

## II

(Besluiten waarvan de publikatie niet voorwaarde is voor de toepassing)

## RAAD

## RICHTLIJN 92/40/EEG VAN DE RAAD

van 19 mei 1992

tot vaststelling van communautaire maatregelen voor de bestrijding van aviaire influenza

DE RAAD VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap, inzonderheid op artikel 43,

Gezien het voorstel van de Commissie <sup>(1)</sup>,

Gezien het advies van het Europese Parlement <sup>(2)</sup>,

Gezien het advies van het Economisch en Sociaal Comité <sup>(3)</sup>,

Overwegende dat pluimvee is opgenomen in de lijst in bijlage II bij het Verdrag; dat het in de handel brengen van pluimvee een aanzienlijke bron van inkomsten is voor de landbouwbevolking;

Overwegende dat op communautair niveau moet worden bepaald welke bestrijdingsmaatregelen in geval van een uitbraak van aviaire influenza in zijn sterk pathogene vorm, veroorzaakt door een influenzavirus met specifieke kenmerken en hierna „aviaire influenza” genoemd, moeten worden getroffen, ten einde de normale ontwikkeling van de pluimveesector te garanderen en bij te dragen tot de bescherming van de diergezondheid in de Gemeenschap;

Overwegende dat een uitbraak van aviaire influenza zich zeer snel kan ontwikkelen tot een epizootie die een zodanige sterfte veroorzaakt en een zodanig verstoring effect heeft dat de rentabiliteit van de gehele pluimveehouderij daardoor ernstig kan worden geschaad;

Overwegende dat, wanneer de aanwezigheid van de ziekte wordt vermoed, maatregelen moeten worden genomen om, zodra het vermoeden wordt bevestigd, de ziekte onmiddellijk en doeltreffend te kunnen bestrijden;

Overwegende dat verspreiding van de ziekte van meet af aan moet worden voorkomen door nauwlettend toezicht te houden op de verplaatsingen van dieren en op het gebruik van mogelijk verontreinigde producten, en indien nodig, door inenting;

Overwegende dat diagnose van de ziekte moet plaatsvinden onder toezicht van de bevoegde nationale laboratoria, waarbij een communautair referentielaboratorium voor de coördinatie dient te zorgen;

Overwegende dat gemeenschappelijke maatregelen voor de bestrijding van aviaire influenza de grondslag vormen voor de handhaving van een uniforme gezondheidsstatus;

Overwegende dat bij het uitbreken van aviaire influenza artikel 3 van Beschikking 90/424/EEG van de Raad van 26 juni 1990 betreffende bepaalde uitgaven op veterinair gebied <sup>(4)</sup> van toepassing is;

Overwegende dat aan de Commissie opdracht moet worden gegeven de nodige uitvoeringsbepalingen vast te stellen,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

*Artikel 1*

Bij deze richtlijn worden de communautaire bestrijdingsmaatregelen vastgesteld die moeten worden toegepast wanneer aviaire influenza uitbreekt bij pluimvee, onverminderd de communautaire voorschriften voor het intracommunautaire handelsverkeer.

Deze richtlijn is niet van toepassing wanneer aviaire influenza wordt geconstateerd bij andere vogels; in dat geval evenwel stellen de Lid-Staten de Commissie in kennis van de eventueel door hen getroffen maatregelen.

*Artikel 2*

In het kader van deze richtlijn zijn, voor zover nodig, de definities van toepassing die zijn vastgesteld in artikel 2 van

<sup>(1)</sup> PB nr. C 231 van 5. 9. 1991, blz. 4.

<sup>(2)</sup> PB nr. C 326 van 16. 12. 1991, blz. 242.

<sup>(3)</sup> PB nr. C 79 van 30. 3. 1992, blz. 8.

<sup>(4)</sup> PB nr. L 224 van 18. 8. 1990, blz. 19. Beschikking gewijzigd bij Beschikking 91/133/EEG (PB nr. L 66 van 13. 3. 1991, blz. 18).

Richtlijn 90/539/EEG van de Raad van 15 oktober 1990 tot vaststelling van veterinaire voorschriften voor het intracommunautaire handelsverkeer en de uitvoer uit derde landen van pluimvee en broedeieren <sup>(1)</sup>.

Voorts wordt verstaan onder:

- a) *besmet pluimvee*:
- alle pluimvee waarbij de aanwezigheid van aviaire influenza als omschreven in bijlage I, officieel is bevestigd door middel van een onderzoek in een erkend laboratorium, of
  - ingeval een of meer nieuwe uitbraken volgen, alle pluimvee waarbij klinische symptomen of, na het slachten, laesies zijn geconstateerd die op aviaire influenza wijzen;
- b) *van besmetting verdacht pluimvee*: alle pluimvee dat klinische symptomen of, na het slachten, laesies vertoont van zodanige aard dat op goede gronden besmetting met aviaire influenza kan worden vermoed, of alle pluimvee waarbij de aanwezigheid van influenza-A-virus, subtype H5 of H7 is aangetoond;
- c) *van verontreiniging verdacht pluimvee*: alle pluimvee dat rechtstreeks of onrechtstreeks in contact kan zijn geweest met het virus van aviaire influenza of met het influenza-A-virus, subtype H5 of H7;
- d) *bevoegde autoriteit*: de autoriteit die bevoegd is in de zin van artikel 2, lid 6, van Richtlijn 90/425/EEG <sup>(2)</sup>;
- e) *officiële dierenarts*: de door de bevoegde autoriteit aangewezen dierenarts.

### Artikel 3

De Lid-Staten zien erop toe dat, wanneer aviaire influenza vermoed wordt, dit verplicht onmiddellijk aan de bevoegde autoriteit wordt gemeld.

### Artikel 4

1. De Lid-Staten zien erop toe dat de officiële dierenarts, wanneer er zich op een bedrijf van aviaire influenza verdacht pluimvee bevindt, er onverwijld voor zorgt dat een officieel onderzoek wordt ingesteld om na te gaan of de ziekte al dan niet aanwezig is, waarbij hij er met name voor moet zorgen dat de nodige monsters voor laboratoriumonderzoek worden genomen.

2. Zodra van het vermoeden van besmetting aangifte is gedaan, laat de bevoegde autoriteit het bedrijf onder officieel toezicht plaatsen en eist zij met name dat:

- a) voor alle categorieën pluimvee op het bedrijf per categorie wordt opgetekend hoeveel dieren zijn gestorven, hoeveel dieren klinische symptomen vertonen en hoeveel dieren geen symptomen vertonen; deze optekening moet worden bijgewerkt om rekening te houden met het

<sup>(1)</sup> PB nr. L 303 van 31. 10. 1990, blz. 6. Richtlijn laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 91/496/EEG (PB nr. L 268 van 24. 9. 1991, blz. 56).

<sup>(2)</sup> PB nr. L 224 van 18. 8. 1990, blz. 29. Richtlijn laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 91/496/EEG (PB nr. L 268 van 24. 9. 1991, blz. 56).

pluimvee dat in de periode dat het vermoeden bestaat, geboren dan wel gestorven is; deze gegevens moeten worden bijgewerkt en desgevraagd overgelegd en kunnen bij elk inspectiebezoek worden gecontroleerd;

- b) alle pluimvee op het bedrijf wordt geïsoleerd in de lokalen waarin het is gehuisvest of op een andere daarvoor geschikte plaats, en geen contact heeft met andere vogels;
- c) geen pluimvee op het bedrijf wordt binnengebracht of van het bedrijf wordt afgevoerd;
- d) behoudens toestemming van de officiële dierenarts,
- elke verplaatsing van personen, van andere dieren en van voertuigen van en naar het bedrijf wordt verboden,
  - het afvoeren uit het bedrijf van vlees of kadavers van pluimvee, van diervoeders, materiaal, afval, uitwerpselen, stromest of andere objecten waardoor het virus van aviaire influenza kan worden overgedragen, wordt verboden;
- e) geen eieren van het bedrijf worden afgevoerd, met uitzondering van eieren die rechtstreeks worden gezonden naar een erkende inrichting voor de vervaardiging en/of de behandeling van eiprodukten overeenkomstig het bepaalde in artikel 6, lid 1, van Richtlijn 89/437/EEG <sup>(3)</sup>, en die vervoerd worden overeenkomstig een door de bevoegde instantie verleende vergunning. Deze vergunning moet voldoen aan de voorschriften van bijlage I;
- f) wordt gezorgd voor de nodige ontsmettingsvoorzieningen bij de in- en uitgangen van de gebouwen waar het pluimvee is gehuisvest, en van het bedrijf zelf;
- g) een epizoötiologisch onderzoek wordt verricht overeenkomstig artikel 7.

3. Totdat de in lid 2 genoemde officiële maatregelen zijn vastgesteld, doet de eigenaar of houder van pluimvee waarbij de aanwezigheid van de ziekte wordt vermoed, alles wat redelijkerwijze mogelijk is om aan het bepaalde in lid 2, met uitzondering van punt g), te voldoen.

4. De bevoegde autoriteit kan alle in lid 2 genoemde maatregelen ook doen gelden voor andere bedrijven, wanneer in verband met de ligging ervan, de plaatselijke situatie of de contacten met het bedrijf waar de ziekte vermoedelijk aanwezig is, verontreiniging moet worden gevreesd.

5. De in de leden 1 en 2 bedoelde maatregelen worden pas opgeheven wanneer de officiële dierenarts de vermoedelijke aanwezigheid van aviaire influenza heeft weerlegd.

### Artikel 5

1. Zodra de aanwezigheid van aviaire influenza op een bedrijf officieel is bevestigd, zien de Lid-Staten erop toe dat de bevoegde autoriteit eist dat behalve de in artikel 4, lid 2, genoemde maatregelen, ook de volgende maatregelen worden getroffen:

<sup>(3)</sup> PB nr. L 212 van 22. 7. 1989, blz. 87. Richtlijn gewijzigd bij Richtlijn 89/662/EEG (PB nr. L 395 van 30. 12. 1989, blz. 13).

- a) alle op het bedrijf aanwezige pluimvee moet onmiddellijk ter plaatse worden afgemaakt. Alle gestorven dieren, alle afgemaakte dieren en alle eieren op het bedrijf moeten worden vernietigd. Bij het afmaken en vernietigen moet verspreiding van de ziekte zoveel mogelijk worden voorkomen;
- b) alle stoffen of afvallen, met name voeder, strooisel en mest, die mogelijk zijn verontreinigd, moeten worden vernietigd of worden behandeld; deze behandeling, die moet worden uitgevoerd overeenkomstig de instructies van de officiële dierenarts, moet garanderen dat het eventueel aanwezige virus van aviaire influenza wordt vernietigd;
- c) wanneer pluimvee tijdens de vermoedelijke incubatieperiode van de ziekte is geslacht, moet het vlees daarvan zoveel mogelijk worden opgespoord en vernietigd;
- d) broedeieren die gedurende de vermoedelijke incubatieperiode van de ziekte van het bedrijf zijn afgevoerd, moeten worden opgespoord en vernietigd; als die eieren reeds zijn uitgekomen, moet het betrokken pluimvee onder officieel toezicht worden geplaatst; consumptie-eieren die gedurende de vermoedelijke incubatieperiode van de ziekte zijn gelegd en die reeds van het bedrijf zijn afgevoerd, moeten voor zover mogelijk worden opgespoord en vernietigd, tenzij zij voordien afdoende zijn ontsmet.
- e) na uitvoering van de onder a) en b) genoemde werkzaamheden moeten de gebouwen waar het betrokken pluimvee is gehuisvest, alsmede de omgeving daarvan, de gebruikte vervoermiddelen en al het andere materieel dat kan zijn verontreinigd, worden schoongemaakt en ontsmet overeenkomstig artikel 11;
- f) na uitvoering van de onder e) genoemde werkzaamheden, moet een leegstand van ten minste 21 dagen in acht worden genomen voordat weer pluimvee op het bedrijf wordt binnengebracht;
- g) er moet een epizoötiologisch onderzoek worden verricht overeenkomstig artikel 7.

2. De bevoegde autoriteit kan de in lid 1 genoemde maatregelen ook doen gelden voor andere bedrijven wanneer in verband met de ligging daarvan, de plaatselijke situatie of de contacten met het bedrijf waar de aanwezigheid van de ziekte is bevestigd, mogelijke besmetting moet worden gevreesd.

#### Artikel 6

Indien er op een besmet bedrijf twee of meer afzonderlijke koppels zijn, kan de bevoegde autoriteit, op basis van door de Commissie volgens de procedure van artikel 21 vastgestelde criteria, voor de gezonde koppels een uitzondering op het bepaalde in artikel 5, lid 1, toestaan, voor zover door de officiële dierenarts is bevestigd dat de op het bedrijf verrichte werkzaamheden van zodanige aard zijn dat de koppels op het vlak van huisvesting, verzorging en voeding volledig zijn gescheiden, zodat het virus zich niet van het ene naar het andere koppel kan verspreiden.

#### Artikel 7

1. Het epizoötiologisch onderzoek heeft betrekking op:
  - de duur van de periode waarin aviaire influenza op het bedrijf aanwezig kan zijn geweest;

- de mogelijke oorsprong van aviaire influenza op het bedrijf en de opsporing van de andere bedrijven waar zich pluimvee bevindt dat uit dezelfde bron kan zijn besmet of verontreinigd;
- de verplaatsingen van personen, pluimvee of andere dieren, voertuigen, eieren, vlees en kadavers en alle materieel of alle stoffen, waardoor het virus van aviaire influenza van en naar het betrokken bedrijf kan zijn gebracht.

2. Met het oog op een volledige coördinatie van alle maatregelen om aviaire influenza zo snel mogelijk uit te roeien en voor het uitvoeren van het epizoötiologisch onderzoek, wordt een crisiseenheid opgericht.

De algemene voorschriften inzake de nationale crisiseenheden en de communautaire crisiseenheden worden op voorstel van de Commissie met gekwalificeerde meerderheid van stemmen door de Raad vastgesteld.

#### Artikel 8

1. Wanneer de officiële dierenarts redenen heeft om aan te nemen dat pluimvee op een bedrijf kan zijn besmet ten gevolge van verplaatsingen van personen, dieren of voertuigen, of anderszins, wordt dat bedrijf onder officiële controle geplaatst overeenkomstig lid 2.

2. De officiële controle heeft ten doel om elke mogelijke aanwijzing van aviaire influenza onmiddellijk te ontdekken, de nodige tellingen te verrichten, de verplaatsingen van het pluimvee te controleren en zo nodig de in lid 3 vastgestelde maatregelen toe te passen.

3. Wanneer een bedrijf onder officiële controle is geplaatst als bedoeld in lid 2, verbiedt de bevoegde autoriteit dat pluimvee van het bedrijf wordt afgevoerd, tenzij om onder officieel toezicht rechtstreeks naar een slachterij te worden gebracht en daar onmiddellijk te worden geslacht. Voordat daartoe toestemming wordt gegeven moet de officiële dierenarts alle pluimvee klinisch hebben onderzocht om de aanwezigheid van aviaire influenza op dat bedrijf uit te sluiten. De in dit artikel bedoelde beperkingen op verplaatsingen zijn van toepassing gedurende 21 dagen, te rekenen vanaf de laatste dag waarop besmetting kan hebben plaatsgevonden. De beperkingen zijn in elk geval van toepassing gedurende ten minste zeven dagen.

4. Wanneer de bevoegde autoriteit van oordeel is dat de omstandigheden het toelaten, kan zij de in dit artikel bedoelde maatregelen beperken tot een gedeelte van het bedrijf en tot het pluimvee dat zich in dat gedeelte bevindt, voor zover de dieren er volledig afzonderlijk worden gehuisvest, verzorgd en gevoederd, en het daarbij betrokken personeel alleen daar werkzaam is.

#### Artikel 9

1. Zodra de diagnose van aviaire influenza officieel is bevestigd, zien de Lid-Staten erop toe dat de bevoegde autoriteit rond het besmette bedrijf een besmettingsgebied afbakt, bestaande uit een beschermingsgebied met een straal van ten minste 3 km en een toezichtgebied met een straal van ten minste 10 km. Bij de instelling van deze gebieden moet rekening worden gehouden met factoren van geografische, administratieve, ecologische en epizoötiologische aard in verband met aviaire influenza alsmede met de controlestructuren.

2. In het beschermingsgebied gelden met name de volgende maatregelen:

- a) alle bedrijven in het gebied waar pluimvee wordt gehouden, worden geïdentificeerd;
- b) alle bedrijven waar pluimvee wordt gehouden, worden op gezette tijden bezocht, waarbij het pluimvee klinisch wordt onderzocht en, voor zover nodig, monsters voor laboratoriumonderzoek worden genomen; de gegevens en de resultaten van die bezoeken moeten worden geregistreerd;
- c) het pluimvee moet in de lokalen blijven waarin het is gehuisvest, of op een andere plaats waar het kan worden geïsoleerd;
- d) bij de in- en uitgangen van de bedrijven dienen adequate ontsmettingsvoorzieningen beschikbaar te zijn;
- e) verplaatsingen van personen die in contact komen met pluimvee, pluimveekadavers en eieren, en van voertuigen waarmee pluimvee, pluimveekadavers en eieren binnen het gebied worden vervoerd, worden gecontroleerd; in het algemeen wordt alle vervoer van pluimvee verboden, met uitzondering van doorvoer via de hoofdwegen of hoofdlijnen van het spoorwegnet;
- f) pluimvee en broedeieren mogen niet van de bedrijven waar ze zich bevinden, worden afgevoerd, tenzij de bevoegde autoriteit toestemming heeft verleend voor het vervoer van:
  - i) pluimvee naar een slachting die bij voorkeur gelegen is binnen het besmette gebied of, indien dit niet mogelijk is, naar een door de bevoegde autoriteit aangewezen slachterij buiten dat gebied, om daar onmiddellijk te worden geslacht. Het vlees van dit pluimvee wordt voorzien van het bijzondere merk als bedoeld in artikel 5, lid 1, van Richtlijn 91/494/EEG<sup>(1)</sup>;
  - ii) eendagskuikens en legrijpe kippen naar een bedrijf binnen het toezichtgebied waar geen ander pluimvee aanwezig is. Het betrokken bedrijf wordt onder officieel toezicht geplaatst als bedoeld in artikel 8, lid 2;
  - iii) broedeieren naar een door de bevoegde autoriteit aangewezen broederij; vóór verzending moeten de eieren en de verpakkingen worden ontsmet. Het onder i), ii) en iii) bedoelde vervoer moet rechtstreeks en onder officieel toezicht geschieden. Het vervoer mag slechts worden toegestaan nadat de officiële dierenarts op het bedrijf een gezondheidsinspectie heeft verricht. De gebruikte vervoermiddelen moeten vóór en na gebruik worden gereinigd en ontsmet;

- g) gebruikt strooisel en pluimveemest mogen niet zonder toestemming worden afgevoerd en verspreid;
- h) jaarbeurzen, markten, tentoonstellingen en andere evenementen waarbij pluimvee of andere vogels worden bijeengebracht, worden verboden.

3. De maatregelen in het beschermingsgebied mogen ten vroegste worden opgeheven 21 dagen nadat op het besmette

bedrijf de reinigings- en ontsmettingswerkzaamheden zijn uitgevoerd overeenkomstig artikel 11. Het beschermingsgebied maakt vanaf dat ogenblik deel uit van het toezichtgebied.

4. In het toezichtgebied gelden met name de volgende maatregelen:

- a) alle bedrijven in het gebied, waar pluimvee wordt gehouden, worden geïdentificeerd;
- b) verplaatsingen van pluimvee en broedeieren binnen het gebied worden gecontroleerd;
- c) het pluimvee mag de eerste vijftien dagen het gebied niet verlaten, tenzij om rechtstreeks te worden vervoerd naar een door de bevoegde autoriteit aangewezen slachterij buiten het toezichtgebied. Het vlees van dit pluimvee wordt voorzien van het bijzondere merk als bedoeld in artikel 5 van Richtlijn 91/494/EEG;
- d) broedeieren mogen het toezichtgebied niet verlaten, tenzij om naar een door de bevoegde autoriteit aangewezen broederij te worden gebracht. Vóór verzending moeten de eieren en de verpakkingen worden ontsmet;
- e) gebruikt strooisel en pluimveemest mogen niet uit het gebied worden afgevoerd;
- f) jaarbeurzen, markten, tentoonstellingen en andere evenementen waarbij pluimvee of andere vogels worden bijeengebracht, worden verboden;
- g) onverminderd het bepaalde onder b) en c), wordt het vervoer van pluimvee binnen het gebied verboden, met uitzondering van doorvoer via de hoofdwegen of de hoofdlijnen van het spoorwegnet.

5. De maatregelen in het toezichtgebied worden ten vroegste opgeheven 30 dagen nadat op het besmette bedrijf de reinigings- en ontsmettingswerkzaamheden zijn uitgevoerd overeenkomstig artikel 11.

6. Indien deze gebieden op het grondgebied van verschillende Lid-Staten zijn gelegen, bakenen de bevoegde autoriteiten van de betrokken Lid-Staten de in lid 1 bedoelde gebieden af in onderling overleg. Zo nodig worden het beschermingsgebied en het toezichtgebied evenwel afgebakend volgens de procedure van artikel 21.

#### Artikel 10

De Lid-Staten zien erop toe dat:

- a) de bevoegde autoriteit de nodige regelingen treft om de verplaatsingen van eieren en pluimvee te kunnen traceren;
- b) de pluimvee-eigenaar of -houder de bevoegde autoriteit desgevraagd de nodige inlichtingen verstrekt over het pluimvee en de eieren die op zijn bedrijf zijn binnengebracht of ervan zijn afgevoerd;
- c) een ieder die betrokken is bij het vervoer of het in de handel brengen van pluimvee en eieren, de bevoegde autoriteit de nodige inlichtingen kan verstrekken omtrent de verplaatsingen van het pluimvee en de eieren die zij hebben vervoerd of in de handel gebracht, en alle desbetreffende bewijsstukken kan overleggen.

<sup>(1)</sup> PB nr. L 268 van 24. 9. 1991, blz. 35.

*Artikel 11*

De Lid-Staten zien erop toe dat:

- a) de te gebruiken ontsmettingsmiddelen en de concentraties daarvan officieel door de bevoegde autoriteit zijn goedgekeurd;
- b) de reinigings- en ontsmettingswerkzaamheden onder officieel toezicht worden verricht overeenkomstig:
  - i) de instructies van de officiële dierenarts;
  - ii) de procedure voor het reinigen en ontsmetten van een besmet bedrijf bedoeld in bijlage II.

*Artikel 12*

Bemonstering en laboratoriumonderzoek met het oog op de opsporing van het virus van aviaire influenza worden verricht overeenkomstig bijlage III.

*Artikel 13*

De Lid-Staten zien erop toe dat de bevoegde autoriteit alle noodzakelijke maatregelen neemt om ervoor te zorgen dat alle in het beschermingsgebied en het toezichtgebied gevestigde personen volledig worden geïnformeerd over de ingestelde beperkingen, en dat deze al het nodige doen om de betrokken maatregelen op passende wijze ten uitvoer te leggen.

*Artikel 14*

1. De Lid-Staten zien erop toe dat in elke Lid-Staat worden aangewezen:

- a) een nationaal laboratorium met de nodige voorzieningen en het nodige gespecialiseerde personeel om de pathogeniteit van influenzavirusisolaten te bepalen (hoofdstuk 7 van bijlage III) en om influenza-A-virussen, subtype H5 of H7, te identificeren;
- b) een nationaal laboratorium dat wordt belast met het testen van de reagentia die door de regionale laboratoria worden gebruikt;
- c) een nationaal instituut of laboratorium, waar geautoriseerde vaccins kunnen worden getest, ten einde hun conformiteit te verifiëren met de specificaties zoals die zijn neergelegd in de vergunning voor het in de handel brengen.

2. De in bijlage IV genoemde nationale laboratoria worden belast met de coördinatie van de voor de diagnose geldende normen en methoden, van het gebruik van de reagentia en van de tests van de vaccins.

3. De in lid 2 bedoelde nationale laboratoria voor aviaire influenza zijn verantwoordelijk voor de coördinatie van de normen en methoden voor de diagnose die in elk diagnoselaboratorium voor aviaire influenza in de Lid-Staat worden vastgesteld. Daartoe:

- a) mogen zij de bij het stellen van de diagnose te gebruiken reagentia leveren aan de nationale laboratoria;
- b) controleren zij de kwaliteit van alle diagnosereagentia die in de Lid-Staat worden gebruikt;

- c) organiseren zij geregeld vergelijkende tests;
- d) bewaren zij isolaten van het virus van aviaire influenza, afkomstig van in die Lid-Staat bevestigde gevallen;
- e) zien zij erop toe dat de in de regionale diagnoselaboratoria verkregen positieve resultaten worden bevestigd.

4. De in bijlage IV genoemde nationale laboratoria werken samen met het in artikel 15 bedoelde communautaire referentielaboratorium.

*Artikel 15*

Het communautaire referentielaboratorium voor aviaire influenza staat vermeld in bijlage V. Onverminderd de bepalingen van Beschikking 90/424/EEG, met name van artikel 28, zijn de bevoegdheden en verplichtingen van dit laboratorium die welke in die bijlage zijn vastgesteld.

*Artikel 16*

Tegen aviaire influenza mag met behulp van een door de bevoegde autoriteit goedgekeurd vaccin alleen worden ingeënt ter aanvulling van de bestrijdingsmaatregelen die bij het uitbreken van de ziekte zijn getroffen, en overeenkomstig de volgende bepalingen:

- a) Het besluit om in te enten ter aanvulling van de bestaande bestrijdingsmaatregelen wordt genomen door de Commissie in samenwerking met de betrokken Lid-Staat, volgens de procedure van artikel 21. Bij dat besluit dient met name rekening te worden gehouden met:
  - de pluimveedichtheid in het betrokken gebied;
  - de kenmerken en de samenstelling van het te gebruiken vaccin;
  - de procedures die worden gevolgd bij het toezicht op de distributie, de opslag en het gebruik van het vaccin;
  - de soorten en categorieën pluimvee die worden ingeënt;
  - de gebieden waar wordt ingeënt.

In afwijking van de eerste alinea mag het besluit om rondom de haard tot noodvaccinatie over te gaan door de betrokken Lid-Staat worden genomen na kennisgeving aan de Commissie, mits de fundamentele belangen van de Gemeenschap niet in het gedrang komen. Dit besluit wordt onverwijld, volgens de procedure van artikel 21, aan een nieuw onderzoek onderworpen in het kader van het Permanent Veterinair Comité.

- b) Wanneer een Lid-Staat, overeenkomstig punt a), toestemming krijgt om in een beperkt deel van zijn grondgebied noodvaccinatie toe te passen, heeft dat geen effect op de status van de rest van het grondgebied, op voorwaarde dat de ingeënte dieren niet worden verplaatst gedurende een periode die volgens de procedure van artikel 21 wordt vastgesteld.

*Artikel 17*

1. Elke Lid-Staat stelt een rampenplan op, waarin wordt aangegeven welke nationale maatregelen moeten worden uitgevoerd in geval van een uitbraak van aviaire influenza.

Dat plan moet voorzien in de beschikbaarstelling van adequate voorzieningen, apparatuur, personeel en materiaal, nodig voor de snelle en doeltreffende uitroeiing van de haard.

2. De criteria voor het opstellen van dit plan staan in bijlage VI.

3. De overeenkomstig de in bijlage VI bedoelde criteria vastgestelde plannen worden uiterlijk zes maanden na het tijdstip waarop deze richtlijn van toepassing wordt, ingediend bij de Commissie.

4. De Commissie onderzoekt de plannen ten einde na te gaan of zij toereikend zijn om het gestelde doel te bereiken en stelt de betrokken Lid-Staat eventueel voor de nodige wijzigingen aan te brengen, met name om te garanderen dat de plannen verenigbaar zijn met die van de andere Lid-Staten.

De Commissie keurt de, eventueel gewijzigde, plannen goed volgens de procedure van artikel 21.

De plannen kunnen nadien nog volgens dezelfde procedure worden gewijzigd of aangevuld in verband met de ontwikkeling van de situatie.

#### Artikel 18

Deskundigen van de Commissie kunnen in samenwerking met de bevoegde autoriteiten controles ter plaatse uitvoeren voor zover de eenvormige toepassing van de onderhavige richtlijn dit vereist. Daartoe kunnen zij met een controle op een representatief percentage bedrijven nagaan of de bevoegde autoriteiten controleren of de bedrijven deze richtlijn naleven. De Commissie brengt de Lid-Staten op de hoogte van de uitslag van de verrichte controles.

De Lid-Staat op het grondgebied waarvan een controle wordt verricht, geeft de deskundigen alle steun voor de uitvoering van hun taak.

De uitvoeringsbepalingen van dit artikel worden vastgesteld volgens de procedure van artikel 21.

#### Artikel 19

De voorschriften met betrekking tot de financiële deelneming van de Gemeenschap in de maatregelen in verband met de tenuitvoerlegging van deze richtlijn zijn vastgesteld in Beschikking 90/424/EEG.

#### Artikel 20

De bijlagen kunnen zo nodig door de Raad op voorstel van de Commissie worden gewijzigd met name om rekening te houden met de ontwikkeling op het gebied van onderzoek en diagnostische procedures.

#### Artikel 21

1. In de gevallen waarin wordt verwezen naar de in dit artikel omschreven procedure, leidt de voorzitter van het bij Besluit 68/361/EEG<sup>(1)</sup> ingestelde Permanent Veterinair Comité, hierna „Comité” genoemd, deze procedure hetzij op eigen initiatief hetzij op verzoek van de vertegenwoordiger van een Lid-Staat, onverwijld in bij het Comité.

2. De vertegenwoordiger van de Commissie legt het Comité een ontwerp voor van de te nemen maatregelen. Het Comité brengt advies uit over dit ontwerp binnen een termijn die de voorzitter kan vaststellen naar gelang van de urgentie van de materie. Het Comité spreekt zich uit met de meerderheid van stemmen die in artikel 148, lid 2, van het Verdrag is voorgeschreven voor de aanneming van de besluiten die de Raad op voorstel van de Commissie dient te nemen. Bij stemming in het Comité worden de stemmen van de vertegenwoordigers van de Lid-Staten gewogen overeenkomstig genoemd artikel. De voorzitter neemt niet aan de stemming deel.

3. a) De Commissie stelt de beoogde maatregelen vast wanneer zij in overeenstemming zijn met het advies van het Comité.

b) Wanneer de beoogde maatregelen niet in overeenstemming zijn met het advies van het Comité of indien geen advies is uitgebracht, dient de Commissie onverwijld bij de Raad een voorstel in betreffende de te nemen maatregelen. De Raad besluit met gekwalificeerde meerderheid van stemmen.

Indien de Raad na verloop van drie maanden na indiening van het voorstel bij de Raad geen besluit heeft genomen, worden de voorgestelde maatregelen door de Commissie vastgesteld, behalve wanneer de Raad zich met gewone meerderheid van stemmen tegen genoemde maatregelen heeft uitgesproken.

#### Artikel 22

De Lid-Staten doen de nodige wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden om uiterlijk op 1 januari 1993 aan deze richtlijn te voldoen. Zij stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Wanneer de Lid-Staten deze bepalingen aannemen, wordt in die bepalingen naar de onderhavige richtlijn verwezen of wordt hiernaar verwezen bij de officiële bekendmaking van die bepalingen. De regels voor deze verwijzing worden vastgesteld door de Lid-Staten.

#### Artikel 23

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 19 mei 1992.

Voor de Raad

De Voorzitter

Arlindo MARQUES CUNHA

<sup>(1)</sup> PB nr. L 265 van 18. 10. 1968, blz. 23.

## BIJLAGE I

**VERGUNNING OM EIEREN AF TE VOEREN VAN EEN BEDRIJF DAT ONDERWORPEN IS AAN DE EISEN VAN ARTIKEL 4, LID 2, ONDER e), VAN DEZE RICHTLIJN**

De door de bevoegde autoriteit verleende vergunning voor het vervoer van eieren van een van besmetting verdacht bedrijf dat onderworpen is aan de eisen van artikel 4, lid 2, onder e), naar een erkende inrichting voor de vervaardiging en behandeling van eiproducten overeenkomstig het bepaalde in artikel 6, lid 1, van Richtlijn 89/437/EEG, hierna „aangewezen inrichting” genoemd, moet aan de volgende voorwaarden voldoen:

1. om het van besmetting verdachte bedrijf te mogen verlaten moeten de eieren
  - a) voldoen aan de eisen van hoofdstuk IV van de bijlage bij Richtlijn 89/437/EEG;
  - b) rechtstreeks van het van besmetting verdachte bedrijf naar de aangewezen inrichting worden gezonden; iedere zending moet vóór het vertrek door de officiële dierenarts van het van besmetting verdachte bedrijf worden verzegeld, en gedurende het vervoer naar de aangewezen inrichting verzegeld blijven;
2. de officiële dierenarts van het van besmetting verdachte bedrijf stelt de bevoegde autoriteit van de aangewezen inrichting in kennis van de voorgenomen zending;
3. de voor de aangewezen inrichting verantwoordelijke bevoegde autoriteit vergewist zich ervan dat
  - a) de in punt 1, onder b), bedoelde eieren vanaf hun aankomst van de andere eieren geïsoleerd worden gehouden, totdat zij behandeld zijn;
  - b) de schalen van deze eieren beschouwd worden als hoog-risicomateriaal overeenkomstig artikel 2, lid 2, van Richtlijn 90/667/EEG <sup>(1)</sup> en overeenkomstig de voorschriften van hoofdstuk II van genoemde richtlijn worden behandeld;
  - c) het verpakkingsmateriaal, de voertuigen die gebruikt zijn voor het vervoer van de in punt 1, onder b), bedoelde eieren en alle plaatsen waarmee de eieren in contact zijn gekomen worden gereinigd en ontsmet zodat het aviaire-influenzavirus geheel wordt vernietigd;
  - d) de officiële dierenarts van het van besmetting verdachte bedrijf van elke zending van behandelde eieren in kennis wordt gesteld.

---

<sup>(1)</sup> PB nr. L 363 van 27. 12. 1990, blz. 51.

## BIJLAGE II

## PROCEDURE VOOR HET REINIGEN EN ONTSMETTEN VAN EEN BESMET BEDRIJF

## I. Voorlopige reiniging en ontsmetting

- a) Zodra de pluimveekarkassen zijn afgevoerd om te worden vernietigd, worden alle delen van het bedrijfsterrein waar het pluimvee was gehuisvest en alle delen van andere gebouwen, van de erven, enzovoort die tijdens het slachten of de post-mortem-keuring zijn verontreinigd, besproeid met ontsmettingsmiddelen die overeenkomstig artikel 11 van de richtlijn zijn goedgekeurd.
- b) Alle weefselresten van pluimvee en eieren die de gebouwen, erven, instrumenten, enzovoort, hebben kunnen verontreinigen moeten zorgvuldig worden verzameld en samen met de karkassen worden vernietigd.
- c) Het gebruikte ontsmettingsmiddel moet ten minste 24 uur op het behandelde oppervlak aanwezig blijven.

## II. Definitieve reiniging en ontsmetting

- a) Vet en vuil moeten van alle oppervlakken worden verwijderd door middel van een ontvettingsmiddel en vervolgens moeten de oppervlakken worden gewassen met water.
- b) Nadat met water is gewassen overeenkomstig het bepaalde onder a), moet alles opnieuw met een ontsmettingsmiddel worden besproeid.
- c) Na zeven dagen moeten de gebouwen opnieuw met een ontvettingsmiddel worden behandeld, worden gespoeld met koud water, worden besproeid met een ontsmettingsmiddel en opnieuw worden gespoeld met water.
- d) Mest en gebruikt strooisel moeten zodanig worden behandeld dat het virus wordt gedood. Hierbij moet een van de volgende methoden worden gebruikt:
  - i) verbranding of behandeling met stoom van ten minste 70 °C;
  - ii) diep begraven, buiten het bereik van ongedierte en wilde vogels;
  - iii) opstapelen — en eventueel nat maken om gisting te bevorderen — en afdekken om de warmte te bewaren en tot een temperatuur van 20 °C te komen en gedurende 42 dagen bedekt houden buiten het bereik van ongedierte en wilde vogels.



## BIJLAGE III

## METHODE VOOR DIFFERENTIËLE DIAGNOSTIEK EN BEVESTIGING VAN DE DIAGNOSE VAN AVIAIRE INFLUENZA

De onderstaande methoden voor het isoleren en karakteriseren van virussen van aviaire influenza moeten worden beschouwd als richtsnoeren en minimumeisen die bij het stellen van de diagnose van de ziekte in acht moeten worden genomen.

Voor de differentiële diagnostiek en de bevestiging van de diagnose van aviaire influenza geldt de volgende definitie:

Aviaire influenza is een pluimveeziekte die wordt veroorzaakt door een influenza-A-virus met een intraveneuze pathogeniteitsindex bij zes weken oude kuikens van meer dan 1,2, of door een influenza-A-virus, subtype H5 of H7; door middel van „sequencing” (bepaling van de basenvolgorde) van de nucleotiden is aangetoond dat bij deze subtypes verschillende basische aminozuren aanwezig zijn aan de breukzijde van het hemagglutinine.

## HOOFDSTUK I

## Bemonstering en behandeling van de monsters

1. *Monsters*

Cloaca-swabs (of faeces) en trachea-swabs van zieke dieren; faeces of inhoud van het spijsverteringskanaal, hersenweefsel, trachea, longen, lever, milt en andere duidelijk aangetaste organen van pas gestorven dieren.

2. *Behandeling van de monsters*

De in punt 1 genoemde organen en weefsels mogen worden samengevoegd, met uitzondering van het faecale materiaal, dat apart moet worden behandeld. De swabs moeten volledig worden ondergedompeld in een voldoende hoeveelheid antibiotisch medium. Monsters van faeces en organen moeten worden gehomogeniseerd (in een laboratoriummixer of met stamper en vijzel en steriel zand) in een antibiotisch medium zodat een 10-20 %-ige m/v suspensie in het medium ontstaat. De suspensies worden gedurende ongeveer twee uur bij omgevingstemperatuur (of gedurende een langere tijd bij 4 °C) gehouden en daarna door middel van centrifugeren (bij voorbeeld 800 tot 1 000 g gedurende 10 minuten) geclarificeerd.

3. *Antibiotisch medium*

Met diverse formuleringen van antibiotische media zijn in verschillende laboratoria goede resultaten verkregen en de nationale laboratoria kunnen voor een bepaald land advies geven. Monsters van faeces vereisen hoge antibioticaconcentraties; een typische formulering daarvoor is: 10 000 eenheden/ml penicilline, 10 mg/ml streptomycine, 0,25 mg/ml gentamycine en 5 000 eenheden/ml mycostatine in PBS (phosphate buffered saline — keukenzoutoplossing met fosfaatbuffer). Een vijfvoudige verdunning van deze concentraties volstaat voor weefsels en trachea-swabs. Voor Chlamydia-organismen mag 50 mg/ml oxytetracycline worden toegevoegd. Voor het bereiden van het medium is het van essentieel belang dat na toevoeging van de antibiotica de pH wordt gecontroleerd en op 7,0-7,4 wordt gebracht.

## HOOFDSTUK 2

## Virusisolatie

*Virusisolatie met behulp van bebroede kipeieren*

Bij ten minste vier geëmbryoneerde kipeieren die gedurende acht tot tien dagen zijn bebroed, wordt telkens 0,1-0,2 ml van het geclarificeerde en vloeibare supernatant in de allantoïsholte geënt. Deze eieren zijn bij voorkeur afkomstig van een specifiek pathogeen vrij koppel (SPF-koppel), maar wanneer dit niet mogelijk is, mogen eieren worden gebruikt van een koppel waarvan is aangetoond dat het vrij is van antistoffen tegen het virus van aviaire influenza. De geënte eieren worden bij 37 °C bewaard en dagelijks geschouwd. Eieren waarin bij het schouwen dode of stervende embryo's worden opgemerkt en alle eieren die op de zesde dag na enten nog overblijven, worden gekoeld tot 4 °C en het allantoïsof of amnionvocht daarvan wordt getest op hemagglutinatief. Als geen hemagglutinatief wordt geconstateerd, wordt de hierboven beschreven procedure herhaald met onverdund allantoïsof of amnionvocht als inoculum.

Wanneer hemagglutinatief wordt geconstateerd, moet de aanwezigheid van bacteriën door middel van kweek worden uitgesloten. Als bacteriën aanwezig zijn, kan het vocht op een membraanfilter van 450 nm worden gefiltreerd; vervolgens worden opnieuw antibiotica toegevoegd en worden bebroede eieren met de aldus verkregen vloeistof geënt volgens de hierboven beschreven methode.

## HOOFDSTUK 3

## Differentiële diagnose

1. *Voorlopige differentiatie*

Aangezien het van belang is dat bestrijdingsmaatregelen om verspreiding van het virus tegen te gaan zo spoedig mogelijk worden toegepast, dient elk regionaal laboratorium in staat te zijn om niet alleen NCD (Newcastle disease)-virus, maar ook elk ander geïsoleerd hemagglutinerend virus, bij voorbeeld influenza-A-virus, subtypes H5 of H7, te identificeren. Met alle vloeistoffen die hemagglutinatie teweegbrengen, moet derhalve een hemagglutinatieremmingstest als beschreven in de hoofdstukken 5 en 6 worden opgezet. Een positieve remming, dat wil zeggen 2<sup>4</sup> of hoger, met het specifieke polyklonale antiserum voor subtype H5 of H7 van het influenza-A-virus met een titer van ten minste 2<sup>9</sup>, wordt beschouwd als een voorlopige identificatie op grond waarvan tijdelijke bestrijdingsmaatregelen kunnen worden ingesteld.

2. *Bevestiging van de identificatie*

Aangezien bij elke influenzavirus dertien subtypes van hemagglutinine en negen subtypes van neuraminotase voorkomen, telkens met varianten, is het praktisch niet realiseerbaar en uit een oogpunt van de kosten niet verantwoord dat elk nationaal laboratorium de nodige antisera bewaart voor een volledige karakterisering van de in influenzavirusisolaten aanwezige antigenen. Elk nationaal laboratorium dient echter:

- i) te bevestigen dat het isolaat een influenza-A-virus is, aan de hand van een dubbele immunodiffusietest voor de opsporing van het gemeenschappelijk antigeen, als beschreven in hoofdstuk 9 van deze bijlage (indien het nationale laboratorium daaraan de voorkeur geeft, mag voor de opsporing van de gemeenschappelijke antigenen ook gebruik worden gemaakt van de immunofluorescentietest of de Elisa);
- ii) te bepalen of het isolaat al dan niet van het subtype H5 of H7 is;
- iii) bij zes weken oude kuikens een intraveneuze pathogeniteitsindextest te verrichten als beschreven in hoofdstuk 7 van deze bijlage. Een intraveneuze pathogeniteitsindex van meer dan 1,2 wijst op de aanwezigheid van het virus; in dat geval moeten de bestrijdingsmaatregelen volledig worden toegepast (het zou nuttig zijn indien de nationale laboratoria ook tests zouden uitvoeren om te bepalen in welke mate een isolaat bij machte is om in celcultures plaques te vormen, overeenkomstig het bepaalde in hoofdstuk 8).

De nationale laboratoria dienen alle isolaten van het virus van aviaire influenza en van de subtypes H5 en H7 onmiddellijk naar het communautaire referentielaboratorium te zenden voor een volledige karakterisering.

3. *Nadere typering en karakterisering van isolaten*

De nationale laboratoria dienen alle hemagglutinerende virussen aan het communautaire referentielaboratorium toe te zenden voor verder onderzoek op hun antigenen en genetische eigenschappen, ten einde de epizoötiologische kennis van de ziekte(n) in de Gemeenschap te ontwikkelen in het kader van de bevoegdheden en taken van het communautaire referentielaboratorium.

Bovendien dient het communautaire referentielaboratorium voor alle ontvangen influenzavirussen een volledige antigeentyping te verrichten. Voor virussen van de subtypes H5 en H7 met een intraveneuze pathogeniteitsindex van ten hoogste 1,2 is ook sequencing van de nucleotiden van het hemagglutininegeen vereist om te bepalen of zich al dan niet multiële basische aminozuren bevinden op de breukzijde van het hemagglutinine-eiwit. Voor virussen waarbij zich multiële basische aminozuren op de breukzijde bevinden, moeten de maatregelen ter bestrijding van aviaire influenza ten volle worden toegepast.

## HOOFDSTUK 4

## Serologische tests voor de opsporing van antistoffen tegen het virus van aviaire influenza

1. In het kader van uitroeiingsprogramma's, waarbij reeds bekend is welk subtype H van het virus verantwoordelijk is voor de ziekte of waarbij het homologe virus als antigeen wordt gebruikt, kan als serologische test voor de opsporing van de besmetting gebruik worden gemaakt van de hemagglutinatieremmingstest als beschreven in de hoofdstukken 5 en 6.

Indien het subtype van het hemagglutinine niet bekend is, kan, om besmetting met influenza-A-virussen aan te tonen, worden gezocht naar tegen de groepspecifieke antigenen gerichte antilichamen.

Daartoe kan gebruik worden gemaakt van de dubbele immunodiffusietest (als beschreven in hoofdstuk 9) of van een Elisa (een probleem bij de Elisa is evenwel de gastheerspecificiteit van de test, aangezien de test gebaseerd is op de opsporing van als gastheer fungerende immunoglobulinen). Watervogels geven zelden positieve resultaten te zien bij de dubbele immunodiffusietest en in de praktijk is het bijgevolg aangewezen om, tenzij het subtype bekend is, dergelijke vogels alleen te onderzoeken op de aanwezigheid van antistoffen bij de subtypes H5 en H7.

2. a) *Monsters*

Bloedmonsters worden genomen van alle dieren als het koppel kleiner is dan 20 dieren, en van 20 dieren als het koppel groter is. (Dit geeft ongeacht de grootte van het koppel een waarschijnlijkheid van 99 % dat ten minste één positief serum wordt gevonden als 25 % of meer van het koppel positief is.) Men laat het bloed stollen en het serum wordt verzameld voor onderzoek.

**b) Onderzoek van antistoffen**

De individuele serummonsters worden onderzocht op hun capaciteit om het hemagglutinerende antigeen van het influenzavirus te remmen in een gestandaardiseerde hemagglutineringsremmingstest (HAR) zoals beschreven in hoofdstuk 6.

Er bestaat enige discussie over het feit of 4 dan wel 8 hemagglutinine-eenheden (HAE) moeten worden gebruikt bij de HAR-test. Beide opties lijken mogelijk en de keuze wordt overgelaten aan de nationale laboratoria.

Het gebruikte antigeen bepaalt echter wel bij welk niveau een serum als positief wordt beschouwd: bij gebruik van 4 HAE is een serum positief als het een titer heeft van  $2^4$  of hoger, bij gebruik van 8 HAE is een serum positief als het een titer heeft van  $2^3$  of hoger.

**HOOFDSTUK 5****Hemagglutinatietest (HA-Test)***Reagentia*

1. Isotonische zoutoplossing die met fosfaat (0,05 M) is gebufferd op een pH van 7,0-7,4.
2. Rode bloedcellen (RBC) van minimaal drie specifiek pathogenvrije kippen (of als die niet beschikbaar zijn van vogels die regelmatig zijn gecontroleerd en vrij zijn gebleken van antistoffen tegen aviaire-influenzavirussen) worden samengevoegd en in een zelfde volume Alsever-oplossing gebracht. Vóór gebruik worden de cellen drie keer in PBS gewassen. Voor de test wordt een 1 %-ige suspensie (packed cells v/v) in PBS aanbevolen.
3. Het communautaire referentielaboratorium levert laagvirulente virussen van de subtypes H5 en H7 voor gebruik als standaardantigeen, of beveelt het gebruik daarvan aan.

*Werkwijze*

1. Breng in ieder putje van een plastic microtiterplaat (met V-vormige putjes) 0,025 ml PBS.
2. Breng 0,025 ml virussuspensie (dat wil zeggen allantoïsvocht) in het eerste putje.
3. Leg een tweevoudige verdunningsreeks aan van het virus over de gehele plaat (1 : 2 tot en met 1 : 4 096) met behulp van een microtitratiediluter.
4. Voeg in ieder putje 0,025 ml PBS toe.
5. Voeg in ieder putje 0,025 ml van de 1 %-ige suspensie van rode bloedcellen toe.
6. Meng door zachtjes te tikken en laat de plaat staan bij 4 °C.
7. De platen worden 30-40 minuten daarna afgelezen wanneer de RBC-controles tot rust zijn gekomen. Bij het aflezen worden de platen lichtjes schuin gehouden en wordt nagegaan of in de RBC al dan niet een traanvormige stroming optreedt. In putjes waarin geen hemagglutinatie (HA) optreedt, moet de stroming met dezelfde snelheid geschieden als in de controleputjes met de virusvrije controles.
8. De HA-titer is de hoogste verdunning waarin agglutinatie van RBC optreedt. Deze verdunning mag worden beschouwd als bevattende 1 HAE. De HA-titer kan nauwkeuriger worden bepaald als in het kader van de HA-test verdunningsreeksen worden aangelegd met een aantal dicht bij elkaar gelegen uitgangsverdunningen van het virus, bij voorbeeld 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5, 1 : 6, enz. Deze methode wordt aanbevolen voor de accurate bereiding van antigeen voor de hemagglutineringsremmingstests (hoofdstuk 6).

**HOOFDSTUK 6****Hemagglutineringsremmingstest (HAR-Test)***Reagentia*

1. PBS.
2. Allantoïsvocht dat virus bevat en met PBS is verdund tot het 4 of 8 HAE per 0,025 ml bevat.
3. 1 %-ige suspensie van RBC van kippen.
4. Negatief controleserum van kippen.
5. Positief controleserum.

*Werkwijze*

1. Breng in ieder putje van een plastic microtiterplaat (met V-vormige putjes) 0,025 ml PBS.
2. Breng 0,025 ml serum in het eerste putje van de plaat.

3. Leg een tweevoudige verdunningsreeks aan van het serum over de gehele plaat met behulp van een microtitratiediluter.
4. Voeg 0,025 ml verdund allantoïsvocht dat 4 of 8 HAE bevat, toe.
5. Meng door zachtjes te tikken en laat de plaat staan bij 4 °C gedurende ten minste 60 minuten of bij kamertemperatuur gedurende ten minste 30 minuten.
6. Voeg aan ieder putje 0,025 ml van de 1 %-ige suspensie van RBC toe.
7. Meng door zachtjes te tikken en laat de plaat staan bij 4 °C.
8. De platen worden 30-40 minuten daarna afgelezen wanneer de RBC-controles tot rust zijn gekomen. Bij het aflezen worden de platen lichtjes schuin gehouden en wordt nagegaan of in de putjes al dan niet een traanvormige stroming optreedt met dezelfde snelheid als in de controleputjes die uitsluitend RBC (0,025 ml) en PBS (0,05 ml) bevatten.
9. De HAR-titer is de hoogste verdunning van het antiserum die nog in staat is de hemagglutinatie van 4 of 8 eenheden virus volledig te remmen (een HA-titratie om de aanwezigheid van de vereiste HAE te bevestigen, maakt deel uit van iedere test).
10. De resultaten zijn alleen geldig als met het negatieve controleserum, een titer wordt verkregen die lager is dan 2<sup>3</sup> voor 4 HAE of lager dan 2<sup>2</sup> voor 8 HAE en als de titer die met het positieve controleserum wordt verkregen, maximaal 1 verdunning afwijkt van de gekende titer van dat serum.

### HOOFDSTUK 7

#### Intraveneuze pathogeniteitsindex (IVPI)

1. Besmettelijk allantoïsvocht van de laagste passage die beschikbaar is, bij voorkeur van de oorspronkelijke isolatie zonder dat enige selectie heeft plaatsgevonden, wordt tot op 10<sup>-1</sup> verdund in een steriele isotonische zoutoplossing.
2. Bij tien zes weken oude kuikens (het gebruik van specifiek pathogeenvrije kuikens is verplicht) wordt telkens 0,1 ml verdunde virusoplossing intraveneus ingespoten.
3. De dieren worden gedurende tien dagen om de 24 uur onderzocht.
4. Bij iedere waarneming wordt voor elk dier een van de volgende aantekeningen gemaakt: normaal (0), ziek (1), ernstig ziek (2) of dood (3).
5. Het registreren van de resultaten en het berekenen van de index vindt plaats overeenkomstig het volgende voorbeeld:

Klinische symptomen	Dagen na inoculatie										Totale score
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Normaal	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12 × 0 = 0
Ziek	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	6 × 1 = 6
Ernstig ziek (*)	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	6 × 2 = 12
Dood	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76 × 3 = 228
											Totaal = 246

De index is het gemiddelde van het totale aantal punten per dier en per waarneming =  $\frac{246}{100} = 2,46$

(\*) Dit is uiteraard een subjectief klinisch oordeel maar normaal betreft het hier dieren die meer dan één van de volgende symptomen vertonen: ademhalingsstoornissen, depressie, diarree, cyanose van onbeschermdde huid of lellen, oedeem in het gezicht en/of op het hoofd, zenuwsymptomen.

### HOOFDSTUK 8

#### Bepaling van de capaciteit tot vorming van plaques

1. Doorgaans kan het best een verdunningsreeks van het virus worden aangelegd om ervoor te zorgen dat in de schaal een optimaal aantal plaques wordt verkregen. Een tienvoudige verdunningsreeks tot en met 10<sup>-7</sup> in PBS zal normaliter voldoende zijn.
2. In petrischalen (met een diameter van 5 cm) worden confluerende vettapijten van kippeëmbryocellen of een andere geschikte cellijn (bij voorbeeld Madin-Darby bovine kidney) aangebracht.

3. Van elke virusverdunding wordt 0,2 ml overgebracht in twee petrischalen en vervolgens laat men het virus gedurende 30 minuten adsorberen.
4. Na driemaal wassen met PBS worden de geïnfecteerde cellen bedekt met een geschikt medium dat 1 % m/v agar en 0,01 mg/ml trypsine bevat of alleen agar zonder trypsine; het dekmedium mag geen serum bevatten.
5. Na 72 uur incuberen bij 37 °C zouden de plaques voldoende groot moeten zijn. Zij zijn het gemakkelijkst waar te nemen als de agardeklaag wordt verwijderd en als het celtapijt wordt gekleurd met in 25 %-ige v/v ethanol opgelost crystal violet (0,5 % m/v).
6. Alle virussen die met een trypsine bevattende deklaag zijn geïncubeerd, moeten heldere plaques geven. Wanneer de deklaag geen trypsine bevat, worden alleen plaques gevormd door de voor kippen virulente virussen.

## HOOFDSTUK 9

### Dubbele immunodiffusie

Om uit te maken of influenza-A-virus aanwezig is, wordt bij voorkeur de aanwezigheid aangetoond van de nucleocapside- of matrix-antigenen die gemeenschappelijk zijn aan alle influenza-A-virussen. Daartoe wordt meestal gebruik gemaakt van de dubbele immunodiffusietest met geconcentreerde viruspreparaten of met extracten van geïnfecteerde chorion-allantoïsmembranen.

Geconcentreerde viruspreparaten kunnen worden aangemaakt door eenvoudige hypercentrifugatie van besmet allantoïsvocht en disruptie van het virus ten einde de inwendige nucleocapside- en matrix-antigenen vrij te maken door behandeling met het detergent natriumlauriolsarcosinaat. Ook kan gebruik worden gemaakt van zuurprecipitatie, door aan besmet allantoïsvocht 1 N HCl toe te voegen waardoor de pH op 3,5—4,0 wordt gebracht, gedurende ten minste 1 uur te koelen bij 0 °C en vervolgens bij geringe snelheid te centrifugeren (1 000 g gedurende 10 minuten).

Het supernatant kan worden verwijderd en het precipitaat dat het virus bevat weer gesuspenderd in een minimumhoeveelheid glycine-sarcosylbuffer (1 % natriumlauriolsarcosinaat dat met 0,5 M glycine is gebufferd tot een pH van 9,0). Deze preparaten bezitten zowel de nucleocapside- als de matrix-antigenen.

Beard (1970) beschrijft de bereiding van nucleocapsiderijk antigeen uit chorion-allantoïsmembranen afkomstig van besmette eieren. Deze methode bestaat uit verwijdering van de chorion-allantoïsmembranen van besmette eieren die hemagglutinine bevatten, vermaling of homogenisering van de membranen, bevriezing en ontdooiing (driemaal) gevolgd door centrifugatie bij 1 000 g gedurende 10 minuten. Het vaste gedeelte wordt verwijderd en het supernatant wordt met 0,1 % formaline behandeld om vervolgens als antigeen te worden gebruikt.

Deze twee antigenen kunnen zonder onderscheid worden gebruikt bij de dubbele immunodiffusietest, met gebruikmaking van 1 % agarose (of agar)-gel die 8,0 % natriumchloride bevat en waarvan de pH op 7,2 is gebracht met 0,1 M fosfaatbuffer. Influenza-A-virus is aanwezig wanneer het te onderzoeken antigeen en het positieve controleantigeen tegenover het positieve antiserum een fuserende precipitatielijnen vormen.

## BIJLAGE IV

## LIJST VAN DE NATIONALE LABORATORIA VOOR AVIAIRE INFLUENZA

België	Nationaal Instituut voor Diergeneeskundig Onderzoek, Groeselenberg 99, B-1180 Brussel
Denemarken	National Veterinary Laboratory, Poultry Disease Division, Hangøvej 2, DK-8200 Aarhus N
Duitsland	Institut für Kleintierzucht der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode, Postfach 2 80, D-3100 Celle
Frankrijk	Centre National d'Études Vétérinaires et Alimentaires — Laboratoire Central de Recherches Agricoles et Porcines, boîte postale 53, F-22440 Ploufragan
Griekenland	Ινστιτούτο Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων 66, 26ης Οκτωβρίου, 54627-Θεσσαλονίκη Institute of Injections and Parasitological Diseases, 66, 26th October Street, GR-54627 Thessaloniki
Ierland	Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Castleknock, IRL-Dublin 15
Italië	Istituto Patologie Aviaire, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Napoli, Via Aniezzo Falcone 394, I-80127 Napoli F Delpino 1
Luxemburg	Institut National de Recherches Vétérinaires, Groeselenberg 99, B-1180 Bruxelles
Nederland	Centraal Diergeneeskundig Instituut, Vestiging Virologie, Houtribweg 39, NL-8221 RA Lelystad
Portugal	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), Estrada de Benfica 701, P-1500 Lisboa
Spanje	Centro Nacional de Referencia para la Peste Aviar es el Laboratorio Nacional de Sanidad y Producción Animal de Barcelona, Zona Franca Circunvalación-Tramo 6, Esquina Calle 3, E-Barcelona
Verenigd Koninkrijk	Central Veterinary Laboratory, New Haw, UK-Weybridge, Surrey KT15 3NB

## BIJLAGE V

## COMMUNAUTAIR REFERENTIELABORATORIUM VOOR AVIAIRE INFLUENZA

## Naam van het laboratorium

Central Veterinary Laboratory,  
New Haw,  
Weybridge,  
Surrey KT15 3NB,  
United Kingdom.

## Functies en taken van het communautaire referentielaboratorium voor aviaire influenza:

1. coördinatie, in overleg met de Commissie, van de in de Lid-Staten toegepaste methoden voor de diagnose van aviaire influenza en met name:
  - a) nauwkeurige omschrijving, opslag en levering van virusstammen van aviaire influenza voor gebruik bij serologisch onderzoek en voor de bereiding van antiserum;
  - b) levering van referentiesera en andere referentiereagentia aan de nationale referentielaboratoria met het oog op de standaardisering van de in de Lid-Staten gebruikte tests en reagentia;
  - c) aanleg en instandhouding van een verzameling stammen en isolaten van het aviaire-influenzavirus;
  - d) periodieke organisatie van communautaire vergelijkende tests van de diagnoseprocedures;
  - e) verzameling en vergelijking van gegevens en informatie inzake de gebruikte diagnosetechnieken en de resultaten van de in de Gemeenschap verrichte tests;
  - f) karakterisering van isolaten van het aviaire-influenzavirus via de meest geavanceerde methoden om een beter inzicht in de epizoötiologie van aviaire influenza te krijgen;
  - g) het volgen van de ontwikkelingen, over de gehele wereld, op het gebied van toezicht op epizoötiologie en voorkoming van aviaire influenza;
  - h) het op peil houden van deskundigheid met betrekking tot het aviaire-influenzavirus en andere hiërmee samenhangende virussen ten einde een snelle differentiële diagnose mogelijk te maken;
  - i) verwerving van gedegen kennis over de vervaardiging en het gebruik van immunologische geneesmiddelen voor dierlijk gebruik voor de uitroeiing en beheersing van aviaire influenza;
2. actieve steun bij het identificeren van de uitbraken van aviaire influenza in de Lid-Staten door het onderzoeken van de virusisolaten die worden toegezonden voor bevestiging van de diagnose, karakterisering en epidemiologische studies. Het laboratorium moet met name de sequencing van de nucleotiden kunnen analyseren om de afgeleide aminozuresequentie op de breukzijde van de hemagglutininmolecuul van de influenzavirussen van het subtype H5 of H7 te kunnen vaststellen;
3. opleiding alsmede na- en bijscholing van deskundigen op het gebied van laboratoriumdiagnose met het oog op de harmonisatie van de diagnosetechnieken in de hele Gemeenschap.

## BIJLAGE VI

## MINIMUMCRITERIA VOOR DE RAMPENPLANNEN

De rampenplannen moeten ten minste:

1. voorzien in de oprichting op nationaal niveau van een crisiscentrum dat alle noodmaatregelen in de betrokken Lid-Staat dient te coördineren;
2. een lijst bevatten van lokale noodcentra die over de nodige voorzieningen beschikken om de controlematregelen op lokaal niveau te coördineren;
3. nauwkeurige informatie bevatten over het bij de noodmaatregelen betrokken personeel, hun vakbekwaamheid en hun bevoegdheden;
4. ervoor zorgen dat elk lokaal noodcentrum snel contact kan opnemen met de personen en/of organisaties die rechtstreeks of indirect bij een besmetting zijn betrokken;
5. ervoor zorgen dat het nodige materieel en materiaal beschikbaar is om de noodmaatregelen naar behoren te kunnen uitvoeren;
6. nauwkeurige instructies bevatten over de maatregelen, inclusief de maatregelen betreffende de wijze van vernietiging van karkassen, die moeten worden genomen wanneer infectie of besmetting wordt vermoed en bevestigd.
7. voorzien in scholingsprogramma's om de praktische vaardigheden en de kennis van de administratieve voorschriften op peil te houden en te verbeteren;
8. ervoor zorgen dat de diagnostische laboratoria over de nodige voorzieningen beschikken voor post-mortem-onderzoek en over de nodige capaciteit voor het verrichten van serologisch, histologisch en ander onderzoek, en dat zij toegang hebben tot recente technieken om snel een diagnose te stellen (hiertoe moeten de nodige regelingen worden getroffen voor het snelle vervoer van monsters);
9. de nodige gegevens bevatten inzake de hoeveelheid vaccin tegen aviaire influenza die naar verwachting nodig is indien tot noodvaccinatie wordt besloten;
10. voorzien in de nodige uitvoeringsbepalingen.