

**COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN**

COM(91) 304 def.

Brussel, 30 juli 1991

Voorstel voor een

**VERORDENING (EEG) VAN DE RAAD**

tot vaststelling van communautaire maatregelen  
voor de bestrijding van aviaire influenza

(door de Commissie ingediend)



### TOELICHTING

Aviaire influenza is, in zijn sterk pathogene vorm, een besmettelijke en gevaarlijke pluimveeziekte. De ziekte wordt veroorzaakt door een virus dat sterk kan variëren inzake pathogeniteit en inzake klinische symptomen bij de voor deze ziekte vatbare diersoorten. De ziekte is over de gehele wereld verspreid en het virus kan worden verslept door migrerende vogels, vooral bepaalde migrerende watervogels.

Krachtens artikel 19 van Richtlijn 90/539/EEG van de Raad van 15 oktober 1990 tot vaststelling van veterinairerechtelijke voorschriften voor het intracommunautaire handelsverkeer en de invoer uit derde landen van pluimvee en broedersieren<sup>(1)</sup> moeten vóór 1 juli 1991 voorschriften voor de bestrijding van aviaire influenza zijn vastgesteld.

De voorgestelde maatregelen hebben ten doel aviaire influenza uit te roeien en verspreiding ervan te voorkomen in geval van een uitbraak. Daartoe wordt stamping out toegepast, al dan niet in combinatie met vaccinatie, en worden alle verplaatsingen van pluimvee, pluimveeproducten, voertuigen en alle andere stoffen waardoor het virus van aviaire influenza kan worden overgedragen, zorgvuldig gecontroleerd. Zodra de aanwezigheid van aviaire influenza wordt vermoed, moet het nodige worden gedaan om onmiddellijk doeltreffende maatregelen te kunnen nemen.

Met het oog op dergelijke maatregelen zijn in dit voorstel een aantal verplichtingen vastgesteld voor de Lid-Staten; zij moeten met name :

- ervoor zorgen dat een onderzoek wordt ingesteld om de aanwezigheid van aviaire influenza bij pluimvee dat ervan wordt verdacht met de ziekte te zijn besmet, te bevestigen of uit te sluiten;
- bedrijven onder toezicht plaatsen en verplaatsingen uit en naar de bedrijven verbieden tijdens de periode waarin, in verband met de vermoedelijke besmetting met aviaire influenza, toezicht wordt gehouden;
- besmette vogels doden en vernietigen wanneer de besmetting met aviaire influenza is bevestigd;

---

(1) PB nr. L 303 van 31.10.1990, blz. 6.

- een grondig epizoötiologisch onderzoek instellen wanneer besmetting met aviaire influenza wordt vermoed en bevestigd;
- een beschermingsgebied (3 km) en een toezichtgebied (10 km) instellen rond de besmette bedrijven;
- laboratoria aanwijzen die de voor een correcte uitvoering van de bestrijdingsmaatregelen vereiste technische assistentie moeten verlenen;
- de Commissie in kennis stellen van de vaccinatieprogramma's;
- een rampenplan opstellen.

Voorstel voor een  
Verordening (EEG) van de Raad  
van  
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,

Gezien het advies van het Europese Parlement,

Gezien het advies van het Economisch en Sociaal Comité,

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 bestrijdings-  
maatregelen in geval van een uitbraak van aviaire influenza in zijn sterk patho-  
gene vorm, veroorzaakt door een influenzavirus met specifieke kenmerken en hierna  
"aviaire influenza" genoemd, moeten worden getroffen, ten einde de normale ont-  
wikkeling 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 ontwik-  
kelen tot een epizoötie die een zodanige sterfte veroorzaakt en een zodanig  
verstorend effect heeft dat de rendabiliteit van de gehele pluimveehouderij  
daardoor ernstig door 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 produkten, en, indien nodig, door inenting;

Overwegende dat diagnose van de ziekte moet plaatsvinden onder toezicht van de bevoegde 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 aan de Commissie opdracht moet worden gegeven de nodige uitvoeringsbepalingen vast te stellen,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD :

#### Artikel 1

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

1. In het kader van deze verordening zijn, voor zover nodig, de definities van toepassing die zijn vastgesteld in artikel 2 van Richtlijn 90/539/EEG van de Raad tot vaststelling van veterinaire rechtelijke voorschriften voor het intra-communautair handelsverkeer en de uitvoer uit derde landen van pluimvee en broedeieren<sup>(1)</sup>.
  
2. 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 één 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 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 daartoe door de nationale overheid van het betrokken land aangewezen veterinaire autoriteit, die in het kader van deze verordening rechtstreeks onder de nationale overheid ressorteert en ook via die overheid verslag uitbrengt;
  
  - e) officiële dierenarts : de door de bevoegde autoriteit van de Lid-Staat aangewezen dierenarts.

---

(1) PB nr. L 303 van 31.10.1990, blz. 6.

### Artikel 3

Teikens wanneer besmetting met aviaire influenza wordt vermoed, dient daarvan onmiddellijk aangifte te worden gedaan aan de bevoegde autoriteit.

### Artikel 4

1. Wanneer pluimvee ervan wordt verdacht met aviaire influenza te zijn besmet of verontreinigd, stelt de officiële dierenarts onverwijld een onderzoek in 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 gegevens moeten worden bijgewerkt en desgevraagd worden overgelegd en zij 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, van materiaal, van afval, van strooisel of van andere objecten waardoor het virus van aviaire influenza kan worden overgedragen, wordt verboden;



- e) geen eieren van het bedrijf worden afgevoerd, met uitzondering van voor consumptie bestemde eieren die ten genoegen van de officiële dierenarts zijn ontsmet;
  - 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, sub b), c), d) en e), 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 2, 3 en 4 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, eist de bevoegde autoriteit dat behalve de in artikel 4, lid 2, genoemde maatregelen, ook de volgende maatregelen worden getroffen :
- 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 in de mate van het mogelijke worden opgespoord en vernietigd;
  - e) na uitvoering van de sub a) genoemde werkzaamheden moeten de gebouwen waar het betrokken pluimvee is gehuisvest, alsmede de omgeving daarvan, de gebruikte vervoermiddelen en alle ander materieel dat kan zijn verontreinigd, worden schoongemaakt en ontsmet overeenkomstig artikel 11;
  - f) na uitvoering van de sub 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 verontreiniging moet worden gevreesd.

Artikel 6

1. Indien er op een besmet bedrijf twee of meer afzonderlijke koppels zijn, kan de bevoegde autoriteit voor de gezonde koppels een uitzondering op het bepaalde in artikel 5, lid 1, a), 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 maar het andere koppel kan verspreiden.
2. De Commissie stelt volgens de procedure van artikel 21 de criteria vast voor het toestaan van een uitzondering als bedoeld in lid 1.

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 zijn vastgesteld bij Verordening (EEG) ... van de Raad.

#### Artikel 8

1. Wanneer de officiële dierenarts redenen heeft om aan te nemen dat pluimvee op een bedrijf kan zijn verontreinigd 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 bovengenoemde beperkingen op verplaatsingen zijn van toepassing gedurende 21 dagen, te rekenen vanaf de laatste dag waarop verontreiniging 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, stelt de bevoegde autoriteit rond het besmette bedrijf een besmet gebied in, 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 de natuurlijke barrières en de epidemiologische kenmerken van de uitbraak.
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 6, lid 1, van Verordening (EEG) nr. ... van de Raad tot vaststelling van veterinairrechtelijke voorschriften voor het intracommunautaire handelsverkeer in en de invoer uit derde landen van vers vlees van pluimvee en gekweekt vederwild<sup>(1)</sup>;
- ii) eendagskuikens en legrijpe kippen naar een bedrijf binnen het besmette gebied 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 broederij binnen het besmette gebied of naar een door de bevoegde autoriteit aangewezen broederij buiten dat gebied; vóór verzending moeten de eieren en de verpakkingen worden ontsmet.

Het sub i), ii) en iii), bedoelde vervoer moet rechtsreeks 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) 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.

---

(1) COM (89) 507 def.

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 broeders binnen het gebied worden gecontroleerd;
- c) het pluimvee mag de eerste 15 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 6, lid 1, van Verordening (EEG) nr. .../.... van de Raad tot vaststelling van veterinaire rechtelijke voorschriften voor het intracommunautaire handelsverkeer in en de invoer uit derde landen van vers vlees van pluimvee en gekweekt vee-wild;
- d) broeders mogen het toezichtgebied niet verlaten, tenzij om naar een door de bevoegde autoriteit aangewezen inrichting te worden gebracht. Vóór verzending moeten de eieren en de verpakkingen worden ontsmet;
- e) 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 sub b) en c), wordt het vervoer van pluimvee binnen het gebied verboden, met uitzondering van doorvoer via de hoofdwegen of de hoofdlijnen van het spoorwagennet.

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.

#### Artikel 10

1. De bevoegde autoriteit treft de nodige regelingen om de verplaatsingen van eieren en pluimvee te kunnen traceren.
2. De pluimvee-eigenaar of -houder dient de bevoegde autoriteit desgevraagd de nodige inlichtingen te verstrekken over het pluimvee en de eieren die op zijn bedrijf zijn binnengebracht of ervan zijn afgevoerd.
3. Een ieder die betrokken is bij het vervoer of het in de handel brengen van pluimvee en eieren, moet de bevoegde autoriteit de nodige inlichtingen kunnen verstrekken omtrent de verplaatsingen van het pluimvee en de eieren die zij hebben vervoerd of in de handel gebracht, en moet alle desbetreffende bewijsstukken kunnen overleggen.

#### Artikel 11

1. De te gebruiken ontsmettingsmiddelen en de concentraties daarvan moeten door de bevoegde autoriteit worden goedgekeurd.
2. De reinigings- en ontsmettingswerkzaamheden moeten onder officieel toezicht en volgens de instructies van de officiële dierenarts worden verricht.

#### Artikel 12

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

#### Artikel 13

1. In elke Lid-Staat worden aangewezen :
  - a) één of meer nationale laboratoria met de nodige voorzieningen en het nodige gespecialiseerd personeel om de pathogeniteit van influenzavirusisolaten te bepalen (Hoofdstuk 7 van bijlage I) en om influenza-A-virussen, subtypes H5 of H7, te identificeren;



- b) één of meer nationale laboratoria die worden belast met het testen van de reagentia die door de regionale laboratoria worden gebruikt;
  - c) één of meer nationale instituten of laboratoria, waar geautoriseerde vaccins kunnen worden getest, teneinde hun conformiteit te verifiëren met de specificaties zoals die zijn weerlegd in "The marketing authorisation".
2. De in bijlage II 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. In iedere Lid-Staat zijn de in lid 2 bedoelde nationale laboratoria voor aviaire influenza verantwoordelijk voor de coördinatie van de normen en diagnosemethoden die in elk diagnoselaboratorium voor aviaire influenza worden gebruikt. Daartoe :
- a) mogen zij de bij het stellen van de diagnose te gebruiken reagentia leveren aan de regionale 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 II genoemde nationale laboratoria houden nauw contact met het in artikel 14 bedoelde communautaire referentielaboratorium.

#### Artikel 14

Het communautair referentielaboratorium voor aviaire influenza is vermeld in bijlage III. De taken en bevoegdheden van het laboratorium worden vastgesteld volgens de procedure van artikel 21, voor zover dat nog niet is gebeurd op grond van artikel 28 van Beschikking 90/424/EEG van de Raad betreffende bepaalde uitgaven op veterinair gebied<sup>(1)</sup>.

---

(1) PB nr. L 224 van 18.08.1990, blz. 29.

Artikel 15

1. Tegen aviaire influenza mag met behulp van een door de bevoegde autoriteiten goedgekeurd vaccin alleen worden ingeënt ter aanvulling van de bestrijdingsmaatregelen die bij het uitbreken van de ziekte zijn getroffen.
2. 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 gevaccineerd;
  - de gebieden waar wordt gevaccineerd.
3. Wanneer een Lid-Staat overeenkomstig het bepaalde in lid 2 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 drie maanden na het einde van de vaccinatiwerkzaamheden.

Artikel 16

1. Wanneer in een bepaald gebied een besmetting met aviaire influenza buitengewoon ernstige vormen aanneemt en de epizoötie zich bovendien dreigt te verspreiden, neemt de betrokken Lid-Staat de volgende maatregelen :
  - een geografisch afgebakend gebied dat ten minste alle beschermingsgebieden en toezichtgebieden omvat, wordt uitgeroepen tot "gebied met groot besmettingsgevaar";

- in het "gebied met groot besmettingsgevaar" worden de in artikel 9, lid 3, vastgestelde maatregelen toegepast;
  - levend pluimvee en broeders en vogels mogen het "gebied met groot besmettingsgevaar" niet verlaten;
  - de Commissie en de andere Lid-Staten worden in het kader van het Permanent Veterinair Comité op de hoogte gebracht van de ziektesituatie en de toegepaste bestrijdingsmaatregelen.
2. De grenzen van het "gebied met groot besmettingsgevaar" kunnen worden aangepast naarmate toezichtgebieden worden opgeheven. Het bepaalde in lid 1 is niet langer van toepassing wanneer het laatste toezichtgebied is opgeheven.
  3. Indien de buitengewoon ernstige situatie aanhoudt, moet elk besluit ten aanzien van de door de betrokken Lid-Staat te nemen maatregelen, met name het uitroepen van het gebied tot "gebied met groot besmettingsgevaar" en de toepassing van artikel 15, worden genomen volgens de procedure van artikel 21.

#### 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 uitbraak. In het plan dient elke betrokken Lid-Staat een nauwkeurige raming te maken van de behoeften aan vaccin voor het geval dat noodvaccinatie nodig zou blijken.

2. Voor het opstellen van de rampenplannen gelden mutatis mutandis de criteria die zijn vastgesteld bij Beschikking 91/42/EEG van de Commissie van 8 januari 1991 houdende vaststelling, overeenkomstig artikel 5 van Richtlijn 90/423/EEG van de Raad, van de criteria die moeten worden toegepast bij het opstellen van de rampenplannen voor de bestrijding van mond- en klauwzeer<sup>(1)</sup>.

De Commissie kan, volgens de procedure van artikel 21, deze criteria wijzigen of aanvullen in verband met de specifieke aard van aviaire influenza.

3. De overeenkomstig de in lid 2 bedoelde criteria vastgestelde plannen worden uiterlijk twaalf maanden na de inwerkingtreding van deze verordening 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

Veterinaire deskundigen van de Commissie kunnen, in samenwerking met de autoriteiten van de betrokken Lid-Staat en voor zover dat nodig is om een uniforme toepassing van deze verordening te garanderen, controles ter plaatse verrichten; de Commissie stelt de Lid-Staten in kennis van de resultaten van deze controles.

---

(1) PB nr. L 23 van 29.01.1991, blz. 29.

De Lid-Staat op het grondgebied waarvan een controle wordt verricht, verleent de deskundigen de nodige assistentie om hun taak te vervullen.

De algemene bepalingen ter uitvoering 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 uit deze verordening voortvloeiende maatregelen zijn vastgesteld in Beschikking 90/424/EEG van de Raad betreffende bepaalde uitgaven op veterinair gebied.

#### Artikel 20

De bijlagen bij deze verordening kunnen door de Commissie volgens de procedure van artikel 21 worden gewijzigd in verband met de ontwikkeling op het gebied van de diagnostische procedures.

#### Artikel 21

1. De Commissie wordt bijgestaan door het bij Besluit 68/361/EEG<sup>(1)</sup> ingestelde Permanent Veterinair Comité, hierna het "Comité" genoemd.
2. In de gevallen waarin wordt verwezen naar de in dit artikel omschreven procedure, gelden de onderstaande bepalingen.

De vertegenwoordiger van de Commissie dient bij het Comité een ontwerp in van de te nemen maatregelen. Het Comité brengt over dat ontwerp advies uit binnen een termijn die de voorzitter kan vaststellen naargelang van de urgentie van de aangelegenheid, eventueel door middel van een stemming.

Het advies wordt opgenomen in de notulen; voorts heeft elke Lid-Staat het recht te verzoeken dat zijn standpunt in de notulen wordt opgenomen.

---

(1) PB nr. L 255 van 18.10.1968, blz. 23

De Commissie houdt zoveel mogelijk rekening met het door het Comité uitgebrachte advies. Zij brengt het Comité op de hoogte van de wijze waarop zij met dat advies rekening heeft gehouden.

Artikel 22

Deze verordening treedt in werking op 1 juli 1991.

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke Lid-Staat.

Gedaan te Brussel,

Voor de Raad,

BIJLAGE I

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

De onderstaande voorschriften 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 1 : 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

Bovengenoemde 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 (bv. 800 tot 1000 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. 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 kippeieren

Bij ten minste vier geëmbryoneerde kippeieren die gedurende acht tot tien dagen zijn bebroed, wordt telkens 0,1-0,2 ml van het geclarifieerde en vloeibare supernatant in de allantoïsholte geënt. Deze eieren zijn bij voorkeur afkomstig van een specifiek pathogenvrij 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 allantoïs- of amnionvocht daarvan wordt getest op hemagglutinatie. Als geen hemagglutinatie wordt geconstateerd, wordt de hierboven beschreven procedure herhaald met onverdund allantoïs- of amnionvocht als inoculum.

Wanneer hemagglutinatie 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-virus, maar ook elk ander geïsoleerd hemagglutinerend virus, bijvoorbeeld 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, d.i.  $2^4$  of hoger, met het specifieke polyklonale antiserum voor subtype H5 of H7 van het influenza-A-virus met een titer van ten minste  $2^9$ , wordt beschouwd als een voorlopige identificatie op grond waarvan tijdelijke bestrijdingsmaatregelen kunnen worden ingesteld.

#### 2. Bevestiging van de identificatie

Aangezien bij elk influenzavirus 13 subtypes van hemagglutinine en 9 subtypes van neuraminidase 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 :

- 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) 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 virus; in dat geval moeten de bestrijdingsmaatregelen volledig worden toegepast (het zou nuttig zijn indien de nationale laboratoria ook test 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 communautair 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 antigene en genetische eigenschappen, ten einde de epizoötiologische kennis van de ziekte(n) in de Europese Gemeenschap te ontwikkelen en het referentielaboratorium de mogelijkheid te bieden om zijn taak beter te vervullen.

Bovendien dient het communautaire referentielaboratorium voor alle ontvangen influenzavirussen een volledige antigeentypering te verrichten. Voor virussen van het subtype 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 multiple basische aminozuren bevinden op de breukzijde van het hemagglutinine-eiwit.

HOOFDSTUK 4 : Serologische tests voor de opsporing van antistoffen tegen  
het virus van aviaire influenza

1. In het kader van uitroelingsprogramma's, waarbij reeds geweten 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 gekend 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 van deze bijlage) 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 tegen 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 meer dan 99 % dat ten minste één positief serum worden gevonden als 25 % of meer van het koppel positief is). Men laat het bloed stollen en het serum wordt verzameld voor onderzoek.

- b) Onderzoek op antistoffen

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

Er bestaat enige discussie over het feit of 4 dan wel 8 hemagglutinine-eenheden 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 pathogeen-vrije kippen (of als die niet beschikbaar zijn van vogels die regelmatig zijn gecontroleerd en vrij zijn gebleken van antistoffen tegen aviaire-influenza-virussen) worden samengevoegd en in eenzelfde 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 communautair 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 (d.w.z. allantoïsvocht) in het eerste putje.
3. Leg een tweevoudige verdunningsreeks aan van het virus over de gehele plaat (1:2 tot en met 1:4096) 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 HA optreedt, moet de stroming tegen 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 HA-eenheid (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, b.v. 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, enz. Deze methode wordt aanbevolen voor de accurate bereiding van antigeen voor de hemagglutinatieremmingstests (Hoofdstuk 6).

#### HOOFDSTUK 6 : Hemagglutinatieremmingstest (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  $2^3$  voor 4 HAE of lager dan  $2^2$  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  $10^{-3}$  verdund in een steriele isotonische zoutoplossing.
2. Bij 10 weken oude kuikens (het gebruik van specifiek pathogeen vrije 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 x 0 = 0
Ziek	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	6 x 1 = 6
Ernstig ziek*	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	6 x 2 = 12
Dood	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76 x 3 = 228
<b>TOTAAL = 246</b>											

De index is het gemiddelde van het totale aantal punten per dier en per waarneming = 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  $10^{-7}$  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 (bijvoorbeeld 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 agar alleen 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 geïnfekteerde 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 1N 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 gesuspendeerd in een minimumhoeveelheid glycine-sarkosylbuffer (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 ontdoeling (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), een gel die 8,0 % natriumchloride bevat 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 positief controle-antigeen tegenover het positieve antiserum een fuserende precipitatieljk vormen.

BIJLAGE II

Lijst van de nationale laboratoria voor aviaire influenza

België	Institut national de Recherches Vétérinaires, Groeselenberg 99, B 1180 Bruxelles
Denemarken	National Veterinary Laboratory, Poultry Disease Division, Hangøvej 2, DK 8200 Aarhus N.
Bondsrepubliek Duitsland	Institut für Kleintierzucht der Bundesforschungs- anstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode, Postfach 280, D 3100 Celle
Frankrijk	Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentation - Laboratoire Centrale de Recherches Agricoles et Porcine, B.P. 53, F 22440 Ploufragan
Griekenland	
Ierland	Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Castleknock, Dublin 15
Italië	Istituto Patologie Aviaire, Facolta di Medicina Veterinaria, Università di Napoli, Via Aniello 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, Hourtibweg 39, NL 8221 RA Lelystad
Portugal	Laboratório Nacional de Investigaçao Veterinaria (LNIV), Estrada de Benfica 701, 1500 Lisboa
Spanje	
Verenigd Koninkrijk	Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, GB-Surrey KT15 3 NB

BIJLAGE III

Naam van het communautair referentielaboratorium voor aviaire influenza

Central Veterinary Laboratory

New Haw

Weybridge

Surrey KT15 3NB

United Kingdom

ISSN 0254-1513

COM(91) 304 def.

# DOCUMENTEN

NL

03

---

Catalogusnummer : CB-CO-91-344-NL-C

ISBN 92-77-74820-6

---

Bureau voor officiële publikaties der Europese Gemeenschappen  
L-2985 Luxemburg