

Tento dokument slouží výhradně k informačním účelům a nemá žádný právní účinek. Orgány a instituce Evropské unie nenesou za jeho obsah žádnou odpovědnost. Závazná znění příslušných právních předpisů, včetně jejich právních východisek a odůvodnění, jsou zveřejněna v Úředním věstníku Evropské unie a jsou k dispozici v databázi EUR-Lex. Tato úřední znění jsou přímo dostupná přes odkazy uvedené v tomto dokumentu

► **B**

**SMĚRNICE RADY 2009/156/ES**

**ze dne 30. listopadu 2009**

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

**(kodifikované znění)**

**(Text s významem pro EHP)**

(Úř. věst. L 192, 23.7.2010, s. 1)

Ve znění:

		Úřední věstník		
		Č.	Strana	Datum
► <b><u>M1</u></b>	Směrnice Rady 2013/20/EU ze dne 13. května 2013	L 158	234	10.6.2013
► <b><u>M2</u></b>	Prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2016/1840 ze dne 14. října 2016	L 280	33	18.10.2016

**SMĚRNICE RADY 2009/156/ES****ze dne 30. listopadu 2009****o veterinárních pravidlech pro přesun koňovitých a jejich dovoz ze třetích zemí****(kodifikované znění)****(Text s významem pro EHP)**

## KAPITOLA I

**OBEČNÁ USTANOVENÍ***Článek 1*

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

*Článek 2*

Pro účely této směrnice se rozumí:

- a) „hospodářstvím“ zemědělské nebo výcvikové zařízení, stáj nebo obecně jakékoliv prostory nebo zařízení, ve kterých se koňoví obvykle drží nebo chovají pro jakékoliv účely;
- b) „koňovitými“ volně žijící nebo domácí zvířata druhů rodu *Equus* (včetně koňů, zeber a oslů) nebo potomci křížení těchto druhů;
- c) „evidovanými koňovitými“ koňoví evidovaní podle směrnice Rady 90/427/EHS ze dne 26. června 1990 o zootechnických a genealogických podmínkách pro obchod s koňovitými uvnitř Společenství<sup>(1)</sup> a identifikovaní pomocí identifikačního dokladu vydaného:
  - i) chovatelským úřadem nebo jiným příslušným orgánem země původu zvířete, který vede plemennou knihu nebo evidenci pro dané plemeno zvířat, nebo
  - ii) některým mezinárodním sdružením nebo organizací, která se zabývá závodními nebo dostihovými koňmi;
- d) „jatečnými koňovitými“ koňoví určení k porážce na jatkách, a to buď přímo po přepravě, nebo po tranzitu přes schválené sběrné středisko uvedené v článku 7;
- e) „plemennými a užitkovými koňovitými“ koňoví jiní než uvedení v písmenech 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) ani epizootologický důkaz moru koní na dotyčném území v posledních dvou letech a kde nebylo provedeno očkování proti této nákaze během posledních dvanácti měsíců;

<sup>(1)</sup> Úř. věst. L 224, 18.8.1990, s. 55.

**▼ B**

- g) „chorobami povinnými hlášením“ nákazy uvedené v příloze I;
- h) „úředním veterinárním lékařem“ veterinární lékař určený příslušným ústředním orgánem členského státu nebo třetí země;
- i) „dočasným vstupem“ status evidovaného koňovitého pocházejícího ze třetí země, kterému byl povolen vstup na území Společenství na dobu kratší než 90 dnů, stanovenou postupem podle čl. 21 odst. 2 v závislosti na nálezové situaci v zemi původu.

## KAPITOLA II

## PRAVIDLA PRO PŘESUN KOŇOVITÝCH MEZI ČLENSKÝMI STÁTY

*Článek 3*

Členské státy povolí přesun evidovaných koňovitých na svém území nebo odeslání koňovitých do jiného členského státu pouze v případě, že jsou splněny podmínky stanovené v člácích 4 a 5.

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

- jsou využíváni k jízdě nebo k vodění pro sportovní nebo rekreační účely 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 určení výhradně pro dočasnou pastvu nebo práci v blízkosti vnitřních hranic Společenství.

Členské státy, které tyto možnosti využijí, sdělí Komisi rozsah udělených výjimek.

*Článek 4*

1. Koňovití nesmějí při prohlídce vykazovat žádný klinický příznak nákazy. Prohlídka musí být provedena během 48 hodin před jejich naložením. 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 dotčení koňovití byli ve styku s koňovitými postiženými nákazou během patnácti dnů bezprostředně předcházejících prohlídce.

**▼B**

3. Koňovití nesmějí být určeni k utracení v rámci národního programu eradikace nákazy.

4. Koňovití musí být identifikováni takto:

a) evidování koňovití pomocí identifikačního dokladu podle směrnice 90/427/EHS, který musí potvrzovat zejména soulad s odstavci 5 a 6 tohoto článku a s článkem 5 této směrnice.

Úřední veterinární lékař pozastaví platnost tohoto identifikačního dokladu pro účely přesunu po dobu karantény podle odstavce 5 tohoto článku nebo článku 5 této směrnice. Po porážce evidovaného koně je identifikační doklad vrácen orgánu, který jej vydal. Prováděcí pravidla k tomuto písmenu se přijímají postupem podle čl. 21 odst. 2;

b) plemenní a užitkoví koňovití identifikační metodou stanovenou postupem podle čl. 21 odst. 2.

5. Vedle požadavků stanovených v článku 5 nesmějí koňovití pocházet z hospodářství, které podléhá některé z následujících karantén:

a) pokud nebyla všechna zvířata druhů vnímavých k nákaze, která jsou umístěna v hospodářství, poražena nebo utracena, musí doba karantény pro hospodářství původu trvat alespoň:

i) šest měsíců ode dne posledního skutečného nebo možného styku s nakaženým zvířetem v případě koňovitých podezřelých z hřebčí nákazy. V případě hřebce však karanténa platí až do jeho kastrace,

ii) šest měsíců ode dne porážky nebo utracení koňovitých postižených danou nákazou v případě vozhrivky nebo encefalomyelitidy koní,

iii) do dne, kdy po zneškodnění nakažených zvířat vykázala zbývající zvířata negativní reakci při dvou vyšetřeních testem podle Cogginse provedených v rozmezí tří měsíců v případě nakažlivé chudokrevnosti koní,

iv) šest měsíců v případě vezikulární stomatitidy,

v) jeden měsíc od posledního zaznamenaného případu v případě vztekliny,

vi) 15 dnů od posledního zaznamenaného případu v případě sněti slezinné;

**▼ B**

- b) pokud nebyla všechna zvířata druhů vnímavých k nákaze, která jsou umístěna v hospodářství, poražena nebo utracena a prostory dezinfikovány, trvá karanténa 30 dnů počínaje dnem zneškodnění zvířat a provedení dezinfekce prostor, s výjimkou sněti slezinné, kdy karanténa trvá patnáct dnů.

Příslušné orgány mohou udělit výjimky z těchto karantén hipodromům a závodistištím, přičemž povahu každé udělené výjimky sdělí Komisi.

6. ► **M1** Jestliže členský stát vypracuje nebo vypracoval dobrovolný nebo povinný program tlumení nákazy, vůči níž jsou koňovité vnímaví, může jej předložit Komisi do šesti měsíců od 4. července 1990 v případě Belgie, Dánska, Německa, Irsko, Řecko, Španělska, Francie, Itálie, Lucemburska, Nizozemska, Portugalska a Spojeného království, od 1. ledna 1995 v případě Rakouska, Finska a Švédska, od 1. května 2004 v případě České republiky, Estonska, Kypru, Lotyšska, Litvy, Maďarska, Malty, Polska, Slovinska a Slovenska, od 1. ledna 2007 v případě Bulharska a Rumunska a od 1. července 2013 v případě Chorvatska s tím, že uvede zejména: ◀

- a) rozšíření nákazy na svém území;
- b) zdůvodnění programu z hlediska významu nákazy, nákladů spojených s programem a hospodářských přínosů programu;
- c) zeměpisnou oblast, ve které bude program proveden;
- d) různé statusy pro jednotlivá zařízení, normy, kterých musí být dosaženo u každého druhu, a vyšetřovací postupy, které budou použity;
- e) postupy pro kontrolu programu;
- f) důsledky ztráty statusu z jakéhokoli důvodu pro hospodářství;
- g) opatření, která mají být provedena v případě pozitivních výsledků vyšetření provedených podle programu;
- h) nediskriminační povahu obchodu na území dotyčného členského státu s ohledem na obchod uvnitř Společenství.

Komise posoudí programy předložené členskými státy. Podle potřeby je schválí postupem podle čl. 21 odst. 2. Týmž postupem lze určit doplňkové obecné nebo zvláštní záruky, které mohou být v obchodu uvnitř Společenství požadovány. Tyto záruky nesmějí být přísnější než záruky, které členský stát vyžaduje na vlastním území.

**▼B**

Programy předložené členskými státy mohou být změněny nebo doplněny postupem podle čl. 21 odst. 3. Týmž postupem mohou být schváleny změny nebo doplnění programů dříve schválených a záruk vymezených v souladu s druhým pododstavcem tohoto odstavce.

*Článek 5*

1. Členský stát, který není prostý moru koní, může odesílat koňovité z té části svého území, která je považována za infikovanou ve smyslu odstavce 2, pouze za podmínek stanovených v odstavci 5.

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

- a) v minulých dvou letech byl klinicky, sérologicky (u neočkovaných zvířat), případně epizootologicky prokázán výskyt moru koní, nebo
- b) v posledních dvanácti měsících bylo provedeno očkování proti moru koní.

Část území považovaná za infikovanou morem koní zahrnuje alespoň:

- a) ochranné pásmo o poloměru alespoň 100 km kolem každého ohniska nákazy;
- b) pásmo dozoru přesahující o nejméně 50 km ochranné pásmo, v němž nebylo v posledních dvanácti měsících prováděno očkování.

3. Pravidla a opatření pro tlumení moru koní vztahující se k územím a pásmům uvedeným v odstavci 2 a odpovídající odchylky jsou blíže uvedeny ve směrnici Rady 92/35/EHS ze dne 29. dubna 1992, kterou se stanoví pravidla a opatření pro tlumení moru koní <sup>(1)</sup>.

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

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

5. Členský stát může odesílat z území uvedeného v odst. 2 druhém pododstavci pouze koňovité, kteří splňují tyto podmínky:

- a) musí být odesíláni, s ohledem na aktivitu vektorového hmyzu, pouze během určitých ročních období stanovených postupem podle čl. 21 odst. 3;
- b) nesmějí v den prohlídky uvedené v čl. 4 odst. 1 vykazovat žádné klinické příznaky moru koní;

<sup>(1)</sup> Úř. věst. L 157, 10.6.1992, s. 19.

**▼ B**

c) musí podstoupit vyšetření na mor koní popsané v příloze IV, a to dvakrát v rozmezí 21 až 30 dnů, přičemž druhé vyšetření musí být provedeno během deseti dnů před odesláním:

i) buď s negativními výsledky, jestliže nebyli očkovaní proti moru koní,

ii) nebo bez zjištění zvýšeného množství protilátek, jestliže byli očkovaní proti moru koní; toto očkování nesmí proběhnout během předcházejících dvou měsíců.

Postupem podle čl. 21 odst. 2 a na základě stanoviska Evropského úřadu pro bezpečnost potravin mohou být uznány jiné kontrolní metody;

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

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

*Článek 6*

Členské státy, které uplatňují alternativní systém kontroly poskytující záruky rovnocenné těm, jež jsou stanoveny v čl. 4 odst. 5, pokud se týká přesunu koňovitých na jejich území, mohou na základě vzájemnosti udělit další výjimky z čl. 4 odst. 1 druhé věty a čl. 8 odst. 1 písm. b).

Členské státy je oznámí Komisi.

*Článek 7*

1. Koňoviti musí být dopraveni z hospodářství původu na místo určení co možná nejrychleji a buď přímo, nebo přes schválené sběrné středisko zvířat ve smyslu čl. 2 odst. 2 písm. o) směrnice Rady 64/432/EHS ze dne 26. června 1964 o veterinárních otázkách obchodu se skotem a prasaty uvnitř Společenství<sup>(1)</sup>, a to ve vozidlech nebo kontejnerech, které jsou pravidelně čištěny a dezinfikovány dezinfekčním prostředkem v odstupech, které stanoví odesílající členský stát. Vozidla musí být vybavena tak, aby z nich v průběhu přepravy nemohly vytékat nebo vypadávat exkrementy, podestýlka nebo krmivo koňovitých. Aniž je dotčeno nařízení (ES) č. 1/2005, musí být přeprava prováděna tak, aby bylo účinně chráněno zdraví a dobré životní podmínky koňovitých.

2. Členský stát určení může udělit obecnou nebo omezenou odchylku od některého z požadavků čl. 4 odst. 5 pro jakékoliv zvíře, které nese zvláštní označení vyjadřující, že je určeno k porážce, za předpokladu, že ve veterinárním osvědčení podle přílohy III je tato odchylka uvedena.

<sup>(1)</sup> Úř. věst. 121, 29.7.1964, s. 1977.

**▼ B**

V případě udělení této odchylky musí být jateční koňovíti dopraveni přímo do určených jatek a musí být poraženi během pěti dnů po příjezdu na jatky.

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

*Článek 8*

1. Členské státy zajistí, aby:

a) evidovaní koňovíti, kteří opouštějí svá hospodářství, byli doprovázeni identifikačním dokladem stanoveným v čl. 4 odst. 4 písm. a), a pokud jsou určeni pro obchod uvnitř Společenství, též s potvrzením o zdravotním stavu uvedeným v příloze II;

b) plemenní, užitkoví a jateční koňovíti byli během přepravy doprovázeni veterinárním osvědčením, které odpovídá příloze III.

2. Veterinární osvědčení nebo v případě evidovaných koňovitých potvrzení o zdravotním stavu musí být, aniž je dotčen článek 6, vypracováno 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 veterinárních osvědčení nebo potvrzení o zdravotním stavu je deset dnů. Veterinární osvědčení nebo potvrzení o zdravotním stavu sestává pouze z jednoho listu.

3. Pro přesun mezi členskými státy mohou být koňovíti jiní než evidovaní namísto jednotlivých veterinárních osvědčení uvedených v odst. 1 písm. b) pokryti pouze jedním veterinárním osvědčením na zásilku.

*Článek 9*

Použijí se pravidla stanovená směrnicí 90/425/EHS, především pokud jde o kontroly původu, o organizaci kontrol v zemi určení, o další postup strany země určení v návaznosti na tyto kontroly a o ochranná opatření, která mají být učiněna.

*Článek 10*

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

Členské státy, na jejichž území se kontrola provádí, poskytují znalcům veškerou pomoc nutnou ke splnění jejich úkolu.



**▼B**

Prováděcí pravidla k tomuto článku se přijímají postupem podle čl. 21 odst. 2.

## KAPITOLA III

## PRAVIDLA PRO DOVOZ KOŇOVITÝCH ZE TŘETÍCH ZEMÍ

*Článek 11*

Koňovité dovážení do Společenství musí splňovat podmínky stanovené v článcích 12 až 16.

*Článek 12*

1. Dovoz koňovitých do Společenství se povolí jen ze třetích zemí uvedených na seznamu sestaveném nebo změněném postupem podle čl. 21 odst. 2.

Při zohlednění nálezové situace a záruk poskytnutých pro koňovité třetí zemí může být postupem podle čl. 21 odst. 2 rozhodnuto, že povolení poskytnuté podle prvního pododstavce tohoto odstavce se použije na celé území třetí země nebo pouze na jeho část.

Za tímto účelem a na základě příslušných mezinárodních norem se přihlédně k tomu, jak třetí země tyto normy, zejména zásadu regionalizace, používá a provádí 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 seznamu stanoveného v odstavci 1 se bere ohled zejména na:

- a) nálezový status koňovitých a jiných domácích zvířat a volně žijících živočichů ve třetí zemi, se zvláštním zřetelem k exotickým nálezům zvířat, a na všechna obecná zdravotní hlediska a situaci životního prostředí ve třetí zemi, které by mohly představovat riziko pro nálezový status a životní prostředí ve Společenství;
- b) právní předpisy třetí země související se zdravím a dobrými životními podmínkami zvířat;
- c) organizaci příslušného veterinárního orgánu a jeho kontrolních útvarů, pravomoci těchto útvarů, dohled, jemuž podléhají, a prostředky, jimiž disponují, včetně personálu a laboratorních kapacit, pro účinné uplatňování vnitrostátních právních předpisů;
- d) záruky, které může příslušný veterinární orgán třetí země poskytnout z hlediska dodržování příslušných veterinárních podmínek použitelných ve Společenství nebo rovnocenných podmínek;

**▼B**

- e) to, zda je třetí země členem Světové organizace pro zdraví zvířat (OIE), a na pravidelnost a rychlost informací poskytovaných třetí zemí o výskytu nálezů zvířat na jejím území, zejména nálezů uvedených na seznamu OIE a v příloze I;
- f) záruky poskytnuté třetí zemí, že bude přímo informovat Komisi a členské státy:
  - i) o potvrzení výskytu nálezů koňovitých uvedených v příloze I, a to během 24 hodin, a o všech změnách přístupu k očkování proti těmto nálezům,
  - ii) v přiměřené lhůtě o veškerých navrhovaných změnách vnitrostátních hygienických předpisů týkajících se koňovitých, zejména jejich dovozu,
  - iii) pravidelně o nálezovém statusu ohledně koňovitých na svém území;
- g) jakékoli zkušenosti z předchozího dovozu živých koňovitých z dané třetí země a na výsledky jakýchkoli provedených dovozních kontrol;
- h) výsledky kontrol nebo auditů Společenství provedených v dané třetí zemi, zejména na výsledky posouzení příslušných orgánů, nebo požádá-li o to Komise, na zprávu předloženou příslušnými orgány o kontrolách, které provedly;
- i) pravidla předcházení a tlumení nálezů zvířat platná v dané třetí zemi a jejich provádění, včetně předpisů o dovozu koňovitých z ostatních třetích zemí.

3. Komise zajistí, aby byly aktualizované verze sestaveného nebo změněného seznamu, jak je stanoveno v odstavci 1, dostupné veřejnosti.

Tento seznam lze kombinovat s ostatními seznamy sestavenými pro účely zdraví zvířat a veřejného zdraví a může rovněž obsahovat vzory veterinárních osvědčení.

4. Postupem podle čl. 21 odst. 2 se pro každou třetí zemi nebo skupinu třetích zemí stanoví zvláštní dovozní podmínky s ohledem na nálezovou situaci koňovitých v dotyčné třetí zemi nebo zemích.

5. Postupem podle čl. 21 odst. 2 mohou být přijata prováděcí pravidla k odstavcům 1 až 4, včetně kritérií pro zařazení třetích zemí nebo částí třetích zemí na seznam podle odstavce 1.

### Článek 13

1. Koňovití musí pocházet ze třetích zemí:
  - a) prostých moru koní;
  - b) dva roky prostých venezuelské encefalomyelitidy koní (VEE);
  - c) šest měsíců prostých hřebčí nákazy a vozhrivky.

**▼B**

2. Postupem podle čl. 21 odst. 2 může být rozhodnuto:
- a) že se odstavec 1 tohoto článku použije pouze na část území třetí země.

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

- b) požadovat doplňkové záruky pro nákazy, které jsou ve Společenství exotické.

*Článek 14*

Přede dnem naložení k přepravě do členského státu určení musí koňovítí 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.

Koňovítí musí pocházet z hospodářství, které je pod veterinárním dozorem.

*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 koňovítí kromě požadavků článku 13:

- a) splňují veterinární požadavky přijaté s ohledem na dané druhy, kategorie koňovitých a typy dovozu postupem podle čl. 21 odst. 2 pro dovoz koňovitých z dané země.

Příslušným základem pro stanovení těchto veterinárních požadavků jsou normy stanovené v člácích 4 a 5 a

- b) v případě, že třetí země není prostá vezikulární stomatitidy nebo virové arteritidy po dobu alespoň šesti měsíců, koňovítí splňují tyto požadavky:
- i) pocházejí z hospodářství, které je prosté vezikulární stomatitidy po dobu alespoň šesti měsíců, a vykázat před odesláním negativní reakci v sérologickém testu,
- ii) v případě virové arteritidy vykazují samci koňovitých, aniž je dotčen čl. 19 písm. b), negativní reakci v sérologickém testu nebo vyšetření na izolaci viru nebo jiném vyšetření uznaném postupem podle čl. 21 odst. 2 a zaručujícím nepřítomnost viru.

**▼B**

Postupem podle čl. 21 odst. 2 a na základě stanoviska Evropského úřadu pro bezpečnost potravin mohou být vymezeny kategorie samců koňovitých, na které se tento požadavek vztahuje.

*Článek 16*

1. Koňovití musí být identifikováni v souladu s čl. 4 odst. 4 a doprovázeni veterinárním osvědčením vystaveným úředním veterinárním lékařem vyvážející třetí země. Toto veterinární 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 členského státu určení a v jednom z úředních jazyků členského státu, ve kterém se provádí kontrola dovozu;
- c) doprovázet zvířata v prvopise;
- 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.

Členské státy uvědomí Komisi, zda využily této možnosti.

2. Veterinární osvědčení se vyhotovuje na formuláři, který odpovídá vzoru stanovenému postupem podle čl. 21 odst. 2.

*Článek 17*

1. Jateční koňovití musí být neprodleně po vstupu do členského státu určení dáni na jatky, a to buď přímo, nebo po tranzitu přes schválené sběrné středisko uvedené v článku 7, a musí být v souladu s veterinárními požadavky poražení ve lhůtě určené v rozhodnutích, která budou přijata podle článku 15.

2. Aniž jsou dotčeny zvláštní podmínky, které mohou být přijaty postupem podle čl. 21 odst. 2, může příslušný orgán členského státu určení na základě zdravotního stavu zvířat určit jatky, do kterých musí být takoví koňovití dopraveni.

*Článek 18*

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

**▼B**

Jestliže se při kontrolách prováděných podle tohoto článku zjistí závažné skutečnosti proti schválenému hospodářství, Komise neprodleně vyrozumí členské státy a ihned přijme rozhodnutí, kterým schválení prozatímně pozastaví. Konečné rozhodnutí se přijme postupem podle čl. 21 odst. 3.

Znalce z členských států pověřené kontrolami jmenuje Komise na návrh členských států.

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

Četnost a průběh kontrol se stanoví postupem podle čl. 21 odst. 2.

*Článek 19*

Postupem podle čl. 21 odst. 2:

- a) může být rozhodnuto, že dovoz z některé třetí země nebo z části třetí země má být omezen na určité druhy nebo kategorie koňovitých;
- b) aniž je dotčen článek 15, stanoví se 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;
- c) určí se podmínky pro změnu dočasného vstupu na trvalý;
- d) může být určena referenční laboratoř Společenství pro jednu nebo více nálezů koňovitých uvedených v příloze I a stanoveny funkce, úkoly a postupy týkající se spolupráce s laboratořemi příslušnými pro diagnostiku nálezů koňovitých v členských státech.

## KAPITOLA IV

**ZÁVĚREČNÁ USTANOVENÍ***Článek 20*

Přílohy I až IV se mění postupem podle čl. 21 odst. 3.

*Článek 21*

1. Komisi je nápomocen Stálý výbor pro potravinový řetězec a zdraví zvířat, zřízený článkem 58 nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup> Úř. věst. L 31, 1.2.2002, s. 1.

**▼B**

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

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

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

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

*Článek 22*

Směrnice 90/426/EHS ve znění aktů uvedených v části A přílohy V se zrušuje, aniž jsou dotčeny povinnosti členských států týkající se lhůt pro provedení zmíněných směrnic ve vnitrostátním právu uvedených v části B přílohy V.

Odkazy na zrušenou směrnici se považují za odkazy na tuto směrnici v souladu se srovnávací tabulkou obsaženou v příloze VI.

*Článek 23*

Tato směrnice vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

*Článek 24*

Tato směrnice je určena členskými státy.

**▼B**

*PŘÍLOHA I*

**CHOROBY POVINNÉ HLÁŠENÍM**

Následující choroby jsou povinné hlášením:

- Hřebčí nákaza
- Vozhřivka
- Encefalomyelitida koní (všech typů, včetně venezuelské encefalomyelitidy koní VEE)
- Nakažlivá chudokrevnost koní
- Vzteklna
- Sněť slezinná
- Mor koní
- Vezikulární stomatitida



PŘÍLOHA II

VZOR

**POTVRZENÍ O ZDRAVOTNÍM STAVU <sup>(a)</sup>**

Pas číslo .....

Já, níže podepsaný, potvrzuji <sup>(b)</sup>, že výše popsany koňovitý splňuje tyto požadavky:

- a) byl dnes vyšetřen a nevykazuje žádné klinické příznaky nákazy;
- b) není určen k utracení v rámci národního programu eradikace nákazy;
- c) — nepochází z území nebo z části území členského státu, které podléhá omezením z důvodu moru koní, nebo

pochází z území nebo části území členského státu, které podléhá karanténě z veterinárních důvodů, a prošel s uspokojivými výsledky vyšetřením stanoveným v čl. 5 odst. 5 směrnice 2009/156/ES, a to v karanténní stanici ..... v době mezi ..... a ..... <sup>(c)</sup>;

— nebyl očkován proti moru koní, nebo

byl očkován proti moru koní dne ..... <sup>(c)</sup> <sup>(d)</sup>;

- d) nepochází z hospodářství, které podléhá karanténě z veterinárních důvodů, a nepřišel do styku s koňovitými z hospodářství, které podléhá karanténě z veterinárních důvodů:

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

— během posledních šesti měsíců v případě vozhrivky nebo encefalomyelitidy koní, počínaje dnem, kdy koňovití postižení dotyčnou nákazou byli utraceni,

— v případě nakažlivé chudokrevnosti koní až do dne, kdy po utracení nakažených zvířat vykazala zbývající zvířata při dvou vyšetřeních testem 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 patnácti dnů od posledního případu,

— byla-li všechna zvířata chovu vnímavá k naze utracena a chovné prostory dezinfikovány, po dobu 30 dnů počínaje dnem, kdy zvířata byla zneškodněna a prostory vydezinfikovány, s výjimkou sněti slezinné, kdy karanténa trvá patnáct dnů;

<sup>(a)</sup> Toto potvrzení se nevyžadují v případě, existuje-li dvoustranná dohoda v souladu s článkem 6 směrnice 2009/156/ES.

<sup>(b)</sup> Platí po dobu deseti dnů.

<sup>(c)</sup> Nehodící se škrtněte.

<sup>(d)</sup> Datum očkování musí být uvedeno v pase.



**▼B**

- e) pokud vím, nepřišel během patnácti dnů před tímto prohlášením do styku s koňovitými postiženými nákazou;
- f) v době vyšetření byl způsobilý k přepravě na zamýšlenou cestu v souladu s nařízením (ES) č. 1/2005 <sup>(e)</sup>.

Datum	Místo	Razítko a podpis úředního veterinárního lékaře <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Jméno velkými písmeny a funkce.

<sup>(e)</sup> Toto prohlášení nezbavuje přepravce povinností, které pro něj vyplývají z platných předpisů Společenství, zejména pokud jde o způsobilost zvířat k přepravě.



## PŘÍLOHA III

VZOR  
**VETERINÁRNÍ OSVĚDČENÍ**  
 pro obchod mezi členskými státy  
**KOŇOVITÍ**

EVROPSKÉ SPOLEČENSTVÍ				Osvědčení pro vnitřní obchod				
Část I. Informace o předpokládané zásilce	I.1. Odesílatel Název Adresa PSČ			I.2. Číslo jednací osvědčení		I.2.a. Místní číslo jednací		
				I.3. Příslušný ústřední orgán				
				I.4. Příslušný místní orgán				
	I.5. Příjemce Název Adresa PSČ			I.6. Č. příložených původních osvědčení Č. doprovodných dokladů				
				I.7.				
	I.8. Země původu		Kód ISO	I.9. Region původu		Kód	I.10. Země určení	
							I.11. Region určení	
	I.12. Místo původu Hospodářství <input type="checkbox"/> Sběrné středisko <input type="checkbox"/> Ostatní <input type="checkbox"/> Název Adresa PSČ			I.13. Místo určení Hospodářství <input type="checkbox"/> Sběrné středisko <input type="checkbox"/> Zařízení <input type="checkbox"/> Název Adresa PSČ		Číslo schválení Číslo schválení Ostatní <input type="checkbox"/>		
	I.14. Místo nakládky PSČ			I.15. Datum a hodina odjezdu				
	I.16. Dopravní prostředek Letadlo <input type="checkbox"/> Plavidlo <input type="checkbox"/> Vagon <input type="checkbox"/> Silniční vozidlo <input type="checkbox"/> Ostatní <input type="checkbox"/> Identifikace:			I.17. Přepravce Název Adresa PSČ				Číslo schválení Členský stát
	I.18. Druh zvířat/Produkt			I.19. Kód komodity (Kód KN)		I.20. Počet/Množství		
						I.22. Počet balení		
					I.24.			
I.23. Čísla plomb a čísla kontejnerů								
I.25. Zvířata osvědčení jako/Produkty osvědčené pro Plemenná <input type="checkbox"/> Evidování koňovití <input type="checkbox"/> Jatečná <input type="checkbox"/> Ostatní <input type="checkbox"/>								
I.26. Transzit přes třetí zemi <input type="checkbox"/> Třetí země Místo výstupu Místo vstupu			Kód ISO Kód Číslo stanoviště hraniční kontroly	I.27. Transzit přes členské státy <input type="checkbox"/> Členský stát Členský stát Členský stát			Kód ISO Kód Číslo stanoviště hraniční kontroly	
I.28. Vývoz <input type="checkbox"/> Třetí země Místo výstupu			Kód ISO Kód	I.29.				
I.30. Plán cesty Ano <input type="checkbox"/> Ne <input type="checkbox"/>								
I.31. Identifikace Druhy (vědecký název) Identifikační systém								



## EVROPSKÉ SPOLEČENSTVÍ

## Evidování koňovití, plemenní a užitkoví koňovití a jateční koňovití

		II.a. Číslo jednací osvědčení	II.b. Místní číslo jednací	
Část II: Osvědčení	II. Údaje o zdravotním stavu <sup>(1)</sup>			
	Já, níže podepsaný, potvrzuji, že výše popsané/á zvíře/zvířata splňuje/í tyto požadavky:			
		II.1.	bylo/a dnes vyšetřeno/a a nevykazuje/í žádné klinické příznaky nákazy;	
		II.2.	není/nejsou určeno/a k utracení v rámci národního programu eradikace nákazy;	
	<i>bud'</i> <sup>(2)</sup>	II.3.	nepochází/ejí z území nebo z části území členského státu, které podléhá omezením z důvodu moru koní;]	
	<i>nebo</i> <sup>(2)</sup>	II.3.	pochází/ejí z území nebo z části území členského státu, které podléhá omezením z důvodu moru koní, byla/ý držena/ly v karanténní stanici ..... chráněné před vektory nejméně po dobu 40 dní před odesláním a prošlo/a vyšetřením na protilátky proti viru moru koní popsaným v příloze IV směrnice 2009/156/ES provedeným současně na krevních vzorcích odebraných dvakrát v rozmezí 21 až 30 dnů, totiž ..... ( <i>datum</i> ) a (během 10 dnů před odesláním) ( <i>datum</i> );	
		<i>bud'</i> <sup>(3)</sup>	[s negativními výsledky v obou případech, jestliže nebylo/a očkováno/a proti moru koní;]	
		<i>nebo</i> <sup>(2)</sup>	[bez zjištění zvýšeného množství protilátek, jestliže bylo/a očkováno/a proti moru koní;]	
	<i>bud'</i> <sup>(3)</sup>	II.4.	nebylo/a očkováno/a proti moru koní;]	
	<i>nebo</i> <sup>(2)</sup>	II.4.	bylo/a očkováno/a proti moru koní dne..... ( <i>datum</i> ),	
	<i>bud'</i> <sup>(3)</sup>	[nejméně dva měsíce před potvrzením;]		
	<i>nebo</i> <sup>(2)</sup>	[nejméně dva měsíce před vstupem do karanténní stanice;]		
	II.5.	nepochází/ejí z hospodářství, které podléhá karanténě z veterinárních důvodů zahrnující alespoň tyto podmínky:		
	<i>bud'</i> <sup>(3)</sup>	[ne všechna zvířata druhů vnímavých vůči nálezům uvedeným v písmenech a) až g) nacházející se v hospodářství byla poražena nebo utracena a karanténa trvala alespoň:		
	a)	v případě koňovitých podezřelých z hřebčí nákazy,		
	<i>bud'</i> <sup>(2)</sup>	[po dobu šest měsíců ode dne posledního skutečného nebo možného styku se zvířetem nemocným nebo nakaženým <i>Trypanosoma equiperdum</i> ;]		
	<i>nebo</i> <sup>(2)</sup>	[v případě hřebce do jeho kastrace;]		
	b)	v případě vozňivky po dobu šesti měsíců počínaje dnem, kdy byli koňovití, kteří jsou postiženi nákazou nebo kteří byli podrobeni vyšetření na kauzativní patogen <i>Burkholderia mallei</i> nebo protilátky proti tomuto patogenu s pozitivním nálezem, utraceni a zneškodněni;		
	c)	v případě encefalomyelitidy koní jakéhokoli typu po dobu šesti měsíců počínaje dnem, kdy byli koňovití postiženi nákazou utraceni, s výjimkou případu nákazy virem West Nile, kdy doba šesti měsíců počíná dnem, kdy nakažení koňovití uhynuli a byli odstraněni z hospodářství nebo plně zneškodněni;		



## EVROPSKÉ SPOLEČENSTVÍ

## Evidovaní koňovití, plemenní a užitkoví koňovití a jateční koňovití

II. Údaje o zdravotním stavu <sup>(1)</sup>	II.a. Číslo jednací osvědčení	II.b. Místní číslo jednací
<p>d) v případě nakažlivé chudokrevnosti koní až do dne, kdy po utracení nakažených zvířat vykázala zbývajícím zvířatům při dvou vyšetřeních testem podle Cogginse na krevních vzorcích odebraných dvakrát v rozmezí tří měsíců negativní reakci;</p> <p>e) v případě vezikulární stomatitidy po dobu šesti měsíců od posledního případu;</p> <p>f) v případě vztekliny po dobu jednoho měsíce od posledního případu;</p> <p>g) v případě sněti slezinné po dobu patnácti dnů od posledního případu;]</p> <p>nebo <sup>(2)</sup> [po případech hřebčí nákazy, vozňivky, encefalomyelitidy koní jakéhokoli typu, nakažlivé chudokrevnosti koní, vezikulární stomatitidy, vztekliny nebo sněti slezinné byla všechna zvířata druhů vnímavých vůči dané naze nacházející se v hospodářství poražena nebo utracena a karanténa trvala 30 dnů, nebo v případě sněti slezinné patnáct dnů, počínaje dnem, kdy byla dezinfekce prostor po zneškodnění zvířat uspokojivě ukončena.]</p> <p>II.6. pokud vím, nepřišlo/a během patnácti dnů před tímto prohlášením do styku s koňovitými postiženými nákazou;</p> <p>II.7. v době prohlídky bylo/a způsobil/á k přepravě na zamýšlenou cestu v souladu s nařízením (ES) č. 1/2005 <sup>(3)</sup>.</p>		
<p><b>Poznámky</b></p> <p><b>Část I:</b></p> <p>Kolona I.6 : Odpovídá číslu povolení CITES v případě koňovitých uvedených na seznamu Washingtonské úmluvy o chráněných druzích a produktech z nich.</p> <p>Kolona I.16 : Registrační číslo (železničních vagonů nebo kontejneru a nákladních automobilů), číslo letu (letadlo) nebo název (plavidlo).</p> <p>Kolona I.19 : Použijte příslušné kódy harmonizovaného systému (HS) Světové celní organizace: 01.01.01 nebo 01.01.06.19</p> <p>Kolona I.31 : Druh: kůň, osel, mula, mezek, zebra (včetně kříženců).</p> <p>Identifikační systém: Do 31. prosince 2009 odpovídá identifikačnímu číslu ve smyslu článku 2 rozhodnutí Komise 2000/68/ES a od 1. ledna 2010 jedinečnému identifikačnímu číslu ve smyslu čl. 2 písm. d) a oddílu 1 části A bodu 4 přílohy I nařízení Komise (ES) č. 504/2008.</p> <p><b>Část II:</b></p> <p><sup>(1)</sup> Údaje v bodech II.1. až II.6. se nevyžadují, existuje-li dvoustranná dohoda v souladu s článkem 6 směrnice 2009/156/ES.</p> <p><sup>(2)</sup> Nehodící se škrtněte.</p> <p><sup>(3)</sup> Toto prohlášení nezbavuje přepravce povinností, které pro ně vyplývají z platných předpisů Společenství, zejména pokud jde o způsobilost zvířat k přepravě.</p> <p>— Toto potvrzení platí po dobu deseti dnů.</p> <p>— Barva razítka a podpisu se musí lišit od barvy ostatních údajů na osvědčení.</p>		
<p>Úřední veterinární lékař nebo úřední inspektor</p> <p>Jméno (hůlkovým písmem):</p> <p>Místní veterinární jednotka:</p> <p>Datum:</p> <p>Razítko</p> <p>Kvalifikace a titul:</p> <p>Číslo související MVJ:</p> <p>Podpis:</p>		

▼ **M2***PŘÍLOHA IV***MOR KONÍ  
DIAGNOSTIKA**

## ČÁST A

## Sérologické testy

Na základě kapitoly 2.5.1 oddílu B bodu 2 Příručky norem pro diagnostické testy a očkovací látky pro suchozemská zvířata vydané v roce 2016 a přijaté Světovým shromážděním delegátů OIE v květnu 2012 využívá sérologická metoda zde popsaná enzymovou imunoanalýzu s enzymem vázaným na imunosorbent (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA).

VP7 je hlavní imunodominantní antigenní virový protein viru moru koní (AHSV) a je obsažen ve všech devíti sérotypech AHSV. Bylo prokázáno, že rekombinantní proteiny AHSV-VP7 jsou stabilní, neškodné a vhodné pro použití jako antigeny v postupech využívajících ELISA pro stanovení protilátek proti AHSV a poskytují vysoký stupeň senzitivity a specifity (Laviada et al., 1992b<sup>(1)</sup>; Maree and Paweska, 2005). Nepřímý test ELISA a blokující test ELISA jsou dva testy AHS-VP7 ELISA, které jsou vhodné pro sérologickou diagnózu moru koní.

1. **Nepřímý test ELISA pro zjištění protilátek proti viru moru koní (AHSV)**

Jako konjugát využívá tato metoda antikoňský gama-globulin konjugovaný s křenovou peroxidázou reagující se sérem koní, mezků a oslů. Metoda popsaná v publikaci Maree & Paweska (2005)<sup>(2)</sup> využívá jako konjugát protein G, který rovněž reaguje se sérem zeber.

Antigen lze získat ve středisku Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) ve lhůtě 4 až 6 měsíců od zaslání žádosti.

1.1. *Postup testu*

1.1.1. Pevná fáze

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

1.1.1.2. 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.

1.1.1.3. Destičky se blokují fosfátovým puftrem (PBS) pH 7,2 + 5 % (hmot./obj.) roztokem odstředěného mléka (Nestlé Dry Skim Milk<sup>TM</sup>), 200 µl/jamka, 1 hodinu při teplotě 37 °C.

1.1.1.4. Blokující pufr se odstraní a destičky se jemně poklepou savým materiálem.

<sup>(1)</sup> Laviada M.D., Roy P. and Sanchez-Vizcaino J.M (1992b). Adaptation and evaluation of an indirect ELISA and immunoblotting test for African horse sickness antibody detection. In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium. Walton T.E. & Osburn B.L., Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 646–650.

<sup>(2)</sup> Maree S. a Paweska J.T. (2005). Preparation of recombinant African horse sickness virus VP7 antigen via a simple method and validation of a VP7-based indirect ELISA for the detection of group-specific IgG antibodies in horse sera. J. Virol. Methods, 125 (1), 55–65.

**▼ M2**

## 1.1.2. Testované vzorky

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

Pro titraci se připraví dvojitá série roztoků od 1 ku 25 (100 µl/jamka), 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.

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

## 1.1.3. Konjugát

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

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

## 1.1.4. Chromogen/substrát

- 1.1.4.1. Přidá se 200 µl/jamka roztoku chromogenu/substrátu (10 ml 80,6 mM DMAB (dimethylaminobenzaldehyd) + 10 ml 1,56 mM MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrázon-hydrochlorid) + 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Proces barvení se zastaví přidáním 50 µl 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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-ethylbenzothiazolin-6-kyselina sulfonová]), TMB (tetra-methyl benzidin) nebo OPD (orto-fenyldiamin).

- 1.1.4.2. Destičky se vyhodnotí při vlnové délce 600 nm (nebo 620 nm).

## 1.2. Interpretace výsledků

- 1.2.1. Prahová hodnota se vypočte přidáním 0,06 k hodnotě negativní kontroly (0,06 je směrodatná odchylka odvozená ze skupiny 30 negativních sér).

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

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

- 1.2.4. Testované vzorky vykazující střední hodnoty absorpce jsou nejisté a k potvrzení výsledku musí být použita druhá metoda.

▼ **M2****2. Blokující test ELISA pro zjištění protilátek proti viru moru koní (AHSV)**

Kompetitivní blokující test ELISA je zaměřen na zjištění specifických protilátek proti AHSV v séru koňovitých, tj. koňů, oslů, zeber a jejich kříženců. Tento test předchází problému se specificitou, k němuž příležitostně dochází při použití nepřímých testů ELISA.

Podstatou testu je přerušení reakce mezi rekombinantním proteinem VP7 vázaným na destičku ELISA a konjugovanou monoklonální protilátkou (Mab) specifickou na AHS-VP7. Protilátka v testovaném séru blokuje reakci mezi antigenem a Mab a v důsledku toho dojde ke zmírnění zbarvení. Protože je Mab zaměřena proti VP7, poskytuje test vysokou úroveň senzitivity a specificity.

Kompetitivní blokující test ELISA je komerčně dostupný.

**2.1. Postup testu****2.1.1. Pevná fáze**

2.1.1.1. Destičky ELISA se pokryjí 50–100 ng rekombinantu AHSV-4 VP7 rozpuštěného v karbonátovém/bikarbonátovém pufru, pH 9,6. Inkubují se přes noc při teplotě 4 °C.

2.1.1.2. Destičky se třikrát propláchnou fosfátovým puftrem (PBS) 0,1× obsahujícím 0,135 M NaCl a 0,05 % (obj.) látky Tween 20 (PBST). Destičky se jemně poklepu savým materiálem, aby byl odstraněn veškerý zbytkový mycí roztok.

**2.1.2. Testované vzorky a kontrolní vzorky**

2.1.2.1. Vzorky séra, které mají být testovány, a pozitivní a negativní kontrolní sérum se rozpustí v poměru 1 ku 5 v roztoku obsahujícím 0,35 M NaCl, 0,05 % (obj.) látky Tween 20 a 0,1 % Kathon, 100 µl na jamku. Inkubuje se 1 hodinu při teplotě 37 °C.

Pro titraci se připraví dvojitá série roztoků testovaných sér (100 µl/jamka) od 1 ku 10 do 1 ku 280 v osmi jamkách, jedno sérum na sloupec destičky. Stejný krok se provede i s pozitivním a negativním kontrolním sérem. Inkubuje se 1 hodinu při teplotě 37 °C.

2.1.2.2. Destičky se pětkrát propláchnou solným fosfátovým puftrem (PBS) 0,1× obsahujícím 0,135 M NaCl a 0,05 % (obj.) látky Tween 20 (PBST). Destičky se jemně poklepu savým materiálem, aby byl odstraněn veškerý zbytkový mycí roztok.

**2.1.3. Konjugát**

2.1.3.1. Do každé jamky se přidá 100 µl roztoku Mab proti VP7 konjugovaného s křenovou peroxidázou. Tento roztok Mab byl předem naředěn v poměru 1/5 000–1/15 000 v roztoku stabilizátoru StabiliZyme Select® (SurModics. Reference: SZ03) 1 ku 1 v destilované vodě. Inkubuje se 30 minut při teplotě 37 °C.

2.1.3.2. Destičky se pětkrát propláchnou solným fosfátovým puftrem (PBS) 0,1× obsahujícím 0,135 M NaCl a 0,05 % (obj.) látky Tween 20 (PBST). Destičky se jemně poklepu savým materiálem, aby byl odstraněn veškerý zbytkový mycí roztok.

**▼ M2**

## 2.1.4. Chromogen/substrát

Přidá se 100 µl/jamka roztoku chromogen/substrát, tj. 1 ml ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazolin-6-kyselina sulfonová]), 5 mg/ml + 9 ml substrátového pufru (0,1 M fosfáto-citrátový pufr pH 4 obsahující 0,03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a inkubuje se 10 minut při pokojové teplotě. Proces barvení se zastaví přidáním 100 µl/jamka 2 % (hmot./obj.) roztoku SDS (natriumdodecylsulfát).

## 2.1.5. Vyhodnocení

Vzorek se vyhodnotí při vlnové délce 405 nm pomocí odečítacího zařízení pro ELISA.

## 2.2. Interpretace výsledků

## 2.2.1. Blokující procento (BP) každého vzorku se určí pomocí následujícího vzorce, kde „Abs“ znamená protilátky:

$$BP = \frac{\text{Abs(kontrolní}^-) - \text{Abs(vzorek)}}{\text{Abs(kontrolní}^-) - \text{Abs(kontrolní}^+)} \times 100$$

## 2.2.2. Vzorky s hodnotou BP vyšší než 50 % by měly být považovány za pozitivní na protilátky proti AHSV.

## 2.2.3. Vzorky s hodnotou BP nižší než 45 % by měly být považovány za negativní na protilátky proti AHSV.

## 2.2.4. Vzorky s hodnotou BP mezi 45 % a 50 % by měly být považovány za nejisté a testování je třeba provést znovu. V případě opakovaného nejistého výsledky by zvířata měla být znovu vyšetřena na základě vzorků odebraných nejdříve dva týdny po odběru vzorku, který se považoval za nejistý.

**ČÁST B****Identifikace původce**

Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (rRT-PCR)

Testy k identifikaci původce založené na metodách využívajících nukleovou kyselinu musí zjistit referenční kmeny u devíti virových sérotypů AHSV.

Metoda popsaná v bodě 2.1. vychází z kapitoly 2.5.1. oddílu B bodu 1.2 Příručky pro diagnostické testy a očkovací látky pro suchozemská zvířata, vydání z roku 2016 přijaté Světovým shromážděním delegátů OIE v květnu 2012.

Každá detekční metoda využívající RT-PCR používaná při testování vzorků krve nebo sleziny v souladu se směrnicí 2009/156/ES musí vykázat stejnou nebo vyšší senzitivitu jako metody popsané v bodě 2.

Inaktivovaný vir referenčních kmenů sérotypů 1 až 9 je možné získat v referenční laboratoři Evropské unie nebo referenční laboratoři OIE pro mor koní v Algete ve Španělsku.

**1. Extrakce virové RNA**

K zajištění dobré reakce je nezbytné ze vzorku AHSV extrahovat vysoce kvalitní RNA. Extrakci nukleových kyselin z klinických vzorků lze provést různými interními a komerčně dostupnými metodami.



▼ **M2**

Komerční sady využívají k izolaci RNA různé přístupy. Většina z nich je založena na jednom z následujících postupů:

- extrakce nukleových kyselin pomocí fenol-chloroformu,
- adsorpce nukleových kyselin do filtračního systému,
- adsorpce nukleových kyselin do systému magnetických kuliček.

Níže je uveden příklad interně provedené extrakce RNA:

- 1.1. 1 g vzorku tkáně se homogenizuje v 1 ml denaturačního roztoku (4 M guanidium thiokyanát, 25 mM citronan sodný, 0,1 M 2-merkapto-*o*-etanol, 0,5 % sarkosyl).
- 1.2. Po odstředění se do supernatantu přidá 1 µg reagentu kvasinkové RNA, 0,1 ml 2 M octanu sodného pH 4, 1 ml fenolu a 0,2 ml směsi chloroformu a isoamylalkoholu (49/1).
- 1.3. Suspenze se prudce protřepe a po dobu 15 minut zchladí na ledu.
- 1.4. Po odstředění se RNA přítomná ve vodné fázi extrahuje fenolem, precipituje etanolem a resuspenduje ve sterilní vodě.

## 2. Postup RT-PCR v reálném čase

- 2.1. *Skupinově specifická RT-PCR v reálném čase dle Agüero a kol., 2008* <sup>(1)</sup>

Tato skupinově specifická RT-PCR v reálném čase cílí na VP7 v AHSV a dokáže detekovat všechny známé a aktuálně cirkulující sérotypy a kmeny AHSV. Uplatnění této metody přineslo v účastnících se národních referenčních laboratořích členských států Evropské unie při zkouškách odborné způsobilosti každoročně organizovaných referenční laboratořích Evropské unie v období 2009–2015 velmi dobré výsledky. V mezinárodním kruhovém testu provedeném v roce 2015 v rámci sítě referenčních laboratořích OIE se tento protokol rovněž umístil na předních místech.

Sekvenování primeru a sondy k detekci virů druhu AHSV:

- |                    |                                       |
|--------------------|---------------------------------------|
| — přímý primer     | 5'-CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG-3'      |
| — reverzní primer  | 5'-CTA-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT-3'      |
| — sonda MGB-TaqMan | 5'-FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-CCA-CTA-MGB-3' |

- 2.1.1. Koncentrace primeru se naředí na pracovní koncentraci 8 µM (dále jen „pracovní primer 8 µM“) a sonda se naředí na pracovní koncentraci 50 µM (dále jen „pracovní roztok sondy 50 µM“). Navrhne se uspořádání testovací destičky a nahraje se do softwaru přístroje k provedení metody PCR v reálném čase. S využitím plánu uspořádání se přidá 2,5 µl každého pracovního primeru 8 µM do každé jamky, která bude obsahovat vzorky RNA, pozitivní a/nebo negativní kontrolní vzorky (konečná koncentrace primeru bude 1 µM v 20 µl roztoku RT-PCR mix). Destička se uchovává na ledu.

<sup>(1)</sup> Agüero M., Gomez-Tejedor C., Angeles Cubillo M., Rubio C., Romero E. a Jimenez-Clavero A. (2008). Real-time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of African horse sickness virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, 325–328.

▼ **M2**

- 2.1.2. 2 µl izolované RNA (testované vzorky a pozitivní kontrolní vzorky), nebo 2 µl vody bez ribonukleáz pro negativní kontrolní vzorky se smíchají s přímým a reverzním primerem. Směs se ohřevem na 95 °C po dobu 5 minut denaturuje a následně je rychle zchlazena na ledu po dobu alespoň 5 minut.
- 2.1.3. Podle pokynů výrobce se připraví roztok master mix k provedení jednokrokové RT-PCR v reálném čase v objemu dostatečném pro počet testovaných vzorků. 0,1 µl pracovního roztoku sondy o 50 µM se přidá do každé jamky obsahující vzorky RNA (konečná koncentrace sondy bude 0,25 µM v každé jamce obsahující vzorky RNA. 13 µl roztoku master mix k provedení jednokrokové RT-PCR v reálném čase se rozdělí do každé jamky na destičce PCR obsahující denaturované primery a RNA.
- 2.1.4. Destička se umístí do termocykleru v reálném čase naprogramovaného na reverzní transkripci a detekci amplifikace/fluorescence cDNA. Podmínky amplifikace zahrnují první krok reverzní transkripce při 48 °C po 25 minut, následovaný 10 minutami při 95 °C („horký start“) a 40 cyklů po 15 sekundách při 95 °C, po 35 sekundách při 55 °C a po 30 sekundách při 72 °C (nebo 40 cyklů při 97 °C po 2 sekundách a při 55 °C po 30 sekundách při použití reakčních činidel a termocykleru určených pro rychlé reakce). Údaje o fluorescenci se získají na konci kroku při 55 °C.
- 2.1.5. Stanovení se nepovažuje za validní, jsou-li výsledkem atypické amplifikační křivky, a musí být provedeno znovu.

Vzorky jsou považovány za pozitivní, pokud je hodnota Ct (číslo cyklu, při němž fluorescence vzniká při reakci překročí prahovou hodnotu fluorescence) nižší nebo se rovná definované prahové hodnotě Ct (35) během 40 cyklů PCR ( $Ct \leq 35$ ).

Vzorky jsou považovány za nejisté, pokud je hodnota Ct vyšší než definovaná prahová hodnota Ct (35) během 40 cyklů PCR ( $Ct \geq 35$ ).

Vzorky jsou považovány za negativní, pokud získaná horizontální křivka amplifikace během 40 cyklů PCR nepřekročí prahovou linii.

2.2. *Skupinově specifická RT-PCR v reálném čase dle Guthrie a kol., 2013* <sup>(1)</sup>

RT-PCR v reálném čase využívající sondy fluorescenčního rezonančního přenosu energie (FRET) k detekci nukleové kyseliny v AHSV.

Popsané stanovení obsahu AHSV RT-PCR bylo navrženo pomocí sekvencí ze širokého spektra v současnosti cirkulujících kmenů AHSV (Quan a kol., 2010 <sup>(2)</sup>). Rovněž zahrnuje chráněnou syntetickou externí kontrolu stanovení obsahu k ověření řádného fungování komponent pro stanovení obsahu.

Soupravy pro jednokrokovou PCR v reálném čase jsou komerčně k dispozici. Níže jsou uvedeny některé základní kroky tak, jak je popsal Guthrie a kol. (2013), které lze upravit v závislosti podle místních specifik nebo specifik jednotlivých případů, použitých soupravách a dostupném vybavení.

<sup>(1)</sup> Guthrie AJ, MacLachlan NJ, Joone C, Lourens CW, Weyer CT, Quan M, Monyai MS, Gardner IA. Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus. *Journal of Virological Methods*. 2013;189(1):30–5.

<sup>(2)</sup> Quan, M., Lourens, C.W., MacLachlan, N.J., Gardner, I.A., Guthrie, A.J., 2010. Development and optimisation of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay targeting the VP7 and NS2 genes of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods* 167, 45–52.

▼ **M2**

Sekvenování primeru a sondy k detekci virů druhu AHSV:

— přímý primer	5'-AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T-3'
— reverzní primer	5'-GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA-3'
— sonda MGB-TaqMan	5'-FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB-3'

- 2.2.1. Roztoky primeru a sondy se připraví v  $25 \times$  násobné koncentraci při  $5 \mu\text{M}$  v případě přímého a reverzního primeru a  $3 \mu\text{M}$  v případě sondy. Navrhne se uspořádání testovací destičky a nahraje se do softwaru přístroje k provedení metody PCR v reálném čase. S využitím plánu uspořádání se přidá  $5 \mu\text{l}$  vzorků RNA, včetně testovacích vzorků a pozitivních i negativních kontrolních vzorků, do příslušných jamek na destičce.
- 2.2.2. RNA se denaturuje ohřevem na  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 5 minut a následně se rychle zchladí na ledu po dobu alespoň 3 minut.
- 2.2.3. Podle pokynů výrobce se připraví roztok master mix k provedení jedno-krokové RT-PCR v reálném čase v objemu dostatečném pro počet testovaných vzorků.  $1 \mu\text{l}$   $25 \times$  násobného roztoku směsi primeru a sondy (viz bod 2.2.1 výše) se přidá do roztoku master mix k získání konečné koncentrace v každé jamce  $200 \text{ nM}$  pro každý primer a  $120 \text{ nM}$  pro sondu.  $20 \mu\text{l}$  roztoku master mix se rozdělí do každé jamky na destičce PCR obsahující denaturovanou RNA.
- 2.2.4. Destička se umístí do termocykleru v reálném čase naprogramovaného na reverzní transkripci a detekci amplifikace/fluorescence cDNA dle doporučení výrobců. Podmínky amplifikace zahrnují například první krok reverzní transkripce při  $48 \text{ }^\circ\text{C}$  po 10 minut, následovaný 10 minutami při  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  a 40 cyklů po 15 sekundách při  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  a po 45 sekundách při  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- 2.2.5. Vzorky jsou považovány za pozitivní, pokud normalizovaná fluorescence stanovení obsahu AHSV RT-PCR překročí prahovou hodnotu 0,1 během 36 cyklů PCR ve všech replikacích vzorku.

Vzorky jsou považovány za nejisté, pokud normalizovaná fluorescence stanovení obsahu AHSV RT-PCR překročí prahovou hodnotu 0,1 během 36 až 40 cyklů PCR v kterékoli replikaci vzorku.

Vzorky jsou považovány za negativní, pokud normalizovaná fluorescence stanovení obsahu AHSV RT-PCR nepřekročila prahovou hodnotu 0,1 během 40 cyklů PCR ve všech replikacích vzorku a pokud normalizovaná fluorescence chráněné syntetické externí kontroly stanovení obsahu překročila prahovou hodnotu 0,1 během 33 cyklů PCR.



*PŘÍLOHA V*

ČÁST A

**Zrušená směrnice a její následné změny**

(uvedené v článku 22)

Směrnice Rady 90/426/EHS  
(Úř. věst. L 224, 18.8.1990, s. 42).

Směrnice Rady 90/425/EHS  
(Úř. věst. L 224, 18.8.1990, s. 29).

pouze čl. 15 odst. 3

Směrnice Rady 91/496/EHS  
(Úř. věst. L 268, 24.9.1991, s. 56).

pouze pokud jde o odkaz na směrnici  
90/426/EHS v čl. 26 odst. 2

Rozhodnutí Komise 92/130/EHS  
(Úř. věst. L 47, 22.2.1992, s. 26).

Směrnice Rady 92/36/EHS  
(Úř. věst. L 157, 10.6.1992, s. 28).

pouze článek 1

Akt o přistoupení z roku 1994, bod  
V.E.I.A.3 přílohy I  
(Úř. věst. C 241, 29.8.1994, s. 132).

Rozhodnutí Komise 2001/298/ES  
(Úř. věst. L 102, 12.4.2001, s. 63).

pouze pokud jde o odkaz na směrnici  
90/426/EHS v čl. 1 odst. 1 a v bodě 2  
přílohy I

Rozhodnutí Komise 2002/160/ES  
(Úř. věst. L 53, 23.2.2002, s. 37).

Nařízení Rady (ES) č. 806/2003  
(Úř. věst. L 122, 16.5.2003, s. 1).

pouze bod 10 přílohy III

Akt o přistoupení z roku 2003, bod  
6.B.I.16 přílohy II  
(Úř. věst. L 236, 23.9.2003, s. 381).

Směrnice Rady 2004/68/ES  
(Úř. věst. L 139, 30.4.2004, s. 320).

pouze článek 15

Směrnice Rady 2006/104/ES  
(Úř. věst. L 363, 20.12.2006, s. 352).

pouze bod I.2 přílohy

Směrnice Rady 2008/73/ES  
(Úř. věst. L 219, 14.8.2008, s. 40).

pouze článek 7

ČÁST B

**Lhůty pro provedení ve vnitrostátním právu**

(uvedené v článku 22)

Směrnice	Lhůta pro provedení
90/426/EHS	1. ledna 1992
90/425/EHS	1. července 1992
91/496/EHS	1. července 1992
92/36/EHS	31. prosince 1992
2004/68/ES	ze dne 19. listopadu 2005
2006/104/ES	ze dne 1. ledna 2007
2008/73/ES	ze dne 1. ledna 2010



## PŘÍLOHA VI

## Srovnávací tabulka

Směrnice 90/426/EHS	Tato směrnice
<i>Článek 1</i>	<i>Článek 1</i>
Čl. 2 větě a písm. a) a b)	Čl. 2 větě a písm. a) a b)
Čl. 2 písm. c)	Čl. 2 písm. c) úvodní slova a body i) a ii)
Čl. 2 písm. d) až i)	Čl. 2 písm. d) až i)
<i>Článek 3</i>	<i>Článek 3</i>
Čl. 4 odst. 1, 2 a 3	Čl. 4 odst. 1, 2 a 3
Čl. 4 odst. 4 větě a body i) a ii)	Čl. 4 odst. 4 větě a písm. a) a b)
Čl. 4 odst. 5 větě a písm. a) první až šestá odrážka	Čl. 4 odst. 5 větě a písm. a) body i) až vi)
Čl. 4 odst. 5 písm. b)	Čl. 4 odst. 5 písm. b)
Čl. 4 odst. 6 první pododstavec větě a první až osmá odrážka	Čl. 4 odst. 6 první pododstavec větě a písm. a) až h)
Čl. 4 odst. 6 druhý a třetí pododstavec	Čl. 4 odst. 6 druhý a třetí pododstavec
Čl. 5 odst. 1	Čl. 5 odst. 1
Čl. 5 odst. 2 písm. a) větě a první a druhá odrážka	Čl. 5 odst. 2 první pododstavec větě a písm. a) a b)
Čl. 5 odst. 2 písm. b) větě a první a druhá odrážka	Čl. 5 odst. 2 druhý pododstavec větě a písm. a) a b)
Čl. 5 odst. 2 písm. c)	Čl. 5 odst. 3
Čl. 5 odst. 2 písm. d)	Čl. 5 odst. 4
Čl. 5 odst. 3 větě a písm. a) a b)	Čl. 5 odst. 5 větě a písm. a) a b)
Čl. 5 odst. 3 písm. c) první odrážka a druhá odrážka první věta	Čl. 5 odst. 5 písm. c) první pododstavec větě a body i) a ii)
Čl. 5 odst. 3 písm. c) druhá odrážka poslední věta	Čl. 5 odst. 5 písm. c) druhý pododstavec
Čl. 5 odst. 3 písm. d) a e)	Čl. 5 odst. 5 písm. d) a e)
<i>Článek 6</i>	<i>Článek 6</i>
<i>Článek 7</i>	<i>Článek 7</i>
Čl. 8 odst. 1 první pododstavec větě a první a druhá odrážka	Čl. 8 odst. 1 větě písm. a) a b)
Čl. 8 odst. 1 druhý pododstavec	Čl. 8 odst. 2
Čl. 8 odst. 2	Čl. 8 odst. 3
<i>Článek 9</i>	<i>Článek 9</i>
<i>Článek 10</i>	<i>Článek 10</i>

▼B

Směrnice 90/426/EHS	Tato směrnice
Čl. 11 odst. 1	<i>Článek 11</i>
Čl. 11 odst. 2	—
<i>Článek 12</i>	<i>Článek 12</i>
<i>Článek 13</i>	<i>Článek 13</i>
<i>Článek 14</i>	<i>Článek 14</i>
<i>Článek 15</i>	<i>Článek 15</i>
Čl. 16 odst. 1 návětí a písm. a) až f)	Čl. 16 odst. 1 návětí a písm. a) až f)
Čl. 16 odst. 1 závěrečná věta	—
Čl. 16 odst. 2	Čl. 16 odst. 2
<i>Článek 17</i>	<i>Článek 18</i>
<i>Článek 18</i>	<i>Článek 17</i>
Čl. 19 návětí a body i) až iv)	Čl. 19 návětí a písm. a) až d)
<i>Článek 22</i>	—
<i>Článek 23</i>	<i>Článek 20</i>
Čl. 24 odst. 1 a 2	Čl. 21 odst. 1 a 2
Čl. 24 odst. 3	—
Čl. 25 odst. 1 a 2	Čl. 21 odst. 1 a 3
<i>Článek 26</i>	—
<i>Článek 27</i>	—
—	<i>Článek 22</i>
—	<i>Článek 23</i>
<i>Článek 28</i>	<i>Článek 24</i>
Příloha A	Příloha I
Příloha B	Příloha II
Příloha C	Příloha III
Příloha D	Příloha IV
—	Příloha V
—	Příloha VI