

Denne tekst tjener udelukkende som dokumentationsværktøj og har ingen retsvirkning. EU's institutioner påtager sig intet ansvar for dens indhold. De autentiske udgaver af de relevante retsakter, inklusive deres betragtninger, er offentliggjort i den Europæiske Unions Tidende og kan findes i EUR-Lex. Disse officielle tekster er tilgængelige direkte via linkene i dette dokument

► **B**

RÅDETS DIREKTIV 2009/156/EF

af 30. november 2009

om dyresundhedsmæssige betingelser for enhovede dyrs bevægelser og indførsel af enhovede dyr fra tredjelande

(kodificeret udgave)

(EØS-relevant tekst)

(EUT L 192 af 23.7.2010, s. 1)

Ændret ved:

| | | Tidende | | |
|--------------------|--|---------|------|------------|
| | | nr. | side | dato |
| ► <u>M1</u> | Rådets direktiv 2013/20/EU af 13. maj 2013 | L 158 | 234 | 10.6.2013 |
| ► <u>M2</u> | Kommissionens gennemførelsesafgørelse (EU) 2016/1840 af 14. oktober 2016 | L 280 | 33 | 18.10.2016 |



RÅDETS DIREKTIV 2009/156/EF

af 30. november 2009

**om dyresundhedsmæssige betingelser for enhovede dyrs bevægelser
og indførsel af enhovede dyr fra tredjelande**

(kodificeret udgave)

(EØS-relevant tekst)

KAPITEL I

ALMINDELIGE BESTEMMELSER

Artikel 1

I dette direktiv fastlægges de dyresundhedsmæssige betingelser for enhovede dyrs bevægelser mellem medlemsstaterne og indførsel af enhovede dyr fra tredjelande.

Artikel 2

I dette direktiv forstås ved:

- a) »bedrift«: en landbrugs- eller træningsvirksomhed, en stald eller generelt ethvert lokale eller anlæg, hvor enhovede dyr på sædvanlig måde holdes eller opdrættes, uanset deres anvendelse
- b) »enhovede dyr«: husdyr eller vildtlevende dyr af hestarten — herunder også zebraer — eller æselarter eller dyr, der fremkommer ved krydsning heraf
- c) »registrerede enhovede dyr«: alle registrerede enhovede dyr, som defineret i Rådets direktiv 90/427/EØF af 26. juni 1990 om zootekniske og genealogiske betingelser for samhandelen inden for Fællesskabet med enhovede dyr⁽¹⁾, der er identificeret ved hjælp af et identifikationsdokument udstedt af:
 - i) den avlsorganisation eller enhver anden kompetent myndighed i dyrets oprindelsesland, som fører stambogen eller raceregistret for det pågældende enhovede dyr, eller
 - ii) enhver sammenslutning eller international organisation, der administrerer konkurrence- eller væddeløbsheste
- d) »slagtedy«: enhovede dyr, der enten direkte eller via et godkendt samlested som omhandlet i artikel 7 skal føres til slagteriet for at slagtes dér
- e) »enhovede dyr til opdræt og som brugsdyr«: andre enhovede dyr end dem, der er nævnt under litra c) og d)
- f) »medlemsstat eller tredjeland, der er fri for afrikansk hestepest«: enhver medlemsstat eller ethvert tredjeland, på hvis område der ikke er noget klinisk, serologisk (hos dyr, der ikke er vaccineret) eller epidemiologisk bevis på, at der har kunnet konstateres afrikansk hestepest i løbet af de sidste to år, og hvor der ikke er blevet vaccineret imod denne sygdom i løbet af de sidste 12 måneder

⁽¹⁾ EFT L 224 af 18.8.1990, s. 55.

▼B

- g) »obligatorisk anmeldepligtige sygdomme«: de i bilag I nævnte sygdomme
- h) »embedsdyrlæge«: dyrlæge, der er udpeget af den kompetente centralmyndighed i en medlemsstat eller et tredjeland
- i) »midlertidig indførsel«: status for registrerede enhovede dyr fra et tredjeland, indført på Fællesskabets område for et tidsrum på mindre end 90 dage, som skal fastsættes efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2, på grundlag af de dyresundhedsmæssige forhold i oprindelseslandet.

KAPITEL II

REGLER FOR ENHOVEDE DYRS BEVÆGELSER MELLEM MEDLEMSSTATER*Artikel 3*

En medlemsstat giver kun tilladelse til bevægelser på sit område for så vidt angår registrerede enhovede dyr og sender kun enhovede dyr til de øvrige medlemsstaters områder, hvis de opfylder betingelserne som fastsat i artikel 4 og 5.

De kompetente myndigheder i bestemmelsesmedlemsstaterne kan dog indrømme generelle eller begrænsede undtagelser for bevægelser for så vidt angår enhovede dyr:

- der til sportsmæssige eller rekreative formål rides eller føres på veje i nærheden af Fællesskabets indre grænser
- der deltager i kulturelle eller lignende foranstaltninger eller i aktiviteter, der tilrettelægges af hertil beføjede lokale organisationer i nærheden af Fællesskabets indre grænser
- der udelukkende skal græsse eller arbejde midlertidigt i nærheden af Fællesskabets indre grænser.

De medlemsstater, som udsteder en sådan tilladelse, giver Kommissionen meddelelse om indholdet af de indrømmede undtagelser.

Artikel 4

1. De enhovede dyr må ikke udvise noget klinisk tegn på sygdom ved kontrollen. Kontrollen skal for enhovede dyr finde sted inden for de sidste 48 timer før indladning. I forbindelse med registrerede enhovede dyr stilles der dog, med forbehold af artikel 6, kun krav om en sådan kontrol, hvis der er tale om handel inden for Fællesskabet.

2. Med forbehold af kravene i stk. 5 for obligatorisk anmeldepligtige sygdomme skal embedsdyrlægen ved kontrollen sikre sig, at intet forhold — navnlig på grundlag af erklæringer fra ejeren eller opdrætteren — viser, at de enhovede dyr har været i kontakt med andre enhovede dyr, der er angrebet af en infektion eller en smitsom sygdom, inden for de sidste 15 dage før kontrollen.

▼B

3. Dyrene må ikke skulle udskilles i forbindelse med et nationalt program for udryddelse af en infektiøs eller smitsom sygdom.

4. Dyrene skal identificeres, hvilket skal ske:

a) for registrerede enhovede dyr, ved et identifikationsdokument som omhandlet i direktiv 90/427/EØF, idet dette dokument navnlig skal godtgøre, at stk. 5 og 6 i nærværende artikel og artikel 5 i dette direktiv er overholdt.

Gyldigheden af identifikationsdokumentet skal suspenderes af embedsdyrlægen i den periode, hvor der gælder et forbud som omhandlet i stk. 5 i nærværende artikel eller artikel 5 i dette direktiv. Det skal efter slagting af det registrerede dyr tilbageleveres til den myndighed, der har udstedt det. Gennemførelsesbestemmelserne til dette litra fastsættes efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2

b) for enhovede dyr til opdræt og som brugsdyr, efter den identifikationsmetode, der fastlægges efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2.

5. Ud over kravene i artikel 5 må dyrene ikke stamme fra en bedrift, der er omfattet af et af følgende forbud:

a) hvis alle dyr af arter, der er modtagelige for den pågældende sygdom, og som er til stede på bedriften, ikke er blevet slagtet eller slået ned, skal det forbud, der er indført for bedriften, hvorfra dyret kommer, i det mindste gælde:

i) med hensyn til dyr, der mistænkes for at være angrebet af dourine, i seks måneder regnet fra datoen for den seneste kontakt eller mulighed for kontakt med et sygt enhovedt dyr. Hvis det drejer sig om en hingst, skal forbuddet dog gælde, indtil dyret kastreres

ii) med hensyn til snive og equin encephalomyelitis, i seks måneder regnet fra den dato, på hvilken de angrebne dyr er blevet udskilt

iii) med hensyn til infektiøs anæmi, i den periode, der — fra datoen for udskillelsen af de angrebne dyr — er nødvendig, for at de resterende dyr har reageret negativt på to Coggings-tests foretaget med tre måneders mellemrum

iv) i seks måneder regnet fra det senest konstaterede tilfælde af vesikulær stomatitis

v) i én måned regnet fra det senest konstaterede tilfælde af rabies

vi) i 15 dage regnet fra det senest konstaterede tilfælde af miltbrand

▼B

- b) hvis alle dyr af arter, der er modtagelige for den pågældende sygdom, og som er til stede på bedriften, er blevet slagtet eller slået ned og lokalerne desinficeret, gælder forbuddet i tredive dage regnet fra den dato, på hvilken dyrene er blevet fjernet og lokalerne desinficeret, undtagen med hensyn til miltbrand, hvor forbuddet gælder i 15 dage.

De kompetente myndigheder kan fravige disse forbud for så vidt angår hippodromer og væddeløbsbaner og underretter Kommissionen om karakteren af de indrømmede fravigelser.

6. ► **M1** Såfremt en medlemsstat opstiller eller har opstillet et fakultativt eller obligatorisk program til bekæmpelse af en sygdom, som kan ramme enhovede dyr, kan den forelægge Kommissionen dette program, inden for seks måneder regnet fra den 4. juli 1990 for så vidt angår Belgien, Danmark, Tyskland, Irland, Grækenland, Spanien, Frankrig, Italien, Luxembourg, Nederlandene, Portugal og Det Forenede Kongerige, regnet fra den 1. januar 1995 for så vidt angår Østrig, Finland og Sverige, regnet fra 1. maj 2004 for så vidt angår Den Tjekkiske Republik, Estland, Cypern, Letland, Litauen, Ungarn, Malta, Polen, Slovenien samt Slovakiet, regnet fra den 1. januar 2007 for så vidt angår Bulgarien og Rumænien og regnet fra den 1. juli 2013 for så vidt angår Kroatien, med oplysning, navnlig om følgende: ◀

- a) situationen med hensyn til den pågældende sygdom på dens område
- b) programmets berettigelse under hensyn til sygdommens alvor og programmets cost-benefit-fordele
- c) det geografiske område, hvor programmet skal anvendes
- d) de forskellige former for status gældende for virksomhederne, de normer, der skal opfyldes for hver enkelt art, og undersøgelsesprocedurerne
- e) procedurene for kontrollen med programmet
- f) konsekvenserne af, at en bedrift mister sin status, uanset årsagen
- g) de foranstaltninger, der skal træffes, såfremt der ved kontrol, gennemført i henhold til programmet, konstateres positive resultater
- h) den ikke-diskriminerende karakter af forholdet mellem handelen på den pågældende medlemsstats område og handelen inden for Fællesskabet.

Kommissionen gennemgår de programmer, medlemsstaterne forelægger. I givet fald godkender den dem efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2. Efter samme fremgangsmåde kan de generelle eller begrænsede supplerende garantier, som kan kræves i samhandelen mellem medlemsstaterne, præciseres. Disse garantier må ikke være mere omfattende end dem, som medlemsstaten gennemfører på nationalt plan.

▼B

De af medlemsstaterne forelagte programmer kan ændres eller suppleres efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 3. Efter samme fremgangsmåde kan der godkendes ændringer af eller tillæg til et tidligere godkendt program eller garantier fastsat i henhold til andet afsnit.

Artikel 5

1. Medlemsstater, der ikke er fri for afrikansk hestepest, kan kun sende enhovedede dyr fra den del af deres område, der betragtes som angrebet i henhold til stk. 2 i nærværende artikel, hvis de opfylder betingelserne i stk. 5.

2. En del af en medlemsstats område betragtes som angrebet af afrikansk hestepest, hvis:

- a) der er et klinisk, serologisk (hos dyr, der ikke er vaccineret) og/eller epidemiologisk bevis på, at der har kunnet konstateres afrikansk hestepest i løbet af de sidste to år, eller
- b) der er blevet vaccineret mod afrikansk hestepest i løbet af de sidste 12 måneder.

Den del af området, der betragtes som angrebet af afrikansk hestepest, skal mindst omfatte:

- a) et iagttagelsesdistrikt med en radius på mindst 100 km omkring ethvert sted med udbrud af sygdommen
- b) et overvågningsområde af en bredde på mindst 50 km omkring iagttagelsesdistriktet, hvor der ikke er blevet vaccineret i løbet af de sidste 12 måneder.

3. Reglerne for kontrol med og foranstaltningerne til bekæmpelse af afrikansk hestepest i de i stk. 2 nævnte områder og distrikter samt undtagelsesbestemmelser i forbindelse hermed er nærmere fastlagt i Rådets direktiv 92/35/EØF af 29. april 1992 om fastsættelse af regler for kontrol med og foranstaltninger til bekæmpelse af hestepest ⁽¹⁾.

4. Alle vaccinerede enhovedede dyr i iagttagelsesdistriktet skal registreres og mærkes i overensstemmelse med artikel 6, stk. 1, litra d), i direktiv 92/35/EØF.

Det skal af identifikationsdokumentet og/eller sundhedscertifikatet klart fremgå, at der er foretaget vaccination.

5. En medlemsstat må fra det i stk. 2, andet afsnit, omhandlede iagttagelsesdistrikt og overvågningsområde kun sende enhovedede dyr, der opfylder følgende krav:

- a) de må kun sendes i visse perioder af året, afhængig af de smittebærende insekters aktivitet; perioderne fastsættes efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 3
- b) de må ikke udvise noget klinisk tegn på afrikansk hestepest den dag, kontrollen som omhandlet i artikel 4, stk. 1, finder sted

⁽¹⁾ EFT L 157 af 10.6.1992, s. 19.

▼B

- c) de skal have gennemgået en test for afrikansk hestepest som beskrevet i bilag IV to gange med et interval på mellem enogtyve og tredive dage, idet test nr. 2 skal være foretaget i løbet af de sidste ti dage inden afsendelsen enten
- i) med negativt resultat, hvis de ikke er blevet vaccineret mod afrikansk hestepest, eller
 - ii) uden at der har været konstateret en stigning i mængden af anti-stoffer, og uden at de er blevet vaccineret inden for de sidste to måneder, hvis de er blevet vaccineret mod afrikansk hestepest

Efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2, og efter udtalelse fra Den Europæiske Fødevarerikkerhedsautoritet kan andre kontrolmetoder godkendes.

- d) de skal have været tilbageholdt på en karantænestation i en periode på mindst 40 dage inden afsendelsen
- e) de skal have været beskyttet mod smittebærende insekter i karantæneperioden og under transporten fra karantænestationen til afsendelsesstedet.

Artikel 6

De medlemsstater, der iværksætter en alternativ kontrolordning, som giver garantier svarende til dem, der i artikel 4, stk. 5, foreskrives for enhovede dyrs bevægelser inden for deres område, kan som en gensidig foranstaltning indrømme hinanden en fravigelse af artikel 4, stk. 1, andet punktum, og artikel 8, stk. 1, litra b).

De underretter Kommissionen herom.

Artikel 7

1. Enhovede dyr skal sendes hurtigst muligt fra den bedrift, hvor de opholder sig, enten direkte eller via et godkendt marked eller samlested som defineret som »samlesteder« i artikel 2, stk. 2, litra o), i Rådets direktiv 64/432/EØF af 26. juni 1964 om veterinærpolitimæssige problemer ved handel inden for Fællesskabet med kvæg og svin⁽¹⁾ til bestemmelsesstedet ved hjælp af transportmidler og transportkasser, der regelmæssigt rengøres og desinficeres med et desinficerende middel med en hyppighed, der skal fastsættes af afsendermedlemsstaten. Transportkøretøjerne skal være indrettet på en sådan måde, at dyrenes fæces, strøelse eller foder ikke kan sive eller falde ud af køretøjet under transporten. Transporten skal foregå på en sådan måde, at dyrenes sundhedstilstand sikres effektivt, og at der tages hensyn til deres velfærd, jf. dog forordning (EF) nr. 1/2005.

2. Bestemmelsesmedlemsstaten kan generelt eller begrænset indrømme en fravigelse af visse af kravene i artikel 4, stk. 5, forudsat at dyret er forsynet med et særligt mærke, der angiver, at det er bestemt til slagtning, og at det af sundhedscertifikatet i overensstemmelse med bilag III fremgår, at der er indrømmet en sådan fravigelse.

⁽¹⁾ EFT 121, 29.7.1964, s. 1977.

▼B

Er der indrømmet en sådan fravigelse skal slagtedyr sendes direkte til det udpegede slagteri og slagtes der inden for en frist på højst fem dage fra ankomsten til slagteriet.

3. Embedsdyrlægen skal i et register indføre identifikationsnummer eller identifikationsdokumentets nummer for det enhovede dyr, der er slagtet, og på anmodning af den kompetente myndighed på afsendelsesstedet til denne fremsende en attest, hvorved det bekræftes, at dyret er slagtet.

Artikel 8

1. Medlemsstaterne drager omsorg for:

a) at registrerede enhovede dyr, hvis de forlader bedriften, ledsages af det i artikel 4, stk. 4, litra a), omhandlede identifikationsdokument og, hvis de er bestemt til handel inden for Fællesskabet, af dette identifikationsdokument suppleret med den i bilag II omhandlede sundhedsattest

b) at enhovede dyr til opdræt eller som brugs- eller slagtedyr under transporten skal være ledsaget af et sundhedscertifikat, der er i overensstemmelse med bilag III.

2. Sundhedscertifikatet eller, i tilfælde af registrerede enhovede dyr, sundhedsattesten skal med forbehold af artikel 6 udstedes inden for de sidste 48 timer eller senest sidste arbejdsdag før inladrningen, på det eller de officielle sprog i afsendelsesmedlemsstaten og bestemmelsesmedlemsstaten. Sundhedscertifikatet eller sundhedsattesten skal være gyldigt i ti dage. Certifikatet eller attesten skal bestå af et enkelt blad.

3. Bevægelser mellem medlemsstater af andre enhovede dyr end registrerede enhovede dyr kan finde sted med et enkelt sundhedscertifikat pr. sending i stedet for med det i stk. 1, litra b), omhandlede individuelle sundhedscertifikat.

Artikel 9

Bestemmelserne i direktiv 90/425/EØF finder især anvendelse med hensyn til kontrol på oprindelsesstedet, tilrettelæggelse og opfølgning af den kontrol, som bestemmelsesmedlemsstaten skal foretage, samt med hensyn til de beskyttelsesforanstaltninger, der skal iværksættes.

Artikel 10

Kommissionens veterinærsagkyndige kan, i det omfang det er nødvendigt for en ensartet anvendelse af dette direktiv og i samarbejde med de kompetente nationale myndigheder, gennemføre kontrol på stedet. Kommissionen underretter medlemsstaterne om resultatet af den gennemførte kontrol.

Den medlemsstat, på hvis område der gennemføres en sådan kontrol, yder de sagkyndige al den hjælp, der er nødvendig for udførelsen af deres opgave.

▼B

Gennemførelsesbestemmelserne til denne artikel fastsættes efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2.

KAPITEL III

REGLER FOR INDFØRELSE AF ENHOVEDE DYR FRA TREDJELANDE

Artikel 11

Enhovede dyr, der indføres i Fællesskabet, skal opfylde betingelserne som anført i artikel 12-16.

Artikel 12

1. Import til Fællesskabet af enhovede dyr tillades kun fra tredjelande, der er opført på en liste der opstilles eller ændres efter proceduren i artikel 21, stk. 2.

Under hensyntagen til sundhedssituationen og de garantier, tredjelandet giver for så vidt angår enhovede dyr, kan det efter proceduren i artikel 21, stk. 2, besluttes, at den tilladelse, der er omhandlet i første afsnit, gælder for det pågældende tredjelands samlede område eller kun for en del af dets område.

I den forbindelse og på grundlag af de relevante internationale standarder tages det i betragtning, hvordan det pågældende tredjeland anvender og gennemfører de pågældende standarder, navnlig princippet om regionalisering inden for dets eget område og dets sundhedsbetingelser for import fra andre tredjelande og fra Fællesskabet.

2. Ved udarbejdelse eller ændring af den i stk. 1 omhandlede liste tages navnlig følgende i betragtning:

a) den sundhedsstatus, som enhovede dyr, andre husdyr og vildtbestanden i tredjelandet har, navnlig med hensyn til eksotiske dyresygdomme og generelle sundheds- og miljøforhold i tredjelandet, der kan udgøre en fare for sundhedsstatus og miljøstatus i Fællesskabet

b) tredjelandets lovgivning om dyresundhed og dyrevelfærd

c) de kompetente veterinærmyndigheders og kontroltjenesternes opbygning, disses beføjelser, det tilsyn, de er undergivet, og de muligheder, de har, herunder personale og laboratoriekapacitet, for effektivt at anvende den nationale lovgivning

d) de garantier, som tredjelandets kompetente veterinærmyndigheder kan give med hensyn til opfyldelsen af eller ligestilling med de relevante dyresundhedsbetingelser, der gælder i Fællesskabet

▼B

- e) tredjelandets eventuelle medlemskab af Verdensorganisationen for Dyresundhed (OIE) og den regelmæssighed og hurtighed, hvormed tredjelandet fremsender oplysninger om forekomst af infektiøse eller smitsomme sygdomme hos enhovedede dyr på dets område, navnlig de sygdomme, der er anført på OIE-listen og i bilag I til dette direktiv
- f) de garantier, som tredjelandet giver med hensyn til direkte at underrette Kommissionen og medlemsstaterne:
 - i) efter højst 24 timer, om bekræftelse af forekomst af infektiøse sygdomme hos enhovedede dyr, der er opført i bilag I, og om ændringer af vaccinationspolitikken over for de pågældende sygdomme
 - ii) inden for et passende tidsrum, om forslag til ændringer af de nationale sundhedsbestemmelser om enhovedede dyr, navnlig vedrørende import af enhovedede dyr
 - iii) regelmæssigt, om dyresundhedsstatus på dets område for så vidt angår enhovedede dyr
- g) erfaringen med tidligere import af enhovedede dyr fra tredjelandet og resultaterne af en eventuel importkontrol
- h) resultaterne af EF-kontrol og/eller -audit i tredjelandet, navnlig resultaterne af de kompetente myndigheders vurdering, eller hvis Kommissionen anmoder herom, en rapport fra de kompetente myndigheder om den kontrol, de har foretaget
- i) de bestemmelser, der i tredjelandet gælder for forebyggelse og bekæmpelse af infektiøse eller smitsomme dyresygdomme, og anvendelsen heraf, herunder også bestemmelser om import af enhovedede dyr fra andre tredjelande.

3. Kommissionen sørger for, at ajourførte udgaver af listen, der er opstillet eller ændret i henhold til stk. 1, stilles til rådighed for offentligheden.

Listen kan kombineres med andre lister, der opstilles af hensyn til dyre- og folkesundheden, og kan også indeholde modeller for sundhedscertifikater.

4. Der fastsættes særlige importbetingelser for hvert tredjeland eller hver gruppe af tredjelande under hensyntagen til dyresundhedssituationen vedrørende enhovedede dyr i det pågældende tredjeland eller gruppen af tredjelande efter proceduren i artikel 21, stk. 2.

5. Der kan vedtages gennemførelsesbestemmelser til stk. 1-4 og kriterier for at optage tredjelande eller dele af tredjelande på listerne omhandlet i stk. 1 efter proceduren i artikel 21, stk. 2.

Artikel 13

1. Enhovedede dyr skal komme fra tredjelande, som:

- a) er fri for afrikansk hestepest
- b) i to år har været fri for venezuelansk encephalomyelitis (VEE)
- c) i seks måneder har været fri for dourine og snive.

▼B

2. Efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2 kan det besluttes:
- a) at stk. 1 i denne artikel kun finder anvendelse på dele af et tredjelands område.

Fastsættes kravene angående afrikansk hestepest områdevis, skal de i artikel 5, stk. 2 og 5, fastsatte foranstaltninger overholdes som et minimum;

- b) at kræve yderligere garantier for sygdomme, der i Fællesskabet anses for eksotiske.

Artikel 14

Enhovede dyr skal inden dagen for deres indladning med henblik på forsendelse til bestemmelsesmedlemsstaten uafbrudt have opholdt sig på et tredjelands område eller en del af et tredjelands område eller, såfremt området er opdelt, på den del af området, der er fastsat i henhold til artikel 13, stk. 2, litra a), i en periode, der fastsættes i forbindelse med vedtagelsen af de afgørelser, der skal træffes i henhold til artikel 15.

De skal komme fra en bedrift, som er under dyrlægekontrol.

Artikel 15

Indførsel af enhovede dyr fra et tredjelands område eller en del af et tredjelands område, fastsat i henhold til artikel 13, stk. 2, litra a), der er opført på den liste, som er opstillet i henhold til artikel 12, stk. 1, er kun tilladt, hvis de, foruden kravene i artikel 13:

- a) opfylder de sundhedsmæssige betingelser, der efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2, er vedtaget for indførsel af enhovede dyr fra det pågældende land, alt efter den pågældende art, kategorier af enhovede dyr.

Ved fastsættelsen af de dyresundhedsmæssige krav anvendes som referencebasis de normer, der er fastsat i artikel 4 og 5; og

- b) når der er tale om tredjelande, der ikke i mindst seks måneder har været fri for vesikulær stomatitis eller viral arthritis, men med hensyn til de enhovede dyr opfylder følgende krav:
- i) de enhovede dyr skal komme fra en bedrift, der i mindst seks måneder har været fri for vesikulær stomatitis, og inden deres afsendelse have reageret negativt på en serologisk test
- ii) for så vidt angår viral arthritis skal de enhovede dyr af hankøn, med forbehold af artikel 19, litra b), have reageret negativt på en serologisk test eller et isolationsvirus eller enhver anden test, som er godkendt efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2, og som garanterer, at dyret ikke er smittet med denne sygdom.

▼B

Efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2 og efter udtalelse fra Den Europæiske Fødevarerikkerhedsautoritet kan de kategorier af enhovedede dyr af hankøn, for hvilke dette krav skal gælde, begrænses.

Artikel 16

1. Enhovedede dyr skal identificeres i overensstemmelse med artikel 4, stk. 4, og ledsages af et sundhedscertifikat, der er udfærdiget af en embedsdyrlæge i eksporttredjelandet. Sundhedscertifikatet skal:

- a) være udstedt på dagen for dyrenes indladning med henblik på forsendelse til bestemmelsesmedlemsstaten, eller, når det drejer sig om registrerede heste, på sidste arbejdsdag inden indladning
- b) være affattet på mindst et af bestemmelsesmedlemsstatens officielle sprog og mindst et af de officielle sprog i den medlemsstat, hvor importkontrollen gennemføres
- c) ledsage dyrene i originaleksemplaret
- d) bekræfte, at dyrene opfylder betingelserne i dette direktiv og de til direktivets gennemførelse fastsatte betingelser for indførsel fra tredjelandet
- e) bestå af et enkelt blad
- f) være bestemt for en enkelt modtager eller, for slagtedyrs vedkommende, for en behørigt mærket og identificeret sending.

Medlemsstaterne underretter Kommissionen, såfremt de gør brug af denne mulighed.

2. Certifikatet skal udfærdiges på en formular, som er i overensstemmelse med en model udarbejdet efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2.

Artikel 17

1. Slagte dyr skal straks efter ankomsten til bestemmelsesmedlemsstaten føres til et slagteri, enten direkte eller via et godkendt samlested som omhandlet i artikel 7, og i overensstemmelse med de dyresundhedsmæssige krav slagtes inden for en frist, der fastsættes i forbindelse med vedtagelsen af de afgørelser, der skal træffes i henhold til artikel 15.

2. Med forbehold af de særlige betingelser, der eventuelt fastsættes efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2, kan den kompetente myndighed i bestemmelsesmedlemsstaten af dyresundhedsmæssige grunde udpege det slagteri, hvortil disse enhovedede dyr skal sendes.

Artikel 18

Medlemsstaternes og Kommissionens veterinære sagkyndige efterprøver ved kontrol på stedet, om bestemmelserne i dette direktiv, særlig bestemmelserne i artikel 12, stk. 2, faktisk overholdes.

▼B

Hvis en kontrol foretaget i medfør af denne artikel afslører alvorlige mangler på en bedrift, underretter Kommissionen straks medlemsstaterne herom og vedtager omgående en afgørelse, der suspenderer autorisationen midlertidigt. En endelig afgørelse træffes efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 3.

Medlemsstaternes sagkyndige, der har til opgave at foretage denne kontrol, udpeges af Kommissionen på forslag af medlemsstaterne.

Denne kontrol foretages på Fællesskabets vegne, og dette afholder de dertil svarende omkostninger.

Hyppigheden af og de nærmere regler for denne kontrol fastsættes efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2.

Artikel 19

Efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 2:

- a) kan det besluttes at begrænse indførslen fra et tredjeland eller en del af et tredjeland til særlige arter eller kategorier af enhovedede dyr
- b) fastsættes, uanset artikel 15, de særlige betingelser, hvorpå midlertidig indførsel til Fællesskabets område eller genindførsel til nævnte område efter midlertidig udførsel af registrerede enhovedede dyr eller enhovedede dyr, der skal anvendes til særlige formål, kan finde sted
- c) fastsættes betingelserne for, hvorledes en midlertidig indførsel kan ændres til endelig indførsel
- d) kan der udpeges et EF-referencelaboratorium for en eller flere af de i bilag I nævnte hovdyrsygdomme, og de funktioner, opgaver og procedurer, som skal gælde for samarbejdet med de laboratorier, der har til opgave at diagnosticere infektiøse sygdomme hos hovdyr i medlemsstaterne, fastlægges.

KAPITEL IV

AFSLUTTENDE BESTEMMELSER*Artikel 20*

Bilag I-IV ændres efter fremgangsmåden i artikel 21, stk. 3.

Artikel 21

1. Kommissionen bistås af Den Stående Komité for Fødevarekæden og Dyresundhed nedsat ved artikel 58 i Europa-Parlamentet og Rådets forordning (EF) nr. 178/2002 af 28. januar 2002 om generelle principper og krav i fødevarelovgivningen, om oprettelse af Den Europæiske Fødevaresikkerhedsautoritet og om procedurer vedrørende fødevaresikkerhed ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ EFT L 31 af 1.2.2002, s. 1.

▼B

2. Når der henvises til dette stykke, anvendes artikel 5 og 7 i afgørelse 1999/468/EF.

Perioden i artikel 5, stk. 6, i afgørelse 1999/468/EF fastsættes til tre måneder.

3. Når der henvises til denne artikel, anvendes artikel 5 og 7 i afgørelse 1999/468/EF.

Perioden i artikel 5, stk. 6, i afgørelse 1999/468/EF fastsættes til 15 dage.

Artikel 22

Direktiv 90/426/EØF, som ændret ved de direktiver, der er nævnt i bilag V, del A, ophæves, uden at dette berører medlemsstaternes forpligtelser med hensyn til de i bilag V, del B, angivne frister for gennemførelse i national ret af direktiverne.

Henvisninger til det ophævede direktiv gælder som henvisninger til nærværende direktiv og læses efter sammenligningstabellen i bilag VI

Artikel 23

Dette direktiv træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Artikel 24

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

▼B

BILAG I

ANMELDEPLIGTIGE SYGDOMME

Følgende sygdomme er underkastet obligatorisk anmeldepligt:

- Dourine
- Snive
- Equin encephalomyelitis (i alle former, herunder også VEE)
- Infektøs anæmi
- Rabies
- Miltbrand
- Afrikansk hestepest
- Vesikulær stomatitis.

▼B*BILAG II*

MODEL

SUNDHEDSATTEST ^(a)

Pasnr.

Undertegnede embedsdyrlæge erklærer ^(b), at ovennævnte enhovede dyr opfylder følgende betingelser:

- a) det er blevet undersøgt i dag og udviser intet klinisk tegn på sygdom
- b) det drejer sig ikke om et dyr, der skal fjernes i forbindelse med et program i medlemsstaten for udryddelse af en smitsom sygdom
- c) — det kommer ikke fra en medlemsstats område eller en del af en medlemsstats/område, hvor der er indført restriktioner som følge af afrikansk hestepest

det kommer fra en medlemsstats område eller en del af en medlemsstats område, hvor der af dyresundhedsmæssige grunde gjaldt et forbud, og det har på karantænestationen imellem den og den været underkastet de test, der omhandles i artikel 5, stk. 5, i direktiv 2009/156/EF, med tilfredsstillende resultat ^(c)

— det er ikke vaccineret mod afrikansk hestepest, eller

det blev vaccineret mod afrikansk hestepest den ^(c) ^(d)

- d) det kommer ikke fra en bedrift, for hvilken der af dyresundhedsmæssige grunde gjaldt et forbud, og det har ikke været i kontakt med enhovede dyr på en bedrift, for hvilken der af dyresundhedsmæssige grunde gjaldt et forbud:

— i tilfælde af enhovede dyr mistænkt for at være angrebet af dourine i seks måneder efter den seneste kontakt eller mulighed for kontakt med et sygt enhovedt dyr; hvis der er tale om en hingst, gælder forbuddet dog, indtil den kastreres

— i tilfælde af snive eller hesteencephalitis i seks måneder efter den dato, hvor de angrebne dyr er fjernet

— i tilfælde af infektiøs anæmi i tilstrækkelig lang tid til, at de resterende dyr efter den dato, hvor de angrebne dyr er fjernet, har reageret negativt på to Coggins-test foretaget med tre måneders interval

— i tilfælde af vesikulær stomatitis i seks måneder efter det sidste sygdomstilfælde

— i tilfælde af rabies i en måned efter det sidste sygdomstilfælde

— i tilfælde af miltbrand i femten dage efter det sidste sygdomstilfælde

— i tilfælde, hvor alle dyr af modtagelige arter på bedriften er blevet slagtet eller aflivet og lokalerne desinficeret i tredivede dage efter den dato, hvor dyrene er fjernet eller lokalerne desinficeret, undtagen i tilfælde af miltbrand, for hvis vedkommende forbuddet gælder i femten dage

^(a) Denne attest kræves ikke, hvis der foreligger en bilateral aftale i henhold til artikel 6 i direktiv 2009/156/EF.

^(b) Attesten er gyldig i ti dage.

^(c) Det ikke gældende overstreges.

^(d) Vaccinationen skal være angivet i passet.

▼B

- e) det har, så vidt mig bekendt, ikke været i kontakt med erhovede dyr, der er angrebet af smitsom sygdom eller infektion, i de sidste femten dage
- f) på undersøgelsestidspunktet var det egnet til at blive transporteret på den planlagte strækning efter bestemmelserne i forordning (EF) nr. 1/2005 ^(*).

| Dato | Sted | Embedsdyrlægens stempel og underskrift ⁽¹⁾ |
|------|------|---|
| | | |

⁽¹⁾ Navn med blokbogstaver og stilling

^(*) Denne erklæring fritager ikke transportvirksomhederne for deres forpligtelser i medfør af de gældende fællesskabsbestemmelser om specielt dyrs egnethed til transport.



DET EUROPÆISKE FÆLLESSKAB Registrerede enhovede dyr, enhovede dyr til opdræt og som brugsdyr, enhovede slagtedy

| II. Sundhedsoplysninger ⁽¹⁾ | | II.a. Certifikatets referencenummer | II.b. Lokalt referencenummer |
|--|---|---|------------------------------|
| Undertegnede embedsdyrlæge bekræfter, at det/de ovennævnte enhovede dyr opfylder følgende betingelser: | | | |
| Del II: Attestering | II.1 | det/de er blevet undersøgt i dag og udviser intet klinisk tegn på sygdom | |
| | II.2 | det drejer sig ikke om (et) dyr, der skal fjernes i forbindelse med et program i Danmark for udryddelse af en smitsom sygdom eller infektion | |
| | <i>enten</i> ⁽²⁾ [II.3 | det/de kommer ikke fra en medlemsstats område eller en del af en medlemsstats område, hvor der er indført restriktioner som følge af hestepest] | |
| | <i>eller</i> ⁽²⁾ [II.3 | det/de kommer fra en medlemsstats område eller en del af en medlemsstats område, hvor der er indført restriktioner som følge af hestepest, har i mindst 40 dage forud for afsendelsen opholdt sig på karantænestationen, der er beskyttet mod smittebærere, og er blevet testet for antistoffer mod hestepestvirus som beskrevet i bilag IV til direktiv 2009/256/EF, idet testen blev udført samtidig på blodprøver, der var taget ad to gange med et interval på mellem 21 og 30 dage den (<i>angiv dato</i>) og i de ti dage inden forsendelse den (<i>angiv dato</i>), | |
| | <i>enten</i> ⁽³⁾ | [med et negativt resultat i begge tilfælde, hvis det/de ikke var vaccinerede mod hestepest] | |
| | <i>eller</i> ⁽²⁾ | [uden øget antistoftal, hvis det/de var vaccinerede mod hestepest] | |
| | <i>enten</i> ⁽³⁾ [II.4 | det/de er ikke blevet vaccineret mod hestepest] | |
| | <i>eller</i> ⁽²⁾ [II.4 | det/de er blevet vaccineret mod hestepest den (<i>indsæt dato</i>), | |
| | <i>enten</i> ⁽³⁾ | [mindst to måneder inden certificeringen] | |
| | <i>eller</i> ⁽²⁾ | [mindst to måneder inden ankomsten til karantænestationen] | |
| II.5 | det/de kommer ikke fra en bedrift/bedrifter, hvor der er nedlagt et forbud af dyresundhedsmæssige grunde, hvori der stilles mindst en af følgende betingelser: | | |
| <i>enten</i> ⁽³⁾ | [ikke alle dyrene på bedriften af den art, der er modtagelig for de i litra a) til g) nævnte sygdomme, blev slagtet, og forbuddet varede mindst: | | |
| a) | i tilfælde af enhovede dyr mistænkt for at være angrebet af dourine | | |
| <i>enten</i> ⁽²⁾ | [i seks måneder efter den seneste kontakt eller mulighed for kontakt med et dyr, der var angrebet af eller smittet med <i>Trypanosoma equiperdum</i>] | | |
| <i>eller</i> ⁽²⁾ | [hvis der er tale om en hingst, indtil dyret kastreredes] | | |
| b) | i tilfælde af snive i seks måneder regnet fra den dato, hvor de enhovede dyr, der var angrebet af sygdommen eller var testet positive for det virksomme patogen <i>Burkholderia mallei</i> eller antistoffer mod det pågældende patogen, blev aflivet og destrueret | | |
| c) | i tilfælde af enhver form for equin encephalomyelitis i seks måneder regnet fra den dato, hvor de angrebne dyr blev slagtet, undtagen i tilfælde af infektion med West Nile-virus, hvor seks månedersperioden regnes fra den dato, hvor de angrebne dyr døde, blev fjernet fra bedriften eller blev fuldstændig raske | | |

▼ **M2***BILAG IV***AFRIKANSK HESTEPEST****DIAGNOSE**

DEL A

Serologiske test

Den serologiske metode, der er beskrevet nedenfor, er enzyumbundne immuno-sorbente assays (ELISA), baseret på kapitel 2.5.1, afsnit B, punkt 2, i Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2016-udgaven, som vedtaget af OIE's World Assembly of Delegates i maj 2012.

VP7-virusproteinet er et betydende immundominant antigen af afrikansk hestepest-virus (AHSV) og er bevaret i alle de ni AHSV-serotyper. Rekombinante AHSV-VP7-proteiner har vist sig at være stabile og uskadelige og egnede til at blive anvendt som antigen i ELISA-procedurer til bestemmelse af AHSV-antistoffer med en høj grad af følsomhed og specificitet (Laviada et al., 1992b ⁽¹⁾; Maree og Paweska, 2005). Den indirekte ELISA og den blokerende ELISA er de to AHS-VP7-ELISA-test, der egner sig til serologisk diagnosticering af afrikansk hestepest (AHS).

1. **Indirekte ELISA til påvisning af antistoffer mod afrikansk hestepest-virus (AHSV)**

Det konjugat, der anvendes med denne metode, er en horseradishperoxidase-antihestegammaglobulin, som reagerer med serum fra heste, muldyr og æsler. Med den af Maree & Paweska (2005) beskrevne metode ⁽²⁾ anvendes protein G som konjugat, der også reagerer med zebraserum.

Antigenet kan efter anmodning leveres af Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) i Spanien inden for 4-6 måneder.

1.1. *Testprocedure*

1.1.1. Fast fase

1.1.1.1. ELISA-plader påføres rekombinant AHSV-4 VP7 fortyndet med carbonat/bicarbonatbuffer, pH-værdi 9,6. Pladerne inkuberes natten over ved 4 °C.

1.1.1.2. Pladerne skylles fem gange med destilleret vand indeholdende 0,01 % (v/v) Tween 20 (skylleopløsning). Pladerne bankes forsigtigt mod absorberende materiale, så eventuel resterende skylleopløsning fjernes.

1.1.1.3. Pladerne blokeres med fosfatbufferet saltopløsning (PBS), pH-værdi 7,2, + 5 % (w/v) skummetmælk (Nestlé Dry Skim MilkTM), 200 µl/brønd, i 1 time ved 37 °C.

1.1.1.4. Den blokerende opløsning fjernes, og pladerne bankes forsigtigt mod absorberende materiale.

⁽¹⁾ M. D. Laviada, P. Roy, og J. M. Sanchez-Vizcaino (1992b). Adaptation and Evaluation of an Indirect ELISA and Immuno-Blotting Test for African Horse Sickness Antibody Detection. Findes i: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium. T. E. Walton & B. I. Osburn, Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, s. 646-650.

⁽²⁾ S. Maree og J. T. Paweska (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), s. 55-65.

▼ M2

1.1.2. Testprøver

- 1.1.2.1. De serumprøver, der skal testes, og positive og negative kontrolsera fortyndes 1:25 med PBS + 5 % (w/v) skummetmælk + 0,05 % (v/v) Tween 20, 100 µl pr. brønd. Der inkuberes i 1 time ved 37 °C.

Ved titrering tilberedes en tofolds fortyndingsrække fra 1:25 (100 µl/brønd), ét serum pr. pladekolonne, og det samme gøres med de positive og negative kontroller. Der inkuberes i 1 time ved 37 °C.

- 1.1.2.2. Pladerne skylles fem gange med destilleret vand indeholdende 0,01 % (v/v) Tween 20 (skylleopløsning). Pladerne bankes forsigtigt mod absorberende materiale, så eventuel resterende skylleopløsning fjernes.

1.1.3. Konjugat

- 1.1.3.1. Der overføres 100 µl/brønd horseradishperoxidasekonjugeret (HRP) antihæstegammaglobulin fortyndet med PBS + 5 % mælk + 0,05 % Tween 20, pH-værdi 7,2. Der inkuberes i 1 time ved 37 °C.

- 1.1.3.2. Pladerne skylles fem gange med destilleret vand indeholdende 0,01 % (v/v) Tween 20 (skylleopløsning). Pladerne bankes forsigtigt mod absorberende materiale, så eventuel resterende skylleopløsning fjernes.

1.1.4. Kromogen/substrat

- 1.1.4.1. Der tilsættes 200 µl/brønd kromogen-/substratopløsning (10 ml 80,6 mM DMAB (dimethylaminobenzaldehyd) + 10 ml 1,56 mM MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinhydraxonhydrochlorid) + 5 µl H₂O₂).

Farveudviklingen standses ved tilsætning af 50 µl 3N H₂SO₄ efter ca. 5-10 minutter (inden den negative kontrol begynder at antage farve).

Andre kromogener såsom ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsyre]), TMB (tetramethylbenzidin) eller OPD (orthophenyldiamin) kan også benyttes.

- 1.1.4.2. Pladerne aflæses ved 600 nm (eller 620 nm).

1.2. *Fortolkning af resultater*

- 1.2.1. Cut-off-værdien beregnes, ved at der lægges 0,06 til værdien af den negative kontrol (0,06 er den afledte standardafvigelse for en gruppe på 30 negative sera).

- 1.2.2. Testprøver, der giver absorbansværdier, som ligger under cut-off, betragtes som negative.

- 1.2.3. Testprøver, der giver absorbansværdier, som ligger over cut-off + 0,15, betragtes som positive.

- 1.2.4. Testprøver, der giver mellemliggende absorbansværdier, betragtes som inkonklusive, og resultatet skal bekræftes ved en anden metode.

▼ M2**2. Blokerende ELISA til påvisning af antistoffer mod afrikansk hestepestvirus (AHSV)**

Den kompetitive blokerende ELISA er udformet med henblik på påvisning af specifikke AHSV-antistoffer i sera fra ethvert dyr af hestefamilien, dvs. heste, æsler, zebraer og krydsninger heraf, med det formål at forebygge problemet med specificitet, som til tider gør sig gældende ved brug af indirekte ELISA'er.

Testprincippet er at blokere reaktionen mellem det rekombinante VP7-protein, der er absorberet til ELISA-pladen, og et konjugeret AHS-VP7-specifikt monoklonalt antistof (Mab). Antistoffet i testseraene vil blokere reaktionen mellem antigenet og Mab, hvilket medfører, at farven bliver mindre kraftig. Da Mab er rettet mod VP7, vil testen udvise stor følsomhed og specificitet.

Den kompetitive blokerende ELISA er kommercielt tilgængelig.

2.1. Testprocedure**2.1.1. Fast fase**

2.1.1.1. Pladerne påføres 50-100 ng rekombinant AHSV-4 VP7 fortyndet med carbonat/bicarbonatbuffer, pH-værdi 9,6. Der inkuberes natten over ved 4 °C.

2.1.1.2. Pladerne skylles 3 gange med fosfatbufferet saltopløsning (PBS) 0,1x indeholdende 0,135 M NaCl og 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST). Pladerne bankes forsigtigt mod absorberende materiale, så eventuel resterende skylleopløsning fjernes.

2.1.2. Testprøver og kontroller

2.1.2.1. De serumprøver, der skal testes, og positive og negative kontrolsera fortyndes 1:5 med fortyndingsmiddel indeholdende 0,35 M NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20 + 0,1 % Kathon, 100 µl pr. brønd. Der inkuberes i 1 time ved 37 °C.

Ved titrering tilberedes en tofolds fortyndingsrække af testseraene fra 1:10 til 1:280 over 8 brønde (100 µl/brønd), ét serum pr. pladekolonne, og det samme gøres med de positive og negative kontroller. Der inkuberes i 1 time ved 37 °C.

2.1.2.2. Pladerne skylles 5 gange med fosfatbufferet saltopløsning (PBS) 0,1x indeholdende 0,135 M NaCl og 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST). Pladerne bankes forsigtigt mod absorberende materiale, så eventuel resterende skylleopløsning fjernes.

2.1.3. Konjugat

2.1.3.1. Der overføres 100 µl/brønd horseradishperoxidasekonjugeret anti-VP7-Mab. Dette Mab er forinden fortyndet 1:5 000-1:15 000 i en 1:1 opløsning af StabiliZyme Select® Stabilizer (SurModics. Reference: SZ03) i destilleret vand. Der inkuberes i 30 minutter ved 37 °C.

2.1.3.2. Pladerne skylles 5 gange med fosfatbufferet saltopløsning (PBS) 0,1x indeholdende 0,135 M NaCl og 0,05 % (v/v) Tween 20 (PBST). Pladerne bankes forsigtigt mod absorberende materiale, så eventuel resterende skylleopløsning fjernes.

▼ **M2**

2.1.4. Kromogen/substrat

Der tilsættes 100 µl/brønd kromogen-/substratopløsning, dvs. 1 ml ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsyre] 5 mg/ml + 9 ml substratbuffer (0,1 M fosfat-citratbuffer med en pH-værdi på 4 indeholdende 0,03 % H₂O₂), og inkuberes i 10 minutter ved stuetemperatur. Farveudviklingen standses ved tilsætning af 100 µl/brønd 2 % (w/v) SDS (natriumdodecylsulfat).

2.1.5. Aflæsning

Der aflæses ved 405 nm i en ELISA-læser.

2.2. *Fortolkning af resultater*

2.2.1. Blokeringsprocenten (BP) bestemmes for hver prøve ved anvendelse af følgende formel, hvor »Abs« står for antistoffer:

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

2.2.2. Prøver, der giver en BP-værdi på over 50 %, betragtes som positive for AHSV-antistoffer.

2.2.3. Prøver, der giver en BP-værdi på under 45 %, betragtes som negative for AHSV-antistoffer.

2.2.4. Prøver, der giver en BP-værdi på mellem 45 % og 50 %, betragtes som inkonklusive og underkastes fornyet testning. Er resultatet igen inkonklusivt, underkastes dyrene fornyet testning på prøver udtaget tidligst to uger efter udtagelsen af den prøve, der blev betraget som inkonklusiv.

DEL B

Bestemmelse af agenset

Realtids-revers transkriptase-polymerasekædereaktion (rRT-PCR)

Agensidentifikationstest baseret på nukleinsyremetoder skal kunne påvise referencestammer fra de ni AHSV-virusserotyper.

Den metode, der er beskrevet i punkt 2.1, er baseret på kapitel 2.5.1, afsnit B, punkt 1,2, i Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2016-udgaven, som vedtaget af OIE's World Assembly of Delegates i maj 2012.

Enhver RT-PCR-påvisningsmetode, der anvendes til testning af prøver — enten blod eller milt — inden for rammerne af direktiv 2009/156/EF, skal være lige så eller mere følsom end de i punkt 2 beskrevne metoders.

Inaktiverede virus af referencestammer af serotype 1-9 kan fås fra EU-referencelaboratoriet eller OIE-referencelaboratoriet for afrikansk hestepest i Algete i Spanien.

1. **Ekstraktion af viralt RNA**

For at sikre en god reaktion er det nødvendigt at ekstrahere AHSV-RNA af høj kvalitet fra prøven. Ekstraktion af nukleinsyrer fra kliniske prøver kan udføres efter flere forskellige interne og kommercielt tilgængelige metoder.

▼ **M2**

De forskellige kommercielle kit indebærer forskellige tilgange til RNA-isolering. De fleste er baseret på én af følgende procedurer:

- phenol-chloroform-ekstraktion af nukleinsyrer
- adsorption af nukleinsyrer til filter
- adsorption af nukleinsyrer til magnetiske kugler.

Nedenfor beskrives et eksempel på intern RNA-ekstraktion:

- 1.1. 1 g vævsprøve homogeniseres i 1 ml denatureringsopløsning (4 M guanidiniumthiocyanat, 25 mM natriumcitrat, 0,1 M 2-mercaptoethanol og 0,5 % sarcosyl).
- 1.2. Efter centrifugering tilsættes 1 µg gær-RNA, 0,1 ml 2 M natriumacetat, pH-værdi 4, 1 ml phenol og 0,2 ml chloroform/isoamylalkohol-blanding (49:1), til supernatanten.
- 1.3. Opløsningen omrystes kraftigt og afkøles på is i 15 minutter.
- 1.4. Efter centrifugering phenolekstraheres RNA'et, som er til stede i den vandige fase, hvorefter det udfældes med ethanol og resuspenderes i sterilt vand.

2. **Realtids-RT-PCR-procedure**

- 2.1. *Gruppespecifik realtids-RT-PCR efter Agüero et al., 2008 ⁽¹⁾*

Denne gruppespecifikke realtids-RT-PCR er rettet mod VP7 i AHSV og gør det muligt at påvise alle kendte AHSV-serotyper og -stammer, der er i omløb i dag. Den er blevet anvendt med rigtig gode resultater af de nationale referencelaboratorier fra EU's medlemsstater, der har deltaget i de præstationsprøvnings, der er blevet arrangeret årligt af EU-referencelaboratoriet i perioden 2009-2015. I en international ring-test, som blev arrangeret i 2015 inden for rammerne af OIE-referencelaboratoriernes netværk, opnåede denne protokol en meget høj placering blandt de øvrige protokoller.

Primer- og probesekvenser til påvisning af AHSV-artsvirus:

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

- 2.1.1. Primer-stamopløsningen fortyndes til en arbejdskoncentration på 8 µM (»primer-arbejdsopløsning 8 µM«), mens proben fortyndes til en arbejdskoncentration på 50 µM (»probe-arbejdsopløsning 50 µM«). Der frembringes et testpladelayout, som indlæses i realtids-PCR-maskinens software. Med dette layout som rettesnor tilsættes 2,5 µl af hver primer-arbejdsopløsning 8 µM til hver brønd, der er bestemt til at indeholde RNA-prøver/positive og/eller negative kontroller (slutkoncentrationen af primeren vil være på 1 µM i de 20 µl RT-PCR-mix). Pladen holdes på is.

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

▼ **M2**

- 2.1.2. 2 µl af det isolerede RNA (testprøver og den positive kontrol), eller 2 µl RNase-frit vand i negative reaktionskontroller, blandes med forward- og revers-primere. Denne blanding denatureres ved opvarmning ved 95 °C i 5 minutter, efterfulgt af hurtig afkøling på is i mindst 5 minutter.
- 2.1.3. Der tilberedes en passende mængde realtids-one-step-RT-PCR-mastermix til det antal prøver, der skal testes, efter fabrikantens anvisninger. Der tilsættes 0,1 µl probe-arbejdsopløsning 50 µM til hver brønd indeholdende RNA-prøver (slutkoncentrationen af proben vil være på 0,25 µM i hver brønd indeholdende RNA-prøver). 13 µl realtids-one-step-RT-PCR-mastermix fordeles i hver brønd på PCR-pladen indeholdende de(t) denaturerede primere/RNA.
- 2.1.4. Pladen anbringes i en realtidstermocycler, som er programmeret til revers transkriptase og cDNA-amplifikation/fluorescensdetektion. Amplifikationsbetingelserne består af et første revers transkriptase-trin ved 48 °C i 25 minutter, efterfulgt af 10 minutter ved 95 °C (»varmstart«) og 40 cykler a 15 sekunder ved 95 °C, 35 sekunder ved 55 °C og 30 sekunder ved 72 °C (eller 40 cykler ved 97 °C i 2 sekunder og 55 °C i 30 sekunder, såfremt der anvendes reagenser og thermocycler, der muliggør hurtige reaktioner). Fluorescensdata opnås ved afslutningen af 55 °C-trinnet.
- 2.1.5. Assayet betragtes som værende ikke validt, hvis der fås atypiske amplifikationskurver, og skal da gentages.

Prøver betragtes som positive, hvis Ct-værdien (cyklusnummer, ved hvilken den fluorescens, der er genereret i en reaktion, krydser fluorescensstærskelværdien) er lavere end eller lig med den definerede Ct-tærskelværdi (35) inden for 40 PCR-cykler ($Ct \leq 35$).

Prøver betragtes som inkonklusive, hvis Ct-værdien er højere end den definerede Ct-tærskelværdi (35) inden for 40 PCR-cykler ($CT \geq 35$).

Prøver betragtes som negative, hvis der fås en horisontal amplifikationskurve, som ikke krydser tærskelværdien inden for 40 PCR-cykler.

2.2. *Gruppenspecifik realtids-RT-PCR efter Guthrie et al., 2013* ⁽¹⁾

Realtids-RT-PCR med anvendelse af fluorescensresonans-energioverførsel (FRET)-prober til påvisning af AHSV-nukleinsyre.

Det beskrevne AHSV-RT-PCR-assay blev udformet med brug af sekvenser fra en bred vifte af AHSV-feltstammer, der er i omløb i dag (Quan et al., 2010 ⁽²⁾). Det omfatter også et ejendomsretligt beskyttet syntetisk eksternt kontrol-assay til verifikation af, at assayets komponenter fungerer på tilfredsstillende vis.

Kit til realtids-one-step-PCR er kommercielt tilgængelige. Nedenstående grundlæggende trin, som er beskrevet af Guthrie et al. (2013), kan tilpasses i overensstemmelse med lokale/sagsspecifikke krav og de(t) anvendte kit/udstyr.

⁽¹⁾ A. J. Guthrie, N. J. MacLachlan, C. Joone, C. W. Lourens, C. T. Weyer, M. Quan, M. S. Monyai, I. A. Gardner, 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.

⁽²⁾ M. Quan, C. W. Lourens, N. J. MacLachlan, I. A. Gardner, A. J. Guthrie, 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, s. 45-52.

▼ **M2**

Primer- og probesekvenser til påvisning af AHSV-artsvirus:

| | |
|--------------------|-------------------------------------|
| — forward primer | 5'-AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T-3' |
| — revers primer | 5'-GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA-3' |
| — MGB-TaqMan-probe | 5'-FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB-3' |

- 2.2.1. 5 µM forward- og revers-primere og 3 µM probe blandes til primer- og probemixstamopløsninger i en koncentration på 25×. Der frembringes et testpladelayout, som indlæses i realtids-PCR-maskinens software. Med dette layout som rettesnor tilsættes 5 µl RNA-prøver, herunder testprøver og positive og negative kontroller, til de relevante brønde på pladen i overensstemmelse med layoutet.
- 2.2.2. RNA'et denatureres ved opvarmning ved 95 °C i 5 minutter, efterfulgt af hurtig afkøling på is i mindst 3 minutter.
- 2.2.3. Der tilberedes en passende mængde realtids-one-step-RT-PCR-mastermix til det antal prøver, der skal testes, efter fabrikantens anvisninger. 1 µl 25× primersondemixstamopløsning (se punkt 2.2.1 ovenfor) tilsættes til mastermixet, så der opnås en slutkoncentration i hver brønd på 200 nM for hver primer og 120 nM for proben. 20 µl mastermix fordeles i hver brønd på PCR-pladen, der indeholder det denaturerede RNA.
- 2.2.4. Pladen anbringes i en realtids-PCR-cyklus, som er programmeret til revers transkriptase og cDNA-amplifikation/fluorescensdetektion, efter fabrikantens anvisninger. Amplifikationsbetingelserne er f.eks. et første revers transkriptase-trin ved 48 °C i 10 minutter, efterfulgt af 10 minutter ved 95 °C og 40 cykler a 15 sekunder ved 95 °C og 45 sekunder ved 60 °C.
- 2.2.5. Prøver betragtes som positive, hvis den normaliserede fluorescens for AHSV-RT-PCR-assayet overstiger en tærskelværdi på 0,1 inden for 36 PCR-cykler i alle replikater af en prøve.

Prøver betragtes som inkonklusive, hvis den normaliserede fluorescens for AHSV-RT-PCR-assayet overstiger en tærskelværdi på 0,1 mellem 36 og 40 PCR-cykler i et eller flere replikater af en prøve.

Prøver betragtes som negative, hvis den normaliserede fluorescens for AHSV-RT-PCR-assayet ikke oversteg en tærskelværdi på 0,1 inden for 40 PCR-cykler i alle replikater af en prøve, og hvis den normaliserede fluorescens for det ejendomsretligt beskyttede syntetiske eksterne kontrolassay oversteg en tærskelværdi på 0,1 inden for 33 PCR-cykler.

▼B*BILAG V*

DEL A

Ophævet direktiv med oversigt over ændringer

(jf. artikel 22)

Rådets direktiv 90/426/EØF
(EFT L 224, 18.8.1990, s. 42)

Rådets direktiv 90/425/EØF
(EFT L 224, 18.8.1990, s. 29)

Kun artikel 15, stk. 3

Rådets direktiv 91/496/EØF
(EFT L 268, 24.9.1991, s. 56)

Kun med henblik på referencen til direktiv 90/426/EØF i Artikel 26, stk. 2

Kommissionens beslutning 92/130/EØF
(EFT L 47, 22.2.1992, s. 26)

Rådets direktiv 92/36/EØF
(EFT L 157, 10.6.1992, s. 28)

Kun artikel 1

Tiltrædelsesakt af 1994, bilag I, punkt
V.E.I.A.3
(EFT C 241, 29.8.1994, s. 132)

Kommissionens beslutning 2001/298/EF
(EFT L 102, 12.4.2001, s. 63)

Kun med henblik på referencen til direktiv 90/426/EØF i artikel 1, stk. 1, og bilag I, nr. 2

Kommissionens beslutning 2002/160/EF
(EFT L 53, 23.2.2002, s. 37)

Rådets forordning (EF) nr. 806/2003
(EUT L 122, 16.5.2003, s. 1)

Kun bilag III, nr. 10

Tiltrædelsesakt af 2003, bilag II, punkt
6.B.I.16
(EUT L 236, 23.9.2003, s. 381)

Rådets direktiv 2004/68/EF
(EUT L 139, 30.4.2004, s. 321)

Kun artikel 15

Rådets direktiv 2006/104/EF
(EUT L 363, 20.12.2006, s. 352)

Kun bilag, punkt. I.2.

Rådets direktiv 2008/73/EF
(EUT L 219 af 14.8.2008, s. 40)

Kun artikel 7

DEL B

Liste over frister for gennemførelse i national ret

(jf. artikel 22)

| Direktiv | Gennemførelsesfrist |
|-------------|---------------------|
| 90/426/EØF | 1. januar 1992 |
| 90/425/EØF | 1. juli 1992 |
| 91/496/EØF | 1. juli 1992 |
| 92/36/EØF | 31. december 1992 |
| 2004/68/EF | 19. november 2005 |
| 2006/104/EF | 1. januar 2007 |
| 2008/73/EF | 1. januar 2010 |



BILAG VI

Sammenligningstabel

| Direktiv 90/426/EØF | Nærværende direktiv |
|--|---|
| Artikel 1 | Artikel 1 |
| Artikel 2, litra a) og b) | Artikel 2, litra a) og b) |
| Artikel 2, litra c) | Artikel 2, litra c), nr. i) og ii) |
| Artikel 2, litra d)-i) | Artikel 2, litra d)-i) |
| Artikel 3 | Artikel 3 |
| Artikel 4, stk. 1-3 | Artikel 4, stk. 1-3 |
| Artikel 4, stk. 4, nr. i) og ii) | Artikel 4, stk. 4, litra a) og b) |
| Artikel 4, stk. 5, litra a), første til sjette led | Artikel 4, stk. 5, litra a), nr. i)-vi) |
| Artikel 4, stk. 5, litra b) | Artikel 4, stk. 5, litra b) |
| Artikel 4, stk. 6, første afsnit, første til ottende led | Artikel 4, stk. 6, første afsnit, litra a)-h) |
| Artikel 4, stk. 6, andet og tredje afsnit | Artikel 4, stk. 6, andet og tredje afsnit |
| Artikel 5, stk. 1 | Artikel 5, stk. 1 |
| Artikel 5, stk. 2, litra a) | Artikel 5, stk. 2, første afsnit, litra a) og b) |
| Artikel 5, stk. 2, litra b) | Artikel 5, stk. 2, andet afsnit, litra a) og b) |
| Artikel 5, stk. 2, litra c) | Artikel 5, stk. 3 |
| Artikel 5, stk. 2, litra d) | Artikel 5, stk. 4 |
| Artikel 5, stk. 3, litra a) og b) | Artikel 5, stk. 5, litra a) og b) |
| Artikel 5, stk. 3, litra c), første og andet led | Artikel 5, stk. 5, litra c), første afsnit, nr. i) og ii) |
| Artikel 5, stk. 3, litra c), anden del, sidste punktum | Artikel 5, stk. 5, litra c), andet afsnit |
| Artikel 5, stk. 3, litra d) og e) | Artikel 5, stk. 5, litra d) og e) |
| Artikel 6 | Artikel 6 |
| Artikel 7 | Artikel 7 |
| Artikel 8, stk. 1, første afsnit, første og anden del | Artikel 8, stk. 1, litra a) og b) |
| Artikel 8, stk. 1, andet afsnit | Artikel 8, stk. 2 |
| Artikel 8, stk. 2 | Artikel 8, stk. 3 |
| Artikel 9 | Artikel 9 |
| Artikel 10 | Artikel 10 |

▼B

| Direktiv 90/426/EØF | Nærværende direktiv |
|------------------------------------|---------------------------------|
| Artikel 11, stk. 1 | Artikel 11 |
| Artikel 11, stk. 2 | — |
| Artikel 12 | Artikel 12 |
| Artikel 13 | Artikel 13 |
| Artikel 14 | Artikel 14 |
| Artikel 15 | Artikel 15 |
| Artikel 16, stk. 1, litra a)- f) | Artikel 16, stk. 1, litra a)-f) |
| Artikel 16, stk. 1, sidste punktum | — |
| Artikel 16, stk. 2 | Artikel 16, stk. 2 |
| Artikel 17 | Artikel 18 |
| Artikel 18 | Artikel 17 |
| Artikel 19, nr. i)-iv) | Artikel 19, litra a)-d) |
| Artikel 22 | — |
| Artikel 23 | Artikel 20 |
| Artikel 24, stk. 1 og 2 | Artikel 21, stk. 1 og 2 |
| Artikel 24, stk. 3 | — |
| Artikel 25, stk. 1 og 2 | Artikel 21, stk. 1 og 3 |
| Artikel 26 | — |
| Artikel 27 | — |
| — | Artikel 22 |
| — | Artikel 23 |
| Artikel 28 | Artikel 24 |
| Bilag A | Bilag I |
| Bilag B | Bilag II |
| Bilag C | Bilag III |
| Bilag D | Bilag IV |
| — | Bilag V |
| — | Bilag VI |