

31994D0577

L 221/26

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

26.8.1994

ODLOČBA KOMISIJE**z dne 15. julija 1994****o pogojih zdravstvenega varstva živali in veterinarskem certificiranju za uvoz govejega semena iz tretjih držav**

(94/577/ES)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 88/407/EGS z dne 14. junija 1988 o določitvi zahtev za zdravstveno varstvo živali, ki se uporabljajo za promet znotraj Skupnosti in za uvoz globoko zamrznjenega semena domačega goveda ⁽¹⁾, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo 93/60/EGS ⁽²⁾, in zlasti členov 10 in 11 Direktive,

ker je bil seznam tretjih držav, iz katerih države članice dovolijo uvoz semena domačega goveda (v nadaljnjem besedilu „seznam tretjih držav“), določen z Odločbo Komisije 90/14/EGS ⁽³⁾, kakor je bila spremenjena z Odločbo 91/276/EGS ⁽⁴⁾;

ker je bil zaradi zdravstvenega stanja v Izraelu z Odločbo Komisije 91/277/EGS ⁽⁵⁾ prepovedan uvoz iz te države;

ker odločbe Komisije 91/479/EGS ⁽⁶⁾, 91/549/EGS ⁽⁷⁾, 92/123/EGS ⁽⁸⁾, 92/124/EGS ⁽⁹⁾, 92/125/EGS ⁽¹⁰⁾, 92/126/EGS ⁽¹¹⁾, 92/127/EGS ⁽¹²⁾, 92/128/EGS ⁽¹³⁾,

⁽¹⁾ UL L 194, 22.7.1988, str. 10.⁽²⁾ UL L 186, 28.7.1993, str. 28.⁽³⁾ UL L 8, 11.1.1990, str. 71.⁽⁴⁾ UL L 135, 30.5.1991, str. 58.⁽⁵⁾ UL L 135, 30.5.1991, str. 60.⁽⁶⁾ UL L 258, 16.9.1991, str. 1.⁽⁷⁾ UL L 298, 29.10.1991, str. 6.⁽⁸⁾ UL L 48, 22.2.1992, str. 1.⁽⁹⁾ UL L 48, 22.2.1992, str. 10.⁽¹⁰⁾ UL L 48, 22.2.1992, str. 19.⁽¹¹⁾ UL L 48, 22.2.1992, str. 28.⁽¹²⁾ UL L 48, 22.2.1992, str. 37.⁽¹³⁾ UL L 48, 22.2.1992, str. 46.

92/386/EGS ⁽¹⁴⁾, 92/387/EGS ⁽¹⁵⁾ in 92/445/EGS ⁽¹⁶⁾ določajo pogoje za zdravstveno stanje živali in izdajanje veterinarskih spričeval za uvoz govejega semena iz Združenih držav Amerike, Kanade, Poljske, Finske, Nove Zelandije, Avstrije, Švice, Švedske, Madžarske, Norveške in Čehoslovaške;

ker Direktiva 93/60/EGS, ki jo je treba v državah članicah začeti izvajati najpozneje do 1. julija 1994, spreminja Direktivo 88/407/EGS in je zato treba spremeniti zgoraj navedene odločbe glede tretjih držav; ker je treba, zato da bi poenostavili in razjasnili zakonodajo Skupnosti na tem področju, združiti zgoraj navedene odločbe in razveljaviti tiste, ki veljajo za vsako posamezno državo;

ker glede na določbe Sporazuma o evropskem gospodarskem prostoru niso več potrebna veterinarskega spričevala za uvoz govejega semena iz Avstrije, Finske, Norveške in Švedske;

ker je v skladu z mnenjem Znanstvenega veterinarskega odbora obvezen dodaten test za epizootsko hemoragično bolezen;

ker se samo v Kanadi opravljajo rutinski testi pred zbiranjem semena za to bolezen v šestmesečnih presledkih; ker je torej treba omogočiti prehodno obdobje za uvedbo te odločbe v zvezi s

⁽¹⁴⁾ UL L 204, 21.7.1992, str. 13.⁽¹⁵⁾ UL L 204, 21.7.1992, str. 22.⁽¹⁶⁾ UL L 247, 27.8.1992, str. 1.

Kanado, da bi dali kanadskim veterinarskim organom na voljo prehodno obdobje za uvedbo novega testa v njihov redni program;

ker se poleg tega glede na napredek, ki je bil v zadnjem času dosežen v zvezi z razumevanjem epidemiologije bolezni modrikastega jezika, zdaj lahko dovoli uvoz govejega semena iz Avstralije;

ker kaže, da je zdravstveno stanje živali v državah, ki so na seznamu tretjih držav, dobro in ga nadzorujejo dobro strukturirane in organizirane veterinarske službe, glede bolezni, ki se prenašajo s semenom;

ker so se pristojni veterinarski organi tretjih držav zavezali, da v roku 24 ur po teleksu ali telefaksu uradno obvestijo Komisijo in države članice o potrditvi pojava katere koli bolezni, ki je na seznamu A Mednarodnega urada za kužne bolezni (Office International d'Epizooties, OIE), ali o kakršnih koli spremembah v politiki cepljenja v zvezi s katero koli od teh bolezni ali, v ustreznem roku, o pojavu bolezni s seznama B OIE in o kakršnih koli predlaganih spremembah uvoznih pravil za domače živali ali njihovo seme ali zarodke;

ker so se pristojni veterinarski organi držav s seznama tretjih držav zavezali, da uradno nadzorujejo izdajanje potrdil iz te odločbe in zagotovijo, da se vsa ustrezna potrdila, odstopanja in laboratorijski izvidi, na podlagi katerih bi lahko bila izdana potrdila, hranijo v uradnih arhivih najmanj 12 mesecev po odpremi semena, na katerega se nanašajo;

ker so se pristojni veterinarski organi držav s seznama tretjih držav zavezali, da uradno odobrijo osemenjevalna središča za izvoz govejega semena v Evropsko gospodarsko skupnost, kakor je zahtevano v členu 9 Direktive 88/407/EGS;

ker je treba pogoje za zdravstveno stanje živali in izdajanje veterinarskih spričeval prilagoditi glede na zdravstveno stanje živali v zadevni tretji državi;

ker so ukrepi, predvideni s to odločbo, v skladu z mnenjem Stalnega veterinarskega odbora,

SPREJELA NASLEDNJO ODLOČBO:

Člen 1

Države članice dovolijo uvoz govejega semena, ki izpolnjuje pogoje, določene v potrdilih iz delov 1 prilog A, B, C in D, in samo iz tistih tretjih držav, ki so navedene v delu 2 priloge A, B, C ali D.

Vendar pa države članice do 31. decembra 1994 dovolijo uvoz govejega semena, zbranega in pripravljenega v skladu z Odločbo 91/549/EGS, iz Kanade.

Člen 2

Odločbe 91/479/EGS, 92/123/EGS, 92/124/EGS, 92/125/EGS, 92/126/EGS, 92/127/EGS, 92/128/EGS, 92/386/EGS, 92/387/EGS in 92/445/EGS se razveljavijo.

Odločba 91/549/EGS se razveljavi s 1. januarjem 1995.

Člen 3

Določbe v zvezi s Kanado iz prvega pododstavka člena 1 se uporabljajo od 1. januarja 1995.

Člen 4

Ta odločba je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 15. julija 1994

Za Komisijo
René STEICHEN
Član komisije

PRILOGA A

DEL 1

VETERINARSKO SPRIČEVALO

za uvoz govejega semena

1. Pošiljatelj (ime in polni naslov)	Številka spričevala	
	2. Tretja država zbiranja	
3. Prejemnik (ime in polni naslov)	4. Pristojni organ	
	5. Pristojna lokalna oblast	
6. Kraj nakladanja	7. Ime in naslov osemenjevalnega središča	
8. Prevozno sredstvo	10. Številka odobritve osemenjevalnega središča	
9. Namembni kraj in država članica		
11. Številka pečata na posodah s semenom		
12. Identifikacija semena		sveže ali zamrznjeno *
(* neustrezno prečrtajte)		
(a) Število odmerkov	(b) Datum(-i) zbiranja	(c) Pasma
(d) Identifikacija živali donorke		

13. Spodaj podpisani uradni veterinar sem prebral Direktivo Sveta 88/407/EGS, kakor je bila spremenjena, sem z njo seznanjen in potrjujem:

(a)
(ime države izvoznice)

je bila 12 mesecev neposredno pred zbiranjem semena za izvoz in do datuma njegove odpreme prosta goveje kuge ter slinavke in parkljevke, v istem obdobju tudi ni bilo opravljeno nobeno cepljenje proti tema boleznima;

(b) o semenjevalno središče, kjer je bilo zbrano seme za izvoz, je bilo:

(i) odobreno v skladu s pogoji, določenimi v poglavju I Priloge A k Direktivi Sveta 88/407/EGS;

(ii) upravljano in nadzorovano v skladu s pogoji, določenimi v poglavju II Priloge A k Direktivi Sveta 88/407/EGS;

(iii) prosto stekline, tuberkuloze, bruceloze, vraničnega prisada in pljučne kuge govedi v obdobju od 30 dni pred datumom zbiranja semena za izvoz do 30 dni po zbiranju (v primeru svežega semena do dneva odpreme);

(c) goveda v o semenjevalnem središču:

(i) izvirajo iz čred in/ali so jih skotile bikovske matere, ki izpolnjujejo pogoje iz poglavja I Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(ii) so bila pred začetkom izolacije testirana, kakor določa poglavje I Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(iii) so izpolnila zahteve glede izolacije in testiranj pred vstopom, določene v poglavju I Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(iv) če so v središču že vsaj eno leto, so bile opravljene rutinske preiskave v skladu s poglavjem II Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(d) seme za izvoz:

(i) je bilo pridobljeno od donorjev, ki so se nahajali v

.....
(ime države izvoznice)

v obdobju šestih mesecev neposredno pred zbiranjem semena za izvoz in izpolnjujejo pogoje, določene v Prilogi C k Direktivi 88/407/EGS;

(ii) je bilo pridobljeno od donorjev:

— ki so v o semenjevalnem središču, v katerem je bil pri vseh govedih v 12 mesecih pred zbiranjem semena za izvoz z negativnim rezultatom opravljen test serumske nevtralizacije ali test ELISA za infektivni bovin rinitis/infektivni pustularni vulvovaginitis ⁽¹⁾,

ali

— pri katerih je bil test serumske nevtralizacije ali test ELISA za infektivni bovin rinitis/infektivni pustularni vulvovaginitis, opravljen v 12 mesecih pred zbiranjem semena za izvoz, negativen ⁽¹⁾,

ali

— ki so seropozitivni po cepljenju, opravljenem v skladu s poglavjem II Priloge B k Direktivi Sveta 88/407/EGS, in pri katerih je bil rezultat testa serumske nevtralizacije ali testa ELISA, opravljenega v odobrenem o semenjevalnem središču pred cepljenjem, negativen ⁽¹⁾,

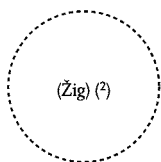
⁽¹⁾ Neustrezno prečrtajte

ali

- ki so seropozitivni pri testu serumske nevtralizacije ali testu ELISA za infekcijski bovin rinoartritis/infekcijski pustularni vulvovaginitis, niso bili cepljeni v skladu s poglavjem II Priloge B k Direktivi Sveta 88/407/EGS in pri katerih je bil na vsaj 10 % vsakega ejakulata semena za izvoz (vendar najmanj pet slamic) pred izvozom opravljen test inokulacije živali ali test izolacije virusa z negativnim rezultatom ⁽¹⁾;

(iii) je bilo obdelano, skladiščeno in prepeljano pod pogoji, ki so v skladu z Direktivo 88/407/EGS.

V (kraj)
(dne) (datum)



Podpis (?)

Ime z velikimi tiskanimi črkami:

Uradni naziv:

⁽¹⁾ Neustrezno prečrtajte.

⁽²⁾ Podpis in žig morata biti drugačne barve kot tisk.

DEL 2

Seznam držav, ki smejo uporabljati vzorec veterinarskega spričevala iz dela 1 Priloge A

ČEŠKA

MADŽARSKA

NOVA ZELANDIJA

POLJSKA

ROMUNIJA

ŠVICA

SLOVAŠKA

PRILOGA B

DEL 1

VETERINARSKO SPRIČEVALO
za uvoz govejega semena iz Združenih držav Amerike

1. Pošiljatelj (ime in polni naslov)	Številka spričevala	
	2. Tretja država zbiranja	
3. Prejemnik (ime in polni naslov)	4. Pristojni organ	
	5. Pristojna lokalna oblast	
6. Kraj nakladanja	7. Ime in naslov osemenjevalnega središča	
8. Prevozno sredstvo	10. Številka odobritve osemenjevalnega središča	
9. Namembni kraj in država članica		
11. Številka pečata na posodah s semenom		
12. Identifikacija semena		sveže ali zamrznjeno *
(* neustrezno prečrtajte)		
(a) Število	(b) Datum(-i) zbiranja	(c) Pasma
(d) Identifikacija bika donorja		

13. Spodaj podpisani uradni veterinar sem prebral Direktivo Sveta 88/407/EGS, kakor je bila spremenjena, sem z njo seznanjen in potrjujem:

(a)
(ime države izvoznice)

je bila 12 mesecev neposredno pred zbiranjem semena za izvoz in do datuma njegove odpreme prosta goveje kuge ter slinavke in parkljevke, v istem obdobju tudi ni bilo opravljeno nobeno cepljenje proti tema boleznima;

(b) o semenjevalno središče, kjer je bilo zbrano seme za izvoz, je bilo:

(i) odobreno v skladu s pogoji, določenimi v poglavju I Priloge A k Direktivi Sveta 88/407/EGS;

(ii) upravljano in nadzorovano v skladu s pogoji, določenimi v poglavju II Priloge A k Direktivi Sveta 88/407/EGS;

(iii) prosto stekline, tuberkuloze, bruceloze, vraničnega prisada in pljučne kuge govedi v obdobju od 30 dni pred datumom zbiranja semena za izvoz do 30 dni po zbiranju (v primeru svežega semena do dneva odpreme);

(c) goveda v osemenjevalnem središču:

(i) izvirajo iz čred in/ali so jih skotile bikovske matere, ki izpolnjujejo pogoje iz poglavja I Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(ii) so bila pred začetkom izolacije testirana, kakor določa poglavje I Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(iii) so izpolnila zahteve glede izolacije in testiranj pred vstopom, določene v poglavju I Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(iv) če so v središču že vsaj eno leto, so bile opravljene rutinske preiskave v skladu s poglavjem II Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(d) seme za izvoz:

(i) je bilo pridobljeno od donorjev, ki so se nahajali v:

.....
(ime države)

v obdobju šestih mesecev neposredno pred zbiranjem semena za izvoz in izpolnjujejo pogoje, določene v Prilogi C k Direktivi 88/407/EGS;

(ii) je bilo pridobljeno od donorjev:

— ki so v osemenjevalnem središču, v katerem je bil pri vseh govedih v 12 mesecih pred zbiranjem semena za izvoz z negativnim rezultatom opravljen test serumske nevtralizacije ali test ELISA za infektivni rinitis/infektivni pustularni vulvovaginitis⁽¹⁾,

ali

— pri katerih je bil test serumske nevtralizacije ali test ELISA za infektivni rinitis/infektivni pustularni vulvovaginitis, opravljen v 12 mesecih pred zbiranjem semena za izvoz, negativen⁽¹⁾,

ali

— ki so seropozitivni po cepljenju, opravljenem v skladu s poglavjem II Priloge B k Direktivi Sveta 88/407/EGS, in pri katerih je bil rezultat testa serumske nevtralizacije ali testa ELISA, opravljenega v odobrenem osemenjevalnem središču pred cepljenjem, negativen⁽¹⁾,

⁽¹⁾ Neustrezno prečrtajte.

DEL 2

Seznam držav, ki smejo uporabljati vzorec veterinarskega spričevala iz dela 1 Priloge B

ZDRUŽENE DRŽAVE AMERIKE

PRILOGA C

DEL 1

VETERINARSKO SPRIČEVALO
za uvoz govejega semena

1. Pošiljatelj (ime in polni naslov)	Številka spričevala	
	2. Tretja država zbiranja	
3. Prejemnik (ime in polni naslov)	4. Pristojni organ	
	5. Pristojna lokalna oblast	
6. Kraj nakladanja	7. Ime in naslov osemenjevalnega središča	
8. Prevozno sredstvo	10. Številka odobritve osemenjevalnega središča	
9. Namembni kraj in država članica		
11. Številka pečata na posodah s semenom		
12. Identifikacija semena		sveže ali zamrznjeno *
(* neustrezno prečrtajte)		
(a) Število doz	(b) Datum(-i) zbiranja	(c) Pasma
(d) Identifikacija bika donorja		

13. Spodaj podpisani uradni veterinar sem prebral Direktivo Sveta 88/407/EGS, kakor je bila spremenjena, sem z njo seznanjen in potrjujem:

(a)
(ime države izvoznice)

je bila 12 mesecev neposredno pred zbiranjem semena za izvoz in do datuma njegove odpreme prosta goveje kuge ter slinavke in parkljevke, v istem obdobju tudi ni bilo opravljeno nobeno cepljenje proti tema boleznima;

(b) o semenjevalno središče, kjer je bilo zbrano seme za izvoz, je bilo:

(i) odobreno v skladu s pogoji, določenimi v poglavju I Priloge A k Direktivi Sveta 88/407/EGS;

(ii) upravljano in nadzorovano v skladu s pogoji, določenimi v poglavju II Priloge A k Direktivi Sveta 88/407/EGS;

(iii) prosto stekline, tuberkuloze, bruceloze, vraničnega prisada in pljučne kuge govedi v obdobju od 30 dni pred datumom zbiranja semena za izvoz do 30 dni po zbiranju (v primeru svežega semena do dneva odpreme);

(c) goveda v o semenjevalnem središču:

(i) izvirajo iz čred in/ali so jih skotile bikovske matere e, ki izpolnjujejo pogoje iz poglavja I Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(ii) so bila pred začetkom izolacije testirana, kakor določa poglavje I Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(iii) so izpolnila zahteve glede izolacije in testiranj pred vstopom, določene v poglavju I Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(iv) če so v središču že vsaj eno leto, so bile opravljene rutinske preiskave v skladu s poglavjem II Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(d) seme za izvoz:

(i) je bilo pridobljeno od donorjev, ki so se nahajali v:

.....
(ime države izvoznice)

v obdobju šestih mesecev neposredno pred zbiranjem semena za izvoz in izpolnjujejo pogoje, določene v Prilogi C k Direktivi 88/407/EGS;

(ii) je bilo pridobljeno od donorjev:

— ki so v o semenjevalnem središču, v katerem je bil pri vseh govedih v 12 mesecih pred zbiranjem semena za izvoz z negativnim rezultatom opravljen test serumske nevtralizacije ali test ELISA za infektivni bovinji rinotraheitis/infektivni pustularni vulvovaginitis ⁽¹⁾,

ali

— pri katerih je bil test serumske nevtralizacije ali test ELISA za infektivni bovinji rinotraheitis/infektivni pustularni vulvovaginitis, opravljen v 12 mesecih pred zbiranjem semena za izvoz, negativen ⁽¹⁾,

ali

— ki so seropozitivni po cepljenju, opravljenem v skladu s poglavjem II Priloge B k Direktivi Sveta 88/407/EGS, in pri katerih je bil rezultat testa serumske nevtralizacije ali testa ELISA, opravljenega v odobrenem o semenjevalnem središču pred cepljenjem, negativen ⁽¹⁾,

⁽¹⁾ Neustrezno prečrtajte.

DEL 2

Seznam držav, ki smejo uporabljati vzorec veterinarskega spričevala iz dela 1 Priloge C

KANADA: razen regije Okanagan Valley v Britanski Kolumbiji, ki je opredeljena kot območje, omejeno s črto, ki poteka od točke na meji med Kanado in Združenimi državami na $120^{\circ} 15'$ zemljepisne dolžine in 49° zemljepisne širine proti severu do točke na $119^{\circ} 35'$ zemljepisne dolžine in $50^{\circ} 30'$ zemljepisne širine, nato proti severovzhodu do točke na 119° zemljepisne dolžine in $50^{\circ} 45'$ zemljepisne širine ter proti jugu do točke na meji med Kanado in Združenimi državami na $118^{\circ} 15'$ zemljepisne dolžine in 49° zemljepisne širine.

PRILOGA D

DEL 1

VETERINARSKO SPRIČEVALO
za uvoz govejega semena

1. Pošiljatelj (ime in polni naslov)	Številka spričevala	
	2. Tretja država zbiranja	
3. Prejemnik (ime in polni naslov)	4. Pristojni organ	
	5. Pristojna lokalna oblast	
6. Kraj nakladanja	7. Ime in naslov osemenjevalnega središča	
8. Prevozno sredstvo	10. Številka odobritve osemenjevalnega središča	
9. Namembni kraj in država članica		
11. Številka pečata na posodah s semenom		
12. Identifikacija semena		sveže ali zamrznjeno *
(* neustrezno prečrtajte)		
(a) Število doz	(b) Datum(-i) zbiranja	(c) Pasma
(d) Identifikacija bika donorja		

13. Spodaj podpisani uradni veterinar sem prebral Direktivo Sveta 88/407/EGS, kakor je bila spremenjena, sem z njo seznanjen in potrjujem:

(a)
(ime države izvoznice)

je bila 12 mesecev neposredno pred zbiranjem semena za izvoz in do datuma njegove odpreme prosta goveje kuge ter slinavke in parkljevke, v istem obdobju tudi ni bilo opravljeno nobeno cepljenje proti tema boleznima;

(b) o semenjevalno središče, kjer je bilo zbrano seme za izvoz, je bilo:

(i) odobreno v skladu s pogoji, določenimi v poglavju I Priloge A k Direktivi Sveta 88/407/EGS;

(ii) upravljano in nadzorovano v skladu s pogoji, določenimi v poglavju II Priloge A k Direktivi Sveta 88/407/EGS;

(iii) prosto stekline, tuberkuloze, bruceloze, vraničnega prisada in pljučne kuge govedu v obdobju od 30 dni pred datumom zbiranja semena za izvoz do 30 dni po zbiranju (v primeru svežega semena do dneva odpreme);

(c) goveda v osemenjevalnem središču:

(i) izvirajo iz čred in/ali so jih skotile bikovske matere, ki izpolnjujejo pogoje iz poglavja I Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(ii) so bila pred začetkom izolacije testirana, kakor določa poglavje I Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(iii) so izpolnila zahteve glede izolacije in testiranj pred vstopom, določene v poglavju I Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(iv) če so v središču že vsaj eno leto, so bile opravljene rutinske preiskave v skladu s poglavjem II Priloge B k Direktivi 88/407/EGS;

(d) seme za izvoz:

(i) je bilo pridobljeno od donorjev, ki so se nahajali v:

.....
(ime države izvoznice)

v obdobju šestih mesecev neposredno pred zbiranjem semena za izvoz in izpolnjujejo pogoje, določene v Prilogi C k Direktivi 88/407/EGS;

(ii) je bilo pridobljeno od donorjev:

— ki so v osemenjevalnem središču, v katerem je bil pri vseh govedih v 12 mesecih pred zbiranjem semena za izvoz z negativnim rezultatom opravljen test serumske nevtralizacije ali test ELISA za infektivni rinosinuzitis/infektivni pustularni vulvovaginitis ⁽¹⁾,

ali

— pri katerih je bil test serumske nevtralizacije ali test ELISA za infektivni rinosinuzitis/infektivni pustularni vulvovaginitis, opravljen v 12 mesecih pred zbiranjem semena za izvoz, negativen ⁽¹⁾,

ali

— ki so seropozitivni po cepljenju, opravljenem v skladu s poglavjem II Priloge B k Direktivi Sveta 88/407/EGS, in pri katerih je bil rezultat testa serumske nevtralizacije ali testa ELISA, opravljenega v odobrenem osemenjevalnem središču pred cepljenjem, negativen ⁽¹⁾,

⁽¹⁾ Neustrezno prečrtajte.

ali

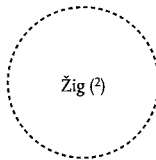
- ki so seropozitivni pri testu serumske nevtralizacije ali testu ELISA za infekcijski bovinji rinotraheitis/infekcijski pustularni vulvovaginitis, niso bili cepljeni v skladu s poglavjem II Priloge B k Direktivi Sveta 88/407/EGS in pri katerih je bil na vsaj 10 % vsakega ejakulata semena za izvoz (vendar najmanj pet slamic) pred izvozom opravljen test inokulacije živali ali test izolacije virusa z negativnim rezultatom ⁽¹⁾;

(iii) je bilo obdelano, skladiščeno in prepeljano pod pogoji, ki so v skladu z Direktivo 88/407/EGS;

(iv) je bilo pridobljeno od bikov donorjev, pri katerih so bili v odobrenem laboratoriju dvakrat v razmiku največ 12 mesecev z negativnimi rezultati opravljeni naslednji testi pred in po zbiranju (test po zbiranju je treba opraviti na vzorcu krvi, odvzetem najmanj 21 dni po zbiranju semena za izvoz):

- kompetitivna ELISA za bolezen modrikastega jezika v skladu s Prilogo E,
- imunodifuzija v agarškem gelu v skladu s Prilogo E in test nevtralizacije virusa za vse serotipe epizootske hemoragične bolezni (EHD), katerih obstoj je znan v državi izvoznici,
- test serumske nevtralizacije za virus Akabane.

V, dne
(kraj) (datum)



Podpis ⁽²⁾

Ime z velikimi tiskanimi črkami:

Uradni naziv:

⁽¹⁾ Neustrezno prečrtajte.

⁽²⁾ Podpis in žig morata biti drugačne barve kot tisk.

DEL 2

Seznam tretjih držav, ki smejo uporabljati vzorec veterinarskega spričevala iz dela 1 Priloge D

AVSTRALIJA

PRILOGA E

Protokol za kompetitivni encimsko-immunski preskus (ELISA), test, pri katerem se za odkrivanje protiteles proti virusu bolezn modrikastega jezika uporabijo za skupino specifična monoklonska protitelesa**KOMPETITIVNA ELISA ZA BOLEZEN MODRIKASTEGA JEZIKA Z UPORABO MONOKLONSKIH PROTITELES 3-17-A3**

Test lahko zazna protitelesa proti vsem znanim serotipom virusa bolezn modirkastega jezika (BTV).

Princip testa je prekinitev reakcije med antigenom BTV in specifičnim monoklonskim protitelesom za to skupino (3-17-A3) z dodajanjem razredčin preskusnega seruma. Protitelesa proti BTV, prisotna v preskusnem serumu, blokirajo reaktivnost monoklonskih protiteles (Mab), kar povzroči manjše obarvanje od pričakovanega ob dodatku encimskega substrata.

PRIBOR IN REAGENTI

1. Mikrotitrnske ploščice z ravnim dnom.
2. Antigen: pripravljen, kakor je opisano spodaj.
3. Blokirni pufer: 5-odstotna (m/V) raztopina mleka v prahu „Marvel“, 0,1-odstotna (V/V) raztopina Tween-20 (v obliki sirupa polioksietilen sorbiton monolavrata) v fosfatnem pufru s soljo (PBS).
4. Monoklonska protitelesa: 3-17-A3 (kot supernatant kulture hibridoma), usmerjen na za skupino specifični polipeptid p7, shranimo pri -20 °C ali liofiliziramo ter pred uporabo razredčimo z blokirnim pufrom v razmerju 1:50.
5. Konjugat: kunčji antiimišji globulin (absorbiran in eluiran) konjugiran s hrenovo peroksidazo in shranjen v temi pri 4 °C.
6. Substrat in kromogen: 0,2 g ortofenilen diamina (OPD) raztopimo v pufru iz 2,553 g citronske kisline in 4,574 g dinatrijevega hidrogenortofosfata in dopolnimo do 500 ml z destilirano vodo, raztopino razdelimo na alikvote po 25 ml in shranimo v temi pri -20 °C; tik pred uporabo dodamo 12 µl vodikovega peroksida (30 % m/V) na 25 ml.

Z OPD RAVNAJTE PREVIDNO – NOSITE GUMIJASTE ROKAVICE – DOMNEVNI MUTAGEN.

7. 1-molarna žveplova kislina: 26,6 ml kisline dodamo v 473,4 ml destilirane vode.

NE POZABITE – VEDNO DODAJAMO KISLINO K VODI, NIKOLI VODO H KISLINI.

8. Krožni stresalnik.
9. Čitalnik ploščic ELISA (test lahko odčitamo vizualno).

PROTOKOL TESTA

Slepa kontrola

Vrstica 1 A – H je slepa kontrola iz antigena BTV in konjugata. Lahko se uporabi za umerjanje čitalnika ELISA.

Kontrola Mab

Vrstica 2 A – H je kontrola monoklonskega protitelesa in jo sestavljajo antigen BTV, monoklonska protitelesa in konjugat. Predstavlja negativno kontrolo. To pomeni, da odčitki optične gostote iz te kontrolne vrstice predstavljajo vrednost inhibicije 0 %.

Pozitivna kontrola

Vrstica 3 A – H je pozitivna kontrola. Sestavljajo jo antigen BTV, razredčine BTV pozitivnega seruma, Mab in konjugat. Vključena je v test kot kazalnik pravilnega delovanja testa in od testa do testa bi se morale pojaviti podobne ravni inhibicije.

Preskusni serumi

Po zgoraj prikazani shemi testa, se lahko testira 18 serumov, razredčenih v razmerjih 1:2, 1:4, 1:8 in 1:16. To bo pokazalo približni titer protiteles v preskusnih serumih. Razpon razredčitev se lahko poveča, da se dobijo končne točke razredčin seruma. Pri obsežnih seroloških raziskavah pa se serumi lahko testirajo le pri eni razredčitvi (1:4) ali dveh razredčitvah (1:2 in 1:4) za hitri presejalni test.

POSTOPEK

1. Antigen BTV razredčimo s PBS do predhodno titrirane koncentracije, na kratko soniciramo, da razbijemo skupke virusa (če nimamo na voljo ultrazvočne naprave, dobro premešamo s pipetiranjem), in damo po 50 µl v vsako vdolbinico ploščice ELISA. Na rahlo potrskamo po stranici ploščice, da se antigen dispergira.
2. Inkubiramo 60 minut pri 37 °C na krožnem stresalniku. Ploščice trikrat speremo, tako da vdolbinice zalijemo z nesterilnim PBS in jih spet izpraznimo, nato jih popivnemo do suhega z vpojnim papirjem.
3. V vsako vdolbinico dodamo po 50 µl blokirnega pufla. V ustrezne vdolbinice dodamo preskusne serume in pozitivni serum ter razredčimo vzorce po celi ploščici z večkanalno pipeto. Slepemu kontrolnemu vzorcu in kontrolnemu vzorcu Mab ne dodamo serumov.
4. Takoj po dodatku preskusnih serumov, Mab razredčimo z blokirnim puflom (do predhodno titrirane razredčitve) in dodamo po 50 µl raztopine v vsako vdolbinico razen v vdolbinice slepe kontrole.
5. Inkubiramo 60 minut pri 37 °C na krožnem stresalniku. Trikrat speremo s PBS in popivnemo do suhega.
6. Kunčji antiimiški koncentrat razredčimo z blokirnim puflom v razmerju 1:5 000 in dodamo po 50 µl v vsako vdolbinico ploščice.
7. Inkubiramo 60 minut pri 37 °C na krožnem stresalniku. Trikrat speremo s PBS in popivnemo do suhega.
8. Odtajamo OPD in tik pred uporabo vsakemu alikvotu 25 ml OPD dodamo po 12 µl 30-odstotnega vodikovega peroksida. V vsako vdolbinico ploščice dodamo po 50 µl. Počakamo približno 10 minut, da se razvije barva, nato reakcijo ustavimo z 1-molarno žveplovo kislino (50 µl na vdolbinico). Obarvati bi se morali vzorci v vdolbinicah kontrole Mab in v tistih, ki vsebujejo serume BREZ protiteles proti BTV.
9. Ploščice pregledamo vizualno ali s spektrofotometričnim čitalnikom in zabeležimo rezultate.

ANALIZA REZULTATOV

Izračunamo srednjo vrednost odčitkov OD kontrolnih vzorcev Mab. Ta vrednost predstavlja vrednost inhibicije 0 %. Odčitke optične gostote pri preskusnih serumih izrazimo kot odstotek inhibicije po naslednji enačbi:

$$\text{Odstotek inhibicije} = 100 - \frac{\text{OD v prisotnosti preskusnega seruma}}{\text{OD v odsotnosti preskusnega seruma}} \times 100.$$

Vrednosti inhibicije nad 40 % pri razredčitvi seruma 1:4 se štejejo za pozitivne. Možno je vizualno odčitavanje, saj je 40-odstotna inhibicija najnižja vrednost, ki jo brez težav zaznamo s prostim očesom.

PRIPRAVA ANTIGENA BTV ELISA

1. Deset „roux“ konfluentnih celic BHK-21 trikrat speremo z gojiščem po Eaglu brez seruma in inficiramo z virusom bolezni modrikastega jezika serotipa 1 v gojišču po Eaglu brez seruma.
2. Inkubiramo pri 37 °C in vsak dan pregledamo, ali se je pojavil citopatski učinek (CPE).
3. Ko je CPE očiten pri 80–90 % celične plasti vsake „roux“, požanjemo virus s stresanjem še pritrjenih celic s stekla.
4. Centrifugiramo pri 2 000–3 000 vrt/min, da peletiramo celice.
5. Zavržemo supernatant in celice resuspendiramo v približno 30 ml PHS, ki vsebuje 1 % „Sarkosyla“ in 2 ml fenolmetilsulfonil fluorida (lizirni puffer). To lahko povzroči tvorbo gela celic in dodamo lahko še nekaj lizirnega pufra, da ta učinek zmanjšamo.
OPOMBA: fenilmetilsulfonil fluorid je zdravju škodljiv – z njim ravnajte zelo previdno.
6. Celice 60 sekund ločujemo z ultrazvočno sondo pri amplitudi 30 mikronov.
7. Centrifugiramo 10 minut pri 10 000 vrt/min.
8. Supernatant shranimo pri +4 °C, preostalo pelet celic pa resuspendiramo v 10–20 ml lizirnega pufra.
9. Vse skupaj trikrat soniciramo in zbistrimo ter vsakokrat shranimo supernatant.
10. Združimo supernatante in jih 120 minut centrifugiramo pri 24 000 vrt/min in +4 °C nad 5 ml podlage iz 40-odstotne saharoze (m/V v PBS) v 30-mililitrskih Beckmannovih centrifugirkah z uporabo rotorja SW 28.
11. Zavržemo supernatant, temeljito odcedimo centrifugirke in pelet s sonikacijo resuspendiramo v PBS. Alikvote antigena shranimo pri -70 °C.

TITRACIJA ANTIGENA BTV ELISA

Antigen bolezni modrikastega jezika ELISA titriramo s posredno ELISO. Dvakratne razredčine antigena titriramo s konstantno razredčino (1:50) monoklonskih protiteles 3-17-A3. Protokol je naslednji:

POSTOPEK

1. Antigen BTV razredčimo s PBS po celi mikrotitrski ploščici v seriji dvakratnih razredčitev (50 µl/vdolbinico) z uporabo večkanalne pipete.
2. Inkubiramo 1 uro pri 37 °C na krožnem stresalniku.
3. Ploščice trikrat speremo s PBS.
4. V vsako vdolbinico mikrotitrške ploščice dodamo po 50 µl monoklonskih protiteles 3-17-A3 (razredčenih v razmerju 1:50).
5. Inkubiramo 1 uro pri 37 °C na krožnem stresalniku.
6. Ploščice trikrat speremo s PBS.
7. V vsako vdolbinico mikrotitrške ploščice dodamo 50 µl kunčjega antiimišjega globulina konjugiranega s hrenovo peroksidazo in razredčenega do predhodno titrirane optimalne koncentracije.
8. Inkubiramo 1 uro pri 37 °C na krožnem stresalniku.
9. Dodamo substrat in kromogen, kakor je bilo prej opisano. Po 10 minutah ustavimo reakcijo z dodatkom 1-molarne žveplove kisline (50 µl/vdolbinico).

Pri kompetitivni analizi morajo biti monoklonska protitelesa v prebitku, zato izberemo razredčitev antigena, ki leži znotraj titracijske krivulje (ne v območju platoja) in pri kateri je po 10 minutah OD približno 0,8.

Protokol za imunodifuzijo v agarskem gelu za odkrivanje protiteles proti epizootski hemoragični bolezni

Imunodifuzija v agarskem gelu se izvede po naslednjem protokolu:

PRIBOR IN REAGENTI

1. Antigen

Precipitinogeni antigen pripravimo v katerem koli sistemu celične kulture, ki omogoča hitro množenje ustreznega serotipa virusa epizootske hemoragične bolezni. Priporoča se uporaba celic BKH ali vero. Ob koncu rasti virusa je antigen sicer prisoten v supernatantu, vendar ga je treba skoncentrirati 50- do 100-krat, da je učinkovit. To lahko dosežemo s standardnim postopkom koncentriranja beljakovin; virus in antigen lahko inaktiviramo z dodatkom 0,3-odstotnega (V/V) beta-propiolaktona.

2. Znani pozitivni kontrolni serum

Z uporabo mednarodnega referenčnega seruma in antigena pripravimo nacionalni standardni serum, ga standardiziramo za optimalno razmerje proti mednarodnemu referenčnemu serumu, liofiliziramo in v vsakem testu uporabimo kot znani kontrolni serum.

3. Preskusni serum

POSTOPEK

1. V petrijevko vlijemo 1-odstotno agarozo, pripravljeno v boratnem ali natrijevem barbitalnem puftru pH 8,5 do 9,0, v debelini najmanj 3,0 mm.
2. V agar zarežemo vzorec sedmih luknjic brez vlage s premerom 5,0 mm. Vzorec sestavljajo ena središčna luknjica in šest luknjic, razporejenih okrog nje v krogu s polmerom 3 mm.

	1	
6		2
	X	
5		3
	4	

3. Središčno luknjico napolnimo s standardnim antigenom. Luknjice 2, 4 in 6 napolnimo z znanim pozitivnim serumom, luknjice 1, 3 in 5 pa s preskusnimi serumi.
4. Petrijevko inkubiramo do 72 ur pri sobni temperaturi v zaprti vlažni komori.

RAZLAGA REZULTATOV

Preskusni serum je pozitiven, če oblikuje specifično precipitacijsko črto z antigenom, ki je popolnoma enaka vodilni črti kontrolnega seruma. Preskusni serum je negativen, če ne oblikuje specifične črte z antigenom in ne ukrivi črte kontrolnega seruma. Petrijevke pregledujemo na temnem ozadju ob neposredni osvetlitvi.