

Reglaments

Decret

La cria d'èquids, i més concretament de cavalls, s'integra en el conjunt de les activitats agràries i constitueix una font important dels ingressos de les explotacions.

La Llei 14/2012 del 12 de juliol, de salut animal i seguretat alimentària estableix la base per garantir l'equilibri necessari entre aquesta activitat econòmica d'una banda i el respecte del benestar animal i la protecció de la salut pública de l'altra.

Aquests principis ja eren establerts en el Reglament d'aplicació de la Decisió 2/1999 del Comitè Mixt Andorra-CE, pel qual es regulen els intercanvis, les importacions i les exportacions d'animals vius i productes d'origen animal destinats al consum humà, del 7 de juny del 2000.

El Reglament actual adapta aquesta normativa d'acord amb les disposicions rellevants de la normativa comunitària, en concret de la Directiva 2009/156/CE del Consell de 30 de novembre del 2009 relativa a les condicions de policia sanitària que regulen els moviments d'èquids i les importacions d'èquids procedents de països tercers.

Aquest Reglament pretén, d'una banda, garantir el desenvolupament racional del sector de producció d'èquids, i de l'altra assegurar al màxim la salut i el benestar animals i la seguretat alimentària.

D'igual manera, regula els moviments dels anomenats èquids registrats, els quals cal proveir necessàriament d'un document d'identificació, d'acord amb el Reglament que estableix els mètodes d'identificació d'èquids.

El compliment de les obligacions previstes pel Reglament en els dos casos queda garantit per la figura del veterinari oficial responsable d'expedir els certificats corresponents. Els certificats expedits en el cas d'èquids intercanviats o exportats són vehiculats mitjançant el sistema d'administració electrònica, anomenat TRACES que permet estrènyer la cooperació amb els països de la Unió Europea i que garanteix la traçabilitat, l'intercanvi d'informació i la gestió de riscos relacionats amb alertes sanitàries, alhora que lluita contra el frau i millora la seguretat de la cadena alimentària.

En concret, el Reglament incideix especialment en les mesures per evitar la propagació de malalties infeccioses com la pesta equina d'acord amb els principis establerts per l'Organització Mundial de la Salut Animal (OIE).

El Reglament s'estructura en setze articles, una disposició derogatòria de la norma adoptada en el seu moment en compliment de la Decisió 2/1999 del Comitè Mixt establert pel Protocol veterinari i qualsevol altra norma del mateix rang que s'hi oposi i quatre annexos.

L'articulat defineix l'objecte del Reglament, els termes específics i els requisits i condicions de salut animal que regulen tant l'intercanvi com la importació d'èquids.

Aquests dos conceptes –intercanvi i importació– discriminen les condicions en dos supòsits que es regulen diferentment segons si els animals provenen d'un estat integrant de la Unió Europea o no. Aquest tracte diferencial es basa en les disposicions del Protocol sobre qüestions veterinàries complementari a l'Acord en forma d'intercanvi de notes entre el Principat d'Andorra i la Comunitat Econòmica Europea signat a Brussel·les el 15 de maig de 1997. Aquest instrument possibilita el moviment tradicional d'animals i de productes animals entre Andorra i els països de la Unió Europea amb el compromís d'aplicar a Andorra la normativa comunitària que garanteixi aquest moviment en condicions equivalents.

Finalment, els quatre annexos estableixen la relació de malalties de declaració obligatòria i els models de declaració sanitària emprats en el cas dels èquids registrats i de certificat sanitari aplicat al moviment dels èquids de cria, renda o abastament; el quart descriu les proves per al diagnòstic de la pesta equina.

Consegüentment, a proposta de la ministra de Medi Ambient, Agricultura i Sostenibilitat, el Govern, en la sessió del 30 de maig del 2018, ha aprovat aquest Decret amb el contingut següent:

Article únic

S'aprova el Reglament relatiu a les condicions de salut animal que regeixen el moviment i la importació d'èquids, que entrarà en vigor l'endemà de ser publicat al Butlletí Oficial del Principat d'Andorra.

Reglament relatiu a les condicions de salut animal que regeixen el moviment i la importació d'èquids

Article 1. *Objecte*

Aquest Reglament estableix les condicions de salut animal que regulen el moviment d'èquids a Andorra i l'intercanvi entre Andorra i els estats membres de la Unió Europea, com també la importació d'èquids des d'altres estats que no siguin membres de la Unió Europea.

Article 2. *Definicions*

1. Als efectes d'aquest Reglament, s'entén per:

- a) Explotació: l'establiment agrari o d'ensinistament, la quadra o, en general, qualsevol local o instal·lació on hi hagi o es criïn habitualment èquids, independentment de l'ús a què es destinin;
- b) Centre d'agrupament: qualsevol lloc on s'agrupen èquids domèstics procedents d'explotacions diverses per constituir-ne lots;
- c) Èquid: l'animal domèstic o salvatge de l'espècie equina –incloent-hi les zebres– i asinal i els animals que resulten del seu encreuament;
- d) Èquid registrat: qualsevol èquid, inscrit o registrat o susceptible de ser inscrit en un llibre genealògic d'acord amb les normes establertes en el capítol I del títol IX del Reglament d'aplicació de la Decisió 2/1999 del Comitè Mixt CE-Andorra, pel qual es regulen els intercanvis, les importacions i les exportacions d'animals vius i de productes d'origen animal destinats al consum humà, identificat mitjançant un document d'identificació lliurat per:
 - i) L'autoritat ramadera o qualsevol altra autoritat competent del país d'origen de l'èquid encarregada de la gestió del llibre genealògic o del registre de la raça d'aquest èquid, o
 - ii) Qualsevol associació o organització encarregada del control dels cavalls destinats a les competicions o les curses;
- e) Èquid d'abastament: l'èquid destinat a l'escorxador per ser sacrificat, ja sigui directament, ja sigui després de romandre en un centre d'agrupament autoritzat, establert d'acord amb l'article 6;
- f) Èquid de cria i de renda: l'èquid no considerat a les lletres c i d;
- g) Estat indemne de pesta equina: qualsevol estat en el territori del qual cap evidència clínica, serològica en el cas dels èquids no vacunats, o epidemiològica hagi permès comprovar la presència de pesta equina durant els dos darrers anys i on en els darrers dotze mesos no s'hagi efectuat cap vacunació contra aquesta malaltia;
- h) Malalties de declaració obligatòria: les malalties considerades a l'annex I;
- i) Admissió temporal: situació d'un èquid registrat admès al territori del Principat d'Andorra per un període no superior a noranta dies que es determinarà en funció de la situació sanitària del país d'expedició;
- j) Moviment: l'expedició d'èquids a l'interior d'Andorra i l'intercanvi d'èquids entre el Principat d'Andorra i els estats membres de la Unió Europea;
- k) Importació: l'expedició al Principat d'Andorra d'èquids des d'un país no integrant de la Unió Europea;
- l) Regió transfronterera: la zona geogràfica dels estats espanyol i francès propera a la frontera amb el Principat d'Andorra. En el cas del Principat d'Andorra la totalitat del territori té la consideració de regió transfronterera.

2. Per a l'aplicació d'aquest Reglament, qualsevol terme o expressió que no hi estigui definit té, llevat que del context s'infereixi una interpretació diferent, el significat que li atribueix la legislació vigent.

Article 3. *Requisits per al moviment d'èquids*

1. Només poden ser autoritzats els moviments d'èquids a Andorra i entre Andorra i un estat membre de la Unió Europea quan compleixin els requisits establerts als articles 4 i 5.

2. No obstant això, l'autoritat competent de l'estat de destí pot atorgar dispenses generals o limitades per al moviment d'èquids:

- a) Que es muntin o es portin amb finalitats esportives o recreatives per rutes situades a la regió transfronterera;
- b) Que participin en manifestacions culturals o similars, o en activitats organitzades per entitats locals autoritzades situades a la regió transfronterera;
- c) Destinats exclusivament a la pastura o el treball, de forma temporal, a la regió transfronterera.

Article 4. *Condicions de salut animal per al moviment d'èquids*

1. Els èquids no poden presentar cap símptoma de malaltia en el moment de la inspecció. La inspecció s'ha de dur a terme en el termini de les quaranta-vuit hores anteriors a l'embarcament o la càrrega.

2. Sense perjudici de les disposicions de l'apartat 5 pel que fa a les malalties de declaració obligatòria, el veterinari oficial s'ha d'assegurar en realitzar la inspecció que no hi ha cap fet –basant-se inclús en la declaració del propietari o del criador– que permeti concloure que els èquids hagin estat en contacte amb èquids afectats per una infecció o una malaltia contagiosa en els darrers quinze dies anteriors a la inspecció.

3. Els èquids no poden estar inclosos entre els animals que s'hagin d'eliminar i destruir complint un programa d'erradicació de malaltia infecciosa o contagiosa.

4. Els èquids han de ser identificats de conformitat amb el Reglament que estableix els mètodes d'identificació dels èquids.

En el cas dels èquids registrats, la validesa del document d'identificació ha de ser suspesa pel veterinari oficial durant el període de prohibicions establertes a l'apartat 5 d'aquest article o a l'article 5 d'aquest Reglament. Quan el cavall registrat sigui sacrificat cal restituir el document a l'autoritat que l'hagi expedid.

5. A més del requisit establert a l'article 5, els èquids no poden provenir d'una explotació que hagi estat l'objecte d'una de les mesures de prohibició següents:

- a) En cas que tots els animals de les espècies sensibles a la malaltia que es trobin a l'explotació no hagin estat sacrificats o eliminats, la durada de la prohibició imposada a l'explotació d'origen ha de ser com a mínim de:
 - i) Sis mesos en el cas d'èquids sospitosos de patir durina, a partir de la data del darrer contacte o de la possibilitat de contacte amb un èquid malalt. No obstant això, si es tracta d'un semental, la prohibició s'estén fins a la castració;
 - ii) Sis mesos en el cas del borm i de l'encefalomielitis equina, a partir de la data en què els èquids malalts hagin estat eliminats;
 - iii) En el cas d'anèmia infecciosa, ha d'acabar en la data en què després de sacrificar els èquids afectats la resta d'animals hagin reaccionat negativament a dos proves de Coggins efectuades en un interval de tres mesos;
 - iv) Sis mesos a comptar del darrer cas d'estomatitis vesicular declarada;
 - v) Un mes a comptar del darrer cas de ràbia declarada;
 - vi) Quinze dies a comptar del darrer cas de carboncle bacteridià declarat;

b) En cas que s'hagin sacrificat o suprimit tots els animals de les espècies sensibles a la malaltia que es troben a l'explotació i s'hagin desinfectat tots els espais, la durada de la prohibició és de trenta dies a partir de la data en què els animals hagin estat eliminats i els locals hagin estat desinfectats, llevat que es tracti de carboncle bacteridià, en relació amb el qual la prohibició té una durada de quinze dies.

Article 5. *Condicions per al moviment d'èquids des d'un territori infectat de pesta equina*

1. Només està permès el moviment d'èquids des d'un territori considerat com a infectat de pesta equina, d'acord amb l'apartat 2, a un estat no indemne de pesta equina en les condicions fixades en l'apartat 6.

2. Es considera com a infectat de pesta equina un territori quan:

a) S'hagi constatat la pesta equina en els dos darrers anys mitjançant una evidència clínica, serològica (en el cas d'animals no vacunats) o epidemiològica, o

b) S'hagi practicat la vacunació contra la pesta equina en els darrers dotze mesos.

3. El territori que es consideri infectat de pesta equina es compon, com a mínim:

a) D'una zona de protecció d'un radi de 100 km com a mínim al voltant de qualsevol focus;

b) D'una zona de vigilància de com a mínim 50 km de fons que s'estén més enllà dels límits de la zona de protecció i on no s'hagi practicat cap vacunació en els darrers dotze mesos.

c) En el cas d'Andorra, es considera la totalitat del territori com una unitat indivisible.

4. Les normes de control i les mesures de lluita contra la pesta equina relatives als territoris i les zones considerades en l'apartat 3, així com les excepcions, s'estableixen reglamentàriament.

5. Qualsevol èquid vacunat que es trobi en la zona de protecció ha de ser registrat i marcat d'acord amb la normativa vigent.

La menció d'aquesta vacunació ha de constar de manera clara en el document d'identificació o en el certificat sanitari.

6. No es pot expedir des d'un territori considerat a l'apartat 3 cap èquid que no compleixi els requisits següents:

a) Ser expedits únicament en determinats períodes de l'any en funció de l'activitat dels insectes vectors;

b) No presentar cap signe clínic de pesta equina el dia de la inspecció considerada a l'apartat 1 de l'article 4;

c) Que hagin estat sotmesos a una prova per a la pesta equina com es descriu en l'annex IV, en dos ocasions, amb un interval comprès entre vint-i-un i trenta dies; la segona prova ha de ser efectuada dins dels deu dies anteriors a l'expedició:

i) Amb resultat negatiu, si no han estat vacunats contra la pesta equina, o

ii) Sense que s'hagi constatat un augment dels anticossos i sense haver estat vacunats durant els darrers dos mesos, si han estat vacunats contra la pesta equina.

d) Haver estat mantinguts en un lloc de quarantena durant un període mínim de quaranta dies abans de l'expedició;

e) Haver estat protegits dels insectes vectors durant el període de quarantena i durant el transport des del lloc de quarantena al lloc d'expedició.

Article 6. *Condicions del transport*

1. Els èquids han de ser conduïts des de l'explotació d'origen al lloc de destí al més aviat possible, bé directament o bé a través d'un centre d'agrupament autoritzat, utilitzant mitjans de transport i de contenció netejats i desinfectats periòdicament. Els vehicles de transport han de ser condicionats de manera que els excrements, el jaç o el farratge dels èquids no rellisqui o caigui fora del vehicle durant el transport. El transport ha d'efectuar-se de manera que garanteixi una protecció eficaç i el benestar dels èquids.

2. L'autoritat competent pot, de manera general o limitada, una dispensa per a determinats requisits de l'apartat 5 de l'article 4 sempre que l'animal tingui una marca especial que indiqui que està destinat al sacrifici i que la menció d'aquesta dispensa figuri en el certificat sanitari d'acord amb l'annex III.

Si s'atorga aquesta dispensa, els èquids d'abastament han de ser conduïts directament a l'escorxador designat per sacrificar-los en un termini màxim de cinc dies a comptar de l'arribada a l'escorxador.

3. El veterinari oficial ha de fer constar en un registre el número d'identificació o el número de document d'identificació de l'èquid sacrificat i ha de transmetre a l'autoritat competent del lloc d'expedició, a petició seva, una declaració que certifiqui el sacrifici de l'èquid.

Article 7. *Expedició del certificat o de la declaració sanitaris*

1. L'autoritat competent ha de vetllar perquè:

- a) En cas que surtin de l'explotació, els èquids registrats vagin acompanyats del document d'identificació establert a l'apartat 4 de l'article 4, completat amb la declaració sanitària prevista a l'annex II en cas que siguin expedits en un altre estat;
- b) Durant el transport, els èquids de cria, de renda i d'abastament vagin acompanyats del certificat sanitari de conformitat amb l'annex III.

2. El certificat sanitari, o la declaració sanitària en el cas dels èquids registrats, cal expedir-los dins de les quaranta-vuit hores anteriors a l'embarcament o, com a molt tard, el darrer dia laborable previ a l'embarcament, en la llengua o les llengües oficials de l'estat d'expedició i de destí. La declaració o el certificat sanitaris han de tenir un període de validesa de deu dies i han de constar d'un sol full.

3. El moviment dels èquids no registrats pot efectuar-se mitjançant un únic certificat sanitari per lot, en lloc del certificat sanitari individual esmentat a la lletra b de l'apartat 1.

Article 8. *Normes d'aplicació per al control a l'estat d'origen i per al control a l'estat de destí*

Pel que fa al control a l'estat d'origen, a l'organització i al seguiment del control a l'estat de destí i a les mesures de salvaguarda que calgui adoptar, s'apliquen les disposicions establertes al títol III del Reglament d'aplicació de la Decisió 2/1999 del Comitè Mixt Andorra-CE, pel qual es regulen els intercanvis, les importacions i les exportacions d'animals vius i productes d'origen animal destinats al consum humà, del 7 de juny del 2000.

Article 9. *Criteris generals per autoritzar la importació d'èquids*

1. Per autoritzar la importació d'èquids des d'un país determinat cal tenir en compte la situació sanitària i les garanties que ofereixi aquest país. A aquest efecte i basant-se en les normes internacionals corresponents, cal tenir en compte com aquest país aplica aquestes normes, en particular el principi de regionalització.

2. Tanmateix, cal tenir en compte els criteris següents:

- a) La situació sanitària dels èquids, d'altres animals domèstics i dels animals salvatges, tenint en compte en particular les malalties animals exòtiques i qualsevol altre aspecte rellevant de la situació sanitària i mediambiental que pugui suposar un risc;
- b) La legislació d'aquest país en matèria de salut i benestar animals;
- c) L'organització de l'autoritat veterinària competent i dels seus serveis d'inspecció, les competències d'aquests serveis, la supervisió a què estiguin sotmesos i els mitjans amb què comptin per aplicar la legislació de forma eficaç;
- d) Que el país d'origen sigui membre de l'Organització Mundial de la Salut Animal (OIE) i la regularitat i rapidesa amb què informi sobre l'existència de malalties infeccioses o contagioses d'èquids en el seu territori, en particular les considerades a l'annex I d'aquest Reglament.

3. L'autorització prevista a l'apartat 1 pot ser atorgada per a la totalitat del territori de l'estat considerat o bé només per a una part d'aquest territori, com també pot ser limitada a determinades espècies o categories d'èquids.

Article 10. *Condicions sanitàries per autoritzar la importació*

1. Els èquids importats han de provenir d'un país:

- a) Indemne de pesta equina;
- b) Indemne durant els dos anys anteriors d'encefalomielitis equina veneçolana (VEE);
- c) Indemne durant els sis mesos anteriors de durina i de borm.

2. Les disposicions de l'apartat 1 poden aplicar-se únicament a una part del territori del país d'origen. En el cas de regionalització dels requisits per a la pesta equina, cal respectar com a mínim les mesures previstes als apartats 2 i 6 de l'article 5.

Article 11. *Permanència al lloc d'origen*

1. Els èquids han de romandre sense interrupció en el territori o part del territori del país d'origen abans del dia de l'expedició o en el cas de regionalització en la part del territori definit en aplicació de l'apartat 2 de l'article 10 i per un període definit d'acord amb les disposicions de l'article 12.

2. Els èquids han de provenir d'una explotació sota control veterinari.

Article 12. *Condicions sanitàries altres per autoritzar la importació*

1. La importació d'èquids del territori o d'una part del territori d'un estat altre que un estat membre de la Unió Europea només s'autoritza quan, a més dels requisits de l'article 10 es compleixen els requisits considerats a l'apartat 2 d'aquest article.

2. Quan es tracti de països no indemnes d'estomatitis vesicular o d'arteritis vírica durant com a mínim sis mesos compleixin els requisits següents:

- a) Els èquids han de provenir d'una explotació indemne d'estomatitis vesicular des de com a mínim els sis mesos anteriors i han d'haver reaccionat negativament a una anàlisi serològica abans de ser expedits;
- b) En el cas de l'arteritis vírica, els èquids mascles han d'haver reaccionat negativament a una anàlisi serològica, a un mètode d'aïllament del virus o a qualsevol altra prova reconeguda que garanteixi que l'animal està lliure d'aquesta malaltia.

Article 13. *Identificació dels èquids importats*

1. Els èquids importats han de ser identificats d'acord amb l'apartat 4 de l'article 4 i han d'acompanyar-se d'un certificat sanitari de contingut equivalent al del certificat descrit a l'annex III lliurat per un veterinari oficial del país d'exportació.

2. El certificat sanitari ha de complir els requisits següents:

- a) Lliurar-se el dia de la càrrega dels èquids per a la seva expedició o quan es tracti de cavalls registrats, el darrer dia laborable abans de l'embarcament;
- b) Acompanyar els èquids en un document original que consti en un únic full;
- c) Expedir-se de forma individual llevat del cas dels èquids d'abastament, per als quals es pot lliurar un únic certificat per a un lot degudament marcat i identificat.

Article 14. *Condicions per al sacrifici dels èquids d'abastament importats*

En arribar a destí, els èquids d'abastament han de ser conduïts a l'escorxador, ja sigui directament, ja sigui després de romandre en un centre d'agrupament, considerat en l'article 6, i d'acord amb els requisits de benestar animal, han de ser sacrificats en un termini que s'ha de fixar tenint en compte les disposicions dels articles 4 i 5.

Article 15. *Protecció de dades*

La comunicació de dades de caràcter personal (a partir d'ara, "dades") entre les parts identificades en el corresponent decret de regulació dels fitxers de dades personals del Departament d'Agricultura, s'efectua tenint en compte les obligacions establertes per a cada part, així com el nivell de protecció suficient de la vida privada i de les llibertats i drets fonamentals de les persones requerit respecte del tractament que es fa o que l'altra part pot fer d'aquestes dades.

Si la part emissora constata que la part destinatària garanteix un nivell suficient de protecció de dades en relació amb la seva legislació, la comunicació d'aquestes dades s'efectua respectant les normes següents:

1. Les dades han de ser adequades, pertinents i no excessives respecte de les finalitats per a les quals s'han comunicat. Les informacions que contenen dades només es poden haver obtingut de tractaments de dades recollides en el marc de la identificació i el registre dels animals de companyia. La part destinatària de les dades esmentades només les pot transmetre a tercers una vegada hagi obtingut l'autorització expressa per escrit de l'òrgan competent de la part emissora.
2. La part destinatària de les dades només les pot utilitzar per a les finalitats i condicions que hagi definit la part emissora.
3. Les dades comunicades s'han d'eliminar en el termini màxim previst per a la conservació de dades segons el dret nacional de la part emissora, que indica a la part destinatària quin és aquest termini màxim en el moment en què es comuniquen les dades. No obstant això, la part destinatària no pot prevaler-se d'aquest termini màxim per conservar les dades més temps del que li autoritza la seva legislació nacional. Les dades s'eliminen abans de l'acabament d'aquest termini si ja no són necessàries per a l'acompliment de la tasca que havia motivat que es comunicuessin.
4. La part emissora garanteix l'exactitud de les dades comunicades. Si es constata que s'han transmès dades inexactes o que no es podien comunicar, la part emissora n'informa al més aviat possible la part destinatària, que corregeix les dades inexactes o elimina les dades que no es podien comunicar.
5. Qualsevol persona que justifiqui la seva identitat té dret a interpel·lar el Departament d'Agricultura amb la finalitat de saber si tenen dades seves i, si escau, que se li puguin comunicar. Qualsevol persona que justifiqui la seva identitat també té dret a demanar al Departament d'Agricultura que es rectifiquin, completin, s'actualitzin o s'eliminin les seves dades si són inexactes, incompletes, caducades, o si es tracten de manera que es violen les disposicions del dret intern relatives a la protecció de dades.
6. Les parts prenen les mesures apropiades per garantir la protecció de les dades que se'ls comuniquen contra la destrucció accidental o no autoritzada, o la pèrdua accidental, així com contra l'accés, la modificació o la difusió no autoritzats.
7. Cada part porta un registre de les dades comunicades i de la seva destrucció.
8. La part destinatària de les dades informa la part emissora, quan ho demani, de l'ús que en fa.

Article 16. Disposicions relatives a les infraccions i a les sancions

Les infraccions relatives a l'incompliment de les disposicions contingudes en aquest Reglament se sancionen d'acord amb la Llei 11/2016, del 28 de juny, de tinença i de protecció d'animals; la Llei 14/2012, del 12 de juliol, de salut animal i seguretat alimentària; la Llei d'agricultura i ramaderia, del 22 de juny del 2000, i la Llei 25/2004, del 14 de desembre, de residus, sense perjudici de les responsabilitats civils o penals o d'un altre ordre que hi puguin concórrer.

Disposició derogatòria

Es deroga el capítol segon (Condicions de sanitat animal exigibles per als moviments intracomunitaris d'èquids) del títol IX (Intercanvi d'èquids) del Reglament d'aplicació de la Decisió 2/1999 del Comitè Mixt Andorra-CE, pel qual es regulen els intercanvis, les importacions i les exportacions d'animals vius i productes d'origen animal destinats al consum humà, del 28 de juny del 2000, així com, qualsevol disposició del mateix rang o inferior que contradigui aquesta norma.

Cosa que es fa pública per a coneixement general.

Andorra la Vella, 30 de maig del 2018

Antoni Martí Petit
Cap de Govern



Annex I. Malalties de declaració obligatòria

Les malalties següents estan sotmeses a declaració obligatòria:

Durina

Borm

Encefalomièlitis equina (en totes les varietats, inclosa l'encefalomièlitis equina veneçolana, VEE)

Anèmia infecciosa

Ràbia

Carboncle bacteridià

Pesta equina

Estomatitis vesicular

Annex II. Model de declaració sanitària

Document d'identificació permanent únic núm.

La persona sotasignada certifica^(a) que l'èquid designat a continuació reuneix les condicions següents:

- a) Ha estat examinat avui i no presenta cap signe clínic de malaltia;
- b) No ha de ser eliminat en el marc d'un programa d'erradicació d'una malaltia contagiosa o infecciosa aplicat a Andorra;
- c) No procedeix d'un territori subjecte a mesures restrictives a causa de la pesta equina,

o

Procedeix del territori o d'una part del territori subjecte a mesures restrictives a causa de policia sanitària i ha estat sotmès al lloc de quarantena de _____ entre el _____ i el _____ a les proves amb resultats satisfactoris previstes a l'apartat 5 de l'article 5 de la Directiva 2009/156/CE^(b),

No ha estat vacunat contra la pesta equina

o

Ha estat vacunat contra la pesta equina el _____ ^(b) ^(c);

- d) No procedeix d'una explotació subjecta a mesures de prohibició per raons de policia sanitària i no ha estat en contacte amb els èquids d'una explotació que és objecte d'una prohibició per raó de policia sanitària:

- En el cas d'èquids sospitosos de patir durina, durant els sis mesos a partir de la data del darrer contacte o de la possibilitat de contacte amb un èquid malalt. Nogensmenys, si es tracta d'un semental, la prohibició s'ha d'aplicar fins a la castració,

- En el cas de borm o d'encefalomielitis equina, durant els sis mesos a partir de la data en la qual es van eliminar els èquids afectats,

- En el cas d'anèmia infecciosa, durant el període necessari perquè, a partir de la data en la qual els èquids afectats han estat eliminats, la resta d'animals han respost negativament a dos proves de Coggins efectuades en un interval de tres mesos,

- En el cas d'estomatitis vesicular, durant els sis mesos a partir del darrer cas,

- En el cas de la ràbia, durant un mes a partir del darrer cas,

- En el cas del carboncle bacteridià, durant els quinze dies a partir del darrer cas,
- En el cas que tots els animals de les espècies sensibles presents a l'explotació hagin estat sacrificats o eliminats i els locals desinfectats, durant els trenta dies a comptar de la data en la qual els animals hagin estat eliminats i els locals desinfectats, llevat del cas del carboncle bacteridià, per al qual la durada de prohibició és de quinze dies;
- e) No ha estat, segons el meu coneixement, en contacte amb èquids afectats d'infecció o de malaltia contagiosa en el decurs dels darrers quinze dies;
- f) Al moment de la inspecció, eren aptes per ser transportats segons el trajecte previst, de conformitat amb les disposicions del Reglament (CE) núm. 1/2005 ^(d).

Data	Lloc	Segell i signatura del veterinari oficial ⁽¹⁾
(1) Nom en majúscules i escrit de forma llegible		

- a) Vàlid durant deu dies.
- b) Ratlleu la menció inútil.
- c) La menció sobre la vacunació ha de constar al document d'identificació permanent únic.
- d) Aquesta declaració no eximeix els transportistes de les obligacions que els incumbeixen d'acord amb les disposicions en vigor, en particular pel que fa a l'aptitud dels animals per ser transportats.



ANNEX III. Model de certificat sanitari per a l'intercanvi d'èquids

Part I: Detalls relatius a la partida presentada	I.1. Expedidor		I.2. Núm. de referència del certificat		I.2.a. Núm. de referència local			
	Nom							
	Adreça		I.3. Autoritat central competent					
	Codi postal		I.4. Autoritat local competent					
	I.5. Destinatarí		I.6. Núm. dels certificats originals associats Núm. dels documents d'acompanyament					
	Nom							
	Adreça		I.7.					
	Codi postal							
	I.8. País d'origen		Codi ISO		I.9. Regió d'origen		Codi	
	I.12. Lloc d'origen		I.13. Lloc de destí					
	☐ Explotació ☐ Centre d'agrupament		☐ Altres		☐ Explotació ☐ Centre d'agrupament		☐ Establiment ☐ Altres	
	Nom		Núm. d'autorització		Nom		Núm. d'autorització	
	Adreça				Adreça			
	Codi postal				Codi postal			
I.14. Lloc de càrrega		I.15. Data i hora de sortida						
Codi postal								
I.16. Mitjans de transport		I.17. Transportista						
☐ Aeronau ☐ Vehicle de carretera		☐ Vaixell ☐ Vagó de ferrocarril ☐ Altres		Nom		Número d'autorització		
Identificació				Adreça				
				Codi postal		Estat membre		
I.18. Descripció de la mercaderia		I.19. Codi producte (Codi NC)						
		I.20. Nombre/Quantitat						
I.21.		I.22. Nombre d'embalums						
		I.24. Tipus d'embalum						
I.23. Núm. de precinte i núm. de contenidor								
I.25. Mercaderies certificades a efectes de		☐ Cría ☐ Sacrifici ☐ Èquid registrat ☐ Altres						
I.26. Trànsit a través d'un país tercer ☐		I.27. Trànsit a través d'estats membres ☐						
País tercer		Codi ISO		Estat membre		Codi ISO		
Punt de sortida		Codi		Estat membre		Codi ISO		
Punt d'entrada		Núm. de PIF		Estat membre		Codi ISO		
I.28. Exportació ☐		I.29. Temps estimat del transport						
País tercer		Codi ISO						
Punt de sortida		Codi						
I.30. Pla de viatge ☐ Sí ☐ No								
I.31. Identificació de les mercaderies								
Espècie (nom científic)		Mètode d'identificació						

Èquids registrats, èquids de cria, de renda i d'abastament

II. Informació sanitària		II.a. Número de referència del certificat	II.b. Número de referència local
Part II: Certificació	El sotassinat certifica que l'(els) èquid(s) abans designat(s) reuneix(en) les condicions següents:		
	II.1	ha(n) estat examinat(s) avui i no presenta(en) cap signe clínic de malaltia;	
	II.2	no ha(n) de ser eliminat(s) en el marc d'un programa d'erradicació d'una malaltia contagiosa o infecciosa aplicat al Principat d'Andorra;	
	O bé (1)	[II.3 no procedeix(en) del territori o d'una part del territori subjecte a mesures restrictives a causa de la pesta equina;]	
	O bé (1)	[II.3 procedeix(en) del territori o d'una part del territori subjecte a mesures restrictives a causa de la pesta equina, ha(n) romàs durant com a mínim 40 dies abans d'enviar-los en el lloc de quarantena de protegit dels vectors i ha(n) estat sotmès(os) a la prova per detectar anticossos de la pesta equina que es descriu en l'annex IV del Reglament relatiu a les condicions de salut animal que regeixen el moviment i la importació d'èquids realitzada simultàniament en mostres de sang preses en dos vegades, amb un interval comprès entre 21 i 30 dies el (indiqueu la data) i durant els 10 dies anteriors a l'enviament el (indiqueu la data);]	
	O bé (2)	[amb resultat negatiu en cada cas si no ha(n) estat vacunat(s) contra la pesta equina;]	
	O bé (1)	[sense augment d'anticossos, si ha(n) estat vacunat (s) contra la pesta equina;]	
	O bé (2)	[II.4 no ha(n) estat vacunat(s) contra la pesta equina;]	
	O bé (1)	[II.4 ha(n) estat vacunat(s) contra la pesta equina el (indiqueu la data);]	
	O bé (2)	[com a mínim dos mesos abans de la certificació;]	
	O bé (1)	[com a mínim dos mesos abans de l'entrada en el lloc de quarantena;]	
	II.5	no procedeix(en) d'una o més explotacions sobre les quals hagin recaigut mesures de prohibició per raons de policia sanitària que hagin establert com a mínim una de les condicions següents:	
	O bé (2)	[no van ser sacrificats tots els animals de l'explotació de l'espècie sensible a les malalties esmentades en les lletres a) a g) següents, i la prohibició es va aplicar com a mínim:	
	a)	En el cas dels èquids sospitosos de patir durina,	
	O bé (1)	[durant els sis mesos següents a la data de l'últim contacte o possibilitat de contacte amb un èquid malalt o infectat de <i>Trypanosoma equiperdum</i> ;]	
O bé (1)	[en el cas d'un semental, fins a la castració;]		
b)	En el cas del borm, durant els sis mesos que segueixen a la data en què els èquids malalts o amb un resultat positiu en la prova de detecció de l'agent patògen causant <i>Burkholderia mallei</i> o d'anticossos d'aquest agent patògen van ser sacrificats i eliminats;		
c)	en el cas d'encefalomièlitis equina de qualsevol tipus, durant els sis mesos que segueixen a la data en què els èquids malalts van ser sacrificats, llevat del cas d'infecció pel virus del Nil occidental, en què el període de sis mesos es compta des de la data en què els èquids infectats van morir, van deixar l'explotació o es van recuperar completament;		
d)	en el cas d'anèmia infecciosa, fins a la data en què, després de sacrificar els èquids afectats, la resta d'animals reaccionin negativament a dos proves de Coggins efectuades amb mostres de sang preses en dos ocasions en un interval de tres mesos;		
e)	durant els sis mesos que segueixen al darrer cas d'estomatitis vesicular;		
f)	durant el mes que segueix al darrer cas de ràbia;		
g)	durant els 15 dies que segueixen al darrer cas de carboncle bacterià;		



Èquids registrats, èquids de cria, de renda i d'abastament

II. Informació sanitària (1)	II.a. Número de referència del certificat	II.b. Número de referència local
	Part II: Certificació O bé (1) [com a conseqüència de casos de durina, borm, encefalomièlitis equina de qualsevol tipus, d'anèmia infecciosa equina, d'estomatitis vesicular, de carboncle bacterià o de ràbia, tots els animals de l'explotació que pertanyen a les espècies sensibles a la malaltia van ser sacrificats o eliminats, i la prohibició es va mantenir durant 30 dies, o 15 dies en el cas del carboncle bacterià, des de la data en què, un cop eliminats els animals, la desinfecció dels locals s'ha dut a terme satisfactòriament;] II.6 no ha estat, al meu coneixement, en contacte amb èquids que han patit una malaltia o una infecció contagiosa durant els darrers quinze dies; II.7 en el moment de la inspecció estava(en) en condicions de realitzar el viatge previst d'acord amb els criteris de benestar animal durant el transport vigents (2). Notes Part I Casella I.6: correspon al núm. d'autorització CITES en el cas d'èquids inclosos en el Conveni de Washington sobre espècies amenaçades i els productes que se'n deriven. Casella I.16: matrícula (vagons o contenidors de ferrocarril i camions), núm. de vol (avions) o nom (vaixells). Casella I.19: utilitzeu el codi apropiat del Sistema Harmonitzat (SH) de l'Organització Mundial de Duanes: 01.01.01 o 01.01.06.19. Casella I.31: Espècie: cavalls, ases, muls, matxos, zebres (inclosos els encreuaments). Part II (1) Ratlleu les mencions inútils. (2) Aquesta declaració no eximeix els transportistes de complir amb les obligacions que els incumbeixen d'acord amb les disposicions comunitàries vigents, en particular pel que fa a l'aptitud dels animals per a ser transportats. - Aquest certificat té una validesa de 10 dies. - El color del segell i de la signatura han de ser diferents del de la resta d'indicacions del certificat Veterinari oficial o inspector oficial Nom (amb majúscules) Data: Segell: Qualificació i títol: Signatura:	

Annex IV. Diagnòstic de la pesta equina

Part A. Proves serològiques

Els mètodes serològics descrits a continuació són assaigs d'immunoabsorció enzimàtica (ELISA) basats en el capítol 2.5.1 de la secció B, apartat 2, del *Manual de les proves de diagnòstic i de les vacunes per a animals terrestres* adoptat per l'Assemblea Mundial de Delegats de l'OIE al maig del 2012 (edició 2016).

La proteïna vírica VP7 és un antigen principal immunodominant del virus de la pesta equina (VPE) que està present en els nou serotips del VPE. S'ha establert que la proteïna recombinant VP7 del VPE és estable, innòcua i adequada per ser utilitzada com a antigen en els processos ELISA per detectar la presència d'anticossos contra el VPE amb un nivell de sensibilitat i d'especificitat molt elevats. Les tècniques ELISA indirecta i de bloqueig utilitzen la proteïna VP7 del VPE i són adequades per al diagnòstic serològic de la pesta equina.

1. ELISA indirecte per detectar anticossos contra el virus de la pesta equina (VPE)

Aquesta tècnica utilitza anticossos anticavall conjugats amb la peroxidasa de rave que reaccionen al sèrum de cavall, de mula i d'ase. El mètode descrit per Maree i Paweska (2005) utilitza com a conjugat la proteïna G, que reacciona igualment al sèrum de zebra.

L'antigen pot ser subministrat pel Centre d'Investigació de Salut Animal (CISA) a Espanya, en el termini de quatre a sis mesos posteriors a la demanda.

1.1. Descripció de la prova

1.1.1. Fase sòlida

- 1.1.1.1. Recobriu les plaques ELISA amb proteïna recombinant VP7 del serotip 4 del virus (VPE-4), diluïda en solució tampó de carbonat/bicarbonat, pH 9,6. Incubeu les plaques tota la nit a 4 °C.
- 1.1.1.2. Renteu les plaques cinc vegades amb aigua destil·lada que contingui 0,01 % (v/v) de Tween 20 (solució de rentat). Sacsegeu suaument les plaques sobre un material absorbent per eliminar les restes de solució de rentat que hi puguin quedar.
- 1.1.1.3. Satureu les plaques amb solució salina tamponada fosfatada (PBS) pH 7,2 + 5% (p/v) de llet desnatada en pols (llet Nestlé™) a raó de 200 µl per cel·la durant 1 hora a 37 °C.
- 1.1.1.4. Elimineu la solució de saturació i sacsegeu suaument les plaques a sobre d'un material absorbent.

1.1.2. Mostres problema

- 1.1.2.1. Diluïu els sèrums problema i els sèrums control positiu i negatiu a l'1/25 en PBS + 5 % (p/v) de llet desnatada + 0,05% (v/v) de Tween 20, fins a un volum de 100 µl per cel·la. Incubeu-ho una hora a 37 °C.

Per a la titulació, realitzeu sèries de dilució dobles des de 1/25 (100 µl/cel·la), utilitzant una columna de la placa per a cada sèrum; repetiu la mateixa operació amb els controls positiu i negatiu. Incubeu-ho durant una hora a 37 °C.

- 1.1.2.2. Renteu les plaques cinc vegades amb aigua destil·lada que contingui 0,01% (v/v) de Tween 20 (solució de rentat). Sacsegeu suaument les plaques sobre un material absorbent per eliminar qualsevol resta de la solució de rentat.

1.1.3. Conjugació

- 1.1.3.1. Dipositeu a cada cel·la 100 µl de gammaglobulina anticavall conjugada amb peroxidasa de rave diluïda en PBS + 5% de llet desnatada + 0,05% de Tween 20, pH 7,2. Incubeu-ho durant una hora a 37 °C.

- 1.1.3.2. Renteu les plaques cinc vegades amb aigua destil·lada que contingui 0,01% (v/v) de Tween 20 (solució de rentat). Sacsegeu suaument les plaques sobre un material absorbent per eliminar qualsevol resta de la solució de rentat.

1.1.4. Cromogen/substrat

- 1.1.4.1. Afegiu a cada cel·la 200 µl de solució de cromogen/substrat [10 ml de solució 80,6 mM de DMAB (dimetil-aminobenzaldehyd) + 10 ml de solució 1,56 mM de MBTH (clorhidrat 3-metil-2-benzotiazolina-hidrazona) + 5 µl H₂O₂].

Bloquegeu la reacció colorimètrica afegint-hi 50 µl de H₂SO₄ 3N passats cinc o deu minuts aproximadament (abans que el control negatiu prengui color).

També es poden utilitzar altres cromògens com l'ABTS (àcid 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfònic]), el TMB (tetrametil-bencidina) o l'OPD (orto-fenildiamina).

- 1.1.4.2. Llegiu les plaques a 600 nm (o 620 nm).

1.2. Interpretació dels resultats

- 1.2.1. Calculeu el valor llindar afegint 0,06 al valor del control negatiu (0,06 és la desviació típica calculada a partir d'un grup de 30 sèrums negatius).

- 1.2.2. Les mostres problema que presenten valors d'absorbància inferiors al llindar es consideren negatives.
- 1.2.3. Les mostres problema que presentin valors d'absorbància superiors al llindar + 0,15 es consideren positives.
- 1.2.4. Les mostres problema que presentin valors d'absorbància intermedis es consideren com a dubtoses, motiu pel qual cal utilitzar un altra tècnica per confirmar el resultat.

2. ELISA de bloqueig per a la detecció d'anticossos contra el virus de la pesta equina (VPE)

La tècnica ELISA de bloqueig de competició té com a objectiu detectar anticossos específics contra el virus de la pesta equina en sèrums de qualsevol espècie d'èquids, és a dir, cavalls, ases, zebres o qualsevol animal que resulti dels seus encreuaments, fet que permet evitar el problema de la possible especificitat de l'ús de l'ELISA indirecte.

El principi de la prova és el bloqueig interrupció de la reacció entre la proteïna recombinant VP7, com a antigen adsorbit a la placa ELISA, i l'anticòs monoclonal específic de la VP7 del VPE conjugat. Els anticossos del sèrum problema bloquegen la reacció entre l'antigen i l'anticòs monoclonal, fet que resulta en la reducció del color. La prova presenta un nivell elevat de sensibilitat i d'especificitat degut a l'ús de l'anticòs monoclonal dirigit contra la proteïna VP7.

La tècnica ELISA de bloqueig està disponible al mercat.

2.1. Descripció de la prova

2.1.1. Fase sòlida

- 2.1.1.1. Recobriu les plaques amb 50-100 ng d'antigen de VP7 recombinant del serotip 4 del virus VPE (VPE-4), diluïda en solució tampó de carbonat/bicarbonat, pH 9,6. Incubeu-ho tota la nit a 4°C.
- 2.1.1.2. Renteu les plaques tres vegades amb solució salina tampó fosfatada (PBS) 0,1 x que contingui 0,135 M de NaCl i 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBST). Sacsegeu suaument les plaques sobre un material absorbent per eliminar qualsevol resta de solució de rentat.

2.1.2. Mostres problema i controls

- 2.1.2.1. Diluïu els sèrums problema i els sèrums positiu i negatiu a l'1/5 en una solució que contingui 0,35 M NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20 i 0,1% de Kathon, fins a un volum final de 100 µl per cel·la. Incubeu-ho durant una hora a 37 °C.

Per a la titulació: prepareu una sèrie de dilucions dobles dels sèrums problema des de 1/10 fins a 1/280, en vuit cel·les (100 µl per cel·la) utilitzant una columna de la placa per a cada sèrum; realitzeu la mateixa operació amb els controls positiu i negatiu. Incubeu-ho durant una hora a 37 °C.

2.1.2.2. Renteu les plaques cinc vegades amb una solució salina tamponada fosfatada (PBS) 0,1 x que contingui 0,135 M de NaCl i 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBST). Sacsegeu suaument les plaques sobre un material absorbent per eliminar qualsevol resta de solució de rentat.

2.1.3. Conjugació

2.1.3.1. Recobriu amb 100 µl/cel·la d'anticòs monoclonal anti-VP7 conjugat amb peroxidasa de rave. Aquest anticòs monoclonal ha sigut prèviament diluït de 1/5000-1/15000 en una solució 1/1 de StabiliZyme Select® Stabilizer (SurModics, referència: SZ03) en aigua destil·lada. Incubeu-ho durant 30 minuts a 37 °C.

2.1.3.2. Renteu les plaques cinc vegades amb una solució salina tamponada fosfatada (SSTP) 0,1 x que contingui 0,135 M de NaCl i 0,05% (v/v) de Tween-20. Sacsegeu suaument les plaques sobre un material absorbent per eliminar qualsevol resta de solució de rentat.

2.1.4. Cromogen/substrat

Afegiu a cada cel·la 100 µl de solució de cromogen/substrat [1 ml d'ABTS (àcid 2,2'-azino-bis-[3- etilbenzotiazolina-6-sulfònic]) 5 mg/ml + 9 ml de solució tampó de substrat (0,1 M ph 4 de solució tampó fosfat/citrat de pH 4 que contingui 0,03% H₂O₂)] i incubeu-ho durant deu minuts a temperatura ambient. Bloquegeu el desenvolupament de color afegint 100 µl/cel·la d'SDS (dodecil-sulfat sòdic) al 2% (m/v).

2.1.5. Lectura

Llegiu els resultats a 405 nm en un lector ELISA.

2.2. Interpretació dels resultats

2.2.1. Determineu el percentatge de bloqueig (PB) de cada mostra aplicant la fórmula següent on Acs es correspon amb els anticossos:

PB= Acs (control -) – Acs (mostra problema)

Acs (control -) – Acs (control +) x 100

$$PB = \frac{Acs (contrôle^{-}) - Acs (échantillon)}{Acs (contrôle^{-}) - Acs (contrôle^{+})} \times 100$$

- 2.2.2. Les mostres que presentin un PB superior a 50% es consideren com a positives per a anticossos contra el VPE.
- 2.2.3. Les mostres que presentin un PB inferior a 45% es consideren com a negatives per a anticossos contra el VPE.
- 2.2.4. Les mostres que presentin un PB entre 45 i 50% es consideren com a dubtoses i han de ser novament analitzades. Si el resultat és novament dubtós, cal prendre mostres dels animals novament quan hagin transcorregut com a mínim dos setmanes des de la primera presa de mostra considerada com a dubtosa.

Part B. Identificació de l'agent patogen

Reacció en cadena de la polimerasa amb transcriptasa inversa en temps real (RT-PCR en temps real)

Les proves d'identificació de l'agent patogen basades en mètodes de detecció d'àcid nucleic han de discernir les soques de referència dels nou serotips del virus de la pesta equina.

El mètode descrit al punt 2.1 es basa en el capítol 2.5.1 de la secció B, punt 1.2, del *Manual de les proves de diagnòstic i de les vacunes per a animals terrestres*, adoptat per l'Assemblea Mundial de Delegats de l'OIE al maig del 2012 (edició 2016).

Qualsevol mètode de detecció mitjançant l'RT-PCR utilitzat per analitzar mostres (de sang o de melsa) ha d'obtenir resultats d'una sensibilitat igual o superior a la dels mètodes descrits al punt 2.

El virus inactivat de les soques de referència dels serotips 1 a 9 pot ser obtingut del laboratori de referència de la Unió Europea o del laboratori de referència de l'OIE per a la pesta equina a Algete (Espanya).

1. Extracció de l'ARN víric

Per garantir una bona reacció, és necessari extraure de la mostra un ARN del VPE de qualitat. L'extracció d'àcids nucleics a partir de mostres clíniques pot ser realitzat mitjançant diversos mètodes interns i comercialitzats

Els estoigs comercials utilitzen tècniques diferents per aïllar l'ARN. La majoria es basen en un dels procediments següents:

- a) Extracció dels àcids nucleics amb fenol-cloroform,
- b) Adsorció dels àcids nucleics sobre membrana filtrant,
- c) Adsorció dels àcids nucleics sobre un sistema de perles magnètiques.

Exemple d'extracció de l'ARN amb un mètode intern:

- 1.1. Homogeneïtzeu 1g de mostra de teixits en 1 ml de solució desnaturalitzant (tiocianat de guanidi 4M, citrat sòdic 25 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 M, Sarcosyl al 0,5%).
- 1.2. Després de centrifugar, s'afegeix al sobrenedant 1 µg d'ARN de llevat, 0,1 ml d'acetat sòdic 2 M i pH 4, 1 ml de fenol i 0,2 ml d'una barreja de cloroform/alcohol isoamílic (49/1).
- 1.3. Agiteu enèrgicament la suspensió i refredeu-la sobre gel durant 15 minuts.
- 1.4. Després de centrifugar, l'ARN present a la fase aquosa s'extreu amb fenol, es precipita amb etanol i es resuspèn amb aigua estèril.

2. Procediment de la RT-PCR en temps real

2.1. RT-PCR en temps real específica de grup (Agüero *et al.*, 2008)

Aquesta RT-PCR en temps real específica de grup està dirigida a la VP7 del VPE i permet discriminar el conjunt de serotips i soques coneguts del VPE que circulen actualment. A més, s'ha utilitzat amb bons resultats en els laboratoris de referència nacionals dels estats membres de la Unió Europea que han participat en proves d'aptitud organitzades cada any pel laboratori de referència de la Unió Europea entre 2009 i 2015. Igualment, en un estudi col·laboratiu internacional organitzat al 2015 en el marc de la xarxa de laboratoris de referència de l'OIE, aquest protocol figura entre els millors classificats.

Seqüències dels encebadors i de la sonda per a la detecció dels virus de la pesta equina:

- Encebador anvers: 5'-CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG-3'
- Encebador revers: 5'-CTA-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT-3'
- Sonda TaqMan amb grup MGB: 5'-FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-CCA-CTA-MGB-3'

- 2.1.1. La solució mare dels encebadors es dilueix a una concentració de treball de 8 µM ("solució de treball de l'encebador 8 µM"), mentre que la sonda es dilueix a una concentració de treball de 50 µM ("solució de treball de la sonda 50 µM"). Cal dissenyar una disposició de les plaques problema que s'introdueix en el programa informàtic de l'aparell de PCR en temps real. Utilitzant aquesta disposició com a guia, afegiu 2,5 µl de cada solució de treball de l'encebador 8 µM a cada cel·la que conté mostres d'ARN així com controls positius i/o

negatius (la concentració final de l'encebador serà d'1 μM en els 20 μl de la barreja de reacció de la RT-PCR). La placa es manté sobre gel.

- 2.1.2. Es barregen 2 μl d'ARN aïllat (mostra problema i control positiu) o 2 μl d'aigua exempta de ribonucleasa en els controls de reacció negativa, amb els encebadors anvers i revers. Aquesta barreja es desnatura per escalfament a 95°C durant 5 minuts, seguida d'un refredament ràpid sobre gel durant com a mínim 5 minuts.
- 2.1.3. Prepareu un volum apropiat de barreja de reacció de la RT-PCR d'una etapa en temps real per al nombre de mostres a analitzar seguint les instruccions del fabricant. S'afegeix 0,1 μl de la solució de treball de la sonda 50 μM a cada cel·la que conté mostres d'ARN (la concentració final de la sonda serà de 0,25 μM en cada cel·la que contingui mostres d'ARN). Es distribueix a cada cel·la 13 μl de barreja de reacció de la RT-PCR d'una etapa en temps real sobre la placa PCR que conté els encebadors desnaturitzats i l'ARN.
- 2.1.4. La placa se situa en un termociclador en temps real programat per a la transcripció inversa i l'amplificació de l'ADNc/detecció de fluorescència. Les condicions d'amplificació consisteixen en una primera etapa de transcripció inversa a 48 °C durant 25 minuts, seguida de 10 minuts a 95 °C ("inici en calent"), i de 40 cicles de 15 segons a 95 °C, 35 segons a 55 °C i 30 segons a 72 °C (o 40 cicles a 97 °C durant 2 segons i 55 °C durant 30 segons si s'utilitzen reactius i un termociclador que permetin reaccions ràpides). Les dades de fluorescència es mesuren a la fi de l'etapa a 55 °C.
- 2.1.5. La prova es considera no vàlida si les corbes d'amplificació obtingudes són atípiques, llavors cal repetir-la.

Les mostres es consideren com a positives si el valor Ct (nombre de cicles en què la fluorescència generada en una reacció supera el llindar de fluorescència) és inferior o igual al llindar Ct definit (35) en els 40 cicles de la PCR ($\text{Ct} \leq 35$).

Les mostres es consideren com a no concloents si el valor Ct és superior al llindar Ct definit (35) en els 40 cicles de la PCR ($\text{Ct} \geq 35$).

Les mostres es consideren negatives quan s'obtingui una corba d'amplificació horitzontal que no superi el llindar en els 40 cicles de la PCR.

- 2.2. RT-PCR en temps real específica de grup (Guthrie *et al.*, 2013)

La RT-PCR en temps real utilitza sondes de transferència d'energia per ressonància de fluorescència (FRET) per detectar l'àcid nucleic del VPE.

La prova de la RT-PCR per al virus de la pesta equina descrita ha estat dissenyada utilitzant seqüències d'una gran varietat de soques salvatges del VPE que circulen actualment. (Quan *et al.*, 2010). Incorpora, igualment una prova de control extern sintètic patentat per verificar el bon funcionament dels components de la prova.

Els estoigs per a la PCR d'una etapa en temps real són disponibles comercialment. A continuació es descriuen algunes etapes bàsiques, segons la descripció de Guthrie *et al.* (2013), susceptibles de ser modificades en funció de les exigències locals/específiques de cada cas, dels estoigs utilitzats i de l'equip disponible.

Seqüències dels encebadors i de la sonda per a la detecció dels virus de la pesta equina:

- Encebador anvers: 5'-AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T-3'
- Encebador revers: 5'-GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA-3'
- Sonda TaqMan amb grup MGB: 5'-FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB-3'

2.2.1. Les solucions mare de barreja dels encebadors i de la sonda es preparen a una concentració 25x: a 5 µM per als encebadors anvers i revers i de 3 µM per a la sonda. Cal dissenyar una disposició de plaques de prova que s'introdueix en el programa informàtic de l'aparell de la PCR en temps real. Mitjançant l'ús de la disposició com a guia, s'afegeixen 5 µl de mostres d'ARN, que comprèn les mostres problema i els controls positiu i negatiu, a les cel·les apropiades de la placa seguint la disposició.

2.2.2. L'ARN es desnaturalitza per escalfament a 95 °C durant 5 minuts, seguit d'un refredament ràpid sobre gel durant com a mínim 3 minuts.

2.2.3. Es prepara, seguint les instruccions del fabricant, un volum apropiat de barreja de reacció de la RT-PCR d'una etapa en temps real per al nombre de mostres problema. S'afegeix a la barreja de reacció 1 µl de solució mare de barreja dels encebadors i de la sonda 25x (vegeu el punt 2.2.1. anterior) a fi d'obtenir una concentració final a cada cel·la de 200 nM per a cada encebador i de 120 nM per a la sonda. Es distribueixen

20 µl de la barreja de reacció a cada cel·la de la placa PCR que contingui l'ARN desnaturalitzat.

2.2.4. La placa es col·loca en un termociclador en temps real programat per a la transcripció inversa i l'amplificació del DNAC/detecció de la fluorescència seguint la recomanació del fabricant. Les condicions d'amplificació poden ser les següents: una primera etapa de transcripció inversa a 48 °C durant 10 minuts, seguida de 10 minuts a 95 °C, i 40 cicles de 15 segons a 95 °C i 45 segons a 60 °C.

2.2.5. Les mostres es consideren positives si la fluorescència normalitzada per a la prova RT-PCR del VPE supera el llindar de 0,1 en menys de 36 cicles de la PCR amb totes les rèpliques d'una mostra.

Les mostres es consideren com a dubtoses si la fluorescència normalitzada per a la prova RT-PCR del VPE supera el llindar de 0,1 entre 36 i 40 cicles de la PCR amb alguna rèplica de la mostra.

Les mostres es consideren negatives si la fluorescència normalitzada per a la prova RT-PCR del VPE no supera el llindar de 0,1 en 40 cicles de la PCR amb totes les rèpliques d'una mostra i si la fluorescència normalitzada per a la prova de control extern sintètic patentat supera el llindar de 0,1 en 33 cicles de la PCR.