Ta dokument je mišljen zgolj kot dokumentacijsko orodje in institucije za njegovo vsebino ne prevzemajo nobene odgovornosti

►B

DIREKTIVA SVETA

z dne 26. junija 1990

o pogojih v zvezi z zdravstvenim varstvom živali, ki ureja premike in uvoz kopitarjev iz tretjih držav

(90/426/EGS)

(EGT L 224, 18.8.1990, s. 42)

spremenjena z:

		Uradni list		
		št.	stran	datum
►M1	Direktiva Sveta 90/425/EGS, z dne 26. junija 1990	L 224	29	18.8.1990
►M2	Direktiva Sveta 91/496/EGS, z dne 15. julija 1991	L 268	56	24.9.1991
►M3	Odločba Komisije 92/130/EGS, z dne 13. februarja 1992	L 47	26	22.2.1992
►M4	Direktiva Sveta 92/36/EGS z dne 29. aprila 1992	L 157	28	10.6.1992
►M5	Odločba Komisije 2001/298/ES, z dne 30. marca 2001	L 102	63	12.4.2001
►M6	Odločba Komisije 2002/160/ES, z dne 21. februarja 2002	L 53	37	23.2.2002
►M7	Uredba Sveta (ES) št. 806/2003 z dne 14. aprila 2003	L 122	1	16.5.2003
►M8	Direktiva Sveta 2004/68/ES z dne 26. aprila 2004	L 139	320	30.4.2004
►M9	Direktiva Sveta 2006/104/ES z dne 20. novembra 2006	L 363	352	20.12.2006

spremenjena z:

►A1	Akt o pristopu Avstrije, Finske in Švedske	C 241	21	29.8.1994
►A2	Akt o pogojih pristopa Češke republike, Republike Estonije, Republike Cipra, Republike Latvije, Republike Litve, Republike Madžarske, Republike Malte, Republike Poljske, Republike Slovenije in Slovaške republike in prilagoditvah Pogodb, na katerih temelji Evropska unija	L 236	33	23.9.2003

▼B

DIREKTIVA SVETA

z dne 26. junija 1990

o pogojih v zvezi z zdravstvenim varstvom živali, ki ureja premike in uvoz kopitarjev iz tretjih držav

(90/426/EGS)

SVET EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti in zlasti člena 43 Pogodbe,

ob upoštevanju predloga Komisije ([1]),

ob upoštevanju mnenja Evropskega parlamenta ([2]),

ob upoštevanju mnenja Ekonomsko-socialnega odbora ([3]),

ker so kopitarji kot žive živali vključeni v seznam proizvodov iz Priloge II k Pogodbi;

ker je treba za zagotavljanje racionalnega razvoja reje kopitarjev, s čimer se v tem sektorju poveča produktivnost, na ravni Skupnosti določiti predpise, ki urejajo premike kopitarjev med državami članicami;

ker je reja in vzreja kopitarjev, zlasti konj, na splošno vključena v kmetijski sektor; ker predstavlja vir dohodka za del kmetijske populacije;

ker bi bilo treba odpraviti neskladja glede pogojev zdravstvenega varstva živali v državah članicah, da se spodbudi trgovina s kopitarji znotraj Skupnosti;

ker bi bilo treba za spodbujanje usklajenega razvoja trgovine znotraj Skupnosti določiti sistem Skupnosti, ki bi urejal uvoz iz tretjih držav;

ker bi bilo treba urediti tudi pogoje za premike kopitarjev, ki imajo identifikacijski dokument, po nacionalnem ozemlju;

ker morajo kopitarji, da bi se lahko z njimi trgovalo, izpolnjevati nekatere zahteve v zvezi z zdravstvenim varstvom živali, da se prepreči širjenje kužnih bolezni; ker se zdi zlasti primerno, da se predvidi morebitna regionalizacija omejevalnih ukrepov;

ker bi bilo treba iz enakega razloga določiti pogoje prevoza;

ker je treba za zagotovitev izpolnjevanja teh zahtev določiti, da uradni veterinar izda zdravstveno spričevalo, ki spremlja kopitarje do namembnega kraja;

ker bi bilo treba v okviru pravil, določenih za veterinarske preglede v trgovini znotraj Skupnosti z živimi živalmi zaradi vzpostavitve notranjega trga, določiti organizacijo in nadaljnje spremljanje pregledov, ki jih bo izvajala namembna država članica, in zaščitnih ukrepov, ki se bodo izvajali;

ker bi bilo treba zagotoviti možnost, da preglede izvaja Komisija; ker bi se morali ti pregledi izvajati v sodelovanju s pristojnimi nacionalnimi organi;

ker je treba za opredelitev pravil Skupnosti, ki veljajo za uvoz iz tretjih držav, pripraviti seznam tretjih držav ali delov tretjih držav, iz katerih se lahko uvažajo kopitarji;

([1]) UL C 327, 30.12.1989, str. 61.
([2]) UL C 149, 18.6.1990.
([3]) UL C 62, 12.3.1990, str. 46.

▼B

ker mora izbira teh držav temeljiti na merilih splošne narave, kot so zdravstveno stanje živine, organizacija in pooblastila veterinarskih služb ter veljavni zdravstveni predpisi;

ker je poleg tega treba prepovedati uvoz kopitarjev iz držav, okuženih z živalskimi kužnimi ali nalezljivimi boleznimi, ki pomenijo tveganje za živali v Skupnosti, ali iz držav, ki so prekratek čas proste teh bolezni; ker velja enaka previdnost tudi za uvoz iz tretjih držav, v katerih se izvaja cepljenje proti tem boleznim;

ker je treba splošne pogoje, ki veljajo za uvoz iz tretjih držav, dopolniti s posebnimi pogoji, oblikovanimi na podlagi stanja zdravstvenega varstva v vsaki od njih; ker je zaradi tehnične narave in raznovrstnosti meril zanje pri njihovi opredelitvi potreben prožen in hiter postopek Skupnosti, v katerem Komisija in države članice tesno sodelujejo;

ker je predložitev standardnega obrazca spričevala ob uvozu kopitarjev učinkovito sredstvo preverjanja, ali se upoštevajo pravila Skupnosti; ker lahko takšna pravila vključujejo posebne določbe, ki se lahko razlikujejo glede na zadevno tretjo državo, in ker je to treba upoštevati pri sestavljanju standardnih obrazcev spričeval;

ker naj bi bili uradni veterinarji Skupnosti odgovorni za preverjanje, ali se upoštevajo zahteve te direktive, zlasti v tretjih državah;

ker se morata pri pregledih ob uvozu kontrolirati izvor in zdravstveno stanje kopitarjev;

ker je treba državam članicam ob prihodu kopitarjev na ozemlje Skupnosti in med tranzitom do namembnega kraja dovoliti izvajanje vseh ukrepov za varovanje zdravja ljudi in živali, vključno z zakolom in uničenjem;

ker je treba opredeliti celovite splošne določbe za preglede, ki se bodo izvajali ob uvozu;

ker mora imeti vsaka država članica pravico nemudoma prepovedati uvoz iz tretje države, če je tak uvoz lahko nevaren za zdravstveno varstvo živali; ker je treba v takem primeru nemudoma zagotoviti uskladitev mnenj držav članic v zvezi z zadevno tretjo državo brez poseganja v morebitne spremembe seznama držav, ki imajo dovoljenje za izvoz v Skupnost;

ker je treba določbe te direktive ponovno preučiti v zvezi z vzpostavitvijo notranjega trga;

ker je treba predvideti postopek, ki bo vzpostavil tesno in učinkovito sodelovanje med Komisijo in državo članico v okviru Stalnega veterinarskega odbora,

SPREJEL NASLEDNJO DIREKTIVO:

POGLAVJE 1

Splošne določbe

Člen 1

Ta direktiva določa pogoje v zvezi z zdravstvenim varstvom živali za premike živih kopitarjev med državami članicami in njihov uvoz iz tretjih držav.

Člen 2

V tej direktivi:

▼B

(a) „gospodarstvo“ pomeni kmetijski ali športni obrat, hlev ali na splošno vsak prostor ali objekt, kjer se običajno redijo ali zadržujejo kopitarji, ne glede na namen;

(b) „kopitarji“ so divje ali domače živali vrst konj, zebra in osel ter križanci prej navedenih vrst;

(c) „registrirani kopitarji“ so tisti, ki so registrirani, kakor je opredeljeno v Direktivi 90/427/EGS ([1]) in jih spremlja identifikacijski dokument, ki ga izda rejska organizacija ali kateri koli drug pristojni organ v državi izvora, ki upravlja rodovniško knjigo oziroma register za to pasmo ali katera koli mednarodna zveza ali organizacija, ki upravlja s tekmovalnimi in dirkalnimi konji;

(d) „kopitarji za zakol“ so kopitarji namenjeni bodisi neposredno v klavnico bodisi na sejem oziroma odobren zbirni center od koder se odpremlja kopitarje v klavnico;

(e) „kopitarji za rejo in rabo“ so kopitarji, ki niso navedeni v (c) in (d);

(f) „država članica ali tretja država, prosta konjske kuge“ pomeni katero koli državo članico ali tretjo državo v kateri ni bilo kliničnih, seroloških (pri necepljenih živalih) ali epidemioloških dokazov o primerih konjske kuge na zadevnem ozemlju v zadnjih dveh letih in v kateri se v zadnjih 12 mesecih ni izvajalo cepljenje proti tej bolezni;

(g) „bolezni, ki jih je treba obvezno prijaviti“ so bolezni, naštete v Prilogi A;

(h) „uradni veterinar“ je veterinar, ki ga imenuje centralni pristojni organ države članice ali tretje države;

(i) „začasni vstop“ pomeni status registrirane živali, ki izvira iz tretje države in za katero je dovoljen vstop na ozemlje Skupnosti za obdobje, krajše od 90 dni, ki ga določi Komisija v skladu s postopkom, določenim v členu 24, glede na zdravstveno stanje v državi izvora.

POGLAVJE II

Pravila za premike kopitarjev

Člen 3

Država članica odobri premike registriranih kopitarjev na svojem ozemlju ali pošlje kopitarje v drugo državo članico samo, če izpolnjujejo pogoje, določene v členih 4 in 5.

Pristojni organi v namembnih državah članicah lahko odobrijo splošne ali omejene izjeme glede premikov kopitarjev, ki:

— se jezdijo ali vodijo, v športne ali rekreativne namene, po cestah v bližini notranjih meja Skupnosti,

— so udeleženi v kulturnih ali podobnih prireditvah ali dejavnostih, ki potekajo v bližini notranjih meja Skupnosti in jih organizirajo krajevni organi,

— so namenjeni samo za začasno pašo ali delo v bližini notranjih meja Skupnosti.

Države članice, ki uporabljajo tako odobritev, Komisijo obvestijo o vsebini odobrenega odstopanja.

([1]) UL L 224, 18.8.1990, str. 55.

▼B

Člen 4

1. Kopitarji pri pregledu ne smejo kazati nobenih kliničnih znakov bolezni. Pregled je treba opraviti v 48 urah pred njihovim vkrcavanjem ali natovarjanjem. Pri registriranih kopitarjih se ta pregled zahteva samo za trgovino znotraj Skupnosti, brez poseganja v člen 6.

2. Brez poseganja v zahteve iz odstavka 5 v zvezi z boleznimi, ki jih je obvezno treba prijaviti, se mora uradni veterinar ob pregledu prepričati — predvsem na podlagi izjav lastnika ali rejca — da ni razlogov, na podlagi katerih bi lahko sklepali, da so bili ti kopitarji 15 dni pred pregledom v stiku s kopitarji, ki so zboleli za nalezljivo ali kužno boleznijo.

3. Kopitarji ne smejo biti namenjeni za zakol v skladu z nacionalnim programom za izkoreninjenje kužnih ali nalezljivih bolezni.

4. Kopitarji morajo biti identificirani na naslednji način:

(i) registrirani konji morajo imeti identifikacijski dokument, kakor je predvideno z Direktivo 90/427/EGS ([1]), ki mora zlasti potrjevati skladnost s členom 5(5) in (6). Uradni veterinar bo moral za čas prepovedi, predvidene v odstavku 5 ali v členu 5, prekiniti veljavnost tega dokumenta. Dokument se mora po zakolu registriranega konja vrniti organu, ki ga je izdal. Postopek za izvedbo te točke Komisija sprejme v skladu s postopkom, določenim v členu 24;

(ii) kopitarji za rejo in rabo se morajo identificirati po metodi, ki jo Komisija uvede v skladu s postopkom, določenim v členu 24.

Dokler se ne začne uporabljati ta metoda, veljajo uradno odobrene nacionalne metode za identifikacijo, pod pogojem, da se o njih v roku treh mesecev od datuma sprejetja te direktive pisno obvestijo Komisija in druge države članice.

5. Poleg zahtev, določenih v členu 5, kopitarji ne smejo prihajati z gospodarstva, ki je bilo predmet enega od naslednjih prepovednih ukrepov:

(a) če niso bile zaklane vse živali iz vrst, dovzetnih za bolezen, ki se nahajajo na gospodarstvu, mora biti obdobje prepovedi za gospodarstvo izvora najmanj:

— šest mesecev pri kopitarjih s sumom na spolno kugo konj od datuma zadnjega dejanskega ali možnega stika z bolno živaljo. Za žrebce prepoved velja, dokler žival ni kastrirana,

— šest mesecev pri smrkavosti ali konjskem encefalomielitisu od datuma, ko so bili kopitarji, ki so zboleli za to boleznijo, zaklani,

— pri infekcijski anemiji do datuma, ko so po zakolu okuženih živali preostale živali negativno reagirale na dva Cogginsova testa, izvedena v razmiku treh mesecev,

— šest mesecev pri vezikularnem stomatitisu;

— en mesec od zadnjega zaznanega primera pri steklini,

— petnajst dni od zadnjega zaznanega primera pri antraksu;

(b) če so bile vse živali vrste, dovzetne za bolezen, na gospodarstvu zaklane in prostori razkuženi, je obdobje prepovedi 30 dni od dneva, ko so bile živali uničene in prostori razkuženi, razen pri antraksu, za katerega traja obdobje prepovedi 15 dni;

Pristojni organi lahko odobrijo odstopanje od teh prepovednih ukrepov za hipodrome in dirkališča ter uradno obvestijo Komisijo o naravi vsakega odobrenega odstopanja.

([1]) UL L 224, 18.8.1990, str. 55.

▼B

6. Če država članica pripravi ali je pripravila prostovoljen ali obvezen program nadzora nad boleznimi, za katere so dovzetni kopitarji, lahko v šestih mesecih od notifikacije te direktive program predloži Komisiji, pri čemer navede predvsem:

— razširjenost bolezni na svojem ozemlju,

— razloge za program, pri čemer upošteva pomen bolezni ter prednosti stroškov in koristi programa,

— zemljepisno območje, kjer se bo program izvajal,

— statusne kategorije za obrate, standarde, ki morajo biti doseženi za vsako vrsto, in uporabljane postopke preskušanja,

— postopke spremljanja programa,

— predvidene ukrepe, če iz kakršnega koli razloga gospodarstvo izgubi svoj status,

— predvidene ukrepe, če bodo rezultati preiskav, opravljenih v skladu z določbami programa, pozitivni,

— nediskriminatorno naravo trgovine na ozemlju zadevne države članice glede na trgovino znotraj Skupnosti.

Komisija preuči programe, ki jih predložijo države članice. Kjer je primerno, jih odobri v skladu s postopkom, določenim v členu 24. Vsa dodatna jamstva, splošna ali specifična, ki se lahko zahtevajo v trgovini znotraj Skupnosti, se lahko določijo v skladu z istimpostopkom. Takšna jamstva ne smejo presegati tistih, ki jih država članica zahteva na svojem ozemlju.

Programe, ki jih predložijo države članice, je mogoče spreminjati ali dopolnjevati v skladu s postopkom, določenim v členu 25. Spremembe ali dopolnitve že odobrenih programov ali jamstev, ki so bila opredeljena v skladu z drugim pododstavkom, se lahko odobrijo po enakem postopku.

▼M4

Člen 5

1. Država članica, ki ni prosta konjske kuge v smislu člena 2(f), lahko odpošlje kopitarje z dela svojega ozemlja, ki se šteje za okuženo v smislu odstavka 2 tega člena, le pod pogoji iz odstavka 3 tega člena.

2. (a) Del ozemlja države članice se šteje za okuženega s konjsko kugo v naslednjih primerih:

— klinični, serološki (pri necepljenih živalih) in/ali epidemiološki dokazi kažejo na prisotnost konjske kuge v zadnjih dveh letih, ali

— v zadnjih 12 mesecih se je izvajalo cepljenje proti konjski kugi.

(b) Del ozemlja, ki se šteje za okuženega s konjsko kugo, mora imeti najmanj:

— okuženo območje s polmerom najmanj 100 km okoli vsakega središča infekcije,

— ogroženo območje, ki sega najmanj 50 km prek okuženega območja, v katerem v zadnjih 12 mesecih ni bilo opravljeno nobeno cepljenje.

(c) Pravila za nadzor ukrepov za zatiranje bolezni v zvezi z ozemlji in območji, na katere se nanašata točki (a) in (b), in ustrezna odstopanja so določena v Direktivi 92/35/EGS ([1]).

([1]) UL L 157, 10.6.1992, str. 19.

▼M4

(d) Vsi cepljeni kopitarji v okuženem območju morajo biti registrirani in identificirani v skladu s členom 6(1) Direktive 92/35/EGS.

V identifikacijskem dokumentu in/ali zdravstvenem spričevalu se takšno cepljenje tudi jasno navede.

3. Država članica lahko z ozemlja iz odstavka 2(b) odpošlje le kopitarje, ki izpolnjujejo naslednje zahteve:

(a) odposlati jih je treba samo v določenih obdobjih v letu, odvisno od dejavnosti insektov, ki prenašajo bolezen, ki se določijo v skladu s postopkom, določenim v členu 25;

(b) na dan pregleda iz člena 4(1) ne smejo kazati nobenega kliničnega znaka konjske kuge;

(c) — če niso bili cepljeni proti konjski kugi, morajo imeti opravljen test reakcije vezanja komplementa za konjsko kugo, opisan v Prilogi D, na katerega so reagirali negativno, in sicer dvakrat v razmiku od 21 do 30 dni med obema testoma, od katerih je zadnji opravljen v 10 dneh pred odpremo,

— če so bili cepljeni, niso smeli biti cepljeni v zadnjih dveh mesecih, vendar so morali opraviti test reakcije vezanja komplementa, opisan v Prilogi D, s prej navedenim razmikom, ne da bi se jim zvišalo število protiteles. Po postopku, določenem v členu 24, lahko Komisija po mnenju Znanstvenega veterinarskega odbora prizna druge metode spremljanja;

(d) najmanj 40 dni pred odpremo so morali biti v karanteni;

(e) v času karantene in prevoza iz karantenske postaje na kraj odpreme so morali biti zaščiteni pred insekti, ki prenašajo bolezen.

▼B

Člen 6

Države članice, ki za gibanje kopitarjev in registriranih kopitarjev po svojem ozemlju uporabljajo drugačne sisteme nadzora, zlasti z identifikacijskim dokumentom, vendar z enakimi jamstvi, kakor so določena v členu 4(5), lahko ena drugi vzajemno odobrijoodstopanja od drugega stavka člena 4(1) in druge alinee člena 8(1).

O tem uradno obvestijo Komisijo.

Člen 7

1. Kopitarje je treba čim prej, bodisi neposredno ali prek odobrenega sejma ali odobrenega zbirnega centra, kakor je opredeljeno v členu 3(6) Direktive 64/432/EGS, prepeljati z gospodarstva izvora do namembnega kraja v vozilih ali zabojnikih, ki se redno čistijo in z razkužilom dezinficirajo v časovnih presledkih, ki jih določi država članica pošiljateljica. Vozila morajo biti grajena tako, da iztrebki, stelja ali krma med prevozom ne morejo padati z vozila. Prevoz mora biti izveden tako, da se lahko učinkovito zaščiti zdravje in dobro počutje kopitarjev.

2. Namembna država članica lahko odobri splošno ali omejeno odstopanje od nekaterih zahtev člena 4(5) za katero koli žival s posebno označbo, da je predvidena za zakol, pod pogojem da je tako odstopanje navedeno v zdravstvenem spričevalu.

Kadar so odobrena taka odstopanja, je treba prepeljati kopitarje za zakol neposredno v določeno klavnico, kjer morajo biti zaklani v petih dneh od prihoda v klavnico.

3. Uradni veterinar mora evidentirati identifikacijsko številko ali številko identifikacijskega dokumenta zaklane živali in pristojnemu

▼B

organu kraja pošiljanja na njegovo zahtevo poslati potrdilo, da je bila žival zaklana.

Člen 8

1. Države članice zagotovijo, da:

— registrirane kopitarje, ki zapustijo gospodarstva, spremlja identifikacijski dokument, določen v členu 4(4), in potrdilo, predvideno v Prilogi B, če so namenjeni za trgovino znotraj Skupnosti,

— kopitarje za rejo, rabo in zakol med prevozom spremlja zdravstveno spričevalo v skladu s Prilogo C k tej direktivi.

Spričevalo ali, kadar gre za identifikacijski dokument, obrazec s podatki o zdravstvenem stanju, mora biti brez poseganja v člen 6 sestavljeno v 48 urah pred vkrcanjem in najpozneje zadnji delovni dan pred vkrcanjem vsaj v enem od uradnih jezikov države članice pošiljateljice in namembne države članice. Spričevalo je veljavno 10 dni. Spričevalo mora obsegati en sam list papirja.

2. Uvoz kopitarjev, ki niso registrirani, lahko namesto posameznih spričeval iz druge alinee odstavka 1 spremlja eno samo zdravstveno spričevalo na pošiljko.

▼M1

Člen 9

Pravila iz Direktive Sveta 90/425/EGS z dne 26. junija 1990 o veterinarskih in zootehničnih pregledih, ki se izvajajo v trgovini znotraj Skupnosti z nekaterimi živimi živalmi in proizvodi zaradi vzpostavitve notranjega trga ([1]), se uporabljajo predvsem za preglede v državi porekla, organizacijo in nadaljnje ukrepanje po pregledih, ki jih mora opraviti namembna država članica, in za ukrepe zaščite, ki jih je treba izvesti.

▼B

Člen 10

Veterinarski izvedenci Komisije lahko v obsegu, potrebnem za zagotavljanje enotnega izvajanja te direktive, v sodelovanju s pristojnimi nacionalnimi organi opravljajo preglede na kraju samem. Komisija o rezultatih takšnih pregledov obvesti države članice.

Države članice, na ozemlju katerih se pregled izvaja, zagotovijo izvedencem pri opravljanju njihovih dolžnosti vso potrebno pomoč.

Splošne določbe za uporabo tega člena se sprejmejo v skladu s postopkom, določenim v členu 24.

POGLAVJE III

Pravila za uvoz iz tretjih držav

Člen 11

1. Kopitarji, uvoženi v Skupnost, morajo izpolnjevati pogoje, določene v členih 12 do 16.

2. Do začetka veljavnosti odločitev, sprejetih skladno s členi 12 do 16, države članice pri uvozu kopitarjev iz tretjih držav uporabljajo pogoje, najmanj enakovredne tistim, ki izhajajo iz uporabe Poglavja II.

([1]) UL L 224, 18.8.1990, str. 29.

▼M8

Člen 12

1. Uvoz kopitarjev v Skupnost se dovoli le iz tretjih držav, ki so navedene na seznamu ali seznamih, ki so sestavljeni ali popravljeni v skladu s postopkom iz člena 24(2).

Ob upoštevanju zdravstvenega stanja in jamstev, ki jih dajejo tretje države za kopitarje, se v skladu s postopkom iz člena 24(2) lahko odloči, da se dovoljenje iz prejšnjega pododstavka uporablja za celotno ozemlje tretje države ali samo za del njenega ozemlja.

V ta namen in ob upoštevanju relevantnih mednarodnih standardov se upošteva, kako tretja država uporablja in izvaja te standarde, zlasti načelo regionalizacije na lastnem ozemlju in glede na njene zdravstvene zahteve za uvoz iz tretjih držav in iz Skupnosti.

2. Pri pripravi in popravkih seznamov iz odstavka 1 je treba zlasti upoštevati:

(a) zdravstveno stanje kopitarjev, drugih domačih živali in prosto živečih živali v tretji državi, s posebnim ozirom na bolezni eksotičnih živali in vse vidike splošnega zdravstvenega in okoljskega stanja v tretji državi, ki bi lahko predstavljali tveganje za zdravstveno in okoljsko stanje v Skupnosti;

(b) zakonodajo tretje države na področju zdravstvenega varstva in dobrega počutja živali;

(c) organizacijo pristojne veterinarske uprave in njenih inšpekcijskih služb, pristojnosti teh služb, nadzor, ki so mu podvržene, in sredstva, ki so jim na razpolago, vključno z osebjem in laboratorijskimi zmogljivostmi, da učinkovito izvajajo nacionalno zakonodajo;

(d) zagotovila, ki jih lahko da pristojna veterinarska uprava tretje države glede skladnosti ali enakovrednost z relevantnimi pogoji zdravstvenega varstva živali, ki se uporabljajo v Skupnosti;

(e) ali je tretja država članica Mednarodnega urada za kužne živalske bolezni (Office International des Epizooties - OIE) in rednost in hitrost podatkov, ki jih daje tretja država glede obstoja kužnih ali nalezljivih bolezni kopitarjev na njenem ozemlju, zlasti glede bolezni, navedenih v seznamu in v Prilogi A k tej direktivi;

(f) jamstva, ki jih zagotovi neposredno tretja država, da informira Komisijo in države članice:

  (i) v 24 urah od potrditve pojava bolezni kopitarjev iz Priloge A in od spremembe politike cepljenja za te bolezni;

  (ii) v ustreznem roku o vseh predlaganih spremembah v nacionalnih zdravstvenovarstvenih predpisih za kopitarje, zlasti glede uvoza;

  (iii) v rednih časovnih presledkih o zdravstvenem stanju kopitarjev na svojem ozemlju;

(g) izkušnje iz prejšnjih uvozov živih kopitarjev iz tretje države in rezultate izvedenih uvoznih kontrol;

(h) rezultate inšpekcij in/ali revizij, ki jih je Skupnost opravila v tretji državi, zlasti rezultate ocene pristojnih organov ali, na zahtevo Komisije, poročilo, ki so ga predložili pristojni organi o izvedenih inšpekcijah;

(i) pravila o preprečevanju in nadzoru kužnih ali nalezljivih bolezni, ki veljajo v tretji državi in njihovo izvajanje, vključno s pravili o uvozu kopitarjev iz tretjih držav.

3. Komisija poskrbi, da so javnosti na razpolago ažurne verzije seznamov, pripravljenih ali popravljenih v skladu z odstavkom 1.

▼M8

Ti seznami so lahko objavljeni skupaj z drugimi seznami, pripravljenimi za namene zdravstvenega varstva živali, in lahko tudi zajemajo vzorce zdravstvenih spričeval.

4. V skladu s postopkom iz člena 24(2) se določijo posebni uvozni pogoji za vsako tretjo državo ali skupino tretjih držav, ob upoštevanju zdravstvenega stanja kopitarjev v zadevni tretji državi ali tretjih državah.

5. V skladu s postopkom iz člena 24(2) se lahko sprejmejo podrobna pravila za uporabo tega člena in merila za vključitev tretjih držav ali delov tretjih držav v sezname iz odstavka 1.

▼B

Člen 13

1. Kopitarji morajo izhajati iz tretjih držav:

(a) ki so proste konjske kuge;

(b) ki so bile zadnji dve leti proste venezuelskega encefalomielitisa kopitarjev (VEE);

(c) ki so bile šest mesecev proste spolne kuge konj in smrkavosti.

2. Komisija lahko v skladu s postopkom, določenim v členu 24:

(a) odloči, da določbe odstavka 1 veljajo samo za del ozemlja tretje države.

Če se zahteve glede konjske kuge uporabljajo na regionalni osnovi, morajo biti izpolnjeni najmanj ukrepi, določeni v členu 5(2) in (3);

(b) zahteva dodatna jamstva za bolezni, ki so Skupnosti tuje.

Člen 14

Pred dnem nakladanja za prevoz v namembno državo članico morajo biti kopitarji v obdobju, ki se določi z odločbami, sprejetimi v skladu s členom 15, brez prekinitve nastanjeni na ozemlju ali delu ozemlja tretje države, v primeru regionalizacije pa na delu ozemlja, opredeljenem v skladu s členom 13(2)(a).

Izhajati morajo z gospodarstva pod veterinarskim nadzorom.

Člen 15

Uvoz kopitarjev z ozemlja tretje države ali njenega dela, kakor je opredeljeno v skladu s členom 13(2)(a), ki je na seznamu, sestavljenem v skladu s členom 12(1), se dovoli le, če kopitarji poleg zahtev iz člena 13:

(a) izpolnjujejo zahteve v zvezi z zdravstvenim varstvom živali, sprejete glede na zadevno vrsto in kategorijo kopitarjev v skladu s postopkom, določenim v členu 24, za uvoz kopitarjev iz navedene države.

Referenčna osnova za določanje pogojev v zvezi z zdravstvenim varstvom živali v skladu z odstavkom 1 so standardi, določeni v členih 4 in 5;

(b) če tretja država vsaj zadnjih šest mesecev ni prosta vezikularnega stomatitisa ali kužnega arteritisa, morajo kopitarji izpolnjevati naslednje zahteve:

(i) izhajati morajo z gospodarstva, ki je vsaj zadnjih šest mesecev prosto vezikularnega stomatitisa, in morajo pred odpremo negativno reagirati na serološki test;

▼B

(ii) v primeru kužnega artritisa morajo samci kopitarjev, ne glede na člen 19(ii), negativno reagirati na serološki test ali na test izolacije virusa ali na kateri koli drug test, ki jamči, da so živali proste virusa, in je priznan v skladu s postopkom, določenim v členu 24.

V skladu s postopkom, določenim v členu 24, in glede na mnenje Znanstvenega veterinarskega odbora lahko Komisija opredeli kategorije samcev kopitarjev, za katere velja ta zahteva.

Člen 16

1. Kopitarji morajo biti identificirani v skladu s členom 4(4) in spremljati jih mora spričevalo, ki ga izpolni uradni veterinar tretje države izvoznice. To spričevalo mora:

(a) biti izdano na dan nakladanja živali za pošiljanje v namembno državo članico ali, pri registriranih konjih, zadnji delovni dan pred vkrcanjem;

(b) biti sestavljeno v vsaj enem od uradnih jezikov namembnih držav članic in v enem od uradnih jezikov države članice, v kateri je izveden uvozni veterinarski pregled;

(c) spremljati živali v izvirniku;

(d) potrjevati, da živali izpolnjujejo zahteve te direktive in zahteve, določene v skladu s to direktivo, ki se nanašajo na uvoz iz tretjih držav;

(e) obsegati en sam list papirja;

(f) biti izpolnjeno za enega samega prejemnika ali, če gre za živali za zakol, za pošiljko, pod pogojem, da so živali pravilno označene in identificirane.

Države članice o uporabi te možnosti obvestijo Komisijo.

2. Spričevalo mora biti na obrazcu, ki ustreza vzorcu, sestavljenem v skladu s postopkom, določenim v členu 24.

Člen 17

Preglede izvajajo na kraju samem veterinarski izvedenci iz držav članic in Komisije, da preverijo, ali se v praksi uporabljajo določbe te direktive, zlasti člena 12(2).

Če bi se pri pregledu, izvedenem v okviru pogojev iz tega člena, pojavila pomembna dejstva v škodo odobrenemu gospodarstvu, Komisija o tem nemudoma obvesti države članice in sprejme odločbo o začasnem preklicu odobritve. Dokončna odločba se sprejme v skladu s postopkom, predvidenim v členu 25.

Komisija na predlog držav članic imenuje strokovnjake iz držav članic, ki jim bodo takšni pregledi zaupani.

Takšni pregledi se opravljajo v imenu Skupnosti, ki krije vse z njimi povezane stroške.

Pogostost pregledov in postopek se določi v skladu s postopkom, določenim v členu 24.

Člen 18

1. Kopitarji za zakol se takoj po prihodu v namembno državo članico odvedejo v klavnico, bodisi neposredno ali prek sejma ali zbirnega centra, in se v skladu z zahtevami v zvezi z zdravstvenim varstvom

▼B

živali zakoljejo v času, določenem s sklepi, ki so sprejeti na podlagi člena 15.

2. Brez poseganja v posebne pogoje, ki se lahko sprejmejo v skladu s postopkom, določenim v členu 24, lahko pristojni organ namembne države članice na podlagi zdravstvenega stanja živali določi klavnico, v katero je treba prepeljati te kopitarje.

Člen 19

Komisija lahko v skladu s postopkom, določenim v členu 24:

(i) odloči, da se mora uvoz iz tretje države ali dela tretje države omejiti na določene vrste ali kategorije;

(ii) ne glede na člen 15 določi posebne pogoje za začasen vstop registriranih kopitarjev ali kopitarjev za posebne namene na ozemlje Skupnosti ali za njihov ponovni vstop na ozemlje Skupnosti, če so bili začasno izvoženi;

(iii) določi pogoje za spremembo začasnega vstopa v trajnega;

▼M8

(iv) lahko določi referenčni laboratorij Skupnosti za eno ali več bolezni kopitarjev iz Priloge A in opredeli funkcije, naloge in postopke za sodelovanje z laboratoriji, odgovornimi za diagnosticiranje nalezljivih bolezni kopitarjev v državah članicah.

▼M2

———————

▼B

POGLAVJE IV

Končne določbe

Člen 22

Določbe te direktive, zlasti tiste iz drugega stavka člena 4(1) in členov 6, 8 in 21, se do 1. januarja 1993 znova proučijo v okviru predlogov o dokončni vzpostavitvi notranjega trga, o katerih Svet odloča s kvalificirano večino.

Člen 23

Komisija spremeni priloge k tej direktivi v skladu s postopkom, predvidenim v členu 25.

▼M7

Člen 24

1. Komisiji pomaga Stalni odbor za prehranjevalno verigo in zdravje živali, ustanovljen s členom 58 Uredbe (ES) št. 178/2002 ([1]).

2. Pri sklicevanju na ta člen se uporabljata člena 5 in 7 Sklepa 1999/468/ES ([2]).

Obdobje iz člena 5(6) Sklepa 1999/468/ES znaša tri mesece.

3. Odbor sprejme svoj poslovnik.

([1]) UL L 31, 1.2.2002, str. 1.
([2]) UL L 184,17.7.1999, str. 23.

▼M7

Člen 25

1. Komisiji pomaga Stalni odbor za prehranjevalno verigo in zdravje živali.

2. Pri sklicevanju na ta člen se uporabljata člena 5 in 7 Sklepa 1999/468/ES.

Obdobje iz člena 5(6) Sklepa 1999/468/ES znaša petnajst dni.

▼B

Člen 26

Člen 34 Direktive 72/462/EGS se uporablja za zahteve, določene v poglavju III te direktive.

Člen 27

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 1. januarja 1992. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Člen 28

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

▼B

PRILOGA A

BOLEZNI, KI JIH JE TREBA OBVEZNO PRIJAVITI

Obvezno je treba prijaviti naslednje bolezni:

— spolna kuga konj

— smrkavost

— konjski encefalomielitis (vseh vrst, vključno z VEE)

— infekciozna anemija

— steklina

— antraks

— konjska kuga

— vezikularni stomatitis

▼M3

PRILOGA B

PODATKI O ZDRAVSTVENEM STANJU (a)

Št. potnega lista .....

Spodaj podpisani potrjujem (b), da zgoraj opisani kopitar izpolnjuje naslednje zahteve:

(a) danes je bil pregledan in ne kaže nobenega kliničnega znaka bolezni;

(b) ni namenjen za zakol v skladu z nacionalnim programom za izkoreninjenje kužnih ali nalezljivih bolezni;

(c) — ne izvira z ozemlja ali dela ozemlja države članice/tretje države, kjer velja omejitev zaradi konjske kuge (c), ali

izvira z ozemlja ali dela ozemlja države članice, kjer je veljala prepoved zaradi zdravstvenega stanja živali in je uspešno prestal testiranje, predvideno v členu 5(3) Direktive 90/426/EGS, v karantenskem objektu ..... med ..... in ..... (c);

— ni cepljen proti konjski kugi ali je bil cepljen proti konjski kugi dne ..... (c) (d);

(d) ne izvira z gospodarstva, kjer je veljala prepoved zaradi zdravstvenega stanja živali, in prav tako ni bil v stiku s konji z gospodarstva, kjer je veljala prepoved:

— šest mesecev v primeru konj, pri katerih se sumi okužba s spolno kugo konj, od datuma zadnjega dejanskega ali možnega stika z bolno živaljo. Za žrebce prepoved velja, dokler žival ni kastrirana,

— šest mesecev v primeru smrkavosti ali konjskega encefalomielitisa od datuma, ko so bili kopitarji, ki so za tozadevno boleznijo zboleli, zaklani,

— v primeru infekciozne anemije do datuma, ko so po zakolu okuženih živali preostale živali negativno reagirale na dva Cogginsova testa, izvedena v razmiku treh mesecev,

— šest mesecev od zadnjega primera v primeru vezikularnega stomatitisa,

— šest mesecev od zadnjega primera v primeru stekline,

— 15 dni od zadnjega primera v primeru antraksa,

— če so bile vse dovzetne živali za bolezen na gospodarstvu zaklane in prostori razkuženi v 30 dneh od dneva, ko so bile živali pokončane, razen v primeru antraksa, za katerega traja obdobje prepovedi 15 dni;

(e) kolikor mi je znano, 15 dni pred to izjavo ni bil v stiku s kopitarji, ki so zboleli za nalezljivo ali kužno boleznijo;

▼(f) v času pregleda so bile zgoraj navedene živali sposobne za načrtovani prevoz v skladu z določbami Direktive 91/628/EGS (c). ◄

Datum	Kraj	Žig in podpis uradnega veterinarja (1)

(1) Ime s tiskanimi črkami in službeni položaj.

(a) Teh podatkov se ne zahteva, če obstaja dvostranski sporazum v skladu s členom 6 Direktive 90/426/EGS.
(b) Velja 10 dni.
(c) Neustrezno prečrtaj.
(d) Datum cepljenja mora biti vpisan v potni list.
▼(c) Ta izjava ne izvzema prevoznikov od izpolnjevanja njihovih obveznosti v skladu z veljavnimi predpisi Skupnosti, predvsem glede sposobnosti živali za prevoz. ◄

▶(1) (2) M5

▼M3

PRILOGA C

VZOREC

ZDRAVSTVENO SPRIČEVALO

za trgovino med državami članicami EGS

KOPITARJI

Št. .....

Država članica pošiljateljica: .....

Pristojno ministrstvo: .....

Pristojna lokalna služba: .....

I. **Število kopitarjev:** .....

II. **Identifikacija kopitarjev:**

Število kopitarjev (1)	Vrste konj, oslov, mul, mezgov	Pasma Starost Spol	Metoda identifikacije in identifikacija (2)

(1) V primeru živali za zakoli, narava posebne oznake.
(2) K temu spričevalu se lahko doda potni list konja, če se vpiše številko lista.

III. **Izvor in namembni kraj živali:**

Žival/-i se pošilja

iz: .....

(Kraj izvoza)

v: .....

(Namembna država članica in kraj)

Ime in naslov pošiljatelja: .....

.....

Ime in naslov prejemnika: .....

.....

IV. **Podatki o zdravstvenem stanju** (a)

Spodaj podpisani potrjujem, da opisana(-e) žival(-i) izpolnjuje(-jo) naslednje zahteve:

1. danes je/so bila(-e) pregledana(-e) in ne kaže(-jo) nobenega kliničnega znaka bolezni;
2. ni(so) za zakol v skladu z nacionalnim programom za izkoreninjenje kužnih ali nalezljivih bolezni;

(a) Teh podatkov se ne zahteva, če obstaja dvostranski sporazum v skladu s členom 6 Direktive 90/426/EGS."

▼M3

3. — ne izvira(-jo) z ozemlja ali dela ozemlja države članice/tretje države, kjer veljajo omejitve zaradi konjske kuge,

ali

izvira(-jo) z ozemlja ali dela ozemlja države članice, kjer je veljala prepoved zaradi konjske kuge, in je/so uspešno prestala(-e) testiranje, predvideno v členu 5(3) Direktive 90/426/EGS v karantenskem objektu ..... med ..... in ..... (b);

— ni(so) cepljena(-e) proti konjski kugi

ali

je/so bila(-e) cepljena(-e) proti konjski kugi dne ..... (b);

4. ne izvira(-jo) s gospodarstva, kjer je veljala prepoved zaradi zdravstvenega stanja živali, in prav tako ni(so) bila(-e) v stiku s konji z gospodarstva, kjer je veljala prepoved zaradi zdravstvenega stanja živali:

— šest mesecev v primeru kopitarjev s sumom na spolno kugo konj od datuma zadnjega dejanskega ali možnega stika z bolno živaljo. Za žrebce prepoved velja, dokler žival ni kastrirana,

— šest mesecev v primeru smrkavosti ali konjskega encefalomielitisa od datuma, ko so bili kopitarji, ki so za zadevno boleznijo zboleli, zaklani,

— v primeru infekciozne anemije do datuma, ko so po zakolu okuženih živali preostale živali negativno reagirale na dva Cogginsova testa, izvedena v razmiku treh mesecev,

— šest mesecev od zadnjega primera v primeru vezikularnega stomatitisa,

— šest mesecev od zadnjega primera v primeru stekline,

— 15 dni od zadnjega primera v primeru antraksa,

— če so bile vse dovzetne živali za bolezen na gospodarstvu zaklane in prostori razkuženi v 30 dneh od dneva, ko so bile živali pokončane, razen v primeru antraksa, za katerega je obdobje prepovedi 15 dni;

5. kolikor mi je znano, 15 dni pred to izjavo ni(so) bila(-e) v stiku s kopitarji, ki so zboleli za nalezljivo ali kužno boleznijo;

►(a) 6. v času pregleda je bil/so bili sposobni za načrtovani prevoz v skladu z določbami Direktive 91/628/EGS (d). ◄

V. **To spričevalo velja 10 dni.**

(Kraj) ....., (datum) .....

Žig

.....

(Podpis)
(Ime s tiskanimi črkami in službeni položaj uradnega veterinarja) (c)

(b) Neustrezno prečrtaj.

(c) V Nemčiji ‚Beamteter Tierarzt'; v Belgiji ‚Inspecteur vétérinaire' ali ‚Inspecteur Dierenarts'; v Franciji ‚Vétérinaire officiel'; v Italiji ‚Veterinario ufficiale'; v Luksemburgu ‚Inspecteur vétérinaire'; na Nizozemskem ‚Officieel Dierenarts'; na Danskem ‚Embeds Dyrlaege'; na Irskem ‚Veterinary Inspector'; v Združenem kraljestvu ‚Veterinary Inspector'; v Grčiji ‚Επίσημος κτηνίατρος'; v Španiji ‚Inspector Veterinario'; na Potrugalskem ‚Inspector Veterinário'►1"; v Avstrija ‚Amtstierarzt'; v Finska ‚Kunnaneläinlääkäri' ali ‚Kaupungineläinlääkäri' ali ‚Lääninneläinlääkäri' /‚Kommunalveterinär' ali ‚Stadsveterinär' ali ‚Länsveterinär'; v Švedska ‚Änsveterinär', ‚Distriktsveterinär' ali ‚Gränsveterinär'; ◄►"na Češkem ‚Veterinární Inspektor'; v Estoniji ‚Veterinaarjärelevalve Ametnik'; na Cipru ‚ΕπίσημοςΚτηνίατρος'; v Latviji ‚Veterinārais Inspektors'; v Litvi ‚Veterinarijos Inspektorius'; na Madžarskem ‚Hatósági Állatorvos'; na Malti ‚Veterinarju Uficjali'; na Poljskem ‚Urzędowy Lekarz Weterynarii'; v Sloveniji ‚Veterinarski Inšpektor'; in na Slovaškem ‚Veterinárny Inšpektor' ◄.►[1] v Bolgariji "ветеринарен инспектор"; v Romuniji "medic veterinar autorizat". ◄

►(d) Ta izjava ne izvzema prevoznikov od izpolnjevanja njihovih obveznosti v skladu z veljavnimi predpisi Skupnosti, predvsem glede sposobnosti živali za prevoz. ◄

►(1) **A1**

►(2) (3) **M5**

►(4) **A2**

►(5) **M9**

▼M6

PRILOGA D

KONJSKA KUGA

DIAGNOSTIKA

Reagente za spodaj opisane encimskoimunske teste (ELISA) je mogoče dobiti v referenčnem laboratoriju Evropske unije ali Referenčnih laboratorijev OIE za konjsko kugo.

1. KOMPETITIVNI TEST ELISA ZA ODKRIVANJE PROTITELES PROTI VIRUSU KONJSKE KUGE (VKK) (PREDPISANI TEST)

Kompetitivni test ELISA se uporablja za odkrivanje specifičnih protiteles proti VKK v serumu katere koli vrste kopitarjev. Polispecifičen, poliklonski imunski anti-VKK serum buder (v nadaljevanju „budrin antiserum“) je specifičen za serološko skupino in je z njim možno prepoznati vse znane serotipe virusa konjske kuge.

Princip testa je prekinitev reakcije med antigeni VKK in budrinim antiserumom z vzorcem preiskovanega seruma. Protitelesa proti VKK v preiskovanem serumu bodo tekmovala s tistimi iz budrinega antiseruma, kar bo posledično povzročilo manj intenzivno obarvanost od pričakovane (po dodatku z encimom označenih protiteles proti budrinim protitelesom in substrata). Serumi se lahko testirajo bodisi pri redčenju 1:5 (metoda točkovnega testa) ali pa se titrirajo (metoda titracije seruma) kjer se določijo končne točke razredčin. Vrednosti inhibicije, ki so večje kot 50 %, se lahko obravnavajo kot pozitivne.

Spodaj opisani testni protokol se uporablja v Regionalnem referenčnem laboratoriju za konjsko kugo v Pirbrightu, Združeno kraljestvo.

1.1 **Postopek testa**

1.1.1 *Priprava plošč*

1.1.1.1 V ELISA plošče nanesemo antigen VKK, ekstrahiran iz okuženih celičnih kultur in razredčen v karbonatnem/bikarbonatnem pufru, pH 9,6. ELISA plošče inkubiramo čez noč na 4 °C.

1.1.1.2 Plošče trikrat speremo s polnjenjem in praznjenjem vdolbinic s fosfatnim pufrom (PBS), pH 7,2 do 7,4, in osušimo s pivnanjem na vpojnem papirju.

1.1.2 *Kontrolne vdolbinice*

1.1.2.1 Pozitivne kontrolne serume titriramo v serijah dvakratnih redčenj, od 1:5 do 1:640, v stolpcu 1 v pufru za blokiranje (PBS z 0,05 % (volumski delež) Tween-20, 5,0 % (utežni delež) posnetega mleka v prahu (Cadbury's Marvel™) in 1 % (volumski delež) govejega seruma), tako da dobimo končni volumen 50 µl/vdolbinico.

1.1.2.2 V vdolbinici A in B stolpca 2 dodamo 50 µl negativnega kontrolnega seruma v razredčini 1:5 (10 µl seruma + 40 µl pufra za blokiranje).

1.1.2.3 V vdolbinici C in D stolpca 2 (slepa kontrola) dodamo po 100 µl pufra za blokiranje.

1.1.2.4 V vdolbinice E, F, G in H stolpca 2 (budrina kontrola) dodamo po 50 µl pufra za blokiranje.

1.1.3 *Metoda točkovnega testa*

1.1.3.1 V po dve vdolbinici stolpcev 3 do 12 dodamo redčenje vsakega preiskovanega seruma v razmerju 1:5 v pufru za blokiranje (10 µl seruma + 40 µl pufra za blokiranje).

ali

1.1.4 *Metoda titracije seruma*

1.1.4.1 Pripravimo serije dvakratnih razredčin vsakega preiskovanega vzorca (1: 5 do 1: 640) v pufru za blokiranje preko osmih vdolbinic posameznega stolpca (3 do 12).

potem

▼M6

1.1.5 V vse vdolbinice razen v vdolbinice slepe kontrole ELISA plošče dodamo 50 µl budrinega antiseruma, razredčenega v pufru za blokiranje, (vse vdolbinice sedaj vsebujejo končni volumen 100 µl).

1.1.5.1 Inkubiramo 1 uro pri 37 °C na rotacijskem tresalniku.

1.1.5.2 Plošče trikrat speremo in osušimo kot prej.

1.1.5.3 V vsako vdolbinico dodamo po 50 µl kunčjega anti-budrinega konjugata, označenega s hrenovo peroksidazo (HRP), redčenega v pufru za blokiranje.

1.1.5.4 Inkubiramo 1 uro pri 37 °C na rotacijskem tresalniku.

1.1.5.5 Plošče trikrat speremo in osušimo kot prej.

1.1.6 *Kromogen*

Pripravimo raztopino OPD (OPD = orto-fenildiamin) kromogena po navodilih proizvajalca (0,4 mg/ml v sterilni destilirani vodi) neposredno pred uporabo. Dodamo substrat (vodikov peroksid = H_2O_2), da dobimo končno koncentracijo 0,05 % (volumski delež) (redčenje 1:2000 30 % raztopine H_2O_2). Dodamo po 50 µl OPD raztopine v vsako vdolbinico in plošče za 10 minut pustimo na pultu pri temperaturi okolja. Reakcijo prekinemo z dodatkom 50 µl 1 M žveplene kisline (H_2SO_4)/vdolbinico.

1.1.7 *Odčitavanje*

Spektofotometrično odčitavamo pri valovni dolžini 492 nm.

1.2 **Prikaz rezultatov**

1.2.1 S pomočjo programskega paketa izpišemo vrednosti absorbance (A) in procent inhibicije (PI) za preiskovane in kontrolne serume na podlagi povprečne vrednosti budrinih kontrol, zabeleženih v štirih vdolbinicah. Podatki, prikazani kot A in PI vrednosti, se uporabijo za ugotavljanje, ali je uspešnost testa v dovoljenih mejah. Zgornje kontrolne meje (ZKM) in spodnje kontrolne meje (SKM) za budrino kontrolo so med vrednostmi A = 1,4 oziroma A = 0,4. Končni titer pozitivne kontrole na temelju 50 % PI bi moral biti pri redčenju 1:240 (v razponu od 1:120 do 1:480). Katera koli plošča, ki ne ustreza zgoraj navedenim kriterijem, mora biti zavržena. Vendar pa se lahko negativni vzorci sprejmejo, če je titer pozitivne kontrole večji kot 1:480 in so preiskovani vzorci še vedno negativni.

Dvojniki vdolbinic z negativno kontrolo seruma in dvojniki vdolbinic slepe kontrole bi morali doseči vrednost PI med + 25 % in – 25 % oziroma med + 95 % in + 105 %. Če vrednosti niso znotraj predpisanih mej, plošča ni neveljavna, da pa slutiti, da se razvija barva ozadja.

1.2.2 Diagnostični prag (mejna vrednost) preiskovanih serumov je 50 % (PI 50 %). Vzorci, ki imajo vrednosti PI večje od 50 %, se vrednotijo kot pozitivni. Vzorci, ki imajo vrednosti PI manjše od 50 %, se vrednotijo kot negativni.

Vzorci z vrednostmi PI nad in pod pragom v dvojnikih vdolbinic se obravnavajo za dvomljive. Takšne vzorce bi bilo treba ponovno testirati s točkovnim testom in s titracijo. Pozitivne vzorce se lahko tudi titrira, da se dobi stopnjo pozitivnosti.

▼**M6**

Načrt točkovnega testa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ kont.		Preiskovani serumi									
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	Slepa kont.										
D	1:40	Slepa kont.										
E	1:80	GP kont.										
F	1:160	GP kont.										
G	1:320	GP kont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	1:640	GP kont.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

– kont. = negativna kontrola
+ kont. = pozitivna kontrola
GP kont. = budrina kontrola

Načrt titracijskega testa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	+ kont.		Preiskovani serumi									
A	1:5	– kont.	1:5									1:5
B	1:10	– kont.	1:10									1:10
C	1:20	Slepa kont.	1:20									1:20
D	1:40	Slepa kont.	1:40									1:40
E	1:80	GP kont.	1:80									1:80
F	1:160	GP kont.	1:160									1:160
G	1:320	GP kont.	1:320									1:320
H	1:640	GP kont.	1:640									1:640

– kont. = negativna kontrola
+ kont. = pozitivna kontrola
GP kont. = budrina kontrola

2. INDIREKTNI TEST ELISA ZA ODKRIVANJE PROTITELES PROTI VIRUSU KONJSKE KUGE (VKK) (PREDPISANI TEST)

Spodaj opisani test je v skladu z opisom testa iz Poglavja 2.1.11 OIE *Priročnika standardov za diagnostične teste in cepiva*, četrta izdaja, 2000.

Rekombinantni VP7 protein se je uporabljal kot antigen za določanje protiteles proti VKK z visokim indeksom občutljivosti in specifičnosti. Drugi prednosti sta, da je stabilen in da ni kužen.

2.1 **Postopek testa**

2.1.1 *Trdna faza*

2.1.1.1 V ELISA plošče nanesemo rekombinantni VKK-4 VP7, razredčen v karbonatnem/bikarbonatnem pufru, pH 9,6. Plošče inkubiramo čez noč na 4 °C.

2.1.1.2 Plošče petkrat speremo z destilirano vodo, ki vsebuje 0,01 % (volumski delež) Tween 20 (spiralna raztopina). S ploščo nežno potolčemo po vpojenem materialu, da odstranimo ostanke spiralne tekočine.

▼M6

2.1.1.3 Plošče blokiramo s fosfatnim pufrom (PBS) + 5 % (utežni delež) posnetega mleka v prahu (Nestlé Dry Skim Milk™), 200 µl/vdolbinico, za 1 uro na 37 °C.

2.1.1.4 Odstranimo pufer za blokiranje in nežno potolčemo s ploščo po vpojenem materialu.

2.1.2 *Preiskovani vzorci*

2.1.2.1 Serumski vzorci, pozitivni in negativni kontrolni serum se redčijo 1:25 v PBS + 5 % (utežni delež) posnetega mleka + 0,05 % (volumski delež) Tween 20, 100 µl na vdolbinico. Inkubiramo 1 uro na 37 °C.

Za titracijo pripravimo serije dvakratnih razredčin od 1:25 (100 µl/vdolbinico), en vzorec seruma na stolpec plošče, isto naredimo s pozitivnim in negativnim kontrolnim serumom. Inkubiramo 1 uro na 37 °C.

2.1.2.2 Plošče speremo, kot je opisano v koraku 2.1.1.2.

2.1.3 *Konjugat*

2.1.3.1 V vdolbinice dodamo po 100 µl anti-konjskih gama globulinov, označenih s hrenovo peroksidazo (HRP), razredčenih v PBS + 5 % mleka + 5 % Tween 20, pH 7,2. Inkubiramo 1 uro na 37 °C.

2.1.3.2 Plošče speremo, kot je opisano v koraku 2.1.1.2.

2.1.4 *Kromogen/substrat*

2.1.4.1 V vdolbinice dodamo po 200 µl raztopine kromogena/substrata (10 ml 80,6 mM DMAB (dimetil aminobezaldehid) + 10 ml 1,56 mM MBTH (3-metil-2-benzo-tiazolin hidrazon hidroklorid) + 5 µl H_2O_2)

Razvijanje barve se ustavi z dodatkom 50 µl 3N H_2SO_4 po približno 5 do 10 minutah (preden se začne barvati negativna kontrola).

Lahko se uporabijo tudi drugi kromogeni, kot so ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina]), TMB (tetra-metil benzidin) ali OPD (orto-fenildiamin).

2.1.4.2 Plošče odčitamo pri 600 nm (ali 620 nm).

2.2 **Interpretacija rezultatov**

2.2.1 Izračunamo mejno vrednost, tako da vrednosti negativne kontrole dodamo 0,6 (0,6 je standardna deviacija, dobljena s skupino 30 negativnih serumov).

2.2.2 Preiskovani vzorci, ki dajo vrednosti absorbance nižje od mejne vrednosti, se smatrajo kot negativni.

2.2.3 Preiskovani vzorci, ki dajo vrednosti absorbance višje od mejne vrednosti + 0,15, se obravnavajo kot pozitivni.

2.2.4 Preiskovani vzorci, ki dajo vmesne vrednosti absorbance, so dvomljivi, tako da je potrebno za potrditev rezultata uporabiti drugo metodo.

3. BLOKING ELISA TEST ZA ODKRIVANJE PROTITELES PROTI VIRUSU KONJSKE KUGE (VKK) (PREDPISANI TEST)

Bloking test ELISA je namenjen odkrivanju specifičnih protiteles proti VKK v serumih katere koli dovzetne vrste. VP7 je glavni, antigeni, virusni protein VKK, in je ohranjen v devetih serotipih. Ker je monoklonsko protitelo (Mpt) prav tako usmerjeno proti VP7, ima test visoko občutljivost in specifičnost. Ob tem je rekombinantni VP7 antigen popolnoma neškodljiv in zato zagotavlja visoko stopnjo varnosti.

Princip testa je prekinitev reakcije med rekombinantnim VP7, antigenom, vezanim na ELISA ploščo, in markiranim Mpt, specifičnim za VP7. Protitelesa v preiskovanem serumu bodo preprečila reakcijo med antigenom in Mpt, kar bo povzročilo manjšo intenziteto obarvanja.

Spodaj opisani test se opravlja v Referenčnem laboratoriju Evropske Skupnosti za konjsko kugo v Algetu v Španiji.

▼M6

3.1 **Postopek testa**

3.1.1 *ELISA plošče*

3.1.1.1 V ELISA plošče nanesemo rekombinantni VKK-4 VP7, razredčen v karbonatnem/bikarbonatnem pufru, pH 9,6. Inkubiramo čez noč na 4 °C.

3.1.1.2 Plošče petkrat speremo s fosfatnim pufrom (PBS), ki vsebuje 0,05 % (volumski delež) Tween 20 (PBST).

3.1.1.3 Ploščo stabiliziramo z obdelavo v stabilizacijski raztopini (da omogočimo daljše shranjevanje pri 4 °C brez izgube aktivnosti) in osušimo na vpojnem materialu.

3.1.2 *Preiskovani vzorci in kontrole*

3.1.2.1 Za pregled: preiskovani serum in kontrole razredčimo 1: 10 neposredno na plošči v PBST, da dobimo končni volumen 100 µl/vdolbinico. Inkubiramo 1 uro pri 37 Code en erreur: 8eJC.

3.1.2.2 Za titracijo: pripravimo serijo dvakratnih razredčin preiskovanih serumov in pozitivne kontrole (100 µl/vdolbinico) od 1:10 do 1:1 280 preko osmih vdolbinic. Negativna kontrola se testira pri redčenju 1: 10.

3.1.3 *Konjugat*

V vsako vdolbinico dodamo po 50 µl razredčenih Mpt (monoklonska protitelesa, specifična za VP7), označenih s hrenovo peroksidazo (HRP) in nežno pomešamo, da zagotovimo homogenost. Inkubiramo 30 minut pri 37 °C.

3.1.4 Plošče petkrat speremo s PBST in osušimo s pivnanjem, kot je opisano zgoraj.

3.1.5 *Kromogen/substrat*

V vdolbinice dodamo po 100 µl raztopine kromogena/substrata (1 ml ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina]) 5 mg/ml + 9 ml substratnega pufra (0,1 M fosfatno-citratni pufer s pH 4, ki vsebuje 0,03 % H_2O_2) in inkubiramo 10 minut pri sobni temperaturi. Razvoj barve se ustavi z dodatkom 100 µl 2 % (utežni delež) SDS (natrijev dodecil sulfat) v vdolbinico.

3.1.6 *Odčitavanje*

V ELISA čitalcu odčitamo pri 405 nm.

3.2 **Interpretacija rezultatov**

3.2.1 *Validacija testa*

Test je veljaven, ko je absorbanca (A) negativne kontrole (NK) večja od 1,0 in A pozitivne kontrole (PK) manjša od 0,2.

3.2.2 *Izračun mejne vrednosti*

$$\text{Pozitivna mejna vrednost} = \text{NK} - ((\text{NK} - \text{PK}) \tilde{n} 0,3)$$

$$\text{Negativna mejna vrednost} = \text{NK} - ((\text{NK} - \text{PK}) \tilde{n} 0,2)$$

Kjer je NK absorbanca negativne kontrole in PK absorbanca pozitivne kontrole.

3.2.3 *Interpretacija rezultatov*

Vzorci, ki imajo A manjšo od pozitivne mejne vrednosti, bi se morali obravnavati kot pozitivni na protitelesa proti VKK.

Vzorci, ki imajo A večjo od negativne mejne vrednosti, bi se morali obravnavati kot negativni na protitelesa proti VKK.

▼**M6**

Vzorci z A med tema dvema vrednostma bi se morali obravnavati kot dvomljivi in pri teh živalih bi se moralo po dveh do treh tednih opraviti ponovno vzorčenje.