

II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

COMISIÓN

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 29 de julio de 1991

relativa a las condiciones sanitarias y a la certificación veterinaria aplicable a la importación de Estados Unidos de América de esperma de animales de la especie bovina

(91/479/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 88/407/CEE del Consejo, de 14 de junio de 1988, por la que se fijan las exigencias de policía sanitaria aplicables a los intercambios intercomunitarios y a las importaciones de esperma congelado de animales de la especie bovina ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye la Directiva 90/425/CEE ⁽²⁾, y, en particular, sus artículos 10 y 11,

Considerando que Estados Unidos de América figuran en la lista de terceros países de los que los Estados miembros autorizan la importación de esperma de animales de la especie bovina, establecida por la Decisión 90/14/CEE de la Comisión ⁽³⁾;

Considerando que la situación zoonosanitaria de Estados Unidos de América parece ser adecuada y estar bajo el control de servicios veterinarios organizados y bien estructurados en el campo de las enfermedades transmisibles por el esperma congelado;

Considerando que las autoridades veterinarias competentes de Estados Unidos de América han confirmado que en este país no se han observado, al menos durante los últimos doce meses, casos de peste bovina, fiebre aftosa y pleuro-

neumonía bovina contagiosa, y que no se han llevado a cabo campañas de vacunación contra estas enfermedades durante el período mencionado;

Considerando que las autoridades veterinarias competentes de Estados Unidos de América se han comprometido a confirmar a la Comisión de las Comunidades Europeas y a los Estados miembros, por télex o telecopia y en el plazo de 24 horas, la aparición de cualesquiera de las enfermedades arriba mencionadas, de fiebre aftosa o de hemorragia epizootica bovina, así como cualquier modificación que se produzca en la política de vacunaciones en relación con alguna de ellas o, en un plazo de tiempo adecuado, toda propuesta de modificación de las normas de importación de Estados Unidos con relación a los animales domésticos o al semen y los embriones de éstos;

Considerando que las autoridades veterinarias competentes de Estados Unidos de América han ofrecido, en lo que se refiere a la tuberculosis y a la brucelosis bovinas, garantías zoonosanitarias equivalentes a las que son aplicables en la Comunidad;

Considerando que las autoridades veterinarias competentes de Estados Unidos de América se han comprometido a supervisar oficialmente la expedición de certificados en aplicación de la presente Decisión y a garantizar que todos los certificados, excepciones y resultados de las investigaciones en los que se hayan podido basar estos certificados permanecerán archivados oficialmente durante doce meses, como mínimo, después del envío del esperma al que se refieran;

Considerando que las autoridades veterinarias competentes de Estados Unidos de América se han comprometido a autorizar oficialmente los centros de recogida de esperma para la exportación de esperma bovina a la Comunidad Económica Europea, según establece el artículo 9 de la Directiva 88/407/CEE;

⁽¹⁾ DO nº L 194 de 22. 7. 1988, p. 10.

⁽²⁾ DO nº L 224 de 18.8.1990, p. 29.

⁽³⁾ DO nº L 8 de 11.1.1990, p. 71.

Considerando que las autoridades veterinarias competentes de Estados Unidos de América se han comprometido a fijar y a comunicar sin demora a la Comisión de la Comunidad Europea la fecha en que, en cada centro de recogida de esperma autorizado, haya cesado toda actividad de las especies culicoides que puedan transmitir la fiebre catarral ovina o la enfermedad epizootica hemorrágica, y la fecha en que se haya reanudado la actividad de dichas especies culicoides;

Considerando que las condiciones y la certificación veterinaria deben adaptarse a la situación zoonosanitaria de los terceros países correspondientes;

Considerando que las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité veterinario permanente.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

1. Hasta el 31 de diciembre de 1992, los Estados miembros podrán autorizar la importación de Estados Unidos de América de esperma de animales de la especie bovina

recogido de machos que hayan dado un resultado distinto del negativo en la prueba de detección de la fiebre catarral ovina o en la prueba de detección de la enfermedad epizootica hemorrágica prescritas en el Anexo I A, pero deberán hacerlo de conformidad con las disposiciones de los Anexos II A y II B y deberán asegurar que tal esperma no es objeto de intercambios intracomunitarios. La Comisión revisará las disposiciones del presente apartado antes de la fecha anteriormente mencionada.

2. Los Estados miembros autorizarán la importación de Estados Unidos de América de esperma de animales de la especie bovina que se ajuste a las condiciones establecidas en el certificado que figura en el Anexo I A y, en su caso, en el certificado que figura en el Anexo I B.

Artículo 2

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 29 de julio de 1991.

Por la Comisión

Ray MAC SHARRY

Miembro de la Comisión

ANEXO I A

CERTIFICADO ZOOSANITARIO

para la importación de Estados Unidos de América de esperma de animales de la especie bovina

Certificado nº:

País de recolección: Estados Unidos de América

Autoridad competente: Ministerio de Agricultura de Estados Unidos — APHIS

I. Identificación del esperma:

Código de identidad de la unidad:

Autorización de la unidad nº:

Nombre del donante	Raza	Código de identidad	Fecha de nacimiento	Fecha de la recolección	Número de dosis

(Táchense las casillas que no se utilicen. El presente certificado se refiere únicamente al esperma recogido en una unidad de recolección autorizada.)

Sello que figura en el contenedor del transporte:

II. Procedencia del esperma:

Dirección de la unidad de recolección del esperma:

.....

III. Destino del esperma:

El esperma se enviará de:
(lugar del sellado y del embarque)

a:
(país y lugar de destino)

por:
(medio de transporte e identificación)

Nombre y dirección del expedidor:

Nombre y dirección del consignatario:

IV. Datos sanitarios:

El veterinario federal abajo firmante certifica que:

1. Estados Unidos de América ha estado indemne de la peste bovina desde doce meses, como mínimo, antes de la primera recolección del esperma arriba mencionado hasta treinta días después de la última recolección de dicho esperma.
2. La unidad de recolección de esperma autorizada en la que se recogió el esperma arriba mencionado:
 - a) ha sido autorizada por las autoridades zoonosanitarias federales de Estados Unidos de América para la exportación de esperma de animales de la especie bovina a la Comunidad Europea, dado que se ajusta a todas las disposiciones del presente apartado;
 - b) se halla en el centro de un círculo de 50 km de radio en el que no se ha observado ningún caso de fiebre aftosa, pleuroneumonía bovina contagiosa o estomatitis vesicular desde tres meses antes de la primera recolección del esperma arriba mencionado hasta treinta días después de la última recolección de dicho esperma;
 - c) ha estado indemne de la fiebre aftosa y de la brucelosis desde los tres meses anteriores a la primera recolección del esperma arriba mencionado hasta treinta días después de la última recolección de dicho esperma;
 - d) ha estado indemne de la rabia, el ántrax, la tuberculosis, la leucosis bovina enzoótica y de cualquier síntoma de infección por *Trichomonas foetus*, *Campylobacter foetus*, *Leptospira canicola*, *Leptospira pomona*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo* o *Leptospira icterohaemorrhagica* desde como mínimo treinta días antes de la primera recolección del esperma arriba mencionado hasta treinta días después de la última recolección de dicho esperma;
 - e) es inspeccionada por un veterinario federal, como mínimo dos veces al año, inspecciones en las que se consideran y comprueban todas las medidas establecidas en el presente certificado;
 - f) se encuentra bajo control permanente por parte de un veterinario de la unidad, que vela por que:
 - i) sólo se admitan animales con la autorización expresa del veterinario de la unidad, registrándose todas las entradas o salidas de los mismos,
 - ii) se mantenga un registro de la raza, fecha de nacimiento, identificación e historial sanitario de cada animal de la especie bovina que se encuentre en la unidad y de todas las pruebas y sus resultados, así como de todos los tratamientos y todas las campañas de vacunación llevadas a cabo en los animales,
 - iii) no se permita el acceso de personas no autorizadas, exigiéndose a los visitantes autorizados que cumplan las condiciones establecidas por el veterinario de la unidad,
 - iv) sólo se contrate a personal técnicamente competente, con una formación adecuada en procedimientos de desinfección y técnicas de higiene relacionadas con el control profiláctico;
 - g) sólo cuenta con animales de la especie bovina, aparte de otros animales domésticos estrictamente necesarios para el funcionamiento normal de la unidad que puedan ser admitidos siempre que no presenten ningún riesgo de infección para los bovinos y cumplan las condiciones establecidas por el veterinario de la unidad;
 - h) está construida de forma que:
 - i) la zona en que se aloje a los animales esté separada físicamente de las salas de almacenamiento y tratamiento del esperma, que a su vez también estarán separadas,
 - ii) cuente con un local de aislamiento para animales enfermos,
 - iii) cuente con una sala de recolección del esperma, que a su vez tenga una sala separada para el lavado y la desinfección o esterilización de los equipos;
 - iv) cuente con una sala de tratamiento del esperma y una sala de almacenamiento del mismo (que no han de hallarse necesariamente en el mismo sitio),
 - v) se impida el contacto con animales del exterior,
 - vi) toda la unidad pueda ser lavada y desinfectada fácilmente,

teniendo en cuenta que, cuando se cumplan los requisitos arriba expuestos, una unidad de recolección de esperma autorizada puede compartir la misma ubicación con una o más unidades.

3. Los machos presentes en la unidad de recolección de esperma autorizada durante el periodo de recolección y almacenamiento del esperma arriba mencionado:
- a) se hallan en la unidad de recolección de esperma autorizada sin interrupción desde el 1 de enero de 1990 y, desde su llegada, han sido sometidos a todas las pruebas mencionadas dando los resultados previstos en la letra d) expuesta a continuación, o
 - b) han sido trasladados de una unidad de recolección de esperma autorizada sin llegar a estar en contacto con animales en peores condiciones sanitarias y, en los casos pertinentes, han sido trasladados en medios de transporte lavados y desinfectados a fondo antes de ser utilizados, o
 - c) han sido admitidos, con el consentimiento del veterinario de la unidad, y sin haber mostrado síntomas clínicos de enfermedad,
 - i) al proceder de rebaños declarados indemnes de tuberculosis por las autoridades zoonitarias federales o que estaban ubicados en zonas indemnes de tuberculosis según las autoridades veterinarias federales y al no haberse encontrado en ningún momento en rebaños de menor categoría;
 - ii) al proceder de rebaños declarados indemnes de brucelosis por las autoridades zoonitarias federales o que estaban ubicados en zonas declaradas indemnes de brucelosis o zonas de la categoría A según las autoridades zoonitarias federales, y al no haberse encontrado en ningún momento en rebaños de menor categoría,
 - iii) — al proceder de rebaños indemnes de leucosis bovina enzoótica durante al menos tres años o,
 - al nacer de vacas sometidas, durante los treinta días anteriores al ingreso de sus crías en el centro de aislamiento, a una prueba serológica para la detección de la leucosis bovina enzoótica realizada de acuerdo con el procedimiento establecido por el Anexo G de la Directiva 64/432/CEE del Consejo, con resultado negativo, o
 - al haber estado sometidos en la última de estas dos circunstancias: en los treinta días anteriores a su ingreso en el centro de aislamiento autorizado o una vez alcanzada la edad de dos años, a una prueba serológica para la detección de la leucosis bovina enzoótica, llevada a cabo de acuerdo con el procedimiento establecido por el Anexo G de la Directiva 64/432/CEE del Consejo, con resultado negativo;
 - iv) al haber estado sometidos, durante los treinta días anteriores a su ingreso en el centro de aislamiento autorizado, a las siguientes pruebas, con resultado negativo en cada caso:
 - prueba de tuberculina del Ministerio de Agricultura de Estados Unidos realizada en el pliegue caudal,
 - prueba serológica estándar en tubo del Ministerio de Agricultura de Estados Unidos para la detección de la brucelosis, con resultado negativo, con menos de 30 UI de aglutinación por mililitro, y prueba de fijación del complemento cuyo resultado haya sido un recuento de brucela inferior a las 20 unidades CEE por mililitro (20 unidades ICFT),
 - prueba serológica para la detección de la leucosis bovina enzoótica realizada de acuerdo con el procedimiento establecido en el Anexo G de la Directiva 64/432/CEE del Consejo,
 - prueba de seroneutralización o prueba ELISA para la detección de anticuerpos del virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustulosa infecciosa;
 - prueba de aislamiento del virus de la diarrea vírica de los bóvidos en muestras de sangre con cultivos celulares sensibles sometidos posteriormente a una prueba con anticuerpo fluorescente o una prueba inmunoperoxidásica, con la condición de que, si al ingresar los animales algún macho tenía menos de 6 meses, la prueba fue retrasada hasta que el animal alcanzó dicha edad,
- y a las siguientes pruebas, con resultado negativo en cada caso, excepto en caso de que el presente certificado se refiera a esperma recogido y enviado antes del 1 de enero de 1993 y de que el Estado miembro importador haya declarado por escrito que se aplica lo dispuesto en el apartado 1 del artículo 1 de la Decisión 91/479/CEE de la Comisión:
- prueba de bloqueo ELISA para la detección de la fiebre catarral ovina mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal específico de grupo realizada de acuerdo con el procedimiento establecido en el Anexo IV A de la Decisión 91/479/CEE de la Comisión,
 - prueba de inmunodifusión en agar para la detección de todos los serotipos de la enfermedad enzoótica hemorrágica conocidos en Estados Unidos de América realizada de acuerdo con el procedimiento establecido en el Anexo IV B de la Decisión 91/479/CEE de la Comisión,

teniendo en cuenta que todas o algunas de las pruebas arriba mencionadas pueden haber sido realizadas en el centro de aislamiento autorizado y que, si el resultado de alguna de las pruebas de las que el presente certificado requiere un resultado negativo no ha sido tal, el período de aislamiento de treinta días de los demás machos en el centro de aislamiento no habrá empezado a contar hasta que el animal afectado haya sido desalojado del centro y, en su caso, el centro haya vuelto a ser declarado indemne de tuberculosis o brucelosis,

- v) al haber pasado, tras la realización de las pruebas previas al aislamiento descritas en el anterior inciso iv), un período de, al menos, treinta días, en un centro de aislamiento situado, en la fecha de su ingreso, en el centro de un círculo de 10 km de radio en el que no se ha observado ningún caso de fiebre aftosa, peste bovina, pleuroneumonía bovina contagiosa o estomatitis vesicular, y ha estado indemne, durante al menos tres meses, de la fiebre aftosa y la brucelosis y, durante al menos treinta días, de la rabia, el ántrax, la tuberculosis y la leucosis bovina enzoótica, y en el que los animales han sido sometidos a las siguientes pruebas con resultado negativo en cada caso:
- prueba serológica estándar en tubo del Ministerio Agricultura de Estados Unidos para la detección de la brucelosis, con resultado negativo, con menos de 30 UI de aglutinación por mililitro, y una prueba de fijación del complemento cuyo resultado haya sido un recuento de brucela inferior a las 20 unidades CEE por mililitro (20 unidades ICFT),
 - prueba con anticuerpo inmunofluorescente o prueba de cultivo para la detección de *Campylobacter foetus* con una muestra de material prepucial, o agua de lavados vaginales artificiales,
 - examen microscópico y prueba de cultivo para la detección de *Trichomonas foetus* con una muestra de material prepucial, o agua de lavados vaginales artificiales,
 - prueba de seroneutralización o prueba ELISA para la detección de anticuerpos del virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustulosa infecciosa,

teniendo en cuenta que, si el resultado de alguna prueba no ha sido negativo, el período de aislamiento de treinta días no habrá empezado a contar hasta que el animal afectado haya sido desalojado del centro, y, en su caso, éste haya vuelto a ser declarado indemne de tuberculosis,

y de que durante dicho período los animales habrán sido tratados contra la leptospirosis mediante una inyección, aplicada dos veces distintas con un margen de catorce días, de estreptomycinina o dihidroestreptomycinina, o una mezcla de ambas sustancias, con una dosis de 25 miligramos per kg de peso vivo;

- d) han sido sometidos, el menos una vez al año, a las pruebas siguientes con resultado negativo en cada caso:
- i) prueba de tuberculina del Ministerio de Agricultura de Estados Unidos realizada en el pliegue caudal,
 - ii) prueba serológica estándar en tubo del Ministerio Agricultura de Estados Unidos para la detección de la brucelosis, con resultado negativo, con menos de 30 UI de aglutinación por mililitro y una prueba de fijación del complemento cuyo resultado sea un recuento de brucela inferior a las 20 unidades CEE por mililitro (20 unidades ICFT),
 - iii) prueba serológica para la detección de la leucosis bovina enzoótica, realizada de acuerdo con el procedimiento establecido en el Anexo G de la Directiva 64/432/CEE,
 - iv) prueba de seroneutralización o prueba ELISA para la detección de la rinotraqueítis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustulosa infecciosa teniendo en cuenta que, cuando las autoridades competentes del Estado miembro importador así lo declaren por escrito, el esperma recogido antes del 31 de diciembre de 1992 que haya dado resultado positivo en alguna de las pruebas podrá ser aceptado si se ha sometido con resultado negativo a una prueba de aislamiento del virus o a una prueba de inoculación en animales para detectar alguna de las enfermedades arriba mencionadas, habiendo sido realizado la prueba el día ..., en el laboratorio de ...;
 - v) prueba con anticuerpo inmunofluorescente o prueba de cultivo para la detección de *Campylobacter foetus* con una muestra de materia prepucial, o agua de lavados vaginales artificiales; sin embargo, no se requiere ninguna de las pruebas previstas en el presente inciso en el caso de animales que no se utilicen para la producción de esperma siempre que se realicen tales pruebas antes de reanudar la producción de esperma,
 - vi) prueba serológica para la detección de los serotipos *canicola*, *pomona*, *grippotyphosa*, *hardjo* e *icterohaemorrhagica* de *Leptospira*,

y a las siguientes pruebas, con resultado negativo en cada caso, como mínimo dos veces el año, excepto en caso de que el presente certificado se refiera a esperma recogido y enviado antes del 1 de enero de 1993 y de que las autoridades zoonosanitarias del Estado miembro importador hayan declarado por escrito que se aplica lo dispuesto en el apartado 1 del artículo 1 de la Decisión 91/000/CEE de la Comisión:

- i) prueba de bloqueo ELISA para la detección de la fiebre catarral ovina mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal específico de grupo, realizada de acuerdo con el procedimiento establecido en el Anexo IV A de la Decisión 91/479/CEE de la Comisión,
- ii) prueba de inmunodifusión en agar para la detección de todos los serotipos de la enfermedad enzoótica hemorrágica conocidos en Estados Unidos de América realizada de acuerdo con el procedimiento establecido en el Anexo IV B de la Decisión 91/479/CEE de la Comisión.

Habiéndose realizado todas las pruebas arriba mencionadas (excepto la prueba de tuberculina) en un laboratorio autorizado por las autoridades veterinarias federales de Estados Unidos de América.

4. El esperma arriba mencionado

- ha sido declarado indemne de la fiebre catarral ovina de acuerdo con la definición que aparece en el Anexo II A de la Decisión 91/479/CEE de la Comisión y, en particular, en su apartado 5 (*), o
- se considera como sometido a la prueba de la fiebre catarral ovina de acuerdo con la definición que aparece en el Anexo II B de la Decisión 91/479/CEE de la Comisión y, en particular, en su apartado 2, en los casos en que las autoridades zoonosanitarias del Estado miembro importador hayan declarado por escrito que se aplica lo dispuesto en el apartado 1 del artículo 1 de la Decisión 91/479/CEE de la Comisión (*),

(*) Táchese la que no proceda.

y:

- a) ha sido recogido, sin aplicación de los métodos de electroeyaculación o electroestimulación, de machos que se encontraban en una unidad de recolección de esperma autorizada:
 - i) y que han permanecido ininterrumpidamente en territorio de Estados Unidos de América desde, como mínimo, seis meses antes de la primera recolección del esperma arriba mencionado y hasta la fecha de su envío,
 - ii) que, en los casos no contemplados en la exención escrita que recoge el inciso iv) de la letra d) del punto 3 anteriormente citado o en el apartado 1 del artículo 1 de la Decisión 91/479/CEE de la Comisión, no han dado resultado positivo en ninguna de las pruebas que se presentan en el presente certificado,
 - iii) que, durante su permanencia en la unidad de recolección de esperma autorizada, no han sido empleados para la reproducción,
 - iv) que han permanecido en la unidad de recolección de esperma autorizada durante un período de treinta días seguidos, como mínimo, previamente a la recolección del esperma,
 - v) que no han mostrado ningún síntoma clínico de enfermedad durante dicho período;
- b) ha sido tratado en una unidad de recolección de esperma autorizada:
 - i) en la cual, durante la recolección del esperma arriba mencionada, no se trató ningún esperma, aparte del esperma de los machos que se encontraban en las unidades autorizadas o el de los machos de la misma categoría zoonosanitaria que los machos de las unidades autorizadas, siempre que en este último caso el tratamiento se haya efectuado con equipos distintos y en momentos diferentes del del esperma de las unidades autorizadas y que el centro de tratamiento haya sido lavado y desinfectado a fondo antes de ser empleado de nuevo para tratar el esperma procedente de los machos de las unidades autorizadas,
 - ii) en condiciones de la más estricta higiene, habiendo sido desinfectados o esterilizados adecuadamente, según el caso, antes de su uso todos los instrumentos y equipos que hayan estado en contacto con el macho donante o con el esperma,
 - iii) en la que se han empleado aditivos, diluyentes o extensores en los que todos los productos de origen animal se hayan obtenido de fuentes que no presentan ningún riesgo zoonosanitario o que han recibido antes de su utilización un tratamiento tal que evita dicho riesgo;
- c) ha sido protegido mediante la adición de los antibióticos siguientes, en las cantidades necesarias para producir las concentraciones indicadas en el esperma diluido final:

no menos de:

500 UI por ml de estreptomina,

500 UI por ml de penicilina,

150 µg por ml de lincomicina,

300 µg por ml de espectinomicina,

manteniéndose inmediatamente después a una temperatura igual o superior a 5° C (41° F) durante un período igual o superior a los 45 minutos,

o

no menos de:

- 50 µg por ml de tilosina,
- 250 µg por ml de gentamicina,
- 150 µg por ml de lincomicina,
- 300 µg por ml de espectinomicina,

o manteniéndose en contacto el antibiótico y el esperma sin diluir durante al menos tres minutos a la temperatura a la que fueron mezclados y manteniéndose el esperma y la fracción no glicerólica del diluyente a una temperatura igual o superior a 5° C (41° Fahrenheit) durante al menos dos horas;

- d) ha sido introducido en contenedores individuales (pajuelas) identificados cada uno de ellos con la fecha de recolección, la raza y la identidad del macho donante y la identidad de la unidad de recolección autorizada, teniendo en cuenta que esta información puede presentarse total o parcialmente en código siempre que se presente una traducción del código empleado de la que puedan disponer las autoridades competentes del Estado miembro importador, y teniendo en cuenta que debe existir una clara correspondencia entre la identificación de cada pajuela y la identificación expuesta en el presente certificado;
- e) ha sido almacenado en recipientes lavados y desinfectados o esterilizados a fondo, según el caso, antes de ser utilizados, empleando agentes criogénicos no utilizados previamente con ningún otro producto de origen animal, en la unidad de recolección de esperma autorizada, bajo el control del veterinario oficial durante, como mínimo los treinta días anteriores a su envío;
- f) no ha sido exportado después de la fecha en que haya dado resultado positivo alguna de las pruebas a que hayan sido sometidos los machos de la unidad, distinta de la prueba para la detección de la fiebre catarral ovina, o de la enfermedad epizootica hemorrágica, prevista en el apartado 1 del artículo 1 de la Decisión 91/479/CEE de la Comisión, o de la prueba para la detección de la rinotraqueitis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustulosa infecciosa prevista en la exención escrita recogida en el inciso iv) de la letra d) del punto 3, o antes de que la unidad haya sido declarada de nuevo apta desde el punto de vista sanitario;
- g) ha sido enviado en recipientes lavados y desinfectados o esterilizados a fondo, según el caso, antes de su uso, con agentes criogénicos no utilizados previamente con ningún otro producto de origen animal y precintados bajo el control del veterinario federal antes de ser enviados por la unidad de recolección de esperma autorizada.

Expedido en el
(lugar) (fecha)



Sello oficial

Firma

Nombre y apellidos en mayúsculas

Cargo oficial

ANEXO I B

CERTIFICADO SUPLEMENTARIO

para la transferencia de esperma de un contenedor a otro para su envío de Estados Unidos de América a la Comunidad Económica Europea

El veterinario federal abajo firmante certifica que: El esperma a que se refieren los certificados y sellos indicados a continuación se transfirió, en una unidad de recolección autorizada y bajo su control directo, de los contenedores en que se recibió, con sellos íntegros, al contenedor en que debe ser enviado a la Comunidad Económica Europea.

Centro de procedencia	Certificado nº	Sello nº

La transferencia se realizó en:

.....

Autorización nº

Sello que figura en el contenedor del transporte:

Se adjuntan los certificados relativos a la totalidad del esperma del contenedor.

Expedido en, el

(lugar) (fecha)



Firma

Nombre y apellido mayúsculas

Cargo oficial

ANEXO II A

Procedimiento para declarar «indemne de fiebre catarral ovina» el semen bovino destinado a la exportación de Estados Unidos de América a la Comunidad Económica Europea

1. Todos los animales de la especie bovina que se hallen en la unidad de recolección de esperma autorizada estarán sujetos, antes de su entrada y a intervalos de seis meses posteriormente, a una prueba de bloqueo ELISA para la detección de anticuerpos del virus de la fiebre catarral ovina y a una prueba de inmunodifusión en agar (IDA) para la detección de anticuerpos de todas las cepas de virus de la enfermedad epizootica hemorrágica que se conocen en Estados Unidos de América, de acuerdo con las normas establecidas en el Anexo IV.
2. Los machos que hayan dado resultado negativo la última vez que se hayan realizado las pruebas a que alude el punto 1 serán declarados seronegativos respecto a la fiebre catarral ovina a efectos de la presente Decisión, a menos que la sangre o el esperma del macho dé un resultado positivo en alguna de las pruebas a que alude el presente Anexo o el Anexo III.
3. A efectos de la presente Decisión, se denominará período libre de vectores en una unidad de recolección de esperma autorizada el período iniciado veintiún días después de la fecha, fijada por el Ministerio de Agricultura de Estados Unidos y comunicada inmediatamente a la dirección de la unidad de recolección de esperma autorizada correspondiente y a la Comisión de las Comunidades Europeas, en que haya cesado toda actividad de las especies de culicoides que pueda transmitir la fiebre catarral ovina o la enfermedad epizootica hemorrágica en la región en que se sitúa la unidad, y terminado los veintiún días antes de la fecha, fijada y comunicada del mismo modo, en que se haya reanudado la actividad de dichas especies.
4. A efectos de la presente Decisión, se entenderá por período de recolección de esperma, en la recolección de esperma para su exportación a la Comunidad, el período no superior a las tres semanas durante el cual se recoja dicho esperma. Si el tiempo real durante el cual se recoge este esperma supera tres semanas, este período se dividirá en dos o más períodos de recolección, ninguno de ellos superior a las tres semanas, considerándose cada uno de ellos un período distinto de recolección por lo que respecta a la aplicación de las pruebas y procedimientos relacionados con la fiebre catarral ovina y la enfermedad epizootica hemorrágica.
5. El esperma que se incluya en una de las categorías expuestas a continuación será declarado indemne de fiebre catarral ovina para su exportación a la Comunidad Económica Europea:
 - a) esperma recogido durante el período libre de vectores, de un macho que haya resultado seronegativo en la prueba de la fiebre catarral ovina, cuando una muestra de sangre del mismo macho, recogida veintiún días después de finalizado el período de recolección del esperma, haya sido sometida, con resultado negativo, a una prueba ELISA para la detección de anticuerpos del virus de la fiebre catarral ovina y a una prueba IDA para la detección de anticuerpos de todos los serotipos del virus de la enfermedad epizootica hemorrágica conocidos en Estados Unidos de América de acuerdo con las normas expuestas en el Anexo IV;
 - b) esperma recogido en un período distinto al período libre de vectores de un macho que haya resultado seronegativo en la prueba de la fiebre catarral ovina, cuando una muestra de sangre de este mismo macho, recogida veintiún días después de finalizado el período de recolección del semen, haya sido sometida, con resultado negativo, a una prueba ELISA para la detección de los anticuerpos del virus de la fiebre catarral ovina y a una prueba IDA para la detección de los anticuerpos de todos los serotipos de la enfermedad epizootica hemorrágica conocidos en Estados Unidos de América de acuerdo con las normas definidas en el Anexo IV, y cuando las muestras de sangre recogidas de este macho al mismo tiempo que la recolección del esperma destinado a la exportación hayan sido sometidas, con resultado negativo, al procedimiento de aislamiento del virus definido en el Anexo III.

ANEXO II B

Procedimiento para considerar sometido a la prueba de la fiebre catarral ovina el esperma bovino destinado a la exportación de Estados Unidos de América a la Comunidad Económica Europea

1. Son aplicable las definiciones recogidas en el Anexo II A.
2. Se considerará el esperma que se incluya en una de las dos categorías expuestas a continuación como esperma sometido a la prueba de la fiebre catarral ovina para su exportación a la Comunidad Económica Europea:
 - a) esperma recogido durante el período libre de vectores de un macho que no haya resultado seronegativo en la prueba de la fiebre catarral ovina cuando, al comparar la muestra de sangre recogida al inicio del período libre de vectores con una muestra recogida veintiún días después de finalizado el período de recolección del esperma, no aparezcan signos de seroconversión o de un aumento cuádruple o mayor en el nivel de anticuerpos neutralizantes de suero frente a ninguno de los serotipos del virus de la fiebre catarral ovina o del virus de la enfermedad epizootica hemorrágica conocidos de Estados Unidos de América, y cuando las muestras de sangre recogidas del macho durante el período de recolección del esperma destinado a la exportación a la Comunidad hayan sido sometidas, con resultado negativo, al procedimiento de aislamiento del virus definido en el Anexo III;
 - b) esperma recogido en cualquier época del año de un macho que no haya resultado seronegativo cuando, al comparar una muestra de sangre recogida al inicio del período de recolección del esperma con una muestra recogida veintiún días después de finalizado este mismo período, no aparezcan signos de seroconversión o de un aumento cuádruple o mayor del nivel de anticuerpos neutralizantes de suero frente a ninguno de los serotipos del virus de la fiebre catarral ovina o del virus de la enfermedad epizootica hemorrágica conocidos en Estados Unidos de América, y cuando las muestras de sangre recogidas del macho durante el período de recolección del esperma destinado a la exportación hayan sido sometidas, con resultado negativo, al procedimiento de aislamiento del virus definido en el Anexo III.
3. El esperma sometido a la prueba de la fiebre catarral ovina deberá ser objeto de un certificado distinto al del esperma declarado indemne de fiebre catarral ovina de acuerdo con lo dispuesto en el Anexo II A.

ANEXO III

Procedimiento de aislamiento del virus para la detección en la sangre del virus de la fiebre catarral ovina en relación con la exportación de espermatozoides de Estados Unidos de América a la Comunidad Económica Europea

1. Se extraerá sangre del macho los días en que se recolecte el espermatozoides destinado a la exportación (normalmente dos veces por semana) y se inoculará subcutáneamente o intradérmicamente en una oveja, declarada seronegativa mediante la prueba de bloqueo ELISA antes de la primera inoculación, en las 48 horas siguientes a la recolección.
2. Dos veces a la semana se extraerá sangre de la oveja para aislar el virus durante un período de tres semanas a partir del día de la primera inoculación a que alude el punto 1.
3. La sangre del macho y de la oveja se inocularán durante las 48 horas siguientes a la recolección en, como mínimo, seis huevos de gallina que contengan embriones de once días.
4. Si no muere ningún embrión o si producen muertes durante los dos días siguientes a la inoculación sin lesiones específicas, después de siete días la prueba se considerará negativa.
5. De los embriones que mueran del segundo al séptimo día se pasará material a huevos de gallina que contengan embriones de once días, empleando, como mínimo, seis huevos por cada embrión muerto.
6. Si el paso de material de un embrión muerto provoca un índice de mortalidad entre los embriones igual o superior al 50 %, la prueba se considerará positiva. Tras pasar a cultivo celular, se examinará el serotipo del virus o los virus para confirmar así la presencia del virus de la fiebre catarral ovina.
7. Dos veces a la semana, se extraerá suero del macho y una vez a la semana de la oveja durante un período de tres semanas, y se someterá a la prueba de bloqueo ELISA mencionada en el Anexo IV B, a una prueba de seroneutralización para la detección de anticuerpos del virus de la fiebre catarral ovina, a la prueba IDA mencionada en el Anexo IV y a una prueba de seroneutralización para la detección de anticuerpos del virus de la enfermedad epizoótica hemorrágica.
8. Se volverá a someter a la oveja a una prueba de bloqueo ELISA veintiún días después de la última inoculación de sangre procedente del macho.
9. La seroconversión o el aumento cuádruple o mayor del título de anticuerpos en el macho o en la oveja indicará una infección reciente o en curso y la prueba se considerará positiva.
10. Las pruebas serológicas se realizarán en todas las muestras juntas al final del período de recolección.
11. El espermatozoides no podrá ser exportado hasta que todas las pruebas hayan sido realizadas y hayan arrojado resultado negativo.

ANEXO IV A

Normas para la prueba de inmunoadsorción enzimática de bloqueo competitiva mediante un anticuerpo monoclonal específico de grupo para la detección de los anticuerpos del virus de la fiebre catarral ovina

PRUEBA ELISA COMPETITIVA DE LA FIEBRE CATARRAL OVINA MEDIANTE EL ANTICUERPO MONOCLONAL 3-17-A3

La prueba ELISA competitiva o de bloqueo deberá efectuarse de conformidad con el siguiente procedimiento:

La prueba ELISA competitiva utilizando anticuerpo monoclonal 3-17-A3 permite detectar los anticuerpos de todos los serotipos conocidos del virus de la fiebre catarral (VFC).

La prueba se basa en la interrupción de la reacción entre el antígeno del VFC y un anticuerpo monoclonal específico de grupo (3-17-A3) mediante la adición de diluciones de sueros problema. Los anticuerpos del VFC que se encuentran en el suero problema bloquean la reactividad del anticuerpo monoclonal (AM) y producen una reducción de la formación de color esperada al añadir el sustrato enzimático.

Material y reactivos

1. Placas de microtitulación de fondo plano.
2. Antígeno: prepárese como se indica a continuación.
3. Tampón de bloqueo: 5 % (p/v) de leche en polvo desecada «Marvel», 0,1 % (v/v) de Tween-20 (en forma de jarabe de monolaurato de polioxietilensorbitol) en STF (solución tampón de fosfatos).
4. Anticuerpo monoclonal: 3-17-A3 (en forma de sobrenadante de cultivo tisular de hibridomas conservado a -20 °C o liofilizado, diluido antes del uso al 1/50 con tampón de bloqueo y dirigido contra el polipéptido p₇ específico de grupo).
5. Conjugado: anticuerpo de conejo antiglobulina de ratón (previamente sometido a adsorción y elución) conjugado con peroxidasa de rábano picante y conservado al abrigo de la luz a 4 °C.
6. Sustrato y cromógeno: 0,2 g de orto-fenilendiamina (OFD) disuelta en un tampón de 2,553 g de ácido cítrico y 4,574 g de ortofosfato ácido disódico enrasado hasta 500 ml con agua destilada, que se dividirá en alícuotas de 25 ml y se conservará a -20 °C y al abrigo de la luz; inmediatamente antes del uso se añadirán 12 µl/25 ml de peróxido de hidrógeno (30 % p/v).

Manejar la OFD con cuidado — usar guantes de goma — posible mutágeno.

7. Ácido sulfúrico 1 molar: añadir 26,6 ml de ácido a 473,4 ml de agua destilada.

Atención: Añadir siempre el ácido al agua, nunca el agua al ácido.

8. Agitador orbital.
9. Lector de placas ELISA (el ensayo puede leerse visualmente).

Formato de la prueba

	H	G	F	E	D	C	B	A		
Ensayo en blanco			Antígeno + conjugado							1
Control del AM			Antígeno + AM + conjugado							2
Control positivo	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	3	
		Sueros problema								
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	4	
									5	
									6	
Sueros problema									7	
									8	
									9	
									10	
									11	
									12	

Protocolo de la prueba

Ensayo en blanco

La hilera 1 de A a H corresponde al ensayo en blanco, formado por antígeno del VFC y conjugado. Puede utilizarse para ajustar a cero el lector ELISA.

Control del AM

La hilera 2 de A a H corresponde al control del anticuerpo monoclonal, formado por antígeno del VFC, anticuerpo monoclonal y conjugado. Es un control negativo. La media de las lecturas de densidad óptica de esta hilera de control representa el porcentaje nulo de inhibición.

Control positivo

La hilera 3 de A a H corresponde al control positivo, formado por antígeno del VFC, diluciones de antisuero positivo del VFC, AM y conjugado. Se emplea como indicador del buen funcionamiento del ensayo, de modo que los niveles de inhibición obtenidos deben ser similares a los de los otros ensayos.

Sueros problema

El formato de prueba que figura con anterioridad permite analizar 18 sueros con unos índices de dilución de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16. De este modo puede conocerse de forma aproximada el título del anticuerpo en los sueros problema. La escala de dilución puede ampliarse aún más para obtener los títulos del punto final de la dilución del suero. En investigaciones serológicas a gran escala pueden analizarse los sueros empleando una sola dilución (1/4) o dos diluciones (1/2 y 1/4), lo que permite realizar una detección rápida.

Procedimiento

1. Diluir el antígeno del VFC en STF hasta una concentración titulada previamente, tratar brevemente con ultrasonidos para dispersar el virus agregado (si no se dispone de baño de ultrasonidos, pipetear enérgicamente) y añadir 50 µl a todos los pocillos de la placa ELISA. Golpear los lados de la placa para dispersar el antígeno.
2. Incubar a 37 °C durante 60 minutos en un agitador orbital. Enjuagar las placas tres veces, llenando los pocillos de STF no estéril, y secándolos a continuación con papel secante.
3. Añadir a cada pocillo 50 µl de tampón de bloqueo. Agregar sueros problema y suero positivo a los pocillos adecuados y diluir a lo largo de la placa con una pipeta de varias vías. No deberán añadirse sueros al ensayo en blanco ni al control del AM.
4. Inmediatamente después de la incorporación de los sueros problema, diluir el AM en tampón de bloqueo (hasta una dilución titulada previamente) y añadir 50 µl a todos los pocillos de la placa, excepto los del ensayo en blanco.
5. Incubar a 37 °C durante 60 minutos en un agitador orbital. Enjuagar tres veces con STF y secar con papel secante.
6. Diluir al 1/5000 conjugado de anticuerpo de conejo antiglobulina de ratón en tampón de bloqueo y añadir 50 µl a todos los pocillos de la placa.
7. Incubar a 37 °C durante 60 minutos en un agitador orbital. Enjuagar tres veces con STF y secar con papel secante.
8. Descongelar la OFD e, inmediatamente antes del uso, añadir 12 µl de peróxido de hidrógeno al 30 % a cada alícuota de 25 ml. Añadir 50 µl a todos los pocillos de la placa. Tras 10 minutos aproximadamente de formación de color, interrumpir la reacción con ácido sulfúrico 1 M (50 µl por pocillo). La formación de color deberá producirse en los pocillos de control del AM y en los que contengan sueros *sin* anticuerpos del VFC.
9. Examinar y registrar las placas visualmente o mediante un lector espectrofotométrico.

Análisis de los resultados:

Calcular media de las lecturas de la densidad óptica (DO) de los controles del AM. Este resultado representará una inhibición del 0 %. Las lecturas de la densidad óptica de los sueros problema se expresarán como porcentajes de inhibición, utilizando la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 \frac{\text{DO en presencia del suero problema}}{\text{DO en ausencia del suero problema}} \times 100$$

Se considerarán positivos los porcentajes de inhibición superiores al 40 % en sueros diluidos al 1/4. Es posible efectuar una lectura visual, ya que la inhibición del 40 % es el valor mínimo que se puede apreciar fácilmente sin instrumental.

Preparación del antígeno del virus de la fiebre catarral (VFC) para la prueba ELISA

1. Lavar 10 frascos de Roux de células confluentes BHK-21 tres veces con medio de Eagle exento de suero e inocular virus de la fiebre catarral del serotipo 1 en medio de Eagle exento de suero.
2. Incubar a 37 °C y comprobar diariamente si se produce el efecto citopático (ECP).
3. Cuando dicho ECP se ponga de manifiesto en el 80-90 % de la capa celular de cada frasco de Roux, recoger el virus desprendiendo por agitación las células que hayan quedado adheridas al cristal.
4. Centrifugar a 2 000-3 000 rpm para que sedimenten las células.
5. Desechar el sobrenadante y efectuar una nueva suspensión celular en 30 ml aproximadamente de STF que contenga un 1 % de «Sarkosyl» y 2 ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (tampón de lisis). Es posible que se produzca la gelificación de las células, en cuyo caso prodrá añadirse más tampón de lisis para reducir el efecto.

Atención: el fluoruro de fenilmetilsulfonilo es nocivo — manejar con mucho cuidado.

6. Disgregar las células aplicando una sonda ultrasónica de 30 micrones de amplitud durante 60 segundos.
7. Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 minutos.
8. Almacenar el sobrenadante a +4 °C y efectuar una nueva suspensión del sedimento celular restante en 10-20 ml de tampón de lisis.
9. Someter a ultrasonidos y clarificar tres veces, almacenando el sobrenadante en cada fase.
10. Reunir los sobrenadantes y centrifugar durante 120 minutos a 24 000 rpm y a una temperatura de +4 °C sobre una almohadilla de 5 ml de sacarosa al 40 % (p/v en STF), utilizando tubos de centrifugado Beckmann de 30 ml y un rotor SW 28.
11. Desechar el sobrenadante, escurrir bien los tubos y efectuar una nueva suspensión del sedimento en STF mediante un baño de ultrasonidos. Almacenar el antígeno en partes alicuotas a -70 °C.

Titulación del antígeno ELISA del VFC.

El antígeno de la fiebre catarral para la prueba ELISA se titula mediante el método ELISA indirecto. Se titulan las diluciones a 1/2 del antígeno ante una dilución constante (1/50) del anticuerpo monoclonal 3-17-A3. El procedimiento es el siguiente:

1. Diluir el antígeno del VFC en STF a lo largo de la placa de microtitulación en una serie de diluciones a 1/2 (50 µl por pocillo) empleando una pipeta de varias vías.
2. Incubar durante 1 hora a 37 °C en un agitador orbital.
3. Enjuagar las placas tres veces con STF.
4. Añadir a cada pocillo de la placa de microtitulación 50 µl de anticuerpo monoclonal 3-17-A3 (dilución a 1/50).
5. Incubar durante 1 hora a 37 °C en un agitador orbital.
6. Enjuagar las placas tres veces con STF.
7. Añadir a cada pocillo de la placa de microtitulación 50 µl de anticuerpo de conejo antiglobulina de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante, diluido a una concentración óptima previamente titulada.
8. Incubar durante 1 hora a 37 °C en un agitador orbital.
9. Añadir el sustrato y el cromógeno como se ha descrito anteriormente. Transcurridos 10 minutos, interrumpir la reacción añadiendo ácido sulfúrico 1 M (50 µl/pocillo).

En el método competitivo el anticuerpo monoclonal debe hallarse en exceso, por lo tanto se utilizará una dilución de antígeno comprendida dentro de la curva de titulación (no en la región plana) que dé aproximadamente 0,8 DO después de 10 minutos.

ANEXO IV B

Normas para la prueba de inmunodifusión en agar para la detección de los anticuerpos de la enfermedad epizootica hemorrágica

Antígeno

El antígeno precipitante deberá prepararse en un cultivo celular que favorezca la multiplicación rápida de una cepa de referencia del virus de la fiebre catarral. Se recomienda la utilización de células BHK o Vero. Al finalizar el crecimiento del virus, el antígeno se encontrará en el líquido sobrenadante, pero para ser activo deberá tener una concentración de 50 a 100 veces, lo que se podrá obtener aplicando un procedimiento normalizado de concentración de las proteínas. El virus existente en el antígeno podrá inactivarse con la adición de 0,3 % (v/v) de betapropiolactona.

Suero de control positivo conocido

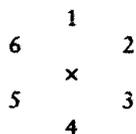
Con el suero y el antígeno de referencia internacionales, preparar un suero patrón nacional, normalizado con relación al suero de referencia internacional para obtener una proporción óptima, liofilizarlo y emplearlo como suero de control positivo conocido en cada prueba.

Suero problema

Procedimiento

Preparar una solución de agarosa al 1 % en un tampón de borato o de barbitol sódico, con un pH de 8,5 a 9,0, y verter en una placa Petri hasta una altura mínima de 3 mm.

Perforar en el agar siete pocillos libres de humedad de 5 mm de diámetro cada uno, dispuestos del siguiente modo: un pocillo central, rodeado de los otros seis pocillos, formando un círculo de 3 mm de radio.



Llenar el pocillo central con el antígeno estándar, los pocillos periféricos 2, 4 y 6 con el suero positivo conocido y los pocillos 1, 3 y 5 con el suero problema.

Incubar durante 72 horas como máximo a temperatura ambiente en una cámara cerrada y húmeda.

Interpretación

El suero problema es positivo si forma una línea de precipitina específica con el antígeno y una línea completa de identidad con el suero de control. El suero problema es negativo si no forma una línea específica con el antígeno y no desvía la línea del suero de control. Las placas Petri deberán examinarse sobre fondo oscuro con iluminación indirecta.