**Tento dokument je třeba brát jako dokumentační nástroj a instituce nenesou jakoukoli odpovědnost za jeho obsah**

►**B**

# SMĚRNICE RADY

## ze dne 26. června 1990

## o veterinárních předpisech pro přesun koňovitých a jejich dovoz ze třetích zemí

(90/426/EHS)

(Úř. věst. L 224, 18.8.1990, s. 42)

Ve znění:

| | | Úřední věstník | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Č. | Strana | Datum |
| ►**M1** | Směrnice Rady 90/425/EHS, ze dne 26. června 1990 | L 224 | 29 | 18.8.1990 |
| ►**M2** | Směrnice Rady 91/496/EHS, ze dne 15. července 1991 | L 268 | 56 | 24.9.1991 |
| ►**M3** | RozhodnutÍ Komise ze dne 13. února 1992 | L 47 | 26 | 22.2.1992 |
| ►**M4** | Směrnice Rady 92/36/EHS ze dne 29. dubna 1992 | L 157 | 28 | 10.6.1992 |
| ►**M5** | Rozhodnutí Komise 2001/298/ES, ze dne 30. března 2001 | L 102 | 63 | 12.4.2001 |
| ►**M6** | Rozhodnutí Komise 2002/160/ES, ze dne 21. února 2002 | L 53 | 37 | 23.2.2002 |
| ►**M7** | Nařízení Rady (ES) č. 806/2003 ze dne 14. dubna 2003 | L 122 | 1 | 16.5.2003 |
| ►**M8** | Směrnice Rady 2004/68/ES ze dne 26. dubna 2004 | L 139 | 320 | 30.4.2004 |
| ►**M9** | Směrnice Rady 2006/104/ES ze dne 20. listopadu 2006 | L 363 | 352 | 20.12.2006 |

Ve znění:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ►**A1** | Akt o přistoupení Rakouska, Švédska a Finska | C 241 | 21 | 29.8.1994 |
| ►**A2** | Akt o podmínkách přistoupení České republiky, Estonské republiky, Kyperské republiky, Lotyšské republiky, Litevské republiky, Maďarské republiky, Republiky Malta, Polské republiky, Republiky Slovinsko a Slovenské republiky a o úpravách smluv, na nichž je založena Evropská unie | L 236 | 33 | 23.9.2003 |

▼B

# SMĚRNICE RADY

**ze dne 26. června 1990**

**o veterinárních předpisech pro přesun koňovitých a jejich dovoz ze třetích zemí**

(90/426/EHS)

RADA EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství, a zejména na článek 43 této smlouvy,

s ohledem na návrh Komise ([1]),

s ohledem na stanovisko Evropského parlamentu ([2]),

s ohledem na stanovisko Hospodářského a sociálního výboru ([3]),

vzhledem k tomu, že koňovití jsou jakožto živá zvířata zahrnuti v seznamu produktů v příloze II Smlouvy;

vzhledem k tomu, že pro zajištění racionálního rozvoje produkce koňovitých a tím zvýšení produktivity v této oblasti musejí být na úrovni Společenství stanoveny zásady, kterými se bude řídit přesun koňovitých mezi členskými státy;

vzhledem k tomu, že chov a plemenitba koňovitých, a zejména koní, jsou obvykle zahrnuty v zemědělském sektoru; že pro část zemědělské populace představují zdroj příjmu;

vzhledem k tomu, že k podpoře obchodu s koňovitými uvnitř Společenství by měly být odstraněny rozdíly týkající se veterinárních podmínek v členských státech;

vzhledem k tomu, že by pro zajištění harmonického rozvoje obchodu uvnitř Společenství měl být stanoven režim Společenství, kterým by se řídil dovoz ze třetích zemí;

vzhledem k tomu, že by také měly být stanoveny podmínky pro přesun koňovitých, kteří mají identifikační doklad, po vnitrostátním území;

vzhledem k tomu, že koňovití, mají-li být předmětem obchodu, musejí splňovat určité veterinární požadavky, aby se tak zabránilo šíření nákaz; že se jako zvláště vhodné jeví stanovit možnou regionalizaci omezujících opatření;

vzhledem k tomu, že ze stejného důvodu by měly být stanoveny přepravní podmínky;

vzhledem k tomu, že k zajištění splnění takových požadavků musí být vytvořeno ustanovení o vydávání veterinárního osvědčení, které doprovází koňovité na místo jejich určení, úředním veterinárním lékařem;

vzhledem k tomu, že organizace kontrol a opatření následující po kontrolách, které má provádět členský stát určení a ochranná opatření, která mají být zavedena, by měly být stanoveny v rámci předpisů stanovených pro veterinární kontroly při obchodu se živými zvířaty uvnitř Společenství z hlediska perspektivy uskutečňování vnitřního trhu;

vzhledem k tomu, že by měla být vytvořena ustanovení, která by Komisi umožnila provádění kontrol; že by tyto kontroly měly být prováděny ve spolupráci s příslušnými vnitrostátními orgány;

([1]) Úř. věst. C 327, 30.12.1989, s. 61.
([2]) Úř. věst. C 149, 18.6.1990.
([3]) Úř. věst. C 62, 12.3.1990, s. 46.

▼B

vzhledem k tomu, že vytvoření ustanovení Společenství použitelných pro dovozy ze třetích zemí vyžaduje sestavení seznamu třetích zemí nebo částí třetích zemí, ze kterých se mohou koňovití dovážet;

vzhledem k tomu, že výběr těchto zemí musí být založen na obvyklých kritériích jako je zdravotní stav hospodářských zvířat, organizace a pravomoci veterinárních služeb a platné veterinární předpisy;

vzhledem k tomu, že by navíc neměly být povoleny dovozy koňovitých ze zemí infikovaných nákazami nebo infekčními chorobami zvířat, které představují nebezpečí pro hospodářská zvířata ve Společenství, nebo ze zemí prostých takovéto infekce po příliš krátkou dobu; že takovéto úvahy platí také pro dovoz ze třetích zemí, ve kterých se provádí očkování proti těmto chorobám;

vzhledem k tomu, že obecné podmínky pro dovoz ze třetích zemí musejí být doplněny zvláštními podmínkami stanovenými na základě nákazové situace v každé z nich; že odborná povaha a rozdílnost kritérií, na kterých tyto zvláštní podmínky závisejí, vyžadují pro své vymezení oporu v pružném a rychlém postupu Společenství, při kterém Komise a členské státy těsně spolupracují;

vzhledem k tomu, že předložení běžného standardního formuláře osvědčení při dovozu koňovitých představuje účinný prostředek ověření používání pravidel Společenství; že taková pravidla mohou zahrnovat zvláštní ustanovení, která se mohou lišit podle dotyčné třetí země, což je nutno brát v úvahu při vytváření standardních formulářů osvědčení;

vzhledem k tomu, že by úřední veterinární lékaři Společenství měli odpovídat za ověřování dodržování požadavků této směrnice, a to zejména ve třetích zemích;

vzhledem k tomu, že kontroly prováděné při dovozu se musejí vztahovat na původ a zdravotní stav koňovitých;

vzhledem k tomu, že členským státům musí být při vstupu koňovitých na území Společenství a během jejich průvozu na místo určení umožněno provést všechna opatření, včetně porážky a likvidace, požadovaných za účelem ochrany zdraví lidí a zvířat;

vzhledem k tomu, že obecná pravidla pro kontroly, které se mají provádět při dovozu, musejí být určena v celkovém rámci;

vzhledem k tomu, že každý členský stát musí mít právo uvalit okamžitý zákaz na dovozy ze třetí země, pokud mohou být takové dovozy nebezpečné pro zdraví zvířat; že v takovém případě musí být neprodleně zajištěna koordinace postupů členských států vůči takové třetí zemi, a to bez dotčení možných změn v seznamu zemí schválených pro vývoz do Společenství;

vzhledem k tomu, že by ustanovení této směrnice měla být přezkoumána v rámci dotváření vnitřního trhu;

vzhledem k tomu, že by měl vzniknout postup, který zajistí těsnou a účinnou spolupráci mezi Komisí a členským státem prostřednictvím Stálého veterinárního výboru,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

## ODDÍL I

### Obecná ustanovení

*Článek 1*

Tato směrnice stanoví veterinární předpisy pro přesun živých koňovitých mezi členskými státy a pro jejich dovoz ze třetích zemí.

▼B

*Článek 2*

Pro účely této směrnice se rozumí:

a) „hospodářstvím“ zemědělské nebo výcvikové zařízení, stáj nebo obecně jakékoliv budovy nebo zařízení, ve kterých se koňovití obvykle drží nebo chovají pro jakékoliv účely;

b) „koňovitými“ volně žijící nebo domácí zvířata druhů kůň (včetně zeber) nebo osel nebo potomci křížení takových druhů;

c) „evidovanými koňovitými“ koňovití evidovaní podle směrnice 90/427/EHS ([1]) a identifikovaní pomocí identifikačního dokladu vydaného chovatelským orgánem nebo jiným příslušným orgánem země původu zvířete, která vede plemennou knihu nebo evidenci pro takové plemeno zvířat nebo některou mezinárodní asociací nebo organizací, která se zabývá závodními nebo dostihovými koňmi;

d) „jatečnými koňovitými“ koňovití určení k porážce na jatkách, a to buď přímo po přepravě nebo po tranzitu přes trh nebo schválené středisko svodu zvířat;

e) „plemennými a užitkovými koňovitými,“ jiní koňovití než kteří jsou uvedení v písmenu c) a d);

f) „členským státem nebo třetí zemí prostou moru koní“ členský stát nebo třetí země, kde nebyl zjištěn žádný klinický, sérologický (u neočkovaných koňovitých) nebo epizootologický důkaz moru koní na dotyčném území v posledních dvou letech a kde nebylo provedeno očkování proti této chorobě během posledních 12 měsíců;

g) „chorobami povinnými hlášením“ choroby uvedené v příloze A;

h) „úředním veterinárním lékařem“ veterinární lékař určený příslušným ústředním orgánem členského státu nebo třetí země;

i) „dočasným vstupem“ statut evidovaného zvířete pocházejícího ze třetí země, kterému byl povolen vstup na území Společenství na dobu kratší než 90 dnů, která bude stanovena Komisí postupem podle článku 24 v závislosti na nákazové situaci v zemi původu.

ODDÍL II

**Pravidla pro přesun koňovitých**

*Článek 3*

Členské státy povolí pohyb evidovaných koňovitých na jejich území nebo odešlou koňovité do jiného členského státu pouze v případě, že splňují podmínky stanovené v článcích 4 a 5.

Příslušné orgány členských států určení však mohou udělit všeobecnou nebo omezenou výjimku pro přesun koňovitých, kteří:

— jsou využíváni k jízdě nebo k vodění pro sportovní nebo rekreační účely, a to na cestách nacházejících se v blízkosti vnitřních hranic Společenství,

— se zúčastňují kulturních nebo podobných událostí nebo činností organizovaných oprávněnými místními institucemi nacházejícími se v blízkosti vnitřních hranic Společenství,

— jsou určeni výhradně pro dočasnou pastvu nebo práci v blízkosti vnitřních hranic Společenství.

Členské státy, které takové možnosti využijí, sdělí Komisi rozsah přiznaných odchylek.

([1]) Úř. věst. L 224, 18.8.1990, s. 55.

▼B

*Článek 4*

1. Koňovití nesmějí při prohlídce vykazovat žádný klinický příznak choroby. Prohlídka musí být provedena během 48 hodin před jejich naložením nebo naloděním. V případě evidovaných koňovitých je však tato prohlídka, aniž je dotčen článek 6, vyžadována pouze pro obchod uvnitř Společenství.

2. Aniž jsou dotčeny požadavky odstavce 5, jež se týkají chorob povinných hlášením, musí být úřední veterinární lékař v době prohlídky přesvědčen o tom, že neexistují žádné důvody — zejména na základě prohlášení majitele nebo chovatele — pro učinění závěru, že koňovití byli v kontaktu s koňovitými postiženými infekční nebo nakažlivou chorobou během 15 dnů bezprostředně předcházejících prohlídce.

3. Koňovití nesmějí být určeni k porážce v rámci vnitrostátního programu eradikace nákazy nebo infekční choroby.

4. Koňovití musejí být identifikováni následujícím způsobem:

i) evidovaní koně pomocí identifikačního dokladu podle směrnice 90/427/EHS ([1]), který musí potvrzovat zejména soulad s odstavci 5 a 6 a s článkem 5. Úřední veterinární lékař pozastaví platnost tohoto dokladu po dobu zákazů podle odstavce 5 nebo článku 5. Po porážce evidovaného koně je tento doklad vrácen orgánu, který jej vydal. Prováděcí pravidla k tomuto písmenu stanoví Komise postupem podle článku 24;

ii) plemenní a užitkoví koňovití identifikační metodou, kterou stanoví Komise postupem podle článku 24.

Do doby, než bude tato metoda zavedena, zůstávají použitelné úředně schválené vnitrostátní identifikační metody za předpokladu, že jsou oznámeny Komisi a ostatním členským státům do tří měsíců od data přijetí této směrnice.

5. Kromě požadavků stanovených v článku 5 nesmějí koňovití pocházet z hospodářství, které podléhá některému z následujících zákazů:

a) pokud nebyla všechna zvířata druhů vnímavých k nákaze, která jsou umístěná v hospodářství, poražena nebo utracena, musí doba zákazu, jež se týká hospodářství původu, trvat přinejmenším:

— šest měsíců počínaje datem posledního skutečného nebo možného kontaktu s nemocným zvířetem v případě, že se jedná o koňovité podezřelé z hřebčí nákazy. V případě hřebce však zákaz platí až do jeho kastrace,

— šest měsíců počínaje dnem odstranění koňovitých postižených danou nákazou v případě, že se jedná o vozhřivku nebo encefalomyelitidu koní,

— do dne, kdy po odstranění nakažených zvířat reagují zbývající zvířata negativně při dvou vyšetřeních testem podle Cogginse provedených v intervalu tří měsíců v případě, že se jedná o nakažlivou chudokrevnost koní,

— šest měsíců v případě, že se jedná o vezikulární stomatitidu,

— jeden měsíc od posledního zaznamenaného případu v případě, že se jedná o vzteklinu,

— 15 dnů od posledního zaznamenaného případu v případě, že se jedná o sněť slezinnou;

b) pokud nebyla všechna zvířata druhů vnímavých k nákaze, která jsou umístěná v hospodářství, poražena nebo utracena a prostory dezinfikovány, trvá zákaz 30 dnů počínaje dnem odstranění zvířat

([1]) Úř. věst. L 224, 18.8.1990, s. 55.

▼B

a provedení dezinfekce prostor; v případě sněti slezinné trvá zákaz 15 dnů.

Příslušné orgány mohou udělit výjimky z těchto zákazů hipodromům a závodištím, přičemž povahu každé přiznané odchylky sdělí Komisi.

6. Jestliže členský stát vypracuje nebo vypracoval dobrovolný nebo povinný program tlumení nákazy, ke které jsou koňovití vnímaví, může tento program předložit Komisi během 6 měsíců od oznámení této směrnice. Program poukáže zejména na:

— rozšíření choroby na jeho území,

— důvody pro vznik programu se zřetelem na význam nákazy, na náklady spojené s tímto programem a na přínosy tohoto programu,

— zeměpisnou oblast, ve které bude program zaveden,

— různé statusy, které se použijí na zařízení, standardy, kterých musí být dosaženo pro každý druh a vyšetřovací postupy, které budou použity,

— postupy pro kontrolu programu,

— důsledky, které nastanou, pokud hospodářství z jakéhokoliv důvodu ztratí svůj status,

— opatření, která budou provedena, pokud jsou výsledky testů provedených v souladu s ustanoveními programu pozitivní,

— nediskriminační povahu obchodu na území dotyčného členského státu s ohledem na obchod uvnitř Společenství.

Komise přezkoumá programy předložené členskými státy. Podle potřeby je postupem podle článku 24. Další obecné nebo zvláštní záruky, které mohou být vyžadovány při obchodu uvnitř Společenství, mohou být stanoveny stejným postupem. Takové záruky musejí být nanejvýš rovnocenné zárukám požadovaným členským státem na jeho vlastním území.

Programy předložené členskými státy mohou být pozměněny nebo postupem podle článku 25. Změny nebo dodatky k programům, které byly již schváleny, nebo k zárukám, které byly stanoveny v souladu s druhým pododstavcem, mohou být schváleny stejným postupem.

▼M4

*Článek 5*

1. Členský stát s výskytem moru koní může odesílat koňovité z té části svého území, která je považována za infikovanou ve smyslu odstavce 2 tohoto článku, pouze za podmínek stanovených v odstavci 3 tohoto článku.

2. a) Část území členského státu se považuje za infikovanou morem koní, jestliže:

— byl klinicky, sérologicky (u neočkovaných zvířat), případně epizootologicky prokázán výskyt moru koní v minulých dvou letech, nebo

— očkování proti moru koní byla provedena v posledních 12 měsících.

b) Část území považovaná za infikovanou morem koní musí zahrnovat alespoň:

— ochranné pásmo o poloměru alespoň 100 km kolem každého ohniska nákazy,

— pásmo dozoru přesahující o nejméně 50 km ochranné pásmo, v němž nebylo v posledních 12 měsících prováděno očkování.

▼M4

c) Pravidla, která upravují tlumící opatření vztahující se k územím a pásmům uvedeným pod písmeny a) a b), a odpovídající výjimky jsou blíže uvedeny ve směrnici 92/35/EHS ([1]).

d) Všichni očkovaní koňovití nalézající se v ochranném pásmu musí být evidováni a identifikováni v souladu s čl. 6 odst. 1 směrnice 92/35/EHS.

Identifikační doklad, případně veterinární osvědčení, musí obsahovat jasný odkaz na toto očkování.

3. Členský stát může odesílat z území uvedeného v odst 2 písm. b) pouze koňovité, kteří splňují tyto podmínky:

a) musí být odesíláni, s ohledem na vektorový hmyz, pouze během určitých ročních období stanovených postupem podle článku 25;

b) nesmějí v den inspekce uvedené v čl. 4 odst. 1 vykazovat žádné klinické příznaky moru koní;

c) — jestliže nebyli očkováni proti moru koní, musí podstoupit test reakce vazby komplementu na mor koní, popsaný v příloze D, s negativní reakcí, a to dvakrát s časovým odstupem 21 a 30 dnů, přičemž druhý test musí být proveden během deseti dnů před odesláním,

— jestliže byli očkováni, nemusí být očkováni během předcházejících dvou měsíců a musí podstoupit test reakce vazby komplementu popsaný v příloze D ve výše uvedených časových lhůtách, přičemž nesmí být zaznamenáno vyšší množství protilátek. Postupem podle článku 24 může Komise, podle stanoviska Vědeckého veterinárního výboru, uznat jiné kontrolní metody;

d) musí být drženi v karanténní stanici po dobu nejméně 40 dnů před odesláním;

e) během období v karanténě a během přepravy z karanténní stanice do místa odeslání musí být chráněni proti vektorovému hmyzu.

▼B

*Článek 6*

Členské státy, které uplatňují alternativní systém kontroly poskytující záruky rovnocenné těm, jež jsou uvedeny v čl. 4 odst. 5, pokud se týká přesunu koňovitých a evidovaných koňovitých na jejich území zejména prostřednictvím identifikačního dokladu, mohou na základě vzájemnosti udělit další výjimky z ustanovení čl. 4 odst. 1 druhé věty a čl. 8 odst. 1 druhé odrážky.

Členské státy o tom uvědomí Komisi.

*Článek 7*

1. Koňovití musejí být přepraveni z hospodářství původu na místo určení co možná nejrychleji, a to buď přímo, nebo přes schválený trh nebo středisko svodu zvířat ve smyslu čl. 3 odst. 6 směrnice 64/432/EHS, a to ve vozidlech nebo kontejnerech, které jsou řádně čištěny a dezinfikovány dezinfekčním prostředkem a v intervalech, které stanoví odesílající členský stát. Vozidla musejí být vybavena tak, aby z nich v průběhu přepravy nemohly vytékat nebo vypadávat exkrementy, podestýlka nebo krmivo koňovitých. Přeprava musí být prováděna tak, aby bylo účinně chráněno zdraví a dobré životní podmínky koňovitých.

2. Členský stát určení může přiznat všeobecnou nebo omezenou odchylku z některého z požadavků čl. 4 odst. 5 pro jakékoliv zvíře,

([1]) Úř. věst. L 157, 10.6.1992, s. 19.

▼B

které nese zvláštní označení vyjadřující, že je určeno k porážce, a to za předpokladu, že se veterinární osvědčení o takové odchylce zmiňuje.

V případě udělení takovéto výjimky musejí být jateční koňovití přepraveni přímo do určených jatek a musejí být poraženi během pěti dnů po příjezdu na jatky.

3. Úřední veterinární lékař musí zaznamenat v evidenci identifikační číslo nebo číslo identifikačního dokladu poraženého koňovitého zvířete a zaslat příslušnému orgánu místa odeslání na jeho žádost potvrzení o tom, že zvíře bylo poraženo.

*Článek 8*

1. Členské státy zajistí, aby:

— evidovaní koňovití, kteří opouštějí svá hospodářství, byli doprovázeni identifikačním dokladem stanoveným v čl. 4 odst. 4 spolu — pokud jsou určeni pro obchod uvnitř Společenství — s potvrzením uvedeným v příloze B,

— plemenní, užitkoví a jateční koňovití byli během přepravy doprovázeni veterinárním osvědčením, které odpovídá příloze C této směrnice.

Osvědčení nebo v případě identifikačního dokladu formulář obsahující zdravotní údaje musejí být, aniž je dotčen článek 6, vypracovány během 48 hodin před naložením nebo nejpozději poslední pracovní den před naložením, a to alespoň v jednom z úředních jazyků členských států odeslání a určení. Doba platnosti osvědčení je 10 dnů. Osvědčení musí sestávat pouze z jednoho listu.

2. Dovozy koňovitých jiných než evidovaných mohou být spíše než jednotlivými osvědčeními uvedenými v druhé odrážce odst. 1 pokryty pouze jedním veterinárním osvědčením na zásilku.

▼M1

*Článek 9*

Použijí se pravidla stanovená směrnicí Rady 90/425/EHS ze dne 26. června 1990 o veterinárních a zootechnických kontrolách v obchodu s některými živými zvířaty a produkty uvnitř Společenství s cílem dotvoření vnitřního trhu [1], a to především pokud jde o kontroly původu, o organizaci kontrol, které se mají provádět v zemi určení, a o další postup ze strany země určení v návaznosti na tyto kontroly a o ochranná opatření, která mají být učiněna.

▼B

*Článek 10*

Veterinární znalci Komise mohou v rozsahu nutném k zajištění jednotného používání této směrnice a ve spolupráci s příslušnými vnitrostátními orgány provádět kontroly na místě. Komise sdělí členským státům závěr takových kontrol.

Členské státy, na jejichž území se kontrola provádí, poskytnou znalcům veškerou pomoc nutnou k provedení jejich úkolu.

Prováděcí pravidla k tomuto článku se stanoví postupem podle článku 24.

[1] Úř. věst. L 224, 18.8.1990, s. 29.

▼B

ODDÍL III

**Pravidla pro dovozy ze třetích zemí**

*Článek 11*

1. Koňovití dovážení do Společenství musejí splňovat podmínky stanovené v článcích 12 až 16.

2. Do dne, kdy vstoupí v platnost rozhodnutí přijatá k provedení článků 12 až 16, budou členské státy při dovozech koňovitých ze třetích zemí používat podmínky přinejmenším rovnocenné těm, které vyplývají z používání kapitoly II.

▼M8

*Článek 12*

1. Dovoz koňovitých do Společenství se povolí jen ze třetích zemí uvedených na seznamu nebo seznamech sestavených nebo pozměněných v souladu s postupem podle čl. 24 odst. 2.

Při zohlednění nákazové situace a záruk poskytnutých pro koňovité třetí zemí může být v souladu s postupem uvedeným v čl. 24 odst. 2 rozhodnuto, že povolení poskytnuté podle předcházejícího pododstavce se použije na celé území třetí země nebo pouze na jeho část.

Za tímto účelem a na základě příslušných mezinárodních norem se přihlédne k tomu, jak třetí země tyto normy používá a provádí, zejména zásadu regionalizace, na svém vlastním území a ve vztahu ke svým veterinárním požadavkům pro dovoz z ostatních třetích zemí a ze Společenství.

2. Při sestavování nebo změně seznamů stanovených v odstavci 1 se přihlédne zejména k:

a) nákazovému statusu koňovitých, ostatních domácích zvířat a volně žijících živočichů ve třetí zemi, se zvláštním zřetelem k exotickým chorobám zvířat a všem hlediskům obecného zdraví a situaci ohledně životního prostředí ve třetí zemi, které by mohly představovat riziko pro nákazový status a životní prostředí ve Společenství;

b) právním předpisům třetí země souvisejícím se zdravím zvířat a dobrými životními podmínkami zvířat;

c) organizaci příslušného veterinárního orgánu a jeho kontrolních služeb, pravomocem těchto služeb, dohledu, jemuž podléhají, a prostředkům, jimiž disponují, včetně personálu a laboratorních kapacit, pro účinné používání vnitrostátních právních předpisů;

d) zárukám, které může příslušný veterinární orgán třetí země poskytnout, pokud jde o dodržování příslušných veterinárních podmínek použitelných ve Společenství, nebo o rovnocenné podmínky;

e) tomu, zda je třetí země členem Mezinárodního úřadu pro nákazy zvířat (OIE), a pravidelnosti a rychlosti informací poskytovaných třetí zemí, týkajících se přítomnosti infekčních nebo nakažlivých chorob zvířat na jejím území, zejména chorob uvedených na seznamu OIE a v příloze A této směrnice;

f) zárukám poskytnutým třetí zemí, že bude přímo informovat Komisi a členské státy:

   i) o potvrzení výskytu nakažlivých chorob koňovitých uvedených v příloze A, a to během 24 hodin, a o všech změnách očkovací politiky ohledně takových chorob,

   ii) v přiměřené lhůtě o jakýchkoli navrhovaných změnách vnitrostátních zdravotnických předpisů ohledně koňovitých, zejména jejich dovozu,

▼M8

iii) v pravidelných intervalech o nákazovém statusu ohledně koňovitých na svém území;

g) jakýmkoli zkušenostem z předchozích dovozů živých koňovitých ze třetí země a k výsledkům jakýchkoli provedených dovozních kontrol;

h) výsledkům kontrol a/nebo auditů Společenství provedených ve třetí zemi, zejména k výsledkům posouzení příslušných orgánů nebo, požádá-li o to Komise, ke zprávě předložené příslušnými orgány o kontrolách, které provedly;

i) pravidlům ohledně předcházení a tlumení infekčních nebo nakažlivých chorob zvířat platných ve třetí zemi a k jejich provádění, včetně pravidel ohledně dovozu koňovitých z ostatních třetích zemí.

3. Komise zajistí, aby byly aktualizované verze všech sestavených nebo pozměněných seznamů, jak je stanoveno v odstavci 1, dostupné veřejnosti.

Tyto seznamy se mohou kombinovat s ostatními seznamy sestavenými pro účely zdraví zvířat a veřejného zdraví a mohou rovněž obsahovat vzory zdravotních osvědčení.

4. V souladu s postupem uvedeným v čl. 24 odst. 2 se pro každou třetí zemi nebo skupinu třetích zemí stanoví zvláštní dovozní podmínky s ohledem na nákazovou situaci koňovitých v dotyčné třetí zemi nebo zemích.

5. V souladu s postupem uvedeným v čl. 24 odst. 2 mohou být přijata prováděcí pravidla k tomuto článku, včetně kritérií pro zahrnutí třetích zemí nebo částí třetích zemí do seznamu podle odstavce 1.

▼B

*Článek 13*

1. Koňovití musejí pocházet ze třetích zemí:

a) prostých moru koní;

b) dva roky prostých venezuelské encefalomyelitidy koní (VEE);

c) šest měsíců prostých hřebčí nákazy a vozhřivky.

2. Komise může postupem podle článku 24:

a) rozhodnout, že se ustanovení odstavce 1 použijí pouze na část území třetí země.

V případě, že se požadavky na mor koní použijí na základě regionalizace, musejí být přinejmenším splněna opatření stanovená v čl. 5 odst. 2 a 3;

b) požadovat dodatečné záruky pro choroby, které jsou ve Společenství exotické.

*Článek 14*

Přede dnem naložení k přepravě do členského státu určení musejí koňovití zůstat bez přerušení na území nebo části území třetí země nebo — v případě regionalizace — v části území definované podle čl. 13 odst. 2 písm. a) po dobu, která bude určena v rozhodnutích přijatých podle článku 15.

Koňovití musejí pocházet z hospodářství, které je pod veterinárním dozorem.

▼B

*Článek 15*

Dovoz koňovitých z území třetí země nebo z jeho části definované v souladu s čl. 13 odst. 2 písm. a), které je na seznamu sestaveném v souladu s čl. 12 odst. 1, je povolen pouze tehdy, pokud koňovití kromě požadavků článku 13:

a) splňují veterinární požadavky přijaté, s ohledem na dané druhy a kategorie koňovitých, postupem podle článku 24 pro dovozy koňovitých z takové země.

   Příslušným základem pro stanovení veterinárních podmínek v souladu s odstavcem 1 jsou standardy stanovené v článcích 4 a 5; a

b) v případě, že třetí země není prostá vezikulární stomatitidy nebo virové arteritidy po dobu alespoň šesti měsíců, musejí koňovití splňovat následující požadavky:

   i) musejí pocházet z hospodářství, které je prosté vezikulární stomatitidy po dobu alespoň šesti měsíců a musejí před odesláním negativně reagovat v sérologickém testu;

   ii) v případě virové arteritidy musejí samci koňovitých — bez dotčení čl. 19 odst. ii) — negativně reagovat v sérologickém testu nebo testu na izolaci viru nebo jiném testu, uznaném postupem podle článku 24 a zaručujícím nepřítomnost viru.

   Postupem podle článku 24 a podle stanoviska Vědeckého veterinárního výboru může Komise vymezit kategorie samců koňovitých, na které se tento požadavek vztahuje.

*Článek 16*

1. Koňovití musejí být identifikováni v souladu s čl. 4 odst. 4 a doprovázeni osvědčením vystaveným úředním veterinárním lékařem vyvážející třetí země. Toto osvědčení musí:

a) být vydáno v den nakládky zvířat k odeslání do členského státu určení nebo, v případě evidovaných koní, v poslední pracovní den před naložením;

b) být vyhotoveno alespoň v jednom z úředních jazyků členských států určení a v jednom z úředních jazyků členského státu, ve kterém se provádí kontrola dovozu;

c) doprovázet zvířata v originálním výtisku;

d) potvrzovat, že zvířata splňují požadavky této směrnice a požadavky stanovené podle této směrnice s ohledem na dovoz ze třetích zemí;

e) sestávat z jednoho listu;

f) být vystaveno na jednoho příjemce nebo, v případě jatečných zvířat, na zásilku, za předpokladu, že zvířata jsou řádně označena a identifikována.

   Pokud členské státy využijí této možnosti, uvědomí o tom Komisi.

2. Osvědčení musí být vyhotoveno na formuláři, který odpovídá vzoru stanovenému postupem podle článku 24.

*Článek 17*

Veterinární znalci členských států a Komise provádějí kontroly na místě za účelem ověření, zda jsou ustanovení této směrnice, a zejména ustanovení čl. 12 odst. 2 používána v praxi.

Jestliže se při kontrolách prováděných podle tohoto článku zjistí závažné skutečnosti proti schválenému hospodářství, Komise neprodleně

▼B

informuje členské státy a neprodleně přijme rozhodnutí, kterým prozatímně pozastaví schválení. Konečné rozhodnutí je přijato postupem podle článku 25.

Znalci z členských států, kteří jsou pověřeni těmito kontrolami, jsou jmenováni Komisí na návrh členských států.

Tyto kontroly jsou prováděny jménem Společenství, které hradí náklady s nimi spojené.

Četnost a postup těchto kontrol se určí postupem podle článku 24.

*Článek 18*

1. Neprodleně po vstupu do členského státu určení jsou jateční koňovití dáni na jatky, a to buď přímo, nebo po tranzitu přes trh nebo středisko svodu zvířat, a jsou v souladu s veterinárními požadavky poraženi ve lhůtě určené v rozhodnutích, která budou přijata podle článku 15.

2. Bez dotčení zvláštních podmínek, které mohou být přijaty postupem podle článku 24, může příslušný orgán členského státu určení na základě zdravotního stavu zvířat určit jatky, do kterých musejí být takoví koňovití dopraveni.

*Článek 19*

Komise postupem podle článku 24:

i) může rozhodnout, že dovozy ze třetí země nebo z části třetí země budou omezeny na určité druhy nebo kategorie koňovitých;

ii) odchylně od článku 15 stanoví zvláštní podmínky pro dočasný vstup na území Společenství evidovaných koňovitých nebo koňovitých určených pro zvláštní využití nebo pro jejich opětovný vstup na území Společenství poté, co byli dočasně vyvezeni;

iii) určuje podmínky pro změnu dočasného přijetí na trvalé;

▼M8

iv) může určit referenční laboratoř Společenství pro jednu nebo více chorob koňovitých uvedených v příloze A, a stanoví funkce, úkoly a postupy týkající se spolupráce s laboratořemi odpovědnými za diagnostiku infekčních chorob koňovitých v členských státech.

▼M2

———————

▼B

ODDÍL IV

**Závěrečná ustanovení**

*Článek 22*

Ustanovení této směrnice a zejména ustanovení obsažená v čl. 4 odst. 1 druhé větě a v článcích 6, 8 a 21 budou přezkoumána do 1. ledna 1993 v rámci návrhů vztahujících se k dotváření vnitřního trhu, o kterých Rada rozhodne kvalifikovanou většinou.

*Článek 23*

Přílohy této směrnice mění Komise postupem podle článku 25.

▼M7

*Článek 24*

1. Komisi je nápomocen Stálý výbor pro potravinový řetězec a zdraví zvířat, zřízený článkem 58 nařízení (ES) č. 178/2002. ([1])

2. Odkazuje-li se na tento článek, použijí se články 5 a 7 rozhodnutí 1999/468/ES. ([2])

Doba uvedená v čl. 5 odst. 6 rozhodnutí 1999/468/ES je tři měsíce.

3. Výbor přijme svůj jednací řád.

*Článek 25*

1. Komisi je nápomocen Stálý výbor pro potravinový řetězec a zdraví zvířat.

2. Odkazuje-li se na tento článek, použijí se články 5 a 7 rozhodnutí 1999/468/ES.

Doba uvedená v čl. 5 odst. 6 rozhodnutí 1999/468/ES je 15 dní.

▼B

*Článek 26*

Na požadavky stanovené v kapitole III této směrnice se vztahuje článek 34 směrnice 72/462/EHS.

*Článek 27*

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 1. ledna 1992. Uvědomí o tom Komisi.

*Článek 28*

Tato směrnice je určena členským státům.

([1]) Úř. věst. L 31, 1.2.2002, s. 1.
([2]) Úř. věst. L 184, 17.7.1999, s. 23.

▼B

*PŘÍLOHA A*

**CHOROBY POVINNÉ HLÁŠENÍM**

Následující choroby jsou povinné hlášením:

— Hřebčí nákaza

— Vozhřivka

— Encefalomyelitida koní (všech typů, včetně venezuelské encefalomyelitidy koní VEE)

— Nakažlivá chudokrevnost koní

— Vzteklina

— Sněť slezinná

— Mor koní

— Vezikulární stomatitida

▼M3

*PŘÍLOHA B*

**ÚDAJE O ZDRAVOTNÍM STAVU (a)**

Pas číslo .....

Já, níže podepsaný potvrzuji (b), že výše popsaný koňovitý splňuje tyto požadavky:

(a) byl dnes vyšetřen a nevykazuje žádné klinické příznaky choroby;

(b) není určen k utracení na základě národního programu eradikace nakažlivých nebo infekčních chorob;

(c) — nepochází z území nebo z části území členského státu/třetí země, které podléhá omezením z důvodu moru (c) koní, nebo

z území nebo části území členského státu/třetí země, které podléhá karanténě z veterinárních důvodů a prošel s uspokojujícími výsledky testem stanoveným v čl. 5 odst. 3 směrnice 90/426/EHS, a to v karanténní stanici ..... v době mezi ..... a ..... (c);

— není očkován proti moru koní, nebo byl očkován proti moru koní dne ..... (c) (d);

(d) nepochází z chovu, který podléhá karanténě z veterinárních důvodů a nepřišel do styku s koňovitými z chovu, který podléhá karanténě z veterinárních důvodů:

— během posledních šesti měsíců v případě koňovitých podezřelých nebo trpících hřebčí nákazou počínaje dnem posledního skutečného nebo možného styku s nemocným zvířetem. V případě hřebce platí karanténa až do doby jeho kastrace,

— během posledních šesti měsíců v případě vozhřivky nebo encefalomyelitidy koní, počínaje dnem, kdy koňovití trpící dotyčnou chorobou byli utraceni,

— v případě infekční anemie až do dne, kdy po utracení nakažených zvířat vykázala zbývající zvířata, po dvou testech podle Cogginse, provedených v rozmezí tří měsíců, negativní reakci,

— v případě vezikulární stomatitidy po dobu šesti měsíců od posledního případu,

— v případě vztekliny po dobu jednoho měsíce od posledního případu,

— v případě sněti slezinné po dobu 15 dnů od posledního případu,

— byla-li všechna zvířata chovu, náchylná k chorobě, utracena a chovné prostory dezinfikovány, po dobu 30 dnů počínaje dnem, kdy zvířata byla zničena a prostory vydezinfikovány, s výjimkou sněti slezinné, kdy období karantény trvá 15 dnů;

(e) pokud vím, nepřišlo zvíře během 15 dnů před tímto prohlášením do styku s koňovitými trpícími infekční nebo nakažlivou chorobou;

►(3) (f) v době vyšetření byli způsobilí k přepravě na zamýšlenou cestu v souladu s ustanoveními směrnice 91/628/EHS (c). ◄

| Datum | Místo | Razítko a podpis úředního veterinárního lékaře (1) |
|---|---|---|
| | | |

(1) Jméno velkými písmeny a funkce.

(a) Tyto informace se nevyžadují v případě, existuje-li dvoustranná dohoda v souladu s článkem 6 směrnice 90/426/EHS.

(b) Platí po dobu 10 dnů.

(c) Nehodící se škrtněte.

(d) Datum očkování musí být uvedeno v pase.

►(3) (e) Toto prohlášení nezbavuje přepravce závazků, které pro ně vyplývají z platných předpisů Společenství, zejména pokud jde o způsobilost zvířat k přepravě. ◄

▶(1) (2) M5

▼M3

*PŘÍLOHA C*

VZOR

**VETERINÁRNÍ OSVĚDČENÍ**

**pro obchod mezi členskými státy EHS**

**KOŇOVITÍ**

Číslo: .....

Odesílající členský stát: .....

Příslušné ministerstvo: .....

Příslušný územní útvar: .....

I. **Počet koňovitých:** .....

II. **Identifikace koňovitých:**

| Počet zvířat (1) | Druh<br>kůň, osel, mula, mezek | Chov<br>Stáří<br>Pohlaví | Identifikační metoda a identifikace (2) |
|---|---|---|---|
| | | | |

(1) V případě jatečních zvířat uveďte druh zvláštního označení.
(2) Pas identifikující koňovitého může být připojen k tomuto osvědčení v případě, že je zde uvedeno jeho číslo.

III. **Původ a místo určení koňovitého zvířete/koňovitých:**

Koňovité zvíře/koňovití je/jsou odesíláno/a

z .....
(místo odeslání)

do .....
(členský stát a místo určení)

Jméno a adresa odesílatele: .....

.....

Jméno a adresa příjemce: .....

.....

IV. **Údaje o zdravotním stavu** (a)

Já,, níže podepsaný potvrzuji, že výše uvedené/á zvíře/zvířata splňuje/jí tyto požadavky:

1. bylo/a dnes vyšetřeno/a a nevykazuje/í žádné klinické příznaky choroby;
2. není/nejsou určeno/a k utracení na základě národního programu k eradikaci nakažlivých nebo infekčních chorob;

(a) Tyto informace se nevyžadují v případě, existuje-li dvoustranná dohoda v souladu s článkem 6 směrnice 90/426/EHS.

▼M3

3. — zvíře/zvířata nepochází/ejí z území nebo z části území členského státu/třetí země, které podléhá omezením z důvodu moru koní,

nebo

nepochází/ejí z území nebo z části území členského státu, které podléhá omezením z důvodu moru koní a prošlo/a s uspokojujícími výsledky testem stanoveným v čl. 5 odst. 3 směrnice 90/426/EHS, a to v karanténní stanici..... v době mezi ..... a ..... (b);

— není/nejsou očkováno/a proti moru koní,

nebo

bylo očkováno proti moru koní dne ..... (b);

4. nepochází/ejí z chovu, který podléhá karanténě z veterinárních důvodů a nepřišlo do styku s koňovitými z chovu, který podléhá karanténě z veterinárních důvodů

— během posledních šesti měsíců v případě koňovitých podezřelých nebo trpících hřebčí nákazou počínaje dnem posledního skutečného nebo možného styku s nemocným zvířetem. V případě hřebce platí karanténa až do doby jeho kastrace,

— během posledních šesti měsíců v případě vozhřivky nebo encefalomyelitidy koní, počínaje dnem, kdy koňovití trpící dotyčnou chorobou byli utraceni,

— v případě infekční anemie až do dne, kdy po utracení nakažených zvířat vykázala zbývající zvířata, po dvou testech poddle Cogginse, provedených v rozmezí tří měsíců, negativní reakci,

— v případě vezikulární stomatitidy po dobu šesti měsíců od posledního případu,

— v případě vztekliny po dobu jednoho měsíce od posledního případu,

— v případě sněti slezinné po dobu 15 dnů od posledního případu,

— byla-li všechna zvířata chovu, náchylná k chorobě, utracena a chovné prostory dezinfikovány, po dobu 30 dnů počínaje dnem, kdy zvířata byla zničena a prostory vydezinfikovány, s výjimkou sněti slezinné, kdy období karantény trvá 15 dnů;

5. pokud vím, nepřišlo zvíře během 15 dnů před tímto prohlášením do styku s koňovitými trpícími infekční nebo nakažlivou chorobou;

►M1 6. v době vyšetření bylo/a způsobilé/á k přepravě na zamýšlenou cestu v souladu s ustanoveními směrnice 91/628/EHS (d). ◄

V. **Toto osvědčení platí po dobu 10 dnů.**

V ....., dne .....

razítko

.....

(podpis)

(jméno velkými písmeny a funkce podpisujícího úředního veterinárního lékaře) (c)

(b) Nehodící se škrtněte.

(c) V Německu „Beamteter Tierarzt"; v Belgii „Inspecteur vétérinaire" nebo „Inspecteur Dierenarts"; ve Francii „Vétérinaire officiel"; v Itálii „Veterinario ufficiale"; v Lucembursku „Inspecteur vétérinaire"; v Nizozemsku „Officieel Dierenarts"; v Dánsku „Embeds Dyrlæge"; v Irsku „Veterinary Inspector"; ve Spojeném království „Veterinary Inspector"; v Řecku „Επίσημος κτηνίατρος"; ve Španělsku „Inspector Veterinario" v Portugalsku „Inspector Veterinário" ►M1 ; v Rakousku „Amtstierarzt"; ve Finsku „Kunnaneläinlääkäri" nebo „Kaupungineläinlääkäri" nebo „Läänineläinlääkäri" / „Kommunalveterinär" nebo „Stadsveterinär" nebo „Länsveterinär"; ve Švédsku „Länsveterinär", „Distriktsveterinär" nebo „Gränsveterinär"; ◄►M1 v České republice „Úřední Veterinární Lékař"; v Estonsku „Veterinaarjärelevalve Ametnik"; na Kypru „ΕπίσημοςΚτηνίατρος "; v Lotyšsku „Veterinārais Inspektors"; v Litvě „Veterinarijos Inspektorius"; v Maďarsku „Hatósági Állatorvos"; na Maltě „Veterinarju Uffiċjali"; v Polsku „Urzędowy Lekarz Weterynarii"; ve Slovinsku „Veterinarski Inšpektor"; na Slovensku „Veterinárny Inšpektor"; ►M1 v Bulharsku „ветеринарен инспектор"; v Rumunsku „medic veterinar autorizat". ◄

►M1 (d) Toto prohlášení nezbavuje přepravce závazků, které pro ně vyplývají z platných předpisů Společenství, zejména pokud jde o způsobilost zvířat k přepravě. ◄

►(1) A1

►(2) (3) M5

►(4) A2

►(5) M9

▼M6

*PŘÍLOHA D*

**MOR KONÍ**

*DIAGNOSTIKA*

Níže popsaná činidla pro enzymový imunotest (*enzyme-linked immunosorbent assays*, ELISA) mohou být získána z referenční laboratoře Evropského společenství nebo z referenčních laboratoří OIE pro mor koní.

1. KOMPETITIVNÍ TEST ELISA PRO ZJIŠTĚNÍ PROTILÁTEK VIRU MORU KONÍ (AHSV) (PŘEDEPSANÝ TEST)

Kompetitivní test ELISA je používán ke zjišťování protilátek viru AHSV v séru všech druhů koňovitých. Širokospektrální, polyklonální, imunní sérum proti AHSV získané z morčat (dále jen antisérum z morčat) je specifické pro séroskupinu a je schopno zjistit všechny známé sérotypy viru AHSV.

Podstatou testu je přerušení reakce mezi protilátkami AHSV a antisérem z morčat pomocí vzorku testovaného séra. Protilátky AHSV v testovaném vzorku séra budou soutěžit s protilátkami v antiséru z morčat, přičemž dojde k odbarvení (po přidání enzymem značkované protilátky z morčat a substrátu). Séra mohou být testována v jednom roztoku 1 ku 5 (metoda kapkového testu) nebo mohou být titrována (sérová titrační metoda) za účelem zjištění koncových bodů roztoku. Hodnoty inhibice vyšší než 50 % mohou být považovány za pozitivní.

Níže popsaný protokol testu je používán v oblastní referenční laboratoři pro mor koní v Pirbright ve Spojeném království.

1.1 **Postup při testu**

1.1.1 *Příprava destiček*

1.1.1.1 Destičky ELISA se pokryjí antigenem AHSV získaným z infikovaných buněčných kultur a zředěným karbonátovým/bikarbonátovým pufrem, pH 9,6. Destičky ELISA se inkubují přes noc při teplotě 4 °C.

1.1.1.2 Destičky se vypláchnou třikrát tak, že se okénka zaplní fosfátovým pufrem (PBS), pH 7,2 až 7,4, vyprázdní se a vysuší se pomocí savého papíru.

1.1.2 *Kontrolní okénka*

1.1.2.1 Pozitivní kontrolní sérum se titruje v dvojité sérii roztoků v koncentracích od 1 ku 5 do 1 ku 640 v sloupci 1 v tlumicím roztoku (PBS obsahující 0,05 % (obj.) látky Tween-20, 5,0 % (hmot./obj.) sušeného odstředěného mléka (Cadbury's Marvel™) a 1 % (obj.) séra dospělého skotu) tak, aby byl získán výsledný objem 50 ìl/okénko.

1.1.2.2 Do okének A a B sloupce 2 se přidá 50 ìl negativního kontrolního séra v roztoku 1 ku 5 (10 ìl séra + 40 ìl tlumicího roztoku).

1.1.2.3 Do okének C a D sloupce 2 (prázdné) se přidá 100 ìl tlumicího roztoku na okénko.

1.1.2.4 Do okének E, F, G a H sloupce 2 (kontrolní vzorky séra morčat) se přidá 50 ìl tlumicího roztoku.

1.1.3 *Metoda kapkového testu*

1.1.3.1 Roztok 1 ku 5 každého testovaného séra v tlumicím roztoku se přidá do duplikovaných okének ve sloupcích 3 až 12 (10 ìl séra + 40 ìl tlumicího roztoku).

nebo

1.1.4 *Sérová titrační metoda*

1.1.4.1 Připraví se dvojitá série roztoků každého testovaného vzorku (1 ku 5 až 1 ku 640) v tlumicím roztoku v osmi okénkách jednotlivých sloupců (3 až 12).

poté

1.1.5 50 ìl antiséra z morčat, předředěného v tlumicím roztoku, se přidá do všech okének kromě prázdných okének destičky

▼M6

ELISA (všechna okénka nyní obsahují výsledný objem 100 il).

1.1.5.1 Inkubuje se 1 hodinu při teplotě 37 °C v orbitální třepačce.

1.1.5.2 Destičky se třikrát propláchnou a vysuší tak, jak je popsáno výše.

1.1.5.3 Do každého okénka se přidá 50 il králičího antiséra z morčat konjugovaného s křenovou peroxidázou (HRP) předředěného v tlumicím roztoku.

1.1.5.4 Inkubuje se 1 hodinu při teplotě 37 °C v orbitální třepačce.

1.1.5.5 Destičky se třikrát propláchnou a vysuší tak, jak je popsáno výše.

1.1.6 *Chromogen*

Těsně před použitím se připraví roztok chromogenu OPD (orto-fenyldiamin) podle návodu výrobce (0,4 mg/ml ve sterilní destilované vodě). Přidá se substrát (peroxid vodíku – $H_2O_2$) pro dosažení výsledné koncentrace 0,05 % (obj.) (1 ku 2000 v 30 % roztoku $H_2O_2$). Do každého okénka se přidá 50 il roztoku OPD a destičky se ponechají na pracovní ploše po dobu 10 minut při okolní teplotě. Reakce se zastaví přidáním 50 il kyseliny sírové (H2 SO4 – 1M) na okénko.

1.1.7 *Vyhodnocení*

Vzorek se vyhodnotí spektrofotometricky na vlnové délce 492 nm.

1.2 **Vyjádření výsledků**

1.2.1 S použitím programového nástroje se vytisknou hodnoty optické hustoty (OH) a procentuální inhibice (PI) pro testovaná a kontrolní séra vztažené ke střední hodnotě zaznamenané u čtyř kontrolních okének s antisérem z morčat. Údaje vyjádřené jako hodnoty OH a PI se použijí k určení toho, zda byl test proveden v rámci přijatelných mezí. Horní kontrolní hodnoty (upper control limits, UCL) a spodní kontrolní hodnoty (lower control limits, LCL) pro kontrolní vzorky protilátek z morčat jsou mezi hodnotami OH 1,4 a 0,4. Koncový bod titrace pro pozitivní kontrolu založenou na 50 % PI by měl být 1 ku 240 (v rámci rozmezí od 1 ku 120 do 1 ku 480). Každá destička, jež není v souladu s výše uvedenými kritérii, nesmí být přijata. Jestliže je však titrace pozitivního kontrolního séra větší než 1 ku 480 a testované vzorky jsou stále negativní, pak mohou být negativní testované vzorky přijaty.

Duplicitní okénka s negativním kontrolním sérem a duplicitní prázdná okénka by měla vykazovat hodnoty PI mezi +25 % a –25 %, resp. mezi +95 % a +105 %. Hodnoty mimo toto rozmezí destičku nevyřazují, ale naznačují, že barva pozadí se vyvíjí.

1.2.2 Diagnostický práh (rozhodovací úroveň) pro testované sérum je 50 % (PI 50 %). Vzorky vykazující hodnoty PI vyšší než 50 % jsou zaznamenány jako pozitivní. Vzorky vykazující hodnoty PI nižší než 50 % jsou zaznamenány jako negativní.

Vzorky, které vykazují hodnoty PI mimo rozmezí pro duplicitní okénka, jsou považovány za nejisté. Takové vzorky mohou být znovu testovány kapkovým testem a titrací. Pozitivní vzorky mohou také být titrovány k zjištění stupně pozitivity.

▼**M6**

Rozmístění kapkového testu

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | +kont. | | Testované sérum | | | | | | | | | |
| A | 1:5 | – kont. | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| B | 1:10 | – kont. | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| C | 1:20 | Prázdné | | | | | | | | | | |
| D | 1:40 | Prázdné | | | | | | | | | | |
| E | 1:80 | M. kont. | | | | | | | | | | |
| F | 1:160 | M. kont. | | | | | | | | | | |
| G | 1:320 | M. kont. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| H | 1:640 | M. kont. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |

–kont. = negativní kontrola.
+kont. = pozitivní kontrola.
M. kont = kontrolní vzorky protilátek z morčat.

Testované sérum

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | +kont. | | Testované sérum | | | | | | | | | |
| A | 1:5 | – kont. | 1:5 | | | | | | | | | 1:5 |
| B | 1:10 | – kont. | 1:10 | | | | | | | | | 1:10 |
| C | 1:20 | Prázdné | 1:20 | | | | | | | | | 1:20 |
| D | 1:40 | Prázdné | 1:40 | | | | | | | | | 1:40 |
| E | 1:80 | M. kont. | 1:80 | | | | | | | | | 1:80 |
| F | 1:160 | M. kont. | 1:160 | | | | | | | | | 1:160 |
| G | 1:320 | M. kont. | 1:320 | | | | | | | | | 1:320 |
| H | 1:640 | M. kont. | 1:640 | | | | | | | | | 1:640 |

–kont. = negativní kontrola.
+kont. = pozitivní kontrola.
M. kont. = kontrolní vzorky protilátek z morčat.

2. NEPŘÍMÝ TEST ELISA PRO ZJIŠTĚNÍ PROTILÁTEK VIRU MORU KONÍ (AHSV) (PŘEDEPSANÝ TEST)

Níže popsaný test je v souladu s popisem testu v kapitole 2.1.11 *Příručky norem pro diagnostické testy a očkovací látky* OIE, čtvrté vydání, 2000.

Pro určení protilátky viru AHS byl použit rekombinantní protein VP7 jako antigen s vysokým stupněm senzitivity a specificity. Dalšími jeho výhodami je, že je stabilní a není infekční.

2.1 **Postup testu**

2.1.1 *Pevná fáze*

2.1.1.1 Destičky ELISA se pokryjí rekombinantem AHSV-4 VP7 rozpuštěném v karbonátovém/bikarbonátovém pufru, pH 9,6. Destičky se inkubují přes noc při teplotě 4 °C.

2.1.1.2 Destičky se pětkrát propláchnou destilovanou vodou obsahující 0,01 % (obj.) látky Tween 20 (mycí roztok). Destičky se jemně poklepou savým materiálem, aby byl odstraněn veškerý zbytkový mycí roztok.

▼M6

2.1.1.3 Destičky se tlumí fosfátovým pufrem (PBS) + 5 % (hmot./obj.) roztokem odstředěného mléka (Nestlé Dry Skim Milk™), 200 ìl/okénko, 1 hodinu při teplotě 37 °C.

2.1.1.4 Tlumicí roztok se odstraní a destičky se jemně poklepou savým materiálem.

2.1.2 *Testované vzorky*

2.1.2.1 Vzorky séra, které mají být testovány, a pozitivní a negativní kontrolní sérum se rozpustí 1 ku 25 v PBS + 5 % (hmot./obj.) roztoku odstředěného mléka + 0,05 % (obj.) látky Tween 20, 100 ìl na okénko. Inkubují se 1 hodinu při teplotě 37 °C.

Pro titraci se připraví dvojitá série roztoků od 1 ku 25 (100 ìl/okénko), jedno sérum v každém sloupci destičky, a totéž se provede s pozitivními a negativními kontrolními vzorky. Vzorky se inkubují 1 hodinu při teplotě 37 °C.

2.1.2.2 Destičky se propláchnou, jak je popsáno v kroku 2.1.1.2.

2.1.3 *Konjugát*

2.1.3.1 Antikoňský gama-globulin konjugovaný s křenovou peroxidázou (HRP) rozpuštěný v PBS + 5 % mléka + 0,05 % látky Tween 20, pH 7,2 se rozdělí v množstvích 100 ìl/okénko. Inkubuje se 1 hodinu při teplotě 37 °C.

2.1.3.2 Destičky se propláchněte, jak je popsáno v kroku 2.1.1.2.

2.1.4 *Chromogen/Substrát*

2.1.4.1 Přidá se 200 ìl/okénko roztoku chromogenu/substrátu (10 ml 80,6 mM DMAB (dimetyl aminobenzal-dehyd) +10 ml 1,56 mM MBTH (3-metyl-2-benzo-thiazolin hydrazon hydrochlorid) +5 ìl $H_2O_2$).

Zabarvení se zastaví přidáním 50 ìl 3N H2 SO4 asi po 5 až 10 minutách (předtím, než se začnou zbarvovat negativní kontrolní vzorky).

Mohou být použity také další chromogeny, např. ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etylbenzothiazolin-6-kyselina sulfonová]), TMB (tetra-metyl benzidin), nebo OPD (orto-fenyldiamin).

2.1.4.2 Destičky se vyhodnotí na vlnové délce 600 nm (nebo 620 nm).

2.2 **Interpretace výsledků**

2.2.1 Prahová hodnota se vypočte přidáním 0,6 k hodnotě negativní kontroly (0,6 je směrodatná odchylka odvozená ze skupiny 30 negativních sér).

2.2.2 Testované vzorky vykazující hodnoty absorpce nižší než prahová hodnota jsou považovány za negativní.

2.2.3 Testované vzorky vykazující hodnoty absorpce vyšší než prahová hodnota +0,15 jsou považovány za pozitivní.

2.2.4 Testované vzorky vykazující střední hodnoty absorpce jsou nejisté a musí být provedena druhá metoda k potvrzení výsledku.

3. TLUMICÍ TESTY ELISA PRO ZJIŠTĚNÍ PROTILÁTEK VIRU MORU KONÍ (AHSV) (PŘEDEPSANÝ TEST)

Tlumicí test ELISA je zaměřen na zjištění specifických protilátek AHSV v séru z jakýchkoli náchylných druhů. VP7 je hlavní, antigenický, virový protein AHSV, obsažený v rámci devíti sérotypů. Protože je monoklonální protilátka (Mab) také zaměřena proti VP7, test poskytne vysokou úroveň senzitivity a specificity. Navíc je rekombinantní antigen VP7 zcela neškodný, a proto zajišťuje vysoký stupeň bezpečnosti.

Podstatou testu je přerušení reakce mezi rekombinantem VP7 jako antigenem vázaným na destičku ELISA a konjugovaným Mab specifickým na VP7. Protilátka v testovaném séru zablokuje reakci mezi antigenem a Mab a v důsledku toho dojde k odbarvení.

Níže popsaný test se provádí v referenční laboratoři pro mor koní Evropského společenství v Algete ve Španělsku.

▼M6

3.1 **Postup testu**

3.1.1 *Destičky ELISA*

3.1.1.1 Destičky ELISA se pokryjí rekombinantem AHSV-4 VP7 rozpuštěným v karbonátovém/bikarbonátovém pufru, pH 9,6. Inkubují se přes noc při teplotě 4 °C.

3.1.1.2 Destičky se pětkrát propláchnou fosfátovým pufrem (PBS) obsahujícím 0,05 % (obj.) látky Tween 20 (PBST).

3.1.1.3 Destička se stabilizuje ošetřením stabilizačním roztokem (aby bylo zajištěno dlouhodobé skladování při teplotě 4 °C bez ztráty aktivity) a vysuší se savým materiálem.

3.1.2 *Testované a kontrolní vzorky*

3.1.2.1 Pro screening: testované sérum a kontrolní vzorky se rozpustí 1 ku 10 přímo na destičce v PBST tak, aby byl získán výsledný objem 100 µl/okénko. Vzorky se inkubují 1 hodinu při teplotě 37 °C.

3.1.2.2 Pro titraci: připraví se dvojitá série roztoků testovaných sér a pozitivních kontrolních vzorků (100 il/okénko) od 1 ku 10 do 1 ku 1 280 v osmi okénkách. Negativní kontrola je testována v roztoku 1 ku 10.

3.1.3. *Konjugát*

Do každého okénka se přidá 50 il/okénko předředěného roztoku Mab (monoklonální protilátky specifické na VP7) konjugovaného s křenovou peroxidázou (HRP) a vzorek se jemně promíchá, aby byla zajištěna homogenita. Inkubuje se 30 minut při teplotě 37 °C.

3.1.4 Destičky se pětkrát propláchnou PBST a vysuší se tak, jak je uvedeno výše.

3.1.5 *Chromogen/Substrát*

Přidá se 100 il/okénko roztoku chromogen/substrát (1 ml ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-etylbenzothiazolin-6-kyselina sulfonová]), 5 mg/ml + 9 ml substrátového pufru (0,1 M fosfátocitrátový pufr pH 4 obsahující 0,03 % $H_2O_2$] a inkubuje se 10 minut při pokojové teplotě. Zabarvení se zastaví přidáním 100 il/okénko 2 % (hmot./obj.) roztoku SDS (natriumdodecylsulfát).

3.1.6 *Vyhodnocení*

Vzorek se vyhodnotí na vlnové délce 405 nm.

3.2 **Interpretace výsledků**

3.2.1 *Platnost testu*

Test je platný, jestliže je optická hustota (OH) negativního kontrolního vzorku (NK) vyšší než 1,0 a OH pozitivního kontrolního vzorku (PK) je nižší než 0,2.

3.2.2 *Výpočet prahové hodnoty*

$$\text{Pozitivní prahová hodnota} = NK - [(NK - PK)x0,3]$$

$$\text{negativní prahová hodnota} = NK - [(NK - PK)x0,2],$$

kde NK je OH negativního kontrolního vzorku a PK je OH pozitivního kontrolního vzorku.

3.2.3 *Interpretace výsledků*

Vzorky s OH nižší, než je pozitivní prahová hodnota, by měly být považovány za pozitivní na protilátky AHSV.

Vzorky s OH vyšší, než je negativní prahová hodnota, by měly být považovány za negativní na protilátky AHSV.

▼**M6**

Vzorky s OH mezi těmito dvěma hodnotami by měly být považovány za nejisté a u dotyčných zvířat by měl být proveden nový odběr vzorků po dvou až třech týdnech.