



MONITORUL OFICIAL

AL

ROMÂNIEI

Anul XIV — Nr. 556

PARTEA I
LEGI, DECRETE, HOTĂRĂRI ȘI ALTE ACTE

Marti, 30 iulie 2002

SUMAR

<u>Nr.</u>	<u>Pagina</u>
ACTE ALE ORGANELOR DE SPECIALITATE ALE ADMINISTRAȚIEI PUBLICE CENTRALE	
105.	— Ordin al ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor pentru aprobarea Normei sanitare veteri- nare cu privire la condițiile de sănătate a animale- lor și certificarea veterinară pentru importul din țări terțe de material seminal provenit de la bovine 1-8

ACTE ALE ORGANELOR DE SPECIALITATE ALE ADMINISTRAȚIEI PUBLICE CENTRALE

MINISTERUL AGRICULTURII, ALIMENTAȚIEI ȘI PĂDURILOR

ORDIN

pentru aprobarea Normei sanitare veterinare cu privire la condițiile de sănătate a animalelor și certificarea veterinară pentru importul din țări terțe de material seminal provenit de la bovine

Ministrul agriculturii, alimentației și pădurilor,
în temeiul prevederilor art. 31 alin. 1 din Legea sanitară veterinară nr. 60/1974, republicată, cu modificările și
completările ulterioare,
în baza Hotărârii Guvernului nr. 12/2001 privind organizarea și funcționarea Ministerului Agriculturii, Alimentației și
Pădurilor, cu modificările și completările ulterioare,
văzând Referatul de aprobare nr. 153.704 din 25 februarie 2002, întocmit de Agenția Națională Sanitară Veterinară,
emite următorul ordin:

Art. 1. — Se aprobă Norma sanitară veterinară cu privire la
condițiile de sănătate a animalelor și certificarea veterinară pentru
importul din țări terțe de material seminal provenit de la bovine,
prevăzută în anexa care face parte integrantă din prezentul ordin.

Art. 2. — Direcțiile sanitare veterinare județene și a municipi-
ului București vor aduce la îndeplinire prevederile prezentului
ordin.

Art. 3. — Agenția Națională Sanitară Veterinară va controla
modul de aducere la îndeplinire a prevederilor prezentului
ordin.

Art. 4. — Prezentul ordin va fi publicat în Monitorul Oficial
al României, Partea I, și va intra în vigoare în termen de
15 zile de la data publicării lui.

Ministrul agriculturii, alimentației și pădurilor,
Ilie Sârbu

București, 11 martie 2002.
Nr. 105.

NORMĂ SANITARĂ VETERINARĂ

cu privire la condițiile de sănătate a animalelor și certificarea veterinară pentru importul din țări terțe de material seminal provenit de la bovine

Art. 1. — Autoritatea sanitară veterinară centrală a României avizează importul de material seminal provenit de la bovinele care îndeplinesc condițiile stabilite în certificatele de sănătate a animalelor prevăzute în anexele nr. 1—4.

Art. 2. — Țările terțe autorizate să utilizeze modelul de certificat de sănătate a animalelor prevăzut în anexa nr. 1 sunt: Republica Cehă, Ungaria, Noua Zeelandă, Polonia, România, Elveția și Republica Slovacă.

Art. 3. — Țara autorizată să utilizeze modelul de certificat de sănătate a animalelor prevăzut în anexa nr. 2 este Statele Unite ale Americii.

Art. 4. — Țara autorizată să utilizeze modelul de certificat de sănătate a animalelor prevăzut în anexa nr. 3 este Canada, excluzând regiunea văii Okanagan din Columbia Britanică, care este definită ca zona delimitată de o linie trasată

de la un punct aflat pe granița care separă Canada de Statele Unite ale Americii, de 120°15' longitudine, 49° latitudine îndreptată spre nord, către un punct de 119°35' longitudine, 50°30' latitudine, într-o direcție nord-est către un punct de 119° longitudine, 50°45' latitudine, într-o direcție sudică spre un punct aflat pe granița care separă Canada de Statele Unite ale Americii, de 118°15' longitudine și 49° latitudine.

Art. 3. — Țara autorizată să utilizeze modelul de certificat de sănătate a animalelor prevăzut în anexa nr. 4 este Australia.

Art. 4. — Testarea bovinelor pentru febra catarală și pentru boala hemoragică epizootică se va efectua conform protocoalelor prevăzute în anexa nr. 5.

Art. 5. — Anexele nr. 1—5 fac parte integrantă din prezenta normă sanitară veterinară.

ANEXA Nr. 1
la norma sanitară veterinară

CERTIFICAT DE SĂNĂTATE A ANIMALELOR
pentru importul de material seminal provenit de la bovine

1. Expeditor (numele și adresa completă)	Numărul certificatului	
3. Destinatar (numele și adresa completă)	2. Țara terță a colectării	
	4. Autoritatea sanitară veterinară competentă	
6. Locul încărcării	5. Autoritatea sanitară veterinară competentă locală	
	7. Numele și adresa centrului de colectare a materialului seminal	
8. Mijlocul de transport	11. Numărul de autorizare a centrului de colectare a materialului seminal	
9. Locul și țara de destinație		
10. Numărul sigiliului containerelor cu material seminal		
12. Identificarea materialului seminal proaspăt sau congelat*)		
a) Numărul de doze	b) Data (datele) colectării	c) Rasa
d) Identificarea animalului donator		

*) A se anula, după caz.

13. Subsemnatul, medic veterinar oficial, am citit și îmi este cunoscută Directiva Consiliului 88/407/CEE și certific că:

a)
(denumirea țării exportatoare)

a fost indemnă de pestă bovină și febră aftoasă pe o perioadă de 12 luni înainte de colectarea materialului seminal pentru export și până la data de expediere a sa, în cursul aceleiași perioade nu s-a efectuat nici o vaccinare împotriva acestor boli;

b) centrul de colectare a materialului seminal în care a fost colectat materialul seminal ce urmează să fie exportat a fost:

(i) autorizat conform condițiilor stabilite în cap. I din anexa A la Directiva Consiliului 88/407/CEE;

(ii) condus și supravegheat conform condițiilor stabilite în cap. II din anexa A la Directiva Consiliului 88/407/CEE;

(iii) indemn de rabie, tuberculoză, bruceloză, antrax și pleuropneumonia contagioasă bovină pe o perioadă de 30 de zile înainte de data colectării materialului seminal ce trebuie exportat și de 30 de zile după data colectării (în cazul materialului seminal proaspăt până în ziua expedierii);

c) bovinele care se găsesc la centrul de colectare a materialului seminal:

(i) provin din efective și/sau au fost făcute de mame care îndeplinesc condițiile prevăzute la cap. I din anexa B la Directiva 88/407/CEE;

1) Se anulează, după caz.

(ii) au fost supuse, înainte de a intra în izolare, testelor solicitate conform cap. I din anexa B la Directiva 88/407/CEE;

(iii) au respectat cerințele de izolare înainte de intrare și pe cele de testare stabilite conform cap. I din anexa B la Directiva 88/407/CEE;

(iv) au fost ținute cel puțin un an și au fost supuse testelor de rutină conform cap. II din anexa B la Directiva 88/407/CEE;

(d) materialul seminal ce trebuie exportat:

(i) a fost obținut de la donatori care au fost ținuti în
(denumirea țării exportatoare)

o perioadă de 6 luni înainte de colectarea materialului seminal pentru export și care satisfac condițiile stabilite în anexa C la Directiva 88/407/CEE;

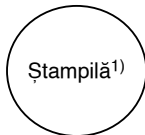
(ii) a fost obținut de la donatori care:

1. se găsesc într-un centru de colectare a materialului seminal în care toate bovinele, în cursul a 12 luni înainte de colectarea materialului seminal pentru export, au fost supuse, cu rezultate negative, unui test de seroneutralizare sau unui test Elisa pentru rinotraheita infecțioasă bovină/vulvovaginita pustuloasă infecțioasă¹⁾; sau

2. au reacționat negativ la un test de seroneutralizare sau la un test Elisa pentru rinotraheita infecțioasă bovină/vulvovaginita pustuloasă infecțioasă, efectuat într-o perioadă de 12 luni înainte de colectarea materialului seminal pentru export; sau

3. sunt seropozitivi, fiind vaccinați în concordanță cu cap. II din anexa B la Directiva Consiliului 88/407/CEE și având un rezultat negativ la un test de seroneutralizare sau la un test

Întocmit la la
(locul) (data)



Elisa, efectuat înainte de vaccinare în centrul de colectare a materialului seminal aprobat;

(iii) a fost prelucrat, depozitat și transportat în condiții care îndeplinesc prevederile Directivei 88/407/CEE.

Semnătura¹⁾
Numele și prenumele (cu majuscule)
Titlul oficial

¹⁾ Semnătura și ștampila trebuie să fie de o culoare diferită de cea a tipăriturii.

ANEXA Nr. 2
la norma sanitară veterinară

**CERTIFICAT DE SĂNĂTATE A ANIMALELOR
pentru importul de material seminal provenit de la bovine din Statele Unite ale Americii**

1. Expeditor (numele și adresa completă)	Numărul certificatului
3. Destinatar (numele și adresa completă)	2. Țara terță a colectării
6. Locul încărcării	4. Autoritatea sanitară veterinară competentă
8. Mijlocul de transport	5. Autoritatea sanitară veterinară competentă locală
9. Locul și țara de destinație	7. Numele și adresa centrului de colectare a materialului seminal
10. Numărul sigiliului containerelor cu material seminal	11. Numărul de autorizare a centrului de colectare a materialului seminal
12. Identificarea materialului seminal proaspăt sau congelat*)	
a) Numărul de doze	b) Data (datele) colectării
d) Identificarea animalului donator	c) Rasa

*) A se anula, după caz.

13. Subsemnatul, medic veterinar oficial, am citit și îmi sunt cunoscute prevederile Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001, publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 111 din 11 februarie 2002, și certific că:

a)
(denumirea țării exportatoare)

a fost indemnă de pestă bovină și febră aftoasă într-o perioadă de 12 luni imediat înainte de colectarea materialului seminal pentru export și până la data de expediere a sa și în cursul aceleiași perioade nu s-a efectuat nici o vaccinare împotriva acestor boli;

b) centrul de colectare a materialului seminal în care a fost colectat materialul seminal ce urmează să fie exportat a fost:

(i) autorizat conform prevederilor Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(ii) condus și supravegheat conform prevederilor Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(iii) indemn de rabie, tuberculoză, bruceloză, antrax și pleuropneumonia contagioasă bovină pe o perioadă de 30 de zile înainte de data colectării materialului seminal ce trebuie exportat și de 30 de zile după colectare (în cazul materialului seminal proaspăt până în ziua expedierii);

c) bovinele care se găsesc la centrul de colectare a materialului seminal:

(i) provin din efective și/sau au fost fătate de mame care îndeplinesc condițiile prevăzute de Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(ii) au fost supuse, înainte de a intra în izolare, testelor prevăzute în Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(iii) au respectat cerințele de izolare înainte de intrare și pe cele de testare stabilite în Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(iv) au fost ținute cel puțin un an și au fost supuse testelor de rutină conform Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

d) materialul seminal ce trebuie exportat:

(i) a fost obținut de la donatori care au fost ținuți în

.....
(denumirea țării exportatoare)

o perioadă de 6 luni imediat înainte de colectarea materialului seminal pentru export, și care îndeplinesc condițiile prevăzute în Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(ii) a fost obținut de la donatori care:

1. se găsesc într-un centru de colectare a materialului seminal în care toate bovinele, în cursul a 12 luni înainte de colectarea materialului seminal pentru export, au fost supuse, cu rezultate negative, unui test de seroneutralizare sau unui test Elisa pentru rinotraheita infecțioasă bovină/vulvovaginită pustuloasă infecțioasă¹⁾; sau

2. reacționează negativ la un test de seroneutralizare sau un test Elisa pentru rinotraheita infecțioasă bovină/vulvovaginită pustuloasă infecțioasă, efectuat într-o perioadă de 12 luni înainte de colectarea materialului seminal pentru export; sau

3. sunt seropozitivi, fiind vaccinați conform Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001 și având un rezultat negativ la un test de seroneutralizare sau la un test Elisa, efectuat înainte de vaccinare în centrul de colectare a materialului seminal aprobat;

¹⁾ Se anulează, după caz.

(iii) a fost prelucrat, depozitat și transportat conform Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

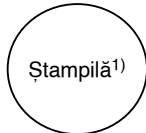
(iv) a fost obținut de la tauri donatori care au fost supuși de două ori, la interval de cel mult 12 luni, înainte și după colectare, la următoarele teste, cu rezultate negative, într-un laborator autorizat (testarea după colectare trebuie să fie efectuată pe o probă de sânge prelevată

cu nu mai puțin de 21 de zile după colectarea materialului seminal pentru export):

1. un test Elisa competitiv pentru febra catarală, conform anexei nr. 5 la prezenta normă sanitară veterinară;

2. un test de imunodifuzie în gel de agar conform anexei nr. 5 la prezenta normă sanitară veterinară și un test de neutralizare pentru toate serotipurile virusului bolii hemoragice epizootice cunoscute ca existând în țara exportatoare.

Întocmit la la
(locul) (data)



Semnătura¹⁾
Numele și prenumele (cu majuscule)
Titlul oficial

¹⁾ Semnătura și ștampila trebuie să fie de o culoare diferită de cea a tipăriturii.

ANEXA Nr. 3
la norma sanitară veterinară

**CERTIFICAT DE SĂNĂTATE A ANIMALELOR
pentru importul de material seminal provenit de la bovine**

1. Expeditor (numele și adresa completă)	Numărul certificatului	
	2. Țara terță a colectării	
3. Destinatar (numele și adresa completă)	4. Autoritatea sanitară veterinară competentă	
	5. Autoritatea sanitară veterinară competentă locală	
6. Locul încărcării	7. Numele și adresa centrului de colectare a materialului seminal	
8. Mijlocul de transport	11. Numărul de autorizare a centrului de colectare a materialului seminal	
9. Locul și statul membru de destinație		
10. Numărul sigiliului containerelor cu material seminal		
12. Identificarea materialului seminal proaspăt sau congelat ^{*)}		
a) Numărul de doze	b) Data (datele) colectării	c) Rasa
d) Identificarea animalului donator		

^{*)} A se anula, după caz

13. Subsemnatul, medic veterinar oficial, am citit și îmi sunt cunoscute prevederile Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001, publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 111 din 11 februarie 2002, și certific că:

a)
(denumirea țării exportatoare)

a fost indemnă de pestă bovină și febră aftoasă într-o perioadă de 12 luni imediat înainte de colectarea materialului seminal pentru export și până la data de expediere a sa și în cursul aceleiași perioade nu s-a efectuat nici o vaccinare împotriva acestor boli;

b) centrul de colectare a materialului seminal în care a fost colectat materialul seminal ce urmează să fie exportat a fost:

(i) autorizat conform Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(ii) condus și supravegheat conform Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(iii) indemn de rabie, tuberculoză, bruceloză, antrax și pleuropneumonia contagioasă bovină o perioadă de 30 de zile înainte de data de colectare a materialului seminal ce trebuie exportat și de 30 de zile după colectare (în cazul materialului seminal proaspăt până în ziua expedierii);

c) bovinele care se găsesc la centrul de colectare a materialului seminal:

(i) provin din efective și/sau au fost făcute de mame care îndeplinesc condițiile prevăzute în Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(ii) au fost supuse, înainte de a intra în izolare, testelor prevăzute în Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(iii) au respectat cerințele de izolare înainte de intrare și pe cele de testare prevăzute în Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(iv) au fost ținute pentru cel puțin un an, au fost supuse testelor de rutină, conform Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001 și cap. II din anexa B la Directiva 88/407/CEE;

d) materialul seminal ce trebuie exportat:

(i) a fost obținut de la donatori care au fost ținuti în

.....
(denumirea țării exportatoare)

o perioadă de 6 luni imediat înainte de colectarea materialului seminal pentru export și care îndeplinesc condițiile prevăzute în Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(ii) a fost obținut de la donatori care:

1. se găsesc într-un centru de colectare a materialului seminal în care toate bovinele, în cursul a 12 luni înainte de colectarea materialului seminal pentru export, au fost supuse, cu rezultate negative, unui test de seroneutralizare sau unui test Elisa pentru rinotraheita infecțioasă bovină/vulvovaginita pustuloasă infecțioasă¹⁾; sau

2. au reacționat negativ la un test de seroneutralizare sau la un test Elisa pentru rinotraheita infecțioasă bovină/vulvovaginita pustuloasă infecțioasă, efectuat într-o perioadă de 12 luni înainte de colectarea materialului seminal pentru export; sau

3. sunt seropozitivi, fiind vaccinați conform Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001, având un rezultat negativ la un test de seroneutralizare sau la un test Elisa, efectuat înainte de vaccinare, în centrul de colectare a materialului seminal aprobat;

(iii) a fost prelucrat, depozitat și transportat conform Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(iv) a fost obținut de la tauri donatori care, fie:

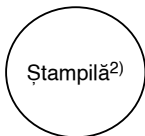
1. se găseau în centrul autorizat de colectare a materialului seminal la data de 1 iulie 1994; fie

2. au fost introduși în centrul autorizat după data de 1 iulie 1994, fiind supuși, cu rezultate negative, următoarelor teste pentru febra catarală și boala hemoragică epizootică, într-un laborator autorizat, înainte de a intra în centru și în orice caz au fost supuși semestrial, cu rezultate negative, următoarelor teste, într-un laborator autorizat:

– test Elisa competitiv pentru febra catarală conform aneinei nr. 5 la prezenta normă sanitară veterinară;

– test de imunodifuzie în gel de agar, conform anexei nr. 5 la prezenta normă sanitară veterinară și test de neutralizare pentru toate serotipurile virusului bolii hemoragice epizootice găsite în țara exportatoare.

Întocmit la la
(locul) (data)



Semnătura²⁾
Numele și prenumele (cu majuscule)
Titlul oficial

¹⁾ Se anulează, după caz.

²⁾ Semnătura și ștampila trebuie să fie de o culoare diferită de cea a tipăriturii.

ANEXA Nr. 4

la norma sanitară veterinară

**CERTIFICAT DE SĂNĂTATE A ANIMALELOR
pentru importul de material seminal provenit de la bovine**

1. Expeditor (numele și adresa completă)	Numărul certificatului
	2. Țara terță a colectării
3. Destinatar (numele și adresa completă)	4. Autoritatea sanitară veterinară competentă
	5. Autoritatea sanitară veterinară competentă locală
6. Locul încărcării	7. Numele și adresa centrului de colectare a materialului seminal
8. Mijlocul de transport	11. Numărul de autorizare a centrului de colectare a materialului seminal
9. Locul și statul membru de destinație	
10. Numărul sigiliului containerelor cu material seminal	
12. Identificarea materialului seminal proaspăt sau congelat ^{*)}	
a) Numărul de doze	b) Data (datele) colectării
d) Identificarea animalului donator	c) Rasa

^{*)} A se anula, după caz.

13. Subsemnatul,, medic veterinar oficial, am citit și îmi sunt cunoscute prevederile Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001 și certific că:

a)
(denumirea țării exportatoare)

a fost indemnă de pestă bovină și febră aftoasă într-o perioadă de 12 luni imediat înainte de colectarea materialului seminal pentru export și până la data de expediere a sa și în cursul aceleiași perioade nu s-a efectuat nici o vaccinare împotriva acestor boli;

b) centrul de colectare a materialului seminal în care a fost colectat materialul seminal ce urmează să fie exportat a fost:

(i) autorizat conform prevederilor Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(ii) condus și supravegheat conform prevederilor Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(iii) indemn de rabie, tuberculoză, bruceloză, antrax și pleuropneumonia contagioasă bovină o perioadă de 30 de zile înainte de data colectării materialului seminal ce trebuie exportat și de 30 de zile după colectare (în cazul materialului seminal proaspăt până în ziua expedierii);

c) bovinele care se găsesc la centrul de colectare a materialului seminal:

(i) provin din efective și/sau au fost făcute de mame care îndeplinesc condițiile prevăzute în Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

- (ii) au fost supuse, înainte de a intra în izolare, testelor prevăzute în Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;
- (iii) au respectat cerințele de izolare înainte de intrare și pe cele de testare, prevăzute în Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;
- (iv) au fost ținute cel puțin un an și au fost supuse testelor de rutină, conform Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;
- d) materialul seminal ce trebuie exportat:
- (i) a fost obținut de la donatori care au fost ținuti în

(denumirea țării exportatoare)

o perioadă de 6 luni imediat înainte de colectarea materialului seminal pentru export și care îndeplinesc condițiile prevăzute în Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

- (ii) a fost obținut de la donatori care:

1. se găsesc într-un centru de colectare a materialului seminal în care toate bovinele, în cursul a 12 luni înainte de colectarea materialului seminal pentru export, au fost supuse, cu rezultate negative, unui test de seroneutralizare sau unui test Elisa pentru rinotraheita infecțioasă bovină/vulvovaginita pustuloasă infecțioasă¹⁾; sau

2. au reacționat negativ la un test de seroneutralizare sau la un test Elisa pentru rinotraheita infecțioasă bovină/vulvovaginita pustuloasă infecțioasă, efectuat pe perioada a 12 luni înainte de colectarea materialului seminal pentru export; sau

3. sunt seropozitivi, fiind vaccinați, conform Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001, având rezultat negativ la un test de seroneutralizare sau la un test Elisa, efectuat în centrul aprobat de colectare a materialului seminal înainte de vaccinare;

- (iii) a fost prelucrat, depozitat și transportat conform Ordinului ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 353/2001;

(iv) a fost obținut de la tauri donatori care au fost supuși de două ori, la interval de cel mult 12 luni, înainte și după colectare, la următoarele teste, cu rezultate negative, într-un laborator autorizat (testul în urma colectării trebuie să fie efectuat pe o probă de sânge prelevată cu nu mai puțin de 21 de zile după colectarea materialului seminal pentru export):

1. un test Elisa competitiv pentru febra catarală, conform anexei nr. 5 la prezenta normă sanitară veterinară;

2. un test de imunodifuzie în gel de agar, conform anexei nr. 5 la prezenta normă sanitară veterinară și un test de neutralizare pentru toate serotipurile virusului bolii hemoragice epizootice cunoscute ca existând în țara exportatoare.

3. un test seroneutralizare pentru virusul Akabane.

Întocmit la la

(locul)

(data)

Stampilă²⁾

Semnătura²⁾
Numele și prenumele (cu majuscule)
Titlul oficial

¹⁾ Se anulează, după caz.

²⁾ Semnătura și ștampila trebuie să fie de o culoare diferită de cea a tipăriturii.

ANEXA Nr. 5
la norma sanitară veterinară

PROTOCOL

pentru un test Elisa competitiv „test de imunoabsorbție cu legătură enzimatică“, test utilizând anticorpi monoclonali specifici de grup pentru detectarea anticorpilor virusului febrei catarale

Test competitiv Elisa pentru febra catarală, utilizând anticorpul monoclonal 3-17-A3

Testul este capabil să detecteze anticorpi față de toate serotipurile cunoscute ale virusului febrei catarale „VFC“.

Principiul testului este întreruperea reacției dintre antigenul VFC și un anticorp monoclonal specific de grup „3-17-A3“ prin adăugarea de diluții ale serului de testat. Anticorpii VFC prezenți în serul de testat blochează reactivitatea anticorpului monoclonal „AcM“ și rezultă o atenuare a schimbării așteptate a culorii în momentul adăugării substratului enzimatic.

Materiale și reagenți

1. Plăci de microtitrare cu fund plat

2. Antigen: preparat în modul descris mai jos

3. Tampon de blocare: lapte praf deshidratat „Marvel“ 5% „w/v“, Tween-20 0,1% „v/v“ „furnizat ca soluție de polioxietilenă sorbiton monolaurat“ în soluție salină tamponată — fosfat „PBS“

4. Anticorp monoclonal 3-17-A3 „furnizat ca supernatant de cultură tisulară hibridomă“ depozitat la temperatura de -20°C

sau liofilizat, diluat 1/50, cu tampon de blocare înainte de utilizare, dirijat contra polipeptidei p7 specifică de grup

5. Conjugat: globulină de iepure antișoarece „absorbită și eluată“, conjugată cu peroxidază de hrean și păstrată la întuneric la temperatura de 4°C

6. Substrat și cromogen: 0,2 g de ortofenilen-diamină „OFD“ dizolvată într-un tampon constând în 2,553 g acid citric și 4,574 g di-sodiu hidrogenortofosfat adus la 500 ml cu apă distilată, împărțită în cote-părți de 25 ml și păstrată la întuneric la temperatura de -20°C, cu 12 μl/25 ml de peroxid de hidrogen „30% w/v“ adăugat imediat înainte de utilizare

A se manipula OFD cu precauții — a se purta mănuși din cauciuc — suspect de a fi mutagen

7. Acid sulfuric 1 M: 26,6 ml de acid adăugat la 474,4 ml apă distilată

Atenție — Întotdeauna se adaugă acid în apă, niciodată apă în acid

8. Agitator orbital

9. Cititor de plăci Elisa — testul poate fi citit vizual

Protocol de testare

	H	G	F	E	D	C	B	A	
Martor			Antigen + conjugat						1
Controlul AcM									2
Controlul pozitivelor			Antigen + AcM + conjugat						3
	Antigen + ser pozitiv + AcM + conjugat								
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
	Seruri de testat								
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	4
									5
									6
Seruri de testat									7
									8
									9
									10
									11
									12

Protocol de testare**Controlul martorului**

Rândul 1A—H reprezintă un control al martorului constând în antigen VFC și conjugat. Acesta poate fi utilizat pentru a etalona cititorul Elisa.

Controlul AcM

Rândul 2A—H reprezintă controlul anticorpului monoclonal și constă în antigen VFC, anticorp monoclonal și conjugat. Acesta reprezintă un control negativ. Media citirilor densităților optice pentru acest rând de control reprezintă valoarea de inhibiție 0%.

Controlul pozitiv

Rândul 3A—H reprezintă controlul pozitiv. Acesta constă în antigen VFC, diluții ale antiserului pozitiv VFC, AcM și conjugat. Acesta este inclus ca un indicator al faptului că testul funcționează corespunzător și că de la test la test trebuie să fie obținute niveluri similare de inhibiție.

Seruri de testat

În schema de testare prezentată mai sus pot fi testate 18 seruri la o rată a diluției de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16. Aceasta va da unele indicații asupra titrului de anticorpi în serul de testat. Această gamă de diluții poate fi extinsă ulterior pentru a se obține titruri finale ale diluției serului. În mod alternativ, pentru studiile serologice la scară mare, serurile pot fi testate la o diluție unică de 1/4 sau la două diluții de 1/2 și 1/4 ca un test de control rapid.

Procedura

1. Se diluează antigenul VFC cu concentrație pretritată în PBS, se agită pentru scurt timp folosindu-se baia de ultrasunete pentru a dispersa virusul agregat, iar „dacă baia de ultrasunete nu este disponibilă, se pipetează viguros” și se adaugă 50 μl în toate godeurile plăcii Elisa. Se lovesc ușor marginile plăcii pentru a dispersa antigenul.

2. Se incubează la temperatura de 37°C timp de 60 de minute într-un agitator orbital. Se spală plăcile de trei ori prin umplerea și golirea godeurilor cu PBS nesteril și se usucă cu hârtie absorbantă.

3. Se adaugă 50 μl de tampon de blocare pentru fiecare godeu. Se adaugă serurile de testat și serul pozitiv în godeurile corespunzătoare și se diluează pe suprafața plăcii utilizându-se o pipetă cu canale multiple. Nu se adaugă ser în cazul controlului cu blanc sau controlului AcM.

4. Imediat după adăugarea serurilor de testat se diluează AcM în tamponul de blocare „cu diluție pretritată” și se adaugă 50 ml în toate godeurile plăcii, cu excepția controlului cu blanc.

5. Se incubează la temperatura de 37°C timp de 60 de minute într-un agitator orbital. Se spală de trei ori cu PBS și se usucă.

6. Se diluează concentratul de globuline de iepure anti-șoarece la 1/5000 în tampon de blocare și se adaugă 50 μl în toate godeurile plăcii.

7. Se incubează la temperatura de 37°C timp de 60 de minute într-un agitator orbital. Se spală de trei ori cu PBS și se usucă.

8. Se dezgheață OPD și imediat înainte de utilizare se adaugă 12 μl din peroxid de hidrogen 30% la fiecare 25 ml de OPD. Se adaugă 50 μl în toate godeurile plăcii. Se așteaptă aproximativ 10 minute pentru a se modifica culoarea și se oprește reacția cu acid sulfuric 1M „50 μl/godeu”. Culoarea trebuie să se modifice în godeurile de control al AcM și în acele godeuri care conțin seruri fără nici un anticorp VFC.

9. Se examinează și se înregistrează plăcile fie vizual, fie utilizându-se un cititor spectrofotometric.

Analiza rezultatelor

Se calculează media citirilor densităților optice „DO” plecându-se de la controalele AcM. Aceasta reprezintă valoarea de inhibiție 0%. Citirile densității optice ale serurilor de testat sunt exprimate ca valori procentuale de inhibiție, utilizându-se următoarea formulă:

$$\text{Valoarea procentuală de inhibiție} = 100 - \frac{\text{DO în prezența serului de testat}}{\text{DO în absența serului de testat}} \times 100$$

Valorile de inhibiție mai mari de 40% la o diluție a serului de 1/4 sunt considerate pozitive. Citirea vizuală este posibilă dacă o inhibiție de 40% este cea mai mică valoare ușor vizibilă cu ochiul liber.

Prepararea antigenului VFC pentru tehnica Elisa

1. Se spală de 3 ori 10 plăci de celule confluențe BHK-21 cu mediul Eagle's fără ser și se infectează cu serotipul 1 al virusului febrei catarale într-un mediu Eagle's fără ser.

2. Se incubează la temperatura de 37°C și se examinează zilnic pentru efectul citopatic „ecp”.

3. Atunci când ecp este evident pe 80—90% din stratul de celule al fiecărei plăci, se recuperează virusul prin agitarea celulelor aderente de sticlă.

4. Se centrifughează la 2.000—3.000 rot./min. pentru a precipita celulele.

5. Se înlătură supernatantul și se resuspendă celulele în aproximativ 30 ml de PBS conținând 1% „Sarkosyl” și 2 ml de fluorură de fenilmetilsulfonil „tampon de liză”.

Aceasta poate determina celulele să formeze un gel și se pot adăuga mai multe tamponuri de liză pentru a reduce acest efect.

NOTĂ:

Fluorura de fenilmetilsulfonil este dăunătoare — a se manipula cu prudență extremă!

6. Se fragmentează celulele timp de 60 de secunde, folosindu-se o sondă ultrasonică la o amplitudine de 30 de microni.

7. Se centrifughează la 10.000 rot./min. timp de 10 minute.

8. Se depozitează supernatantul la temperatura de +4°C și se resuspendă celulele precipitate rămase în 10—20 ml de tampon de liză.

9. Se agită cu ajutorul unui aparat cu ultrasunete și se clarifică, depozitând supernatantul în fiecare etapă, în total de 3 ori.

10. Se reunesc supernatanții și se centrifughează la 24.000 rot./min. timp de 120 de minute la temperatura de 4°C pe un tampon de 5 ml de sucroză 40% „w/v în PBS”, folosindu-se tuburi de centrifugare Beckmann de 30 ml și un rotor SW 28.

11. Se înlătură supernatantul, se drenează tuburile în întregime și se resuspendă granula de reziduu celular în PBS prin supunerea la ultrasunete. Se depozitează antigenul în cotești la -70°C.

Titarea antigenului VFC pentru tehnica Elisa

Antigenul febrei catarale este titrat prin tehnica Elisa indirectă. Diluții în bază doi de antigen sunt titrate față de o diluție constantă „1/50” de anticorpi monoclonali 3-17-A3. Protocolul este după cum urmează:

Procedura

1. Se diluează antigen VFC în PBS de-a lungul plăcii de microtitrare în serii de diluții, în bază doi „50 μl/godeu”, utilizându-se o pipetă cu canale multiple.

2. Se incubează timp de o oră la temperatura de 37°C într-un agitator orbital.

3. Se spală plăcile de trei ori cu PBS.

4. Se adaugă 50 μl din anticorpul monoclonal 3—17—A3 „diluat 1/50” în fiecare godeu al plăcii de microtitrare.

5. Se incubează timp de o oră la temperatura de 37°C într-un agitator orbital.

6. Se spală plăcile de trei ori cu PBS.

7. Se adaugă în fiecare godeu al plăcii de microtitrare 50 μl de globulină de iepure antișoarece conjugată la peroxidază de hrean, diluată până la o concentrație optimă pretrată.

8. Se incubează o oră la temperatura de 37°C într-un agitator orbital.

9. Se adaugă substrat și cromogen după cum s-a descris anterior. Se oprește reacția după 10 minute, prin adăugarea de acid sulfuric 1 M „50 μl/godeu”.

În testul concurrent anticorpul monoclonal trebuie să fie în exces, de aceea se alege o diluție de antigen care cade pe curba de titrare „nu pe zona platou”, care dă aproximativ 0,8 DO după 10 minute.

Protocolul pentru testul de imunodifuzie pe gel de agar pentru detectarea anticorpilor bolii hemoragice epizootice

Testul de imunodifuzie pe gel de agar este efectuat în concordanță cu următorul protocol:

Materiale și reactivi**1. Antigen**

Antigenul care precipită este preparat în orice sistem de cultură celulară care susține multiplicarea rapidă a serotipului „serotipurilor” virale corespunzătoare ale virusului bolii hemoragice epizootice. Sunt recomandate celulele BKH sau celulele Vero. Antigenul este prezent în fluidul supernatant la finalul creșterii virusului, dar pentru a fi eficient necesită o concentrare de la 50 până la 100 de ori. Aceasta poate fi realizată prin orice procedură standard de concentrare a proteinelor; virusul antigenului poate fi inactivat prin adăugarea de beta-propiolactonă 0,3% „v/v”.

2. Serul de control pozitiv cunoscut

Utilizându-se serul internațional de referință și antigenul, este produs un ser standard național, standardizat pentru porția optimă față de serul internațional de referință, liofilizat și utilizat ca ser de control cunoscut în fiecare test.

3. Serul de testat**Procedură**

1. Agaroză 1% preparată în tampon de borat sau de barbitol de sodiu, pH de la 8,5 la 9,0, este turnată într-o placă Petri de o adâncime minimă de 3,0 mm.

2. Un șablon de testat din 7 godeuri lipsite de umiditate, fiecare cu un diametru de 5,0 mm, este tăiat în agar. Șablonul constă într-un godeu central și 6 godeuri aranjate în jurul lui într-un cerc cu o rază de 3 mm.

1	
6	2
X	
5	3
4	

3. Godeul central este umplut cu antigenul standard. Godeurile periferice 2, 4 și 6 sunt umplute cu ser pozitiv cunoscut, iar godeurile 1, 3 și 5 sunt umplute cu seruri de testat.

4. Sistemul este incubat o perioadă de până la 72 de ore la temperatura camerei, într-o cameră umedă închisă.

Interpretare

Un ser de testat este pozitiv dacă formează o linie de precipitare specifică cu antigenul și formează o linie completă de identitate cu serul de control. Un ser de testat este negativ dacă nu formează o linie specifică cu antigenul și nu deviază curba serului de control. Plăcile Petri trebuie să fie examinate pe fond întunecat și utilizându-se iluminare indirectă.

EDITOR: PARLAMENTUL ROMÂNIEI — CAMERA DEPUTAȚILOR

Regia Autonomă „Monitorul Oficial”, str. Izvor nr. 2—4, Palatul Parlamentului, sectorul 5, București, cont nr. 2511.1—12.1/ROL Banca Comercială Română — S.A. — Sucursala „Unirea” București și nr. 5069427282 Trezoreria sector 5, București (alocat numai persoanelor juridice bugetare).

Adresa pentru publicitate: Centrul pentru relații cu publicul, București, șos. Panduri nr. 1, bloc P33, parter, sectorul 5, tel. 411.58.33 și 411.97.54, tel./fax 410.77.36.

Tiparul: Regia Autonomă „Monitorul Oficial”, tel. 490.65.52, 335.01.11/2178 și 402.21.78, E-mail: ramomrk@bx.logicnet.ro, Internet: www.monitoruloficial.ro