

Este texto constitui um instrumento de documentação e não tem qualquer efeito jurídico. As Instituições da União não assumem qualquer responsabilidade pelo respetivo conteúdo. As versões dos atos relevantes que fazem fé, incluindo os respetivos preâmbulos, são as publicadas no Jornal Oficial da União Europeia e encontram-se disponíveis no EUR-Lex. É possível aceder diretamente a esses textos oficiais através das ligações incluídas no presente documento

► **B**

DIRECTIVA 2009/156/CE DO CONSELHO

de 30 de Novembro de 2009

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

(versão codificada)

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(JO L 192 de 23.7.2010, p. 1)

Alterada por:

		Jornal Oficial		
		n.º	página	data
► <u>M1</u>	Diretiva 2013/20/UE do Conselho de 13 de maio de 2013	L 158	234	10.6.2013
► <u>M2</u>	Decisão de Execução (UE) 2016/1840 da Comissão de 14 de outubro de 2016	L 280	33	18.10.2016

**DIRECTIVA 2009/156/CE DO CONSELHO****de 30 de Novembro de 2009****relativa às condições de polícia sanitária que regem a circulação de equídeos e as importações de equídeos provenientes de países terceiros****(versão codificada)****(Texto relevante para efeitos do EEE)**

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 do Conselho, de 26 de Junho de 1990, relativa às condições zootécnicas e genealógicas que regem o comércio intracomunitário de equídeos ⁽¹⁾, identificado através de um documento de identificação emitido:
 - i) pela autoridade de criação ou qualquer outra autoridade competente do país de origem do equídeo responsável pelo livro genealógico; ou
 - ii) 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 agrupamento a que se refere o artigo 7.º 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;

⁽¹⁾ JO L 224 de 18.8.1990, p. 55.

▼B

- g) «Doenças de declaração obrigatória»: as doenças mencionadas no anexo I;
- h) «Veterinário oficial»: o veterinário designado pela autoridade central competente do Estado-Membro ou de um país terceiro;
- i) «Admissão temporária»: o estatuto proveniente de um país terceiro e autorizado a permanecer no território da Comunidade durante um período inferior a noventa dias, a fixar pela Comissão pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º em função da situação sanitária do país de origem.

CAPÍTULO II

REGRAS PARA A CIRCULAÇÃO DE EQUÍDEOS ENTRE ESTADOS-MEMBROS

Artigo 3.º

Um Estado-Membro apenas autoriza a circulação de equídeos registados no seu território e apenas expede 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 devem 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.

▼B

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

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

a) No que se refere aos equídeos registados, através do documento de identificação previsto na Directiva 90/427/CEE, documento esse que deve designadamente comprovar a observância dos n.ºs 5 e 6 do presente artigo e do artigo 5.º da presente directiva.

A validade do documento de identificação deve ser suspensa pelo veterinário oficial enquanto durarem as proibições previstas no n.º 5 do presente artigo ou no artigo 5.º da presente directiva. O documento de identificação deve ser restituído à autoridade que o emitiu após o abate do cavalo registado. As regras de aplicação desta alínea são aprovadas pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º;

b) No que se refere aos equídeos de criação e de rendimento, segundo método estabelecido pela Comissão, pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º

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 deve ser pelo menos igual:

i) 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,

ii) Em caso de mormo ou de encefalomielite equina, a seis meses a partir da data em que os equídeos atingidos tiverem sido eliminados,

iii) 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,

iv) A seis meses a partir do último caso de estomatite vesicular verificado,

v) A um mês, a partir do último caso de raiva verificado,

vi) A quinze dias a partir do último caso de carbúnculo bacteridiano verificado;

▼B

- 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 derrogações a estas medidas de proibição para os hipódromos e terrenos de corrida e devem informar a Comissão sobre a natureza das derrogações concedidas.

6. ►**M1** 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, no prazo de seis meses a contar de 4 de julho de 1990 no que se refere à Bélgica, Dinamarca, Alemanha, Irlanda, Grécia, Espanha, França, Itália, Luxemburgo, Países Baixos, Portugal e Reino Unido, a contar de 1 de janeiro de 1995 no que se refere à Áustria, Finlândia e Suécia, a contar de 1 de maio de 2004 no que se refere à República Checa, Estónia, Chipre, Letónia, Lituânia, Hungria, Malta, Polónia, Eslovénia e Eslováquia, a contar de 1 de janeiro de 2007 no que se refere à Bulgária e Roménia e a contar de 1 de julho de 2013 no que se refere à Croácia, indicando, nomeadamente: ◀

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

Os programas comunicados pelos Estados-Membros são analisados pela Comissão. Se for caso disso, a Comissão aprova esses programas, respeitando os critérios enunciados no parágrafo anterior, pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º. Pelo mesmo procedimento, podem ser indicadas as garantias complementares, gerais ou limitadas, que podem ser exigidas. Essas garantias devem ser, no máximo, equivalentes às que o Estado-Membro aplica no âmbito nacional.

▼B

Os programas apresentados pelos Estados-Membros podem ser alterados ou completados pelo procedimento a que se refere o n.º 3 do artigo 21.º. Pelo mesmo procedimento, pode ser aprovada uma alteração ou um complemento a um programa anteriormente aprovado e às garantias definidas nos termos do segundo parágrafo do presente número.

Artigo 5.º

1. Os Estados-Membros não indemnes da peste equina só podem expedir equídeos provenientes da parte do território considerada infectada na acepção do n.º 2 nas condições fixadas no n.º 5.

2. Uma parte do território de um Estado-Membro é considerada infectada pela peste equina se:

- a) 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
- b) No decorrer dos últimos 12 meses, tiver sido feita a vacinação contra a peste equina.

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

- a) Uma zona de protecção com um raio de, pelo menos, 100 quilómetros em redor do foco de infecção;
- b) 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.

3. As regras de controlo e as medidas de luta contra a peste equina relativas aos territórios e zonas a que se refere o n.º 2, assim como as derrogações que lhes digam respeito, são precisadas na Directiva 92/35/CEE do Conselho, de 29 de Abril de 1992, que define as regras de controlo e as medidas de luta contra a peste equina ⁽¹⁾.

4. Todos os equídeos vacinados que se encontrem na zona de protecção devem ser registados e marcados nos termos da alínea d) 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.

5. Um Estado-Membro só pode expedir do território referido no segundo parágrafo 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 procedimento a que se refere o n.º 3 do artigo 21.º;
- b) Não apresentarem qualquer sinal clínico de peste equina no dia da inspecção referida no n.º 1 do artigo 4.º;

⁽¹⁾ JO L 157 de 10.6.1992, p. 19.

▼B

- c) Terem sido submetidos, por duas vezes, a um teste para a peste equina descrito no anexo IV, com um intervalo compreendido entre 21 e 30 dias, devendo o segundo teste ter sido efectuado nos 10 dias anteriores à expedição, alternativamente:
- i) Com resultados negativos, caso não tenham sido vacinados contra a peste equina, ou
 - ii) Sem que se tenha verificado um aumento de anticorpos e a vacinação não se tenha realizado durante os dois últimos meses, caso tenham sido vacinados contra a peste equídea.
- Pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º, e após parecer da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, outros métodos de controlo podem ser reconhecidos;
- 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.

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 podem conceder mutuamente, numa base de reciprocidade, uma derrogação ao disposto na segunda frase do n.º 1 do artigo 4.º e na alínea b) do n.º 1 do artigo 8.º

Do facto informam 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 centro de agrupamento aprovado, tal como definido na alínea o) do n.º 2 do artigo 2.º da Directiva 64/432/CEE do Conselho, de 26 de Junho de 1964, relativa a problemas de fiscalização sanitária em matéria de comércio intracomunitário de animais das espécies bovina e suína⁽¹⁾, num meio de transporte e num espaço regularmente limpos e desinfectados com um desinfectante 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. Sem prejuízo do Regulamento (CE) n.º 1/2005, 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, de acordo com o anexo III, faça referência a essa derrogação.

⁽¹⁾ JO 121 de 29.7.1964, p. 1977.

▼B

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 velam por que:

- a) Os equídeos registados sejam acompanhados, ao abandonarem a exploração respectiva, do documento de identificação previsto na alínea a) do n.º 4 do artigo 4.º e, se se destinarem às trocas intra-comunitárias, desse documento de identificação completado pelo atestado de saúde previsto no anexo II;
- 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 III.

2. O certificado de saúde ou, no caso de equídeos registados, o atestado de saúde, 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 de saúde ou do atestado de saúde é de dez dias. O certificado de saúde ou atestado de saúde deve consistir numa só folha.

3. Para a circulação entre Estados-Membros, os equídeos que não os equídeos registados podem ser efectuadas ao abrigo de apenas um certificado sanitário por lote, em vez de certificado individual de saúde a que se refere a alínea b) do n.º 1.

Artigo 9.º

São aplicáveis as regras previstas na Directiva 90/425/CEE, 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.

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 informa os Estados-Membros do resultado dos controlos efectuados.

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

▼B

As regras de aplicação do presente artigo são aprovadas pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º

CAPÍTULO III

REGRAS PARA AS IMPORTAÇÕES DE EQUÍDEOS PROVENIENTES DE PAÍSES TERCEIROS*Artigo 11.º*

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

Artigo 12.º

1. A importação de equídeos na Comunidade apenas é autorizada quando estes forem provenientes dos países terceiros constantes de uma lista a estabelecer ou a alterar pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º

Tendo em conta a situação sanitária e as garantias apresentadas pelo país terceiro no que diz respeito aos equídeos, pode ser decidido, pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º, que a autorização prevista no primeiro parágrafo do presente parágrafo seja aplicável à totalidade do território do país terceiro ou apenas a parte deste.

Para esse fim, é 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 a lista prevista no n.º 1, são 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 inspeção, 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;

▼B

- e) Se o país terceiro é membro da Organização Mundial da Saúde Animal (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 I 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 I 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 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 deve tomar as disposições necessárias para que sejam facultadas ao público versões actualizadas da lista estabelecida ou alterada nos termos do n.º 1.

Essa lista pode ser combinada com outras listas elaboradas para fins de protecção da saúde animal e da saúde pública e podem também incluir modelos de certificados sanitários.

4. Devem ser estabelecidas condições especiais de importação para cada país terceiro ou grupo de países terceiros pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º, tendo em conta a respectiva situação zoossanitária no que se refere aos equídeos.

5. As regras de execução dos n.ºs 1 a 4 e os critérios para a inclusão de países terceiros ou partes de países terceiros nas listas previstas no n.º 1 podem ser aprovados pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º

Artigo 13.º

1. Os equídeos devem provir de países terceiros que sejam:
 - 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.

▼B

2. Pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º, pode ser decidido:

- a) Que o n.º 1 do presente artigo 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 5 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 da alínea a) do n.º 2 do artigo 13.º, durante um período a fixar nas 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 da alínea a) do n.º 2 do artigo 13.º constante da lista elaborada nos termos do n.º 1 do artigo 12.º, só é autorizada se, para além dos requisitos do artigo 13.º:

- a) Os equídeos em questão satisfizerem as condições sanitárias aprovadas pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º, para as importações de equídeos desse país em função da espécie em causa, das categorias de equídeos e do tipo de importação.

Para fixar esses requisitos de polícia sanitária 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 b) do artigo 19.º, a um teste serológico ou a um vírus de isolamento ou a qualquer outro teste aprovado pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º, que garanta que o animal se encontra indemne dessa doença.

▼B

Pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º, e após parecer do Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, as categorias de equídeos machos a que esta exigência é aplicável podem ser delimitadas.

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 de saúde passado por um veterinário oficial do país terceiro exportador. O certificado de saúde 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.

Se decidirem recorrer a esta opção, os Estados-Membros devem informar a Comissão.

2. Este certificado deve ser redigido num formulário conforme com o modelo elaborado pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º

Artigo 17.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 agrupamento aprovado, tal como referido no artigo 7.º e, em conformidade com as exigências de polícia sanitária, ser abatidos num prazo a fixar nas decisões a tomar em aplicação do artigo 15.º

2. Sem prejuízo das condições especiais eventualmente fixadas pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.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 18.º

São 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 deve informar imediatamente os Estados-Membros desse facto e adoptar imediatamente uma decisão que inclua a suspensão provisória da aprovação. É tomada uma decisão definitiva a este respeito pelo procedimento a que se refere o n.º 3 do artigo 21.º

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

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

A periodicidade e as modalidades desses controlos são determinadas pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º

Artigo 19.º

Pelo procedimento a que se refere o n.º 2 do artigo 21.º:

- a) Pode ser limitada a importação proveniente de um país terceiro, ou de uma parte de um país terceiro, a espécies ou categorias especiais de equídeos;
- b) 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 são definidas;
- c) As condições que permitem converter uma admissão temporária em admissão definitiva são determinadas;
- d) Um laboratório comunitário de referência para uma ou mais das doenças dos equídeos mencionada(s) no anexo I pode ser designado e as funções, tarefas e procedimentos para a colaboração com os laboratórios encarregados de diagnosticar doenças infecciosas dos equídeos nos Estados-Membros são definidas.

CAPÍTULO IV

DISPOSIÇÕES FINAIS*Artigo 20.º*

Os anexos I a IV são alterados pelo procedimento a que se refere o n.º 3 do artigo 21.º

Artigo 21.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 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ JO L 31 de 1.2.2002, p. 1.

▼B

2. Sempre que se faça referência ao presente número, 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 três meses.

3. Sempre que se faça referência ao presente número, 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.

Artigo 22.º

A Directiva 90/426/CEE, com a redacção que lhe foi dada pelas directivas referidas na Parte A do anexo V, é revogada, sem prejuízo das obrigações dos Estados-Membros no que respeita aos prazos de transposição das directivas para o direito interno indicados na Parte B do anexo V.

As remissões para a directiva revogada devem entender-se como sendo feitas para a presente directiva e ler-se nos termos do quadro de correspondência constante do anexo VI.

Artigo 23.º

A presente directiva entra em vigor no vigésimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

Artigo 24.º

Os Estados-Membros são destinatários da presente directiva.

▼B

ANEXO I

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,
- estomatite vesicular.



ANEXO II

MODELO

ATESTADO SANITÁRIO ^(a)

Passaporte no

Eu, abaixo assinado, certifico ^(b) 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/objecto de medidas restritivas devido à peste equina, 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 n.º 5 do artigo 5.º da Directiva 2009/156/CE ^(c),

— não foi vacinado contra a peste equina, ou

foi vacinado contra a peste equina em ^(c) ^(d);

- 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 desinfecção dos locais, excepto no caso do carbúnculo bacteriano, relativamente ao qual a proibição é de 15 dias;

^(a) Este atestado não é exigido em caso de acordo bilateral concluído nos termos do artigo 6.º da Directiva 2009/156/CE.

^(b) Válido por 10 dias.

^(c) Riscar a menção inútil.

^(d) A menção da vacinação deve constar do passaporte.

▼B

- 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;
- f) Aquando da inspecção, os animais supramencionados estavam aptos para serem transportados na viagem prevista, em conformidade com as disposições do Regulamento (CE) n.º 1/2005 ⁽⁴⁾.

Data	Local	Carimbo e assinatura do veterinário oficial ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Apelido em maiúsculas e qualidade.

⁽⁴⁾ 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.



ANEXO III

MODELO

CERTIFICADO SANITÁRIO

para o comércio entre os Estados-Membros

EQUÍDEOS

COMUNIDADE EUROPEIA				Certificado intracomunitário				
Parte I: Detalhes relativos a remessa apresentada	I.1. Expedidor Nome Endereço Código postal				I.2. N.º de referência do certificado		I.2.a. N.º de referência local	
					I.3. Autoridade central competente			
	I.5. Destinatário Nome Endereço Código postal				I.4. Autoridade local competente			
					I.6. N.º dos certificados originais associados N.º dos documentos de acompanhamento			
	I.7.							
	I.8. País de origem		Código ISO		I.9. Região de origem		Código	
	I.10. País de destino		Código ISO		I.11. Região de destino		Código	
	I.12. Local de origem Exploração <input type="checkbox"/> Centro de agrupamento <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/> Nome Endereço Código postal				I.13. Local de destino Exploração <input type="checkbox"/> Centro de agrupamento <input type="checkbox"/> Estabelecimento <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/> Nome Endereço Código postal			
	Número de aprovação				Número de aprovação			
	I.14. Local de carregamento Código postal				I.15. Data e hora da partida			
	I.16. Meios de transporte Avião <input type="checkbox"/> Navio <input type="checkbox"/> Veículo rodoviário <input type="checkbox"/> Vagão ferroviário <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/> Identificação:				I.17. Transportador Nome Endereço Código postal			
	Número de aprovação				Estado-Membro			
	I.18. Descrição da mercadoria				I.19. Código do produto (Código NC)			
					I.20. Número/Quantidade			
	I.21.				I.22. Número de embalagens			
I.23. N.º do selo e n.º do contentor				I.24. Tipo de acondicionamento				
I.25. Mercadorias certificadas para Reprodução <input type="checkbox"/> Equídeos registados <input type="checkbox"/> Abate <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/>								
I.26. Trânsito por país terceiro <input type="checkbox"/> País terceiro Ponto de saída Ponto de entrada				I.27. Trânsito por Estados-Membros <input type="checkbox"/> Estado-Membro Estado-Membro Estado-Membro				
Código ISO Código N.º do PIF				Código ISO Código ISO Código ISO				
I.28. Exportação <input type="checkbox"/> País terceiro Ponto de saída				I.29. Duração prevista do transporte				
Código ISO Código								
I.30. Guia de marcha Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>								
I.31. Identificação das mercadorias Espécie (Designação científica) Sistema de identificação								



COMUNIDADE EUROPEIA

Equídeos registados, equídeos de criação e de rendimento, equídeos para abate

		II.a. Número de referência do certificado	II.b. Número de referência local
Parte II: Certificação	II. Informações sanitárias ⁽¹⁾		
	Eu, abaixo assinado, certifico que o(s) equídeo(s) anteriormente indicado(s) satisfaz(em) as seguintes condições:		
	II.1	foi/foram examinado(s) nesta data e não apresenta(m) qualquer sinal clínico de doença.	
	II.2	não é/ não são destinado(s) ao abate no âmbito de um programa de erradicação de uma doença contagiosa ou infecciosa aplicado no Estado-Membro.	
	<i>quer</i> ⁽²⁾ II.3	não provém/não provém do território ou de uma parte do território de um Estado-Membro objecto de medidas restritivas devido à peste equina;]	
	<i>quer</i> ⁽²⁾ II.3	provém/provém do território ou de uma parte do território de um Estado-Membro objecto de medidas restritivas devido à peste equina e permaneceu/permaneceram durante, pelo menos, 40 dias antes da expedição na estação de quarentena à prova de vectores de e foi/foram submetido(s) a um teste para detecção de anticorpos do vírus da peste equina, tal como descrito no anexo IV da Directiva 2009/156/CE, efectuado simultaneamente em amostras de sangue colhidas em duas ocasiões com um intervalo compreendido entre 21 e 30 dias em (<i>inserir data</i>) e durante os 10 dias anteriores à expedição em (<i>inserir data</i>);	
	<i>quer</i> ⁽³⁾	[com resultados negativos em cada caso, se não tiver/nãotiverem sido vacinado(s) contra a peste equina;]	
	<i>quer</i> ⁽²⁾	[sem aumento do número de anticorpos, se tiver/tiverem sido vacinado(s) contra a peste equina;]	
	<i>quer</i> ⁽³⁾ II.4	não foi/não foram vacinado(s) contra a peste equina;]	
	<i>quer</i> ⁽²⁾ II.4	foi/foram vacinado(s) contra a peste equina em (<i>inserir data</i>),	
	<i>quer</i> ⁽³⁾	[pelo menos dois meses antes da certificação;]	
	<i>quer</i> ⁽²⁾	[pelo menos dois meses antes da entrada na estação de quarentena;]	
	II.5	não provém/não provém de uma exploração objecto de uma ordem de proibição por motivos de polícia sanitária que tenha estabelecido pelo menos uma das seguintes condições:	
	<i>quer</i> ⁽³⁾	[nem todos os animais, de espécies sensíveis às doenças mencionadas nas seguintes alíneas a) a g) presentes na exploração foram abatidos e a proibição durou pelo menos:	
	a)	no caso de equídeos suspeitos de terem contraído tripanossomiase dos equídeos,	
<i>quer</i> ⁽²⁾	[seis meses com início na data do último contacto real ou possível com um animal doente ou infectado com <i>Trypanosoma equiperdum</i> ;		
<i>quer</i> ⁽²⁾	[no caso de um macho reprodutor, até o animal ter sido castrado;]		
b)	no caso do mormo, seis meses com início no dia em que foram mortos e destruídos os equídeos infectados com a doença ou sujeitos, com resultados positivos, a um teste de detecção do agente patogénico responsável <i>Burkholderia mallei</i> ou de anticorpos a esse agente patogénico;		
c)	no caso de encefalomielite equina de qualquer tipo, seis meses com início no dia em que os equídeos infectados com a doença foram abatidos, excepto no caso da infecção pelo vírus do Nilo Ocidental, caso em que o período de seis meses começa no dia em que os equídeos infectados morreram, foram removidos da exploração ou recuperaram totalmente;		



COMUNIDADE EUROPEIA

Equídeos registados, equídeos de criação e de rendimento, equídeos para abate

II. Informações sanitárias ⁽¹⁾	II.a. Número de referência do certificado	II.b. Número de referência local
<p>d) no caso da anemia infecciosa, até à data em que, depois de abatidos os animais infectados, os restantes animais reagiram negativamente a um teste de Coggins efectuado em amostras de sangue colhidas em duas ocasiões com um intervalo de três meses;</p> <p>e) no caso da estomatite vesiculosa, seis meses a contar do último caso;</p> <p>f) no caso da raiva, um mês a contar do último caso;</p> <p>g) no caso do carbúnculo, 15 dias a contar do último caso;]</p> <p><i>quer</i> ⁽²⁾ [no seguimento de casos de tripanossomiase dos equídeos, mormo, encefalomielite equina de todos os tipos, anemia infecciosa dos equinos, estomatite vesiculosa, carbúnculo, raiva, todos os animais da exploração de espécies sensíveis à doença em causa foram abatidos ou mortos e a proibição durou 30 dias, ou 15 dias no caso do carbúnculo, a contar da data em que, após eliminação dos animais, a desinfeção das instalações foi efectuada de modo satisfatório;]</p> <p>II.6 o(s) equídeo(s), tanto quanto me é dado conhecer, não esteve/não estiveram em contacto com equídeos atingidos por uma doença infecciosa ou contagiosa durante os últimos 15 dias;</p> <p>II.7 aquando da inspecção, os animais supramencionados estavam aptos para serem transportados na viagem prevista, em conformidade com as disposições do Regulamento (CE) n.º 1/2005 ⁽³⁾.</p>		
Notas		
Parte I		
Casa I.6: Corresponde ao número da licença CITES no caso dos equídeos indicados na convenção de Washington sobre as espécies protegidas e produtos delas derivados.		
Casa I.16: Número de registo/matricula (carruagens ferroviárias ou contentores e camiões), número do voo (avião) ou nome (navio).		
Casa I.19: Usar o código adequado do Sistema Harmonizado (SH) da Organização Mundial das Alfândegas: 01.01.01 ou 01.01.06.19.		
Casa I.31: Espécies: cavalos, burros, muares, zebras (incluindo respectivos cruzamentos).		
Sistema de identificação: até 31 de Dezembro de 2009, corresponde a um número de identificação, como descrito no artigo 2.º da Decisão 2000/68/CE, e, a partir de 1 de Janeiro de 2010, ao número único vitalício descrito na alínea d) do artigo 2.º, e na secção 1, parte A, ponto 4, do anexo I do Regulamento (CE) n.º 504/2008.		
Parte II		
⁽¹⁾ As informações mencionadas nos pontos II.1. a II.6. não são exigidas em caso de acordo bilateral concluído nos termos do artigo 6.º da Directiva 2009/156/CE.		
⁽²⁾ Riscar o que não interessa.		
⁽³⁾ 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.		
— O presente certificado é válido por 10 dias.		
— O carimbo e a assinatura devem ser de uma cor diferente da utilizada nas outras menções do certificado.		
Veterinário oficial ou inspector oficial		
Nome (em maiúsculas):	Qualificações e cargo:	
Unidade veterinária local:	N.º da UVL relacionada:	
Data:	Assinatura:	
Carimbo		

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

Testes serológicos

Os métodos serológicos seguidamente descritos consistem em ensaios de imunoborção enzimática (ELISA) baseados no capítulo 2.5.1, secção B, ponto 2, do Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres, edição de 2016, adotado pela Assembleia Mundial dos Delegados da OIE em maio de 2012.

A proteína vírica VP7 é uma importante proteína antigénica imunodominante do vírus da peste equina (AHSV), sendo conservada nos nove serótipos do AHSV. Está demonstrado que as proteínas recombinantes AHSV-VP7 são estáveis, inócuas e adequadas para utilização como antígenos em procedimentos ELISA para a determinação de anticorpos anti-AHSV com um elevado grau de sensibilidade e especificidade (Laviada *et al.*, 1992b ⁽¹⁾; Maree e Paweska, 2005). O ensaio ELISA indireto e o ensaio ELISA de bloqueio são os dois ensaios ELISA AHS-VP7 adequados para o diagnóstico serológico da peste equina (AHS).

1. Ensaio ELISA indireto para a deteção de anticorpos contra o vírus da peste equina (AHSV)

O conjugado utilizado no presente método é uma antigama globulina de cavalo conjugada com peroxidase de rábano que reage com o soro de cavalos, mulas e burros. O método descrito por Maree & Paweska (2005) ⁽²⁾ utiliza a proteína G como conjugado que também reage com soro de zebra.

O antígeno pode ser fornecido pelo *Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA)*, Espanha, no prazo de quatro a seis meses a contar da data do pedido.

1.1. Procedimento de ensaio

1.1.1. Fase sólida

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

1.1.1.2. 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.

1.1.1.3. Bloquear as placas mediante a adição a cada alvéolo de 200 µl de tampão fosfato (PBS) pH 7,2 com 5 % (m/v) de leite desnatado (leite em pó desnatado NestléTM, incubando a 37 °C durante uma hora.

1.1.1.4. Remover a solução de bloqueio; inverter e bater levemente com as placas num material absorvente.

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

⁽²⁾ Maree S. and 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. Amostras em análise

- 1.1.2.1. Diluir as amostras de soro para analisar, 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.

Para a titulação, 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.

- 1.1.2.2. 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.

1.1.3. Conjugado

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

- 1.1.3.2. 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.

1.1.4. Cromogénio/Substrato

- 1.1.4.1. Distribuir por cada alvéolo 200 µl de solução cromogénio/substrato [10 ml DMAB (dimetilaminobenzaldeído) 80,6 mM + 10 ml MBTH (cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolino-hidrazona) 1,56 mM + 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).

- 1.1.4.2. Efetuar as leituras espectrofotométricas da densidade ótica (DO) a 600 nm (ou 620 nm).

1.2. *Interpretação dos resultados*

- 1.2.1. Calcular o valor-limite (*cut-off*) adicionando 0,06 ao valor obtido para a testemunha negativa (0,06 é o desvio-padrão obtido com um grupo de 30 soros negativos).

- 1.2.2. As amostras em análise que apresentarem valores de absorvância inferiores ao valor-limite são consideradas negativas.

- 1.2.3. As amostras em análise que apresentarem valores de absorvância superiores ao valor-limite acrescido de 0,15 são consideradas positivas.

- 1.2.4. As amostras em análise que apresentarem valores de absorvância intermédios são consideradas inconclusivas, devendo utilizar-se outra técnica para confirmar o resultado.

▼ **M2****2. Ensaio ELISA de bloqueio para a deteção de anticorpos contra o vírus da peste equina (AHSV)**

O ensaio ELISA competitivo de bloqueio foi concebido para a deteção de anticorpos específicos anti-AHSV em soros de quaisquer espécies de equídeos, ou seja, cavalos, burros, zebras e respetivos cruzamentos, evitando o problema da especificidade encontrado ocasionalmente quando se utilizam ensaios ELISA indiretos.

O princípio do ensaio consiste no bloqueio da reação entre a proteína recombinante VP7 absorvida na placa ELISA e um anticorpo monoclonal (Mab) conjugado específico da AHS-VP7. Os anticorpos do soro da amostra em análise bloqueiam a reação entre o antígeno e o Mab, resultando numa redução da coloração. Uma vez que o Mab é dirigido contra a VP7, o ensaio apresenta um elevado nível de sensibilidade e especificidade.

O ensaio ELISA competitivo de bloqueio está disponível comercialmente.

2.1. Procedimento de ensaio**2.1.1. Fase sólida**

2.1.1.1. Revestir as placas ELISA com 50-100 ng de proteína recombinante AHSV-4 VP7 diluída em tampão carbonato-bicarbonato a pH 9,6. Incubar a 4 °C de um dia para o outro.

2.1.1.2. Lavar as placas três vezes com PBS 0,1× contendo 0,135 M de NaCl e 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST). Inverter e bater levemente com as placas num material absorvente, para a remoção de resíduos da solução de lavagem.

2.1.2. Amostras em análise e testemunhas

2.1.2.1. Diluir as amostras de soro para analisar, bem como os soros das testemunhas positiva e negativa, na proporção 1:5, em solvente com 0,35 M de NaCl, 0,05 % (v/v) de Tween 20 e 0,1 % de Kathon, adicionando 100 µl a cada alvéolo. Incubar a 37 °C durante uma hora.

Para a titulação, distribuir por 8 alvéolos (100 µl/alvéolo) diluições sucessivas para metade, de 1:10 para 1:280, dos soros em análise, um soro por coluna, procedendo da mesma forma com as testemunhas positiva e negativa. Incubar a 37 °C durante uma hora.

2.1.2.2. Lavar as placas cinco vezes com PBS 0,1× contendo 0,135 M de NaCl e 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST). Inverter e bater levemente com as placas num material absorvente, para a remoção de resíduos da solução de lavagem.

2.1.3. Conjugado

2.1.3.1. Distribuir por cada alvéolo 100 µl de Mab anti-VP7 conjugado com peroxidase de rábano. Previamente, o Mab deve ser diluído a 1/5 000-1/15 000 numa solução 1/1 de estabilizador StabiliZyme Select® (Sur-Modics. Referência: SZ03) em água destilada. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.

2.1.3.2. Lavar as placas cinco vezes com PBS 0,1× contendo 0,135 M de NaCl e 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBST). Inverter e bater levemente com as placas num material absorvente, para a remoção de resíduos da solução de lavagem.

▼ **M2**

2.1.4. 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 (0,1 M 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).

2.1.5. Leitura

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

2.2. *Interpretação dos resultados*

2.2.1. Determinar a percentagem de bloqueio (PB) de cada amostra aplicando a seguinte fórmula, em que «AC», corresponde a «anticorpos»:

$$PB = \frac{AC(\text{testemunha}^-) - AC(\text{amostra})}{AC(\text{testemunha}^-) - AC(\text{testemunha}^+)} \times 100$$

2.2.2. As amostras com um valor PB superior a 50 % devem ser consideradas positivas em relação aos anticorpos anti-AHSV.

2.2.3. As amostras com um valor PB inferior a 45 % devem ser consideradas negativas em relação aos anticorpos anti-AHSV.

2.2.4. As amostras com um valor PB entre 45 % e 50 % devem ser consideradas inconclusivas e sujeitas a um novo ensaio. Se o resultado for novamente inconclusivo, os animais devem ser submetidos a um novo ensaio em amostras colhidas não antes de duas semanas depois de a amostra considerada inconclusiva ter sido colhida.

PARTE B

Identificação do agente

Transcriptase reversa associada à reação em cadeia da polimerase em tempo real (rRT-PCR)

Os testes de identificação do agente baseados em métodos de ácidos nucleicos devem detetar estirpes de referência dos nove serótipos do AHSV.

O método descrito no ponto 2.1 baseia-se no capítulo 2.5.1, secção B, ponto 1.2, do Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres, edição de 2016, adotado pela Assembleia Mundial dos Delegados da OIE em maio de 2012.

Qualquer método de deteção RT-PCR utilizado na análise de amostras de sangue ou de baço no contexto da Diretiva 2009/156/CE deve ter sensibilidade igual ou superior à dos métodos descritos no ponto 2.

Os vírus inativados das estirpes de referência dos serótipos 1 a 9 a utilizar no ensaio podem ser solicitados ao Laboratório de Referência da União Europeia ou ao Laboratório de Referência da OIE para a Peste Equina, em Algete, Espanha.

1. **Extração do ARN viral**

A fim de assegurar uma boa reação, o ARN do AHSV extraído da amostra deve ser de elevada qualidade. A extração de ácidos nucleicos de amostras clínicas pode ser realizada utilizando diversos métodos internos ou disponíveis comercialmente.

▼ **M2**

Os *kits* comerciais utilizam várias abordagens para o isolamento do ARN. Na maior parte dos casos baseiam-se num dos seguintes procedimentos:

- Extração de ácidos nucleicos por fenol-clorofórmio;
- Adsorção de ácidos nucleicos em sistemas de filtração;
- Adsorção de ácidos nucleicos em sistemas de esferas magnéticas.

Segue-se um exemplo de extração de ARN por método interno:

- 1.1. Homogeneizar 1 g de amostra de tecido em 1 ml de uma solução de desnaturação (tiocianato de guanidínio 4 M, citrato de sódio 25 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 M, sarcosil 0,5 %).
- 1.2. Após centrifugação, adicionar ao sobrenadante 1 µg de ARN de levedura, 0,1 ml de acetato de sódio 2 M pH 4, 1 ml de fenol e 0,2 ml de mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (49/1).
- 1.3. Agitar vigorosamente a suspensão e arrefecer sobre gelo durante 15 minutos.
- 1.4. Após centrifugação, o ARN presente na fase aquosa é extraído com fenol, precipitado com etanol e ressuspensão em água esterilizada.

2. Procedimento RT-PCR em tempo real

- 2.1. *RT-PCR em tempo real específico de grupo, por Agüero et al., 2008* ⁽¹⁾

Este método RT-PCR em tempo real específico de grupo tem por alvo a proteína VP7 do vírus AHSV e permite detetar todos os serótipos e estirpes conhecidos do AHSV atualmente em circulação. Foi utilizado com muito bons resultados pelos laboratórios nacionais de referência dos Estados-Membros da União Europeia que participaram nos testes de proficiência organizados anualmente pelo Laboratório de Referência da União Europeia durante o período de 2009-2015. Além disso, num ensaio colaborativo internacional organizado em 2015 no âmbito da rede de laboratórios de referência do OIE, este protocolo foi dos que obtiveram as classificações mais elevadas.

Sequências de iniciadores e sondas para deteção de vírus da espécie AHSV:

- iniciador direto 5'-CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG-3'
- iniciador inverso 5'-CTA-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT-3'
- sonda MGB-TaqMan 5'-FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-CCA-CTA-MGB-3'

- 2.1.1. Diluir a solução-mãe do iniciador para uma concentração de trabalho de 8 µM («concentração de trabalho a 8 µM do iniciador») e diluir a sonda para uma concentração de trabalho de 50 µM («concentração de trabalho a 50 µM da sonda»). Configurar a placa de ensaio e introduzir a configuração no *software* do aparelho de PCR em tempo real. Utilizando a configuração como guia, adicionar 2,5 µl da concentração de trabalho a 8 µM de cada iniciador a cada alvéolo destinado às amostras de ARN e às testemunhas positiva e/ou negativa (a concentração final do iniciador será de 1 µM em 20 µl da mistura para RT-PCR). Manter a placa em gelo.

⁽¹⁾ Agüero M., Gomez-Tejedor C., Angeles Cubillo M., Rubio C., Romero E. and Jimenez-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. Misturar 2 µl do ARN isolado (amostras em análise e testemunha positiva), ou 2 µl de água isenta de RNase nas testemunhas de reação negativa, com os iniciadores direto e inverso. Desnaturar esta mistura por aquecimento a 95 °C durante cinco minutos, seguido de arrefecimento rápido em gelo durante pelo menos cinco minutos.
- 2.1.3. Seguindo as instruções do fabricante, preparar um volume de *master mix* para RT-PCR em tempo real de uma só etapa, adequado ao número de amostras a testar. Adicionar 0,1 µl da concentração de trabalho a 50 µM da sonda a cada alvéolo contendo amostras de ARN (a concentração final da sonda será de 0,25 µM em cada alvéolo contendo amostras de ARN). Distribuir 13 µl da *master mix* para RT-PCR em tempo real de uma só etapa em cada alvéolo da placa de PCR contendo os iniciadores e o ARN desnaturados.
- 2.1.4. Colocar a placa num termociclador em tempo real programado para transcrição reversa e amplificação/deteção por fluorescência do ADNc. As condições de amplificação consistem numa primeira etapa de transcrição reversa a 48 °C durante 25 minutos, seguida de 10 minutos a 95 °C («arranque a quente») e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 35 segundos a 55 °C e 30 segundos a 72 °C (ou 40 ciclos a 97 °C durante dois segundos e a 55 °C durante 30 segundos se forem utilizados reagentes e um termociclador que permitam reações rápidas). Os dados de fluorescência são obtidos no final da etapa a 55 °C.
- 2.1.5. Se se obtiverem curvas de amplificação atípicas, o ensaio não é considerado válido e tem de ser repetido.

As amostras são consideradas positivas se o valor Ct (número de ciclos necessários para que a fluorescência gerada numa reação ultrapasse o limiar de fluorescência) for inferior ou igual ao limiar Ct definido (35) em 40 ciclos de PCR ($Ct \leq 35$).

As amostras são consideradas inconclusivas se o valor Ct for superior ao limiar Ct definido (35) em 40 ciclos de PCR ($Ct \geq 35$).

As amostras são consideradas negativas se for obtida uma curva de amplificação horizontal que não cruza o limiar em 40 ciclos de PCR.

2.2. *RT-PCR em tempo real específico de grupo, por Guthrie et al., 2013* ⁽¹⁾

RT-PCR em tempo real utilizando sondas FRET (transferência de energia por ressonância de fluorescência) para detetar ácido nucleico de AHSV.

O ensaio RT-PCR do AHSV descrito foi concebido utilizando sequências de uma grande variedade de estirpes de campo do AHSV atualmente em circulação (Quan *et al.*, 2010 ⁽²⁾). Inclui também um ensaio de controlo sintético externo patenteado, a fim de verificar o correto funcionamento dos componentes do ensaio.

Estão disponíveis comercialmente *kits* para PCR em tempo real de uma etapa. Apresentam-se em seguida algumas etapas básicas, como descritas por Guthrie *et al.* (2013), que podem ser modificadas em função dos requisitos locais ou do caso específico, dos *kits* utilizados e do equipamento disponível.

⁽¹⁾ 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.

⁽²⁾ 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.



ANEXO VI

Tabela de correspondência

Directiva 90/426/CEE	Presente directiva
Artigo 1.º	Artigo 1.º
Artigo 2.º, alíneas a) e b)	Artigo 2.º, alíneas a) e b)
Artigo 2.º, alínea c)	Artigo 2.º, alínea c) e subalíneas i) e ii)
Artigo 2.º, alíneas d) a i)	Artigo 2.º, alíneas d) a i)
Artigo 3.º	Artigo 3.º
Artigo 4.º, n.ºs 1, 2 e 3	Artigo 4.º, n.ºs 1 a 3
Artigo 4.º, n.º 4, subalíneas i) e ii)	Artigo 4.º, n.º 4, alíneas a) e b)
Artigo 4.º, n.º 5, alínea a), primeiro a sexto travessões	Artigo 4.º, n.º 5, alínea a), subalíneas i) a vi)
Artigo 4.º, n.º 5, alínea b)	Artigo 4.º, n.º 5, alínea b)
Artigo 4.º, n.º 6, primeiro parágrafo, primeiro a oitavo travessões	Artigo 4.º, n.º 6, primeiro parágrafo, alíneas a) a h)
Artigo 4.º, n.º 6, segundo e terceiro parágrafos	Artigo 4.º, n.º 6, segundo e terceiro parágrafos
Artigo 5.º, n.º 1	Artigo 5.º, n.º 1
Artigo 5.º, n.º 2, alínea a)	Artigo 5.º, n.º 2, primeiro parágrafo, alíneas a) e b)
Artigo 5.º, n.º 2, alínea b)	Artigo 5.º, n.º 2, segundo parágrafo, alíneas a) e b)
Artigo 5.º, n.º 2, alínea c)	Artigo 5.º, n.º 3
Artigo 5.º, n.º 2, alínea d)	Artigo 5.º, n.º 4
Artigo 5.º, n.º 3, alínea a) e b)	Artigo 5.º, n.º 5, alíneas a) e b)
Artigo 5.º, n.º 3, alínea c), primeiro e segundo travessões	Artigo 5.º, n.º 5, alínea c), primeiro parágrafo, subalíneas i) e ii)
Artigo 5.º, n.º 3, alínea c), segundo travessão, frase final	Artigo 5.º, n.º 5, alínea c), segundo parágrafo
Artigo 5.º, n.º 3, alíneas d) e e)	Artigo 5.º, n.º 5, alíneas d) e e)
Artigo 6.º	Artigo 6.º
Artigo 7.º	Artigo 7.º
Artigo 8.º, n.º 1, primeiro parágrafo, primeiro e segundo travessões	Artigo 8.º, n.º 1, alíneas a) e b)
Artigo 8.º, n.º 1, segundo parágrafo	Artigo 8.º, n.º 2
Artigo 8.º, n.º 2	Artigo 8.º, n.º 3
Artigo 9.º	Artigo 9.º
Artigo 10.º	Artigo 10.º

▼B

Directiva 90/426/CEE	Presente directiva
Artigo 11.º, n.º 1	Artigo 11.º
Artigo 11.º, n.º 2	—
Artigo 12.º	Artigo 12.º
Artigo 13.º	Artigo 13.º
Artigo 14.º	Artigo 14.º
Artigo 15.º	Artigo 15.º
Artigo 16.º, n.º 1, alíneas a) a (f)	Artigo 16.º, n.º 1, alíneas a) a (f)
Artigo 16.º, n.º 1, frase final	—
Artigo 16.º, n.º 2	Artigo 16.º, n.º 2
Artigo 17.º	Artigo 18.º
Artigo 18.º	Artigo 17.º
Artigo 19.º, subalíneas i) a iv)	Artigo 19.º, alíneas a) a d)
Artigo 22.º	—
Artigo 23.º	Artigo 20.º
Artigo 24.º, n.º 1 e n.º 2	Artigo 21.º n.º 1 e n.º 2
Artigo 24.º, n.º 3	—
Artigo 25.º, n.º 1 e n.º 2	Artigo 21.º n.º 1 e n.º 3
Artigo 26.º	—
Artigo 27.º	—
—	Artigo 22.º
—	Artigo 23.º
Artigo 28.º	Artigo 24.º
Anexo A	Anexo I
Anexo B	Anexo II
Anexo C	Anexo III
Anexo D	Anexo IV
—	Anexo V
—	Anexo VI