II

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

COMMISSIE

BESCHIKKING VAN DE COMMISSIE

van 25 februari 1991

tot vaststelling van de voorschriften voor de standaardisatie van materialen en methoden voor de veterinaire tests en van de voorwaarden voor de erkenning van de markten in het kader van de invoer van als huisdier gehouden runderen en varkens uit derde landen

(91/189/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

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

Gelet op Richtlijn 72/462/EEG van de Raad van 12 december 1972 inzake gezondheidsvraagstukken en veterinairrechtelijke vraagstukken bij de invoer van runderen en varkens en van vers vlees of van vleesprodukten uit derde landen (1), laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 91/69/EEG (2), inzonderheid op artikel 8, lid 1,

Overwegende dat op grond van Richtlijn 72/462/EEG uit de derde landen die in de aan Beschikking 79/542/EEG van de Raad (3), laatstelijk gewijzigd bij Beschikking 90/485/EEG (4), gehechte lijst zijn opgenomen, runderen en varkens mogen worden ingevoerd;

Overwegende dat de voor de invoer van levende dieren uit een derde land geldende veterinairrechtelijke voorschriften op de dierziektesituatie in het betrokken derde land dienen te worden afgestemd;

Overwegende dat, alhoewel deze veterinairrechtelijke voorschriften van land tot land kunnen verschillen, de protocollen voor veterinaire tests en de voorwaarden voor de erkenning van in derde landen gelegen markten voor de handel in dieren die naar de Gemeenschap worden uitgevoerd, voor alle derde landen gelden;

Overwegende dat het, met het oog op vereenvoudiging van de beschikkingen inzake de bij de invoer van als huisdier gehouden runderen en varkens uit derde landen geldende veterinairrechtelijke voorschriften, dienstig voorkomt naar slechts één gemeenschappelijke beschikking te verwijzen waarin de protocollen voor veterinaire tests en de voorwaarden voor de erkenning van markten zijn vastgelegd;

Overwegende dat een beschikking inzake de protocollen voor veterinaire tests en de voorwaarden voor de erkenning van markten in derde landen slechts zal gelden voor een derde land waarvoor een beschikking is vastgesteld waarin met de in dat derde land heersende diergezondheidstoestand rekening wordt gehouden;

Overwegende dat de in deze beschikking vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Permanent Veterinair Comité,

HEEFT DE VOLGENDE BESCHIKKING GEGEVEN:

Artikel 1

1. Deze beschikking betreft de vaststelling van de protocollen voor veterinaire tests en de voorwaarden voor de

(1) PB nr. L 302 van 31. 12. 1972, blz. 28.
(2) PB nr. L 46 van 19. 2. 1991, blz. 37.
(3) PB nr. L 146 van 14. 6. 1979, blz. 15.
(4) PB nr. L 267 van 27. 9. 1990, blz. 46.

erkenning van in derde landen gelegen markten voor de handel in dieren die naar de Gemeenschap worden uitgevoerd, meer in het bijzonder met betrekking tot de invoer van levende runderen en varkens uit derde landen die in de aan Beschikking 79/542/EEG gehechte lijst zijn opgenomen.

2. De in de bijlagen I en II bij deze beschikking vastgestelde bepalingen gelden uitsluitend voor derde landen waarvoor voor elk geval beschikkingen inzake veterinairrechtelijke voorschriften als bedoeld in artikel 8 van Richtlijn 72/462/EEG vastgesteld.

Artikel 2

Deze beschikking is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 25 februari 1991.

Voor de Commissie

Ray MAC SHARRY

Lid van de Commissie

BIJLAGE I

VOORSCHRIFTEN VOOR DE STANDAARDISATIE VAN MATERIAAL EN METHODEN VOOR DE TESTS

HOOFDSTUK I

Runderen

1. *Tuberculose*

De enkelvoudige intradermale tuberculinetest met boviene tuberculine wordt uitgevoerd overeenkomstig bijlage B bij Richtlijn 64/432/EEG van de Raad van 26 juni 1964 inzake veterinaire vraagstukken op het gebied van het intracommunautaire handelsverkeer in runderen en varkens (1).

2. *Brucellose*

De serumagglutinatietest en de complementbindingsreactie worden uitgevoerd overeenkomstig bijlage C, onder A en B, bij Richtlijn 64/432/EEG.

3. *Enzoötische boviene leukose*

De agargel-immunodiffusietest wordt uitgevoerd overeenkomstig bijlage G bij Richtlijn 64/432/EEG.

4. *Bluetongue*

A. De „blocking" of „competitie Elisa" wordt uitgevoerd overeenkomstig de onderstaande voorschriften.

Met de competitie Elisa met gebruikmaking van monoclonaal antilichaam 3-17-A3 kunnen antilichamen tegen alle bekende serotypen van het bluetonguevirus (BTV) worden opgespoord.

Het principe van de test is de onderbreking van de reactie tussen BTV-antigeen en een groepspecifiek monoclonaal antilichaam (3-17-A3) door toevoeging van verdunningen van het serum. De in het testserum aanwezige antilichamen tegen BTV blokkeren de reactiviteit van het monoclonale antilichaam (MCA) en leiden tot een vermindering van de verwachte kleurontwikkeling bij toevoeging van enzymsubstraat.

Materiaal en reagentia

1. Microtiterplaatjes met vlakke bodem.
2. Antigeen: bereid zoals hierboven beschreven.
3. Blokkeerbuffer: 5 % (m/v) „Marvel" gedroogd melkpoeder, 0,1 % (v/v) Tween-20 (geleverd als polyoxyethyleensorbitonmonolauraatsiroop) in PBS.
4. Monoclonaal antilichaam: 3-17-A3 (geleverd in de vorm van supernatant van hybridoma-weefselcultuur) opgeslagen bij – 20 °C of gevriesdroogd, vóór gebruik verdund tot 1/50 met een blokkeerbuffer, en gericht tegen het groepspecifieke polypeptide p7.
5. Conjugaat: konijn-antimuis-globuline (geadsorbeerd en geëlueerd) geconjugeerd met mierikswortelperoxidase en in het donker bewaard bij 4 °C.
6. Substraat en chromogeen: 0,2 g orthofenyleendiamine (OPD), opgelost in een buffer bestaande uit 2,553 g citroenzuur en 4,574 g dinatrium hydrogeenorthofosfaat waaraan tot 500 ml gedistilleerd water is toegevoegd, verdeeld in fracties van elk 25 ml en in het donker bewaard bij – 20 °C, waaraan onmiddellijk voor gebruik 12 µl/25 ml waterstofperoxide (30 % m/v) wordt toegevoegd.

Voorzichtig met orthofenyleendiamine — gebruik rubberen handschoenen — vermoedelijk mutageen

7. 1 M zwavelzuur: 26,6 ml zuur toegevoegd aan 473,4 ml gedistilleerd water.

*Let op! Steeds zuur toevoegen aan water, **nooit** water aan zuur.*

(1) PB nr. 121 van 29. 7. 1964, blz. 1977/64.

8. Rondschudapparaat.

9. Elisa-afleesapparaat (de test kan ook visueel worden afgelezen).

Proefopstelling

	H	G	F	E	D	C	B	A	
Blanco			Antigeen + conjugaat						1
MCA-controle		Antigeen + MCA + conjugaat							2
Positieve controle	1/2	Antigeen + positief serum + MCA + conjugaat 1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	3
	1/2	Testsera 1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	4
									5
									6
Testsera									7
									8
									9
									10
									11
									12

Protocol

Blanco controle

Rij 1 A-H is een blanco controle, bestaande uit BTV-antigeen en conjugaat. Deze kan worden gebruikt om de nulwaarde in te stellen op het Elisa-afleesapparaat.

MCA-controle

Rij 2 A-H is de MCA-controle en bestaat uit BTV-antigeen, monoclonaal antilichaam en conjugaat. Dit vormt een negatieve controle. Het gemiddelde van de gemeten optische dichtheid van deze controlerij is de 0 % inhibitiewaarde.

Positieve controle

Rij 3 A-H is de positieve controle. Deze bestaat uit BTV-antigeen, voor BTV positieve verdunningen van het antiserum, monoclonaal antilichaam en conjugaat. Deze controle wordt in de test opgenomen om na te gaan of de test goed functioneert en voor alle tests zouden analoge inhibitieniveaus moeten worden verkregen.

Testsera

Bij de hierboven beschreven proefopstelling kunnen 18 sera worden getest in de verdunningen 1/2, 1/4, 1/8 en 1/16. Dit geeft een indicatie van de antilichaamtiter in de testsera. De verdunningsreeks zou verder kunnen worden uitgebreid ter verkrijging van de eindpunttiters van de serumverdunning. Anderzijds zouden, in het kader van een serologisch onderzoek op grote schaal, sera in een enkele verdunning (1/4) of in twee verdunningen (1/2 en 1/4) kunnen worden getest als een snelle screeningstest.

Procedure

1. Verdun BTV-antigeen tot een vooraf bepaalde concentratie in PBS, bewerk kort met ultrasone trillingen ten einde samengekit virus te scheiden (indien geen ultrasoonapparaat beschikbaar is, moet krachtig worden gepipetteerd) en voeg 50 µl toe aan alle putjes van de Elisa-plaat. Tik tegen de zijkanten van de plaat om het antigeen te verspreiden.

2. Incubeer bij 37 °C gedurende 60 minuten op een rondschudapparaat. Spoel de platen driemaal door de putjes met niet-steriele PBS te vullen en weer te ledigen en dep de plaatjes droog op absorberend papier.

3. Voeg 50 µl blokkeerbuffer toe per putje. Voeg de testsera en het positieve serum toe aan de daarvoor bestemde putjes en verdun alle putjes met gebruik van een meerkanaalspipet. Voeg geen sera toe aan de blanco controle of de MCA-controle.

4. Dilueer MCA's in de blokkeerbuffer (totdat een vooraf getitreerde verdunning is bereikt) onmiddellijk nadat de testsera zijn toegevoegd; breng vervolgens 50 µl daarvan over in alle putjes in de plaat, behalve in de blanco controle.

5. Incubeer bij 37 °C gedurende 60 minuten op een rondschudapparaat, spoel vervolgens driemaal met PBS en dep de plaatjes droog.

6. Verdun konijn-antimuis-concentraat tot 1/5000 in de blokkeerbuffer en breng 50 µl over in alle putjes van de plaat.

7. Incubeer bij 37 °C gedurende 60 minuten op een rondschudapparaat. Spoel driemaal met PBS en dep de plaatjes droog.

8. Ontdooi de OPD en voeg onmiddellijk voor gebruik 12 µl 30 %-ige waterstofperoxide-oplossing toe per 25 ml OPD. Breng 50 µl daarvan over in alle putjes van de plaat. Laat de kleur ontwikkelen gedurende ongeveer tien minuten en stop de reactie met 1 M zwavelzuur (50 µl per putje). Kleurontwikkeling zou moeten plaatsvinden in de controleputjes met MCA en in de putjes met serum **zonder** antilichamen tegen BTV.

9. Onderzoek de platen en registreer de resultaten hetzij visueel hetzij met behulp van een spectrofotometer.

Analyse van de resultaten

Bereken het gemiddelde van het OD-resultaat van de MCA-controles. Dit is de 0 %-inhibitiewaarde. De gemeten optische dichtheid van de testsera wordt uitgedrukt in procentuele inhibitiewaarden, aan de hand van de volgende formule:

$$\text{Percentage inhibitiewaarde} = 100 - \frac{\text{OD in aanwezigheid van testserum}}{\text{OD in afwezigheid van testserum}} \times 100.$$

Inhibitiewaarden van meer dan 40 % bij een serumverdunning van 1/4 worden als positief beschouwd. Visuele aflezing is mogelijk aangezien 40 % inhibitie de laagste waarde is die gemakkelijk met het blote oog kan worden waargenomen.

Bereiding van het BTV-Elisa-antigeen

1. Spoel tien rouxkolven die confluente BHK-21-celcultures bevatten, driemaal met een serumvrij Eagle's medium en besmet deze met bluetonguevirus serotype 1 in serumvrij Eagle's medium.

2. Incubeer bij 37 °C en onderzoek dagelijks op cytopathogeen effect (cpe).

3. Wanneer 80—90 % van de cellaag in elke rouxkolf duidelijk een cpe vertoont, verzamel dan het virus door mogelijk nog aan het glas vastgehechte cellen los te schudden.

4. Centrifugeer bij 2 000—3 000 omwentelingen per minuut ten einde de cellen neer te slaan.

5. Verwijder het supernatant en resuspendeer de cellen in ongeveer 30 ml PBS, met 1 % „Sarkosyl" en 2 ml fenolmethylsulfonylfluoride (lysis-buffermengsel). Dat kan ertoe leiden dat de cellen een gel vormen en om dit effect tegen te gaan kan meer lysis-buffermengsel worden toegevoegd.

   NB: fenylmethylsulfonylfluoride is schadelijk — hanteer met uiterste voorzichtigheid.

6. Breek de cellen gedurende 60 seconden met een ultrosoonsonde bij een amplitude van 30 micron.

7. Centrifugeer bij 10 000 omwentelingen per minuut gedurende tien minuten.

8. Bewaar het supernatant bij +4 °C en resuspendeer de resterende celpellet in 10—20 ml lysis-buffermengsel.

9. Bewerk met ultrasone trillingen en laat uitklaren, waarbij het supernatant in elk stadium wordt opgeslagen, in totaal driemaal.

10. Voeg de supernatants samen en centrifugeer bij 24 000 omwentelingen per minuut gedurende 120 minuten bij +4 °C op een 5 ml-kussen van 40 %-ige sucrose (m/v in PBS), met gebruikmaking van Beckmann-centrifugeerbuisjes van 30 ml en een SW 28-rotor.

11. Giet het supernatant weg, verwijder de vloeistof grondig uit de buisjes en resuspendeer de pellet in PBS met het ultrasoonapparaat. Sla het antigeen op in gelijke fracties bij −70 °C.

Titrering van BTV-Elisa-antigeen

Bluetongue Elisa-antigeen wordt getitreerd met de indirecte Elisa. Duplo verdunningen van het antigeen worden getitreerd tegen een constante verdunning (1/50) van monoclonaal antilichaam 3-17-A3. Voor de test gelden de onderstaande voorschriften.

Procedure

1. Verdun BTV-antigeen in PBS over de volledige microtiterplaat met een meerkanaalspipet; leg de verdunningsreeks aan in duplo (50 µl per putje).

2. Incubeer gedurende één uur bij 37 °C op een rondschudapparaat.

3. Spoel de platen driemaal met PBS.

4. Voeg 50 µl monoclonaal antilichaam 3-17-A3 (in een verdunning 1/50) toe aan elk putje van de microtiterplaat.

5. Incubeer gedurende één uur bij 37 °C op een rondschudapparaat.

6. Spoel de platen driemaal met PBS.

7. Breng 50 µl konijn-antimuis-globuline, geconjugeerd met mierikswortelperoxidase en verdund tot een vooraf bepaalde optimale concentratie, over in elk putje van de microtiterplaat.

8. Incubeer gedurende één uur bij 37 °C op een rondschudapparaat.

9. Voeg substraat en chromogeen toe zoals hierboven beschreven. Zet de reactie stop na tien minuten door toevoeging van 1 M zwavelzuur (50 µl per putje).

Bij de competitietest dient een teveel aan monoclonaal antilichaam aanwezig te zijn; daarom wordt een verdunning van het antigeen gekozen die ligt op de titratiecurve (niet op het horizontale gedeelte), wat ongeveer 0,8 OD geeft na tien minuten.

B. De agargel-immunodiffusietest wordt uitgevoerd overeenkomstig onderstaande voorschriften.

Materiaal en reagentia

Antigeen

Precipiterend antigeen wordt bereid in een celcultuur die geschikt is voor de snelle vermeerdering van een referentiestam van het bluetonguevirus. Bij voorkeur wordt hiervoor gebruik gemaakt van BHK- of Vero-cellen. Het antigeen bevindt zich in het aan het einde van de virusgroei verkregen supernatant, maar moet 50 tot 100 keer worden geconcentreerd om effectief te zijn. Daartoe kan om het even welke gestandaardiseerde methode voor eiwitconcentratie worden gebruikt; het virus in het antigeen kan worden geïnactiveerd door toevoeging van 0,3 % (v/v) beta-propiolacton.

Positief controleserum

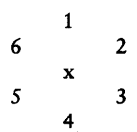
Met gebruikmaking van het internationale referentie-antiserum en -antigeen wordt een nationaal standaardserum geproduceerd, dat voor een optimale verhouding wordt gestandaardiseerd ten opzichte van het internationale referentieserum; vervolgens wordt het gevriesdroogd en bij iedere test als positief controleserum gebruikt.

Testserum

Procedure

1 %-ige agar, in een boraat- of natriumbarbituraatbuffer, pH 8,5 à 9,0, wordt in een petrischaaltje gegoten, en wel zo dat het laagje agar een dikte heeft van ten minste 3,0 mm.

In de agar worden zeven vochtvrije putjes gemaakt, met een diameter van elk 5 mm. Eén putje ligt centraal en de zes andere liggen er omheen in een cirkel met een straal van 3 mm:



Het centrale putje wordt gevuld met het standaardantigeen. De perifere putjes 2, 4 en 6 worden gevuld met het positieve controleserum en de putjes 1, 3 en 5 met het testserum.

Het geheel wordt gedurende 72 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd in een gesloten vochtige kamer.

Interpretatie

Een testserum is positief indien het een specifieke precipitatielijn vormt met het antigeen en een volledig identieke lijn met het controleserum. Een testserum is negatief indien het geen specifieke lijn vormt met het antigeen en indien het de lijn van het controleserum niet buigt. De petrischaaltjes moeten worden bekeken bij donkerveldbelichting met indirect licht.

5. *Epizoötische hemorragische ziekte*

De agargel-immunodiffusietest wordt uitgevoerd overeenkomstig de onderstaande voorschriften.

Materiaal en reagentia

Antigeen

Precipiterend antigeen wordt bereid in een celcultuur die geschikt is voor de snelle vermeerdering van het passende serotype van het virus van epizoötische hemorragische ziekte. Bij voorkeur wordt hiervoor gebruik gemaakt van BHK- of Vero-cellen. Het antigeen bevindt zich in het aan het einde van de virusgroei verkregen supernatant, maar moet 50 tot 100 keer worden geconcentreerd om effectief te zijn. Daartoe kan om het even welke gestandaardiseerde methode voor eiwitconcentratie worden gebruikt; het virus in het antigeen kan worden geïnactiveerd door toevoeging van 0,3 % (v/v) beta-propiolacton.

Positief controleserum

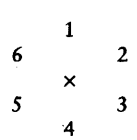
Met gebruikmaking van het internationale referentie-antiserum en -antigeen wordt een nationaal standaardserum geproduceerd, dat voor een optimale verhouding wordt gestandaardiseerd ten opzichte van het internationale referentieserum; vervolgens wordt het gevriesdroogd en bij iedere test als positief controleserum gebruikt.

Testserum

Procedure

1 %-ige agar, in een boraat- of natriumbarbituraatbuffer, pH 8,5 à 9,0, wordt in een petrischaaltje gegoten, en wel zo dat het laagje agar een dikte heeft van ten minste 3,0 mm.

In de agar worden zeven vochtvrije putjes gemaakt, met een diameter van elk 5 mm. Eén putje ligt centraal en de zes andere liggen er omheen in een cirkel met een straal van 3 mm:



Het centrale putje wordt gevuld met het standaardantigeen. De perifere putjes 2, 4 en 6 worden gevuld met het positieve controleserum en de putjes 1, 3 en 5 met het testserum.

Het geheel wordt gedurende 72 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd in een gesloten vochtige kamer.

Interpretatie

Een testserum is positief indien het een specifieke precipitatielijn vormt met het antigeen en een volledig identieke lijn met het controleserum. Een testserum is negatief indien het geen specifieke lijn vormt met het antigeen en indien het de lijn van het controleserum niet buigt. De petrischaaltjes moeten worden bekeken bij donkerveldbelichting met indirect licht.

6. *Leptospirose*

De micro-agglutinatietest wordt uitgevoerd overeenkomstig de onderstaande voorschriften.

Cultures

Worden bewaard in Korthof's en EMJH-medium bij 30 °C.

Antigeen

Moet 2 x 10^8 organismen per ml kweekmedium bevatten.

Test

Gelijke hoeveelheden antigeen en serum worden aangebracht op microtiterplaatjes met vlakke bodem; de hoeveelheden worden vermengd en vervolgens geïncubeerd bij 30 °C gedurende twee uur of bij 37 °C gedurende één à anderhalf uur; de reactie wordt afgelezen onder een donkerveldmicroscoop bij een vergroting van 60 à 100 ×.

Interpretatie

Het resultaat is negatief indien de agglutinatie minder dan 50 % bedraagd bij een verdunning van 1/50.

7. *Infectieuze boviene rhinotracheïtis/infectieuze pustuleuze vulvovaginitis* (IBR/IPV)

De serumneutralisatietest wordt uitgevoerd overeenkomstig de onderstaande voorschriften.

Serum

Vóór gebruik worden alle sera geïnactiveerd door blootstelling aan een temperatuur van 56 °C gedurende 30 minuten.

Procedure

De neutralisatietest met constant virus tegenover wisselende serumverdunningen wordt uitgevoerd door microtitrering, waarbij gebruik wordt gemaakt van MDBK of andere gevoelige cellen. De Colorado-, de Oxford- of een andere referentiestam van het virus wordt gebruikt in een concentratie van 100 $TCID_{50}$ per 0,025 ml; geïnactiveerde onverdunde serummonsters worden vermengd met een gelijke hoeveelheid (0,025 ml) virussuspensie. De virus/serummengsels worden gedurende één uur bij 37 °C geïncubeerd in microtiterplaatjes voordat de MDBK-cellen worden toegevoegd. De cellen worden gebruikt in een zodanige concentratie dat na 24 uur een volledige monolayer wordt gevormd.

Controles

Bepaling van het infectievermogen van het virus.
Controles op de toxiteit van het serum.
Controles van niet-geïnoculeerde celcultures.
Referentie-antisera.

Interpretatie

De resultaten van de neutralisatietest en de titer van het bij de test gebruikte virus worden afgelezen na een incubatieperiode van drie tot zes dagen bij 37 °C. De serumtiters worden als negatief beschouwd indien er geen neutralisatie is bij een verdunning van 1/2 (onverdund serum).

8. *Boviene virusdiarree (BVD)*

A. De virusisolatietest wordt uitgevoerd met inachtneming van de onderstaande voorschriften.

Testmateriaal en opsporingsmethoden

Gebruik wordt gemaakt van serum, buffy coat of bloedstolselsuspensies van recente bloedmonsters, die nog niet door verhitting zijn geïnactiveerd, afkomstig van runderen van meer dan zes maanden oud. Een immunologische merkingsmethode, bij voorbeeld immunofluorescentietechniek (IFT), of een op enzymwerking gebaseerde antilichaamtest, bij voorbeeld immunoperoxidase (IPX), wordt gebruikt voor de opsporing van BVD-virus in geïnoculeerde cultures.

Testreagentia

Voor de IFT is een met FITC geconjugeerd specifiek BVD-antiserum vereist. Voor de IPX-test zijn een niet-geconjugeerd specifiek anti-BVD-serum van boviene oorsprong, een met peroxidase geconjugeerd antibovien antiserum en een passend enzymsubstraat (bij voorbeeld 3-amino-9-ethylcarbazol) vereist. Een anti-BVD-serum dat is gekweekt in een andere diersoort dan runderen, mag worden gebruikt, op voorwaarde dat het peroxidaseconjugaat gericht is tegen de serumglobinen van de betrokken soort. De specificiteit van de gebruikte antivirale sera moet zijn bewezen en de sera moeten een uitgebreide reactiviteit vertonen.

Procedure

Voor de test wordt gebruik gemaakt van gevoelige cellen, met name boviene turbinaatcellen, kalfsniercellen of kalfstestikelcellen die vrij zijn van endogeen BVD-virus.

Serummonsters — het testserum en de weefselcultuurcellen worden overgebracht op cultures op dekplaatjes, in putjes van microtiterplaatjes of in een ander recipiënt, op zodanige wijze dat de uiteindelijke verdunning van het serum 10 % bedraagt.

Buffy coat en bloedstolsel — de monsters worden gedurende één uur bij 37 °C toegevoegd aan confluente celcultures in monolayer, vervolgens worden de cultures gespoeld en bedekt met kweekmedium dat 10 %-ig BVD-vrij kalverfoetusserum bevat.

De cultures worden dan geïncubeerd bij 37 °C, gefixeerd en gemerkt met behulp van de IFT of de IPX.

Controles

Positieve BVD-viruscontrole.
Negatieve controles zonder toegevoegd virus.

Interpretatie

De IFT wordt gemerkt na incubatie gedurende vier à zes dagen en wordt afgelezen bij ultraviolet licht. Fluorescentie in de met het testmonster geïncubeerde cellen wordt als positief geschouwd.

De IPX wordt gemerkt na incubatie gedurende vier dagen en afgelezen bij een lichtmicroscoop. Donkerbruine verkleuring in het cytoplasma van enkele cellen wordt als positief beschouwd.

B. De serumneutralisatietest wordt uitgevoerd overeenkomstig de onderstaande voorschriften.

Serum

Vóór gebruik worden de sera geïnactiveerd door blootstelling aan een temperatuur van 56 °C gedurende 30 minuten.

Procedure

De test wordt uitgevoerd op microtiterplaatjes met een constant virus tegenover wisselende serumverdunningen, met gebruikmaking van geschikte seriematig doorgekweekte gevoelige boviene cellen (b.v. boviene turbinaatcellen als omschreven door McClurkin e.a., 1974, Arch. ges. Virusforsch., 45, 285-289).

Het is essentieel dat alle reagentia en cellen vrij zijn van bijkomend verontreinigend niet-cytopathogeen BVD/MD-virus. Het testvirus, van om het even welke geschikte cytopathogene referentiestam (b.v. de NADL-stam), wordt gebruikt in een concentratie van 100 $TCID_{50}$ per 0,025 ml. Verdunningen van geïnactiveerd serum worden vermengd met gelijke volumes virussuspensie (0,025 ml) en de virus/serummengsels worden gedurende één uur bij 37 °C geïncubeerd voordat gelijke volumes celsuspensie worden toegevoegd. De cellen worden gebruikt in een zodanige concentratie dat binnen twee dagen een volledige monolayer wordt gevormd.

Controles

Bepaling van het infectievermogen van het virus.
Controles op de toxiciteit van het serum.
Controles van niet-geïnoculeerde celcultures.
Referentie-antisera.

Interpretatie

Met de NADL-stam geschiedt de aflezing bij voorkeur na een incubatieperiode van vijf dagen bij 37 °C.

Een 50 % neutraliserende titer in een verdunning 1/10 wordt geïnterpreteerd als een immuunrespons op een voorafgaande acute infectie.

9. *Melkanalyse voor de opsporing van mastitis*

De melkanalyse wordt verricht overeenkomstig bijlage D bij Richtlijn 64/432/EEG.

10. *Mond- en klauwzeer (MKZ)*

A. Met verzamelen van monsters uit oesophagus en pharynx en het onderzoeken daarvan vinden plaats overeenkomstig de onderstaande voorschriften.

Reagentia

Voordat met de bemonstering wordt begonnen, wordt het transportmedium bereid. 2 ml daarvan wordt overgebracht in evenveel containers als er dieren zijn die moeten worden bemonsterd. De gebruikte containers moeten bestand zijn tegen invriezing over CO_2 in vaste vorm of over vloeibare stikstof.

Voor de bemonstering moet gebruik worden gemaakt van een speciaal ontworpen sputumvanger of „probang".

Om het monster te nemen wordt het probanglepeltje via de mond over het dorsale gedeelte van de tong tot in het bovenste deel van de slokdarm gebracht. Via lateraal en dorsaal gerichte bewegingen wordt getracht het oppervlakte-epitheel van het bovenste gedeelte van de slokdarm af te schrapen. Vervolgens wordt de probang teruggetrokken, bij voorkeur nadat het dier heeft geslikt. Het lepeltje moet gevuld zijn en een mengsel bevatten van slijm, speeksel, slokdarmvocht en celresten. Er dient evenwel voor te worden gezorgd dat elk monster zichtbaar celmateriaal bevat. Elke ruwe beweging die bloedingen kan veroorzaken, moet worden vermeden.

De monsters van sommige dieren kunnen zwaar verontreinigd zijn met resten van het herkauwde voeder. Dergelijke monsters moeten worden weggegooid en de bek van het betrokken dier moet worden gespoeld met water, of beter nog met een fysiologische zoutoplossing, voordat een nieuw monster wordt genomen.

Behandeling van de monsters

Elk in het probanglepeltje genomen monster wordt op zijn kwaliteit onderzocht en 2 ml ervan wordt toegevoegd aan dezelfde hoeveelheid transportmedium in een vriesbestendige container. De containers worden stevig gesloten, verzegeld, ontsmet en van een etiket voorzien. De monsters worden koel bewaard (+4 °C) en binnen drie à vier uur onderzocht of wel op droog ijs (– 69 °C) of vloeibare stikstof geplaatst en bevroren gehouden totdat zij worden onderzocht.

Na elke monstername moet de probang worden ontsmet en driemaal gespoeld, telkens in schoon water.

Onderzoek op MKZ-virus

De monsters worden geïnoculeerd op cultures van primaire boviene schildkliercelkweken, waarbij per monster ten minste drie buisjes worden gebruikt. Andere gevoelige cellen, bij voorbeeld primaire runder- of varkensniercellen, kunnen eveneens worden gebruikt, maar daarbij mag niet worden vergeten dat zij voor bepaalde stammen van het MKZ-virus minder gevoelig zijn. De buisjes worden geïncubeerd bij 37 °C op een rollerbank en gedurende 48 uur dagelijks onderzocht op de aanwezigheid van een cytopathogeen effect (CPE). Indien de uitkomst negatief is, worden de cultures blind gepasseerd op nieuwe cultures en opnieuw onderzocht gedurende 48 uur. De specificiteit van elk CPE moet worden bevestigd.

Aanbevolen transportmedia

1. 0,08M fosfaatbuffer pH 7,2 met 0,01 % bovien serumalbumine, 0,002 % fenolrood en antibiotica.
2. Weefselcultuurmedium (bij voorbeeld Eagle's MEM) met 0,04 M Hepes-buffer, 0,01 % bovien serumalbumine en antibiotica, pH 7,2.

Aan het transportmedium moeten antibiotica worden toegevoegd (per ml uiteindelijk medium), bij voorbeeld:

— penicilline	1 000 IE,
— neomycine sulfaat	100 IE,
— polymyxine B-sulfaat	50 IE,
— mycostatine	100 IE.

B. De virusneutralisatietest wordt uitgevoerd overeenkomstig de volgende voorschriften.

Reagentia

Het stamantigeen van het mond- en klauwzeervirus wordt aangemaakt in celcultures of op rundertongen en wordt vervolgens opgeslagen bij ten hoogste −70 °C of bij −20 °C indien 50 % glycerol is toegevoegd. Dit is het stam- of bewaarantigeen. Het MKZ-virus is onder deze omstandigheden stabiel en de titers variëren slechts in geringe mate in de loop van een aantal maanden.

Procedure

De test wordt uitgevoerd op gegradueerde, voor weefselkweek bestemde microtiterplaatjes met vlakke bodem, met gebruikmaking van gevoelige cellen, bij voorbeeld IB-RS-2, BHK-21 of kalfsniercellen.

De testsera worden verdund in een verhouding 1/4 in een serumvrij celkweekmedium, waaraan vervolgens 100 IE per ml neomycine of een ander daartoe geschikt antibioticum wordt toegevoegd. De sera worden geïnactiveerd bij 56 °C gedurende 30 minuten en 0,05 ml ervan wordt gebruikt voor de aanleg, in duplo, van een verdunningsreeks op microtiterplaatjes met behulp van verdunningscapillairen met een inhoud van 0,05 ml. Vooraf getitreerd virus, dat eveneens is verdund in serumvrij cultuurmedium en in een concentratie van 100 $TCID_{50}$ per 0,05 ml, wordt vervolgens aan elk putje toegevoegd. Na incubatie bij 37 °C gedurende één uur, om het neutralisatieproces te doen plaatsvinden, wordt 0,05 ml celsuspensie, met 0,5 — 1,0 x 10^6 cellen per 1 ml in celkweekmedium dat een serum bevat dat vrij is van antilichamen tegen MKZ, toegevoegd aan elk putje en worden de platen verzegeld.

De plaatjes worden geïncubeerd bij 37 °C. De daarbij gevormde monolayers zijn normaal binnen 24 uur confluent. Na 48 uur is er gewoonlijk voldoende CPE om de test *microscopisch* af te lezen. Op dat ogenblik kan een definitieve *microscopische* aflezing plaatsvinden of kunnen de plaatjes worden gefixeerd en gemerkt met het oog op *macroscopische* aflezing, bij voorbeeld met behulp van 10 %-ige formol-zoutoplossing en 0,05 %-ig methylethyleenblauw.

Controles

De controles bij elke test omvatten een homoloog antiserum met gekende titer, een celcontrole, een controle op de toxiciteit van het serum, een controle van het medium en een virustitratie aan de hand waarvan de juiste hoeveelheid virus in de test wordt berekend.

Interpretatie

Putjes die CPE vertonen worden als besmet beschouwd en de neutralisatietiters worden uitgedrukt als de reciproke van de uiteindelijke verdunning van het in het serum/virusmengsel aanwezige serum bij het 50 %-eindpunkt, berekend aan de hand van de methode van Spearman-Karber (Karber, G., 1931, Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 162, 480).

Een test wordt als geldig beschouwd wanneer de werkelijke hoeveelheid virus per putje in de test tussen $10^{1,5}$ en $10^{2,5}$ $TCID_{50}$ ligt en wanneer de titer van het referentieserum minder bedraagd dan het dubbele van de verwachte titer, berekend op basis van voorafgaande titreringen. Wanneer bij de controles waarden worden gevonden buiten deze limieten, worden de tests overgedaan.

Een eindpunttiter van 1/11 of minder wordt als negatief beschouwd.

C. De opsporing en kwantificering van antilichamen met behulp van de Elisa wordt uitgevoerd overeenkomstig de onderstaande voorschriften.

Reagentia

Konijn-antiserum tegen 146S-antigeen van zeven typen van mond- en klauwzeervirus (MKZ-virus), gebruikt bij een vooraf vastgestelde optimale concentratie in carbonaat/bicarbonaat-bufferoplossing, pH 9,6.

Antigeen wordt bereid uit geselecteerde virusstammen, gekweekt op monolayers van BHK-21-cellen. Niet-gezuiverd supernatant wordt vooraf getitreerd overeenkomstig de voorschriften, maar zonder serum, en dan gebruikt voor het aanleggen van een verdunning die na toevoeging van een gelijk volume PBST (met fosfaat gebufferde zoutoplossing die 0,05 % Tween-20 en fenolrood bevat) bij aflezing een optische densiteit oplevert tussen 1,2 en 1,5. De virussen mogen vóór gebruik worden geïnactiveerd. PBST wordt gebruikt als diluent.

Cavia-antiserum wordt bereid door cavia's te enten met 146S-antigeen van elk serotype. Een vooraf bepaalde optimale concentratie in PBST dat 10 % normaal runderserum en 5 % normaal konijneserum bevat.

Konijn-anticavia-immunoglobuline, geconjugeerd met mierikswortelperoxidase, wordt gebruikt in een vooraf bepaalde optimale concentratie in PBST dat 10 % normaal runderserum en 5 % normaal konijneserum bevat.

De testsera worden verdund in PBST.

Procedure

1. Elisa-plaatjes worden gecoat met 50 µl konijn-antivirusserum en worden daarbij gedurende één nacht in een vochtige kamer bij kamertemperatuur bewaard.

2. Van elk teststerum wordt in duplo een tweevoudige verdunningsreeks aangelegd van telkens 50 µl, te beginnen bij een verdunning 1/4, in plaatjes met diverse putjes en met een U-vormige bodem (dragerplaatjes). Aan elk putje wordt 50 µl van een constante antigeendosis toegevoegd en de mengsels worden gedurende één nacht bij 4 °C bewaard. Door de toevoeging van het antigeen wordt de oorspronkelijke serumverdunning op 1/8 gebracht.

3. De Elisa-plaatjes worden vijf keer met PBST gespoeld.

4. Vervolgens wordt 50 µl van de serum/antigeenmengsels overgebracht van de dragerplaatjes naar de met konijneserum gecoate Elisa-plaatjes en bij 37 °C gedurende één uur geïncubeerd op een rondschudapparaat.

5. Na het spoelen wordt aan elk putje 50 µl van een tegen het in punt 4 gebruikte antigeen gericht cavia-antiserum toegevoegd. De plaatjes worden bij 37 °C gedurende één uur geïncubeerd op een rondschudapparaat.

6. De plaatjes worden gespoeld en aan elk putje wordt 50 µl van met mierikswortelperoxidase geconjugeerd konijn-anticavia-immunoglobuline toegevoegd. De plaatjes worden bij 37 °C gedurende één uur geïncubeerd op een rondschudapparaat.

7. De plaatjes worden gespoeld en aan elk putje wordt 50 µ orthofenyleendiamine met 0,05 % H_2O_2 (30 %) m/v toegevoegd.

8. De reactie wordt na 15 minuten stopgezet met 1,25 M H_2SO_4.

De plaatjes worden spectrofotometrisch afgelezen bij 492 nm op een Elisa-afleesapparaat dat met een microcomputer is verbonden.

Controles

Voor elk gebruikt antigeen zijn er 40 putjes die geen serum bevatten maar antigeen verdund in PBST.

Een in duplo aangelegde tweevoudige verdunningsreeks van homoloog bovien referentie-antiserum.

Een in duplo aangelegde tweevoudige verdunningsreeks van negatief runderserum.

Interpretatie

Antilichaamtiters worden uitgedrukt als de uiteindelijke verdunning van het testserum dat 50 % oplevert van de gemiddelde OD-waarde die is geregistreerd in de viruscontroleputjes zonder testserum. Titers boven 1/40 worden als positief beschouwd.

Referenties

Hamblin C, Barnett ITR and Hedger RS (1986) — A new enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of Elisa. Journal of Immunological Methods, 93, 115-121.11.

HOOFDSTUK II

Varkens

1. *Tuberculose*

De enkelvoudige intradermale tuberculinetest met aviaire tuberculine wordt uitgevoerd overeenkomstig bijlage B bij Richtlijn 64/432/EEG, met die uitzondering dat de injectie wordt gegeven in de losse huid aan de oorbasis.

2. *Brucellose*

De serumagglutinatietest en de complementbindingsreactie worden uitgevoerd overeenkomstig bijlage C, onder A en B, bij Richtlijn 64/432/EEG.

3. *Ziekte van Aujeszky*

De serumneutralisatietest wordt uitgevoerd overeenkomstig de onderstaande voorschriften.

Serum

Vóór gebruik worden alle sera geïnactiveerd door blootstelling aan een temperatuur van 56 °C gedurende 30 minuten.

Procedure

De neutralisatietest met constant virus tegenover wisselende serumverdunningen wordt uitgevoerd op microtiterplaatjes, waarbij gebruik wordt gemaakt van Vero-cellen of andere gevoelige cellen. Het virus van de ziekte van Aujeszky wordt gebruikt in een concentratie van 100 $TCID_{50}$ per 0,025 ml; geïnactiveerde onverdunde serummonsters worden vermengd met een gelijke hoeveelheid (0,025 ml) virussuspensie. De virus/serummengsels worden gedurende twee uur bij 37 °C geïncubeerd in de microtiterplaatjes voordat de nodige cellen worden toegevoegd. De cellen worden gebruikt in een zodanige concentratie dat na 24 uur een volledige monolayer wordt gevormd.

Controles

Bepaling van het infectievermogen van het virus.
Controles op de toxiciteit van het serum.
Controles van niet-geïnoculeerde celcultures.
Referentie-antisera.

Interpretatie

De resultaten van de neutralisatietest en de titer van het bij de test gebruikte virus worden afgelezen na een incubatieperiode van drie tot zeven dagen bij 37 °C. Een serumtiter van minder dan 1/2 (onverdund serum) wordt als negatief beschouwd.

4. *Overdraagbare gastro-enteritis (TGE)*

De serumneutralisatietest wordt uitgevoerd overeenkomstig de onderstaande voorschriften.

Serum

Vóór gebruik worden alle sera geïnactiveerd door blootstelling aan een temperatuur van 56 °C gedurende 30 minuten.

Procedure

De neutralisatietest met constant virus tegenover wisselende serumverdunningen wordt uitgevoerd op microtiterplaatjes, met gebruikmaking van A72 (hondetumor)-cellen of andere gevoelige cellen. Het TGE-virus wordt gebruikt in een concentratie van 100 $TCID_{50}$ per 0,025 ml; geïnactiveerde onverdunde serummonsters worden vermengd met een gelijke hoeveelheid (0,025 ml) virussuspensie. De virus/serummengsels worden in de microtiterplaatjes gedurende 30 à 60 minuten bij 37 °C geïncubeerd voordat de nodige cellen worden toegevoegd. De cellen worden gebruikt in een zodanige concentratie dat na 24 uur een volledige monolayer wordt gevormd. In ieder putje wordt 0,1 ml celsuspensie aangebracht.

Controles

Bepaling van het infectievermogen van het virus.
Controle op de toxiciteit van het serum.
Controle van niet-geïnoculeerde celcultures.
Referentie-antisera.

Interpretatie

De resultaten van de neutralisatietest en de titer van het bij de test gebruikte virus worden afgelezen na een incubatieperiode van drie tot vijf dagen bij 37 °C. Serumtiters van minder dan 1/2 (in de uiteindelijke verdunning) worden als negatief beschouwd. Indien onverdunde serummonsters toxisch zijn voor de weefselcultures, worden deze sera verdund in de verhouding 1/2 voordat zij bij de test worden gebruikt. Dat geeft een uiteindelijke serumverdunning van 1/4. In deze gevallen worden serumtiters van minder dan 1/4 (in de uiteindelijke verdunning) als negatief beschouwd.

5. *Varkensinfluenza*

De hemagglutinatie-inhibitietest wordt uitgevoerd overeenkomstig de onderstaande voorschriften.

Procedure

De test wordt uitgevoerd met behulp van de standaardmethode (US Department of Health, Education and Welfare, Immunology series No 6).

Om aspecifieke inhibitoren te vernietigen moeten de varkenssera of wel gedurende één nacht worden behandeld met een receptorvernietigend enzym (Vibrio cholerafiltraat) bij 37 °C en vervolgens gedurende 30 minuten worden verwarmd tot 56 °C om elke residuele enzymactiviteit te vernietigen, of wel gedurende één nacht worden behandeld met 25 %-ige kaoline bij 10 °C (Clarc and Casals 1958, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 7, 561).

Na absorptie met een 10 %-ige suspensie van kippenerytrocyten gedurende één uur bij 37 °C, worden de sera getest tegen vier hemagglutinerende eenheden van het desbetreffende virus, met gebruikmaking van 1 % kippenerytrocyten. Het virus en het serum blijven gedurende 60 minuten met elkaar in contact bij kamertemperatuur voordat de erytrocyten worden toegevoegd.

Interpretatie

Titers van 1/10 of meer worden als positief beschouwd.

6. *Mond- en klauwzeer*

Tests op mond- en klauwzeer bij varkens worden uitgevoerd overeenkomstig voorschriften die zijn vastgesteld in deel I, punt 10.

7. *Vesiculaire varkensziekte*

De serumneutralisatietest wordt uitgevoerd overeenkomstig de onderstaande voorschriften.

Serum

Vóór gebruik worden de sera geïnactiveerd door blootstelling aan een temperatuur van 56 °C gedurende 30 minuten.

Procedure

De neutralisatietest met constant virus tegenover wisselende serumverdunningen wordt uitgevoerd op microtiterplaatjes met gebruikmaking van IB-RS-2-cellen of andere gevoelige cellen. De UKG 27/72 of een andere referentiestam van het virus wordt gebruikt in een concentratie van 100 $TCID_{50}$ per 0,025 ml. Testsera worden verdund in de verhouding 1/4 en geïnactiveerd; vervolgens worden tweevoudige verdunningsreeksen aangelegd. De serummonsters worden vermengd met een gelijke hoeveelheid virussuspensie en gedurende één uur bij 37 °C in de microtiterplaatjes geïncubeerd; vervolgens wordt 0,025 ml celsuspensie (met 3 x 10^6 cellen/ml) toegevoegd.

Controles

Bepaling van het infectievermogen van het virus.
Controles op de toxiciteit van het serum.
Controles van niet-geïnoculeerde celcultures.
Referentie-antisera.

Interpretatie

De resultaten van de neutralisatietest en de titer van het bij de test gebruikte virus worden afgelezen na een incubatieperiode van drie dagen bij 37 °C. Serumtiters worden als negatief beschouwd indien geen neutralisatie plaatsvindt bij een verdunning van 1/11.

8. *Klassieke varkenspest*

Tests op klassieke varkenspest worden uitgevoerd overeenkomstig bijlage I bij Richtlijn 80/217/EEG van de Raad [1].

9. *Leptospirose*

Tests op leptospirose bij varkens worden uitgevoerd overeenkomstig het bepaalde in hoofdstuk I, punt 6.

---

[1] PB nr. L 47 van 21. 2. 1980, blz. 11.

BIJLAGE II

MINIMUMVOORWAARDEN VOOR DE ERKENNING VAN MARKTEN VOOR DE HANDEL IN RUNDEREN OF VARKENS BESTEMD VOOR UITVOER NAAR DE EUROPESE GEMEENSCHAP

1. De markten moeten onder toezicht staan van een officiële dierenarts.

2. Binnen een straal van 20 km rond de markten mogen, volgens officiële gegevens, gedurende ten minste 30 dagen vóór het gebruik als erkende markt geen gevallen van mond- en klauwzeer zijn geconstateerd en — voor zover het erkende markten voor varkens betreft — ook geen gevallen van varkenspest, vesiculaire varkensziekte of besmettelijke varkensverlamming (Teschener ziekte).

3. De markten moeten, voordat zij als erkende markten worden gebruikt, worden gereinigd en gedesinfecteerd met een desinfecterend middel dat in het exporterende land officieel is erkend als een doeltreffend middel voor de bestrijding van de in punt 2 genoemde ziekten.

4. Groeperingsplaatsen, laadplaatsen of andere plaatsen waar de voor export naar de Europese Gemeenschap bestemde runderen en varkens tijdelijk verblijven, moeten voldoen aan het bepaalde in de punten 1, 2 en 3.

5. Alle runderen of varkens die via de erkende markten worden verhandeld, moeten voldoen aan de veterinairrechtelijke voorschriften die gelden voor de invoer van de desbetreffende categorie dieren in de Europese Gmeenschap.

6. De naar de Europese Gemeenschap te exporteren dieren moeten binnen zes dagen nadat zij op de erkende markten zijn verhandeld, worden geladen en rechtstreeks naar de grens van het exporterende land worden gebracht:

   a) zonder dat zij in contact komen met andere tweehoevige dieren dan runderen of varkens die voldoen aan de veterinairrechtelijke voorschriften welke gelden voor de invoer van de desbetreffende categorie dieren in de Europese Gemeenschap;

   b) waarbij fok-of gebruiksdieren dienen te worden gescheiden van dieren die bestemd zijn om onmiddellijk te worden geslacht;

   c) in transportvoertuigen of containers die eerst zijn gereinigd en gedesinfecteerd met een desinfecterend middel dat in het exporterende land officieel is erkend als een doeltreffend middel voor de bestrijding van de in punt 2 genoemde ziekten en die zo zijn geconstrueerd dat het voertuig tijdens het transport geen faecaliën, urine, strooisel of veevoederresten kan verliezen.

7. Wanneer op grond van de voorwaarden voor de uitvoer van dieren naar de Europese Gemeenschap binnen een bepaalde periode alvorens de dieren worden geladen, een test moet worden uitgevoerd, moet ook de periode voor het groeperen van de dieren nadat zij op de erkende markten zijn verhandeld, (tot maximaal zes dagen) worden meegerekend.

8. Het exporterende land moet bepalen welke markten als erkende markten voor de handel in fok- en gebruiksdieren en welke als erkende markten voor slachtdieren worden aangewezen. De Commisssie en de bevoegde centrale autoriteiten van de Lid-Staten moeten van de naam en het adres van de aangewezen erkende markten in kennis worden gesteld.

9. Het exporterende land moet de procedure voor het officiële toezicht op de markten, groeperings- en laadplaatsen vaststellen en moet ervoor zorgen dat hierop ook daadwerkelijk toezicht wordt gehouden.

10. Het exporterende land moet ervoor zorgen dat in het desbetreffende vak van het gezondheidscertificaat waarvan de dieren, die naar de Europese Gemeenschap worden uitgevoerd, vergezeld moeten gaan, nadere gegevens over markten en groeperinsplaatsen worden vermeld.