II

(Retsakter, hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS BESLUTNING

af 4. august 2006

om godkendelse af en diagnosticeringsmanual for aviær influenza, jf. Rådets direktiv 2005/94/EF

(meddelt under nummer K(2006) 3477)

(EØS-relevant tekst)

(2006/437/EF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til Rådets direktiv 2005/94/EF af 20. december 2005 om fællesskabsforanstaltninger til bekæmpelse af aviær influenza og om ophævelse af direktiv 92/40/EØF [1], særlig artikel 50, stk. 1, andet afsnit, og

ud fra følgende betragtninger:

(1) Direktiv 2005/94/EF indeholder bestemmelser om visse forebyggende foranstaltninger vedrørende overvågning og tidlig påvisning af aviær influenza samt minimumsbekæmpelsesforanstaltninger, som skal gennemføres i tilfælde af et udbrud af aviær influenza hos fjerkræ og andre fugle i fangenskab.

(2) Der bør på EF-plan fastsættes diagnosticeringsprocedurer, prøvetagningsmetoder og kriterier for evaluering af resultaterne af laboratorietest til bekræftelse af udbrud af aviær influenza.

(3) I bilag VII til direktiv 2005/94/EF er der fastsat funktioner og opgaver for EF-referencelaboratoriet for aviær influenza med hensyn til i samråd med Kommissionen at samordne de metoder, der anvendes i medlemsstaterne til diagnosticering af sygdommen. Funktionerne og opgaverne omfatter tilrettelæggelse med mellemrum af sammenlignende undersøgelser og levering af referencereagenser på EF-plan.

(4) Der er for nylig udviklet laboratorieprøver, som sikrer, at aviær influenza hurtigt kan diagnosticeres.

(5) På grundlag af de erfaringer, der er gjort med bekæmpelsen af aviær influenza i de seneste år, har man kortlagt de prøvetagningsmetoder og kriterier for evaluering af resultaterne af laboratorieprøver, der er bedst egnet til at stille en korrekt diagnose af sygdommen i forskellige situationer.

(6) Foranstaltningerne i denne beslutning er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Komité for Fødevarekæden og Dyresundhed —

VEDTAGET FØLGENDE BESLUTNING:

Artikel 1

Diagnosticeringsmanualen, jf. direktiv 2005/94/EF, der er fastsat i bilaget til denne beslutning, godkendes hermed.

Artikel 2

Medlemsstaterne anvender diagnosticeringsmanualen fra den dato, hvor de gennemfører direktiv 2005/94/EF, dog senest den 1. juli 2007.

[1] EUT L 10 af 14.1.2006, s. 16.

Artikel 3

Denne beslutning er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 4. august 2006.

På Kommissionens vegne
Markos KYPRIANOU
Medlem af Kommissionen

BILAG

DIAGNOSTICERINGSMANUAL FOR AVIÆR INFLUENZA

KAPITEL I

Indledning, mål og definitioner

1. For at sikre ensartede procedurer for diagnosticering af aviær influenza (AI) i Fællesskabet fastsættes der i denne diagnosticeringsmanual:

   a) retningslinjer for og minimumskrav til diagnosticeringsprocedurer, prøvetagningsmetoder og kriterier for evaluering af resultaterne af laboratorietest med henblik på at stille en korrekt diagnose af AI

   b) laboratorietest, der skal anvendes til diagnosticering af AI, og laboratoriemetoder, der skal anvendes til gentypebestemmelse af isolater af AI

   c) minimumskrav til biosikkerhed og kvalitetsnormer, som skal overholdes af laboratorier, der foretager diagnosticering, og ved transport af prøver.

2. Denne diagnosticeringsmanual henvender sig til de myndigheder, der er ansvarlige for bekæmpelsen af AI. Den vedrører derfor primært principperne og anvendelsesområderne for laboratorietest og evalueringen af resultaterne samt laboratoriemetoder.

3. Ved anvendelsen af denne diagnosticeringsmanual gælder definitionerne i artikel 2 i direktiv 2005/94/EF, og desuden forstås ved:

   »diagnostisk prøve«: animalsk materiale, herunder hele kroppe, der forsendes med henblik på diagnosticering eller undersøgelse, dog ikke levende inficerede dyr.

4. AI hos fjerkræ og andre fugle i fangenskab bekræftes efter de procedurer, prøvetagningsmetoder og kriterier for evaluering af resultaterne af laboratorietest, der er fastlagt i denne diagnosticeringsmanual, og på basis af et eller flere af kriterierne i litra a), b) og c):

   a) påvisning af infektiøst virus, antigen eller specifikt genetisk materiale i prøver af væv, organer, blod eller ekskret fra fjerkræ eller andre fugle

   b) påvisning af kliniske sygdomstegn og post mortem-læsioner hos sådanne fugle

   c) påvisning af en specifik antistofrespons i blodprøver fra sådanne fugle.

5. Infektion hos pattedyr med influenza A-virus af aviær oprindelse, der er højpatogen eller, hvis lavpatogen, af subtype H5 eller H7, bekræftes på basis af et eller flere af kriterierne i litra a) eller b):

   a) påvisning af infektiøst AI-virus, AI-antigen eller specifikt genetisk AI-materiale i prøver af væv, organer, blod eller ekskret fra pattedyr

   b) påvisning af en specifik antistofrespons over for AI i blodprøver fra pattedyr.

6. Procedurer, prøvetagningsmetoder og kriterier for evaluering af resultaterne af laboratorietest skal være:

   a) dem, der er fastsat i denne diagnosticeringsmanual, eller

   b) dem, den kompetente myndighed har godkendt, forudsat at:

      i) det er godtgjort, at de godkendte laboratorietests følsomhed og specificitet er effektive, ved en sammenlignende undersøgelse gennemført af EF-referencelaboratoriet for aviær influenza (i det følgende benævnt »EF-referencelaboratoriet«), eller

      ii) den godkendte laboratorietests følsomhed og specificitet er blevet valideret af det nationale referencelaboratorium, hvis EF-referencelaboratoriet ikke har gennemført en sådan evaluering af en specifik type laboratorietest, således at laboratorietesten er egnet til det formål, den anvendes til; resultaterne af en sådan validering skal forelægges for EF-referencelaboratoriet, så det kan gennemgå dem.

KAPITEL II

Beskrivelse af AI med særlig vægt på differentialdiagnose

1. **Ætiologi og virulens**

AI er en meget smitsom virusinfektion, der forårsages af vira af familien *Orthomyxoviridae*, slægten *influenzavirus A*. Influenza A-vira er de eneste orthomyxovira, der vides at inficere fugle. Det er konstateret, at mange fuglearter er modtagelige over for infektion med influenza A-vira; vandfugle udgør et stort reservoir for sådanne vira, men langt den overvejende del af isolaterne har været lavpatogene hos kyllinger og kalkuner, der er de fugle, hvor det medfører de største økonomiske konsekvenser, hvis de får sygdommen.

Influenza A-vira har antigent beslægtede nukleoproteiner og antigent beslægtede matrixproteiner, men klassificeres i subtyper på grundlag af det antigene slægtskab for overfladeglycoproteinerne hæmagglutinin (HA) og neuraminidase (NA). For øjeblikket kendes der 16 HA-subtyper (H1–H16) og 9 NA-subtyper (N1–N9). Et influenza A-virus har 1 HA-antigen og 1 NA-antigen; alle kombinationer er tilsyneladende mulige.

Influenza A-virus inddeles i to grupper på grundlag af deres evne til at forårsage sygdom hos modtageligt fjerkræ:

a) **højpatogene aviær influenza**-vira (**HPAI**), som forårsager en særdeles alvorlig sygdom, der er kendetegnet ved en generaliseret infektion af det inficerede fjerkræ, og kan medføre en meget høj flokdødelighed (op til 100 %)

b) **lavpatogene aviær influenza**-vira (**LPAI**), som forårsager en mild sygdom hos fjerkræ, primært i luftvejene, medmindre der indtræder en forværring som følge af andre samtidige infektioner eller faktorer.

Vilde fugle, især trækkende vandfugle, er et meget betydeligt reservoir for influenza A-virus, hvilket illustreres af, at man har isoleret næsten alle mulige kombinationer af HA- og NA-subtyper fra vilde fugle. Generelt påvises der udelukkende LPAI-vira hos vilde fugle, undtagen i tilfælde af HPAI-forekomst, der kommer fra inficeret fjerkræ.

Primær indslæbning af AI-vira til fjerkræbedrifter hidrører sandsynligvis fra direkte eller indirekte kontakt med vilde fugle.

Det er muligt, at sådanne LPAI-vira, der kommer fra et vildtreservoir, hos tamfjerkræ kan cirkulere uden at blive påvist, da kliniske tegn ofte er svage eller fraværende.

Når LPAI-virusstammer af subtyperne H5 og H7 er indslæbt til fjerkræ, kan de efterfølgende mutere til HPAI-stammer. Indtil videre er det kun vira af subtyperne H5 og H7, der er påvist som årsag til HPAI.

Skønt en række mekanismer tilsyneladende kan være ansvarlige for mutation fra LPAI- til HPAI-virus, ved man ikke, hvilke faktorer der forårsager mutationen. I nogle tilfælde er mutationen tilsyneladende sket på den primære lokalitet hurtigt efter indslæbningen fra vilde fugle, mens LPAI-virus i andre tilfælde har cirkuleret blandt fjerkræ i månedsvis inden mutationen. Det er derfor umuligt at forudsige, om og hvornår en sådan mutation vil finde sted. Det kan dog med rimelighed antages, at jo mere udbredt cirkulationen af LPAI hos fjerkræ er, jo større er muligheden for, at der vil ske en mutation til HPAI.

Det er vanskeligt at sætte tal på inkubationsperioden, der sandsynligvis varierer afhængigt af virusstammen og værten. Der nævnes tal på 5-6 dage, men for enkeltfugle varierer det sandsynligvis fra nogle få timer til ca. 7 dage.

2. **Kliniske tegn hos fugle inficeret med HPAI-virus**

De kliniske tegn er meget forskelligartede og påvirkes af faktorer som det inficerende virus' virulens, den sygdomsramte art, alder, køn, samtidige sygdomme og miljø.

Tidlige tegn kan f.eks. være appetitløshed, reduceret indtag af vand og forholdsvis lille dødelighed. Sygdommen kan imidlertid også pludselig dukke op i en flok, hvor mange fugle dør enten uden forvarsel eller med minimale tegn på depression, appetitløshed, pjusket fjerdragt og feber. Generelt er de kliniske tegn mere markante, jo længere fuglene er i live. Tidslinjen for udviklingen af tegn afhænger af virusset, værten og den oprindelige infektionsdosis samt opdrætssystem. Virusset spredes langsommere blandt æglæggende høner i bur eller fugle, der går udendørs, end i kyllingestalde.

Høner, der er inficeret med HPAI-virus, lægger evt. æg med blød skal til at begynde med, men holder efter kort tid op med at lægge æg. Syge fugle sidder eller står ofte i halvkomatøs tilstand med hovedet på jorden. Kam og hagelapper er cyanotiske og ødematiske, evt. med petekkier eller ekkymoser i spidserne. Voldsom, tynd diarré forekommer ofte, og fuglene er ekstremt tørstige. Åndedrættet kan være besværet, og tåreflod kan forekomme. Der kan observeres blødninger på fjerløse hudområder. Flokdødeligheden ligger på 50-100 %.

Hos slagtekyllinger er tegnene på HPAI ofte mindre tydelige end for andre typer fjerkræ og omfatter normalt alvorlig depression, appetitløshed, og en meget markant stigning i dødeligheden kan være den første anomali, der observeres. Der kan endvidere ses hoved- og halsødemer samt neurologiske tegn som torticollis og ataksi.

For HPAI hos kalkuner gælder det samme som for tamfjerkræ, men visse HPAI-vira synes mere virulente hos kalkuner, mens andre synes mindre virulente.

Hos gæs, der er inficeret med HPAI-virus, er tegnene med hensyn til depression, appetitløshed og diarré de samme som hos æglæggende høner, dog ofte med hævede bihuler. Der kan evt. observeres neurologiske tegn hos yngre fugle.

Ænder inficeret med HPAI-vira udviser ikke nødvendigvis kliniske tegn, men der er meldinger om, at visse stammer medfører tegn, der svarer til tegnene hos gæs, med en vis dødelighed.

Der er ikke nødvendigvis kliniske tegn ved HPAI- og LPAI-infektioner hos strudse. I forbindelse med HPAI-udbrud, f.eks. i Italien i 1999/2000, var der meldinger om, at perlehøns og japanske vagtler er modtagelige for infektioner med tegn og dødelighed, der ligner sygdommen hos kyllinger eller kalkuner. Eksperimentelle undersøgelser har imidlertid vist, at vagtler er resistente over for visse HPAI-stammer. For alle fugle gælder det, at forekomst af antistoffer over for samme H-subtype, uanset om det er som følge af vaccination eller naturlig infektion, kan medføre, at infektion med HPAI-virus ikke giver klare kliniske tegn.

3. **Post mortem-læsioner hos fugle inficeret med HPAI-virus**

Fugle, der dør efter et hyperakut forløb, kan have meget få makroskopiske læsioner som følge af dehydrering og kongestion i organer og muskler.

Hos fugle, der dør efter et langvarigt klinisk forløb, forekommer der petekkier og ekkymoser i hele kroppen, navnlig i svælg, luftrør, kirtelmave og hjertefedt samt på serosa tæt på sternum. Der er omfattende subkutant ødem, navnlig omkring hoved og haser. Kroppen kan være dehydreret. Gule eller grå nekroser kan forekomme i milt, lever, nyrer og lunger. Luftsækken kan indeholde et ekssudat. Milten kan være forstørret og hæmoragisk.

AI er histologisk karakteriseret ved karforstyrrelser, der medfører ødem, blødninger og perivaskulær infiltration, især i myocardium, milt, lunger, hjerne, bugspytkirtel og hagelapper. Der forekommer nekroser i lunger, lever og nyrer. Der kan forekomme gliose, vaskulær proliferation og neurondegeneration i hjernen.

4. **Differentialdiagnosticering**

Ved differentialdiagnosticering af HPAI skal især følgende sygdomme tages i betragtning:

a) andre sygdomme, der forårsager pludselig høj dødelighed, f.eks.:

   i) Newcastle disease

   ii) infektiøs laryngotracheitis

iii) andepest

iv) akut forgiftning

b) andre sygdomme, der forårsager hævelse af kam og hagelapper, f.eks.:

i) akut fjerkrækolera og andre septikæmiske lidelser

ii) bakteriel cellulitis i kam og hagelapper.

5. **Kliniske tegn hos fugle inficeret med LPAI-vira**

Hvor alvorlig sygdom forårsaget af LPAI-vira er, er i høj grad påvirket af:

a) virusstammen

b) værtens art og alder

c) værtens immunstatus med hensyn til virusset og navnlig forekomsten af andre infektiøse agenser, f.eks.:

i) *Pasteurella* spp.

ii) Newcastle disease-vira (herunder vaccinestammer)

iii) aviær pneumovirus, infektiøs bronkitisvirus

iv) *E. coli*

v) *Mycoplasma* spp.

d) immundefekttilstande

e) miljøfaktorer (f.eks. for meget ammoniak, støv, høje/lave temperaturer).

I den ene ende af registret kan de kliniske sygdomstegn være upåfaldende eller milde og kun give mildt åndedrætsbesvær eller små æglægningsproblemer hos æglæggere. I den anden ende af registret kan LPAI-virusinfektioner være forbundet med alvorlige kliniske sygdomstegn, navnlig hos kalkuner, sædvanligvis med rallelyde, hosten og hævede infraorbitale bihuler og en febril tilstand i forbindelse med appetitløshed og høj dødelighed.

LPAI kan forveksles med — eller kompliceres af — mange af de sygdomme, der ledsages af luftvejs- eller tarmproblemer. Der er altid mistanke om AI, når der hos fjerkræ udbryder sygdom, der varer ved, selv om der træffes præventive og terapeutiske foranstaltninger vedrørende andre sygdomme.

6. **Kliniske tegn hos fugle i fangenskab**

Spektret af kliniske tegn kan være meget bredt, og det kan — som hos fjerkræ — spænde fra upåfaldende til alvorlige sygdomstegn, der resulterer i høj dødelighed.

Infektion spredes generelt langsommere i en besætning af fugle i fangenskab, da der er tale om forskellige arter med forskellig modtagelighed, variationer i virusafgivelse og ofte forholdsvis langsom overførsel, hvilket skyldes lav kontaktrate og forholdsvis lave belægningsgrader.

KAPITEL III

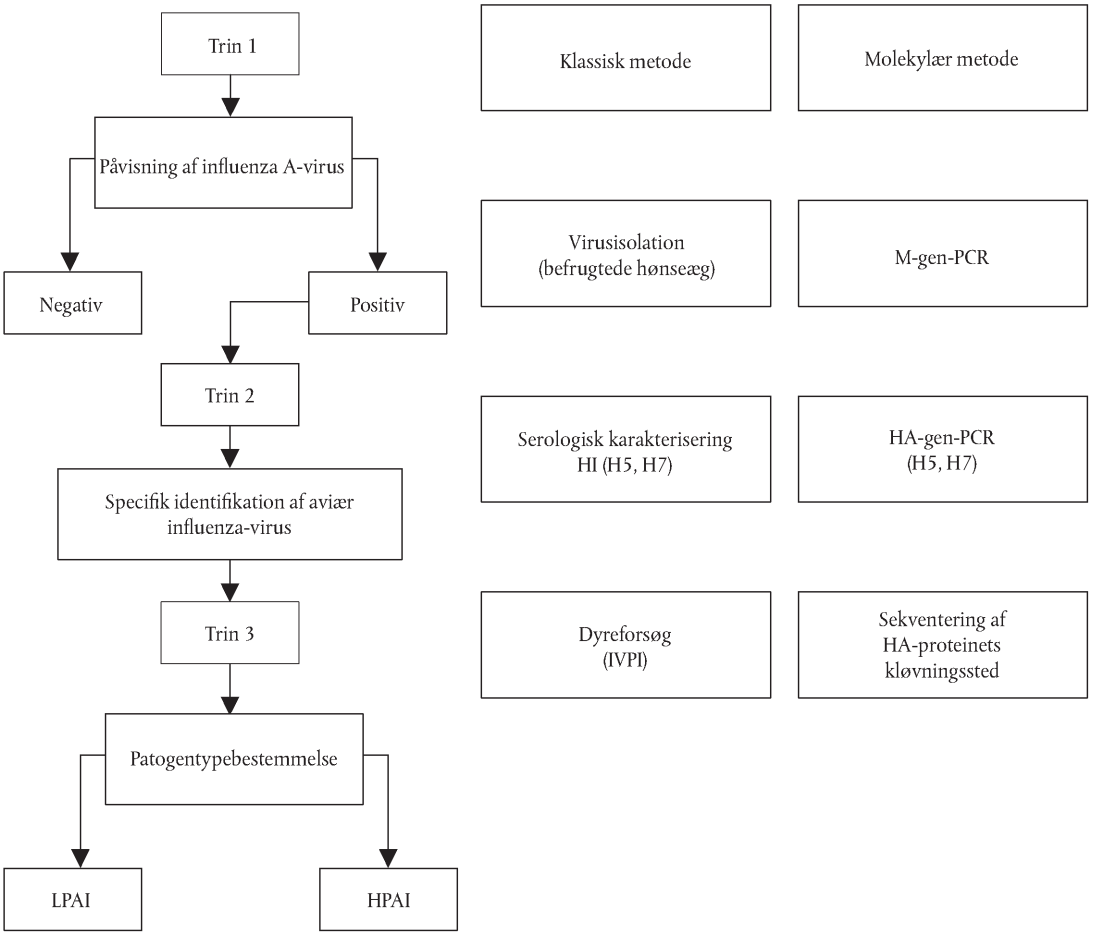
Retningslinjer i tilfælde af mistanke om AI på en bedrift

For såvel HPAI som LPAI gør de kliniske tegns forskelligartethed, at det ikke er muligt at udstikke helt klare retningslinjer i forbindelse med mistanke om udbrud. En pludselig høj dødelighed hos fjerkræ med eller uden nogle af de dermed forbundne kliniske tegn, jf. kapitel II, skal undersøges, ved at der indsendes prøver til laboratorieundersøgelse, men hvis der ikke forekommer høj dødelighed, er det vanskeligere at få mistanke om eller udelukke forekomst af AI.

Da hurtig diagnosticering af HPAI eller LPAI forårsaget af H5- og H7-subtyper er af overordentlig betydning for tidlig bekæmpelse og udryddelse, skal AI altid inddrages som en mulighed, når der foretages differentialdiagnosticering i forbindelse med luftvejsproblemer, ægproduktionsproblemer og øget dødelighed hos fjerkræ og de pågældende prøver, der indsendes til laboratorieundersøgelse.

Figur

Skematisk oversigt over diagnosticeringstrin til bekræftelse af AI



KAPITEL IV

Generelle procedurer for udtagning og transport af prøver

1. **Direktiv 2005/94/EF og diagnosticeringsmanualen**

Når der i direktiv 2005/94/EF henvises til diagnosticeringsmanualen, skal de procedurer for undersøgelser, prøveudtagninger og overvågning, der er beskrevet i dette kapitel i diagnosticeringsmanualen, gennemføres.

2. **Procedurer, der skal følges, når der er mistanke om AI-udbrud**

Hvis embedsdyrlægen har en klinisk mistanke om et AI-udbrud, eller hvis resultaterne af en laboratorietest for sygdommen ikke er negative, skal den kompetente myndighed påse, at der gennemføres en undersøgelse som beskrevet i dette kapitel i diagnosticeringsmanualen, jf. artikel 7 i direktiv 2005/94/EF, og den skal være tilfredsstillende tilendebragt, før sygdommens forekomst kan udelukkes.

3. **Fortolkning af en virologisk undersøgelse**

Den kompetente myndighed kan betragte forekomst af AI-virus som udelukket, når et passende antal syge eller døde fugle og svaberprøver fra luftrør, svælg og/eller kloak i overensstemmelse med dette kapitel er blevet indsendt til påvisning af det pågældende virus eller dets genom, og prøverne har givet negative resultater, idet der ved testen skal være anvendt en af de specifikke viruspåvisningsmetoder, der er omhandlet i kapitel V eller VI, eller som er godkendt af den kompetente myndighed, jf. kapitel I, punkt 6, litra b).

4. **Standardsæt af prøver til virologisk eller serologisk laboratorietest**

Til undersøgelse af en bedrift, hvor der er mistanke om AI-virus-infektion, skal der udtages et standardsæt af prøver til virologisk eller serologisk test, jf. litra a) og b) (standardprøver), som indsendes direkte til virologiske og serologiske laboratorietest.

a) Standardsættet af prøver til virologisk test omfatter:

i) mindst fem syge/døde fugle, hvis sådanne findes, og/eller

ii) mindst 20 svaberprøver fra luftrør og/eller svælg og 20 kloaksvaberprøver.

Kroppene skal være af fugle, der er døde for nylig, eller som er alvorligt syge eller døende, og som er aflivet på en human måde.

Svaberprøverne tages fra det antal fugle, der er nævnt i litra a), eller fra alle fugle på den mistænkte bedrift, hvis der kun forefindes et lavere antal fugle. Der udføres målrettet prøveudtagning af fugle, der udviser kliniske sygdomstegn.

Kloaksvaberprøverne skal være dækket med fæces (optimalt 1 g). Hvis det af en eller anden grund ikke lader sig gøre at tage kloaksvaberprøver fra levende fugle, kan forsigtigt indsamlet frisk fækalt materiale anvendes som alternativ.

Det er ofte mest praktisk at indsamle svaberprøver fra luftrør og svælg fra mundhulen.

Så snart virussets vækstegenskaber er kendt, kan den kompetente myndighed beslutte at anvende enten svaberprøver fra luftrør og/eller svælg eller kloaksvaberprøver i stedet for at indsamle begge slags, afhængigt af om virusset replikerer sig selv bedst i luftvejene eller i mave-tarm-systemet og under hensyntagen til den pågældende art.

b) Standardsættet af prøver til serologisk test omfatter mindst 20 blodprøver.

Prøverne tages fra det antal fugle, der er nævnt i litra b), eller fra alle fugle på bedriften, hvis der kun forefindes et lavere antal fugle. Der udføres målrettet prøveudtagning af fugle, der udviser sygdomstegn, eller som tilsyneladende er blevet raske.

Den kompetente myndighed kan beslutte, at det fulde sæt af standardprøver ikke behøver at blive udtaget, men at der i stedet udtages en del af standardprøverne.

5. **Transport af prøver**

Der skal sikres optimale betingelser for opbevaring og transport af prøver til laboratoriet til undersøgelse.

Svaberprøverne skal straks nedkøles på is eller med frosne gelpakninger og indsendes til laboratoriet hurtigst muligt. Prøverne må ikke nedfryses, medmindre det er absolut nødvendigt. Hvis der ikke er sikkerhed for hurtig transport til laboratoriet inden for 24 timer, skal prøverne straks nedfryses, opbevares og siden transporteres på tøris.

Desuden skal svaberprøverne — og det er ikke et alternativ til nedkøling — anbringes helt nedsænket i en antibiotisk eller særlig virustransportvæske ved 4 °C. Hvis en sådan væske ikke er til rådighed, skal svaberprøverne anbringes i deres oprindelsesbeholder og indsendes i tør tilstand til laboratorieundersøgelsen.

Opbevaring og transport af prøver kan blive påvirket af en række faktorer, så transportmetoden skal vælges, så den er egnet til formålet.

6. **Antibiotisk væske**

Den antibiotiske væske, jf. punkt 5, skal være baseret på fosfatbufferet saltopløsning med en pH-værdi på 7,0-7,4 (kontrolleret efter tilsætning af antibiotika).

Proteinbaserede medier, f.eks. brain-heart-infusion eller tris-bufferet tryptosebouillon, kan give virusset ekstra stabilitet, især under transport. Hvilke antibiotika der anvendes, og i hvilken koncentration, kan tilpasses lokale forhold og disponibilitet.

Det kan være nødvendigt med meget høje niveauer antibiotika til fæcesprøver, og passende niveauer er: 10 000 IU/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin, 0,25 mg/ml gentamycin og 5 000 IU/ml nystatin. Disse mængder kan reduceres indtil fem gange til væv og svaberprøver fra luftrør.

Hvis der ønskes kontrol af Chlamydophila, skal der desuden tilsættes 0,05–0,1 mg/ml oxytetracyclin.

7. **Brain-heart-infusionsvæske**

Opløsningen tilberedes i vand og indeholder 15 % w/v brain-heart-infusionsbouillonpulver, inden der foretages sterilisering (ved autoklave ved 121 °C/15 minutter).

Følgende steriliseringsantibiotika tilsættes: 10 000 IU/ml penicillin G, 20 µg amphotericin B og 1 000 µg/ml gentamycin. Væskerne kan opbevares ved 4 °C i højst to måneder.

8. **Procedurer i relation til de relevante bestemmelser i direktiv 2005/94/EF**

8.A. Mistanke om udbrud

8.1. *Artikel 7, stk. 1 — Foranstaltninger på bedrifter, hvor der er mistanke om udbrud*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en bedrift, hvor der er mistanke om udbrud, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand, hvis sådanne registre foreligger. I embedsdyrlægens inspektionsrapport skal der foreligge dokumentation for data om daglig dødelighed og daglig ægproduktion samt daglig indtagelse af foder og/eller vand for en periode, der begynder en uge før de første kliniske tegn på AI og slutter på den dag, embedsdyrlægen foretager inspektion på bedriften.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, navnlig fugle, der forekommer syge.

c) Medmindre det over for den kompetente myndighed dokumenteres, at mistanke om udbrud kan udelukkes på grundlag af den kliniske inspektion, jf. litra a) og b), skal der udtages standardprøver fra alle produktionsenheder.

d) Selv om testen af standardprøver giver negative resultater, skal der foretages en klinisk inspektion af fjerkræet i alle produktionsenheder, før den offentlige overvågning kan ophæves, idet der samtidig skal tages hensyn til lokale faktorer.

8.2. *Artikel 10, stk. 3 — Supplerende foranstaltninger på grundlag af den epidemiologiske undersøgelse*

Der skal udtages standardprøver i alle produktionsenheder fra fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, der aflives.

8.B. Højpatogen aviær influenza (HPAI)

8.3. *Artikel 11, stk. 4 — Foranstaltninger vedrørende fjerkræ udklækket af æg indsamlet på bedrifter, hvor der er konstateret udbrud*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en bedrift, hvor der forefindes fjerkræ, som allerede er udklækket af æg indsamlet i inkubationsperioden på en bedrift, hvor der er konstateret HPAI, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand. I embedsdyrlægens inspektionsrapport skal der foreligge dokumentation for data om daglig dødelighed og daglig indtagelse af foder og/eller vand, hvis sådanne foreligger, for en periode, der begynder en uge før de første kliniske tegn på HPAI og slutter på den dag, embedsdyrlægen foretager inspektion på bedriften.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder og en klinisk undersøgelse af fjerkræ, især fjerkræ, der forekommer sygt, eller som ikke har den forventede tilvækst.

c) Standardprøverne udtages fra fjerkræ, der er 2-3 uger.

d) Den offentlige overvågning af bedriften kan ophæves, når der er foretaget en klinisk undersøgelse af fjerkræ, der er mere end 21 dage, og der foreligge negative resultater af testen af standardprøverne.

8.4. *Artikel 13, stk. 2, litra b) — Dispensation for visse bedrifter*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en bedrift, der har fået dispensation i henhold til artikel 11, stk. 2, første afsnit, i direktiv 2005/94/EF, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand, hvis sådanne registre foreligger.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, navnlig fugle, der forekommer syge.

c) I stedet for standardprøverne udtages følgende prøver til laboratorieundersøgelse 21 dage efter det seneste positive fund af HPAI fra alle produktionsenheder og med 21 dages interval:

   i) prøver af alt fjerkræ eller alle andre fugle i fangenskab, der på prøveudtagningstidspunktet forefindes døde

   ii) hvis det er praktisk muligt, svaberprøver fra luftrør, svælg og kloak fra mindst 60 stykker fjerkræ eller andre fugle i fangenskab eller fra alt fjerkræ eller alle andre fugle i fangenskab, hvis der er mindre end 60 fugle på bedriften; eller der skal indsamles frisk fækalt materiale, hvis fuglene er små, eksotiske og ikke vant til at blive håndteret, eller hvis håndtering af dem ville være farligt for mennesker.

   Den kompetente myndighed kan dog på grundlag af en risikovurdering dispensere fra prøvestørrelsen som omhandlet i nr. i) og ii).

d) Prøveudtagning som omhandlet i litra c) og laboratorieundersøgelse af disse prøver skal fortsætte, indtil der opnås to på hinanden følgende negative laboratorieresultater med mindst 21 dages interval.

8.5. *Artikel 15, stk. 1 og 3 — Foranstaltninger vedrørende kontaktbedrifter*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en kontaktbedrift, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand, hvis sådanne registre foreligger. I embedsdyrlægens inspektionsrapport skal der foreligge dokumentation for data om daglig dødelighed og daglig indtagelse af foder og/eller vand, hvis sådanne foreligger, for en periode, der begynder en uge før kontakten med den flok, som er mistænkt for at være inficeret med AI, og slutter på den dag, embedsdyrlægen foretager inspektion på bedriften.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, navnlig fugle, der forekommer syge.

c) Hvis der er kliniske tegn hos fjerkræ eller andre fugle i fangenskab eller indikationer på en forhøjet daglig dødelighed (> 3 gange flokkens normale dødelighedstal) eller en nedgang i den daglige ægproduktion (> 5 %) eller et fald i den daglige indtagelse af foder og/eller vand (> 5 %), skal der straks udtages standardprøver fra alle produktionsenheder.

d) Hvis der ikke er nogen tegn som omhandlet i litra b) og c), skal der udtages standardprøver 21 dage efter den seneste mistænkte kontakt med en inficeret bedrift, eller når fjerkræet eller de andre fugle i fangenskab aflives.

8.6. *Artikel 18, litra b) og c) — Optælling, embedsdyrlægens inspektion og overvågning på bedrifter i beskyttelseszonen*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en erhvervsdrivende bedrift, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand. Hvis der er indikationer på en forhøjet daglig dødelighed (> 3 gange flokkens normale dødelighedstal) eller en nedgang i den daglige ægproduktion (> 5 %) eller et fald i den daglige indtagelse af foder og/eller vand (> 5 %), skal der udtages standardprøver fra alle produktionsenheder.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræ og andre fugle i fangenskab, navnlig fugle, der forekommer syge.

c) Hvis der er tale om arter af fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, der ikke forventes at have tydelige kliniske sygdomstegn, eller hvis der er tale om vaccinerede fugle, kan den kompetente myndighed på grundlag af en risikovurdering beslutte, at der skal udtages standardprøver af alle produktionsenheder.

d) Den kompetente myndighed skal på grundlag af en risikovurdering træffe beslutning om supplerende offentlig overvågning med målrettede kliniske inspektioner og udtagning af prøver til laboratorieundersøgelser fra bedrifter, segmenter eller produktionstyper.

8.7. *Artikel 19, litra f) — Foranstaltninger på bedrifter i beskyttelseszoner*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en bedrift, hvor der er indberettet stigning i sygeligheden eller dødeligheden og ændringer af produktionsdata, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand. Hvis der er indikationer på en forhøjet daglig dødelighed (> 3 gange flokkens normale dødelighedstal) eller en nedgang i den daglige ægproduktion (> 5 %) eller et fald i den daglige indtagelse af foder og/eller vand (> 5 %), skal der udtages standardprøver fra alle produktionsenheder.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, navnlig fugle, der forekommer syge.

8.8. *Artikel 23, litra b) — Dispensation for direkte transport af fjerkræ til omgående slagtning*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en bedrift, der har fået dispensation fra artikel 22 i direktiv 2005/94/EF, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand.

b) En klinisk inspektion mindre end 24 timer før afsendelsen af fjerkræet i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræ, navnlig fugle, der forekommer syge.

c) På grundlag af en risikovurdering foretaget af den kompetente myndighed og i stedet for standardprøverne skal der fra hver produktionsenhed udtages mindst 60 svaberprøver fra luftrør og/eller svælg og/eller 60 kloaksvaberprøver fra fjerkræ, der skal sendes til slagtning, mindre end 48 timer før afsendelsen af fjerkræet.

8.9. *Artikel 25, litra b) — Dispensation for direkte transport af æglægningsklart fjerkræ*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en bedrift, der har fået dispensation fra artikel 22 i direktiv 2005/94/EF, forud for transport af æglægningsklart fjerkræ, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand.

b) En klinisk inspektion mindre end 24 timer før afsendelsen af fjerkræet i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræet, navnlig fugle, der forekommer syge.

c) På grundlag af en risikovurdering foretaget af den kompetente myndighed og i stedet for standardprøverne skal der fra hver produktionsenhed udtages mindst 60 svaberprøver fra luftrør og/eller svælg og/eller kloaksvaberprøver fra fjerkræ, der skal transporteres, mindre end 48 timer før afsendelsen af fjerkræet.

8.10. *Artikel 26, stk. 1, litra a) — Dispensation for direkte transport af ruge- og konsumæg*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en bedrift med forældreflok, der har fået dispensation fra artikel 22 i direktiv 2005/94/EF, forud for transport af rugeæggene, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand.

b) En klinisk inspektion af alle produktionsenheder hver 15. dag.

c) Der skal udtages standardprøver fra alle produktionsenheder.

8.11. *Artikel 29, stk. 1 — Foranstaltningernes varighed*

De foranstaltninger, der anvendes i beskyttelseszonen i henhold til kapitel IV, afsnit 3, i direktiv 2005/94/EF, kan tidligst ophæves 21 dage efter den foreløbige rengøring og desinfektion på de inficerede bedrifter og under følgende forudsætninger:

a) Alle erhvervsdrivende bedrifter, der ligger i beskyttelseszonen, er blevet inspiceret af en embedsdyrlæge, og alle kontroller og kliniske inspektioner og laboratorieundersøgelser, jf. punkt 8.6, litra a), b) og c), og punkt 8.7, har givet negative resultater.

b) Alle identificerede ikke-erhvervsdrivende bedrifter i beskyttelseszonen er blevet inspiceret af en embedsdyrlæge, og hverken den kliniske undersøgelse eller resultaterne af laboratorieundersøgelser har givet anledning til mistanke om AI-infektion.

c) Eventuel supplerende offentlig overvågning, der er blevet foretaget, jf. punkt 8.6, litra d), har givet negative resultater.

8.12. *Artikel 30, litra g) — Foranstaltninger i overvågningszonerne*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en bedrift, hvor der er indberettet stigning i sygeligheden eller dødeligheden og ændringer af produktionsdata, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, navnlig fugle, der forekommer syge.

c) Der skal udtages standardprøver fra alle produktionsenheder.

8.13. *Artikel 35 — Undersøgelse af mistanke om forekomst af HPAI på slagterier og i transportmidler*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en oprindelsesbedrift for fugle, der er på slagterier eller i transportmidler, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand, hvis sådanne registre foreligger.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, under hensyntagen til samråd med embedsdyrlægen på slagteriet, som skal fremlægge nærmere oplysninger om eventuelle tidligere inspektionsdata og resultater af undersøgelser før og efter slagtning.

c) Medmindre det over for den kompetente myndighed dokumenteres, at mistanken om HPAI-udbrud kan udelukkes på grundlag af dyrlægeundersøgelsen, jf. litra a) og b), skal der udtages standardprøver fra alle produktionsenheder.

d) Som supplement til standardprøverne indsendes prøver af mindst fem syge, døde eller slagtede fugle på slagteriet med patologiske fund til laboratorieundersøgelse.

8.14. *Artikel 36, stk. 1 — Foranstaltninger vedrørende slagterier*

Når undersøgelserne, jf. punkt 8.13, er afsluttet, og forudsat at resultaterne af laboratorieundersøgelserne er negative, og der ikke er nogen klinisk mistanke om forekomst af HPAI på oprindelsesbedriften og på slagteriet, kan den offentlige overvågning ophæves.

8.15. *Artikel 37, stk. 1 og 2 — Foranstaltninger vedrørende grænsekontrolsteder eller transportmidler*

8.15.1. Når en embedsdyrlæge undersøger fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, der holdes i isolation, og som er blevet flyttet fra et grænsekontrolsted eller et transportmiddel som følge af mistanke om eller bekræftet forekomst af HPAI, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af relevante dokumenter og registre, hvis sådanne dokumenter eller registre foreligger.

b) En klinisk undersøgelse af fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, der således holdes i isolation, og en klinisk inspektion af alt andet fjerkræ eller alle andre fugle i fangenskab, især fugle, der forekommer syge.

c) Der skal udtages standardprøver fra fjerkræ eller andre fugle i fangenskab fra forskellige transportkasser eller -bure.

8.15.2. Når en embedsdyrlæge inspicerer en identificeret oprindelsesbedrift for fugle eller andre fugle i fangenskab, der slagtes, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand, hvis sådanne registre foreligger.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, under hensyntagen til samråd med embedsdyrlægen på slagteriet, som skal fremlægge nærmere oplysninger om eventuelle tidligere inspektionsdata og resultater af undersøgelser før og efter slagtning.

c) Medmindre det over for den kompetente myndighed dokumenteres, at mistanken om HPAI-udbrud kan udelukkes på grundlag af dyrlægeundersøgelsen, jf. litra a) og b), skal der udtages standardprøver fra alle produktionsenheder.

d) Som supplement til standardprøverne, jf. litra c), indsendes prøver af mindst fem syge, døde eller slagtede fugle på slagteriet med patologiske fund til laboratorieundersøgelse.

e) Forudsat at resultaterne af laboratorieundersøgelserne af prøverne omhandlet i litra c) og d) er negative, og der ikke er nogen klinisk mistanke om forekomst af HPAI på oprindelsesbedriften og på slagteriet, kan den offentlige overvågning ophæves.

8.C. Lavpatogen aviær influenza (LPAI)

8.16. *Artikel 39, stk. 6, litra b) og h) — Foranstaltninger på bedrifter, hvor der er konstateret LPAI-udbrud*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en bedrift, inden fjerkræet transporteres til et slagteri, eller en bedrift, hvor der forefindes fjerkræ, som allerede er udklækket af æg indsamlet i inkubationsperioden, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræet eller de andre fugle i fangenskab.

c) Der skal udtages standardprøver fra alle produktionsenheder af fjerkræ, der skal sendes til slagtning, mindre end 48 timer før afsendelsen af fjerkræet.

d) Der skal udtages standardprøver fra alle produktionsenheder af fjerkræ, som allerede er udklækket af æg indsamlet i inkubationsperioden.

8.17. *Artikel 40, stk. 2, litra b) — Dispensation for visse bedrifter fra foranstaltninger på bedrifter, hvor der er konstateret udbrud*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en bedrift, der har fået dispensation fra artikel 39, stk. 2, og artikel 39, stk. 5, litra b), i direktiv 2005/94/EF, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand, hvis sådanne registre foreligger.

b) En klinisk inspektion med jævne mellemrum i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, navnlig fugle, der forekommer syge.

c) I stedet for standardprøverne udtages følgende prøver til laboratorieundersøgelse 21 dage efter de seneste positive fund af LPAI fra alle produktionsenheder og med 21 dages interval:

i) prøver af alt fjerkræ eller alle andre fugle i fangenskab, der på prøveudtagningstidspunktet forefindes døde

ii) svaberprøver fra luftrør, svælg og kloak fra 60 stykker fjerkræ og andre fugle i fangenskab eller fra alt fjerkræ eller alle andre fugle i fangenskab, hvis der er mindre end 60 fugle på bedriften; eller der skal indsamles frisk fækalt materiale, hvis fjerkræet eller de andre fugle i fangenskab er små, eksotiske og ikke vant til at blive håndteret, eller hvis håndtering af dem ville være farligt for mennesker.

Den kompetente myndighed kan dog på grundlag af en risikovurdering dispensere fra prøvestørrelsen som omhandlet i nr. i) og ii).

d) Prøveudtagning som omhandlet i litra c) og laboratorieundersøgelse af disse prøver skal fortsætte, indtil der opnås to på hinanden følgende negative laboratorieresultater med mindst 21 dages interval.

8.18. *Artikel 42, stk. 1 og 3 — Foranstaltninger vedrørende kontaktbedrifter*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en kontaktbedrift, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af kontaktbedriftens registre over produktion og sundhedstilstand, hvis sådanne registre foreligger.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, navnlig fugle, der forekommer syge.

c) Der skal udtages standardprøver i alle produktionsenheder, eller når fjerkræ eller andre fugle i fangenskab aflives.

8.19. *Artikel 44, stk. 1, litra b) — Foranstaltninger i spærrezoner*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en erhvervsdrivende bedrift i en spærrezone, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, navnlig fugle, der forekommer syge.

c) Der skal udtages standardprøver fra alle produktionsenheder.

d) Den kompetente myndighed skal på grundlag af en risikovurdering træffe beslutning om supplerende offentlig overvågning med målrettede kliniske inspektioner og udtagning af prøver til laboratorieundersøgelser fra bedrifter, segmenter eller produktionstyper.

8.20. *Artikel 45, litra a) og b) — Foranstaltningernes varighed*

De foranstaltninger, der anvendes i spærrezonen i henhold til kapitel V, afsnit 3, i direktiv 2005/94/EF, kan tidligst ophæves 21 dage efter den foreløbige rengøring og desinfektion på de inficerede bedrifter, efter at bedriften er tømt, eller tidligst 42 dage efter datoen for bekræftelse af LPAI-forekomst og under følgende forudsætninger:

a) Alle erhvervsdrivende bedrifter, der ligger i spærrezonen, er blevet inspiceret af en embedsdyrlæge, og alle laboratorieundersøgelser af prøverne, jf. punkt 8.13, litra c) og d), er gennemført, og resultaterne heraf foreligger.

b) Der foreligger resultater af eventuelle supplerende kliniske inspektioner og laboratorieundersøgelser, der kan omfatte ikke-erhvervsdrivende bedrifter, med henblik på at bestemme risikoen for LPAI-spredning.

c) På grundlag af en risikovurdering, hvor der er taget hensyn til den epidemiologiske situation og resultaterne af laboratorieundersøgelserne omhandlet i litra a) og b), er det over for den kompetente myndighed godtgjort, at risikoen for LPAI-spredning er ubetydelig; vurderingen kan føre til den konklusion, at restriktionerne kan ophæves, hvis der er positive serologiske fund og negative virologiske fund.

8.D. Foranstaltninger til undgåelse af spredning af influenzavirus af aviær oprindelse til andre arter

8.21. *Artikel 47, stk. 1 og 6 — Laboratorieundersøgelser og andre foranstaltninger vedrørende svin og andre arter*

Når en embedsdyrlæge efter bekræftet forekomst af AI inspicerer en bedrift, hvor der holdes svin, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand, hvis sådanne registre foreligger.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af svinene, navnlig dem, der forekommer syge.

c) Der udtages svaberprøver fra næsebor og svælg fra mindst 60 svin fra hver produktionsenhed eller fra alle svin, hvis produktionsenheden omfatter mindre end 60 svin, før eller på den dag, hvor fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, der er inficeret, aflives. Der tages mindst 60 blodprøver fra svinene 2-4 uger efter aflivningen. Prøverne tages således, at mindst én prøve tages fra hver gruppe af svin, der er i direkte kontakt med hinanden.

d) Flytning af svin til andre bedrifter kan tillades, hvis mindst 60 svaberprøver fra næsebor og svælg og 60 blodprøver fra svin fra hver produktionsenhed udtaget 14 dage efter de positive fund af AI har givet negative resultater.

Flytning af svin til et slagteri kan tillades, hvis mindst 60 svaberprøver fra næsebor og svælg fra svin fra hver produktionsenhed udtaget 14 dage efter de positive fund af AI har givet negative resultater.

Hvis der er inkonklusive eller positive laboratorieresultater, foretages der yderligere undersøgelser, der er nødvendige for at udelukke infektion med eller overførsel af AI blandt svin.

e) Når embedsdyrlægen har mistanke om, at andre husdyr af pattedyrklassen på bedriften, navnlig dyr med identificeret modtagelighed for infektion med AI-virus af subtyperne H5 og H7, kan have været i kontakt med fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, der er inficeret, skal der udtages prøver til laboratorieundersøgelse.

8.E. Genindsættelse af dyr

8.22. *Artikel 49, stk. 3, litra b) og c) — Genindsættelse af dyr på bedrifter*

Når en embedsdyrlæge inspicerer en erhvervsdrivende bedrift, hvor der er genindsat dyr, skal der træffes følgende foranstaltninger:

a) Kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand.

b) En klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræet eller de andre fugle i fangenskab, navnlig fugle, der forekommer syge.

c) I stedet for standardprøver udtages følgende prøver fra hver enkelt produktionsenhed:

i) mindst 20 blodprøver, så snart fjerkræet er blevet indsat på bedriften, undtagen hvis det drejer sig om daggamle kyllinger; hvis det er relevant, kan prøveudtagningen foregå på fjerkræets oprindelsesbedrift, inden de flyttes til den bedrift, hvor genindsættelse skal foregå

ii) prøver af dødt fjerkræ eller svaberprøver af deres kroppe fra højst 10 døde fugle pr. uge i de første 21 dage efter genindsættelsen.

d) Hvis bedriften tidligere har været inficeret med HPAI, skal der endvidere udtages 20 svaberprøver fra luftrør og/eller svælg og 20 kloaksvaberprøver fra vandfugle (ænder/gæs) fra hver produktionsenhed, hvis det er relevant, i den sidste uge af de første 21 dage efter genindsættelsen.

e) Hvis bedriften tidligere har været inficeret med LPAI, skal der endvidere udtages 20 svaberprøver fra luftrør og/eller svælg og 20 kloaksvaberprøver og 20 blodprøver fra hver produktionsenhed.

8.F. Vaccination

8.23. *Artikel 56, stk. 2, litra i) — Forebyggende vaccination af fjerkræ og andre fugle i fangenskab*

Der skal gennemføres laboratorieundersøgelser, jf. kapitel IX i direktiv 2005/94/EF, af fjerkræ og andre fugle i fangenskab, der er vaccineret, ved anvendelse af godkendte DIVA-assays, hvis den naturligt forekommende virus er kendt.

Når der anvendes kontroldyr, skal sådanne forefindes i hver af de vaccinerede flokke, og de skal inspiceres klinisk og testes ved anvendelse af hæmagglutinations-inhibitionstesten (HI). I det øjemed tages der mindst hver 60. dag 20 blodprøver fra de uvaccinerede kontroldyr på hver af de bedrifter, hvor der er foretaget vaccination.

8.24. *Bilag IX — Betingelser for flytning af fjerkræ eller andre fugle i fangenskab og fjerkræprodukter i forbindelse med nødvaccination*

Der skal anvendes strenge overvågningsforanstaltninger vedrørende flytning af levende fjerkræ og andre fugle i fangenskab og æg heraf for at minimere risikoen for yderligere spredning af AI-infektion.

I det øjemed skal der i begyndelsen af en nødvaccinationskampagne anvendes samme strenge overvågningsforanstaltninger vedrørende flytning af levende fjerkræ og andre fugle i fangenskab og æg heraf for at minimere risikoen for yderligere spredning af AI-infektion i og uden for vaccinationsområdet.

a) Inden den første flytning i og uden for vaccinationsområdet af rugeæg og konsumæg, og derefter mindst hver 30. dag skal embedsdyrlægen træffe følgende foranstaltninger:

   i) en klinisk inspektion af uvaccineret forældrefjerkræ eller vaccinerede æglæggere i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræet, navnlig fugle, der forekommer syge; der skal udtages standardprøver fra fjerkræ i alle produktionsenheder, eller

   ii) en klinisk inspektion af vaccineret forældrefjerkræ eller vaccinerede æglæggere i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af kontroldyr i flokkene; der skal udtages standardprøver fra de pågældende kontroldyr.

b) I forbindelse med flytning af levende fjerkræ eller andre fugle i fangenskab, der er vaccineret, til andre bedrifter eller i forbindelse med flytning af levende vaccineret fjerkræ i eller uden for vaccinationsområdet skal embedsdyrlægen træffe følgende foranstaltninger:

   i) kontrol af bedriftens registre over produktion og sundhedstilstand

   ii) en klinisk inspektion i alle produktionsenheder, herunder en evaluering af enhedens kliniske historie og kliniske undersøgelser af fjerkræet eller de andre fugle i fangenskab højst 72 timer før afsendelsen, med særligt fokus på kontroldyrene

   iii) hvis resultaterne af kontrol, klinisk inspektion og kliniske undersøgelser, jf. nr. i) og ii), ikke er tilfredsstillende, skal der tages standardprøver fra kontroldyrene; hvis resultaterne imidlertid er tilfredsstillende udtages følgende prøver af:

      — fjerkræ og andre fugle i fangenskab, der er vaccineret: mindst 20 svaberprøver fra luftrør og/eller svælg og 20 kloaksvaberprøver og 20 blodprøver, som testes med et passende DIVA-assay højst 72 timer før afsendelsen

      — kontroldyr: 20 svaberprøver fra luftrør og/eller svælg og 20 kloaksvaberprøver og 20 blodprøver, som testes serologisk med HI-testen før afsendelsen.

KAPITEL V

Diagnostisk virologisk test og evaluering af resultater

1. Indtil der forelå og udvikledes molekylære test, blev virusisolation ved inokulering af befrugtede hønseæg anset for langt den mest følsomme diagnostiske test for AI, og metoden var af afgørende betydning for efterfølgende identifikation og karakterisering af det inficerende virus. Dette kapitel indeholder en beskrivelse af de vigtigste trin.

2. **Behandling af prøver**

Hvis de indsendte svaberprøver er »tørre«, anbringes de i så meget antibiotisk væske, at de er helt nedsænket. Prøverne kan samles i batch a fem prøver, forudsat at de kommer fra samme art, tidspunkt og epidemiologiske enhed.

Kroppe, der er indsendt til laboratoriet, skal undersøges, og der tages prøver af følgende organer: fæces eller mavetarm-indhold, hjernevæv, luftrør, lunger, lever, milt og andre synligt angrebne organer. De nævnte organer og væv kan samles, men det er vigtigt, at fækalt materiale behandles for sig.

Fæcesprøver og organprøver homogeniseres (i en lukket blender eller ved hjælp af pistil og morter og sterilt sand) i antibiotisk væske til en opslæmning på 10-20 % w/v i væsken.

De nedsænkede svaberprøver og opslæmningerne henstår i ca. to timer ved rumtemperatur (eller i længere tid ved 4 °C) og klares derpå ved centrifugering (f.eks. 800-1 000 x g i 10 minutter).

3. **Virusisolation i befrugtede hønseæg**

Den klarede supernatant inokuleres i mængder på 0,1-0,2 ml i allantoishulen på mindst fire befrugtede hønseæg, som er blevet ruget i 9-11 dage. Ideelt set skal æggene komme fra en specifikt patogenfri flok (SPF-flok), men hvis det ikke er praktisk muligt, kan der anvendes æg fra en flok, der er dokumenteret fri for AI-antistoffer (serumantistof-negative — SAN).

De inokulerede æg inkuberes ved 37 °C og lyses dagligt. Æg med døde eller døende embryoner nedkøles til 4 °C, og allantois/amnionvæskerne undersøges for hæmagglutinerende egenskaber. Seks dage efter inokulationen nedkøles og afprøves resterende æg på samme måde. Hvis der ikke konstateres nogen hæmagglutination, gentages fremgangsmåden med ufortyndet allantois/amnionvæske fra primærpassagen som inokulat. Hvis der konstateres hæmagglutination, undersøges det ved dyrkning, om der forekommer bakterier. Forekommer der bakterier, kan væskerne passeres gennem et 450 nm membranfilter, tilsættes yderligere antibiotika og inokuleres i befrugtede æg som anført ovenfor.

For at fremskynde diagnosticeringen har nogle laboratorier anvendt to 3-dageskørsler eller 2-dages- og 4-dageskørsler og rapporteret om resultater, der kan sammenlignes med to 6-dageskørsler, men dette er endnu ikke fuldt evalueret.

Positive væsker skal testes for, om de er bakteriefrie. Forekommer der bakterier, kan væskerne passeres gennem et 450 nm membranfilter, eller centrifugeres for at fjerne bakterier og atter overføres til æg efter tilsætning af yderligere antibiotika.

4. **Differentialdiagnosticering**

a) Foreløbig differentiering

Da det er vigtigt, at der hurtigst muligt gennemføres bekæmpelsesforanstaltninger for at begrænse spredning af AI-virus, skal alle nationale referencelaboratorier, der har isoleret et hæmagglutinerende virus, være i stand til at identificere, om det er et influenza A-virus af subtype H5 eller H7 eller Newcastle disease-virus. De hæmagglutinerende væsker anvendes til en hæmagglutinations-inhibitionstest som beskrevet i kapitel IX. Positiv inhibition, dvs. en titer inden for 2-3 $\log_2$ af en positiv kontrolprøve, med polyklonale antisera, der er specifikke for influenza A af subtype H5 eller H7, kan anvendes som foreløbig identifikation, således at der kan indføres foreløbige bekæmpelsesforanstaltninger.

b) Konfirmatorisk identifikation

Da der findes 16 hæmagglutinsubtyper og ni neuraminidasesubtyper af influenzavira og forekommer variationer inden for hver af dem, er det hverken muligt eller rentabelt, at hvert enkelt nationalt referencelaboratorium opbevarer antisera, der gør det muligt at foretage en fuldstændig subtypeidentifikation af influenzaisolater. Hvert enkelt nationalt referencelaboratorium skal dog som minimum:

i) bekræfte, at isolatet er et influenza-A-virus ved hjælp af en immunodobbeltdiffusionsprøve til påvisning af gruppeantigener

ii) afgøre, hvorvidt isolatet er af subtype H5 eller H7; positiv identifikation indebærer krav om gennemførelse af bekæmpelsesforanstaltninger vedrørende LPAI af subtyperne H5 og H7

iii) omgående indsende alle isolater af HPAI og af subtype H5 og H7 til EF-referencelaboratoriet med henblik på bekræftelse og en fuldstændig karakterisering, medmindre der er givet dispensation i henhold til litra d).

Endvidere må laboratorier med relevante faciliteter gerne:

iv) foretage en intravenøs patogenicitetsindeksprøve på seks uger gamle kyllinger som beskrevet i kapitel VII. Intravenøs patogenicitetsindeks på over 1,2 er ensbetydende med forekomst af virus, der kræver komplet iværksættelse af HPAI-bekæmpelsesforanstaltninger.

De nationale referencelaboratorier skal endvidere overveje at etablere ekspertise og udstyr, så de for alle H5- eller H7-LPAI-vira kan foretage bestemmelse af hæmagglutiningenets nukleotidsekvens for at afgøre, om der på hæmagglutininprækursorproteinets kløvningssted er flerbasiske aminosyrer. Skønt EF-referencelaboratoriet vil foretage patogenicitetsbestemmelser som en højt prioriteret opgave som led i de arbejdsopgaver, der er omhandlet i punkt 2, litra b), i bilag VII til direktiv 2005/94/EF, vil en sådan viruskarakterisering på nationalt plan i høj grad afkorte den tid, der anvendes til diagnosticering, og, hvis prøven er positiv, den tid, der anvendes til komplet gennemførelse af HPAI-bekæmpelsesforanstaltninger.

c) Yderligere typebestemmelse og karakterisering af isolater

EF-referencelaboratoriet skal have tilsendt alle hæmagglutinerende vira fra de nationale referencelaboratorier til yderligere antigene og genetiske undersøgelser for at opnå større forståelse af sygdommen(e)s epizootiologi i Fællesskabet i overensstemmelse med EF-referencelaboratoriets funktioner og opgaver, jf. bilag VII til direktiv 2005/94/EF.

Derudover skal EF-referencelaboratoriet foretage en fuldstændig antigentypebestemmelse af alle modtagne influenzavira. For H5- og H7-vira, som ikke har intravenøse patogenicitetsindekser på over 1,2, skal der også straks foretages bestemmelse af hæmagglutiningenets nukleotidsekvens for at afgøre, om der på hæmagglutininprækursorproteinets kløvningssted er flerbasiske aminosyrer, og det nationale referencelaboratorium og den kompetente myndighed i oprindelseslandet underrettes, så snart resultaterne foreligger, så HPAI-bekæmpelsesforanstaltninger kan gennemføres fuldt ud.

d) Da den epidemiologiske situation med hensyn til HPAI/LPAI er omskiftelig, er der mulighed for efter aftale med såvel Kommissionen som EF-referencelaboratoriet at give laboratorier, der er fuldt ud i stand til at foretage hurtig viruskarakterisering, dispensation til at indsende en mindre del af disse vira efter undersøgelse af data, og således at EF-referencelaboratoriet kan foretage en relevant udvælgelse. En sådan dispensation kan kun tillades, når det nationale referencelaboratorium hurtigt kan generere data og udveksle dem med EF-referencelaboratoriet.

KAPITEL VI

Molekylære test og evaluering af resultater

Den nuværende definition af HPAI tillader molekylær identifikation af virulensfaktorer og bekræfter anvendelsen af molekylære teknikker til diagnosticering af AI. Der er på det seneste sket en udvikling i anvendelsen af dem til påvisning og karakterisering af AI-virus direkte fra klinisk prøvemateriale fra inficerede fugle. Konventionelle RT-PCR-teknikker på klinisk prøvemateriale kan — med korrekt definerede primere — betyde hurtig påvisning og identifikation af subtype (i det mindste af H5 og H7) samt et PCR-amplikon, der kan anvendes til bestemmelse af nukleotidsekvens, og som det er dokumenteret kan have stor betydning ved hurtig identifikation af efterfølgende udbrud, når det primære inficerede sted er påvist, og virusset er karakteriseret. Real-time single-step RT-PCR med anvendelse af primer/fluorogen-probe-systemer (rRT-PCR) giver mulighed for endnu hurtigere og mere følsom diagnosticering med påvisning af AI-vira og bestemmelse af subtype H5 eller H7 i klinisk prøvemateriale.

Et stort problem med RT-PCR- og rRT-PCR-systemer er, at de forskellige laboratorier indtil nu har udviklet forskellige systemer, som ikke — hvilket ganske vist er helt legitimt — er blevet valideret eller har omfattet afprøvninger med et stort antal prøver i forskellige laboratorier. EF-referencelaboratoriet og nærmere bestemte nationale referencelaboratorier har beskæftiget sig med dette problem som led i et EU-støttet projekt (EU AVIFLU) med henblik på at udarbejde ratificerede protokoller for konventionel RT-PCR og rRT-PCR, som kunne overtages af andre nationale referencelaboratorier. Hvis testparametre, såsom cykel- og ramptid, varieres i forhold til anbefalingerne i protokollerne, skal det inden ibrugtagning dokumenteres, at de er egnede til formålet, jf. kapitel I, punkt 6, i denne diagnosticeringsmanual.

Standardprotokollerne for sådanne molekylære test og evaluering heraf, som anvendes af EF-referencelaboratoriet, findes på følgende websted:

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

KAPITEL VII

In vivo-patogenicitetstest og evaluering af resultater

Virulensen for kyllinger af influenza A-vira, der er isoleret fra fugle, skal vurderes ved anvendelse af intravenøst patogenicitetsindeks-testen (IVPI-testen), som gennemføres således:

a) Frisk inficeret allantoisvæske med en HA-titer > 1/16 (> 2^4 eller >$\log_2$ 4, når den udtrykkes som den reciprokke værdi) fra det lavest mulige niveau, helst fra den oprindelige isolering uden udvælgelse, fortyndes 1:10 i steril isotonisk saltopløsning.

b) 0,1 ml fortyndet virus indsprøjtes intravenøst i ti seks uger gamle SPF- eller SAN-kyllinger.

c) Kyllingerne undersøges med 24 timers mellemrum i ti dage. Ved hver observation gives der hver kylling point. 0 = normal, 1 = syg, 2 = meget syg, 3 = død. Bedømmelsen af syge og meget syge kyllinger er en subjektiv klinisk vurdering.

Normalt udviser »syge« kyllinger et af følgende symptomer, og »meget syge« mere end et af følgende symptomer: respiratorisk insufficiens, depression, diarre, cyanose af blottet hud eller hagelapper, ødemer i hoved, nervøse symptomer. Døde fugle noteres for 3 point ved hver af de resterende daglige observationer, efter at døden er indtrådt.

Af velfærdshensyn skal kyllinger, der er for syge til at æde og drikke, aflives på human vis og noteres som døde ved den næste observation, idet de ville have været døde inden for et døgn, hvis de ikke var blevet aflivet. Denne fremgangsmåde kan accepteres af akkrediteringmyndigheder.

d) IVPI er det gennemsnitlige antal point pr. kylling pr. observation over en 10-dagesperiode. Et indeks på 3,00 betyder, at alle kyllingerne døde inden for 24 timer, og et indeks på 0,00 betyder, at ingen af kyllingerne udviste kliniske symptomer i løbet af de ti dages observationsperiode.

I følgende eksempel vises en enkel metode til registrering af resultater og indeksberegning:

Kliniske symptomer	Dag efter inokulation										Point i alt
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Normal	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12 x 0 = 0
Syg	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	6 x 1 = 6
Meget syg	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	6 x 2 = 12
Død	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76 x 3 = 228
											I alt = 246

Anmærkninger:

10 kyllinger observeret i 10 dage = 100 observationer.

Indeks = gennemsnitligt antal point pr. kylling pr. observation = 246/100 = 2,46.

En influenza A-virus, uanset subtype, der giver en værdi på over 1,2 i en IVPI-test, betragtes som en HPAI-virus.

KAPITEL VIII

Serologiske test og evaluering af resultater

Den foretrukne metode til påvisning af tilstedeværelsen af influenza-A-virus er at vise forekomsten af nukleoprotein- eller matrixantigenerne, som er fælles for alle influenza-A-vira.

Det kan foregå ved hjælp af immunodobbeltdiffusionstest med koncentrerede viruspræparater eller ekstrakter af inficerede chorioallantoismembraner.

De foretrukne metoder til serologiske test til påvisning af AI-virusantigener er hæmagglutinationstest (HA-test) og hæmagglutinations-inhibitionstest (HI-test).

I kapitel 2.7.12 i Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals fra Verdensorganisationen for Dyresundhed (OIE) findes der nærmere oplysninger om laboratorieteknikker og evaluering af resultaterne.

Standardprotokollerne for serologiske test og evaluering heraf, som anvendes af EF-referencelaboratoriet, findes på følgende websted:

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

KAPITEL IX

Overvågningssystemer kombineret med vaccination

1. **Direktiv 2005/94/EF og diagnosticeringsmanualen**

I henhold til kapitel IX, afsnit 2 og 3, i direktiv 2005/94/EF kan der på visse betingelser anvendes nødvaccination og forebyggende vaccination. En af betingelserne er, at der anvendes en DIVA-strategi (DIVA = Differentiating Infected from Vaccinated Animals = differentiering mellem inficerede og vaccinerede dyr).

Vaccination skal tage sigte på at forebygge infektion og efterfølgende spredning af virus mellem flokke. Der foreligger klar dokumentation for, at vaccination indebærer, at der skal en større mængde virus til at inficere fugle, og at der udskilles en mindre mængde virus. Skønt vaccinerede fugle ikke længere udviser kliniske tegn, kan de imidlertid fortsat sprede virus under bestemte forhold. HPAI-vira af subtype H5 og H7 kan således cirkulere ubemærket i nogen tid i en flok med suboptimale immunitetsniveauer, på samme måde som LPAI-vira kan det i en uvaccineret flok. Der er derfor behov for at kunne identificere viruspositive vaccinerede flokke, der er blevet inficeret med naturligt forekommende virus, så andre bekæmpelsesforanstaltninger, f.eks. nedslagning (stamping out), kan gennemføres.

2. **Anvendelse af kontroldyr til overvågning af infektion**

På flokniveau udgør regelmæssig overvågning af kontroldyr, der efterlades uvaccinerede i de vaccinerede flokke, en enkel metode, men der er visse styringsproblemer forbundet med denne fremgangsmåde, navnlig med hensyn til at identificere kontroldyrene, især i store flokke. Det skal sikres, at der er kontakt mellem kontroldyrene og de vaccinerede fugle.

3. **DIVA-laboratorietest til overvågning af infektion**

Som et alternativ eller et supplement hertil kan der gennemføres test til påvisning af naturlig eksponering på selve de vaccinerede fugle ved anvendelse af DIVA-laboratorietest. Der er i de seneste år blevet udviklet en række testsystemer, som også muliggør påvisning af naturlig påvirkning af vaccinerede fugle. En af de metoder, der fungerer i praksis, er anvendelse af en vaccine, der indeholder et virus af samme hæmagglutininsubtype (H), men en anden neuraminidasetype (N) end det fremherskende naturligt forekommende virus. Antistoffer over for det naturligt forekommende virus' N fungerer som naturlige infektionsmarkører.

Det system blev anvendt i Italien, efter at LPAI H7N1-virus forekom på ny i 2000. Som et supplement til direkte bekæmpelsesforanstaltninger blev der gennemført en DIVA-strategi, hvor man anvendte en vaccine, der indeholdt H7N3, til at bekæmpe en naturligt forekommende H7N1-infektion. Vaccinerede fugle og naturligt eksponerede fugle blev differentieret ved anvendelse af en serologisk test til påvisning af specifikke anti-N1-antistoffer. Samme strategi blev anvendt til at bekæmpe LPAI forårsaget af H7N3 i Italien i 2002-2003, denne gang med en H7N1-vaccine og en serologisk test til specifik påvisning af antistoffer mod N3. I begge tilfælde medførte vaccination kombineret med stamping out og anvendelse af DIVA-strategien udryddelse af det naturligt forekommende virus.

Der opstår problemer i forbindelse med systemet, hvis der opstår et naturligt forekommende virus, der har samme N-antigen som det eksisterende naturligt forekommende virus, men som er af en anden H-subtype end H5 eller H7, eller hvis subtyper med samme N-antigener allerede er i omløb. Det vides, at navnlig ænder kan være bærere af mere end én subtype. Der var endvidere behov for at udvikle en egnet test, der ville muliggøre rutineovervågning af flokke med hensyn til anti-neuraminidase-antistoffer. I Italien blev der udviklet og anvendt en serologisk ad hoc-test, der var baseret på en indirekte fluorescensantistoftest, hvor man som et antigen anvendte N-proteiner udtrykt ved baculovirus-rekombinanter. Anvendelsen af systemet bliver måske mere udbredt og lettere, når der er udviklet en ELISA-test.

Anvendelse af vacciner, der udelukkende indeholder HA, f.eks. rekombinante vektorvacciner, muliggør klassiske AGID-test eller ELISA-test på basis af nukleoprotein, non-strukturelle proteiner eller matrixproteiner, der skal anvendes til at påvise infektioner hos vaccinerede fugle.

Hvad angår inaktiverede vacciner foreligger der beskrivelse af en test, der påviser antistoffer over for non-strukturelt virusprotein, som kun dannes ved en naturlig infektion. Et sådant system er endnu ikke blevet valideret ved anvendelse i praksis, men det har den begrænsning, at naturlig infektion af en flok med en influenzavirus, uanset subtype, medfører dannelse af antistoffer over for det non-strukturelle protein.

Udvikling af hurtige og følsomme viruspåvisningsmetoder, navnlig metoder, der kan automatiseres, f.eks. real-time RT-PCR, indebærer, at de kan anvendes til enkel, omfattende og regelmæssigt testning af vaccinerede fugle for forekomst af naturligt forekommende virus. Påvisning af agens vil imidlertid kun omfatte et kort moment i denne akutte infektionsfase og kan ikke anvendes til at konkludere, at en flok ikke tidligere har været eksponeret for virusset. Denne fremgangsmåde er bedst egnet til at teste vaccinerede fugle, inden de flyttes, for at påvise, at de er fri for aktiv infektion.

Antallet af prøver, der skal testes ved anvendelse af disse systemer, skal medføre, at man kan udelukke prævalens af AI-virusinfektion i en flok på over 15 % med en konfidens på 95 %.

KAPITEL X

Strategier ved AI-diagnosticering

Som fastsat i bilag IV til direktiv 2005/94/EF kan beslutninger om at anvende foranstaltninger i bestemte områder eller på kontaktbedrifter og foranstaltningernes strenghed i høj grad variere afhængigt af risikoens størrelse. På lignende vis vil den krævede diagnostiske bekræftelse af sygdommen normalt blive afvejet i forhold til de fremherskende forhold, farens størrelse og graden af risiko. Veterinærmyndighederne skal træffe beslutning om diagnostiske kendsgerninger, hvor hurtig sygdomsbekæmpelse og -udryddelse afvejes over for de potentielle konsekvenser af en fejldiagnose. Sådanne vurderinger skal foretages under samtidig hensyntagen til mange faktorer, men visse situationer kan forudses.

Sygdomssituation	Potentielt problem	Diagnostiske kriterier
Ikke-specifikke symptomer, ingen officiel mistanke	Isoleret bedrift	Der foretages hurtig påvisning baseret på M-gen-RT-PCR. Differentialdiagnosticering i fornødent omfang.
Mistanke om primærudbrud	Isoleret bedrift	Der gennemføres komplet diagnostisk test, virusisolation og karakterisering.
Mistanke om primærudbrud	Bedrift i område med høj fjerkræbelægningsgrad	Der gennemføres komplet diagnostisk test, virusisolation og karakterisering, men med fokus på hurtige påvisnings- og karakteriseringsmetoder, navnlig metoder baseret på RT-PCR og sekventering (1).
Mistanke om udbrud efterfølgende	Isolerede bedrifter med en epidemiologisk forbindelse til primærudbrud, der er omfattet af mistanke	Der fokuseres på hurtige påvisnings- og karakteriseringsmetoder, navnlig metoder baseret på RT-PCR og sekventering (1).
Mistanke om udbrud efterfølgende	Bedrifter i område med høj fjerkræbelægningsgrad eller med mange epidemiologiske forbindelser	Der anvendes hurtige påvisningsmetoder, der giver første dokumentation for forekomst af AI-virus (1).
Flere tilfælde af mistanke om udbrud eller hurtig sygdomsspredning på trods af overvågning	Spredning kan ikke holdes under kontrol uden hurtig indgriben	Der anvendes hurtige påvisningsmetoder, der giver første dokumentation for forekomst af AI-virus, eller der lægges vægt på kliniske tegn (1).

(1) Der bør foretages fuld prøveudtagning, og prøverne bør opbevares til senere evaluering.

KAPITEL XI

Diagnosticering af AI-virusinfektion hos svin og andre pattedyr

1. **AI hos svin**

AI-vira inficerer let svin, og skønt der i de fleste tilfælde kun er relativt begrænset replikation, kan inficerede svin muligvis overføre sygdommen til fjerkræ og andre modtagelige dyr. Der har ikke hidtil været naturligt forekommende eksempler på, at inficerede svin overfører AI-vira af subtype H5 og H7.

Erfaringerne fra udbruddet i Nederlandene i 2003 viste, at H7N7-inficerede svin ikke viste kliniske tegn, der kunne tilskrives H7N7-infektionen. Dertil kommer, at der tilsyneladende hidtil ikke er meldt om syge svin under H5N1-udbruddet i Asien og andre steder.

Derfor kan man ikke forlade sig på kliniske symptomer som tegn på, om svin er inficerede, selv om infektion af svin med andre influenzavira af aviær oprindelse kan give kliniske symptomer, når et virus har tilpasset sig værten. Diagnosticering af AI-virusinfektioner hos svin svarer i alt væsentligt til diagnosticering vedrørende fuglearter, idet der anvendes virusisolation, molekylære teknikker og påvisning af specifikke antistoffer ved anvendelse af hæmagglutinations-inhibitionstest. Der er dog visse forskelle, og ingen af testene er fuldt valideret til anvendelse på svin til bekræftelse af AI-virusinfektion.

2. **Prøver til virusisolation**

AI-virusinfektioner hos svin omfatter sædvanligvis kun luftvejene, og prøverne skal består af væv fra luftvejene, og, hvis det er relevant, svaberprøver fra svælg og næsebor, helst fra svin med tegn på den pågældende sygdom. Vævsprøverne og svaberprøverne kan forberedes til virusisolation eller molekylær påvisning af virus ved anvendelse af de teknikker, der er beskrevet ovenfor vedrørende prøver af fugle. Når der anvendes PCR-teknikker, skal man imidlertid sørge for korrekt kontrol for at sikre, af amplifikationen ikke hæmmes af stoffer i svineprøverne.

3. **Inokulation og rugning af æg**

For at isolere influenzavira fra pattedyr i 9-11 dage gamle befrugtede hønseæg er det almindelig praksis at inokulere hvert enkelt æg gennem allantoishulen ind i amnionhulen. Hvis man tester svin i kontakt med AI-vira, i tilfælde af at virus har haft ringe mulighed for at tilpasse sig, er det dog sandsynligvis tilstrækkeligt med inokulation af allantoishulen.

Ligeledes anbefales normalt 35 °C som rugetemperatur til isolation af influenza A-vira fra pattedyr, men når det drejer sig om vira, der kun i ringe grad har tilpasset sig svin, er 37 °C ikke til skade for virusisolationen.

4. **Test til påvisning af specifikke antistoffer ved HI-test**

Virusisolation eller molekylær påvisning er sandsynligvis de mest følsomme metoder til at konstatere AI-virusinfektion hos svin. Der er dog også konstateret serologiske reaktioner hos svin, når der ikke er anvendt virusisolation eller molekylær påvisning. HI-test, hvor der anvendes serum fra svin, forudsætter visse ændringer i forhold til den test, der anvendes til serum fra fugle, jf. kapitel VIII.

Svineserum er berygtet for at vise non-specifik inhibition ved HI-test, og de enkelte serumprøver skal derfor behandles med et receptornedbrydende enzym (RDE), så dette ikke sker. Følgende metode skal anvendes:

a) Til 100 µl svineantiserum tilsættes 400 µl RDE (forudfastsat arbejdsfortynding), og der blandes grundigt.

b) Der inkuberes ved 37 °C i en time.

c) Der inkuberes dernæst i 30 minutter ved 56 °C.

d) Prøverne nedkøles ved 4 °C i mindst 15 minutter.

e) Der tilsættes 10 µl 30 % (v/v pakkede celler) røde blodlegemer fra celler, og der blandes kraftigt.

f) Der inkuberes ved 4 °C natten over. Hvis det er af afgørende betydning at anvende prøverne samme dag, inkuberes der som alternativ ved 37 °C i en time, og der centrifugeres ved 300 x g i fem minutter.

Det behandlede serum anvendes dernæst til HI-test som beskrevet vedrørende fugleserum i punkt [..], idet den første fortynding er 1:10. Der skal anvendes et sæt svinesera med en kendt sero-negativ-status med hensyn til AI til at vurdere HI-testens specificitet i forbindelse med den virusstamme, der skal benyttes (se anvendelse af virusstamme fra udbruddet til serologisk undersøgelse; kapitel VIII). Under udbruddet i Nederlandene i 2003 blev der påvist op til 2,6 % non-specifikke reaktorer ved den HI-test, hvor man anvender svinesera, der var indsamlet uafhængigt af udbruddet.

5. **Udtagning af prøver fra svin**

Navnlig på bedrifter, hvor der holdes både svin og fjerkræ, enten blandet eller i separate stalde, er der risiko for, at svin inficeres med AI direkte eller indirekte via kontakt med fjerkræ eller fjerkræprodukter. For at udelukke infektion tages der svaberprøver fra svælg og næsebor og blodprøver i henhold til de procedurer, der er beskrevet i kapitel IV, punkt 8.21. Prøverne tages fra svin, der udviser kliniske tegn på sygdommen. Hvis de imidlertid ikke udviser nogen kliniske tegn, kan prøverne tages tilfældigt alle steder i stalden. Hvis laboratoriet har mulighed for det, testes svaberprøverne med hurtige molekylære test og/eller virusisolation. RT-PCR skal i forvejen være korrekt valideret og have en følsomhed, der mindst svarer til virusisolation i æg til påvisning af influenza A-vira.

2-4 uger efter aflivning af det AI-inficerede fjerkræ tages der mindst 60 blodprøver fra svin, således at i hvert fald nogle af prøverne tages fra grupper af svin, der er i direkte kontakt med hinanden. Prøverne testes med HI-test med anvendelse af virus fra det pågældende udbrud hos fjerkræ. I samme test skal der testes prøver fra såvel den akutte fase som rekonvalescensfasen. Positive prøver kan bekræftes med anvendelse af virusneutralisationstest og/eller Western blotting.

Hvis nogle af prøverne tester positive, skal der gennemføres en epidemiologisk undersøgelse af alle svinebedrifter, der ligger i beskyttelseszonen, uanset om der er tale om blandede besætninger eller ej.

6. **AI-vira i andre pattedyr end svin**

Der skal foretages undersøgelser af andre pattedyr end svin, som er modtagelige for AI, herunder katte. Med særlig reference til HPAI H5N1 foretages følgende i forbindelse med test af katte:

Store patologiske læsioner forbundet med virusreplikation er koncentreret i lunger og lever. Derfor er det bedst at udtage prøver til virologiske undersøgelser fra disse organer fra døde dyr. Hos levende dyr er det bedst at tage svaberprøver fra luftrør og svælg til viruspåvisning. Desuden kan der tages separate fækale svaberprøver.

Blodprøver, der skal undersøges ved HI-test, varmebehandles ved 56 °C i 30 minutter, mens RDE-behandling kan udelades.

KAPITEL XII

Minimumskrav til sikkerheden ved transport af prøver

1. Transport af prøver, i hvilke man ved eller har mistanke om, at der forekommer patogener, er underlagt strenge nationale og internationale forskrifter, der til stadighed skal overholdes. Virusisolater er ikke klassificeret som diagnoseprøver, men de skal emballeres ifølge internationale standarder.

Instrukserne i dette kapitel gælder for lufttransport, men lignende emballage skal anvendes ved transport af prøver ad landevejen eller søvejen.

2. **Emballering af diagnoseprøver med henblik på transport**

Diagnoseprøver, der transporteres i henhold til IATA-forskrifterne, har identifikationsnumrene UN 2814, 2900 eller 3373, alt efter hvad der er relevant.

Det er afsenderen — ikke transportvirksomheden — der har ansvaret for sendingen, indtil den når frem til modtageren.

3. **Primæremballage**

a) Primærbeholderen/-beholderne skal være vandtætte; f.eks. skal skruelåg forsegles med parafilm eller tape, eller der anvendes lignende beskyttelse.

b) Hvis der er flere primærbeholdere, indpakkes de individuelt for at hindre, at de går itu.

c) Ved bestemmelse af mængden af diagnoseprøver, der afsendes, skal virustransportmediet medregnes.

d) Primærbeholderen/-beholderne må højst indeholde 500 ml eller 500 g.

Primærbeholderen må ikke indeholde andet end diagnoseprøven.

4. **Sekundæremballage**

a) Der skal anvendes tilstrækkeligt absorberende materiale i sekundærbeholderen til at opsuge alt indhold af alle primærbeholdere i tilfælde af lækage eller skade.

b) Sekundæremballagen skal opfylde IATA's emballagekrav til diagnoseprøver, herunder faldprøven på 1,2 m (3,9 engelske fod). Da kravene til emballage for infektiøse stoffer er strengere end kravene til emballage for diagnoseprøver, jf. IATA's emballeringsforskrift 602, kan disse anvendes.

c) Emballage for infektiøse stoffer skal være forsynet med den foreskrevne specifikationsmærkning på emballagen (»UN« skal være anbragt i en cirkel): Eksempel:

»UN 4G/CLASS 6.2/99/GB/2450«

d) Sekundæremballagen skal være vandtæt. Emballageproducentens eller andre autoriserede parters emballeringsforskrifter, der følger med sekundæremballagen, skal følges.

e) Sekundæremballagens mindste ydre mål skal være mindst 100 mm (fire engelske tommer).

f) Sekundæremballagen skal være stor nok til forsendelsesdokumenter, f.eks. et luftfragtbrev.

5. **Ydre emballage**

a) Den ydre emballage må højst indeholde 4 l eller 4 kg.

b) Om fornødent placeres tøris eller våd is uden for sekundæremballagen. Hvis der anvendes tøris, skal emballagen tillade udslip af kuldioxid, og den må ikke tillade, at der opbygges et tryk, der kan få emballagen til at gå i stykker. Hvis der anvendes våd is, skal emballagen være lækagesikker.

Hver enkelt emballage og luftfragtbrevet skal være forsynet med eksakt følgende ordlyd:

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

c) En specificeret liste over indholdet skal vedlægges mellem sekundæremballagen og den ydre emballage.

d) Den ydre emballage skal placeres i en forseglet plasticpose som beskyttelse mod fugt.

e) Transportdokumentet »Shipper's Declaration for Dangerous Goods« er ikke påkrævet.

KAPITEL XIII

Forsendelse af vira og prøver til EF-referencelaboratoriet

1. Prøver, der skal sendes til EF-referencelaboratoriet, skal efterkomme de henstillinger, der gælder for transport af farlige patogener i EU, samt forskrifter og andre gældende bestemmelser i Det Forenede Kongerige.

Instrukserne i dette kapitel skal følges.

2. **Forsendelse af vira og andet materiale til EF-referencelaboratoriet**

a) Alt materiale skal emballeres i overensstemmelse med instrukserne i dette kapitel.

b) Den ydre emballage forsynes med følgende:

»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) Et af følgende licensnumre indsættes:

i) for AI-vira: **»AHZ/2232/2002/5*«**

ii) for væv og andet materiale: **»AHZ/2074C/2004/3*«.**

Eftersom licensnumrene af og til ændres, skal laboratorier, der afsender prøver, inden afsendelsen sikre sig, at de anvender de aktuelle licensnumre.

d) Pakken adresseres til:

Avian Virology
VLA Weybridge,
New Haw, Addlestone,
Surrey KT15 3NB
United Kingdom

e) Med pakken sendes der et følgebrev, der indeholder så mange baggrundsoplysninger om isolaterne som muligt, f.eks. art og alder, område/land, hvor isolation har fundet set og evt. klinisk historie.

f) Pakkerne skal sendes som luftpost eller luftfragt.

Hvis pakkerne sendes som luftfragt, skal EF-referencelaboratoriet have besked om luftfragtbrevets nummer pr. fax, telefon eller e-mail, inden materialet ankommer.

Pakker, der sendes som luftfragt, skal tydeligt mærkes således:

»**CARE OF TRANSGLOBAL**« for at sikre hurtig ekspedition i lufthavnen.

Kontaktpersoner på EF-referencelaboratoriet:

Ian H. Brown, direktør for referencelaboratoriet
Direkte telefon: (44-1932) 35 73 39
Direkte fax: (44-1932) 35 72 39
E-mail: i.h.brown@vla.defra.gsi.gov.uk

Ruth Manvell, leder af referencelaboratoriet
Direkte telefon: (44-1932) 35 77 36 eller (44-1932) 35 77 08
Direkte fax: (44-1932) 35 78 56
E-mail: r.manvell@vla.defra.gsi.gov.uk

KAPITEL XIV

Minimumskrav til sikkerheden på et AI-diagnosticeringslaboratorium

1. Sikkerhedskravene på diagnostiske laboratorier, der arbejder med AI-vira, skal omfatte såvel indeslutning af vira som en trussel mod dyresundheden og beskyttelse af dem, der arbejder på (og uden for) laboratoriet, mod eventuelle zoonotiske risici.

I EU er der i en række direktiver fastsat minimumskrav til sikkerheden på laboratorier. Der er desuden beskrevet og fastlagt operationelle aspekter i dertil knyttede europæiske standarder (EN). Hvad angår driften af laboratorier til diagnosticering findes der supplerende forskrifter (EN), f.eks. god laboratoriepraksis.

2. **EF-direktiver om laboratorier**

Rådets direktiv 89/391/EØF af 12. juni 1989 om iværksættelse af foranstaltninger til forbedring af arbejdstagernes sikkerhed og sundhed under arbejdet (EFT L 183 af 29.6.1989, s. 1).

Rådets direktiv 90/679/EØF af 26. november 1990 om beskyttelse af arbejdstagerne mod farerne ved at være udsat for biologiske agenser under arbejdet (syvende særdirektiv i henhold til artikel 16, stk. 1, i direktiv 89/391/EØF) (EFT L 374 af 31.12.1990, s. 1).

Hvis en diagnose stilles ved hjælp af polymerasekædereaktion (PCR) og kloning af PCR-produkter i et bakterieplasmid med henblik på formering, f.eks. til DNA-sekventering, anvendes følgende direktiv og europæiske standarder (EN) som supplement til de to nævnte direktiver:

Rådets direktiv 90/219/EØF af 23. april 1990 om indesluttet anvendelse af genetisk modificerede mikroorganismer (EFT L 117 af 8.5.1990, s. 1).

3. Som supplement til EF-direktiverne tages følgende europæiske standarder (EN) i betragtning:

EN 12128 Bioteknologi. Forsknings-, udviklings- og analyselaboratorier. Indeslutningsniveauer (laboratorieklasser) for mikrobiologiske laboratorier, arbejdsområder og -steder og fysiske sikkerhedskrav.

EN 12738 Bioteknologi. Forsknings-, udviklings- og analyselaboratorier. Vejledning i indeslutning af dyr inficeret med mikroorganismer i forsøg.

EN 12740 Bioteknologi. Forsknings-, udviklings- og analyselaboratorier. Vejledning for håndtering, inaktivering og prøvning af affald.

EN 12741 Bioteknologi. Forsknings-, udviklings- og analyselaboratorier. Vejledning for bioteknologisk laboratoriepraksis.

For drift/ledelse af et laboratorium gælder følgende betingelser:

4. **Krav til laboratorier (indeslutningsniveau 1-4)**

Som fastsat i Europa-Parlamentets og Rådets **direktiv 2000/54/EF** af 18. september 2000 om beskyttelse af arbejdstagerne mod farerne ved at være udsat for biologiske agenser under arbejdet (syvende særdirektiv i henhold til artikel 16, stk. 1, i direktiv 89/391/EØF)(EFT L 262 af 17.10.2000, s. 21), direktiv 90/219/EØF og de europæiske standarder EN 12128, EN 12740 og EN 12741.

Indeslutningsforanstaltninger	Indeslutningsniveauer			
	1	2	3	4
Laboratorieområde: isolation	nej	ja	ja	ja
Laboratorier adskilt af døre	nej	ja	ja	ja
Krav om et observationsvindue eller en anden metode til at se personerne i lokalet	valgfrit	valgfrit	valgfrit	ja
Personalet have skal mulighed for at vaske hænder	ja	ja	ja	ja
Der skal være mulighed for desinfektion (hænder)	valgfrit	ja	ja	ja
Område med begrænset adgang	nej	ja	ja	ja
Særlige foranstaltninger for at få aerosoldannelse under kontrol	nej	ja, reduceres mest muligt	ja, forhindres	ja, forhindres
Skilt om biologiske risici på døren	nej	ja	ja	ja
Brusebad	nej	nej	valgfrit	ja
Øjenskylning	ja	ja	ja	ja
Laboratorium: skal kunne forsegles for at muliggøre gasning	nej	nej	ja	ja
Overfladerne skal være resistente over for vand, syrer, alkalier, opløsningsmidler, desinfektionsmidler, dekontamineringsagenser samt lette at rengøre	ja (bord)	ja (bord)	ja (bord, gulv)	ja (bord, gulv)
Adgang til laboratorium via luftsluse	nej	nej	valgfrit	ja
Undertryk i forhold til trykket i den umiddelbare omgivelse	nej	nej	valgfrit	ja
Luftind- og -udsugning fra laboratoriet skal være HEPA-filtreret	nej	nej	ja (luftudsugning)	ja
Autoklave	på stedet	i bygningen	i laboratorieområdet	i laboratoriet = gennemgang

Indeslutningsforanstaltninger	Indeslutningsniveauer			
	1	2	3	4
Beskyttelsesbeklædning	passende beskyttelsesbeklædning	passende beskyttelsesbeklædning	passende beskyttelsesbeklædning og (valgfrit) -fodtøj	fuldstændigt skift af beklædning
Handsker	nej	valgfrit	ja	ja
Effektiv vektorbekæmpelse (f.eks. af gnavere og insekter)	valgfrit	ja	ja	ja
Sikker opbevaring af en biologisk agens	ja	ja	ja	ja
Laboratoriet skal have sit eget udstyr	nej	nej	anbefalet	ja

Der findes yderligere europæiske standarder, der vedrører laboratoriers ledelse og organisation.

Der findes andre nationale og internationale forskrifter og anbefalinger, der skal følges. WHO har offentliggjort sin »Laboratory Biosafety Manual 3rd Edition« på sit websted:

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

5. **Indeslutning af relevans for dyresundhed**

Medlemsstaternes veterinærmyndigheder skal fastsætte forskrifter vedrørende indeslutning af AI-vira, især HPAI, men desuden også alle AI-vira af subtype H5 og H7. I kapitel 1.4.5 i Terrestrial Animal Health Code 2005 fra Verdensorganisationen for Dyresundhed (OIE) gives der visse anbefalinger, og HPAI betragtes som et patogen i OIE's indeslutningsgruppe 4.

Det er op til medlemsstatens veterinærmyndigheder at fastsætte forskrifter for håndtering af AI-vira.

De minimumskrav til sikkerheden, der gælder for EF-referencelaboratoriet, og som er nationale bestemmelser i Det Forenede Kongerige, kan ses på følgende websted:

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

6. **Indeslutning af relevans for menneskers sundhed**

Laboratorier, der arbejder med AI-vira, skal til stadighed være opmærksomme på, at viraene er i det mindste potentielt humane patogener, og laboratoriet skal drives, så man undgår infektion af dem, der arbejder på laboratoriet, og undgår udslip af virus til mennesker uden for laboratoriet.

På WHO's websted finder der retningslinjer for håndtering af prøvemateriale, der er mistænkt for at indeholde AI-A-virus:

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