo en las condiciones fijadas en el apartado 5.

2. Se considerará infectada de peste equina una parte del territorio de un Estado miembro siempre que:

- a) se haya comprobado la peste equina en los dos últimos años mediante una evidencia clínica, serológica (en los animales no vacunados) o epidemiológica, o
- b) se haya practicado la vacuna contra la peste equina en los doce últimos meses.

La parte del territorio que se considere infectada de peste equina se compondrá al menos de:

- a) una zona de protección de un radio de 100 km como mínimo en torno a cualquier foco;
- b) una zona de vigilancia de al menos 50 km de fondo que empezará en los límites de la zona de protección y en la que no se haya practicado vacunación alguna en los últimos doce meses.

3. Las normas de control y las medidas de lucha contra la enfermedad relativas a los territorios y zonas contemplados en el apartado 2 así como las excepciones a las mismas se especifican en la Directiva 92/35/CEE del Consejo, de 29 de abril de 1992, por la que se establecen las normas de control y las medidas de lucha contra la peste equina <sup>(1)</sup>.

4. Todo équido vacunado que se encuentre en la zona de protección deberá quedar registrado y marcado conforme a lo dispuesto en el artículo 6, apartado 1, letra d), de la Directiva 92/35/CEE.

La mención de dicha vacunación deberá constar de manera clara en el documento de identificación o en el certificado sanitario.

5. Un Estado miembro solo podrá expedir del territorio mencionado en el apartado 2, párrafo segundo los équidos que cumplan los siguientes requisitos:

- a) ser expedidos únicamente en determinados períodos del año, en función de la actividad de los insectos vectores, que deberán fijarse de conformidad con el procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 3;
- b) no presentar ningún síntoma clínico de peste equina el día de la inspección contemplada en el artículo 4, apartado 1;

<sup>(1)</sup> DO L 157 de 10.6.1992, p. 19.

**▼B**

- c) que hayan sido sometidos a una prueba para la peste equina tal como se describe en el anexo IV, en dos ocasiones, con un intervalo comprendido entre veintiún y treinta días, debiendo haberse efectuado la segunda prueba en los diez días anteriores al envío:
- i) bien con resultados negativos, si no han sido vacunados contra la peste equina, o
  - ii) sin que se haya evidenciado un aumento de los anticuerpos y sin haber sido vacunados durante los últimos dos meses, si han sido vacunados contra la peste equina.

Con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2, y previo dictamen de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, podrán reconocerse otros métodos de control;

- d) haber sido mantenidos en un lugar de cuarentena durante un período de al menos cuarenta días antes del envío;
- e) haber sido protegidos de los insectos vectores durante el período de cuarentena y durante el transporte del lugar de cuarentena al lugar de envío.

*Artículo 6*

Los Estados miembros que apliquen un régimen alternativo de control que ofrezca garantías equivalentes a las previstas en el artículo 4, apartado 5, para los movimientos en su territorio de los équidos podrán concederse, en régimen de reciprocidad, una dispensa a las disposiciones del artículo 4, apartado 1, segunda frase y del artículo 8, apartado 1, letra b).

Informarán de ello a la Comisión.

*Artículo 7*

1. En el más breve plazo, los équidos deberán ser conducidos desde la explotación de procedencia hacia el lugar de destino, o bien directamente o bien a través de un centro de concentración autorizado tal como se definen en el artículo 2, apartado 2, letra o), de la Directiva 64/432/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1964, relativa a problemas de policía sanitaria en materia de intercambios intracomunitarios de animales de las especies bovina y porcina<sup>(1)</sup>, utilizando medios de transporte y de contención periódicamente limpiados y desinfectados con un desinfectante según la frecuencia que deberá fijar el Estado miembro de expedición. Sin perjuicio del Reglamento (CE) n° 1/2005 los vehículos de transporte deberán ir acondicionados de forma que las heces, la yacija o el forraje de los équidos no puedan deslizarse o caer fuera del vehículo durante el transporte. Sin perjuicio de lo dispuesto en el Reglamento (CE) n° 1/2005, el transporte deberá efectuarse de forma que se garantice una protección sanitaria eficaz y el bienestar de los équidos.

2. El Estado miembro de destino podrá, de manera general o limitada, conceder una dispensa a determinados requisitos del artículo 4, apartado 5, siempre que el animal lleve una marca especial que indique que está destinado al sacrificio y que la mención de dicha dispensa figure en el certificado sanitario de acuerdo con el anexo III.

<sup>(1)</sup> DO 121 de 29.7.1964, p. 1997.

**▼B**

Si se concede dicha dispensa los équidos de abasto deberán ser conducidos directamente al matadero designado para ser sacrificados en un plazo que no supere los cinco días a partir de la llegada al matadero.

3. El veterinario oficial deberá anotar en un registro el número de identificación o el número del documento de identificación del équido sacrificado y transmitir a la autoridad competente del lugar de expedición, a petición de esta, una declaración que certifique el sacrificio del équido.

*Artículo 8*

1. Los Estados miembros velarán por que:

- a) en caso de que salgan de su explotación, los équidos registrados deban ir acompañados del documento de identificación establecido en el artículo 4, apartado 4, letra a), y si están destinados a intercambios intracomunitarios, completados por el certificado sanitario previsto en el anexo II;
- b) durante su transporte, los équidos de reproducción, de producción y de abasto deberán ir acompañados de un certificado sanitario conforme al anexo III.

2. El certificado sanitario o, cuando se trate de un équido registrado la declaración, deberá, sin perjuicio de lo dispuesto en el artículo 6, expedirse dentro de las 48 horas anteriores al embarque o, a más tardar, el último día laborable previo al mismo, en la o las lenguas oficiales del Estado miembro de expedición y de destino. La declaración o el certificado sanitarios tendrán un período de validez de diez días y deberá constar de una sola hoja.

3. El movimiento entre Estados miembros de los équidos no registrados podrá efectuarse mediante un solo certificado sanitario por lote, en lugar de llevarse a cabo mediante el certificado sanitario individual a que se hace mención en el apartado 1, letra b).

*Artículo 9*

Las normas de la Directiva 90/425/CEE se aplicarán en particular en lo relativo a los controles en origen, a la organización y a la continuación que se dará de los controles que deba realizar el Estado miembro de destino y a las medidas de salvaguardia que deban aplicarse.

*Artículo 10*

En la medida en que resulte necesario para la aplicación uniforme de la presente Directiva, y en colaboración con las autoridades nacionales competentes, los expertos veterinarios de la Comisión podrán efectuar controles *in situ*. La Comisión informará a los Estados miembros del resultado de los controles efectuados.

El Estado miembro en cuyo territorio se realice un control deberá prestar a los expertos toda la ayuda necesaria para el cumplimiento de su misión.

**▼B**

Las normas de desarrollo del presente artículo se adoptarán con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2.

## CAPÍTULO III

**NORMAS PARA LAS IMPORTACIONES DE ÉQUIDOS PROCEDENTES DE TERCEROS PAÍSES***Artículo 11*

Los équidos importados en la Comunidad deberán cumplir las condiciones fijadas en los artículos 12 a 16.

*Artículo 12*

1. La importación de équidos en la Comunidad solo se autorizará a partir de los terceros países que figuren en una lista que se elaborará o modificará con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2.

Teniendo en cuenta la situación sanitaria y las garantías que ofrezca el tercer país para los équidos, podrá decidirse, con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2, que la autorización prevista en el primer párrafo del presente apartado sea aplicable a todo el territorio del tercer país o solo a parte de su territorio.

A este efecto, y basándose en las normas internacionales correspondientes, se tendrá en cuenta la manera en que el tercer país observe y aplique dichas normas, en particular el principio de regionalización, dentro de su territorio y en lo que se refiere a sus requisitos sanitarios para la importación a partir de otros terceros países y de la Comunidad.

2. Al elaborar o modificar la lista prevista en el apartado 1, deberán tenerse especialmente en cuenta los siguientes aspectos:

- a) la situación sanitaria de los équidos, de otros animales domésticos y de los animales silvestres en el tercer país, atendiendo en particular a las enfermedades animales exóticas y a cualquier aspecto de la situación sanitaria y medioambiental general del tercer país que pueda presentar un riesgo para la situación sanitaria y medioambiental de la Comunidad;
- b) la legislación del tercer país en materia de salud y bienestar de los animales;
- c) la organización de la autoridad veterinaria competente y sus servicios de inspección, las competencias de dichos servicios, la supervisión a la que estén sujetos y los medios con que cuenten, incluidos el personal y las capacidades de laboratorio, para aplicar la legislación nacional de forma eficaz;
- d) las garantías que la autoridad veterinaria competente del tercer país pueda dar en lo que se refiere a la conformidad o equivalencia con las condiciones zoonosanitarias correspondientes aplicables en la Comunidad;

**▼B**

- e) la pertenencia del tercer país a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la regularidad y rapidez de la información que proporcione en relación con la existencia de enfermedades infecciosas o contagiosas de los équidos en su territorio, en particular las enfermedades repertoriadas por la OIE y las recogidas en el anexo I de la presente Directiva;
- f) las garantías que el tercer país ofrezca de informar directamente a la Comisión y a los Estados miembros:
  - i) en un plazo de 24 horas, sobre la confirmación de incidencia de enfermedad infecciosa de los équidos de las que figuran en el anexo I, así como de cualquier cambio en la política de vacunación relativa a dichas enfermedades,
  - ii) en un plazo adecuado, sobre cualquier cambio previsto en las normas sanitarias nacionales relativas a los équidos, en particular en lo referente a su importación,
  - iii) a intervalos regulares, sobre la situación zoonosanitaria de su territorio en lo relativo a los équidos;
- g) toda experiencia de importaciones previas de équidos vivos a partir del tercer país y los resultados de los controles de importación realizados;
- h) los resultados de las inspecciones y auditorías comunitarias llevadas a cabo en el tercer país, en particular los resultados de la evaluación de las autoridades competentes o, si la Comisión lo solicitara, el informe presentado por las autoridades competentes sobre las inspecciones que hayan realizado;
- i) las normas sobre la prevención y el control de las enfermedades animales infecciosas o contagiosas que estén vigentes en el tercer país y su aplicación, incluidas las normas sobre la importación de équidos a partir de otros terceros países.

3. La Comisión tomará medidas para poner a disposición del público las versiones actualizadas de la lista elaborada o modificada según lo dispuesto en el apartado 1.

La lista podrá combinarse con otras elaboradas a efectos de salud pública o animal, y podrá también incluir modelos de certificados sanitarios.

4. Para cada tercer país o grupo de terceros países se establecerán condiciones especiales de importación, con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2, teniendo en cuenta la situación zoonosanitaria en lo relativo a los équidos en el tercer país o los terceros países en cuestión.

5. Con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2, podrán adoptarse normas detalladas para la aplicación de los apartados 1 a 4 y criterios para la inclusión de terceros países o partes de terceros países en la lista prevista en el apartado 1.

### *Artículo 13*

1. Los équidos deberán proceder de un tercer país:
  - a) indemne de peste equina;
  - b) indemne desde dos años antes de encefalomiелitis equina venezolana (VEE);
  - c) indemne desde seis meses antes, de durina y de muermo.

**▼B**

2. Con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2, podrá decidirse:

- a) que las disposiciones del apartado 1 del presente artículo solo se apliquen en una parte del territorio de un tercer país.

En caso de regionalización de los requisitos para la peste equina deberán respetarse como mínimo las medidas previstas en el artículo 5, apartados 2 y 5;

- b) exigir garantías suplementarias para enfermedades exóticas en la Comunidad.

*Artículo 14*

Antes del día de su carga para su envío al Estado miembro de destino, los équidos deberán haber permanecido sin interrupción en el territorio o parte del territorio de un tercer país o, en caso de regionalización en la parte del territorio definida en aplicación del artículo 13, apartado 2, letra a), durante un período que deberá fijarse en el momento de la adopción de las decisiones que se establezcan en aplicación del artículo 15.

Deberán proceder de una explotación colocada bajo control veterinario.

*Artículo 15*

La importación de équidos del territorio de un tercer país o de una parte de territorio de un tercer país definida con arreglo al artículo 13, apartado 2, letra a), que figure en la lista establecida con arreglo al artículo 12, apartado 1, solo se autorizará si, además de los requisitos establecidos en el artículo 13:

- a) cumplen los requisitos sanitarios adoptados, con arreglo al procedimiento a que se refiere el artículo 21, apartado 2, para las importaciones de équidos de países considerados según la especie de que se trate y las categorías de équidos.

Para determinar dichos requisitos de policía sanitaria, la base de referencia utilizada será la de las normas previstas en los artículos 4 y 5, y

- b) cuando se trate de terceros países no indemnes de estomatitis vesiculosa o de arteritis viral durante al menos seis meses, los équidos satisfagan los siguientes requisitos:

i) los équidos deberán proceder de una explotación indemne de estomatitis vesiculosa desde al menos seis meses antes y haber reaccionado negativamente a un análisis serológico antes de su expedición,

ii) en el caso de la arteritis viral, los équidos machos deberán, sin perjuicio de lo dispuesto en el artículo 19, letra b), haber reaccionado negativamente a un análisis serológico, a un virus de aislamiento o a cualquier otra prueba reconocida según el procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2, que garantice que el animal está indemne de esta enfermedad.

**▼B**

Con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2, previo dictamen de la Autoridad Europea de Sanidad Alimentaria, podrán delimitarse las categorías de équidos machos a las que serán aplicadas el citado requisito.

*Artículo 16*

1. Los équidos deberán quedar identificados de conformidad con el artículo 4, apartado 4, e ir acompañados de un certificado sanitario expedido por un veterinario oficial del tercer país exportador. El certificado sanitario deberá:

- a) expedirse el día de la carga de los équidos para su envío al Estado miembro de destino o, cuando se trate de caballos registrados, el último día laborable antes del embarque;
- b) estar redactado en una al menos de las lenguas oficiales del Estado miembro de destino y en una de las del Estado miembro donde se efectúe el control de importación;
- c) acompañar a los équidos, en ejemplar original;
- d) certificar que los équidos cumplen los requisitos establecidos por la presente Directiva, así como las que se hayan fijado en aplicación de la misma para las importaciones procedentes de terceros países;
- e) constar de una sola hoja;
- f) expedirse para un solo destinatario o, en el caso de équidos de abasto, para un lote debidamente marcado e identificado.

Los Estados miembros informarán a la Comisión si hacen uso de esta opción.

2. El certificado sanitario deberá ser redactado en un impreso que se ajuste al modelo fijado con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2.

*Artículo 17*

1. Nada más llegar al Estado miembro de destino, los équidos de abasto deberán ser conducidos a un matadero, ya sea directamente o bien después de haber pasado por un centro de concentración, contemplado en el artículo 7, y, de acuerdo con los requisitos de policía sanitaria, ser sacrificados en un plazo que deberá ser fijado en el momento de la adopción de las decisiones que deban tomarse en aplicación del artículo 15.

2. Sin perjuicio de las condiciones particulares que puedan fijarse con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2, la autoridad competente del Estado miembro de destino estará facultada, siempre que lo exijan razones de policía sanitaria para designar el matadero hacia el que deban dirigirse dichos équidos.

*Artículo 18*

Expertos veterinarios de los Estados miembros y de la Comisión efectuarán controles sobre el terreno para verificar si las disposiciones de la presente Directiva, y en particular las recogidas en el artículo 12, apartado 2, se cumplen efectivamente.

**▼B**

Si en el transcurso de una inspección efectuada en virtud del presente artículo, se detectaran hechos graves en una explotación, la Comisión informará inmediatamente de ello a los Estados miembros y adoptará inmediatamente una decisión que incluya la suspensión provisional de la autorización. La decisión final a este respecto se adoptará con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 3.

La Comisión designará, a propuesta de los Estados miembros, a los expertos de los Estados miembros encargados de dichos controles.

Se realizarán dichos controles por cuenta de la Comunidad, a cuyo cargo correrán los gastos correspondientes.

La periodicidad y las modalidades de dichos controles se determinarán con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2.

*Artículo 19*

Con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 2:

- a) podrá limitarse la importación procedente de un tercer país o de una parte de un tercer país a determinadas especies o categorías de équidos;
- b) se fijarán, no obstante lo dispuesto en el artículo 15, las condiciones particulares en que pueda efectuarse la admisión temporal en el territorio de la Comunidad o la reintroducción en dicho territorio previa exportación temporal de los équidos registrados o de los équidos destinados a usos particulares;
- c) se determinarán las condiciones que permitan convertir una admisión temporal en admisión definitiva;
- d) podrá designarse un laboratorio comunitario de referencia para una o varias de las enfermedades de los équidos mencionadas en el anexo I y regularse las funciones, tareas y procedimientos de colaboración con los laboratorios encargados del diagnóstico de las enfermedades infecciosas de los équidos en los Estados miembros.

## CAPÍTULO IV

**DISPOSICIONES FINALES***Artículo 20*

Los anexos I a IV serán modificados con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 21, apartado 3.

*Artículo 21*

1. La Comisión estará asistida por el Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal, creado mediante el artículo 58 del Reglamento (CE) n° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria <sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup> DO L 31 de 1.2.2002, p. 1.

**▼B**

2. En los casos en que se haga referencia al presente apartado, serán de aplicación los artículos 5 y 7 de la Decisión 1999/468/CE.

El plazo contemplado en el artículo 5, apartado 6, de la Decisión 1999/468/CE queda fijado en tres meses.

3. En los casos en que se haga referencia al presente apartado, serán de aplicación los artículos 5 y 7 de la Decisión 1999/468/CE.

El plazo contemplado en el artículo 5, apartado 6, de la Decisión 1999/468/CE queda fijado en quince días.

*Artículo 22*

Queda derogada la Directiva 90/426/CEE, modificada por los actos indicados en el anexo V, parte A, sin perjuicio de las obligaciones de los Estados miembros relativas a los plazos de transposición al Derecho nacional de las Directivas que figuran en el anexo V, parte B.

Las referencias a la Directiva derogada se entenderán hechas a la presente Directiva y se leerán con arreglo a la tabla de correspondencias que figura en el anexo VI.

*Artículo 23*

La presente Directiva entrará en vigor a los veinte días de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

*Artículo 24*

Los destinatarios de la presente Directiva son los Estados miembros.

**▼B**

*ANEXO I*

**ENFERMEDADES DE DECLARACIÓN OBLIGATORIA**

Estarán sometidas a declaración obligatoria las siguientes enfermedades:

- Durina
- Muermo
- Encefalomiелitis equina (en todas sus variedades incluida la VEE)
- Anemia infecciosa
- Rabia
- Carbunco bacteridiano
- Peste equina
- Estomatitis vesiculosa.

**▼B***ANEXO II*

## MODELO

**CERTIFICADO SANITARIO <sup>(a)</sup>**

Pasaporte n° .....

El abajo firmante certifica <sup>(b)</sup> que los équidos anteriormente identificados reúnen los siguientes requisitos:

- a) han sido examinados en el día de hoy y no presentan ningún signo clínico de enfermedad;
- b) no deben ser eliminados en el marco de un programa de erradicación de una enfermedad contagiosa aplicado en el Estado miembro;
- c) — no proceden del territorio o de una parte del territorio de un Estado miembro sujeto a medidas restrictivas por motivos de peste equina,

o

proceden del territorio o de una parte del territorio de un Estado miembro sujeto a medidas restrictivas por motivos de peste equina y han sido sometidos con resultados satisfactorios a las pruebas establecidas en el artículo 5, apartado 5 de la Directiva 2009/156/CE, realizadas entre el ..... y el ..... en el lugar de cuarentena de ..... <sup>(c)</sup>,

— no han sido vacunados contra la peste equina,

o

han sido vacunados contra la peste equina el ..... <sup>(c)</sup> <sup>(d)</sup>;

- d) no proceden de una explotación sobre la que haya recaído una prohibición por motivos de policía sanitaria ni han estado en contacto con équidos de una explotación de estas características:

— en el caso de équidos sospechosos de padecer durina, durante los seis meses siguientes a la fecha del último contacto o posibilidad de contacto con un équido enfermo; no obstante, si se tratase de un semental, la prohibición deberá aplicarse hasta su castración,

— en caso de muermo y encefalomiélitis equina, durante los seis meses siguientes a la fecha en que hayan sido sacrificados los équidos enfermos,

— en caso de anemia infecciosa, durante el período necesario para que, a partir de la fecha en que hayan sido sacrificados los équidos enfermos, los animales restantes hayan reaccionado negativamente a dos pruebas de Coggins efectuadas con un intervalo de tres meses,

— durante los seis meses siguientes al último caso de estomatitis vesiculosa,

— durante el mes siguiente al último caso de rabia,

— durante los quince días siguientes al último caso de carbunco bacteridiano,

— en caso de que todos los animales de las especies sensibles presentes en la explotación hayan sido sacrificados y los locales desinfectados, durante treinta días a partir de la fecha en la que estas tareas hayan quedado realizadas, salvo cuando se trate de carbunco bacteridiano, en cuyo caso el período de prohibición es de quince días;

<sup>(a)</sup> Este certificado no se exigirá cuando exista un acuerdo bilateral celebrado de conformidad con lo dispuesto en el artículo 6 de la Directiva 2009/156/CE.

<sup>(b)</sup> Certificado valedero diez días.

<sup>(c)</sup> Táchese lo que no proceda.

<sup>(d)</sup> La vacuna deberá mencionarse en el pasaporte.

**▼B**

- e) no han permanecido, que yo sepa, en contacto con équidos que padezcan una enfermedad o una infección contagiosa durante los últimos quince días;
- f) en el momento de la inspección, estaban en condiciones de realizar el viaje previsto con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) n° 1/2005 <sup>(a)</sup>.

Fecha	Lugar	Firma y sello del veterinario oficial <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Nombre en mayúsculas y funciones.

<sup>(a)</sup> Esta declaración no exime a los transportistas de cumplir con las obligaciones que les incumben en virtud de las disposiciones comunitarias en vigor, en particular por lo que se refiere a la aptitud de los animales para ser transportados.



## ANEXO III

## MODELO

## CERTIFICADO SANITARIO

para los intercambios entre los Estados miembros

## ÉQUIDOS

COMUNIDAD EUROPEA				Certificado intracomunitario										
Parte I: Detalles relativos a la partida presentada	I.1. Expedidor Nombre Dirección Código postal				I.2. N° de referencia del certificado		I.2.a. N° de referencia local:							
					I.3. Autoridad central competente									
					I.4. Autoridad local competente									
	I.5. Destinatario Nombre Dirección Código postal				I.6. N° de los certificados originales asociados: N° de los documentos de acompañamiento									
					I.7.									
	I.8. País de origen		Cód. ISO	I.9. Región de origen		Código	I.10. País de destino		Cód. ISO	I.11. Región de destino		Código		
	I.12. Lugar de origen Explotación <input type="checkbox"/> Centro de concentración <input type="checkbox"/> Otros <input type="checkbox"/> Nombre Dirección Código postal				I.13. Lugar de destino Explotación <input type="checkbox"/> Centro de concentración <input type="checkbox"/> Establecimiento <input type="checkbox"/> Otros <input type="checkbox"/> Nombre Dirección Código postal									
	I.14. Lugar de carga Código postal				I.15. Fecha y hora de salida									
	I.16. Medio de transporte Aeronave <input type="checkbox"/> Buque <input type="checkbox"/> Vagón de ferrocarril <input type="checkbox"/> Vehículo de carretera <input type="checkbox"/> Otros <input type="checkbox"/> Identificación				I.17. Transportista Nombre Dirección Código postal				Número de autorización		Estado miembro			
	I.18. Descripción de la mercancía						I.19. Código del producto (Código NC)							
										I.20. Número/Cantidad				
	I.21.									I.22. Número de bultos				
	I.23. N° del precinto y n° del contenedor									I.24. Tipo de embalaje				
	I.25. Mercancías certificadas para Cría <input type="checkbox"/> Équidos registrados <input type="checkbox"/> Sacrificio <input type="checkbox"/> Otros <input type="checkbox"/>													
	I.26. Tránsito a través de un país tercero <input type="checkbox"/> País tercero Punto de salida Punto de entrada						ISO Cód. Código N° de PIF			I.27. Tránsito a través de Estados miembros <input type="checkbox"/> Estado miembro Estado miembro Estado miembro			ISO Cód. ISO Cód. ISO Cód.	
I.28. Exportación <input type="checkbox"/> País tercero Punto de salida						ISO Cód. Código			I.29. Tiempo estimado del transporte					
I.30. Plan de Viaje Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>														
I.31. Identificación de las mercancías Especie (Nombre científico)      Sistema de identificación														



COMUNIDAD EUROPEA

Équidos registrados, équidos de crianza y de renta équidos de abasto

		II.a. Número de referencia del certificado	II.b. Número de referencia local
Parte II: Certificación	<b>II. Información sanitaria <sup>(1)</sup></b>		
	El abajo firmante certifica que el (los) équido(s) arriba designado(s) reúne(n) los siguientes requisitos:		
	II.1.	ha(n) sido examinado(s) en el día de hoy y no presenta(n) ningún signo clínico de enfermedad;	
	II.2.	no debe(n) ser eliminado(s) en el marco de un programa de erradicación de una enfermedad contagiosa aplicado en el Estado miembro;	
	<i>o bien</i> <sup>(2)</sup> II.3.	no procede(n) del territorio o de una parte del territorio de un Estado miembro sujeto a medidas restrictivas por motivos de peste equina.;	
	<i>o bien</i> <sup>(2)</sup> II.3.	procede(n) del territorio o de una parte del territorio de un Estado miembro sujeto a medidas restrictivas por motivos de peste equina, ha(n) permanecido durante al menos 40 días antes del envío en el lugar de cuarentena protegido de vectores de ..... y ha(n) sido sometido(s) a la prueba para la detección de anticuerpos contra el virus de la peste equina que se describe en el anexo IV de la Directiva 2009/156/CE realizada simultáneamente en muestras de sangre tomadas en dos ocasiones, con un intervalo comprendido entre 21 y 30 días el ..... ( <i>indicar fecha</i> ) y durante los 10 días anteriores al envío el ..... ( <i>indicar fecha</i> );	
		<i>o bien</i> <sup>(3)</sup> [con resultado negativo en cada caso si no ha(n) sido vacunado(s) contra la peste equina.];	
		<i>o bien</i> <sup>(2)</sup> [sin aumento de los anticuerpos, si ha(n) sido vacunado(s) contra la peste equina.];	
	<i>o bien</i> <sup>(3)</sup> II.4.	no ha(n) sido vacunado(s) contra la peste equina.;	
	<i>o bien</i> <sup>(2)</sup> II.4.	ha(n) sido vacunado(s) contra la peste equina el ..... ( <i>indicar fecha</i> ), ,	
	<i>o bien</i> <sup>(3)</sup> [al menos dos meses antes de la certificación.];		
	<i>o bien</i> <sup>(2)</sup> [al menos dos meses antes de su entrada en el lugar de cuarentena.];		
II.5.	no procede(n) de una o más explotaciones sobre la que haya(n) recaído una o más prohibiciones por motivo de policía sanitaria que hayan establecido al menos una de las condiciones siguientes:		
<i>o bien</i> <sup>(3)</sup>	[no fueron sacrificados todos los animales de las especies expuestas a las enfermedades mencionadas en las letras a) a g) siguientes que se encontraban en la explotación, y la prohibición se aplicó como mínimo:		
a)	en el caso de los équidos sospechosos de padecer durina,		
	<i>o bien</i> <sup>(2)</sup> [durante los seis meses siguientes a la fecha del último contacto o posibilidad de contacto con un équido enfermo o infectado de <i>Trypanosoma equiperdum</i> .];		
	<i>o bien</i> <sup>(2)</sup> [en el caso de un semental, hasta su castración.];		
b)	en el caso de muermo, durante los seis meses siguientes a la fecha en que los équidos enfermos o con resultado positivo en la prueba de detección del patógeno causante <i>Burkholderia mallei</i> o de anticuerpos de este patógeno, fueron sacrificados y eliminados;		
c)	en el caso de encefalomielititis equina, durante los seis meses siguientes a la fecha en que los équidos enfermos fueron sacrificados, salvo en el caso del virus del Nilo occidental, en que el período de seis meses se cuenta desde la fecha en que los équidos infectados murieron, fueron trasladados fuera de la explotación o se recuperaron completamente;		



COMUNIDAD EUROPEA

Équidos registrados, équidos de crianza y de renta équidos de abasto

II. Información sanitaria <sup>(1)</sup>	II.a. Número de referencia del certificado	II.b. Número de referencia local
<p>d) en el caso de anemia infecciosa, hasta la fecha en que, tras haber sido sacrificados los équidos afectados, los animales restantes hayan reaccionado negativamente a dos pruebas de Coggins efectuadas con muestras de sangre recogidas en dos ocasiones con un intervalo de tres meses;</p> <p>e) durante los seis meses siguientes al último caso de estomatitis vesiculosa;</p> <p>f) durante el mes siguiente al último caso de rabia;</p> <p>g) durante los 15 días siguientes al último caso de carbunco bacteridiano;</p> <p><i>o bien</i> <sup>(2)</sup> [como consecuencia de casos de durina, muermo, encefalomiелitis equina de todo tipo, anemia infecciosa, estomatitis vesiculosa, carbunco bacteridiano o rabia, todos los animales presentes en la explotación pertenecientes a las especies expuestas a la enfermedad fueron sacrificados o eliminados, y la prohibición se mantuvo durante 30 días, o 15 días en el caso del carbunco bacteridiano, desde la fecha en que, una vez eliminados los animales, concluyó satisfactoriamente la desinfección de los locales;]</p> <p>II.6. no han permanecido, que yo sepa, en contacto con équidos que han padecido una enfermedad o una infección contagiosa durante los últimos 15 días;</p> <p>II.7. en el momento de la inspección estaba(n) en condiciones de realizar el viaje previsto con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) n° 1/2005 <sup>(3)</sup>.</p>		
<b>Notas</b>		
<b>Parte I</b>		
Casilla I.6: corresponde al número de permiso CITES en el caso de équidos incluidos en el Convenio de Washington sobre especies amenazadas y sus productos derivados.		
Casilla I.16: Matrícula (vagones o contenedores de ferrocarril y camiones), número de vuelo (aviones) o nombre (barcos).		
Casilla I.19: utilizar el código apropiado del Sistema Armonizado (SA) de la Organización Mundial de Aduanas: 01.01.01 o 01.01.06.19		
Casilla I.31: Especie: caballos, asnos, mulos, burdéganos, cebras (incluidos mestizajes).		
Sistema de identificación: hasta el 31 de diciembre de 2009, corresponderá al número de identificación mencionado en el artículo 2 de la Decisión 2000/68/CE de la Comisión y, a partir del 1 de enero de 2010, al número permanente único a que se refieren el artículo 2, letra d), y el anexo I, sección 1, letra A, apartado 4, del Reglamento (CE) n° 504/2008 de la Comisión.		
<b>Parte II</b>		
<sup>(1)</sup> Los datos de los puntos II.1 a II.6 no se exigirán cuando exista un acuerdo bilateral celebrado de conformidad con lo dispuesto en el artículo 6 de la Directiva 2009/156/CE.		
<sup>(2)</sup> Táchese lo que no proceda.		
<sup>(3)</sup> Esta declaración no exime a los transportistas de cumplir con las obligaciones que les incumben en virtud de las disposiciones comunitarias en vigor, en particular por lo que se refiere a la aptitud de los animales para ser transportados.		
— El presente certificado tiene una validez de 10 días.		
— El color del sello y de la firma debe ser diferente del de las demás indicaciones del certificado.		
Veterinario oficial o inspector oficial		
Nombre y apellidos (en mayúsculas):	Cualificación y cargo:	
Unidad Veterinaria Local (UVL):	N° de la UVL relacionada:	
Fecha:	Firma:	
Sello		

▼ **M2***ANEXO IV***PESTE EQUINA****DIAGNÓSTICO****PARTE A**

## Pruebas serológicas

El método serológico descrito a continuación consiste en pruebas de inmunoadsorción enzimática (ELISA) basadas en el capítulo 2.5.1, sección B, punto 2, del Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres, edición de 2016, adoptado por la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2012.

La proteína vírica VP7 es un antígeno inmunodominante principal del virus de la peste equina (VPE) y se conserva en los nueve serotipos del VPE. Las proteínas VP7 recombinantes del VPE han mostrado ser estables, inocuas y adecuadas a la hora de utilizarlas como antígenos en procedimientos ELISA para detectar anticuerpos del VPE con una alta sensibilidad y especificidad (Laviada *et al.*, 1992b <sup>(1)</sup>; Maree y Paweska, 2005). Las técnicas ELISA indirecta y ELISA de bloqueo son dos pruebas ELISA con la VP7 del virus de la peste equina adecuadas para el diagnóstico serológico de la peste equina (PE).

**1. Técnica ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra el virus de la peste equina (VPE)**

El conjugado empleado en este método es una gammaglobulina anti-caballo conjugada con peroxidasa de rábano que reacciona con suero de caballos, mulos y asnos. El método descrito por Maree y Paweska (2005) <sup>(2)</sup> emplea la proteína G como conjugado que también reacciona con suero de cebra.

El Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA), España, podrá proporcionar el antígeno en un plazo de entre 4 y 6 meses tras la petición.

**1.1. Procedimiento de la prueba**

**1.1.1. Fase sólida**

**1.1.1.1.** Recubrir las placas de ELISA con VP7 recombinante de la cepa 4 del virus (VPE-4) diluida en solución amortiguadora de carbonato/bicarbonato, pH 9,6. Incubar las placas toda la noche a 4 °C.

**1.1.1.2.** Lavar las placas cinco veces con agua destilada que contenga 0,01 % (v/v) de Tween 20 (solución de lavado). Golpear suavemente las placas contra un material absorbente para eliminar los restos de solución de lavado que pudieran quedar.

**1.1.1.3.** Bloquear las placas poniendo en cada pocillo 200 µl de solución amortiguadora salina fosfatada (PBS) pH 7,2 + 5 % (p/v) de leche desnatada (leche desnatada en polvo de Nestlé<sup>TM</sup>) y dejar una hora a 37 °C.

**1.1.1.4.** Eliminar la solución de bloqueo y golpear suavemente las placas contra un material absorbente.

<sup>(1)</sup> Laviada M.D., Roy P. y Sánchez-Vizcaino J.M. (1992b). Adaptation and evaluation of an indirect ELISA and immunoblotting test for African horse sickness antibody detection. En: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium. Walton T.E. & Osburn B.I., Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 646-650.

<sup>(2)</sup> Maree S. y Paweska J.T. (2005). Preparation of recombinant African horse sickness virus VP7 antigen via a simple method and validation of a VP7-based indirect ELISA for the detection of group-specific IgG antibodies in horse sera. *J. Virol. Methods*, 125 (1), 55-65.

▼ **M2**

## 1.1.2. Muestras problema

- 1.1.2.1. Diluir los sueros problema y los sueros control positivo y negativo al 1/25 en PBS + 5 % (p/v) de leche desnatada + 0,05 % (v/v) de Tween 20, hasta alcanzar un volumen de 100 µl por pocillo. Incubar una hora a 37 °C

Para la titulación, hacer una serie de diluciones a 1/2 desde 1/25 (100 µl por pocillo), con un solo suero por columna de la placa, y hacer la misma operación con los controles positivos y negativos. Incubar durante una hora a 37 °C.

- 1.1.2.2. Lavar las placas cinco veces con agua destilada que contenga 0,01 % (v/v) de Tween 20 (solución de lavado). Golpear suavemente las placas contra un material absorbente para eliminar los restos de solución de lavado que pudieran quedar.

## 1.1.3. Conjugado

- 1.1.3.1. Poner en cada pocillo 100 µl de gammaglobulina anti-caballo conjugada con peroxidasa de rábano diluida en PBS + 5 % de leche + 0,05 % de Tween 20, pH 7,2. Incubar durante una hora a 37 °C.

- 1.1.3.2. Lavar las placas cinco veces con agua destilada que contenga 0,01 % (v/v) de Tween 20 (solución de lavado). Golpear suavemente las placas contra un material absorbente para eliminar los restos de solución de lavado que pudieran quedar.

## 1.1.4. Cromógeno/sustrato

- 1.1.4.1. Añadir a cada pocillo 200 µl de solución de cromógeno/sustrato [10 ml de solución 80,6 mM de DMAB (dimetil-aminobenzaldehído) + 10 ml de solución 1,56 mM de MBTH (clorhidrato 3-metil-2-benzotiazolina-hidrazona) + 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>].

La formación de color se detiene añadiendo 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N tras unos cinco o diez minutos aproximadamente (antes de que el control negativo comience a tomar color).

Pueden utilizarse también otros cromógenos como ABTS [ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)], TMB (tetrametil-bencidina) u OPD (orto-fenildiamina).

- 1.1.4.2. Leer las placas a 600 nm (o 620 nm).

## 1.2. Interpretación de los resultados

- 1.2.1. Calcular el valor del punto de corte añadiendo 0,06 al valor del control negativo (0,06 es la desviación típica derivada de un grupo de 30 sueros negativos).

- 1.2.2. Las muestras problema que presenten valores de absorbancia inferiores al punto de corte se consideran negativas.

- 1.2.3. Las muestras problema que presenten valores de absorbancia superiores al punto de corte + 0,15 se consideran positivas.

- 1.2.4. Las muestras problema que presenten valores de absorbancia intermedios se consideran no concluyentes, por lo que debe emplearse otra técnica para confirmar el resultado.

▼ **M2****2. Técnica ELISA de bloqueo para la detección de anticuerpos contra el virus de la peste equina (VPE)**

La técnica ELISA de bloqueo de competición está diseñada para detectar anticuerpos específicos contra el virus de la peste equina presentes en sueros de cualquier especie de équidos, es decir, caballos, burros, cebras y sus cruces, y evita el problema de la especificidad que a veces surge al utilizar técnicas ELISA indirectas.

El principio de esta prueba es bloquear la reacción que tiene lugar entre la proteína VP7 recombinante absorbida en una placa de ELISA y un anticuerpo monoclonal específico de VP7 de VPE conjugado. Los anticuerpos del suero problema bloquean la reacción entre el antígeno y el anticuerpo monoclonal, lo que se materializa en una reducción del color. Teniendo en cuenta que el anticuerpo monoclonal va dirigido contra la VP7, el ensayo presentará un alto nivel de sensibilidad y especificidad.

La técnica ELISA de bloqueo de competición está disponible en el comercio.

**2.1. Procedimiento de la prueba****2.1.1. Fase sólida**

2.1.1.1. Recubrir las placas de ELISA con 50-100 ng de VP7 recombinante de la cepa 4 del virus (VPE-4) diluida en una solución amortiguadora de carbonato/bicarbonato, pH 9,6. Incubar durante toda la noche a 4 °C.

2.1.1.2. Lavar las placas tres veces con solución salina amortiguadora fosfatada (PBS) 0,1x que contenga 0,135 M NaCl y 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST). Golpear suavemente las placas contra un material absorbente para eliminar los restos de solución de lavado que pudieran quedar.

**2.1.2. Muestras problema y controles**

2.1.2.1. Diluir los sueros problema y los sueros control positivo y negativo a 1/5 en diluyente que contenga 0,35 M NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20 y 0,1 % Kathon, a razón de 100 µl por pocillo. Incubar durante una hora a 37 °C.

Para la titulación, hacer una serie de diluciones a 1/2 del suero problema desde 1/10 a 1/280 en 8 pocillos (100 µl por pocillo), con un solo suero por columna de la placa, y hacer la misma operación con los controles positivos y negativos. Incubar durante una hora a 37 °C.

2.1.2.2. Lavar las placas cinco veces con solución salina amortiguadora fosfatada (PBS) 0,1x que contenga 0,135 M NaCl y 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST). Golpear suavemente las placas contra un material absorbente para eliminar los restos de solución de lavado que pudieran quedar.

**2.1.3. Conjugado**

2.1.3.1. Poner en cada pocillo 100 µl de anticuerpo monoclonal anti-VP7 conjugado con peroxidasa de rábano. Este anticuerpo monoclonal debe diluirse previamente a 1/5 000–1/15 000 en una solución 1/1 de StabiZyme Select® Stabilizer (SurModics. Referencia: SZ03) en agua destilada. Incubar treinta minutos a 37 °C.

2.1.3.2. Lavar las placas cinco veces con solución salina amortiguadora fosfatada (PBS) 0,1x que contenga 0,135 M NaCl y 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST). Golpear suavemente las placas contra un material absorbente para eliminar los restos de solución de lavado que pudieran quedar.

▼ **M2**

## 2.1.4. Cromógeno/sustrato

Añadir a cada pocillo 100 µl de solución de cromógeno/sustrato, es decir, 1 ml de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] 5 mg/ml + 9 ml de solución amortiguadora de sustrato (solución amortiguadora fosfato/citrato 0,1 M de pH 4 que contenga 0,03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e incubar durante diez minutos a temperatura ambiente. Detener la formación de color añadiendo 100 µl/pocillo de SDS (dodecil-sulfato sódico) al 2 % (p/v).

## 2.1.5. Lectura

Leer los resultados a 405 nm en un lector ELISA.

## 2.2. Interpretación de los resultados

## 2.2.1. Determinar el porcentaje de bloqueo (BP) de cada muestra aplicando la siguiente fórmula, donde «Abs» significa anticuerpos:

$$BP = \frac{\text{Abs}(\text{control}^-) - \text{Abs}(\text{muestra})}{\text{Abs}(\text{control}^-) - \text{Abs}(\text{control}^+)} \times 100$$

## 2.2.2. Las muestras que presenten un valor de BP superior al 50 % se considerarán positivas para anticuerpos contra el VPE.

## 2.2.3. Las muestras que presenten un valor de BP inferior al 45 % se considerarán negativas para anticuerpos contra el VPE.

## 2.2.4. Las muestras que presenten un valor de BP comprendido entre el 45 % y el 50 % se considerarán no concluyentes y deberán volver a analizarse. Si el resultado vuelve a ser no concluyente, deberán volver a tomarse muestras de los animales, cuando hayan transcurrido al menos dos semanas desde la toma de las muestras que se hubieran considerado no concluyentes, y volver a analizarse.

## PARTE B

## Identificación del agente

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR en tiempo real)

Las pruebas de identificación del agente basadas en métodos de ácido nucleico deben detectar cepas de referencia de los nueve serotipos del virus de la peste equina.

El método descrito en el punto 2.1 se basa en el capítulo 2.5.1, sección B, punto 1.2, del Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres, edición de 2016, adoptado por la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2012.

Cualquier método de detección mediante la RT-PCR empleado para el análisis de muestras, tanto de sangre como del bazo, en el contexto de la Directiva 2009/156/CE debe igualar o superar la sensibilidad de las metodologías descritas en el punto 2.

Los virus inactivados de las cepas de referencia de los serotipos del 1 al 9 pueden obtenerse del Laboratorio de Referencia de la UE o del Laboratorio de Referencia de la OIE para la peste equina, Algete, España.

## 1. Extracción de ARN vírico

Para garantizar una buena reacción es necesario extraer de la muestra un ARN del VPE de calidad. La extracción de ácidos nucleicos de muestras clínicas puede llevarse a cabo mediante varios métodos internos y comercializados.

▼ **M2**

Los juegos comerciales utilizan enfoques diferentes para el aislamiento del ARN. La mayoría se basa en uno de los procedimientos siguientes:

- extracción de ácidos nucleicos con fenol-cloroformo,
- adsorción de ácidos nucleicos a un sistema de filtro,
- adsorción de ácidos nucleicos a un sistema de perlas magnéticas.

A continuación se expone un ejemplo de una extracción de ARN por un método interno:

- 1.1. Se homogeneiza 1 g de muestra de tejido en 1 ml de solución desnaturante (tiocianato de guanidío 4 M, citrato sódico 25 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 M, sarcosil al 0,5 %).
- 1.2. Tras la centrifugación, se añade al sobrenadante 1 µg de ARN de levadura, 0,1 ml de acetato sódico 2 M y de pH 4, 1 ml de fenol y 0,2 ml de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (49/1).
- 1.3. La suspensión se sacude enérgicamente y se refrigera en hielo durante 15 minutos.
- 1.4. Tras la centrifugación, el ARN presente en la fase acuosa se extrae con fenol, se precipita con etanol y se resuspende en agua estéril.

## 2. Procedimiento de la RT-PCR en tiempo real

- 2.1. *RT-PCR en tiempo real específica de grupo de Agüero et al., 2008* <sup>(1)</sup>

Esta RT-PCR en tiempo real específica de grupo está dirigida a la VP7 del VPE y permite detectar todos los serotipos y cepas del VPE conocidos actualmente circulantes. Además, se ha empleado con buenos resultados en los Laboratorios de Referencia nacionales de los Estados miembros de la Unión Europea que han participado en pruebas de aptitud organizadas anualmente por el Laboratorio de Referencia de la UE entre 2009 y 2015. Asimismo, en un estudio colaborativo internacional de 2015 organizado en el marco de la red de los Laboratorios de Referencia de la OIE, se otorgó un lugar destacado al presente Protocolo, entre otros.

Secuencias de sondas y de cebadores para la detección de especies del VPE:

- |                              |                                       |
|------------------------------|---------------------------------------|
| — Cebador directo            | 5'-CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG-3'      |
| — Cebador inverso            | 5'-CTA-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT-3'      |
| — Sonda Taqman con grupo MGB | 5'-FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-CCA-CTA-MGB-3' |

- 2.1.1. La solución madre del cebador se diluye hasta una concentración de trabajo de 8 µM («solución de trabajo del cebador 8 µM»), mientras que la sonda se diluye a una concentración de trabajo de 50 µM («solución de trabajo de la sonda 50 µM»). Debe diseñarse una disposición de las placas problema que se introducirá en el programa informático de la máquina de PCR en tiempo real. Utilizando esa disposición como guía, se añadirán 2,5 µl de cada solución de trabajo del cebador 8 µM a cada pocillo que vaya a contener muestras de ARN y controles positivos y/o negativos (la concentración final del cebador será de 1 µM en los 20 µl de la mezcla de reacción de RT-PCR). La placa se conserva en hielo.

<sup>(1)</sup> Agüero M., Gómez-Tejedor C., Ángeles Cubillo M., Rubio C., Romero E. y Jiménez-Clavero A. (2008). Real-time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of African horse sickness virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, 325-328.

▼ **M2**

- 2.1.2. Se mezclan 2 µl de ARN aislado (muestras problema y control positivo), o 2 µl de agua libre de ribonucleasa en los controles de reacción negativa, con los cebadores directo e inverso. Esta mezcla se desnaturaliza calentándola a 95 °C durante 5 minutos y, a continuación, se enfría rápidamente sobre hielo durante al menos 5 minutos.
- 2.1.3. Se prepara un volumen apropiado de mezcla de reacción de RT-PCR de un paso en tiempo real para el número de muestras que se van a analizar, según las instrucciones del fabricante. Se añade 0,1 µl de la solución de trabajo de la sonda 50 µM a cada pocillo que contiene muestras de ARN (la concentración final de la sonda será de 0,25 µM en cada pocillo que contenga muestras de ARN). En cada pocillo de la placa PCR que contenga los cebadores desnaturalizados y el ARN se distribuyen 13 µl de la mezcla de reacción de RT-PCR de un paso en tiempo real.
- 2.1.4. La placa se coloca en un termociclador en tiempo real programado para la transcripción inversa y la amplificación del ADNc/detección de fluorescencia. Las condiciones de amplificación consisten en un primer paso de transcripción inversa a 48 °C durante 25 minutos, seguido de 10 minutos a 95 °C («arranque en caliente») y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 35 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C (o 40 ciclos a 97 °C durante 2 segundos y 55 °C durante 30 segundos si se emplean reactivos y un termociclador que permitan reacciones rápidas). Se obtienen datos de fluorescencia al final del paso de 55 °C.
- 2.1.5. El ensayo se considera inválido si se obtienen curvas de amplificación atípicas, y debe repetirse.

Las muestras se consideran positivas si el valor Ct (el número de ciclos en el que la fluorescencia generada en una reacción supera el umbral de fluorescencia) es inferior o igual al umbral Ct definido (35) en 40 ciclos de PCR ( $Ct \leq 35$ ).

Las muestras se consideran no concluyentes si el valor Ct es superior al umbral Ct definido (35) en 40 ciclos de PCR ( $Ct \geq 35$ ).

Las muestras se consideran negativas si se obtiene una curva de amplificación horizontal que no supera el umbral en 40 ciclos de PCR.

2.2. *RT-PCR en tiempo real específica de grupo de Guthrie et al., 2013* <sup>(1)</sup>

La RT-PCR en tiempo real emplea sondas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para detectar ácidos nucleicos del VPE.

La prueba descrita de RT-PCR del VPE se diseñó empleando secuencias de una amplia variedad de cepas silvestres actualmente circulantes del VPE (Quan *et al.*, 2010 <sup>(2)</sup>). También incorpora una prueba de control externo sintético patentado para comprobar el funcionamiento adecuado de los componentes de la prueba.

Los juegos para la PCR de un paso en tiempo real están disponibles comercialmente. A continuación se presentan algunos de los pasos básicos descritos por Guthrie *et al.* (2013), que pueden modificarse según los requisitos específicos de cada caso/locales, los juegos empleados y el equipo disponible.

<sup>(1)</sup> Guthrie AJ, MacLachlan NJ, Joone C, Lourens CW, Weyer CT, Quan M, Monyai MS, Gardner IA. Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus. *Journal of Virological Methods*. 2013;189(1):30-5.

<sup>(2)</sup> Quan, M., Lourens, C.W., MacLachlan, N.J., Gardner, I.A., Guthrie, A.J., 2010. Development and optimisation of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay targeting the VP7 and NS2 genes of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods* 167, 45–52.

▼ M2

Secuencias de sondas y de cebadores para la detección de especies del VPE:

— Cebador directo	5'-AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T-3'
— Cebador inverso	5'-GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA-3'
— Sonda Taqman con grupo MGB	5'-FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB-3'

- 2.2.1. Las soluciones madre de mezclas de sondas y cebadores se realizan a una concentración 25×: a 5 µM para los cebadores directos e inversos y a 3 µM para la sonda. Debe diseñarse una disposición de placas de prueba que se introducirá en el programa informático de la máquina de PCR en tiempo real. Mediante el uso de la disposición como guía, se añadirán 5 µl de muestras de ARN, incluyendo las muestras problema y los controles positivo y negativo, a los pocillos de la placa apropiados según la disposición.
- 2.2.2. El ARN se desnaturaliza calentándolo a 95 °C durante 5 minutos, y, a continuación, se enfría rápidamente sobre hielo durante al menos 3 minutos.
- 2.2.3. Se prepara un volumen apropiado de mezcla de reacción de RT-PCR de un paso en tiempo real para el número de muestras que se analizarán, según las instrucciones del fabricante. Se añade 1 µl de solución madre de mezcla de sondas y cebadores 25× (punto 2.2.1 anterior) en la mezcla de reacción para obtener una concentración final en cada pocillo de 200 nM para cada cebador y 120 nM para cada sonda. Se distribuyen 20 µl de la mezcla de reacción en cada pocillo de la placa PCR que contenga el ARN desnaturalizado.
- 2.2.4. La placa se coloca en un termociclador en tiempo real programado para la transcripción inversa y la amplificación del ADNc/detección de fluorescencia tal como sugieren los fabricantes. Las condiciones de amplificación consisten, por ejemplo, en una primera fase de transcripción inversa a 48 °C durante 10 minutos, seguida de 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 45 segundos a 60 °C.
- 2.2.5. Las muestras se consideran positivas si la fluorescencia normalizada para la prueba RT-PCR del VPE supera el umbral de 0,1 en menos de 36 ciclos de PCR con todas las réplicas de una muestra.
- Las muestras se consideran no concluyentes si la fluorescencia normalizada para la prueba RT-PCR del VPE supera el umbral de 0,1 en entre 36 y 40 ciclos de PCR con alguna réplica de una muestra.
- Las muestras se consideran negativas si la fluorescencia normalizada para la prueba RT-PCR del VPE no supera el umbral de 0,1 en 40 ciclos de PCR con todas las réplicas de una muestra y si la fluorescencia normalizada para la prueba de control externo sintético patentado supera el umbral de 0,1 en 33 ciclos de PCR.



## ANEXO V

## PARTE A

**Directiva derogada con la lista de sus modificaciones sucesivas**

(contempladas en el artículo 22)

Directiva 90/426/CEE del Consejo  
(DO L 224 de 18.8.1990, p. 42).

Directiva 90/425/CEE del Consejo  
(DO L 224 de 18.8.1990, p. 29).

Únicamente el artículo 15, apartado 3

Directiva 91/496/CEE del Consejo  
(DO L 268 de 24.9.1991, p. 56).

Únicamente en lo que respecta a la referencia hecha a la Directiva 90/426/CEE en el artículo 26, apartado 2

Decisión 92/130/CEE de la Comisión  
(DO L 47 de 22.2.1992, p. 26).

Directiva 92/36/CEE del Consejo  
(DO L 157 de 10.6.1992, p. 28).

Únicamente el artículo 1

Acta de adhesión de 1994, anexo I,  
punto V.E.I.A.3  
(DO C 241 de 29.8.1994, p. 132).

Decisión 2001/298/CE de la Comisión  
(DO L 102 de 12.4.2001, p. 63).

Únicamente en lo que respecta a la referencia hecha a la Directiva 90/426/CEE en el artículo 1, apartado 1 y en el anexo I, punto 2

Decisión 2002/160/CE de la Comisión  
(DO L 53 de 23.2.2002, p. 37).

Reglamento (CE) nº 806/2003 del Consejo  
(DO L 122 de 16.5.2003, p. 1).

Únicamente el anexo III, punto 10

Acta de adhesión de 2003, anexo II,  
punto 6.B.I.16  
(DO L 236 de 23.9.2003, p. 381).

Directiva 2004/68/CE del Consejo  
(DO L 139 de 30.4.2004, p. 321).

Únicamente el artículo 15

Directiva 2006/104/CE del Consejo  
(DO L 363 de 20.12.2006, p. 352).

Únicamente el anexo, punto 1.2

Directiva 2008/73/CE del Consejo  
(DO L 219 de 14.8.2008, p. 40).

Únicamente el artículo 7

## PARTE B

**Plazos de transposición al Derecho nacional**

(contemplados en el artículo 22)

Directiva	Plazo de transposición
90/426/CEE	1 de enero de 1992
90/425/CEE	1 de julio de 1992
91/496/CEE	1 de julio de 1992
92/36/CEE	31 de diciembre de 1992
2004/68/CE	19 de noviembre de 2005
2006/104/CE	1 de enero de 2007
2008/73/CE	1 de enero de 2010



## ANEXO VI

## Tabla de correspondencias

Directiva 90/426/CEE	Presente Directiva
Artículo 1	Artículo 1
Artículo 2, letras a) y b)	Artículo 2, letras a) y b)
Artículo 2, letra c)	Artículo 2, letra c), incisos i) y ii)
Artículo 2, letras d) a i)	Artículo 2, letras d) a i)
Artículo 3	Artículo 3
Artículo 4, apartados 1, 2 y 3	Artículo 4, apartados 1, 2 y 3
Artículo 4, apartado 4, incisos i) y ii)	Artículo 4, apartado 4, letras a) y b)
Artículo 4, apartado 5, letra a), primer a sexto guiones	Artículo 4, apartado 5, letra a), incisos i) a vi)
Artículo 4, apartado 5, letra b)	Artículo 4, apartado 5, letra b)
Artículo 4, apartado 6, párrafo primero, primer a octavo guiones	Artículo 4, apartado 6, párrafo primero, letras a) a h)
Artículo 4, apartado 6, párrafos segundo y tercero	Artículo 4, apartado 6, párrafos segundo y tercero
Artículo 5, apartado 1	Artículo 5, apartado 1
Artículo 5, apartado 2, letra a)	Artículo 5, apartado 2, párrafo primero, letras a) y b)
Artículo 5, apartado 2, letra b)	Artículo 5, apartado 2, párrafo segundo, letras a) y b)
Artículo 5, apartado 2, letra c)	Artículo 5, apartado 3
Artículo 5, apartado 2, letra d)	Artículo 5, apartado 4
Artículo 5, apartado 3, letras a) y b)	Artículo 5, apartado 5, letras a) y b)
Artículo 5, apartado 3, letra c), primer y segundo guiones	Artículo 5, apartado 5, letra c), párrafo primero, incisos i) y ii)
Artículo 5, apartado 3, letra c), segundo guión, última frase	Artículo 5, apartado 5, letra c), párrafo segundo
Artículo 5, apartado 3, letras d) y e)	Artículo 5, apartado 5, letras d) y e)
Artículo 6	Artículo 6
Artículo 7	Artículo 7
Artículo 8, apartado 1, párrafo primero, primer y segundo guiones	Artículo 8, apartado 1, letras a) y b)
Artículo 8, apartado 1, párrafo segundo	Artículo 8, apartado 2
Artículo 8, apartado 2	Artículo 8, apartado 3
Artículo 9	Artículo 9
Artículo 10	Artículo 10

▼B

Directiva 90/426/CEE	Presente Directiva
Artículo 11, apartado 1	Artículo 11
Artículo 11, apartado 2	—
Artículo 12	Artículo 12
Artículo 13	Artículo 13
Artículo 14	Artículo 14
Artículo 15	Artículo 15
Artículo 16, apartado 1, letras a) a f)	Artículo 16, apartado 1, letras a) a f)
Artículo 16, apartado 1, frase final	—
Artículo 16, apartado 2	Artículo 16, apartado 2
Artículo 17	Artículo 18
Artículo 18	Artículo 17
Artículo 19, incisos i) a iv)	Artículo 19, letras a) a d)
Artículo 22	—
Artículo 23	Artículo 20
Artículo 24, apartados 1 y 2	Artículo 21, apartados 1 y 2
Artículo 24, apartado 3	—
Artículo 25, apartados 1 y 2	Artículo 21, apartados 1 y 3
Artículo 26	—
Artículo 27	—
—	Artículo 22
—	Artículo 23
Artículo 28	Artículo 24
Anexo A	Anexo I
Anexo B	Anexo II
Anexo C	Anexo III
Anexo D	Anexo IV
—	Anexo V
—	Anexo VI