

Edição em  
língua portuguesa

## Comunicações e Informações

---

<u>Número de informação</u>	Índice	Página
	I <i>Comunicações</i>	
	.....	
	II <i>Actos preparatórios</i>	
	<b>Comissão</b>	
94/C 33/01	Proposta de directiva do Conselho que altera e actualiza a Directiva 64/432/CEE relativa a problemas de fiscalização sanitária em matéria de comércio intracomunitário de animais da espécie bovina e suína .....	1

## II

*(Actos preparatórios)*

## COMISSÃO

**Proposta de directiva do Conselho que altera e actualiza a Directiva 64/432/CEE relativa a problemas de fiscalização sanitária em matéria de comércio intracomunitário de animais da espécie bovina e suína**

(94/C 33/01)

COM(93) 698 final

*(Apresentada pela Comissão em 10 de Janeiro de 1994)*

O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA,

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

Tendo em conta a proposta da Comissão,

Tendo em conta o parecer do Parlamento Europeu,

Tendo em conta o parecer do Comité Económico e Social,

Considerando que foram realizados progressos significativos na harmonização no domínio veterinário; que, em especial, o Conselho adoptou a Directiva 90/425/CEE, de 26 de Junho de 1990, relativa aos controlos veterinários e zootécnicos aplicáveis ao comércio intracomunitário de certos animais vivos e produtos, na perspectiva da realização do mercado interno<sup>(1)</sup>, a Directiva 91/496/CEE, de 15 de Julho de 1991, que fixa os princípios relativos à organização dos controlos veterinários dos animais provenientes de países terceiros introduzidos na Comunidade e que altera as Directivas 89/662/CEE, 90/425/CEE e 90/675/CEE<sup>(2)</sup>, a Directiva 85/511/CEE, de 18 de Novembro de 1985, que estabelece medidas comunitárias de luta contra a febre aftosa<sup>(3)</sup> e a Directiva 92/119/CEE, de 17 de Dezembro de 1992, que estabelece medidas comunitárias gerais de luta contra certas doenças animais, bem como medidas específicas respeitantes à doença vesiculosa do suíno<sup>(4)</sup>;

Considerando que, neste contexto, é necessário alterar a Directiva 64/432/CEE do Conselho, de 25 de Junho de 1964, relativa a problemas de fiscalização sanitária

em matéria de comércio intracomunitário de animais da espécie bovina e suína<sup>(5)</sup>, com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 92/102/CEE, de 5 de Dezembro de 1992<sup>(6)</sup> em especial no que diz respeito ao período de permanência num Estado-membro antes do transporte, às regras de comercialização dos animais com idade inferior a quinze dias e às normas de controlo de determinadas doenças;

Considerando que a Directiva 64/432/CEE foi substancialmente alterada em diversas ocasiões; que convém, por uma questão de clareza actualizar a Directiva 64/432/CEE.

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

*Artigo 1º*

A Directiva 64/432/CEE é substituída pelo texto constante do anexo I à presente directiva.

*Artigo 2º*

Os Estados-membros porão em vigor as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva o mais tardar em 1 de Julho de 1994. Do facto informarão imediatamente a Comissão.

Sempre que os Estados-membros adoptarem tais disposições, estas devem incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As modalidades dessa referência serão adoptadas pelos Estados-membros.

*Artigo 3º*

Os Estados-membros são os destinatários da presente directiva.

<sup>(1)</sup> JO nº L 224 de 18. 8. 1990, p. 29.<sup>(2)</sup> JO nº L 268 de 24. 9. 1991, p. 56.<sup>(3)</sup> JO nº L 315 de 26. 11. 1985, p. 11.<sup>(4)</sup> JO nº L 62 de 15. 3. 1993, p. 69.<sup>(5)</sup> JO nº 121 de 29. 7. 1964, 1977/64.<sup>(6)</sup> JO nº L 355 de 5. 12. 1992, p. 32.

## ANEXO I

## Artigo 1º

A presente directiva é aplicável ao comércio intracomunitário de bovinos e de suínos.

## Artigo 2º

Para efeitos da presente directiva, entende-se por:

- a) *Exploração*: exploração na acepção do artigo 2º da Directiva 90/425/CEE do Conselho;
- b) *Animal para abate*: bovino (incluindo as espécies *Bubalus bubalus*) ou suíno destinado a um matadouro ou a um mercado a partir do qual só poderá ser transportado com vista ao abate;
- c) *Animal para reprodução ou produção*: bovino (incluindo as espécies *Bubalus bubalus*) ou suíno não abrangido pela alínea b), destinado à reprodução, produção de leite ou de carne, ou tracção;
- d) *Exploração bovínica oficialmente indemne de tuberculose*: exploração bovínica que satisfaz as condições definidas no capítulo I, nºs 1, 2 e 3, do anexo A;
- e) *Estado-membro ou parte de um Estado-membro oficialmente indemne de tuberculose*: Estado-membro ou parte de um Estado-membro que satisfaz as condições definidas no capítulo I, nºs 4, 5 e 6, do anexo A;
- f) *Exploração bovínica oficialmente indemne de brucelose*: exploração bovínica que satisfaz as condições definidas no capítulo II, nºs 1, 2 e 3, do anexo A;
- g) *Região oficialmente indemne de brucelose*: parte de um Estado-membro que satisfaz as condições definidas no capítulo II, nºs 7, 8 e 9, do anexo A;
- h) *Estado-membro oficialmente indemne de brucelose*: Estado-membro que satisfaz as condições definidas no capítulo II, nºs 10, 11 e 12, do anexo A;
- i) *Exploração bovínica indemne de brucelose*: exploração bovínica que satisfaz as condições definidas no capítulo II, nºs 4, 5 e 6, do anexo A;
- j) *Exploração indemne de leucose bovina enzoótica*: exploração que satisfaz as condições definidas no capítulo I, partes A e B, do anexo B;
- k) *Estado-membro ou região indemne de leucose bovina enzoótica*: região ou Estado-membro que satisfaz as condições definidas no capítulo I, secções E, F e G, do anexo D;
- l) *Veterinário oficial*: veterinário designado pela autoridade central competente do Estado-membro.

## Artigo 3º

1. Cada Estado-membro assegurará que apenas sejam enviados a partir do seu território para o território de outro Estado-membro os animais que satisfaçam as condições definidas na presente directiva.
2. Os bovinos e suínos abrangidos pela presente directiva devem:
  - a) Ser sujeitos a um exame sanitário e a um controlo de identidade, realizados por um veterinário oficial, não apresentando qualquer sinal clínico de doença;
  - b) Ser provenientes de uma exploração ou de uma área que não seja objecto, por motivos sanitários, de uma proibição que afecte as espécies em questão, em conformidade com a legislação comunitária ou nacional;

- c) Ser identificados como previsto na Directiva 92/102/CEE do Conselho;
- d) Não ser destinados ao abate no âmbito de um programa de um Estado-membro de erradicação de uma doença contagiosa ou infecciosa;
- e) Ser conformes às disposições dos artigos 4º e 5º.

#### Artigo 4º

1. Os bovinos e suínos abrangidos pela presente directiva, desde a saída da exploração de origem até à chegada ao local de destino noutro Estado-membro, não devem, em momento algum, ter estado em contacto com biungulados que não preencham as condições aplicáveis ao comércio intracomunitário.
2. Os bovinos e suínos abrangidos pela presente directiva devem ser transportados em meios de transporte que tenham sido previamente limpos e desinfectados com um desinfectante oficialmente autorizado no Estado-membro de origem. Os veículos de transporte devem ser concebidos de forma a que as fezes dos animais, a palha ou a forragem não possam derramar-se ou cair do veículo durante o transporte.
3. As regras de aprovação dos locais de desinfectação e dos processos necessários para garantir e verificar a conformidade com as exigências do n.º 2 supra serão determinadas em conformidade com o disposto no artigo 12º.

#### Artigo 5º

1. Durante o transporte para o local de destino, os bovinos e suínos abrangidos pela presente directiva devem ser acompanhados de um certificado sanitário em conformidade com o anexo F. O certificado consistirá numa única folha e deve incluir um número de série. Deve ser emitido no dia da inspecção sanitária, pelo menos numa das línguas oficiais do país de destino. O certificado será válido durante dez dias a contar da data da inspecção sanitária. No entanto, quando a inspecção sanitária for efectuada após a saída da exploração de origem, como previsto no n.º 2 *infra*, o certificado será válido durante dez dias após a saída da exploração de origem.
2. A inspecção sanitária e a emissão do certificado sanitário para uma remessa de animais devem ter lugar na exploração de origem ou no local de carregamento. Neste último caso, o veterinário oficial que procede à certificação deve ter recebido do veterinário oficial da exploração de origem uma prova que consista num documento oficial com as informações necessárias ou num certificado de acordo com o modelo constante das partes A e B do anexo F, devidamente completado e certificado. O veterinário oficial responsável pela exploração de origem deve indicar também o endereço de quaisquer instalações de passagem, como um mercado aprovado ou um ponto de concentração aprovado (parte C).
3. O veterinário oficial responsável pelas instalações de passagem deve certificar a chegada dos animais e, quando necessário, completar um certificado final intracomunitário (parte D, anexo F). Quando os animais não entrem em instalações de passagem, o certificado final intracomunitário deve ser preenchido pelo veterinário oficial responsável pela exploração de origem.
4. O veterinário oficial que preencha a parte B do anexo F será responsável pelo registo da circulação dos animais no sistema ANIMO.
5. As instalações de passagem utilizadas no comércio intracomunitário, como os mercados ou centros de concentração, devem:
  - a) Ser controladas por um veterinário oficial que assegurará, em especial, que são satisfeitas as disposições dos n.ºs 1 e 2 do artigo 4º e que emitirá os certificados necessários anteriormente referidos. Os deveres dos veterinários oficiais serão posteriormente especificados por uma decisão adoptada nos termos do processo do artigo 12º;

- b) Situar-se numa zona que não seja objecto de proibição, nos termos da legislação comunitária;
- c) Ser limpas antes da utilização e desinfectadas, coforme exigido pelo veterinário oficial responsável pelas instalações;
- d) Ser declaradas pelo Estado-membro de origem mercados aprovados e centros de concentração aprovados. Essa aprovação deve ser limitada a espécies particulares ou a animais para reprodução e produção ou a animais para abate. O Estado-membro notificará às autoridades centrais competentes dos demais Estados-membros e à Comissão quais os mercados e centros de concentração aprovados.

6. Uma instalação de passagem pode ser, igualmente, um mercado aprovado oficialmente, situado num Estado-membro que não seja o de destino. Neste caso, o certificado do anexo F (incluindo a parte D) deve ser preenchido pelo veterinário oficial responsável do Estado-membro de origem dos animais. O veterinário oficial responsável pelo mercado certificará o destino dos animais, mediante a emissão de um segundo certificado, como o do anexo F, no qual aporá o número de série do original juntando-o ao certificado original ou a uma cópia do mesmo.

#### Artigo 6º

1. Para além de satisfazer as exigências dos artigos 3º, 4º e 5º, os animais para reprodução ou produção devem:

- ter permanecido na exploração de origem durante um período de 30 dias antes do carregamento, ou desde o nascimento caso os animais tenham menos de 30 dias. Com base na identificação oficial prevista no nº 2, alínea c), do artigo 3º e nos registos oficiais, o veterinário oficial deve verificar que os animais estão em conformidade com essas condições e, além disso, que são originários da Comunidade ou foram importados de um país terceiro em conformidade com a legislação comunitária em matéria de sanidade animal,
- quando sejam importados de um país terceiro para um Estado-membro que não seja o de destino final, ser transportados para o Estado-membro de destino tão rapidamente quanto possível, ao abrigo do certificado emitido nos termos do artigo 7º da Directiva 91/496/CEE. À chegada ao local de destino, estes animais devem, no que diz respeito a quaisquer outras operações de circulação, satisfazer as exigências da presente directiva e, em especial, a exigência relativa à permanência prevista no primeiro travessão.

2. Para além de satisfazer as exigências dos artigos 3º, 4º e 5º, os bovinos para reprodução e produção devem:

- a) Ser provenientes de uma exploração bovinícola oficialmente indemne de tuberculose e, no caso dos animais com mais de seis semanas de idade, ter reagido negativamente a uma prova intradérmica da tuberculina, realizada no período de 30 dias antes da saída do efectivo de origem, nos termos do disposto no nº 32, alínea d), do anexo D;

Esta prova intradérmica da tuberculina não é exigida no caso de os animais serem originários de um Estado-membro, ou de uma parte de um Estado-membro, considerado oficialmente indemne de tuberculose;

- b) No caso dos animais não castrados provenientes de uma exploração bovinícola oficialmente indemne de brucelose e com mais de 12 meses de idade, ter apresentado uma contagem brucélica inferior a 30 unidades internacionais de aglutinação por mililitro numa prova de sero-aglutinação realizada no período de 30 dias antes da saída do efectivo de origem e ser conformes às disposições da parte A do anexo C.

Esta prova de sero-aglutinação não é exigida se os animais forem originários de um Estado-membro, ou de uma parte de um Estado-membro, declarado oficialmente indemne de brucelose;

- c) Ser provenientes de uma exploração indemne de leucose bovina enzoótica na acepção da alínea j) do artigo 2º;

d) Não ter estado em contacto, desde a saída da exploração de origem até à chegada ao local de destino, com animais que não satisfaçam as exigências do nº 3 do artigo 6º *infra*.

3. Para além de satisfazer as exigências dos artigos 3º, 4º e 5º, os bovinos para abate devem ser provenientes de efectivos oficialmente indemnes de tuberculose, leucose bovina enzoótica e, no caso de bovinos não castrados, de efectivos oficialmente indemnes de brucelose.

#### *Artigo 7º*

Após a sua chegada ao país de destino, os animais para abate que tenham sido conduzidos para um matadouro devem ser abatidos no mais breve prazo, em conformidade com as exigências de sanidade animal.

Após a sua chegada ao Estado-membro de destino, os animais para abate que tenham sido conduzidos para um mercado, cujas regras determinem que depois do mercado todos os animais devem ser levados para um matadouro aprovado para o efeito pela autoridade central competente, devem ser abatidos nesse matadouro o mais tardar cinco dias após a sua chegada ao mercado.

#### *Artigo 8º*

Qualquer pessoa que suspeite da presença de uma das doenças constantes do capítulo I do anexo E deve notificar a autoridade competente e, quando adequado, informar o proprietário ou o responsável pelos animais, no mais breve prazo.

Cada Estado-membro enviará à Comissão, até 31 de Maio de cada ano, informações sobre a ocorrência de tuberculose, brucelose e leucose bovina enzoótica no seu território no ano civil anterior e o número de efectivos de cada estatuto, para cada doença, bem como os dados relativos aos programas de vigilância ou de erradicação levados a cabo em cada região. O teor e o modo de apresentação das informações exigidas serão determinados pela Comissão. A Comissão apresentará estas informações aos Estados-membros no âmbito do comité veterinário permanente e, em especial, pode utilizá-las em relação às decisões referidas nos anexos A e B.

#### *Artigo 9º*

1. Um Estado-membro que proponha um programa de controlo nacional, de carácter obrigatório, contra uma das doenças contagiosas constantes do capítulo II do anexo E, aplicável em todo o seu território ou parte deste, deve apresentá-lo à Comissão, indicando, nomeadamente:

- a distribuição da doença no Estado-membro,
- a justificação do programa, atendendo à importância da doença e à possível relação custos/benefícios do programa,
- a zona geográfica em que o programa vai ser aplicado,
- os diferentes estatutos aplicáveis aos estabelecimentos envolvidos e as normas que devem ser respeitadas em cada categoria, bem como os métodos de teste,
- os processos de vigilância do programa, cujos resultados devem ser enviados, pelo menos anualmente, à Comissão,
- as acções a adoptar se, por qualquer motivo, um estabelecimento perder o seu estatuto,
- as medidas a adoptar se forem positivos os resultados dos testes realizados em conformidade com as disposições do programa.

2. A Comissão examinará os programas comunicados pelos Estados-membros. Os programas referidos no nº 1 podem ser aprovados em conformidade com os critérios definidos no nº 1, de acordo com o processo previsto no artigo 12º. Nos termos do mesmo processo, serão definidas,

simultaneamente ou o mais tardar três meses após a aprovação dos programas, garantias suplementares, gerais ou limitadas, que podem ser exigidas no comércio intracomunitário. Essas garantias devem ser, no máximo, equivalentes às que os Estados-membros exigem no âmbito nacional.

3. Os programas apresentados pelos Estados-membros podem ser alterados ou completados em conformidade com o processo previsto no artigo 12º. De acordo com o mesmo processo, podem ser aprovadas alterações ou complementos em relação a programas previamente aprovados, ou às garantias definidas em conformidade com o nº 2.

#### *Artigo 10º*

1. Um Estado-membro, quando considere que o seu território, ou parte deste, está indemne de uma das doenças constantes do capítulo II do anexo E, apresentará à Comissão documentos de apoio adequados, indicando, nomeadamente:

- a natureza da doença e o historial na sua ocorrência no território,
- os resultados de testes de vigilância baseados numa pesquisa serológica, microbiológica, patológica ou epidemiológica e no facto de a doença ser de notificação obrigatória às autoridades competentes,
- o período durante o qual foi feita a vigilância,
- eventualmente, o período durante o qual foi proibida a vacinação contra a doença e a zona geográfica abrangida por essa proibição,
- as normas que permitem o controlo da ausência da doença.

2. A Comissão examinará a documentação apresentada pelos Estados-membros. As garantias suplementares, gerais ou limitadas, que podem ser exigidas no comércio intracomunitário, podem ser definidas em conformidade com o processo previsto no artigo 12º. Essas garantias devem ser, no máximo, equivalentes às que os Estados-membros exigem no âmbito nacional.

3. O Estado-membro em causa notificará a Comissão de qualquer alteração dos pormenores referidos no nº 1 respeitantes à doença, em especial no que se refere a quaisquer novos focos de doença. À luz dessas informações, as garantias definidas em conformidade com o nº 2 podem ser alteradas ou suprimidas de acordo com o processo previsto no artigo 12º.

#### *Artigo 11º*

Os anexos da presente directiva podem ser alterados em conformidade com o processo definido no artigo 12º.

Em derrogação do disposto na presente directiva, podem ser determinadas, em conformidade com o processo definido no artigo 12º, condições específicas para o comércio de animais para fins especiais e, em especial, para espectáculos.

#### *Artigo 12º*

1. Sempre que se faça referência ao processo definido no presente artigo, o assunto será apresentado pelo seu presidente, quer por sua própria iniciativa quer a pedido de representante de um Estado-membro, ao comité veterinário permanente (a seguir designado «comité») instituído pela decisão do Conselho de 15 de Outubro de 1968.

2. O representante da Comissão submeterá ao comité um projecto de medidas a tomar. O comité emitirá o seu parecer sobre o projecto num prazo que o presidente pode fixar em função da urgência da questão. O comité pronunciar-se-á por maioria de 54 votos, sendo os votos dos Estados-membros sujeitos à ponderação prevista no nº 2 do artigo 148º do Tratado. O presidente não participa na votação.

3. A Comissão adoptará as medidas consideradas quando estiverem em conformidade com o parecer do comité.

4. Quando as medidas consideradas não estiverem em conformidade com o parecer do comité, ou na falta de parecer, a Comissão submeterá imediatamente ao Conselho uma proposta relativa às medidas a tomar.

O Conselho deliberará por maioria qualificada.

Se, no termo de um prazo de três meses a contar da data em que a proposta da Comissão lhe foi submetida, o Conselho não tiver adoptado medidas, a Comissão adoptará as medidas propostas e dar-lhes-á imediatamente aplicação, salvo no caso de o Conselho se pronunciar por maioria simples contra as medidas em causa.

#### *Artigo 13º*

1. Sempre que se faça referência ao processo definido no presente artigo, o assunto será apresentado pelo seu presidente, quer por sua própria iniciativa quer a pedido de um representante de um Estado-membro, ao comité veterinário permanente (a seguir designado «comité») instituído pela decisão do Conselho de 15 de Outubro de 1968.

2. O representante da Comissão submeterá ao comité um projecto de medidas a tomar. O comité emitirá o seu parecer sobre o projecto num prazo que o presidente pode fixar em função da urgência da questão. O comité pronunciar-se-á por maioria de 54 votos, sendo os votos dos Estados-membros sujeitos à ponderação prevista n.º 2 do artigo 148º do Tratado. O presidente não participa na votação.

3. A Comissão adoptará as medidas consideradas quando estiverem em conformidade com o parecer do comité.

4. Quando as medidas consideradas não estiverem em conformidade com o parecer do comité, ou na falta de parecer, a Comissão submeterá imediatamente ao Conselho uma proposta relativa às medidas a tomar.

O Conselho deliberará por maioria qualificada.

Se, no termo de um prazo de 15 dias a contar da data em que a proposta da Comissão lhe foi submetida, o Conselho não tiver adoptado medidas, a Comissão adoptará as medidas propostas e dar-lhes-á imediatamente aplicação, salvo no caso de o Conselho se pronunciar por maioria simples contra as medidas em causa.

#### *Artigo 14º*

As normas estabelecidas pela Directiva 90/425/CEE do Conselho, de 26 de Junho de 1990, relativa aos controlos veterinários e zootécnicos aplicáveis ao comércio intracomunitário de certos animais vivos e produtos, na perspectiva da realização do mercado interno, com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 92/60/CEE do Conselho, de 30 de Junho de 1992 <sup>(1)</sup> serão aplicadas, em especial, aos controlos na origem, à organização e ao seguimento dos controlos efectuados pelo país de destino e às medidas de protecção a aplicar.

#### *Artigo 15º*

Os Estados-membros são os destinatários da presente directiva.

---

(<sup>1</sup>) JO n.º L 268 de 24. 9. 1992, p. 75.



## ANEXO A

## I. EXPLORAÇÃO BOVINÍCOLA OFICIALMENTE INDEMNE DE TUBERCULOSE

## 1. Uma exploração bovinícola é oficialmente indemne de tuberculose se:

- a) Todos os animais estiverem isentos de sinais clínicos de tuberculose;
- b) Todos os animais com mais de seis semanas de idade tiverem reagido negativamente a pelo menos duas provas intradérmicas de tuberculina oficiais, realizadas em conformidade com o anexo B, a primeira seis meses após a eliminação de qualquer infecção da exploração e a segunda seis meses depois ou, no caso de o efectivo ter sido constituído unicamente com animais provenientes de efectivos oficialmente indemnes de tuberculose, o primeiro teste deve ser realizado pelo menos 60 dias após a constituição do efectivo, não sendo o segundo obrigatório;
- c) Após a realização do primeiro teste referido na alínea b), não tiver sido introduzido na exploração qualquer bovino com mais de seis semanas, a não ser que tenha reagido negativamente a uma prova intradérmica de tuberculina realizada e avaliada em conformidade com o anexo B e efectuada quer nos 30 dias antes quer nos 30 dias depois da data da sua introdução na exploração.

Este teste não é obrigatório nos Estados-membros em que a percentagem de explorações bovinícolas infectadas com tuberculose for inferior a 0,2 % e quando os animais forem originários de explorações oficialmente indemnes de tuberculose.

## 2. Uma exploração bovinícola conservará o estatuto de oficialmente indemne de tuberculose se:

- a) Continuarem a ser aplicadas as condições das alíneas a) e c) do nº 1;
- b) Todos os animais que entram na exploração forem provenientes de explorações com estatuto de oficialmente indemnes de tuberculose;
- c) Todos os animais da exploração, excluindo os vitelos com menos de seis semanas que nasceram na exploração, forem sujeitos a provas de tuberculina de rotina, em conformidade com o anexo B, realizadas anualmente.

No entanto, a Comissão pode, em conformidade com o processo definido no artigo 12º e relativamente a um Estado-membro, ou a uma parte de um Estado-membro, quando todas as explorações bovinícolas sejam sujeitas a operações oficiais para combater a tuberculose, alterar a frequência das provas de rotina do seguinte modo:

- se a percentagem de explorações bovinícolas infectadas com tuberculose não for superior a 1 %, em média, durante os dois períodos de vigilância anuais mais recentes, o intervalo entre as provas de rotina na exploração pode ser aumentado para dois anos,
- se a percentagem de explorações bovinícolas infectadas com tuberculose não for superior a 0,2 %, em média, durante os dois períodos de vigilância bianuais mais recentes, o intervalo entre as provas de rotina pode ser aumentado para três anos,
- se a percentagem de explorações bovinícolas infectadas com tuberculose não for superior a 0,1 %, em média, durante os dois períodos de vigilância trianuais mais recentes, o intervalo entre as provas de rotina pode ser aumentado para quatro anos e/ou a idade em que os animais têm de ser submetidos a estas provas pode passar para 24 meses.

A Comissão pode, igualmente, em conformidade com o processo definido no artigo 13º, decidir aumentar a frequência das provas de rotina de tuberculina caso o nível da doença pareça aumentar.

## 3. O estatuto de oficialmente indemne de tuberculose de uma exploração será suspenso se:

- a) As condições referidas no nº 2 não forem respeitadas;
- b) Se considerar que um animal reagiu positivamente a uma prova de rotina de tuberculina ou se tiver sido diagnosticado um caso de tuberculose numa inspecção de rotina *post mortem*.

Nestes casos, o estatuto permanecerá suspenso até que todos os animais restantes com mais de seis semanas de idade tenham reagido negativamente a, pelo menos, duas provas oficiais intradérmicas de tuberculina, em conformidade com o anexo B, sendo a primeira realizada pelo menos dois meses após a eliminação do animal da exploração e a segunda pelo menos 42 dias após a primeira.

No entanto, quando a prova de rotina referida na alínea c) do nº 2 não tiver sido realizada a tempo, o estatuto da exploração não deve ser suspenso desde que o teste seja efectuado o mais tardar 60 dias após a data prevista para a sua realização, e que os testes subsequentes sejam efectuados em conformidade com o calendário inicial;

- c) A exploração contiver animais de estatuto indeterminado, como descrito no ponto 32 do anexo B. Neste caso, o estatuto da exploração permanecerá suspenso até que tenha sido clarificado o estatuto dos animais.

**4. Um Estado-membro, ou parte de um Estado-membro, pode ser declarado oficialmente indemne de tuberculose, em conformidade com o processo definido no artigo 12º, se satisfizer as seguintes condições:**

- a) A percentagem de explorações bovinícolas infectadas não é superior a 0,01 % durante seis anos consecutivos e pelo menos 99,9 % das explorações foram declaradas oficialmente indemnes de tuberculose há 10 anos;
- b) Existe um sistema de identificação que permite determinar quais os efectivos de origem e de trânsito de cada bovino;
- c) Todos os bovinos abatidos são sujeitos a uma inspecção *post mortem* por um veterinário oficial;
- d) Todos os casos suspeitos de tuberculose são plenamente investigados, incluindo a determinação e o controlo de quaisquer efectivos de origem ou de trânsito e a realização de todos os exames laboratoriais adequados. Na pendência da realização dos exames, o estatuto de oficialmente indemne de tuberculose dos efectivos de origem ou de trânsito deve ser suspenso até que os exames clínicos ou laboratoriais ou as provas de tuberculina tenham infirmado a presença de tuberculose bovina.

**5. Um Estado-membro ou uma parte de um Estado-membro conservará o estatuto de oficialmente indemne de tuberculose se:**

- a) Continuarem a ser aplicadas as condições das alíneas a) a d) do nº 4;
- b) Quando confirmado um caso de tuberculose, for retirado o estatuto de oficialmente indemne de tuberculose da exploração de origem e de trânsito;
- c) O estatuto de oficialmente indemne de tuberculose das explorações em que tenha sido confirmada a tuberculose continuar retirado até:
- ao abate de todos os animais considerados infectados,
  - à desinfecção das instalações e dos utensílios,
  - que todos os bovinos restantes com mais de seis semanas de idade tenham reagido negativamente a pelo menos duas provas intradérmicas oficiais, realizadas em conformidade com o anexo B, a primeira pelo menos seis meses após a retirada dos animais infectados e a segunda seis meses depois.

**6. Caso existam indícios de uma mudança significativa da situação relativamente à tuberculose num Estado-membro, ou numa parte de um Estado-membro, que tenha sido considerado oficialmente indemne de tuberculose, a Comissão pode, em conformidade com o processo definido no artigo 13º, tomar uma decisão de suspensão ou de revogação do estatuto e exigir provas de rotina de tuberculina, a realizar em conformidade com um dos programas da alínea d) do nº 2.**

## II. EXPLORAÇÕES BOVINÍCOLAS OFICIALMENTE INDEMNES DE BRUCELOSE E INDEMNES DE BRUCELOSE

Para efeitos do presente anexo A.II entende-se por «bovinos» todos os bovinos à excepção dos machos castrados com menos de quatro meses.

**1. Uma exploração bovinícola é oficialmente indemne de brucelose se:**

- a) Não contiver bovinos que tenham sido vacinados contra a brucelose, excluindo as fêmeas vacinadas há pelo menos três anos;

- b) Todos os bovinos estiverem insentos de sinais clínicos de brucelose há pelo menos seis meses;
- c) Todos os bovinos com mais de 12 meses de idade tiverem sido sujeitos a um dos seguintes programas de teste, com resultados negativos, em conformidade com o anexo C:
  - i) duas provas de seroaglutinação, com um intervalo superior a três meses e inferior a 12 meses,
  - ii) três provas do anel, com um intervalo de três meses, seguidas, pelo menos seis semanas depois, de uma prova de seroaglutinação,
  - iii) duas provas de antigénio brucélico tamponado, com um intervalo superior a três meses e inferior a 12 meses,
  - iv) Duas provas de microaglutinação, com um intervalo superior a três meses e inferior a 12 meses.

**2. Uma exploração bovinícola conservará o estatuto de oficialmente indemne de brucelose se:**

- a) For realizado anualmente, com resultados negativos em conformidade com o anexo C, um dos seguintes programas de teste:
  - i) três provas do anel realizadas com intervalos de pelo menos três meses,
  - ii) três provas Elisa do leite, realizadas com intervalos de, pelo menos, três meses,
  - iii) três provas do anel realizadas com um intervalo de, pelo menos, três meses, seguidas de uma prova serológica realizada, pelo menos, seis semanas depois,
  - iv) duas provas Elisa do leite, realizadas com um intervalo de, pelo menos, três meses, seguidas de uma prova serológica realizada, pelo menos, seis semanas depois,
  - v) duas provas serológicas realizadas com um intervalo de, pelo menos, três meses e não superior a seis meses.

No entanto, a Comissão pode, em conformidade com o processo definido no artigo 12º e relativamente a um Estado-membro, ou a uma parte de um Estado-membro, não oficialmente indemne de brucelose mas em que todas as explorações bovinícolas estejam sujeitas a operações oficiais de combate à brucelose, alterar a frequência das provas de rotina do seguinte modo:

- quando estejam infectadas, no máximo, 1 % das explorações bovinícolas, pode ser suficiente realizar, anualmente, duas provas do anel ou duas provas Elisa do leite com um intervalo de, pelo menos três meses ou uma prova serológica,
- quando, pelo menos, 99,8 % das explorações bovinícolas tenham sido declaradas oficialmente indemnes de brucelose durante, pelo menos, quatro anos, o intervalo entre os controlos pode ser alargado para dois anos e os controlos devem ser realizados utilizando uma das provas serológicas referidas na alínea a) no nº 7;

- b) Todos os bovinos que entram na exploração forem provenientes de explorações com o estatuto de oficialmente indemnes de brucelose e, no caso dos bovinos com mais de 12 meses de idade, apresentarem uma contagem brucélica inferior a 30 UI de aglutinação por ml, aquando da realização de uma prova de seroaglutinação em conformidade com o anexo C, durante os 30 dias anteriores à introdução na exploração.

No entanto, a prova de seroaglutinação anteriormente descrita não é obrigatória nos Estados-membros, ou regiões dos Estados-membros, em que a percentagem de explorações bovinícolas infectadas com brucelose não seja superior a 0,2 % durante, pelo menos, dois anos e em que os animais sejam provenientes de uma exploração oficialmente indemne de brucelose nesse Estado-membro ou região e que não tenham estado em contacto, durante o transporte, com bovinos com um estatuto inferior;

- c) Sem prejuízo da alínea b) do nº 2, os bovinos provenientes de uma exploração bovinícola indemne de brucelose podem ser introduzidos numa exploração oficialmente indemne de brucelose se tiverem, pelo menos, 18 meses de idade e, no caso de terem sido vacinados contra a brucelose, esta tenha sido efectuada há mais de um ano.

Esses animais devem ter apresentado, nos 30 dias anteriores à introdução, uma contagem brucélica inferior a 30 UI da aglutinação por ml e um resultado negativo numa prova de fixação do complemento, ambas realizadas em conformidade com o anexo C.

No entanto, se um animal proveniente de uma exploração indemne de brucelose for introduzido numa exploração bovinícola oficialmente indemne de brucelose, nos termos destas disposições, essa exploração deve ser considerada indemne de brucelose durante dois anos a contar da data de introdução do animal.

**3. O estatuto de uma exploração de oficialmente indemne de brucelose será suspenso ou retirado se:**

- a) As condições referidas nos nºs 1 e 2 não forem respeitadas;
- b) Na sequência de testes laboratoriais ou por motivos clínicos se suspeitar de que um ou mais bovinos têm brucelose.

Caso se suspeite da presença da doença num ou mais bovinos de uma exploração oficialmente indemne de brucelose, o estatuto da exploração pode ser suspenso, e não retirado, se o animal ou animais forem imediatamente destruídos ou isolados.

Quando o animal foi destruído, a suspensão pode ser levantada caso duas provas de seroaglutinação, realizadas em conformidade com o anexo C, em todos os bovinos da exploração com mais de 12 meses de idade, apresentem uma contagem brucélica inferior a 30 UI de aglutinação por ml. A primeira prova deve ser realizada pelo menos 30 dias após a retirada do animal e a segunda pelo menos 60 dias depois.

Um animal, quando tenha sido isolado, pode ser reintroduzido na exploração, sendo restabelecido o estatuto da mesma se, posteriormente, apresentar uma contagem de seroaglutinação inferior a 30 UI de aglutinação por ml e tiver dado origem a um resultado negativo numa prova de fixação do complemento, sendo estes testes realizados em conformidade com o anexo C.

Quando, na sequência de testes laboratoriais ou de pesquisas epidemiológicas, for confirmada na exploração a infecção com *Brucella*, o estatuto desta só pode ser restabelecido quando todas as fêmeas prenhes no momento do surgimento do foco apresentarem resultados negativos nos testes supracitados, sendo o teste final realizado pelo menos 21 dias após a parição.

**4. Uma exploração bovinícola é indemne de brucelose se corresponder às condições das alíneas a), b) e c) do nº 1, com as seguintes excepções:**

- i) as fêmeas devem ser vacinadas:
  - antes dos seis meses de idade com uma estirpe 19 da vacina viva ou com outras vacinas aprovadas em conformidade com o processo do artigo 12º ou,
  - antes dos 15 meses de idade com uma vacina inactivada 45/20 adjuvante, oficialmente inspecionada e reconhecida;
- ii) os bovinos com menos de 30 meses que tenham sido vacinados com uma estirpe 19 da vacina viva devem apresentar um resultado na prova de seroaglutinação superior a 30 UI, mas inferior a 80 UI, de aglutinação por ml desde que, na prova de fixação de complemento, tenham tido um resultado inferior a 30 unidades CEE no caso das fêmeas vacinadas há menos de 12 meses ou inferior a 20 unidades CEE nos restantes casos;
- iii) para além dos testes enumerados na alínea c) do nº 1, devem ser igualmente aprovados os seguintes programas de teste para obter o estatuto de indemne de brucelose:
  - a) Duas provas de antígeno brucélico tamponado, realizadas com um intervalo superior a três meses e inferior a 12 meses,
  - b) duas provas de microaglutinação, realizadas com um intervalo superior a três meses e inferior a 12 meses.

efectuadas em conformidade com o disposto no anexo C.

**5. Uma exploração bovinícola conservará o estatuto de indemne de brucelose se:**

- i) For objecto de um dos programas de teste enumerados na alínea a) do nº 2,
- ii) Os bovinos que entram na exploração respeitarem as condições da alínea b) do nº 2 ou
  - forem provenientes de explorações com o estatuto de indemnes de brucelose e, no caso dos bovinos com mais de 12 meses de idade, apresentarem, nos 30 dias anteriores à introdução na exploração, menos de 30 UI de aglutinação por ml numa prova de seroaglutinação e uma prova negativa de fixação do complemento, em conformidade com o anexo C ou,

- forem provenientes de explorações com o estatuto de indemne de brucelose, a sua idade for inferior a 30 meses e tiverem sido vacinados com uma estirpe 19 de vacina viva numa prova de seroaglutinação apresentando um resultado superior a 30 UI mas inferior a 80 UI de aglutinação por ml e, na prova de fixação do complemento, tiverem dado origem a um resultado inferior a 30 unidades CEE no caso das fêmeas vacinadas há menos de 12 meses ou inferior a 20 unidades CEE nos restantes casos.

**6. O estatuto de indemne de brucelose de uma exploração será suspenso ou retirado se:**

- a) As condições definidas nos nºs 4 e 5 não forem respeitadas, ou
- b) Existirem animais suspeitos de brucelose, com idade superior a 30 meses, na sequência de testes laboratoriais ou por motivos clínicos.

Se se suspeitar que um ou mais animais, com idade superior a 30 meses, numa exploração indemne de brucelose, estão infectados com *Brucella*, o estatuto da exploração pode ser suspenso, e não retirado, caso o animal ou animais sejam imediatamente destruídos ou isolados.

Quando o animal foi destruído, a suspensão pode ser levantada caso duas provas de seroaglutinação, realizadas em conformidade com o anexo C, em todos os bovinos da exploração com mais de 12 meses de idade, apresentem uma contagem inferior a 30 UI de aglutinação por ml. A primeira prova deve ser realizada pelo menos 30 dias após a retirada do animal e a segunda pelo menos 60 dias depois.

O animal, quando tenha sido isolado, pode ser reintroduzido na exploração, sendo restabelecido o estatuto da mesma se, posteriormente, apresentar numa prova de seroaglutinação uma contagem inferior a 30 UI de aglutinação por ml e tiver dado origem a um resultado negativo numa prova de fixação do complemento, sendo estes testes realizados em conformidade com o anexo C.

Quando, na sequência de testes laboratoriais ou de pesquisas epidemiológicas, for confirmada na exploração a infecção com *Brucella*, o estatuto desta só será restabelecido quando todas as fêmeas prenhes no momento do surgimento do foco apresentarem resultados negativos nos testes supracitados, sendo o teste final realizado pelo menos 21 dias após a parição.

**7. Uma região de um Estado-membro pode ser declarada oficialmente indemne de brucelose em conformidade com o processo do artigo 12º se satisfizer as seguintes condições:**

- a) Não tenha sido registado, durante pelo menos três anos, qualquer caso de aborto devido à infecção com *Brucella* e, pelo menos, 99,8 % das explorações foram declaradas oficialmente indemnes de brucelose desde há 10 anos;
- b) Exista um sistema de identificação que possibilite a identificação dos efectivos de origem e de trânsito relativamente a cada bovino.

**8. Sem prejuízo do nº 9, uma região declarada oficialmente indemne de brucelose manterá este estatuto se todos os bovinos com mais de 24 meses de idade forem sujeitos quer a duas provas do anel quer a uma prova serológica todos os três anos. Caso se observe um resultado positivo, são aplicadas as condições do nº 6.**

**9. Uma região declarada oficialmente indemne de brucelose notificará a Comissão da ocorrência de todos os casos de brucelose. A Comissão pode, em conformidade com o processo definido no artigo 12º, propor a suspensão ou revogação do estatuto e exigirá a pesquisa sistemática de brucelose, a realizar em conformidade com os programas do nº 2.**

**10. Um Estado-membro pode ser declarado oficialmente indemne de brucelose, em conformidade com o processo definido no artigo 12º, se satisfizer as seguintes condições:**

- a) Pelo menos nos últimos três anos não foi registado qualquer aborto devido a infecção com *Brucella* e, pelo menos, 99,8 % das explorações foram declaradas oficialmente indemnes de brucelose há 10 anos.
- b) Existe um sistema de identificação que permite determinar quais os efectivos de origem e de trânsito de cada bovino.

11. Um Estado-membro declarado oficialmente indemne de brucelose conservará o seu estatuto se:

- forem notificados à autoridade competente todos os casos de bovinos suspeitos de estar infectados com *Brucella*, sendo esses animais submetidos a investigação oficial relativamente à brucelose, que compreenda, pelo menos, duas provas serológicas de sangue, incluindo numa prova de fixação do complemento, bem como um exame microbiológico de amostras adequadas colhidas no caso de aborto,
- durante o período de suspeita, mantido até à obtenção de resultados negativos nos testes previstos no primeiro travessão, tiver sido suspenso o estatuto de oficialmente indemne de brucelose do efectivo de origem ou de trânsito do bovino suspeito,
- em caso de obtenção de um resultado positivo, forem aplicadas as condições do nº 6.

12. Um Estado-membro declarado oficialmente indemne de brucelose notificará a Comissão da ocorrência de todos os casos de brucelose. A Comissão pode, em conformidade com o processo definido no artigo 13º, propor que o estatuto seja suspenso ou retirado e exigir a realização de testes de rotina relativos à brucelose efectuados em conformidade com um dos programas do nº 2.

13. a) Para efeitos da presente parte II do anexo A, entende-se por prova serológica uma prova de seroaglutinação, uma prova de antígeno brucélico tamponado, uma prova de fixação do complemento, uma prova de plasmaglutinação, uma prova do anel em plasma, uma prova de microaglutinação ou uma prova Elisa individual em sangue, como descrito no anexo C;
- b) Quando são efectuadas provas do anel em cisternas, o número destes testes referidos no presente anexo deve ser duplicado e os intervalos entre os testes devem ser reduzidos para metade.
-

## ANEXO B

## NORMAS DE FABRICO E UTILIZAÇÃO DE TUBERCULINAS BOVINAS E AVIÁRIAS

1. As provas de tuberculina controladas oficialmente devem ser realizadas com tuberculinas PPD ou HCSM.
2. Os padrões a utilizar pelos fabricantes no controlo das tuberculinas bovinas PPD e HCSM devem ser aferidos em unidades comunitárias de tuberculina (UCT), com base em ensaios biológicos com a tuberculina padrão comunitária apropriada.
3. Os padrões a utilizar pelos fabricantes para o controlo das tuberculinas aviárias devem ser aferidos em unidades internacionais, com base em ensaios biológicos efectuados com o padrão comunitário de PPD de tuberculina aviária.
4. O padrão comunitário PPD de tuberculina bovina é o do Centraal Diergeneeskundig Instituut, Afdeling Rotterdam, Países Baixos.
5. O padrão comunitário de HCSM de tuberculina bovina é o do Institut Pasteur, Paris, França.
6. O padrão comunitário de tuberculina aviária é o do Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, Inglaterra.
7. As tuberculinas bovinas devem ser preparadas com uma das seguintes estirpes de *Mycobacterium bovis*:
  - a) AN5,
  - b) Vallee.
8. As tuberculinas aviárias devem ser preparadas com uma das seguintes estirpes de *Mycobacterium avium*:
  - a) D4ER,
  - b) TB56.
9. O ph das tuberculinas deve situar-se entre 6,5 e 7,5.
10. É necessário confirmar, de modo que satisfaça o organismo público responsável pelo controlo oficial da tuberculina, que os agentes conservantes especificamente antimicrobianos ou outras substâncias que possam ter sido adicionadas à tuberculina não alteram nem a inocuidade nem a eficácia do produto.

As concentrações máximas autorizadas para o fenol e o glicerol são as seguintes:

  - a) Fenol: 0,5 % m/v;
  - b) Glicerol: 10 % v/v.
11. Desde que sejam conservadas ao abrigo da luz e a uma temperatura entre 2 e 8 °C, as tuberculinas podem ser utilizadas até ao fim dos períodos abaixo indicados a contar do último ensaio de actividade considerado satisfatório:
  - a) Tuberculinas líquidas PPD: dois anos.  
Tuberculinas liofilizadas PPD: oito anos;
  - b) Tuberculinas HCSM diluídas: dois anos.
12. São encarregados do controlo oficial das tuberculinas nos respectivos países os seguintes organismos públicos:
  - a) Alemanha: Paul-Ehrlich-Institut, Frankfurt/Main;
  - b) Bélgica: Instituut voor Hygiëne en Epidemiologie, J. Wytmanstraat 14, B-1050 Bruxelas;
  - c) França: Laboratoire nationale des médicaments vétérinaires, Fougères;

- d) Grão-Ducado do Luxemburgo: Instituto do país fornecedor;
  - e) Itália: Istituto superiore di sanità, Roma;
  - f) Países Baixos: Centraal Diergeneeskundig Instituut, afdeling Rotterdam;
  - g) Dinamarca: Statens Veterinære Serumlaboratorium, Copenhaga V;
  - h) Irlanda: Instituto do país fornecedor;
  - i) Reino Unido: Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey;
  - j) Grécia: Κτηνιατρικών Ινστιτούτων Λοιμωδών και παρασιτικών Νοσημάτων. Ιερά οδός 75, Αθήνα 301.
  - k) Espanha: Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Granada;
  - l) Portugal: Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Lisboa.
13. Deve ser efectuado um controlo oficial de cada um dos lotes de tuberculinas engarrafados e prontos a serem utilizados.
14. O controlo das tuberculinas deve ser efectuado por métodos biológicos e por métodos químicos.
15. As tuberculinas devem ser estéreis. Os ensaios de esterilidade devem ser efectuados de acordo com as regras da farmacopeia europeia.
16. Deve ser realizado um controlo para confirmar a inexistência de toxicidade ou de propriedades irritantes de acordo com as regras da farmacopeia europeia.
17. As tuberculinas devem ser submetidas a uma análise química que permita determinar a concentração de glicerol e/ou de fenol, assim como a concentração de qualquer outro agente conservante que possa ter sido adicionado.
18. Deve ser realizada uma prova de não sensibilização à tuberculina de acordo com as regras da farmacopeia europeia.
19. A actividade das tuberculinas deve ser avaliada por métodos biológicos. Estes métodos, que devem ser utilizados para as tuberculinas HCSCM e PPD, baseiam-se numa comparação entre as tuberculinas padrão e as tuberculinas a ensaiar.
20. O teor proteíca da tuberculina PPD deve ser avaliado pelo método do Kjeldahl. O factor de conversão do azoto em tubérculo-proteína é de 6,25.
21. O padrão comunitário da tuberculina bovina HCSCM tem uma actividade de 65 000 unidades comunitárias de tuberculina (UCT) por ml e é apresentada em ampolas de 5 ml.
22. O padrão comunitário de tuberculina bovina PPD tem uma actividade de 50 000 unidades comunitárias de tuberculina (UCT) por mg de PPD e é apresentada no estado liofilizado, em ampolas contendo 1,8 mg de PPD, o que significa que 0,00002 mg de PPD têm uma actividade igual a uma unidade comunitária de tuberculina.
23. O padrão comunitário de tuberculina aviária PPD tem uma actividade de 50 000 unidades internacionais (UI) por mg de matéria seca do derivado proteico purificado e é apresentado no estado liofilizado em ampolas contendo 10 mg de PPD e 26,3 mg de sais, o que significa que 0,0000726 mg de padrão têm uma actividades igual a uma unidade internacional.
24. As tuberculinas submetidas pelos fabricantes ao controlo dos organismos referidos no ponto 12 devem, em primeiro lugar, ter sido testadas para determinação da actividade por ensaio biológico efectuado por comparação com os padrões apropriados indicados nos pontos 2 e 3.
25. a) *Controlo da actividade em cobaias*
- Devem usar-se cobaias albinas de peso compreendido entre 400 e 600 g. Estas cobaias devem estar de boa saúde no momento da injeção da tuberculina. Em cada ensaio devem ser utilizadas pelo menos oito cobaias. O ensaio não deve ser realizado menos de um mês após a sensibilização.
- aa) Para ensaiar as tuberculinas bovinas, as cobaias serão sensibilizadas de acordo com um dos seguintes métodos:
1. Injeção de *Mycobacterium bovis* da estirpe AN5, morta pelo calor, em adjuvante oleoso.



2. Injecção de *Mycobacterium bovis* da estirpe AN5, viva, em soro fisiológico.
  3. Injecção de vacina BCG.
- ab) Para testar as tuberculinas aviárias, a sensibilização das cobaias deve fazer-se por injecção de 2 mg de bacilos tuberculosos do tipo aviário, mortos pelo calor, em suspensão de cerca de 0,5 ml de parafina líquida estéril ou por injecção de bacilos tuberculosos vivos do tipo aviário em soro fisiológico. Para esse efeito, deve utilizar-se uma estirpe do tipo aviário D4.
- ac) Cada tuberculina a controlar deve ser ensaiada por comparação com a tuberculina padrão apropriada, por injecção intradérmica em grupos de cobaias convenientemente sensibilizadas.

Devem cortar-se os pêlos de ambos os flancos de cada cobaia. O ensaio deve basear-se numa comparação entre as reacções provocadas por uma série de injecções intracutâneas de doses de 0,2 ml, no máximo, de diluições de tuberculina padrão em solução salina isotónica tamponada contendo 0,0005 % de Tween 80 e as reacções provocadas por uma série correspondente de injecções da tuberculina a ensaiar. As diluições far-se-ão segundo séries geométricas e serão injectadas nas cobaias segundo um quadrado latino aleatório (quatro casas de cada lado de um ensaio em oito pontos). Os diâmetros das reacções em cada caso devem ser medidos e anotados 24 a 28 horas depois.

Para cada amostra de tuberculina a ensaiar, há que fazer uma estimativa da actividade relativa por comparação com o padrão apropriado e determinar o intervalo de confiança por métodos estatísticos, utilizando os diâmetros das reacções e os logaritmos das doses como parâmetros. A tuberculina bovina a ensaiar é aceitável se a sua actividade estimada garantir, por dose individual, 2 000 unidades comunitárias de tuberculina ( $\pm 25\%$ ) no gado. A actividade de cada tuberculina deve ser expressa em unidades comunitárias de tuberculina ou em unidades internacionais por ml consoante o caso.

b) *Controlo de actividade em bovinos*

Pode efectuar-se um controlo periódico da actividade das tuberculinas bovinas em animais infectados natural ou artificialmente por tuberculose. Estes controlos de actividade realizados em grupos de bovinos tuberculosos devem incluir uma injecção intradérmica (em quatro ou seis pontos) da tuberculina a ensaiar; serão feitos por comparação com o padrão adequado, sendo a actividade da tuberculina avaliada por métodos estatísticos como no ensaio realizado em cobaias.

26. A rotulagem dos recipientes e das embalagens de tuberculina deve satisfazer as condições a seguir indicadas.

- O rótulo do recipiente e o rótulo da embalagem devem indicar:
  - o nome do preparado,
  - para preparados líquidos, o volume total do recipiente,
  - o número de unidades comunitárias ou de unidades internacionais por ml ou por mg,
  - o nome do fabricante,
  - o número do lote,
  - a natureza e a quantidade do líquido de reconstituição, para os preparados liofilizados.
- O rótulo do recipiente ou o rótulo da embalagem devem indicar:
  - o prazo de validade,
  - as condições de conservação,
  - a denominação e, se possível, a proporção de qualquer substância adicionada,
  - o tipo de bacilo utilizado para a preparação da tuberculina.

27. Serão designados laboratórios comunitários em conformidade com o processo do artigo 12º, encargues do exame complementar das tuberculinas utilizadas normalmente nos Estados-membros, a fim de garantir que a actividade de cada uma dessas tuberculinas seja apropriada, tendo em conta a tuberculina padrão comunitária adequada. Essas análises deverão ser realizadas em bovinos tuberculosos, em cobaias convenientemente sensibilizadas e por meio de ensaios químicos apropriados.

28. Consideram-se provas oficiais de tuberculina:

- a) A intradermotuberculinação simples: esta prova exige uma única injecção de tuberculina bovina;
- b) A intradermotuberculinação de comparação: esta prova exige uma só injecção de tuberculina bovina e uma só injecção de tuberculina aviária, administradas simultaneamente.

29. A dose de tuberculina injectada será:
1. 2 000 UCT, no mínimo, de tuberculina bovina.
  2. 2 000 UI, no mínimo, de tuberculina aviária.
- O volume de cada dose injectada não deverá exceder 0,2 ml.
30. As provas de tuberculina devem ser realizadas por injeção da ou das tuberculinas na pele do pescoço. Os pontos de injeção situar-se-ão no limite entre os terços anterior e médio do pescoço. Caso sejam injectadas no mesmo animal tuberculinas aviária e bovina, o ponto de injeção da tuberculina aviária deve situar-se a cerca de 10 cm da linha superior do pescoço e o ponto de injeção da tuberculina bovina deve situar-se 12,5 cm abaixo, numa linha mais ou menos paralela à linha da espádua, ou em lados diferentes do pescoço; nos animais jovens, em que ainda não seja possível separar suficientemente os pontos de injeção de um dos lados do pescoço, será aplicada uma injeção de cada lado em sítios idênticos, no centro do terço médio do pescoço.
31. A técnica de administração da tuberculina e a interpretação das reacções serão as seguintes:
- a) *Técnica*

Nas zonas de injeção os pêlos devem ser cortados, e a pele limpa. Segura-se uma prega da pele de cada zona em que os pêlos foram cortados, entre o indicador e o polegar, mede-se com uma craveira e anota-se o resultado. Introduce-se obliquamente nas camadas mais profundas da pele, uma pequena agulha estéril, com o bordo biselado voltado para o exterior, ligado a uma seringa graduada contendo tuberculina. A seguir injecta-se a dose de tuberculina. Uma injeção bem dada provocará, à palpação, um ligeiro inchaço com as dimensões de uma ervilha em cada ponto de injeção. A espessura da prega de pele em cada ponto de injeção voltará a ser medida e registada 72 horas depois da injeção.
  - b) *Interpretação das reacções*

A interpretação das reacções basear-se-á na observação clínica e no aumento ou aumentos registados na espessura da prega de pele nos pontos de injeção, 72 horas depois da injeção da ou das tuberculinas.

    - ba) Reacção negativa: se apenas se observar um inchaço limitado, com um aumento máximo de 2 mm de espessura da prega da pele, sem sinais clínicos tais como edema difuso ou extenso, exsudação, necrose, dor ou reacção inflamatória dos canais linfáticos da região ou dos glândulos;
    - bb) Reacção duvidosa: Se não se observar nenhum dos sinais clínicos indicados na alínea ba), mas o aumento de espessura da prega da pele for superior a 2 mm e inferior a 4 mm;
    - bc) Reacção positiva: Se se observarem os sinais clínicos indicados na alínea ba) ou um aumento de espessura da prega de pele de 4 mm ou mais no sítio da injeção.
32. A interpretação das provas oficiais de tuberculina é a seguinte:
- a) *Intradermotuberculinação simples:*
    - Positiva: reacção tal como definida na alínea bc) do ponto 31.
    - Duvidosa: reacção idêntica à definida na alínea bb) do ponto 31.
    - Negativa: reacção tal como definida na alínea ba) do ponto 31.

Os animais em que a intradermotuberculinação simples tenha dado resultados duvidosos serão submetidos a uma outra tuberculinação passado um prazo mínimo de 42 dias.

Os animais em que esta segunda prova não dê resultados negativos devem ser considerados como tendo reagido positivamente à prova de tuberculina.

Os animais com resultados positivos na prova intradérmica simples podem ser submetidos a uma intradermotuberculinação de comparação;
  - b) *Intradermotuberculinação de comparação para a determinação e manutenção do estatuto de exploração oficialmente indemne de tuberculose:*
    - Positiva: reacção bovina superior em mais de 4 mm à reacção aviária ou presença de sinais clínicos.
    - Duvidosa: reacção bovina positiva ou duvidosa e superior em 1 a 4 mm à reacção aviária, e ausência de sinais clínicos.
    - Negativa: reacção bovina negativa ou reacção bovina positiva ou duvidosa mas igual ou inferior a uma reacção aviária positiva ou duvidosa e ausência de sinais clínicos nos dois casos.

Os animais em que a intradermotuberculinação de comparação tenha dado resultados duvidosos devem ser submetidos a uma outra prova de tuberculina passado um prazo mínimo de 42 dias.

Os animais em que esta segunda prova de tuberculina não dê resultados negativos serão considerados como tendo reagido positivamente à tuberculina;

- 
- c) O estatuto de exploração oficialmente indemne de tuberculose poder ser suspenso, ficando os animais da exploração excluídos do comércio intracomunitário, até estar regularizado o estatuto dos animais seguintes:
1. Animais considerados como tendo tido uma reacção duvidosa à prova de tuberculina simples;
  2. Animais considerados como tendo reagido positivamente à prova de tuberculina simples mas que devem ser submetidos a uma prova de tuberculina de comparação;
  3. Animais considerados como tendo tido uma reacção duvidosa à prova de tuberculina de comparação.
- d) Nos casos em que a legislação comunitária exige que os animais sejam submetidos a uma prova intradérmica antes da sua deslocação, a prova deve ser interpretada de forma a que sejam excluídos do comércio intracomunitário os animais em que o aumento de espessura da prega de pele seja superior a 2 mm, ou em que se verifique a presença de sinais clínicos.

## ANEXO C

## BRUCELOSE

## A. Provas de seroaglutinação

1. O soro padrão de aglutinação deve estar em conformidade com o soro padrão preparado pelo Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, Inglaterra.

Uma ampola deve conter 1 000 UI de aglutinação obtidas por liofilização de 1 ml de soro de bovino.

2. O soro padrão deve ser o soro fornecido pelo Bundesgesundheitsamt, Berlim.
3. O grau de aglutinação de brucelas no soro deve ser expresso em UI por ml (por exemplo, soro x = 80 UI/ml).
4. As observações referentes à seroaglutinação lenta em tubos devem ser feitas aos 59 ou 75 % de aglutinação, tendo o antigénio utilizado sido titulado em idênticas condições por referência a um soro padrão.
5. O poder aglutinante de vários antigénios em relação ao soro padrão deve situar-se dentro dos seguintes limites:
  - se a observação for feita aos 50 %: entre 1/600 e 1/1 000,
  - se a observação for feita aos 75 %: entre 1/500 e 1/750.
6. Na preparação do antigénio a utilizar na aglutinação em tubo (método lento) deve ser utilizada a estirpe nº 99 de Weybridge, a estirpe USDA 1119 ou qualquer outra estirpe de sensibilidade equivalente.
7. Os meios de cultura utilizados para a conservação da estirpe no laboratório e para a produção de antigénio não devem encorajar a dissociação das bactérias (em s e r); deve utilizar-se, de preferência, o ágar de batata.
8. A emulsão bacteriana deve ser feita a partir de soro fisiológico (NaCl 8,5 %) fenolizado a 5 %. Não deve ser utilizado formol.
9. Os organismos públicos abaixo indicados devem ser responsabilizados pelas provas oficiais dos antigénios:
  - a) Alemanha: Bundesgesundheitsamt, Berlim;
  - b) Bélgica: Institut national de recherches vétérinaires, Bruxelas;
  - c) França: Laboratoire central de recherches vétérinaires, Alfort;
  - d) Grão-Ducado do Luxemburgo: Instituto do país fornecedor;
  - e) Itália: Istituto superiore di sanità, Roma;
  - f) Países Baixos: Centraal Diergeneeskundig Instituut, Afdeling Rotterdam;
  - g) Dinamarca: Statens Veterinære Serumlaboratorium, Copenhaga V;
  - h) Irlanda: Veterinary Research Laboratory, Department of Agriculture and Food, Dublin;
  - i) Reino Unido:
    - Grã-Bretanha: Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, Inglaterra;
    - Irlanda do Norte: Veterinary Research Laboratory, Stormont, Belfast;
  - j) Grécia: Κτηνιατρικό Ινστιτούτον Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων. Ιερά οδός 75. Αθήνα 301;
  - k) Espanha: Centro Nacional de brucelosis de Murcia;
  - l) Portugal: Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Lisboa.

10. Os antigénios podem ser fornecidos concentrados, desde que seja indicado no rótulo do frasco o factor de diluição a utilizar.
11. Para a realização das provas de seroaglutinação, devem ser preparadas pelo menos três diluições de cada soro. As diluições de soro suspeito devem ser feitas de forma a que a leitura referente à reacção no limite de infecção seja feita no tubo médio. Caso haja uma reacção positiva neste tubo, o soro suspeito contém pelo menos, 30 UI de aglutinação por ml.

#### B. Prova da reacção de fixação do complemento

1. O soro padrão é o mesmo que o mencionado no ponto A.1 do presente anexo. Para além do teor mencionado em unidades internacionais de aglutinação, 1 ml deste soro bovino liofilizado deve conter 1 000 unidades de sensibilização que fixem o complemento. Estas unidades de sensibilização são designadas por unidades CEE de sensibilização.
2. O soro padrão deve ser fornecido pelo Bundesgesundheitsamt, Berlim.
3. O teor de anticorpos fixadores do complemento no soro deve ser expresso em unidades CEE de sensibilização (por exemplo: soro x = 60 unidades CEE de sensibilização por ml).
4. Um soro que contenha 20 ou mais unidades CEE de sensibilização (por exemplo, uma actividade igual a 20 % da do soro padrão) por ml, deve ser considerado positivo.
5. Os soros devem ser inactivados do seguinte modo:
  - a) Soro de bovino: 50 a 60 °C durante 30 a 50 minutos;
  - b) Soro de suíno: 60 °C durante 30 a 50 minutos.
6. Na preparação do antigénio devem ser utilizadas as estirpes nº 99 de Weybridge ou USDA 1119. O antigénio representa uma suspensão bacteriana em soro fisiológico a 0,85 % ou numa solução de carga de Veronal.
7. Para a realização da prova de reacção dever-se-á utilizar uma dose complementar superior à dose mínima necessária para a hemólise total.
8. A prova de reacção de fixação do complemento deve ser sempre acompanhada dos seguintes controlos:
  - a) Controlo do efeito anticomplementar do soro;
  - b) Controlo do antigénio;
  - c) Controlo dos corpúsculos vermelhos do sangue sensibilizados;
  - d) Controlo do complemento;
  - e) Controlo da sensibilidade no início da reacção, utilizando um soro positivo;
  - f) Controlo da especificidade da reacção utilizando um soro negativo.
9. A verificação e o controlo oficial dos soros e antigénios padrão devem ser efectuados pelos organismos enumerados no ponto 9 do presente anexo.
10. Os antigénios podem ser fornecidos concentrados, desde que o factor de diluição a utilizar esteja indicado no rótulo do frasco.

#### C. Prova do anel

1. Deve ser submetido à prova do anel o conteúdo de cada bateadeira ou de cada cisterna de leite da exploração.
2. O antigénio padrão a utilizar deve ser proveniente de um dos institutos mencionados nas alíneas a) a j) do ponto A.9. Recomenda-se a normalização dos antigénios de acordo com as recomendações da OMS/FAO.

3. O antigénio só pode ser corado com hematoxilina ou tetrazólio; deve utilizar-se, de preferência, a hematoxilina.
4. Caso não de utilizem conservantes, a prova de reacção deve ser efectuada de 18 a 24 horas após da colheita da amostra de vaca. Caso a prova deva ser realizada mais de 24 horas depois de colhida a amostra, deve utilizar-se um conservante, podendo ser utilizados a formalina ou o cloreto de mercúrio; se for utilizado um destes conservantes, a prova deve ser realizada nos 14 dias seguintes ao da colheita da amostra. A formalina pode ser adicionada ao leite até uma concentração final, na amostra, de 0,2 %; nesse caso, a proporção do leite relativamente à solução de formalina deve ser, no mínimo, de 10 : 1. Em vez da formalina, pode ser utilizada uma solução de cloreto de mercúrio, até uma concentração final, no leite, de 0,2 %, nesse caso, a relação entre a quantidade de leite e de solução de cloreto de mercúrio deve ser de 10 : 1.
5. A reacção deve realizar-se segundo um dos seguintes métodos:
  - numa coluna de leite com, pelo menos, 25 mm de altura e com um volume do leite de 1 ml, ao qual se adicionaram 0,03 ml de um dos antigénios corados padronizados,
  - numa coluna de leite de, pelo menos, 25 mm de altura e com um volume de leite de 1 ml, ao qual se adicionaram 0,05 ml de um dos antigénios corados padronizados,
  - num volume de leite de 8 ml ao qual se adicionaram 0,08 ml de um dos antigénios corados padronizados,
  - numa coluna de leite de, pelo menos, 25 mm de altura e com um volume de leite de 2 ml, ao qual se adicionaram 0,05 ml de um dos antigénios corados padronizados.
6. A mistura de leite e antigénios deve ser incubada a 37 °C durante um período não inferior a 45 minutos e não superior a 60 minutos. O ensaio deve ser avaliado nos 15 minutos seguintes à retirada do incubador.
7. A reacção deve ser avaliada de acordo com os seguintes critérios:
  - a) Reacção negativa: leite corado, nata incolor;
  - b) Reacção positiva: leite e nata corados da mesma forma, ou leite incolor e nata corada.

#### D. Prova de antigénio brucélico tamponado

A prova de antigénio brucélico tamponado deve ser realizada por um dos seguintes métodos:

##### a) Prova manual

1. O soro padrão deve ser o segundo soro padrão internacional anti-*Brucella abortus* fornecido pelo Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, Inglaterra.
2. O antigénio deve ser preparado sem referência à concentração de células, devendo a sua sensibilidade ser aferida por comparação com o segundo soro padrão internacional anti-*Brucella abortus*, de forma a que o antigénio produza uma reacção positiva com uma diluição do soro de 1 : 47,5, e uma reacção negativa com uma diluição de 1 : 55.
3. Deve preparar-se uma suspensão do antigénio em diluente tamponado de antigénio brucélico com ph de  $3,65 \pm 0,5$ , e pode ser corado com o corante Rose Bengal.
4. Na preparação do antigénio deve ser utilizada a estirpe nº 99 de Weybridge ou USDA 1119, ou ainda qualquer outra estirpe de sensibilidade equivalente.
5. Os meios de cultura utilizados para a conservação da estirpe no laboratório e para a produção de antigénio não devem encorajar a dissociação das bactérias (em s e r); deve utilizar-se meio ágar de batata ou métodos de cultura contínua.
6. O antigénio deve ser controlado por comparação com oito soros conhecidos liofilizados, positivos e negativos.

7. A verificação oficial e o controlo do antigénio e do soro padrão deve ser efectuada pelos organismos públicos indicados na parte A, ponto 9, do anexo C.
8. O antigénio será fornecido pronto a usar.
9. A prova do antigénio brucélico tamponado do será realizada da seguinte forma:
  - a) Colocar uma gota (0,03 ml) de antigénio ao lado de uma gota (0,03 ml) de soro, numa placa branca;
  - b) Misturar as gotas com um aplicador, primeiro segundo uma linha recta e depois num círculo de cerca de 10 a 12 mm de diâmetro;
  - c) Depois fazer oscilar a placa para a frente e para trás durante quatro minutos (cerca de 30 vezes por minuto);
  - d) As leituras devem ser feitas com boa luz; caso não haja sinais de aglutinação, a prova será considerada negativa; qualquer nível de aglutinação será considerado positivo, salvo se tiver havido uma dessecação excessiva na periferia.

b) *Método automatizado*

O método automatizado deve ser pelo menos tão sensível e preciso como o método manual.

**E. Prova do anel em plasma**

A. *Extracção do plasma*

Centrifugar a 3 000 r/min, durante 3 minutos, um tubo contendo sangue ao qual se adicionou EDTA para impedir a coagulação; o tubo deve ser depois mantido a 37 °C durante 12 a 24 horas.

B. *Avaliação*

Introduzir 0,2 ml de plasma estabilizado num tubo contendo 1 ml de leite não tratado. Misturar e adicionar depois um gota (0,05 ml) de antigénio antribrucélico, tornando a misturar em seguida. O antigénio deve ser padronizado por comparação com um antigénio padrão fornecido pelo organismo referido no ponto 9, alínea a), da parte A.

Incubar durante 45 minutos a 37 °C e fazer uma leitura nos 15 minutos seguintes. O resultado será considerado positivo se o anel se tiver tornado da mesma cor que a coluna de leite, ou mais escuro.

**F. Aglutinação do plasma**

O plasma extraído em conformidade com o ponto A da parte E pode ser utilizado imediatamente após a centrifugação, não sendo necessária a estabilização térmica. Misturar 0,05 ml de plasma com 1 ml de antigénio.

Para uma seroaglutinação de 50 %, o que corresponde a uma seroaglutinação na diluição de 1 : 20. A leitura deve ser feita 18 a 24 horas após a incubação a 37 °C. Uma aglutinação de 50 % ou mais deve ser considerada positiva.

**G. Prova de microaglutinação**

1. Os diluentes são constituídos de solução salina fisiológica a 0,85 %, com 0,5 % de fenol.
2. O antigénio deve ser preparado de acordo com a parte A, pontos 6, 7 e 8, do anexo C e ser titulado tal como descrito na parte A, ponto 5, do anexo C. No momento de utilização do antigénio, adicionar safranina o a 0,02 % (diluição final).
3. O soro padrão é o mesmo que o referido na parte A, ponto 1, do anexo C.
4. O soro padrão deve ser fornecido pelo Bundesgesundheitsamt, Berlim.

5. A prova de microaglutinação deve ser realizada em placas com cavidades de fundo cónico, com 0,250 ml de volume. A prova deve ser efectuada do seguinte modo:

- a) Pré-diluição do soro: em cada cavidade, adicionar 0,050 ml de cada soro suspeito a 0,075 ml de diluente. Agitar as misturas durante 30 segundos;
- b) Diluição gradual do soro: preparar pelo menos três diluições de cada soro. Para tal, introduzir numa cavidade contendo 0,025 ml de diluente, 0,025 ml da pré-diluição (1 : 2,5) de cada soro. Desta forma, a primeira diluição é de 1 : 5, e as seguintes serão diluídas dum factor dois.
- c) Adição do antígeno: em cada uma das cavidades contendo as diversas diluições do soro, adicionar 0,025 ml de antígeno. Agitar as placas durante 30 segundos e em seguida fechar com as respectivas tampas e mantê-las a 37 °C durante 20 a 24 horas, em atmosfera humidificada;
- d) Leitura dos resultados: a avaliação da sedimentação do antígeno faz-se examinando o fundo da cavidade reflectida num espelho côncavo colocado acima desta.

Se a reacção for negativa, o antígeno sedimenta na forma de um botão compacto com limite bem definido e de coloração vermelha intensa. Se, pelo contrário, a reacção for positiva, forma-se um véu rosado difuso e uniformemente distribuído. As diversas percentagens de aglutinação são determinadas por comparação com antígenos testemunhas, com 0,25, 50, 75 e 100 % de aglutinação. O título de cada soro é expresso em UI aglutinantes por ml. A prova deve incluir testemunhas com soros negativos e positivos, diluídos de forma a conter 30 UI aglutinantes por ml.

#### H. Prova de imunoabsorção enzimática (Elisa) para a pesquisa de brucelose bovina

1. Os materiais e reagentes a utilizar são os seguintes:

- a) Microplacas para fase sólida, tinas ou qualquer outra fase sólida;
- b) O antígeno fixado à fase sólida com ou sem a ajuda de anticorpos de captação policlonal ou monoclonal;
- c) O fluido biológico a examinar;
- b) Um controlo positivo e negativo correspondente;
- e) Conjugado;
- f) Um substrato adaptado ao enzima utilizado;
- g) Uma solução de paragem, se necessário;
- h) Soluções para a diluição das amostras a ensaiar, para a preparação dos reagentes e para a lavagem;
- i) Um sistema de leitura apropriado para o substrato utilizado.

2. Padronização e sensibilidade da prova:

1. As amostras de leite examinadas em conjunto são consideradas negativas se derem uma reacção correspondente a menos de 50 % da verificada com uma diluição de 1/10 000 do segundo soro padrão internacional de brucelose em leite negativo;
2. As amostras de soro individuais são consideradas negativas se derem uma reacção correspondente a menos de 10 % da obtida com uma diluição de 1 : 200 do segundo soro padrão internacional de brucelose numa solução salina, ou qualquer outra diluição reconhecida, de acordo com o processo estabelecido no artigo 12º, após parecer do comité científico veterinário.

Os padrões para a prova Elisa de brucelose serão os especificados na parte A, pontos 1 e 2, do anexo C ( a utilizar nas diluições indicadas no rótulo).

3. Condições de utilização da prova Elisa para a brucelose bovina:

O método Elisa pode ser utilizado numa amostra de leite ou soro retirada de uma colheita de leite proveniente de uma exploração com pelo menos 30 % de vacas leiteiras em lactação.

Se se utilizar este método, devem ser tomadas medidas que garantam a possibilidade de identificar, a partir da amostra, os animais de que provém o leite ou soro examinados.



## ANEXO D

## CAPÍTULO I

## EXPLORAÇÕES, ESTADOS-MEMBROS E REGIÕES INDEMNES DE LEUCOSE BOVINA ENZOÓTICA

A. Uma exploração é considerada indemne de leucose bovina enzoótica se:

- i) Não existirem provas, quer clínicas quer laboratoriais, de qualquer caso de leucose bovina enzoótica na exploração, nem tiver sido confirmado qualquer caso nos dois anos anteriores, e
- ii) Todos os animais com idade superior a 24 meses tiverem sido submetidos, com reacções negativas, a duas provas realizadas nos 12 meses precedentes, em conformidade com o presente anexo, com um intervalo de, pelo menos, quatro meses, ou
- iii) Preencher as condições da alínea i) anterior e estiver situada num Estado-membro ou numa região indemne de leucose bovina enzoótica.

B. Uma exploração manterá o estatuto de indemne de leucose bovina enzoótica se:

- i) Continuar a estar preenchida a condição da alínea i) da parte A.
- ii) Todos os animais introduzidos na exploração forem provenientes de explorações indemnes de leucose bovina enzoótica;
- iii) Todos os animais com idade superior a 24 meses continuarem a apresentar reacção negativa a provas realizadas de três anos de acordo com o capítulo II.

C. O estatuto de exploração indemne de leucose bovina enzoótica será suspenso caso deixem de estar preenchidas as condições especificadas na parte B anterior.

D. O estatuto permanecerá suspenso até que estejam preenchidas as seguintes condições:

1. Caso um único animal, numa exploração indemne de leucose bovina enzoótica, tenha apresentado reacção positiva a uma das provas referidas no capítulo II:

- i) O animal que reagiu positivamente e, no caso de uma vaca, todos os vitelos seus descendentes, devem ter sido retirados de exploração e enviados para o matadouro, sob o controlo das autoridades veterinárias;
- ii) Os restantes animais devem ter apresentado reacção negativa a provas serológicas realizadas de acordo com o capítulo II, pelo menos três meses após a retirada dos animais positivos e dos seus eventuais descendentes;
- iii) Deve ser realizado um inquérito epidemiológico, e as explorações epidemiologicamente ligadas à exploração infectada devem ser submetidas às medidas referidas na alínea ii).

A autoridade competente pode, no entanto, conceder uma derrogação da obrigação de abate do vitelo de uma vaca infectada, caso este tenha sido separado da mãe após o parto. Neste caso, o vitelo deve ser submetido às condições previstas na alínea iii) do nº 2 seguinte.

2. Caso mais de um animal da exploração indemne de leucose bovina enzoótica tenha apresentado reacção positiva, ou caso tenha sido confirmada a infecção na exploração:

- i) Os animais positivos e os respectivos vitelos, no caso das vacas, devem ser retirados para abate sob controlo das autoridades veterinárias;
- ii) Todos os animais com idade superior a 24 meses devem ter sido submetidos, com reacção negativa, a duas provas realizadas de acordo com o capítulo II, com um intervalo mínimo de quatro meses e máximo de 12 meses;
- iii) Todos os restantes animais devem, depois de identificados, permanecer na exploração até terem idade superior a 24 meses e terem sido submetidos, com resultados satisfatórios, às provas referidas na alínea ii) anterior;
- iv) Deve ser realizado um inquérito epidemiológico, devendo as explorações epidemiologicamente ligadas à exploração infectada ser submetidas às medidas estabelecidas na alínea ii) anterior.

A autoridade competente pode, no entanto, conceder uma derrogação à obrigação de abate do vitelo de uma vaca infectada, desde que este tenha sido separado da mãe após o parto. Nesse caso, o vitelo deve ser submetido ao disposto na alínea iii) do nº 2.

3. Caso o estatuto de exploração indemne de leucose bovina enzoótica tenha sido suspenso por qualquer outra razão, todos os animais da exploração com idade superior a 24 meses devem ter apresentado reacção negativa a uma prova serológica realizada de acordo com o capítulo II.
- E. Em conformidade com o processo do artigo 12º, a Comissão pode propor a concessão do estatuto de indemne de leucose bovina enzoótica a um Estado-membro ou região, se:
- a) Pelo menos 99,8 % das explorações bovinícolas estiverem indemnes de leucose bovina enzoótica, na acepção da parte A;
  - ou
  - b) Não tiver sido confirmado qualquer caso de leucose bovina enzoótica no Estado-membro ou região, durante os últimos três anos e  
  
no caso de um Estado-membro, todos os animais com idade superior a 24 meses de pelo menos 10 % dos efectivos, seleccionados ao acaso, tiverem sido submetidos, com resultados negativos, a uma prova em conformidade com o capítulo II nos 24 meses anteriores ou  
  
no caso de uma região ou de um Estado-membro, todos os animais com idade superior a 24 meses tiverem sido submetidos, com resultados negativos, a uma prova prevista no capítulo II.
- F. Um Estado-membro ou uma região de um Estado-membro manterão o estatuto de indemnes de leucose bovina enzoótica se:
- i) Se verificar anualmente, com base numa amostra casualizada correspondente a um nível de confiança de 99 %, que menos de 0,2 % das explorações estavam infectadas, ou que pelo menos 20 % dos bovinos com idade superior a dois anos foram submetidos, com resultados negativos, a uma prova realizada de acordo com o capítulo II;
  - ou
  - ii) Se não se tiver registado nenhum caso de leucose bovina enzoótica no Estado-membro ou região, numa proporção de numa exploração para 10 000, durante pelo menos três anos; nesse caso, pode ser tomada, em conformidade com o artigo 12º, a decisão de interromper a pesquisa serológica sistemática, desde que:
    - todos os bovinos abatidos no território desse Estado-membro ou região sejam submetidos a um exame *post mortem* por um veterinário oficial, que deverá notificar todos os tumores com vista a um exame laboratorial, e
    - o Estado-membro relate a ocorrência de todos os casos de leucose bovina enzoótica na área afectada pela decisão da Comissão. A Comissão pode, de acordo com o processo do artigo 12º, propor a suspensão ou revogação da decisão de interromper a pesquisa serológica sistemática; e
    - todos os bovinos com reacção positiva a uma prova de imunodifusão sejam abatidos, devendo a exploração permanecer submetida a restrições até ao restabelecimento do seu estatuto nos termos do capítulo I, parte D, do anexo D.
- G. i) O estatuto de Estado-membro ou região de Estado-membro indemne de leucose bovina enzoótica será suspenso, de acordo com o processo do artigo 12º, caso seja detectada e confirmada a presença de leucose bovina enzoótica em mais de 0,2 % das explorações dessa região ou Estado-membro.
- ii) O estatuto de indemne de leucose bovina enzoótica pode ser restabelecido, de acordo com o processo do artigo 12º, se:
- a) Para além das medidas previstas nos pontos 1 e 2 da parte D, pelo menos 20 % das outras explorações, seleccionadas ao acaso na região ou Estado-membro, tiverem sido submetidas, dentro de um prazo de doze meses, a uma das provas referidas no capítulo II.
  - b) Os resultados destas provas indicarem, com um nível de confiança de 99 %, que menos 0,2 % das explorações estão infectadas.

## CAPÍTULO II

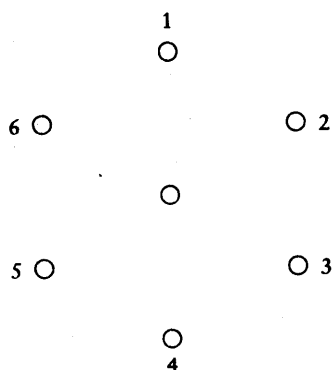
## PROVAS PARA PESQUISA DE LEUCOSE BOVINA ENZOÓTICA

A pesquisa de leucose bovina enzoótica efectua-se mediante a prova de imunodifusão nas condições descritas nos pontos A e B, ou mediante a prova de imunoabsorção enzimática (Elisa) nas condições descritas no ponto C. O método de imunodifusão só se aplica às provas individuais. No caso de os resultados das provas serem objecto de uma contestação devidamente fundamentada, efectuar-se-á uma prova de imunodifusão como controlo complementar.

**A. Provas de imunodifusão sobre placas de ágar-gel para pesquisa de leucose, bovina enzoótica.**

1. O antigénio a utilizar nesta prova deve conter glicoproteínas do vírus da leucose bovina. O antigénio deve ser padronizado em relação a um soro padrão (soro EI) fornecido pelo Statens Veterinære Serum Laboratorium de Copenhaga.
2. Os organismos públicos seguidamente indicados devem ser encarregados de calibrar o antigénio padrão de trabalho no laboratório por comparação com o soro padrão oficial CEE (soro EI) fornecido pelo Statens Veterinære Serum Laboratorium de Copenhaga.
  - a) Alemanha: Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen;
  - b) Bélgica: Institut national de recherches vétérinaires, Bruxelas;
  - c) França: Laboratoire national de pathologie bovine, Lião;
  - d) Grão-Ducado do Luxemburgo: —
  - e) Itália: Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Perugia;
  - f) Países Baixos: Centraal Diergeneeskundig Instituut, Afdeling Rotterdam;
  - g) Dinamarca: Statens Veterinære Serum Laboratorium, Copenhaga;
  - h) Irlanda: Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Dublin;
  - i) Reino Unido:
    1. Grã-Bretanha: The Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Inglaterra,
    2. Irlanda do Norte: The Veterinary Research Laboratory, Stormont, Belfast;
  - j) Espanha: Subdirección general de sanidad animal. Laboratorio de Sanidad y Producción Animal Algete, de Barcelona;
  - k) Portugal: Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Lisboa;
  - l) Grécia: —
3. Os antigénios padrão utilizados no laboratório devem ser apresentados pelo menos uma vez por ano aos laboratórios de referência CEE enumerados no nº 2 *supra*, para aí serem testados por comparação com o soro padrão CEE. Independentemente desta padronização, o antigénio utilizado pode ser calibrado em conformidade com a parte B.
4. Na prova serão utilizados os reagentes seguintes:
  - a) Antigénio: o antigénio deve conter glicoproteínas específicas do vírus da leucose bovina enzoótica padronizado por comparação com o soro padrão oficial CEE;
  - b) O soro a testar;

- c) Um soro de controlo positivo conhecido;
- d) Ágar-gel:  
 0,8 % ágar  
 8,5 % NaCl  
 tampão Tris 0,05 M, ph 7,2  
 devem-se colocar 15 ml deste ágar numa placa de Petri de 85 mm de diâmetro, o que dá uma altura de 2,6 mm de ágar.
5. Preparar um dispositivo experimental de sete cavidades isentas de humidade por perfuração do ágar até ao fundo da placa; a rede assim obtida deverá ser constituída por uma cavidade central em torno da qual se ordenam seis cavidades periféricas dispostas em círculo.
- Diâmetro da cavidade central: 4 mm  
 Diâmetro das cavidades periféricas: 6 mm  
 Distância entre a cavidade central e as cavidades periféricas: 3 mm.
6. Encher a cavidade central com o antigénio padrão. As cavidades periféricas 1 e 4 (ver esquema abaixo) são enchidas com o soro positivo conhecido e as cavidades 2, 3, 5 e 6 com os soros a testar. As cavidades devem ser enchidas até ao desaparecimento do menisco.



7. As quantidades obtidas são as seguintes:  
 antigénio: 32 microlitros,  
 soro de controlo: 73 microlitros,  
 soro a testar: 73 microlitros.
8. A incubação deve durar 72 horas à temperatura ambiente (20—27°C) em atmosfera húmida num recipiente fechado.
9. A prova pode ser lida passadas 24 horas e passadas 48 horas, mas não se pode obter qualquer resultado final antes de passarem 72 horas:
- a) Um soro a testar é positivo se formar uma linha de precipitação específica com o antigénio do vírus da leucose bovina e se essa linha coincidir com a do soro de controlo;
- b) Um soro a testar é negativo se não der linha de precipitação específica com o antigénio do vírus da leucose bovina e se não inflectir a linha do soro de controlo;

c) A reacção não pode ser considerada concludente se:

- i) inflectir a linha do soro de controlo para a cavidade do antigénio do vírus da leucose bovina sem formar uma linha de precipitação visível com o antigénio, ou
- ii) Não for possível interpretá-la como negativa ou como positiva.

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

10. Pode ser utilizada qualquer outra configuração ou distribuição das cavidades, desde que permita detectar como positiva uma diluição do soro E4 em soro negativo à razão de 1 : 10.

#### B. Método de padronização do antigénio

##### *Soluções e materiais necessários:*

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

##### *Modo de execução:*

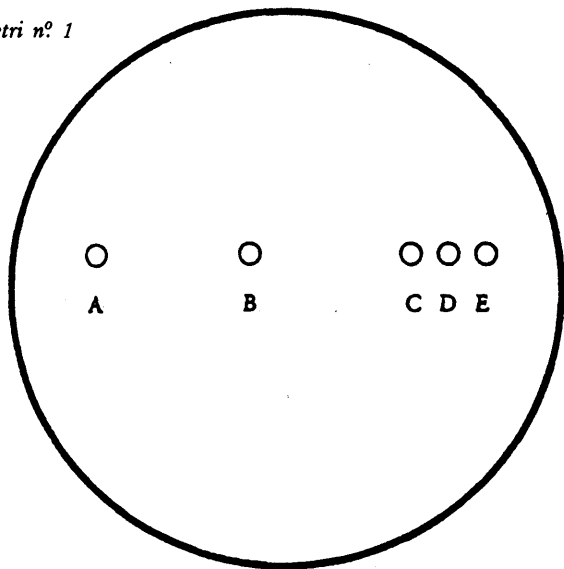
Dissolver a agarose (1,6 %) no tampão Tris/HCl aquecendo com cuidado até 100 °C. Pôr no banho-maria a 56 °C durante cerca de 1 hora. Colocar também as diluições do soro de leucose bovina no banho-maria a 56 °C.

Misturar em seguida 15 ml de solução de agarose a 56 °C com os 15 ml de soro de leucose bovina (1 : 10), agitar rapidamente e deitar em duas placas de Petri, à razão de 15 ml por placa.

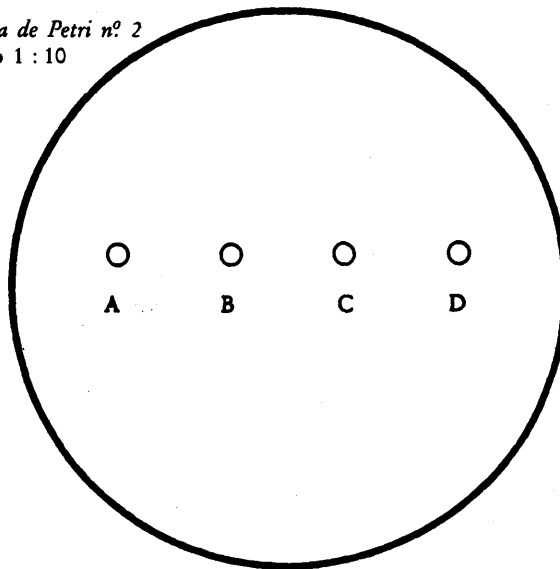
Repetir as operações atrás descritas com o soro de leucose bovina diluído a 1/5.

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

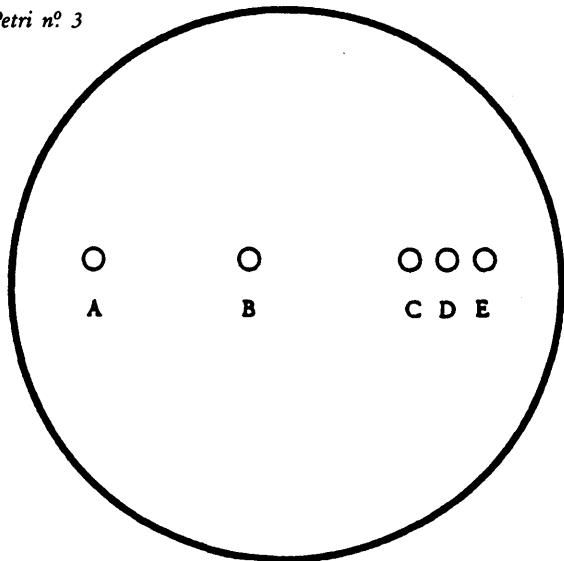
Placa de Petri nº 1  
Soro 1 : 10



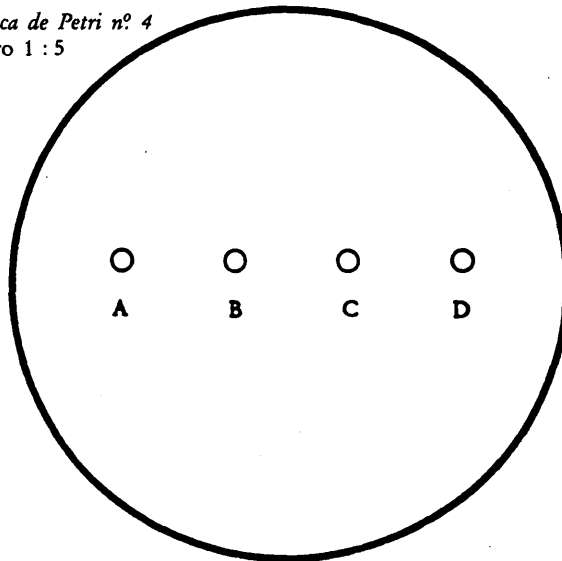
Placa de Petri nº 2  
Soro 1 : 10



Placa de Petri nº 3  
Soro 1 : 5



Placa de Petri nº 4  
Soro 1 : 5



Adição de antígeno:

I. Placas de Petri nºs 1 e 3:

- Cavidade A = antígeno de referência não diluído
- Cavidade B = antígeno de referência diluído a 1/2,
- Cavidades C e E = antígeno de referência,
- Cavidade D = antígeno a testar, não diluído.

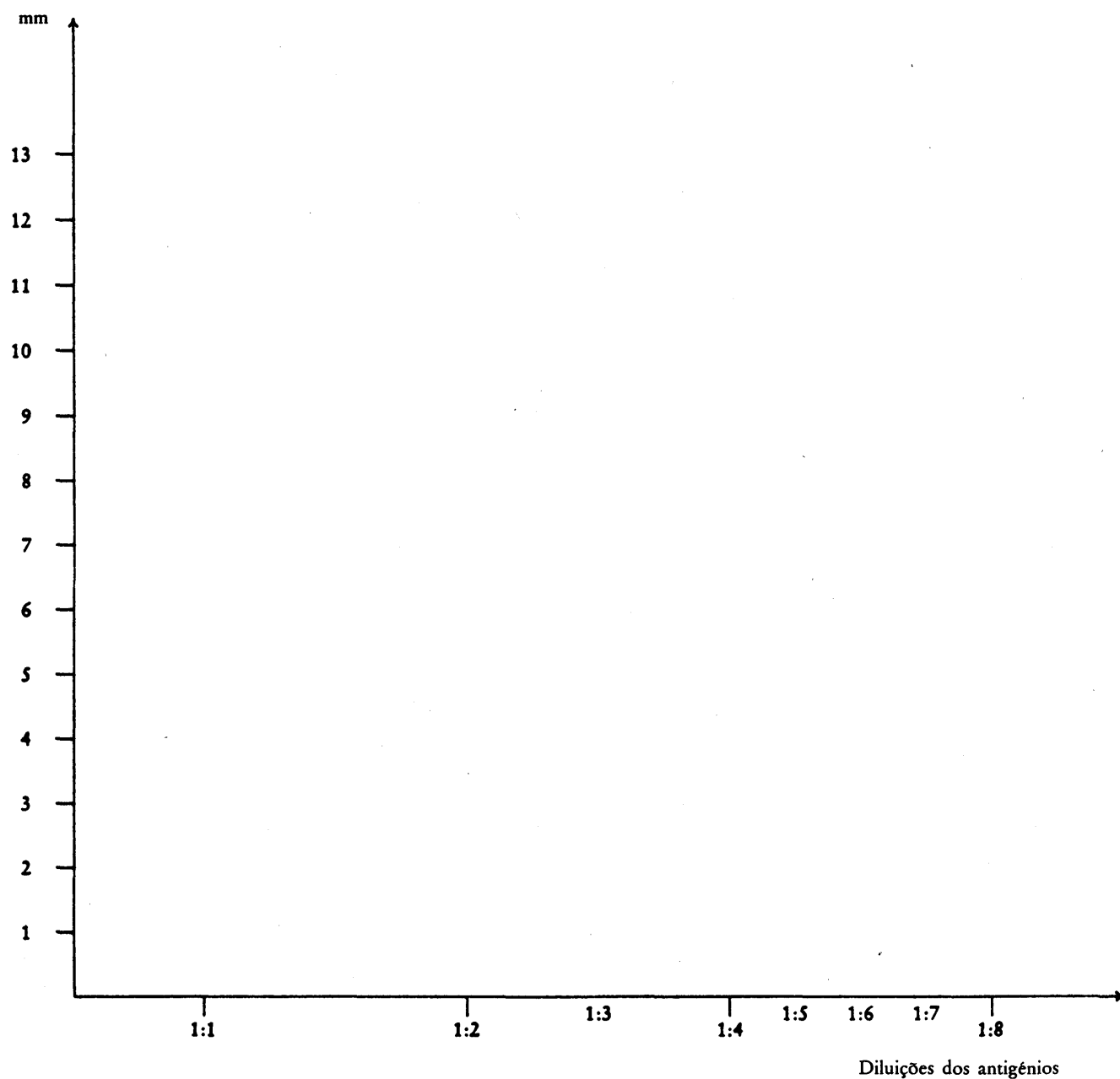
II. Placas de Petri nºs 2 e 4:

- Cavidade A = antígeno a testar, não diluído,
- Cavidade B = antígeno a testar, diluído a 1/2,
- Cavidade C = antígeno a testar, diluído a 1/4,
- Cavidade D = antígeno a testar, diluído a 1/8.

*Instruções complementares:*

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

Diâmetro



**C. Prova de imunoabsorção enzimática (Elisa) para a pesquisa de leucose bovina enzoótica****1. Para o método Elisa, são os seguintes os materiais e os reagentes a utilizar:**

- a) Microplacas para fase sólida, tinas ou qualquer fase sólida;
- b) O antigénio fixado à fase sólida com ou sem a ajuda de anticorpos de captação policlonal ou monoclonal. Se o antigénio é directamente aplicado à fase sólida, todas as amostras que apresentem reacções positivas devem ser testadas de novo em relação ao antigénio de controlo. Este deve ser idêntico ao antigénio testado excepto no que respeita aos antigénios BLV. Se os anticorpos de captação forem aplicados à fase sólida, os anticorpos apenas devem reagir aos antigénios BLV;
- c) O fluido biológico a examinar;
- d) Um controlo positivo e negativo correspondente;
- e) Conjugado;
- f) Um substrato adaptado ao enzima utilizado;
- g) Uma solução de paragem, se necessário;
- h) Soluções para a diluição das amostras de ensaio, para a preparação dos reagentes e para a lavagem;
- i) Um sistema de leitura adequado para o substrato utilizado.

**2. Normalização e sensibilidade do teste:**

A sensibilidade da prova Elisa utilizada deve ser de um nível tal que o soro E4 seja positivo quando diluído 10 vezes (amostras de soro) ou 250 vezes (amostras de leite) mais do que uma solução obtida a partir de amostras individuais colocadas em conjunto. Em provas em que as amostras (soro e leite) sejam examinadas individualmente, o soro E4, diluído à razão de 1 : 10 (para o soro negativo) ou à razão de 1 : 250 (para o leite negativo), deve dar uma reacção positiva quando for examinado na mesma diluição que é utilizada para as amostras individuais. Os organismos públicos indicados no nº 2 da parte A serão responsáveis pelo controlo da qualidade do método Elisa, nomeadamente pela determinação, para cada lote produzido, do número de amostras a reunir, com base na contagem obtida com o soro E4.

O soro E4 é fornecido pelo Statens Veterinære Serumlaboratorium de Copenhaga.

**3. Condições de utilização do teste Elisa para a pesquisa de leucose bovina enzoótica**

O método Elisa pode ser utilizado numa amostra de leite ou soro retirada de uma colheita de leite proveniente de uma exploração com pelo menos 30 % das vacas leiteiras em lactação .

Se for utilizado este método, devem ser tomadas medidas que garantam a correspondência entre as amostras recolhidas e os animais de que provém o leite ou os soros analisados.



---

*ANEXO E (I)*

- a) Doenças dos bovinos
- Raiva,
  - Tuberculose,
  - Brucelose,
  - Peripneumonia contagiosa dos bovinos,
  - Leucose bovina enzoótica.
- b) Doenças dos suínos:
- Raiva,
  - Brucelose.
- 

*ANEXO E (II)*

- Doença de Aujeszky
  - Rinotraqueíte infecciosa dos bovinos,
  - Infecção por *Brucella suis*
-

CERTIFICADO Nº .....

ESPÉCIE bovinos/suínos  
para abate/reprodução/rendimento

ESTADO-MEMBRO DE ORIGEM .....

REGIÃO DE ORIGEM .....

A.

EXPLORAÇÃO DE ORIGEM	Endereço .....
Nome .....	.....
Número de refª .....	.....
Situação sanitária da exploração de origem:	Os animais abaixo mencionados foram submetidos às provas seguintes, em conformidade com a Directiva 64/432/CEE:
Oficialmente indemne de tuberculose      sim/não	
Oficialmente indemne de brucelose        sim/não	
Indemne de brucelose                        sim/não	
Indemne de leucose                          sim/não	
DATA DE SAÍDA .....	PROVAS EXIGIDAS                              DATA DA PROVA
Assinatura .....	Tuberculina                                  sim/não .....
	Seroaglutinação brucelose                sim/não .....
	Leucose                                        sim/não .....
	Veterinário oficial, exploração de origem .....

B.

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL	
Raça .....	Número total de animais .....
Tipo .....	Identificação oficial .....
Idade .....	

C.

MERCADO APROVADO	
Local .....	
Endereço .....	
.....	
.....	
Data .....	Nº refª .....
Assinatura/carimbo	

LOCAL DE CONCENTRAÇÃO/CARREGAMENTO	
Local .....	
Endereço .....	
.....	
.....	
Data .....	Nº refª .....

D.

DESTINATÁRIO
Endereço .....
.....
.....

COMÉRCIO INTRACOMUNITÁRIO
Meios de transporte .....
Identificação .....
Tendo realizado as averiguações necessárias, certifico que:
(1) Foram cumpridas todas as disposições aplicáveis da Directiva 64/432/CEE do Conselho;
(2) A deslocação proposta foi registada na rede ANIMO.
(3) Os animais acima indicados cumprem as garantias adicionais referentes
à ..... (doença), exigidas para o envio
de ..... (espécie/tipo)
com destino a .....
(Decisão .../.../CEE da Comissão).
Data do exame sanitário .....
O presente certificado é válido até .....
Assinatura .....
Nome (maiúsculas) .....
Data .....

Data do exame sanitário .....  
O presente certificado é válido até .....

Assinatura ..... Data .....  
Nome (maiúsculas) .....

## ANEXO II

## QUADRO DE CORRESPONDÊNCIA

Directiva actualizada	Directiva 64/432/CEE
Artigo 1º	Artigo 1º
Artigo 2º alínea a)	---
Artigo 2º alínea b)	Artigo 2º alínea b)
Artigo 2º alínea c)	Artigo 2º alínea c)
Artigo 2º alínea d)	Artigo 2º alínea d)
Artigo 2º alínea e)	---
Artigo 2º alínea f)	Artigo 2º alínea e)
Artigo 2º alínea g)	---
Artigo 2º alínea h)	---
Artigo 2º alínea i)	Artigo 2º alínea f)
Artigo 2º alínea j)	Artigo 2º alínea s)
Artigo 2º alínea k)	Artigo 2º alínea t)
Artigo 2º alínea l)	Artigo 2º alínea l)
Artigo 3º nº 1	Artigo 3º nº 1
Artigo 3º nº 2 alínea a)	Artigo 3º nº 2 alínea a)
Artigo 3º nº 2 alínea b)	Artigo 3º nº 2 alínea b)
Artigo 3º nº 2 alínea c)	Artigo 3º nº 2 alínea c)
Artigo 3º nº 2 alínea d)	Artigo 3º nº 5
Artigo 3º nº 2 alínea e)	---
Artigo 4º nº 1	Artigo 3º nº 2 alínea f) e subalínea i)
Artigo 4º nº 2	Artigo 3º nº 2 alínea g)
Artigo 4º nº 3	---
Artigo 5º	---
Artigo 6º nº 1, primeiro travessão	Artigo 3º nº 2 alínea d)
Artigo 6º nº 1, segundo travessão	---
Artigo 6º nº 2 alínea a), primeiro parágrafo	Artigo 3º nº 3 alínea a)
Artigo 6º nº 2 alínea a), segundo parágrafo	---
Artigo 6º nº 2 alínea b), primeiro parágrafo	Artigo 3º nº 3 alínea b)
Artigo 6º nº 2 alínea b), segundo parágrafo	---
Artigo 6º nº 2 alínea c)	Artigo 3º nº 3 alínea d)
Artigo 6º nº 2 alínea d)	Artigo 3º nº 2 alínea f) e subalínea ii)
Artigo 6º nº 3	---
Artigo 7º	Artigo 6º
Artigo 8º	---
Artigo 9º	Artigo 9º
Artigo 10º	Artigo 10º
Artigo 11º	---
Artigo 12º nº 1	Artigo 12º nº 1
Artigo 12º nº 2	Artigo 12º nº 2
Artigo 12º nº 3	Artigo 12º nº 3
Artigo 12º nº 4, primeiro parágrafo	Artigo 12º nº 4, primeiro parágrafo
Artigo 12º nº 4, segundo parágrafo	Artigo 12º nº 4, segundo parágrafo
Artigo 12º nº 4, terceiro parágrafo	---
Artigo 13º nº 1	Artigo 13º nº 1
Artigo 13º nº 2	Artigo 13º nº 2
Artigo 13º nº 3	Artigo 13º nº 3
Artigo 13º nº 4, primeiro parágrafo	Artigo 13º nº 4, primeiro parágrafo
Artigo 13º nº 4, segundo parágrafo	---
Artigo 14º	Artigo 14º
Artigo 15º	Artigo 16º
Anexo A	---
Anexo B nº 1-B nº 26	Anexo B nº 1-B nº 26
Anexo B nº 27	Anexo B nº 27
Anexo B nº 28-B nº 31	Anexo B nº 28-B nº 31
Anexo B nº 32	Anexo B nº 32
Anexo C parte A	Anexo C parte A
Anexo C parte B	Anexo C parte B
Anexo C parte C	Anexo C parte C
Anexo C parte D	Anexo C parte D
Anexo C parte E	Anexo C parte E
Anexo C parte F	Anexo C parte F

Directiva actualizada	Directiva 64/432/CEE
Anexo C parte G Anexo C parte H Anexo D capítulo I Anexo D capítulo II secção A nº 1 e secção A nº 9 Anexo D capítulo II secção A nº 10 Anexo D capítulo II secção B Anexo D capítulo II secção C Anexo E capítulo I Anexo E capítulo II Anexo F	Anexo C parte G Anexo G capítulo II secção C Anexo G capítulo I Anexo G capítulo II secção A nº 1 e secção A nº 9 --- Anexo G capítulo II secção B Anexo G capítulo II secção C --- --- ---