

II

(Rättsakter vilkas publicering inte är obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS BESLUT

av den 4 augusti 2006

om godkännande av en diagnostikhandbok för aviär influensa i enlighet med rådets direktiv 2005/94/EG

[delgivet med nr K(2006) 3477]

(Text av betydelse för EES)

(2006/437/EG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT
DETTA BESLUT

med beaktande av rådets direktiv 2005/94/EG av den 20 december 2005 om gemenskapsåtgärder för bekämpning av aviär influensa och om upphävande av direktiv 92/40/EEG⁽¹⁾, särskilt artikel 50.1 andra stycket, och

av följande skäl:

(1) Direktiv 2005/94/EG innehåller bestämmelser om vissa förebyggande åtgärder för övervakning och tidig upptäckt av aviär influensa samt om de minimiåtgärder för bekämpning som skall vidtas vid ett utbrott av sjukdomen bland fjäderfä och andra fåglar i fångenskap.

(2) Det är nödvändigt att på gemenskapsnivå fastställa diagnostiska förfaranden, provtagningsmetoder och kriterier för utvärdering av resultaten från laboratorietester för bekräftande av ett utbrott av aviär influensa.

(3) För att de metoder för diagnostisering av aviär influensa som används i medlemsstaterna skall kunna samordnas i samråd med kommissionen, fastställs i bilaga VII till direktiv 2005/94/EG vilka uppgifter och åligganden gemenskapens referenslaboratorium har när det gäller sjukdomen. Till dessa uppgifter och åligganden hör att regelbundet anordna jämförelseprovning och tillhandahålla standardreagens inom gemenskapen.

(4) Det har under senare tid utarbetats laboratorietester för snabb diagnostisering av aviär influensa.

(5) De senaste årens erfarenheter av bekämpningen av aviär influensa har bidragit till att man kunnat fastställa vilka provtagningsförfaranden som är mest ändamålsenliga samt vilka kriterier som bör användas vid tolkningen av resultaten från laboratorietesterna för en korrekt diagnostisering av sjukdomen under olika förhållanden.

(6) De åtgärder som föreskrivs i detta beslut är förenliga med yttrandet från ständiga kommittén för livsmedelskedjan och djurhälsa.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Härmed godkänns den diagnostikhandbok enligt direktiv 2005/94/EG som fastställs i bilagan till detta beslut.

Artikel 2

Medlemsstaterna skall tillämpa diagnostikhandboken från och med den dag då de införlivar direktiv 2005/94/EG eller från och med den 1 juli 2007, om denna dag infaller tidigare.

⁽¹⁾ EUT L 10, 14.1.2006, s. 16.

Artikel 3

Detta beslut riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 4 augusti 2006.

På kommissionens vägnar
Markos KYPRIANOU
Ledamot av kommissionen

BILAGA

DIAGNOSTIKHANDBOK FÖR AVIÄR INFLUENSA

KAPITEL I

Inledning, syfte och definitioner

1. För att diagnostiseringen av aviär influensa skall ske enligt enhetliga förfaranden i gemenskapen fastställs följande i denna diagnostikhandbok:
 - a) Riktlinjer och minimikrav för diagnos- och provtagningsmetoder samt kriterier för utvärdering av resultaten från laborietester som gör det möjligt att korrekt diagnostisera aviär influensa.
 - b) De laborietester som skall användas för diagnostisering av aviär influensa och de laborietekniker som skall användas för den genetiska typningen av isolat av aviärt influensavirus.
 - c) Minimikrav för biosäkerhet och kvalitetsstandarder för diagnoslaboratorierna och för transport av prover.
2. Handboken riktar sig till de myndigheter som ansvarar för bekämpningen av aviär influensa. Den handlar därför främst om principerna för laborietesterna, tillämpningen av testerna, utvärderingen av resultaten samt om laborietekniker.
3. Utöver definitionerna i artikel 2 i direktiv 2005/94/EG avses i denna diagnostikhandbok med

diagnostiskt prov: animaliskt material, även en hel djurkropp, som transporteras för diagnostik- eller forskningsändamål. Levande infekterade djur omfattas inte.
4. Bekräftandet av aviär influensa hos fjäderfä och andra fåglar i fångenskap skall ske i enlighet med de förfaranden, provtagningsmetoder och kriterier för utvärdering av resultaten från laborietester som anges i denna diagnostikhandbok och skall grunda sig på ett eller flera av de kriterier som anges i a, b och c:
 - a) Påvisande av infektiöst virus, antigen eller specifikt genetiskt material i vävnads-, organ-, blod- eller avföringsprov från fjäderfä eller andra fåglar.
 - b) Kliniska tecken på sjukdomen och postmortala organskador hos dessa fåglar.
 - c) Påvisande av specifik antikroppsreaktion i blodprover från dessa fåglar.
5. Bekräftandet av infektion hos däggdjur med ett influensa A-virus från fåglar som är högpatoget eller, om det är lågpatoget, av subtyp H5 eller H7 skall grundas på ett eller flera av de kriterier som anges i a eller b:
 - a) Påvisande av infektiöst aviärt influensavirus, antigen eller specifikt genetiskt material i vävnads-, organ-, blod- eller avföringsprover från däggdjur.
 - b) Påvisande av specifik antikroppsreaktion mot aviär influensa i blodprov från däggdjur.
6. Förfarandena, provtagningsmetoderna och kriterierna för utvärdering av resultaten av laborietesterna skall vara
 - a) de som anges i denna diagnostikhandbok, eller
 - b) de som godkänts av de behöriga myndigheterna, förutsatt att
 - i) känsligheten och specificiteten hos de godkända laborietesterna har visat sig vara effektiva efter ett jämförande test som genomförts av gemenskapens referenslaboratorium för aviär influensa (nedan kallat "gemenskapens referenslaboratorium"), eller
 - ii) om ingen sådan utvärdering har genomförts av gemenskapens referenslaboratorium för en viss typ av laborietest, känsligheten och specificiteten hos det godkända laborietestet har validerats av det nationella referenslaboratoriet så att laborietestet fyller sitt syfte; resultaten av en sådan validering skall skickas in till gemenskapens referenslaboratorium för granskning.

KAPITEL II

Beskrivning av aviär influensa med tyngdpunkt på differentialdiagnos**1. Etiologi och virulens**

Aviär influensa är en mycket smittsam virusinfektion som orsakas av virus av familjen *Orthomyxoviridae* och släktet *influenzavirus A*. Influenza A-virus är de enda ortomyxovirus som man konstaterat infekterar fåglar. Många fågelarter har visat sig vara mottagliga för infektion med influensa A-virus; sjöfågel utgör en stor reservoar för dessa virus, men den stora majoriteten isolat har varit lågpatogena hos kycklingar och kalkoner, som har störst ekonomisk betydelse av de fåglar som får sjukdomen.

Influenzavirus typ A har antigen besläktade nukleoproteiner och matrixproteiner, men klassificeras i olika subtyper utifrån det antigena släktskapet med hjälp av antikroppar mot ytglykoproteiner hemagglutinin (HA) och neuraminidas (NA). För närvarande finns 16 HA-subtyper (H1–H16) och 9 NA-subtyper (N1–N9) identifierade. Varje influensa A-virus har en HA-antigen och en NA-antigen, som kan kombineras fritt med varandra.

Influenza A-virus indelas i följande två grupper utifrån deras förmåga att framkalla sjukdom hos mottagligt fjäderfä:

- a) **Högpatorgena aviära influenzavirus (HPAI)**, som orsakar en ytterst allvarlig sjukdom som kännetecknas av en generaliserad infektion hos det infekterade fjäderfäet och kan medföra en mycket hög dödlighet i flocken (upp till 100 %).
- b) **Lågpatorgena aviära influenzavirus (LPAI)**, som orsakar en mild sjukdom hos fjäderfä, främst i luftvägarna, om den inte förvärras till följd av andra samtidiga infektioner eller faktorer.

Vilda fåglar, särskilt flyttande sjöfåglar, är en mycket betydande reservoar för influensa A-virus. Man har isolerat nästan samtliga möjliga kombinationer av HA- och NA-subtyper från vilda fåglar. I allmänhet förekommer bara LPAI-virus hos vilda fåglar, utom när HPAI har överförts från infekterat fjäderfä.

Primär introduktion av aviära influenzavirus till fjäderfäanläggningar sker sannolikt till följd av direkt eller indirekt kontakt med vilda fåglar.

Det är möjligt att LPAI-virus som kommer från en vild reservoar kan cirkulera hos tamfjäderfä utan att påvisas, eftersom de kliniska tecknen ofta är obetydliga eller saknas helt.

När LPAI-virusstammar av subtyp H5 och H7 har introducerats hos fjäderfä kan de sedan mutera till HPAI-stammar. Hittills är det bara konstaterat att virus av subtyp H5 och H7 kan orsaka HPAI.

Det förefaller visserligen som om en rad mekanismer kan vara ansvariga för att LPAI-virus muterar till HPAI-virus, men man vet inte vilka faktorer som förorsakar mutationen. Ibland tycks mutationen ha skett snabbt på den ursprungliga platsen efter introduktion från vilda fåglar, medan LPAI-viruset vid andra tillfällen har cirkulerat bland fjäderfä i månader innan det har muterat. Det är därför omöjligt att förutsäga om och när en sådan mutation kommer att ske. Det är dock rimligt att anta att ju mer LPAI cirkulerar bland fjäderfä, desto större är risken för att det sker en mutation till HPAI.

Det är svårt att ange inkubationstiden och den varierar troligen beroende på virusstam och värd. Man brukar säga fem till sex dagar, men för enskilda fåglar varierar den troligen från några få timmar till omkring sju dagar.

2. Kliniska tecken hos fåglar som är infekterade med HPAI-virus

De kliniska tecknen varierar avsevärt och påverkas av faktorer såsom det infekterande virusets virulens, fågelart, fåglarnas ålder, kön, förekomst av andra sjukdomar och miljö.

Tidiga tecken kan vara aptitlöshet, minskat vattenintag och relativt låg dödlighet. Sjukdomen kan emellertid också uppträda plötsligt i en flock och många fåglar kan dö, antingen utan förvarning eller med minimala tecken på depression, aptitlöshet, uppburrad fjäderdräkt och feber. Ju längre fåglarna överlever, desto tydligare är i allmänhet de kliniska tecknen. Tidsspannet för utvecklingen av tecken beror på virus, värd och ursprunglig infektionsdos samt uppfödningssystem. Virus sprids långsammare bland värphöns i bur och bland fåglar som går ute än i kycklings-tall.

Höns som är infekterade med HPAI-virus lägger eventuellt först ägg med mjukt skal, men slutar snart att lägga ägg. Insjuknade fåglar sitter eller står ofta i ett semikomatos tillstånd med huvudet mot marken. Kammar och slör är cyanotiska och ödematösa, eventuellt med petekier och ekkymoser i spetsarna. Riklig vattnig diarré förekommer ofta och fåglarna är extremt törstiga. Andningen kan vara ansträngd och tårflöde kan förekomma. Blödningar kan observeras på obefjädrade hudpartier. Dödligheten i flocken ligger på 50–100 %.

Hos slaktkycklingar är tecknen på HPAI ofta mindre tydliga än hos annat fjäderfä och omfattar vanligen allvarlig depression och aptitlöshet. En klart ökad dödlighet kan vara den första abnormitet som observeras. Vidare kan ansikts- och halsödem förekomma samt neurologiska tecken som torticollis och ataxi.

För HPAI hos kalkoner gäller detsamma som för tamfjäderfä, men vissa HPAI-virus tycks vara mer virulenta hos kalkoner, medan andra tycks mindre virulenta.

Hos gäss som är infekterade med HPAI-viruset är tecknen när det gäller depression, aptitlöshet och diarré desamma som hos värphöns, men ofta med svullna bihålor. Neurologiska tecken kan eventuellt observeras på yngre fåglar.

Ankor som är infekterade med HPAI-virus uppvisar inte nödvändigtvis några kliniska tecken, men det finns rapporter om vissa stammar som orsakar liknande tecken som hos gäss, med viss dödlighet.

Vid HPAI- och LPAI-infektioner hos strutsar förekommer det inte nödvändigtvis några kliniska tecken. I samband med HPAI-utbrott, t.ex. i Italien 1999–2000, har pärlhöns och japansk vaktel rapporterats vara mottagliga för infektioner med tecken och dödlighet som liknar sjukdomen hos kycklingar eller kalkoner. Vid vissa försöksstudier har dock vaktlar visat sig vara resistent mot vissa HPAI-stammar. För alla fåglar gäller att förekomsten av antikroppar mot samma H-subtyp, oavsett om den är till följd av vaccination eller naturlig infektion, kan medföra att en infektion med HPAI-virus inte ger upphov till klara kliniska tecken.

3. Postmortala organskador hos fåglar som är infekterade med HPAI-virus

Fåglar som dör per akut kan ha ospecifika makroskopiska förändringar såsom dehydrering och cirkulationssvikt i muskler och inre organ.

Hos fåglar som dör efter ett längre kliniskt förlopp kan petekier och ekkymosblödningar iakttagas i hela kroppen, särskilt i struphuvud, luftstrupe, körtelmage och epikardiellt fett samt på serösa hinnor intill bröstbenet. Omfattande ödem subkutant förekommer, särskilt kring huvud och hasleder. Kroppen kan vara dehydrerad. Gula eller gråa nekrotiska hårdar kan förekomma i mjälte, lever, njurar och lungor. Luftsäcken kan innehålla ett exsudat. Mjälten kan vara förstörd och ibland ses mjälteblödningar.

Aviär influensa kännetecknas histologiskt av vaskulära störningar som leder till ödem, inre blödningar och perivas-kulär ansamling av inflammatoriska celler, särskilt i hjärtmuskeln, mjälte, lungor, hjärna, bukspottsörtel och slör. Nekrotiska hårdar ses i lungor, lever och njurar. Glios, kärlnybildning och neurondegeneration kan förekomma i hjärnan.

4. Differentialdiagnos

I differentialdiagnosen för HPAI måste i synnerhet följande sjukdomar beaktas:

- a) Andra sjukdomar som leder till plötslig hög dödlighet, t.ex.
 - i) Newcastlejuka,
 - ii) infektiös laryngotrakeit,

- iii) ankpest,
 - iv) akut förgiftning.
- b) Andra sjukdomar som orsakar svullna kammar och slör, t.ex.
- i) akut hönskolera och andra septikemiska sjukdomar,
 - ii) bakteriell cellulit i kam och slör

5. Kliniska tecken hos fåglar som är infekterade med LPAI-virus

Hur allvarlig den sjukdom som förorsakas av LPAI-virus är bestäms till stor del av

- a) virusstammen,
- b) värdart och värdens ålder,
- c) värdens immunstatus mot viruset och särskilt förekomsten av andra smittämnen, t.ex.
 - i) *Pasteurella* spp.,
 - ii) Newcastlejukevirus (inklusive vaccinstammar),
 - iii) aviärt pneumovirus, infektiöst bronkitvirus,
 - iv) *E. coli*,
 - v) *Mycoplasma* spp.,
- d) tillstånd med nedsatt immunförsvar,
- e) miljöfaktorer (t.ex. för höga ammoniakhalter, damm, höga eller låga temperaturer).

Å ena sidan kan de kliniska tecknen på sjukdomen vara otydliga eller lindriga och iakttas bara som lätta andnings-svårigheter eller minskad äggproduktion hos värphöns. Å andra sidan kan infektioner med LPAI-virus vara förenade med allvarliga kliniska sjukdomstecken, särskilt hos kalkoner, vanligen med rassel, hosta, ansvällda suborbitalhålör, feber och aptitlöshet tillsammans med hög dödlighet.

LPAI kan förväxlas med, och förvärras av, flera sjukdomar med symtom från andningsorgan eller mag-tarmkanal. Aviär influensa skall misstänkas vid alla sjukdomsutbrott hos fjäderfå som kvarstår trots att förebyggande och terapeutiska åtgärder vidtas för andra sjukdomar.

6. Kliniska tecken hos fåglar i fångenskap

En mängd kliniska tecken kan förekomma och de kan, liksom när det gäller fjäderfå, variera från otydliga till allvarliga sjukdomstecken som leder till hög dödlighet.

I allmänhet sprids infektionen långsammare bland fåglar i fångenskap, eftersom man då håller olika arter med olika grad av mottaglighet och varierande virusutsöndring och ofta med relativt långsam överföring på grund av låg grad av kontakt och relativt låg djurtäthet.

KAPITEL III

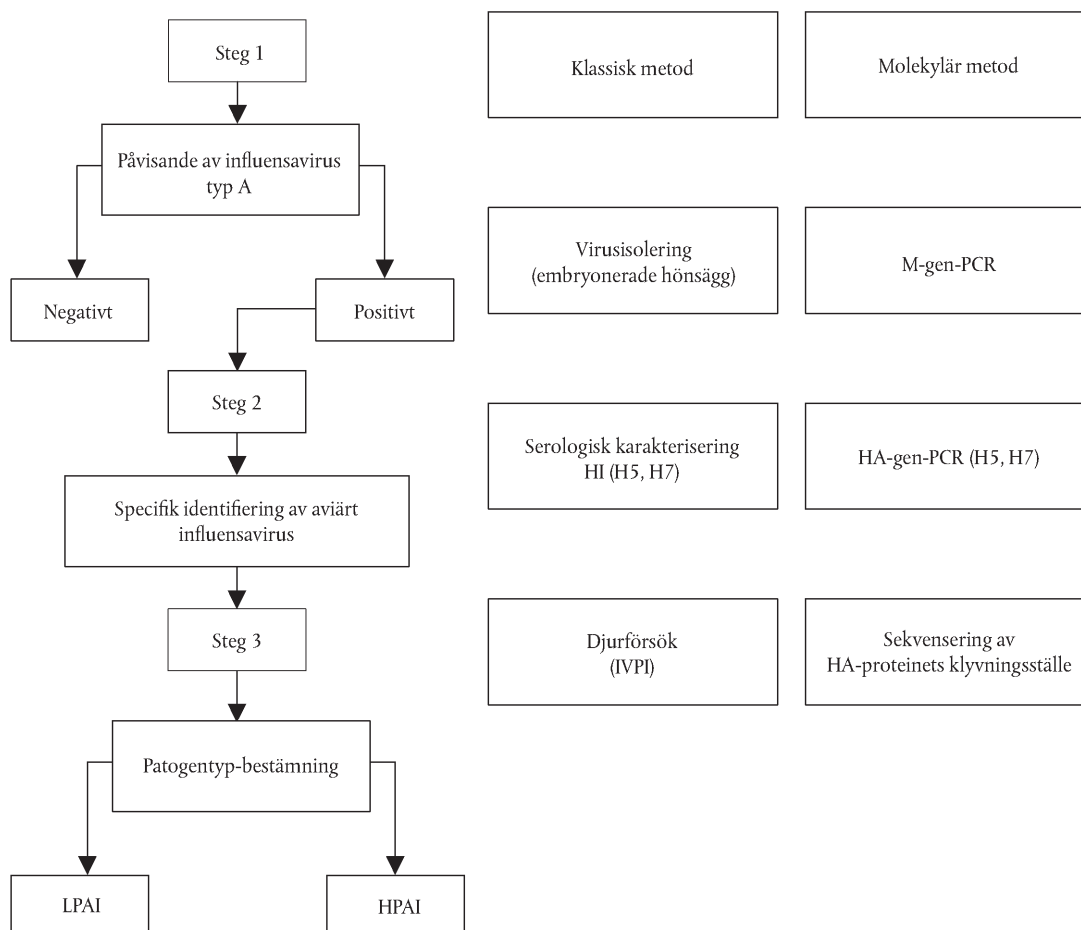
Riktlinjer vid misstanke om aviär influensa på en anläggning

Eftersom de kliniska tecknen kan vara så olika när det gäller både HPAI och LPAI är det inte möjligt att ge några klara riktlinjer vid ett misstänkt sjukdomsutbrott. En plötslig, hög dödlighet bland fjäderfå med eller utan några av de kliniska tecken som beskrivs i kapitel II måste utredas och prover lämnas in för laboratorieundersökning. Om det inte förekommer någon hög dödlighet är det svårare att bekräfta eller utesluta misstanken om förekomst av aviär influensa.

Eftersom det är av största vikt att snabbt diagnostisera HPAI och LPAI som orsakas av virus av subtyp H5 och H7 för att sjukdomen skall kunna bekämpas och utrotas i ett tidigt skede, måste aviär influensa alltid beaktas i differentialdiagnosen av andningsproblem, problem med äggläggning och förhöjd dödlighet bland fjäderfå, och ändamålsenliga prover måste lämnas in för laboratorieundersökning.

Figur

Schematisk översikt av diagnostiseringen för bekräftelse av aviär influensa



KAPITEL IV

*Allmänna förfaranden för insamling och transport av prover*1. **Direktiv 2005/94/EG och diagnostikhandboken**

När det i direktiv 2005/94/EG hänvisas till diagnostikhandboken skall de undersökningar, provtagningar och övervakningsförfaranden som anges i detta kapitel i diagnostikhandboken genomföras.

2. **Förfaranden som skall tillämpas vid misstänkt utbrott av aviär influensa**

Om den officiella veterinären har en klinisk misstanke om ett utbrott av aviär influensa eller om resultaten av ett laborietest för den sjukdomen inte är negativa, skall den behöriga myndigheten se till att en undersökning i enlighet med detta kapitel i diagnostikhandboken genomförs enligt artikel 7 i direktiv 2005/94/EG och slutförs på ett tillfredsställande sätt innan man utesluter förekomsten av sjukdomen.

3. **Tolkning av virologiska tester**

Den behöriga myndigheten får konstatera att förekomsten av det aviära influensaviruset kan uteslutas om ett adekvat antal av de sjuka eller döda fåglarna samt svabbprover från luftstrupe/svalg eller kloak har lämnats in i enlighet med detta kapitel för påvisande av viruset eller dess genom, och dessa har lett till negativt resultat när de testats med hjälp av en av de metoder för påvisande av viruset som avses i kapitel V eller VI eller som godkänts av den behöriga myndigheten i enlighet med punkt 6 b i kapitel I.

4. **Standarduppsättning prover för virologiska eller serologiska laborietester**

När en anläggning som misstänks vara smittad med aviärt influensavirus skall undersökas skall den standarduppsättning prover för virologiska eller serologiska tester som avses i punkterna a och b (nedan kallade "standardprover") tas och lämnas in direkt för virologiska och serologiska tester.

a) Standarduppsättningen prover för virologisk undersökning är

- i) minst fem sjuka eller döda fåglar, i förekommande fall, och/eller
- ii) minst 20 svabbprover från luftstrupe/svalg och 20 svabbprover från kloak.

Kroppar skall tas av fåglar som dött nyligen eller som är allvarligt sjuka eller döende och som har avlivats skonsamt.

Svabbprov måste tas från det antal fåglar som anges i punkt a eller från alla fåglar på den misstänkta anläggningen om antalet fåglar där är färre. Det är i första hand fåglar som uppvisar kliniska sjukdomstecken som skall provtas.

Kloaksvabbar skall vara belagda med faeces (optimalt 1 g). Om det av någon anledning inte är möjligt att ta kloaksvabbar från levande fåglar, kan försiktigt samlade färska faecesprov vara ett alternativ.

Ofta är det enklast att ta trakeal-/svalgsvabbar från näshålan.

Så snart man känner till virusets egenskaper för tillväxt får den behöriga myndigheten bestämma om svabbprov skall tas från antingen luftstrupe/svalg eller kloak i stället för att båda proven tas, detta beroende på om viruset förökar sig bättre i andningsvägar eller gastrointestinalt och med beaktande av de berörda arterna.

b) Standarduppsättningen prover för serologisk undersökning är minst 20 blodprover.

Prover skall tas från det antal fåglar som anges i punkt b eller från alla fåglar på anläggningen om antalet fåglar där är färre. Det är i första hand fåglar som verkar vara sjuka eller som tycks ha tillfrisknat som skall provtas.

Den behöriga myndigheten får bestämma att alla standardprover inte behöver tas utan att man i stället tar en mindre uppsättning standardprover.

5. **Transport av prover**

Särskild aktsamhet måste iakttas vid lagring och transport av proverna till laboriet för undersökning.

Svabbproverna måste kylas omedelbart på is eller med frysklappar och lämnas in till laboriet så snart som möjligt. Proverna får inte frysas om detta inte är absolut nödvändigt. Om det inte kan garanteras att proverna kan transporteras snabbt till laborier inom 24 timmar skall de frysas omedelbart, lagras och sedan transporteras på torris.

Dessutom, och inte som ett alternativ till kylning, skall svabbproverna placeras i ett antibiotika- eller särskilt transportmedium vid 4 °C så att de är helt täckta. Om det inte finns något sådant medium skall svabbproverna läggas tillbaka i sin hylsa och skickas in torra till laboriet för undersökning.

Lagring och transport av prover kan påverkas av en rad faktorer, vilket innebär att den metod som används för transporten skall vara ändamålsenlig.

6. **Antibiotikamedium**

Det antibiotikamedium som avses i punkt 5 skall vara baserat på fosfatbuffrad koksaltlösning med pH 7,2–7,4 (kontrollerat efter tillsatsen av antibiotika).

Proteinbaserade media såsom BHI-buljong eller trisbuffrad tryptosbuljong kan ge ökad stabilitet till viruset, särskilt under transport. De antibiotika som används och deras koncentrationer kan varieras så att de passar lokala förhållanden och tillgänglighet.

Mycket höga mängder antibiotika kan krävas för faecesprover och lämpliga mängder är 10 000 IE/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin, 0,25 mg/ml gentamycin och 5 000 IE/ml nystatin. Dessa mängder kan minskas ner till fem gånger för vävnader och svabbprover från luftstrupe.

För kontroll av *Clamydofila* skall 0,05–0,1 mg/ml oxytetracyklin tillsättas.

7. BHI-infusion-medium

Lösningen skall beredas i vatten och innehålla 15 % w/v BHI-buljongpulver före sterilisering (genom autoklavering vid 121 °C/15 minuter).

Efter steriliseringen skall antibiotika tillsättas enligt följande: 10 000 IE/ml penicillin G, 20 µg amfotericin B och 1 000 µg/ml gentamycin. Media får lagras vid 4 °C under högst två månader.

8. Förfaranden att tillämpa, med avseende på de relevanta bestämmelserna i direktiv 2005/94/EG

8.A. Misstänkta utbrott

8.1. Artikel 7.1 – Åtgärder som skall vidtas på anläggningar där utbrott misstänks

När en officiell veterinär inspekterar en anläggning där ett utbrott misstänks skall följande åtgärder vidtas:

- Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik, om dessa uppgifter föreligger. I den officiella veterinärens inspektionsrapport skall det finnas uppgifter om daglig dödlighet och daglig äggproduktion samt om foder- och/eller vattenintag under den period som börjar en vecka före den dag då de första kliniska tecknen på aviär influensa uppträdde och slutar den dag då den officiella veterinären inspekterar anläggningen.
- Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap, särskilt fåglar som verkar vara sjuka.
- Om den behöriga myndigheten på grundval av den kliniska besiktningen enligt punkterna a och b konstaterar att ett misstänkt utbrott inte kan uteslutas, skall standardprover tas från varje produktionsenhet.
- Även om standardproverna ger negativt resultat skall en klinisk besiktning av fjäderfä i varje produktionsenhet genomföras innan den officiella övervakningen kan upphöra, samtidigt som lokala faktorer beaktas.

8.2. Artikel 10.3 – Kompletterande åtgärder till följd av den epidemiologiska undersökningen

I varje produktionsenhet skall standardprover tas på fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap som avlivas.

8.B. Högpatoget aviär influensa (HPAI)

8.3. Artikel 11.4 – Åtgärder som skall vidtas då fjäderfä har kläckts från ägg som samlats upp på anläggningar där utbrott har bekräftats

När en officiell veterinär inspekterar en anläggning där det finns fjäderfä som redan har kläckts från ägg som samlats upp under inkubationstiden på en anläggning där HPAI har bekräftats, skall följande åtgärder vidtas:

- Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik. I den officiella veterinärens inspektionsrapport om anläggningen skall det finnas uppgifter om daglig dödlighet och uppgifter om dagligt foder- och/eller vattenintag, om sådana uppgifter föreligger, under den period som börjar en vecka före den dag då de första kliniska tecknen på HPAI uppträdde och slutar den dag då den officiella veterinären inspekterar anläggningen.

- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet och en klinisk undersökning av fjäderfä, särskilt fåglar som verkar sjuka eller som inte växer som väntat.
- c) Standardprover skall tas på fjäderfä som är 2–3 veckor gamla.
- d) Den officiella övervakningen av anläggningen kan upphöra när kliniska undersökningar har genomförts av fjäderfä som är mer än 21 dagar gamla och standardproverna har gett negativt resultat.

8.4. Artikel 13.2 b – Undantag rörande vissa anläggningar

När en officiell veterinär inspekterar en anläggning som har medgetts undantag från artikel 11.2 första stycket i direktiv 2005/94/EG skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik, om dessa uppgifter föreligger.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap, särskilt fåglar som verkar vara sjuka.
- c) I stället för standardproverna skall följande prover för laboratorieanalys tas 21 dagar efter det senaste positiva fyndet av HPAI från varje produktionsenhet och med 21 dagars intervall:
 - i) Prover från allt fjäderfä eller alla andra fåglar i fångenskap som är döda vid tidpunkten för provtagningen.
 - ii) Om det är praktiskt möjligt, svabbprover från lufrör/svalg och kloak från minst 60 fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap eller från allt fjäderfä eller alla andra fåglar i fångenskap, om det finns färre än 60 fåglar på anläggningen, eller om fåglarna är små, exotiska och inte vana vid att bli hanterade eller om hanteringen av dem skulle vara farlig för människor skall färsk faeces samlas in.

Den behöriga myndigheten får dock efter en riskbedömning medge undantag från den provstorlek som avses i i och ii.

- d) Den provtagning som avses i punkt c och laboratorieanalysen av dessa prover skall fortsätta fram till dess att två på varandra följande negativa laboratorieresultat erhålls med minst 21 dagars intervall.

8.5. Artikel 15.1 och 15.3 – Åtgärder som skall vidtas på kontakthanläggningar

När en officiell veterinär inspekterar en kontakthanläggning skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik, om dessa uppgifter föreligger. I den officiella veterinärens inspektionsrapport om anläggningen skall det finnas uppgifter om daglig dödlighet och uppgifter om dagligt foder- och/eller vattenintag, om sådana uppgifter föreligger, under den period som börjar en vecka före kontakten med den flock som misstänks vara infekterad med aviär influensa och slutar den dag då den officiella veterinären inspekterar anläggningen.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap, särskilt fåglar som verkar vara sjuka.
- c) Om det föreligger kliniska tecken hos fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap eller indikationer på ökad daglig dödlighet (> 3 gånger flockens normala dödlighet) eller minskad daglig äggproduktion (> 5 %) eller minskat dagligt foder- och/eller vattenintag (> 5 %), skall standardprover omedelbart tas från varje produktionsenhet.
- d) Om det inte föreligger några sådana tecken som avses i punkterna b och c, skall standardprover tas 21 dagar efter den senaste misstänkta kontakten med en infekterad anläggning eller när fjäderfäet eller de andra fåglarna i fångenskap avlivas.

8.6. Artikel 18 b och c – Inventering, inspektioner av den officiella veterinären och övervakning på anläggningar i skyddsområdet

När en officiell veterinär inspekterar en kommersiell anläggning skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik. Om det finns indikationer på ökad daglig dödlighet (> 3 gånger flockens normala dödlighet) eller minskad daglig äggproduktion (> 5 %) eller minskat dagligt foder- och/eller vattenintag (> 5 %), skall standardprover tas från varje produktionsenhet.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfä och andra fåglar i fångenskap, särskilt fåglar som verkar vara sjuka.

- c) Om det rör sig om arter av fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap som inte förväntas uppvisa klara kliniska sjukdomstecken, eller om det rör sig om vaccinerade fåglar, får den behöriga myndigheten efter en riskbedömning besluta att standardprover skall tas från varje produktionsenhet.
- d) Den behöriga myndigheten skall efter en riskbedömning besluta om kompletterande officiell övervakning med målinriktade kliniska besiktningar och provtagning för laboratorietester från anläggningar, compartment eller produktionstyper.

8.7. *Artikel 19 f – Åtgärder som skall vidtas på anläggningar i skyddsområden*

När en officiell veterinär inspekterar en anläggning där det har rapporterats om ökad sjuklighet, dödlighet eller förändringar i produktionen skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik. Om det finns indikationer på ökad daglig dödlighet (> 3 gånger flockens normala dödlighet) eller minskad daglig äggproduktion (> 5 %) eller minskat dagligt foder- och/eller vattenintag (> 5 %), skall standardprover tas från varje produktionsenhet.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap, särskilt fåglar som verkar vara sjuka.

8.8. *Artikel 23 b – Undantag för direkttransport av fjäderfä för omedelbar slakt*

När en officiell veterinär inspekterar en anläggning som har medgetts undantag från artikel 22 i direktiv 2005/94/EG skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfä, särskilt fåglar som verkar vara sjuka, senast 24 timmar före avsändningen av fjäderfäet.
- c) Efter en riskbedömning som görs av den behöriga myndigheten, och i stället för standardproverna, skall det från varje produktionsenhet tas minst 60 trakeal-/svalgsvabbar och/eller 60 kloaksvabbar från fjäderfä som skall sändas till slakt, senast 48 timmar före avsändningen av fjäderfäet.

8.9. *Artikel 25 b – Undantag för direkttransport av värfärdiga unghöns*

När en officiell veterinär inspekterar en anläggning som har medgetts undantag från artikel 22, före direkttransporten av värfärdiga unghöns, skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfäet, särskilt fåglar som verkar vara sjuka, senast 24 timmar före avsändningen av fjäderfäet.
- c) Efter en riskbedömning som görs av den behöriga myndigheten, och i stället för standardproverna, skall det från varje produktionsenhet tas minst 60 trakeal-/svalgsvabbar och/eller 60 kloaksvabbar från fjäderfä som skall transporteras, senast 48 timmar före avsändningen av fjäderfäet.

8.10. *Artikel 26.1 a – Undantag för direkttransport av kläck- och konsumtionsägg*

När en officiell veterinär inspekterar en anläggning med föräldraflock som har medgetts undantag från artikel 22, före direkttransporten av kläckäggen, skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik.
- b) Klinisk besiktning av varje produktionsenhet var femtonde dag.
- c) Standardprover skall tas från varje produktionsenhet.

8.11. *Artikel 29.1 – Åtgärdernas giltighetstid*

De åtgärder som gäller i skyddsområdet enligt kapitel IV avsnitt 3 i direktiv 2005/94/EG får upphävas tidigast 21 dagar efter det att den preliminära rengöringen och desinfektionen genomförts på de smittade anläggningarna och på följande villkor:

- a) Alla kommersiella anläggningar som ligger i skyddsområdet skall ha inspekterats av en officiell veterinär och alla kontroller och kliniska besiktningar och laborietester enligt punkt 8.6 a–c och punkt 8.7 skall ha gett negativt resultat.
- b) Alla identifierade icke-kommersiella anläggningar i skyddsområdet skall ha inspekterats av en officiell veterinär, och varken den kliniska undersökningen eller resultaten av laborietest får ha lett till misstanke om infektion med aviär influensa.
- c) Eventuell kompletterande övervakning som har genomförts enligt punkt 8.6 d skall ha gett negativa resultat.

8.12. *Artikel 30 g – Åtgärder som skall vidtas i övervakningsområden*

När en officiell veterinär inspekterar en anläggning där det har rapporterats om ökad sjuklighet, dödlighet eller förändringar i produktionen skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap, särskilt fåglar som verkar vara sjuka.
- c) Standardprover skall tas från varje produktionsenhet.

8.13. *Artikel 35 – Undersökning av misstänkt förekomst av högpatogen aviär influensa på slakterier och i transportmedel*

När en officiell veterinär inspekterar en ursprungsanläggning för fåglar som är på slakterier eller i transportmedel skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik, om dessa uppgifter föreligger.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap, med beaktande av samrådet med den officiella veterinären på slakteriet som skall tillhandahålla uppgifter från eventuella tidigare inspektioner och resultaten av undersökningar före och efter slakt.
- c) Om den behöriga myndigheten på grundval av veterinärundersökningen enligt punkterna a och b konstaterar att förekomsten av HPAI inte kan uteslutas, skall standardprover tas från varje produktionsenhet.
- d) Utöver standardproverna skall prover från minst fem sjuka, döda eller på slakteriet slaktade fåglar med patologiska fynd skickas in för laborietester.

8.14. *Artikel 36.1 – Åtgärder som skall vidtas på slakterier*

När de undersökningar som avses i punkt 8.13 är avslutade kan den officiella övervakningen upphöra, förutsatt att resultaten från laborietesterna är negativa och att det inte finns någon klinisk misstanke om förekomst av HPAI på ursprungsanläggningen och på slakteriet.

8.15. *Artikel 37.1 och 37.2 – Åtgärder som skall vidtas på gränskontrollstationer eller i transportmedel*

8.15.1 När en officiell veterinär undersöker fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap som hålls isolerade och som har flyttats från en gränskontrollstation eller ett transportmedel på grund av misstanke om eller bekräftad förekomst av HPAI, skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av relevanta dokument och uppgifter, om sådana dokument eller uppgifter föreligger.
- b) Klinisk undersökning av fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap som hålls isolerade och klinisk besiktning av allt annat fjäderfä eller alla andra fåglar i fångenskap, särskilt fåglar som verkar vara sjuka.
- c) Standardprover skall tas från fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap från olika transportboxar eller transportburar.

8.15.2. När en officiell veterinär inspekterar en identifierad ursprungsanläggning för fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap som slaktas skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik, om dessa uppgifter föreligger.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap, med beaktande av samrådet med den officiella veterinären på slakteriet som skall tillhandahålla uppgifter från eventuella tidigare inspektioner och resultaten av undersökningar före och efter slakt.
- c) Om den behöriga myndigheten på grundval av veterinärundersökningen enligt punkterna a och b konstaterar att förekomsten av HPAI inte kan uteslutas, skall standardprover tas från varje produktionsenhet.
- d) Utöver de standardprover som avses i punkt c skall prover från minst fem sjuka, döda eller på slakteriet slaktade fåglar med patologiska fynd skickas in för laboratorietester.
- e) Den officiella övervakningen kan upphävas om resultaten från de laboratorietester som avses i punkterna c och d är negativa och om det inte finns någon klinisk misstanke om förekomst av HPAI på ursprungsanläggningen och på slakteriet.

8.C. Lågpatogen aviär influensa (LPAI)

8.16. Artikel 39.6 b och h – Åtgärder som skall vidtas på anläggningar där utbrott av LPAI bekräftats

När en officiell veterinär inspekterar en anläggning, innan fjäderfäet transporteras till ett slakteri, eller en anläggning där det finns fjäderfä som redan har kläckts från ägg som samlats upp under inkubationstiden, skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfäet eller de andra fåglarna i fångenskap.
- c) Standardprover skall tas från fåglar i varje produktionsenhet som skall sändas till slakt, senast 48 timmar före avsändningen av fjäderfäet.
- d) Standardprover skall tas från varje produktionsenhet från fjäderfä som redan har kläckts från ägg som samlats upp under inkubationstiden.

8.17. Artikel 40.2 b – Undantag för vissa anläggningar från åtgärder som skall vidtas om utbrott bekräftats

När en officiell veterinär inspekterar en anläggning som har medgetts undantag från artikel 39.2 och artikel 39.5 b i direktiv 2005/94/EG skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik, om dessa uppgifter föreligger.
- b) Klinisk besiktning med jämna mellanrum i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap, särskilt fåglar som verkar vara sjuka.
- c) I stället för standardproverna skall följande prover för laboratorieanalys tas 21 dagar efter det senaste positiva fyndet av LPAI från varje produktionsenhet och med 21 dagars intervall:
 - i) Prover från alla fjäderfän eller andra fåglar i fångenskap som är döda vid tidpunkten för provtagningen.
 - ii) Svabbprover från luftrör/svalg och kloak från 60 fjäderfä och andra fåglar i fångenskap eller från allt fjäderfä eller alla andra fåglar i fångenskap, om det finns färre än 60 fåglar på anläggningen, eller om fjäderfäet eller de andra fåglarna i fångenskap är små, exotiska och inte vana vid att bli hanterade eller om hanteringen av dem skulle vara farlig för människor skall färsk faeces samlas in.

Den behöriga myndigheten får dock efter en riskbedömning medge undantag från den provstorlek som avses i i och ii.

- d) Den provtagning som avses i punkt c och laboratorieanalyserna av dessa prover skall fortsätta fram till dess att två på varandra följande negativa laboratorieresultat erhålls med minst 21 dagars intervall.

8.18. Artikel 42.1 och 42.3 – Åtgärder som skall vidtas på kontakthanläggningar

När en officiell veterinär inspekterar en kontakthanläggning skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av kontakthanläggningens produktions- och hälsostatistik, om dessa uppgifter föreligger.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap, särskilt fåglar som verkar vara sjuka.
- c) Standardprover skall tas från varje produktionsenhet eller när fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap avlivas.

8.19. Artikel 44.1 b – Åtgärder som skall vidtas i restriktionsområden

När en officiell veterinär inspekterar en kommersiell anläggning i ett restriktionsområde skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap, särskilt fåglar som verkar vara sjuka.
- c) Standardprover skall tas från varje produktionsenhet.
- d) Den behöriga myndigheten skall efter en riskbedömning besluta om kompletterande officiell övervakning med målinriktade kliniska besiktningar och provtagning för laborietest från anläggningar, compartment eller produktionstyper.

8.20. Artikel 45 a och b – Åtgärdernas varaktighet

De åtgärder som gäller i restriktionsområdet enligt kapitel V avsnitt 3 i direktiv 2005/94/EG får upphävas tidigast 21 dagar efter det att den preliminära rengöringen och desinfektionen genomförts på de smittade anläggningarna efter utslaktning eller tidigast 42 dagar efter den dag då LPAI bekräftats och på följande villkor:

- a) Alla kommersiella anläggningar i restriktionsområdet skall ha inspekterats av en officiell veterinär och alla laborietester för de prover som avses i punkt 8.13 c och d skall ha genomförts och resultaten föreligga.
- b) Resultaten av eventuella kompletterande kliniska besiktningar och laborietester – som kan omfatta icke-kommersiella anläggningar i syfte att bestämma risken för att LPAI sprids – skall föreligga.
- c) Den behöriga myndigheten skall, efter en riskbedömning där den epidemiologiska situationen och resultaten av de laborietester som avses i punkterna a och b har beaktats, ha konstaterat att risken för att LPAI sprids är försumbar. Bedömningen kan leda till slutsatsen att restriktionerna kan upphävas om det föreligger positiva serologiska resultat och negativa virologiska resultat.

8.D. Åtgärder för att förhindra spridning av influensavirus från fåglar till andra arter

8.21. Artikel 47.1 och 47.6 – Laborietester och andra åtgärder rörande svin och andra arter

När en officiell veterinär efter bekräftad förekomst av aviär influensa inspekterar en anläggning där svin hålls skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik, om dessa uppgifter föreligger.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av svinen, särskilt dem som verkar vara sjuka.
- c) Svabbprover från näshåla/svalg från minst 60 svin från varje produktionsenhet, eller från alla svin om det finns färre än 60 svin i produktionsenheten, skall tas före eller under den dag då det smittade fjäderfäet eller de smittade andra fåglarna i fångenskap utslaktas. Minst 60 blodprover skall tas från svinen 2–4 veckor från den dag då utslaktningen sker. Prover skall tas på ett sådant sätt att minst ett prov tas från varje grupp av svin som kommer i direkt kontakt med varandra.

- d) Svin får flyttas till andra anläggningar om minst 60 svabbprover från näshåla/svalg och 60 blodprover från svin från varje produktionsenhet som tagits 14 dagar efter det positiva fyndet av aviär influensa har gett negativa resultat.

Svin får flyttas till ett slakteri om minst 60 svabbprover från näshåla/svalg från varje produktionsenhet som tagits 14 dagar efter det positiva fyndet av aviär influensa har gett negativa resultat.

Om laboratorieresultaten är osäkra eller positiva skall ytterligare undersökningar genomföras för att utesluta smitta med eller överföring av aviär influensa mellan svin.

- e) Om den officiella veterinären misstänker att andra tama däggdjur på anläggningarna, särskilt djur som är mottagliga för infektion med aviära influensavirus av subtyp H5 och H7, kan ha kommit i kontakt med det smittade fjäderfäet eller de smittade andra fåglarna i fångenskap skall prover tas för laboratorietester.

8.E. Återinsättning

8.22. Artikel 49.3 b och c – Återinsättning på anläggningar

När en officiell veterinär inspekterar en kommersiell anläggning där återinsättning har skett skall följande åtgärder vidtas:

- a) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik.
- b) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfäet eller de andra fåglarna i fångenskap, särskilt fåglar som verkar vara sjuka.
- c) I stället för standardprover skall följande prover tas från varje produktionsenhet:
- i) Minst 20 blodprover så snart fjäderfäet har placerats på anläggningen, utom om det rör sig om dagsgamla kycklingar. Om det är lämpligt kan denna provtagning utföras på fjäderfäets ursprungsanläggning innan de flyttas till den anläggning där de skall återinsättas.
 - ii) Prover från dött fjäderfä eller svabbprover som tagits från minst 10 döda fåglar per vecka under de första 21 dagarna efter återinsättningen.
- d) Om anläggningen har varit smittad med HPAI tidigare skall även 20 trakeal-/svalgsvabbar och 20 kloaksvabbar tas från sjöfågel (änder/gäss) från varje produktionsenhet, om det är relevant, under den sista veckan av de första 21 dagarna efter återinsättningen.
- e) Om anläggningen har varit smittad med LPAI tidigare skall 20 trakeal-/svalgsvabbar, 20 kloaksvabbar och 20 blodprover tas från varje produktionsenhet.

8.F. Vaccinering

8.23. Artikel 56.2 i – Förebyggande vaccinering av fjäderfä och andra fåglar i fångenskap

Laboratorietester enligt kapitel IX i direktiv 2005/94/EG skall genomföras på fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap som är vaccinerade med tillämpning av godkända DIVA-strategier, om fältviruset är känt.

Om indikatordjur används skall sådana finnas i varje vaccinerad flock, besiktigas kliniskt och testas med hemagglutinationsinhibitionstestet (HI). För detta syfte skall det minst var 60:e dag tas 20 blodprover från de ovaccinerade indikatordjuren på varje vaccinerad anläggning.

8.24. Bilaga IX – Krav för förflyttning av fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap och fjäderfäprodukter vid nödvaccinering

Strikta övervakningsåtgärder skall gälla för förflyttning av levande fjäderfä och andra fåglar i fångenskap och deras ägg, för att minimera risken för ytterligare spridning av aviär influensa.

När en plan för nödvaccinering inleds skall därför samma övervakningsåtgärder gälla för förflyttning av levande fjäderfä och andra fåglar i fångenskap och deras ägg för att minimera risken för ytterligare spridning av aviär influensa inom och ut ur vaccinationsområdet.

- a) Innan kläckägg och konsumtionsägg för första gången förflyttas inom och ut ur vaccinationsområdet och därefter minst var 30:e dag skall den officiella veterinären genomföra
 - i) en klinisk besiktning av ovaccinerade föräldradjur eller värphöns i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfäet, särskilt fåglar som verkar vara sjuka; standardprover skall tas från fjäderfä från varje produktionsenhet; eller
 - ii) en klinisk besiktning av vaccinerade föräldradjur eller värphöns i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av indikatordjuren i dessa flockar; standardprover skall tas från dessa indikatordjur.
- b) När levande fjäderfä eller andra fåglar i fångenskap som vaccinerats förflyttas till andra anläggningar eller när levande vaccinerat fjäderfä förflyttas inom och ut ur vaccinationsområdet skall den officiella veterinären vidta följande åtgärder:
 - i) Kontroll av anläggningens produktions- och hälsostatistik.
 - ii) Klinisk besiktning i varje produktionsenhet med bl.a. en utvärdering av dess kliniska bakgrund och kliniska undersökningar av fjäderfäet eller de andra fåglarna i fångenskap senast 72 timmar före avsändningen, med särskilt beaktande av indikatordjuren.
 - iii) Om resultaten av kontroll, klinisk besiktning och kliniska undersökningar enligt i och ii inte är tillfredsställande skall standardprover tas från indikatordjuren; om resultaten emellertid är tillfredsställande skall följande prover tas från
 - fjäderfäet eller de andra fåglarna i fångenskap: minst 20 trakeal-/svalgsvabbar, 20 kloaksvabbar och 20 blodprover för tillämpning av en ändamålsenlig DIVA-strategi senast 72 timmar före avsändningen, och från
 - indikatordjur: 20 trakeal-/svalgsvabbar, 20 kloaksvabbar och 20 blodprover för serologisk undersökning med HI-testet före avsändningen.

KAPITEL V

Diagnostiska virologiska tester och utvärdering av resultat

1. Innan molekylära tester utvecklades ansågs virusisolering genom inokulering av embryonerade hönsägg vara det avgjort mest känsliga diagnostestet för aviär influensa och av avgörande betydelse för efterföljande identifiering och karakterisering av det infekterande viruset. Detta kapitel innehåller en beskrivning av de viktigaste stegen.
2. **Beredning av prover**

Svabbprover som lämnas "torra" skall placeras i så mycket antibiotikamedium att de är helt täckta. Fem prover kan slås samman till ett, förutsatt att de kommer från samma art, är tagna vid samma tidpunkt och tillhör samma epidemiologiska enhet.

Djurkroppar som skickas in till laboratoriet skall genomgå postmortal undersökning och prover skall tas från följande organ: faeces eller tarminnehåll, hjärnvävnad, luftstrupe, lungor, lever, mjälte och andra organ som visar tydliga förändringar. Dessa organ och vävnader kan slås samman, men det är viktigt att fekalt material behandlas för sig.

Prover på faeces och organ skall homogeniseras var för sig (i en tillsluten blandare eller med hjälp av mortel och stöt och steril sand) i antibiotikamedium och spädas till en suspension av 10–20 % vikt/volym i mediet.

De täckta svabbproverna och suspensionerna skall stå i ca två timmar i rumstemperatur (eller längre tid vid 4 °C) och sedan klargöras genom centrifugering (t.ex. 800–1 000 x g i 10 minuter).

3. Virusisolering i embryonerade hönsägg

Supernatanten skall efter centrifugering inokuleras i mängder om 0,1–0,2 ml in i allantoiskaviteten i vart och ett av minst fyra embryonerade hönsägg som har varit inkuberade i nio till elva dagar. Dessa ägg skall helst komma från en särskild patogenfri flock, men om detta inte är möjligt kan ägg användas från en flock som har konstaterats vara fri från antikroppar mot aviär influensa.

De inokulerade äggen skall förvaras vid 37 °C och genomlysas dagligen. Ägg med döda eller döende embryon och alla ägg som är kvar sex dagar efter inokulationen skall efter hand kylas till 4 °C och allantois-amnionvätskorna testas på förekomst av hemagglutinerande aktivitet. Om ingen hemagglutination kan påvisas skall detta förfarande upprepas med utspädd allantois-amnionvätska som inokulationsmedel. När hemagglutination påvisas skall förekomst av bakterier uteslutas genom odling. Finns det bakterier i vätskan skall denna passera ett 450 nm membranfilter, ytterligare antibiotika tillsätts och därefter inokuleras i embryonerade ägg enligt ovan.

För att påskynda diagnostiseringen har vissa laboratorier förkortat inkuberingstiden till två 3-dagars- eller 2- och 4-dagarsperioder och rapporterat om resultat som kan jämföras med två 6-dagarsperioder, men detta har ännu inte utvärderats fullt ut.

Positiv vätska måste testas för att fastställa att den är fri från bakterier. Finns det bakterier i vätskan skall denna passera ett 450 nm membranfilter eller centrifugeras för att avlägsna bakterierna och en ny körning på ägg sker efter tillsats av ytterligare antibiotika.

4. Differentialdiagnos

a) Preliminär differentiering

Eftersom det är viktigt att bekämpningsåtgärder som syftar till att begränsa spridningen av det aviära influensaviruset sätts in så snart som möjligt, skall varje nationellt referenslaboratorium som har isolerat hemagglutinerande virus kunna identifiera det om det är ett influensa A-virus av subtyp H5 eller H7 eller Newcastlesjukevirus. Hemagglutinationsvätskorna skall användas i hemagglutinationsinhibitionstest i enlighet med kapitel IX. Positiv inhibition, dvs. en titer inom 2-3 log₂ av ett positivt kontrollprov, med polyklonala antiserum som är specifika för subtyp H5 eller H7 av influensavirus typ A kan användas som en preliminär identifiering så att bekämpningsåtgärder kan sättas in som gäller tills vidare.

b) Bekräftande identifiering

Eftersom det finns 16 subtyper av hemagglutinin och nio neuraminidassubtyper av influensavirus och då variationer förekommer inom vart och ett av dessa, är det varken praktiskt möjligt eller lönsamt att varje nationellt referenslaboratorium håller antiserum som medger full subtypbestämning av influensaisolat. Varje nationellt referenslaboratorium skall dock minst kunna

- i) bekräfta att isolatet är ett influensa A-virus med hjälp av ett immunodubbelldiffusionstest för att påvisa grupptigener,
- ii) bestämma om isolatet är av subtyperna H5/H7 eller inte; positiv identifiering kräver insats av bekämpningsåtgärderna för LPAI av subtyp H5 och H7,
- iii) omedelbart skicka in alla HPAI-isolat och H5- och H7-isolat till gemenskapens referenslaboratorium för bekräftelse och fullständig karakterisering, om inte undantag medges enligt punkt d.

Dessutom är det önskvärt att laboratorier med lämplig utrustning

- iv) utför ett intravenöst patogenitetsindextest på sex veckor gamla kycklingar enligt beskrivningen i kapitel VII. Intravenösa patogenitetsindex över 1,2 anger att det finns virus som kräver full insats av bekämpningsåtgärder för HPAI.

De nationella referenslaboratorierna skall även överväga att etablera expertis och utrustning så att de för alla LPAI H5- eller H7-virus kan göra en bestämning av hemagglutininens nukleotidsekvens för att avgöra huruvida det finns eller saknas multipla basiska aminosyror på klyvningsstället för hemagglutininets prekursorprotein. Gemenskapens referenslaboratorium kommer att högprioritera en bestämning av patogeniteten, som en del av de åligganden som avses i punkt 2 b i bilaga VII till direktiv 2005/94/EG, men en sådan viruskarakterisering på nationell nivå minskar avsevärt den tid som åtgår för diagnostisering och, om proven är positiva, för fullständig insats av bekämpningsåtgärder för HPAI.

c) Ytterligare typning och bestämning av isolat

Gemenskapens referenslaboratorium skall från de nationella referenslaboratorierna erhålla alla hemagglutinerande virus för vidare antigen- och genetikundersökningar för att möjliggöra en bättre förståelse av sjukdomens eller sjukdomarnas epizootologi inom gemenskapen i enlighet med gemenskapens referenslaboratoriums uppgifter och åligganden enligt bilaga VII till direktiv 2005/94/EG.

Utöver dessa uppgifter och åligganden skall gemenskapens referenslaboratorium utföra fullständig antigentypning av alla mottagna influensavirus. För H5- och H7-virus med ett intravenöst patogenitetsindex på högst 1,2 skall även en nukleotidsekvensering av hemagglutiningenen omedelbart utföras för att bestämma huruvida det finns eller saknas multipla basiska aminosyror på klyvningsstället för hemagglutininets prekursorprotein, och det nationella referenslaboratoriet och den behöriga myndigheten i ursprungslandet skall informeras så snart resultaten är tillgängliga så att bekämpningsåtgärder för HPAI kan genomföras fullt ut.

d) Eftersom den epidemiologiska situationen när det gäller HPAI/LPAI växlar kan undantag, i samförstånd med kommissionen och gemenskapens referenslaboratorium, medges för laboratorier som har full kapacitet till snabb viruskaraktisering att skicka in en mindre del av dessa virus efter det att data undersökts och gemenskapens referenslaboratorium har gjort ett relevant urval. Ett sådant undantag får bara medges om data snabbt kan tas fram av det nationella referenslaboratoriet och utväxlas med gemenskapens referenslaboratorium.

KAPITEL VI

Molekylära test och utvärdering av resultat

Med den nuvarande definitionen av HPAI kan virulensfaktorer på molekylär nivå identifieras och molekylärteknik användas för diagnostisering av aviär influensa. Denna teknik att påvisa och karakterisera aviärt influensavirus direkt från kliniska prover från infekterade fåglar har utvecklats under senare tid. Används konventionell RT-PCR-teknik på kliniska prover kan man, med korrekt definierade primrar, snabbt påvisa virus och bestämma subtyp (åtminstone H5 och H7) samt få fram en PCR-amplikon som kan användas för nukleotidsekvensering. Detta har visat sig ha stor betydelse i och med att man snabbt kan kartlägga efterföljande utbrott när den först infekterade platsen har påvisats och viruset karakteriserats. Realtids-RT-PCR, med primrar och fluoroscerande probe, som utförs i ett steg (rRT-PCR) möjliggör en ännu snabbare och känsligare diagnostisering, med påvisande av aviära influensavirus och bestämning av subtyp H5 eller H7 i kliniska prover.

Ett stort problem med RT-PCR- och rRT-PCR-system är att olika laboratorier har utvecklat olika system, som – även om det är fullt legitimt – inte har validerats eller testats med ett stort antal prover i olika laboratorier. Gemenskapens referenslaboratorium och vissa nationella referenslaboratorier har som ett led i ett EU-finansierat projekt (EU AVIFLU) arbetat för att ta fram ratificerade protokoll för konventionell RT-PCR och rRT-PCR som kan övertas av andra nationella referenslaboratorier. Om testparametrar, som t.ex. temperaturcyklning och temperaturförändringarnas hastighet varieras i förhållande till rekommendationerna i protokollen, skall det innan de används visas att de fyller sitt syfte i enlighet med punkt 6 i kapitel I i denna diagnostikhandbok.

Standardprotokollen för dessa molekylära tester och utvärderingen av dessa från gemenskapens referenslaboratorium finns på följande webbplats:

<http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm>

KAPITEL VII

Patogenitetstest in vivo och utvärdering av resultat

Virulensen för kycklingar när det gäller influensa A-virus som isolerats från fåglar skall värderas med hjälp av det intravenösa patogenitetsindextestet (IVPI), som skall genomföras enligt följande:

- a) Färsk infekterad allantoisvätska med en HA-titer $>1/16$ ($> 2^4$ eller $> \log_2 4$, när den uttrycks som det reciproka värdet) från lägsta möjliga nivå, och helst från den ursprungliga isoleringen utan urval, späds 1:10 i steril isotonisk saltlösning.
- b) 0,1 ml utspädd virus sprutas in intravenöst i 10 stycken sex veckor gamla SPF- eller SAN-kycklingar.

- c) Fåglarna undersöks var 24:e timme i 10 dagar. Vid varje observation antecknas för varje fågel 0 om den är normal, 1 om den är sjuk, 2 om den är svårt sjuk eller 3 om den är död. Bedömningen av sjuka och mycket sjuka fåglar är en subjektiv klinisk bedömning.

Normalt visar "sjuka" fåglar inte upp något av följande tecken och "svårt sjuka" fåglar fler än ett av följande tecken: andningssvårigheter, depression, diarré, cyanos på synlig hud eller slör, ödem i huvudet, nervösa symtom. Döda fåglar skall antecknas som 3 vid var och en av de dagliga observationerna efter det att de dött.

Av djurskyddsskäl skall fåglar som är för sjuka för att äta eller dricka avlivas skonsamt och antecknas som döda vid nästa observation, eftersom de kommer att dö inom 24 timmar om de inte avlivas. Detta tillvägagångssätt kan godtas av ackrediteringsmyndigheter.

- d) IVPI är medelresultatet per fågel och observation under tiodagarsperioden. Ett index på 3,00 betyder att alla fåglar har dött inom 24 timmar, och ett index på 0,00 betyder att inte någon fågel har visat upp några kliniska tecken under observationstiden på tio dagar.

I följande exempel visas en enkel metod för att anteckna resultat och beräkna index:

Kliniska tecken	Dag efter inokulation										Sammanlagt resultat
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Normal	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	$12 \times 0 = 0$
Sjuk	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	$6 \times 1 = 6$
Svårt sjuk	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	$6 \times 2 = 12$
Död	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	$76 \times 3 = 228$
											Totalt = 246

Anmärkingar:

10 fåglar observeras under 10 dagar = 100 observationer

Index = medelresultat per fågel och observation = $246/100 = 2,46$

Influenza A-virus, oavsett subtyp, som ger ett värde som är större än 1,2 vid ett IVPI-test skall anses vara ett HPAI-virus.

KAPITEL VIII

Serologiska test och utvärdering av resultat

Den vanligaste metoden att påvisa förekomsten av influensa A-virus är att påvisa innehållet av nukleoprotein- eller matrix-antigener som förekommer hos alla influensa A-virus.

Detta kan ske i immunodubbelldiffusionstester som antingen omfattar koncentrerade viruspreparat eller extrakt av infekterade korioallantoismembran.

De vanligaste metoderna som används för serologiska tester för att påvisa antikroppar mot aviärt influensavirus är hemagglutinationstest (HA) och hemagglutinationsinhibitionstest (HI).

I kapitel 2.7.12 i *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* från Världsgesundhetsorganisationen för djurens hälsa (OIE) finns detaljerad information om laborieteknikerna och utvärderingen av resultat.

Standardprotokollen för serologiska tester och utvärderingen av resultat från gemenskapens referenslaboratorium finns på följande webbplats:

<http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm>

KAPITEL IX

Övervakningssystem i samband med vaccination

1. Direktiv 2005/94/EG och diagnostikhandboken

Enligt avsnitten 2 och 3 i kapitel IX i direktiv 2005/94/EG kan nödvaccinering och förebyggande vaccinering införas på vissa villkor. Ett av villkoren är att en DIVA-strategi (differentiering mellan infekterade och vaccinerade djur) tillämpas.

Vaccineringen skall syfta till att förhindra infektionen och senare spridning av viruset mellan flockar. Det finns klart dokumenterat att vaccinering innebär att en större mängd virus behövs för att infektera fåglar och att den mängd virus som utsöndras minskar. Vaccinerade fåglar utvecklar visserligen inte några kliniska tecken, men de kan fortfarande sprida viruset under vissa omständigheter. HPAI-virus av subtyp H5 och H7 kan därmed cirkulera obemärkt under en tid i en flock utan fullständig immunitet på samma sätt som LPAI-virus kan göra det i en ovaccinerad flock. Viruspositiva vaccinerade flockar som har blivit infekterade med ett fältvirus måste därför kunna identifieras så att andra bekämpningsåtgärder kan vidtas, t.ex. utslaktning.

2. Användning av indikatordjur för infektionsövervakning

På flocknivå är en enkel metod att regelbundet övervaka indikatordjur som är ovaccinerade i varje vaccinerad flock, men det finns vissa problem med detta tillvägagångssätt, i synnerhet när det gäller att identifiera indikatordjuren och då särskilt i stora flockar. Indikatordjuren och de vaccinerade fåglarna måste komma i kontakt med varandra.

3. DIVA-laboratorietest för infektionsövervakning

Som ett alternativ eller komplement kan test för påvisande av naturlig exponering göras på de vaccinerade fåglarna med hjälp av DIVA-laboratorietest. En rad testsystem har utvecklats under senare år som även gör det möjligt att påvisa naturlig infektion hos vaccinerade fåglar. En metod som har visat sig fungera är att använda ett vaccin som innehåller ett virus av samma subtyp av hemagglutinin (H) men en annan neuraminidas (N) än det aktuella fältviruset. Antikroppar mot N av fältviruset fungerar som naturliga infektionsmarkörer.

Det systemet användes i Italien efter det att ett LPAI H7N1-virus uppstod på nytt år 2000. Som ett komplement till direkta bekämpningsåtgärder genomfördes en DIVA-strategi med ett vaccin innehållande H7N3 för att bekämpa en naturlig infektion med H7N1. Vaccinerade och fältexponerade fåglar differentierades med hjälp av ett serologiskt test för att påvisa specifika anti-N1-antikroppar. Samma strategi användes för att bekämpa LPAI som orsakats av H7N3 i Italien 2002–2003. Då använde man ett H7N1-vaccin och ett serologiskt test för att påvisa antikroppar mot N3. I båda fallen medförde vaccinering kombinerat med utslaktning och tillämpningen av denna DIVA-strategi att fältviruset kunde utrotas.

Problem med detta system uppkommer om det uppstår ett fältvirus som har samma N-antigen som det aktuella fältviruset, men som är av en annan H-subtyp än H5 eller H7, eller om subtyper med samma N-antigener redan cirkulerar ute i fält. Särskilt ändrar/ankor brukar vara bärare av fler än en subtyp. Det fanns också ett behov att utveckla ett lämpligt test som skulle göra det möjligt att rutinövervaka flockar med avseende på anti-neuraminidas-antikroppar. I Italien utvecklade och använde man ett serologiskt test som byggde på ett indirekt fluorescerande antikroppstest och använde då som antigen N-proteiner uttryckt som bakulovirusrekombinanter. Användningsområdet för detta kan utökas när ett ELISA-test utvecklats.

Används vaccin innehållande endast HA, såsom rekombinant vektorvaccin, kan man använda klassiska AGID-tester eller ELISA-tester baserade på nukleoprotein, NS-protein eller matrixproteiner för att påvisa infektion hos vaccinerade fåglar.

När det gäller inaktiverat vaccin har ett test beskrivits som påvisar antikroppar mot NS-virusprotein som bara bildas vid en naturlig infektion. Ett sådant system måste först valideras i fält, men det har den begränsningen att endast naturlig infektion av en flock med ett influensavirus, oavsett subtyp, medför att det bildas antikroppar mot NS-proteinet.

Utvecklingen av snabba och känsliga metoder för att påvisa virus, särskilt metoder som kan automatiseras, t.ex. RT-PCR, innebär att dessa kan användas för omfattande och regelbunden testning av vaccinerade fåglar för förekomst av fältvirus. Påvisa agens kan man emellertid bara göra under ett kort moment i den akuta infektionsfasen och detta kan inte användas för att dra slutsatsen att en flock inte har varit exponerad för viruset tidigare. Detta tillvägagångssätt passar bäst för att testa vaccinerade fåglar, innan de flyttas, för att påvisa att de är fria från aktiv infektion.

Antalet prover som skall testas med hjälp av dessa system skall göra det möjligt att utesluta infektion med aviär influensa i en flock på över 15 % med en konfidensgrad på 95 %.

KAPITEL X

Strategier vid diagnostiseringen av aviär influensa

Så som framgår av bilaga IV till direktiv 2005/94/EG kan beslut om att vidta åtgärder i vissa områden eller på kontaktanläggningar och hur omfattande dessa åtgärder är varierar stort beroende på risken. På samma sätt kan man normalt göra en avvägning mellan den nödvändiga diagnostiska bekräftelsen av sjukdomen och den rådande situationen, farans storlek och graden av risk. Veterinärmyndigheterna måste fatta beslut, säkerställa diagnosen och göra en avvägning mellan att snabbt bekämpa och utrota en sjukdom och eventuella konsekvenser av fel diagnos. Sådana bedömningar måste göras mot bakgrund av många faktorer, men vissa situationer kan förutses.

Sjukdomssituation	Potentiellt problem	Diagnostiska kriterier
Icke specifika tecken, ingen officiell misstanke	Isolerad anläggning	Snabbt påvisande baserat på M-gen-RT-PCR. Differentialdiagnos i den utsträckning som krävs.
Misstanke om primärutbrott	Isolerad anläggning	Genomförande av fullständiga diagnostiska test, virusisolering och karakterisering.
Misstanke om primärutbrott	Anläggning i fjäderfätätt område	Genomförande av fullständiga diagnostiska test, isolering och karakterisering av virus, men med inriktning på snabba metoder för påvisande och karakterisering, särskilt metoder som är baserade på RT-PCR och sekvensering ⁽¹⁾ .
Misstanke om efterföljande utbrott	Isolerade anläggningar med epidemiologisk kontakt till det misstänkta primärutbrottet	Inriktning på snabba metoder för påvisande och karakterisering, särskilt metoder som är baserade på RT-PCR och sekvensering ⁽¹⁾ .
Misstanke om efterföljande utbrott	Anläggningar i fjäderfätätt område eller med många epidemiologiska kontakter	Användning av snabba metoder för påvisande som snarast möjligt visar på förekomsten av aviärt influensavirus ⁽¹⁾ .
Flera tillfällen av misstanke om utbrott eller snabb sjukdomsspridning, trots övervakning	Spridning kan inte hållas under kontroll utan snabbt ingripande	Användning av snabba metoder för påvisande som snarast möjligt visar på förekomsten av aviärt influensavirus, eller bedömning av kliniska tecken ⁽¹⁾ .

⁽¹⁾ Fullständig provtagning bör göras och proven bör lagras för senare utvärdering.

KAPITEL XI

Diagnostisering av infektion med aviära influensavirus hos svin och andra däggdjur**1. Aviär influensa hos svin**

Aviära influensavirus infekterar lätt svin, och även om replikationen i de flesta fall är relativt begränsad kan infekterade svin överföra sjukdomen till fjäderfå och andra mottagliga djur. Hittills finns det inga exempel från fältet på att infekterade svin har överfört aviära influensavirus av subtyp H5 och H7.

Under utbrottet i Nederländerna 2003 visade det sig att H7N7-infekterade svin inte uppvisade några kliniska tecken som kunde hänföras till H7N7-infektionen. Det finns heller inga rapporter om svin som insjuknat under H5N1-utbrottet i Asien och på andra platser.

Man kan därmed inte förlita sig på kliniska symtom som tecken på om svin är infekterade; om svin infekterats med andra influensavirus av aviärt ursprung kan dock kliniska symtom uppträda när viruset har anpassat sig till värden. Diagnostiseringen av aviära virusinfektioner hos svin svarar i allt väsentligt mot diagnostiseringen för fågelarter, med virusisolering, molekylära tekniker och påvisande av specifika antikroppar med hjälp av hemagglutinationsinhibitionstest. Det finns dock vissa skillnader och inga av testerna är validerade fullt ut för användning på svin för att bekräfta infektion med aviära influensavirus.

2. Prover för virusisolering

Virusinfektioner med aviär influensa hos svin omfattar vanligen bara luftvägarna och proverna måste bestå av vävnad från luftvägarna och, om det är relevant, svabbprover från svalg eller näshåla, helst från svin som visar tecken på sjukdomen. Vävnads- och svabbproverna kan förberedas för virusisolering eller för påvisande av specifika nukleotider med molekylärbioologiska metoder med samma tekniker som beskrivs ovan för prover från fåglar. När PCR-tekniker används måste man dock sörja för korrekta kontroller för att se till att amplifieringen inte hämmas av ämnen i proverna från svin.

3. Inokulation och inkubering av ägg

För att isolera influensavirus från däggdjur i 9–11 dagar gamla embryonerade hönsägg brukar man vanligen inokulera varje ägg genom allantoiskaviteten in i amnionkaviteten. Vid test av svin som kommit i kontakt med aviära influensavirus, när virus inte har haft någon större möjlighet att anpassa sig, räcker det sannolikt att inokulera ägget in i allantoiskaviteten.

Likaledes rekommenderas normalt 35 °C som inkuberingstemperatur för isolering av influensa A-virus från däggdjur, men för virus som bara i ringa grad har anpassat sig till svin är 37 °C inte till skada för virusisoleringen.

4. Test för påvisande av specifika antikroppar vid HI-test

Virusisolering eller molekylärt påvisande är sannolikt de känsligaste metoderna för att konstatera infektion med aviärt influensavirus hos svin. Serologiska reaktioner har dock påvisats hos svin utan att man har isolerat eller påvisat virus. HI-tester där svinserum används kräver vissa ändringar av det test som används för fågelserum och som avses i kapitel VIII.

Svinserum är allmänt känt för sina egenskaper att uppvisa ospecifika hämmande ämnen vid HI-test och varje serumprov måste därför behandlas med receptornedbrytande enzym (RDE) så att detta inte inträffar. Följande metod skall användas:

- Till 100 µl svinantiserum tillsätts 400 µl RDE (på förhand fastställd arbetsspädning) som blandas grundligt.
- Inkubera vid 37 °C under 1 timme.
- Inkubera sedan under 30 minuter vid 56 °C.
- Proven nedkyls vid 4 °C under minst 15 minuter.
- Tillsätt 10 µl 30 % (v/v packade celler) röda blodkroppar och blanda kraftigt.
- Inkubera vid 4 °C över natten. Om det är av avgörande betydelse att proverna används samma dag kan man som alternativ inkubera vid 37 °C under 1 timme och centrifugera vid 300 x g under 5 minuter.

Det behandlade serumet används sedan vid HI-test enligt beskrivningen för fågelserum i punkt [...], varvid den första spädningen är 1:10. En uppsättning svinserum med känd seronegativ status med avseende på aviär influensa skall användas för att bedöma HI-testets specificitet för den virusstam som skall användas (se användningen av virusstammar från utbrottet för serologisk undersökning; kapitel VIII). Under utbrottet i Nederländerna 2003 påvisade upp till 2,6 % ej specifika reaktioner vid det HI-test där man använde svinserum som samlats in oberoende av utbrottet.

5. Provtagning på svin

Särskilt på gårdar som håller både svin och fjäderfå, antingen blandat eller i separata stallar, finns det risk för att svin infekteras med aviär influensa direkt eller indirekt via kontakt med fjäderfå eller fjäderfäprodukter. För att utesluta infektion skall svalg- eller nässvabbar tas såväl som blodprover i enlighet med de förfaranden som beskrivs i punkt 8.21 i kapitel IV. Proven skall tas från svin som uppvisar kliniska tecken på sjukdomen. Om de inte uppvisar några kliniska tecken kan proverna tas slumpmässigt från alla delar av stallet. Svabbprover skall testas med hjälp av snabba molekylära test och/eller virusisolering, om laboratoriet kan göra detta. RT-PCR skall ha validerats korrekt och ha en känslighet som minst svarar mot virusisolering i ägg för påvisande av influensa A-virus.

Två till fyra veckor efter det att det fjäderfä som infekterats med aviär influensa har avlivats skall minst 60 blodprover tas från svin på ett sådant sätt att åtminstone vissa prover tas från grupper av svin som kommer i direkt kontakt med varandra. Proverna skall testas med hjälp av HI-test och med virus som tagits från det aktuella utbrottet bland fjäderfä. Vid samma test skall prover från både akut- och konvalescentfas testas. Positiva prover kan bekräftas med virusneutralisationstest och/eller Westernblotting.

Om något av dessa prover är positivt skall en epidemiologisk undersökning göras av alla svingårdar som ligger i skyddszonen, oavsett om det handlar om blandade besättningar eller ej.

6. Aviära influensavirus hos andra däggdjur är svin

Undersökningar skall göras av andra däggdjur än svin som är mottagliga för aviär influensa, bl.a. katter. När katter testas med avseende på HPAI H5N1 skall följande göras:

Större patologiska organskador till följd av virusreplikation är koncentrerade till lungor och lever. Prover för virologisk undersökning skall därför i första hand tas på dessa organ från döda djur. Hos levande djur är det bäst att ta svabbprover från luftrör/svalg för att påvisa virus. Därutöver kan fekala svabbprover tas separat.

Blodprover som skall undersökas i HI-test skall värmebehandlas vid 56 °C under 30 minuter; behandling med receptornedbrytande enzym är inte nödvändig.

KAPITEL XII

Minimikrav för säkerheten vid transport av prover

1. Transport av prover som innehåller eller misstänks innehålla patogener omfattas av strikta nationella och internationella bestämmelser som alltid måste följas. Virusisolat som inte är klassificerade som diagnostiska prover skall vara förpackade enligt internationella standarder.

Anvisningarna i detta kapitel gäller lufttransport, men samma förpackningar skall användas vid transport av prover på land och till sjöss.

2. Förpackning av diagnostiska prover för transport

Diagnostiska prover som transporteras enligt IATA:s bestämmelser förses med UN-nummer 2814, 2900 eller 3373, beroende på vad som är tillämpligt.

Avsändaren – inte transportföretaget – är ansvarig för försändelsen tills den når mottagaren.

3. Primärförpackning

- a) Primärkärl skall vara vattentäta; exempelvis skall skruvlock vara förseglade med parafilm eller tejp eller skall liknande skyddsåtgärder vidtas.
- b) Om det rör sig om flera primärkärl skall dessa förpackas separat så att de inte går sönder.
- c) Vid bestämningen av de diagnostiska provens volym skall virusets transportmedium beaktas.
- d) Primärkärlen får innehålla högst 500 ml eller 500 g.

Primärkärlen får inte innehålla något annat än det diagnostiska provet.

4. Sekundärförpackning

- a) Det skall finnas ett absorberande material i sekundärförpackningen som har förmåga att suga upp hela provvolymen om primärkärl skulle läcka eller skadas.
- b) Sekundärförpackningen skall uppfylla IATA:s förpackningskrav för diagnostiska prover och klara fallprovet på 1,2 m. Eftersom förpackningskraven för smittförande ämnen är strängare än kraven för förpackningar av diagnostiska prover enligt IATA:s förpackningsinstruktion 602, kan dessa användas.

- c) Förpackningar med smittförande ämnen skall vara försedda med föreskriven märkning (med "UN" i en cirkel), till exempel:

"UN 4G/CLASS 6.2/99/GB/2450"

- d) Sekundärförpackningen skall vara vattentät. Förpackningstillverkarens eller andra auktoriserade parter förpackningsanvisningar som följer med sekundärförpackningen skall följas.
- e) Sekundärförpackningens minsta yttre mått skall vara minst 100 mm.
- f) Sekundärförpackningen skall vara så stor att fraktdokument ryms, t.ex. flygfraktsedel.

5. Ytterförpackning

- a) Ytterförpackningen får innehålla högst 4 l eller 4 kg.
- b) Eventuell torris eller is skall placeras utanför sekundärförpackningen. Om torris används måste koldioxid kunna tränga ut från förpackningen så att det inte kan byggas upp ett tryck som kan spräcka förpackningen. Om is används måste förpackningen vara läckagesäker.

Varje förpackning och flygfraktsedeln skall vara försedda med följande text:

**"UN 3373 DIAGNOSTIC SPECIMEN
PACKED IN COMPLIANCE WITH
IATA PACKING INSTRUCTION 650"**

- c) En detaljerad innehållsförteckning skall finnas mellan sekundärförpackningen och ytterförpackningen.
- d) Ytterförpackningen skall vara placerad i en tättslutande plastpåse till skydd mot fukt.
- e) Transportdokumentet *Shipper's Declaration for Dangerous Goods* krävs inte.

KAPITEL XIII

Avsändning av virus och prover till gemenskapens referenslaboratorium

1. Prover som skall skickas till gemenskapens referenslaboratorium skall följa rekommendationerna för transport av farliga patogener i EU och även gällande bestämmelser i Förenade kungariket.

Anvisningarna i detta kapitel skall följas.

2. Avsändning av virus och annat material till gemenskapens referenslaboratorium

- a) Allt material skall förpackas i enlighet med anvisningarna i detta kapitel.
- b) Ytterförpackningen skall vara försedd med följande text:

"ANIMAL PATHOGEN – PACKAGE ONLY TO BE OPENED AT THE AVIAN VIROLOGY SECTION, VLA, WEYBRIDGE. IMPORTATION AUTHORISED BY LICENCE NUMBER.....*.....ISSUED UNDER THE IMPORTATION OF ANIMAL PATHOGENS ORDER."

- c) Ett av följande licensnummer skall införas:

- i) För aviära influensavirus: "AHZ/2232/2002/5*"
- ii) För vävnader och annat material: "AHZ/2074C/2004/3*"

Eftersom dessa licensnummer ibland ändras måste laboratorier som skickar in prover se till att de använder licensnummer som är aktuella.

d) Paketet skall adresseras till

Avian Virology
VLA Weybridge,
New Haw, Addlestone,
Surrey KT15 3NB
Förenade kungariket

e) Paketet skall åtföljas av ett följebrev som innehåller så många bakgrundsuppgifter om isolaten som möjligt, t.ex. art och ålder, område/land där isolering har skett och eventuell klinisk bakgrund.

f) Paketet skall skickas med flygpost eller flygfrakt.

Om paketet skickas med flygfrakt skall gemenskapens referenslaboratorium få uppgift om flygfraktsedelns nummer via fax, telefon eller e-post innan materialet ankommer.

Paket som skickas med flygfrakt skall vara tydligt märkta med texten

"CARE OF TRANSGLOBAL" för att säkerställa snabb expedition på flygplatsen.

Kontaktpersoner på gemenskapens referenslaboratorium:

Ian H. Brown, direktör för referenslaboratoriet
Tfn, direktanknytning (44-1932) 35 73 39
Fax, direkt (44-1932) 35 72 39
E-post: i.h.brown@vla.defra.gsi.gov.uk

Ruth Manvell, chef för referenslaboratoriet
Tfn, direktanknytning (44-1932) 35 77 36 eller (44-1932) 35 77 08
Fax, direkt (44-1932) 35 78 56
E-post: r.manvell@vla.defra.gsi.gov.uk

KAPITEL XIV

Minimikrav på säkerhet för ett diagnoslaboratorium för aviär influensa

1. Säkerhetskraven på diagnoslaboratorier som arbetar med aviära influensavirus skall omfatta både inneslutning av virus som ett hot mot djurhälsan och skydd för dem som arbetar på laboratoriet (och människor utanför) mot eventuella zoonotiska risker.

Inom EU finns det en rad direktiv där minimikrav på säkerhet för laboratorier fastställs. Dessutom beskrivs och fastställs operativa aspekter i därtill knutna Europeiska standarder (EN). När det gäller driften av laboratorier för diagnostisering finns det kompletterande föreskrifter (EN), t.ex. god laboratorised.

2. EU-direktiv om laboratorier

Rådets direktiv 89/391/EEG av den 12 juni 1989 om åtgärder för att främja förbättringar av arbetstagarnas säkerhet och hälsa i arbetet (EGT L 183, 29.6.1989, s. 1).

Rådets direktiv 90/679/EEG av den 26 november 1990 om skydd för arbetstagare mot risker vid exponering för biologiska agenser i arbetet (sjunde särdirektivet enligt artikel 16.1 i direktiv 89/391/EEG) (EGT L 374, 31.12.1990, s. 1).

Om diagnos ställs med hjälp av polymeraskedjereaktion (PCR) och kloning av PCR-produkter i en bakterieplasmid för förökning, t.ex. för DNA-sekvensering, gäller följande direktiv och Europeiska standarder (EN) utöver dessa två direktiv:

Rådets direktiv 90/219/EEG av den 23 april 1990 om innesluten användning av genetiskt modifierade mikroorganismer (EGT L 117, 8.5.1990, s. 1).

3. Utöver EU-direktiven skall följande Europeiska standarder (EN) beaktas:

EN 12128 Bioteknik – Laboratorier för forskning, utveckling och analys – Skyddsnivåer för mikrobiologiska laboratorier, riskområden, lokaler och fysiska säkerhetsanordningar.

EN 12738 Bioteknik – Laboratorier för forskning, utveckling och analys – Vägledning för förvaring av försöksdjur inokulerade med mikroorganismer.

EN 12740 Bioteknik – Laboratorier för forskning, utveckling och analys – Vägledning för hantering, inaktivering och kontroll av avfall.

EN 12741 Bioteknik – Laboratorier för forskning, utveckling och analys – Vägledning för biotekniskt laboratoriearbete.

För drift/ledning av ett laboratorium gäller följande villkor:

4. Krav för laboratorier (inneslutningsnivå 1–4)

I enlighet med Europaparlamentets och rådets **direktiv 2000/54/EG** av den 18 september 2000 om skydd för arbetstagare mot risker vid exponering för biologiska agens i arbetet (sjunde särdirektivet enligt artikel 16.1 i direktiv 89/391/EEG) (EGT L 262, 17.10.2000, s. 21), direktiv 90/219/EEG och de europeiska standarderna EN 12128, EN 12740 och EN 12741.

Inneslutningsåtgärder	Inneslutningsnivå			
	1	2	3	4
Laboratoriesvit: isolering	Nej	Ja	Ja	Ja
Laboratorier åtskilda av dörrar	Nej	Ja	Ja	Ja
Krav på ett observationsfönster eller motsvarande för att de som vistas i lokalen skall kunna ses	Valfritt	Valfritt	Valfritt	Ja
Personalen skall ha möjlighet att tvätta händerna	Ja	Ja	Ja	Ja
Det skall finnas möjlighet till desinfektion (händer)	Valfritt	Ja	Ja	Ja
Begränsat tillträde	Nej	Ja	Ja	Ja
Särskilda åtgärder för kontroll av aerosolspridning	Nej	Ja, skall minimeras	Ja, skall förhindras	Ja, skall förhindras
Symbol för mikrobiologisk risk på dörren	Nej	Ja	Ja	Ja
Dusch	Nej	Nej	Valfritt	Ja
Ögonsköljning	Ja	Ja	Ja	Ja
Laboratorium: skall kunna förseglas för att möjliggöra rökbehandling	Nej	Nej	Ja	Ja
Ytor som är resistenta mot vatten, syror, alkalier, lösningsmedel, desinfektionsmedel och dekontamineringsmedel och är lätta att rengöra	Ja (bänk)	Ja (bänk)	Ja (bänk, golv)	Ja (bänk, golv)
Ingång till laboratoriet via luftsluss	Nej	Nej	Valfritt	Ja
Undertryck i förhållande till trycket i den omedelbara omgivningen	Nej	Nej	Valfritt	Ja
Luftintag till och luftutsläpp från laboratoriet skall HEPA-filtreras	Nej	Nej	Ja, (luftutsläppet)	Ja
Autoklav	På platsen	I byggnaden	I laboratoriesviten	I laboratoriet, dubbelsidig

Inneslutningsåtgärder	Inneslutningsnivå			
	1	2	3	4
Skyddsdräkt	Lämplig skyddsdräkt	Lämplig skyddsdräkt	Lämplig skyddsdräkt (valfri fotbeklädnad)	Fullständigt byte av kläder
Handskar	Nej	Valfritt	Ja	Ja
Effektiv vektorkontroll (t.ex. mot gnagare och insekter)	Valfritt	Ja	Ja	Ja
Säker lagring av ett biologiskt agens	Ja	Ja	Ja	Ja
Laboratoriet skall innesluta sin egen utrustning	Nej	Nej	Rekommenderas	Ja

Det finns fler europeiska standarder som handlar om laboratoriers ledning och organisation.

Det finns andra nationella och internationella regler och rekommendationer som skall följas. WHO har lagt ut sin "Laboratory Biosafety Manual 3rd Edition" på sin webbplats:

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/

5. Inneslutning av relevans för djurhälsa

Medlemsstaternas veterinärmyndigheter skall fastställa föreskrifter om inneslutning av aviära influensavirus, i synnerhet HPAI, men dessutom alla aviära influensavirus av subtyp H5 och H7. I kapitel 1.4.5 i *Terrestrial Animal Health Code 2005* från Världsgesundhetsorganisationen för djurens hälsa (OIE) ges viss vägledning, och HPAI betraktas som en patogen i OIE:s inneslutningsgrupp 4.

Medlemsstaternas veterinärmyndigheter skall fastställa föreskrifter för hanteringen av aviära influensavirus.

De minimikrav på säkerhet som gemenskapens referenslaboratorium tillämpar och som är nationella bestämmelser i Förenade kungariket finns på följande webbplats:

<http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm>

6. Inneslutning av relevans för människors hälsa

Laboratorier som arbetar med aviära influensavirus måste alltid vara medvetna om att dessa är åtminstone potentiella humana patogener och bedriva laboratoriets verksamhet på ett sådant sätt att de som arbetar i laboratoriet inte infekteras och viruset inte sprids till människor utanför laboratoriet.

Riktlinjer för hantering av prover som misstänks innehålla aviärt influensavirus typ A finns på WHO:s webbplats.

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/