

II

(Akty, których publikacja nie jest obowiązkowa)

KOMISJA

DECYZJA KOMISJI

z dnia 4 sierpnia 2006 r.

zatwierdzająca podręcznik diagnostyczny dotyczący grypy ptaków, przewidziany w dyrektywie Rady 2005/94/WE

(notyfikowana jako dokument nr C(2006) 3477)

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

(2006/437/WE)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając dyrektywę Rady 2005/94/WE z dnia 20 grudnia 2005 r. w sprawie wspólnotowych środków zwalczania grypy ptaków i uchylającą dyrektywę 92/40/EWG⁽¹⁾, w szczególności jej art. 50 ust. 1 akapit drugi,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Dyrektywa 2005/94/WE przewiduje określone środki zapobiegawcze odnoszące się do nadzorowania i wczesnego wykrywania grypy ptaków, a także minimalne środki zwalczania do stosowania w przypadku wystąpienia ogniska grypy ptaków u drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka.
- (2) Konieczne jest ustalenie na poziomie wspólnotowym procedur diagnostycznych, metod pobierania próbek oraz kryteriów oceny wyników badań laboratoryjnych służących do stwierdzenia ognisk grypy ptaków.
- (3) Załącznik VII do dyrektywy 2005/94/WE ustala funkcje i obowiązki wspólnotowego laboratorium referencyjnego ds. grypy ptaków w celu koordynowania, w porozumieniu z Komisją, metod wykorzystywanych w państwach członkowskich do diagnozowania tej choroby. Wspomniane funkcje i obowiązki obejmują organizację okresowych badań porównawczych oraz dostarczenie standardowych odczynników na poziomie wspólnotowym.

- (4) W ostatnim czasie opracowano badania laboratoryjne w celu zapewnienia szybkiego diagnozowania grypy ptaków.
- (5) Doświadczenie zdobyte w ostatnich latach w zwalczaniu grypy ptaków doprowadziło do zidentyfikowania najbardziej odpowiednich procedur pobierania próbek oraz kryteriów oceny wyników badań laboratoryjnych służących do właściwego diagnozowania tej choroby w różnych sytuacjach.
- (6) Środki przewidziane w niniejszej decyzji są zgodnie z opinią Stałego Komitetu ds. Łańcucha Żywnościowego i Zdrowia Zwierząt,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DECYZJĘ :

Artykuł 1

Zatwierdza się podręcznik diagnostyczny przewidziany w dyrektywie 2005/94/WE i zawarty w Załączniku do niniejszej decyzji.

Artykuł 2

Państwa członkowskie stosują podręcznik diagnostyczny od dnia 1 lipca 2007 r. lub od dnia dokonania transpozycji dyrektywy 2005/94/WE, o ile transpozycja zostanie dokonana przed wymienioną datą.

⁽¹⁾ Dz.U. L 10 z 14.1.2006, str. 16.

Artykuł 3

Niniejsza decyzja skierowana jest do państw członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 4 sierpnia 2006 r.

W imieniu Komisji
Markos KYPRIANOU
Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK

PODRĘCZNIK DIAGNOSTYCZNY DOTYCZĄCY GRYPY PTAKÓW

ROZDZIAŁ I

Wprowadzenie, cele i definicje

1. W celu zapewnienia jednolitych procedur diagnozowania grypy ptaków we Wspólnocie, w niniejszym podręczniku diagnostycznym ustalono:
 - a) wytyczne i minimalne wymagania w odniesieniu do procedur diagnostycznych, metod pobierania próbek i kryteriów oceny wyników badań laboratoryjnych w zakresie prawidłowej diagnostyki grypy ptaków;
 - b) badania laboratoryjne, które mają być wykorzystywane do rozpoznawania grypy ptaków, oraz techniki laboratoryjne, które mają być wykorzystywane do genetycznego klasyfikowania izolatów wirusów grypy ptaków;
 - c) minimalne wymagania bezpieczeństwa biologicznego i normy jakościowe, które mają być przestrzegane przez laboratoria diagnostyczne oraz przy transporcie próbek.
2. Podręcznik diagnostyczny jest skierowany do organów odpowiedzialnych za zwalczanie grypy ptaków. Odnosi się on zatem głównie do zasad i stosowania badań laboratoryjnych oraz oceny ich wyników, a także do technik laboratoryjnych.
3. Do celów niniejszego podręcznika w uzupełnieniu definicji podanych w art. 2 dyrektywy 2005/94/WE stosuje się również następującą definicję:

„materiał diagnostyczny” oznacza wszelki materiał zwierzęcy, w tym całe zwłoki, transportowane w celach diagnostyki lub dochodzenia, z wyjątkiem żywych zakażonych zwierząt.
4. Stwierdzenie grypy ptaków u drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka musi odbywać się w sposób zgodny z procedurami, metodami pobierania próbek i kryteriami oceny wyników badań laboratoryjnych, określonymi w niniejszym podręczniku diagnostycznym, oraz musi opierać się na jednym lub większej ilości kryteriów wymienionych w lit. a), b) i c):
 - a) wykrycie wirusa zakaźnego, antygeny lub specyficznego materiału genetycznego w próbkach tkanek, organów, krwi lub wydalnin drobiu lub innych ptaków;
 - b) wykrycie objawów klinicznych choroby i pośmiertnych zmian chorobowych u tych ptaków;
 - c) wykazanie specyficznej reakcji przeciwciał w próbkach krwi tych ptaków.
5. Stwierdzenie zakażenia ssaków wirusem grypy typu A pochodzącej od ptaków – bądź wysoce zjadliwej, bądź też nisko zjadliwej podtypów H5 lub H7 – musi opierać się na jednym lub kilku kryteriach wymienionych w lit. a) lub b):
 - a) wykrycie wirusa zakaźnego grypy ptaków, antygeny lub specyficznego materiału genetycznego w próbkach tkanek, organów, krwi lub wydalnin ssaków;
 - b) wykazanie specyficznej reakcji przeciwciał na grypę ptaków w próbkach krwi ssaków.
6. Należy stosować wyłącznie procedury, metody pobierania próbek i kryteria oceny wyników badań laboratoryjnych, które:
 - a) są określone w niniejszym podręczniku diagnostycznym; lub
 - b) zostały zatwierdzone przez właściwe organy, pod warunkiem że:
 - i) w toku testów porównawczych zorganizowanych przez wspólnotowe laboratorium referencyjne ds. grypy ptaków („wspólnotowe laboratorium referencyjne”) wykazano, że czułość i swoistość zatwierdzonych badań laboratoryjnych zapewnia ich skuteczność; lub
 - ii) w przypadku gdy wspólnotowe laboratorium referencyjne nie zorganizowało takiej oceny konkretnego typu badań laboratoryjnych – krajowe laboratorium referencyjne potwierdziło czułość i swoistość zatwierdzonych badań laboratoryjnych, stwierdzając, że dane badanie laboratoryjne jest odpowiednie do celu, do którego jest stosowane; wyniki takiego zatwierdzenia muszą zostać przekazane wspólnotowemu laboratorium referencyjnemu do przeglądu.

ROZDZIAŁ II

Opis grypy ptaków ze szczególnym uwzględnieniem rozpoznania różnicowego**1. Etiologia i zjadliwość**

Grypa ptaków jest wysoce zaraźliwą infekcją wirusową wywołaną przez wirusy z rodziny *Orthomyxoviridae*, rodzaju *influenzavirus A*. Wirusy grypy A są jedynymi znanymi ortomyksowirusami zakażającymi ptaki. Podatność na zakażenie grypą A wykazano u wielu gatunków ptaków; głównym rezerwuarem tego rodzaju wirusów jest ptactwo wodne, jednak przeważającą większość izolatów uzyskano z typów o niskiej zjadliwości u kur i indyków, które spośród gatunków dotkniętych chorobą mają największe znaczenie gospodarcze.

Wirusy grypy A mają antygenowo pokrewne białka nukleoproteiny i matrix, ale są klasyfikowane według podtypów na podstawie antygenowego pokrewieństwa glikoprotein – hemaglutyniny (HA) i neuraminidazy (NA). Do chwili obecnej rozpoznano 16 podtypów HA (H1–H16) oraz 9 podtypów NA (N1–N9). Każdy wirus grypy A ma po jednym antygenie HA i NA, które mogą występować prawdopodobnie we wszystkich kombinacjach.

Wirusy grypy A dzieli się na dwie grupy pod względem zdolności wywoływania choroby u podatnego drobiu:

- a) wirusy **wysoce zjadliwej grypy ptaków (HPAI)**, które wywołują bardzo poważną chorobę charakteryzującą się ogólnym zakażeniem zainfekowanego drobiu i mogącą powodować bardzo wysoką upadkowość w stadach (do 100 %); oraz
- b) wirusy **nisko zjadliwej grypy ptaków (LPAI)**, które wywołują u drobiu chorobę o łagodnym przebiegu, z objawami głównie ze strony układu oddechowego, o ile przebieg nie ulegnie nasileniu pod wpływem innych zakażeń lub czynników.

Dzikie ptaki, szczególnie wędrowne ptactwo wodne, odgrywają bardzo istotną rolę jako rezerwuariusz wirusa grypy A, o czym świadczy wyizolowanie prawie wszystkich możliwych kombinacji podtypów HA i NA u dzikich ptaków. Ogólnie, z wyjątkiem przypadków przeniesienia HPAI od zakażonego drobiu, u ptaków dzikich wykrywa się wyłącznie wirus LPAI.

Pierwotne przypadki wprowadzenia wirusów grypy ptaków do gospodarstw hodowli drobiu wynikają najprawdopodobniej z bezpośredniego lub pośredniego kontaktu z dzikim ptactwem.

U drobiu hodowlanego istnieje możliwość niewykrytego krążenia wirusów LPAI pochodzących z dzikich rezerwuarów, ponieważ objawy kliniczne w takich przypadkach są często łagodne lub nie występują.

Po przeniesieniu się do drobiu szczepy wirusów LPAI podtypów H5 i H7 mogą łatwo mutować w szczepy HPAI. Do tej pory wykazano wywoływanie HPAI jedynie przez wirusy podtypów H5 i H7.

Choć wydaje się, że za mutacje wirusów LPAI w HPAI może być odpowiedzialnych kilka mechanizmów, nie są znane czynniki wywołujące te mutacje. W niektórych przypadkach mutacja następowała szybko u pierwotnego gospodarza po przeniesieniu wirusa od dzikich ptaków; w innych przypadkach wirus LPAI krążył wśród drobiu przez kilka miesięcy, zanim nastąpiła mutacja. Dlatego też niemożliwe jest przewidzenie, czy i kiedy mutacja nastąpi. Można jednak zasadnie zakładać, że im bardziej rozpowszechniony wśród drobiu jest wirus LPAI, tym większe jest prawdopodobieństwo jego mutacji w HPAI.

Okres inkubacji trudno oszacować; prawdopodobnie jest on różny w zależności od szczepu wirusa i od gospodarza. Zwykle podaje się okres od pięciu do sześciu dni, jednak dla poszczególnych ptaków może się on prawdopodobnie wahać od kilku godzin do około siedmiu dni.

2. Objawy kliniczne u ptaków zakażonych wirusem HPAI

Objawy kliniczne są bardzo różnorodne i w pewnej mierze uzależnione od takich czynników, jak zjadliwość wirusa, gatunki dotknięte zakażeniem, wiek i płeć zakażanych ptaków, choroby współwystępujące u nich oraz środowisko.

Wczesne objawy mogą obejmować zmniejszenie apetytu i pragnienia oraz stosunkowo niską śmiertelność. Choroba może jednak pojawiać się w stadach nagle, powodując śmierć wielu ptaków bez uprzednich objawów lub przy wystąpieniu minimalnych objawów depresji, zmniejszonego apetytu, stroszenia piór i gorączki. Ogólnie, im dłużej ptaki żyją po zakażeniu, tym wyraźniejsze są objawy kliniczne. Okres rozwijania się objawów zależy od wirusa, gospodarza i początkowej dawki wirusa, a także od systemu hodowli. U niosek trzymanyh w klatkach lub u ptaków trzymanyh na zewnątrz wirus rozprzestrzenia się wolniej niż w fermach brojlerów.

Kury zakażone wirusem HPAI mogą początkowo składać jaja o miękkich skorupkach, ale szybko przestają się nieść w ogóle. Chore ptaki często siedzą lub stoją w półotępiącym stanie, dotykając głowami podłoga. Ich grzebień i dzwonek są sine i obrzęknięte, a na ich końcach mogą pojawiać się wylewy krwawe lub wybroczyny. Często występuje obfita, wodnista biegunka i nadmierne pragnienie. Ptaki mogą mieć trudności z oddychaniem i obficie łzawić. Na nieopierzonych miejscach skóry mogą występować wylewy krwawe. Upadkowość w stadzie wynosi od 50 do 100 %.

U brojlerów objawy HPAI są często mniej wyraźne niż u innych rodzajów drobiu i zwykle obejmują ciężką depresję i brak apetytu; często pierwszą wyraźną zaobserwowaną anomalią może być bardzo wyraźny wzrost upadkowości. Mogą również występować obrzęk głowy i szyi oraz objawy neurologiczne, jak kręcz szyi i ataksja.

HPAI u indyków jest podobna do występującej u kur, ale niektóre wirusy HPAI wydają się bardziej zjadliwe u indyków, natomiast inne mniej.

U gęsi zakażonych wirusem HPAI objawy depresji, braku apetytu i biegunki są podobne jak u niosek, ale często towarzyszy im obrzęk zatok. U młodszych ptaków mogą występować objawy neurologiczne.

Kaczki zakażone wirusami HPAI niejednokrotnie nie wykazują objawów klinicznych; stwierdzono jednak, że niektóre szczepy wywołują objawy podobne jak u gęsi oraz pewną śmiertelność.

Zakażenie HPAI i LPAI u strusi może przebiegać bez objawów klinicznych. W przypadkach ognisk HPAI, np. we Włoszech w latach 1999/2000, obserwowano podatność perliczek i przepiórek japońskich na zakażenia, z objawami i śmiertelnością podobną jak w przypadku choroby u kur lub indyków. Jednak w niektórych badaniach eksperymentalnych obserwowano odporność przepiórek na niektóre szczepy HPAI. U wszystkich ptaków obecność przeciwciał na ten sam podtyp H, w wyniku szczepienia lub naturalnego zakażenia, może oznaczać brak wyraźnych objawów klinicznych w wyniku zakażenia wirusem HPAI.

3. Zmiany pośmiertne u ptaków zakażonych wirusem HPAI

Ptaki, które padły w wyniku ostrego przebiegu choroby, mogą wykazywać minimalne zmiany ogólne, polegające na odwodnieniu oraz przekrwieniu mięśni i organów wewnętrznych.

U ptaków, które padły po dłuższym przebiegu choroby, w całym ciele występują wylewy krwawe i wybroczyny, głównie w krtani, tchawicy, żołądku i tłuszczu nasierdza, a także na powierzchniach surowiczych przylegających do mostka. Występują rozległe obrzmienia podskórne, zwłaszcza wokół głowy i nóg. Zwłoki mogą być odwodnione. W śledzionie, wątrobie, nerkach i płucach mogą być obecne żółte lub szare ogniska martwicy. Worek powietrzny może zawierać wysięk. Śledziona może być powiększona i przekrwiona.

Pod względem histologicznym grypa ptaków charakteryzuje się zaburzeniami naczyniowymi prowadzącymi do obrzęków, krwawień i zwężeń okołonaczyniowych, szczególnie w mięśni sercowym, śledzionie, płucach, mózgu, trzustce i dzwonekach. W płucach, wątrobie i nerkach występują ogniska martwicy. W mózgu mogą występować glejoza, rozrost naczyń i zwyrodnienie neuronalne.

4. Rozpoznanie różnicowe

W rozpoznaniu różnicowym HPAI należy w szczególności wziąć pod uwagę następujące choroby:

a) inne choroby powodujące nagłą wysoką śmiertelność, np.:

- i) rzekomy pomór drobiu;
- ii) zakaźne zapalenie krtani i tchawicy;

- iii) pomór kaczek;
- iv) ostre zatrucia;
- b) inne choroby powodujące obrzęk grzebieni i dzwonek, np.:
 - i) ostra postać cholery drobiu i inne choroby posocznicowe;
 - ii) bakteryjne zapalenie tkanki łącznej grzebienia i dzwonek.

5. Objawy kliniczne u ptaków zakażonych wirusami LPAI

Ciężkość choroby wywołanej wirusami LPAI jest w dużym stopniu uzależniona od:

- a) szczepu wirusa;
- b) gatunku i wieku gospodarza;
- c) odporności gospodarza na zakażenie wirusem, w szczególności obecności innych czynników zakaźnych, takich jak:
 - i) *Pasteurella* spp.;
 - ii) wirusów rzekomego pomoru drobiu (w tym szczepów szczepionkowych);
 - iii) pneumowirusów ptasich i wirusów zakaźnego zapalenia oskrzeli;
 - iv) *E. coli*;
 - v) *Mycoplasma* spp.;
- d) stanów niedoboru odporności;
- e) czynników środowiskowych (takich jak zwiększone stężenie amoniaku, kurz, wysoka lub niska temperatura).

W skrajnym przypadku objawy kliniczne choroby mogą być niewidoczne lub nieznaczne – łagodne objawy ze strony układu oddechowego lub problemy w produkcji nieśnej u ptaków nieśnych. W przypadku drugiej skrajności zakażenia wirusami LPAI mogą wiązać się z poważnymi objawami klinicznymi choroby, szczególnie u indyków, zwykle ze szmerami oddechowymi, kaszlem, obrzękiem zatok podoczodołowych oraz stanem gorączkowym połączonym ze spadkiem apetytu i wysoką śmiertelnością.

LPAI może być mylona z wieloma chorobami wywołującymi objawy ze strony układu oddechowego lub jelit; mogą one również komplikować przebieg LPAI. Grypę ptaków należy podejrzewać w każdym ognisku choroby u drobiu, które utrzymuje się mimo stosowania środków zapobiegawczych i leczniczych w stosunku do innych chorób.

6. Objawy kliniczne u ptaków utrzymywanych przez człowieka

Zakres objawów klinicznych może być bardzo szeroki; u drobiu może on sięgać od braku widocznych objawów choroby do objawów poważnych, skutkujących wysoką śmiertelnością.

Ogólnie zakażenie rozprzestrzenia się wolniej w stadach ptaków utrzymywanych przez człowieka z uwagi na różnorodność hodowanych gatunków charakteryzujących się różną podatnością, niejednolite poziomy wydalania wirusa i często stosunkowo powolne przenoszenie wynikające z niewielkiego kontaktu oraz stosunkowo niskiego zageęszczenia.

ROZDZIAŁ III

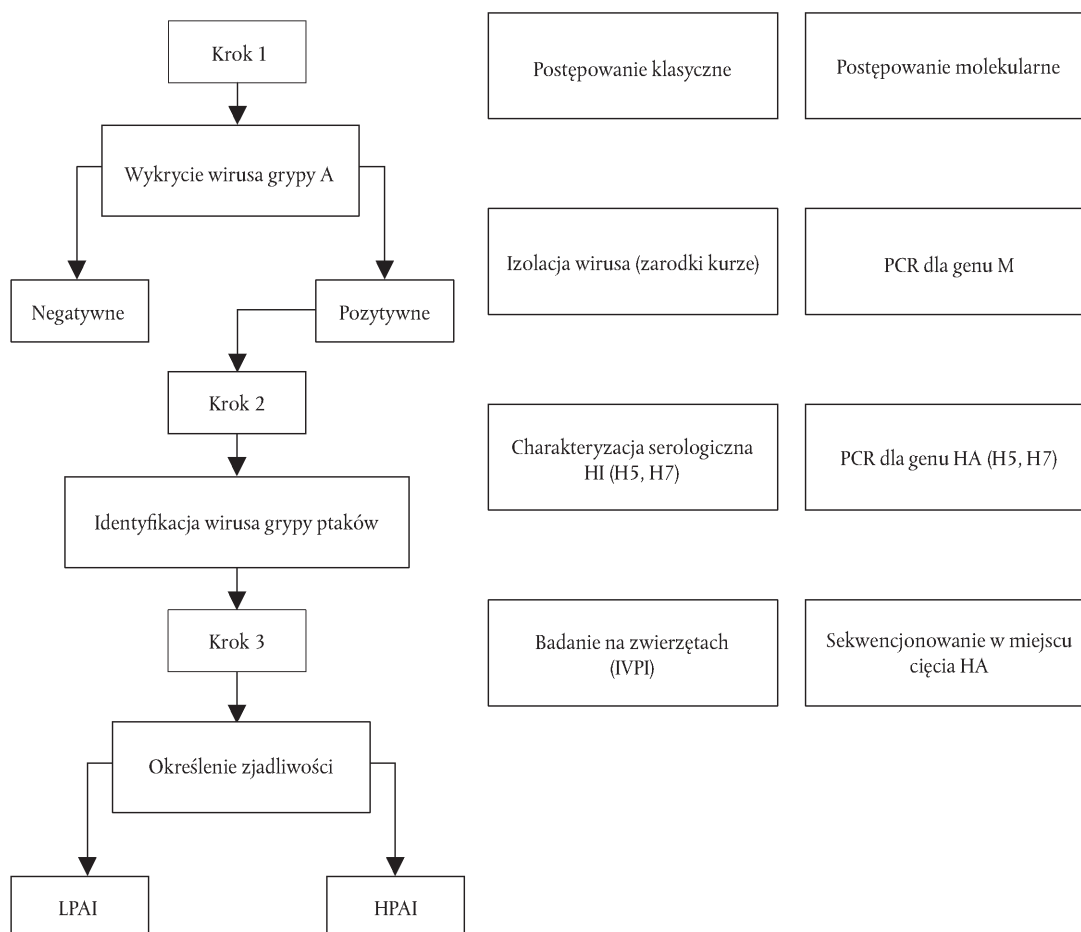
Wytyczne na wypadek podejrzenia grypy ptaków w gospodarstwie

Różnorodność klinicznych objawów zarówno HPAI, jak i LPAI oznacza, że sformułowanie jednoznacznych wytycznych na wypadek podejrzenia ogniska choroby nie jest możliwe. W wypadku nagłej wysokiej upadkowości drobiu, przy obecności któregośkolwiek z objawów klinicznych wymienionych w rozdziale II, a także w sytuacji braku takich objawów należy przeprowadzić dochodzenie w drodze dostarczenia próbek do badania laboratoryjnego; jednak w wypadku braku wysokiej upadkowości trudniej jest podejrzewać lub wykluczyć obecność grypy ptaków.

Ponieważ dla wczesnego zwalczania HPAI i LPAI wywoływanych przez podtypy H5 i H7 kwestią najwyższej wagi jest szybka diagnoza choroby, grypę ptaków należy zawsze brać pod uwagę w rozpoznaniu różnicowym zaburzeń układu oddechowego i nieśności oraz podwyższonej upadkowości drobiu; należy również dostarczyć odpowiednie próbki do badania laboratoryjnego.

Rysunek

Schemat etapów diagnozy w celu stwierdzenia grypy ptaków



ROZDZIAŁ IV

Ogólne procedury pobierania i przewozu próbek

1. Dyrektywa 2005/94/WE i przewodnik diagnostyczny

W przypadkach, w których dyrektywa 2005/94/WE odwołuje się do przewodnika diagnostycznego, obowiązkowe jest przeprowadzenie dochodzeń, pobranie próbek i przeprowadzenie procedur nadzoru opisanych w niniejszym rozdziale przewodnika diagnostycznego.

2. Procedury obowiązujące w przypadku podejrzenia ogniska grypy ptaków

W przypadku gdy urzędowy lekarz weterynarii ma klinicznie uzasadnione podejrzenie wystąpienia ogniska grypy ptaków lub wyniki jakiegokolwiek badania laboratoryjnego przeprowadzonego w celu wykrycia tej choroby nie są negatywne, właściwy organ musi zapewnić, że przed wykluczeniem obecności choroby zostanie przeprowadzone dochodzenie, zgodnie z art. 7 dyrektywy 2005/94/WE, w sposób określony w niniejszym rozdziale przewodnika diagnostycznego oraz że zostanie ono zadowalająco zakończone.

3. Interpretacja badań wirusologicznych

Właściwy organ może uznać, że można wykluczyć obecność wirusa grypy ptaków, o ile dostarczono zgodnie z niniejszym rozdziałem odpowiednią liczbę chorych lub padłych ptaków lub wymazów z tchawicy lub jamy ustno-gardłowej bądź z kloaki w celu wykrycia danego wirusa lub jego genomu, a ich badanie z wykorzystaniem jednej z określonych metod wykrywania wirusa, wymienionych w rozdziale V lub VI, lub zatwierdzonych przez właściwy organ zgodnie z pkt 6 lit. b) rozdziału I, przyniosło wynik negatywny.

4. Standardowy zestaw próbek do laboratoryjnego badania wirusologicznego lub serologicznego

W celu przeprowadzenia dochodzenia w gospodarstwie, co do którego istnieje podejrzenie zakażenia grypą ptaków, należy pobrać standardowy zestaw próbek do badania wirusologicznego lub serologicznego, określony w lit. a) i b) („próbki standardowe”) oraz dostarczyć je bezpośrednio do badania wirusologicznego lub serologicznego.

a) Standardowy zestaw próbek do badania wirusologicznego obejmuje:

- i) co najmniej pięć chorych lub padłych ptaków, jeśli są one dostępne; i/lub
- ii) co najmniej 20 wymazów z tchawicy lub jamy ustno-gardłowej i 20 wymazów z kloaki.

Dostarczone zwłoki muszą być zwłokami ptaków padłych niedawno lub takich, które były poważnie chore lub w stanie agonii i zostały zabite w sposób humanitarny.

Wymazy należy pobrać od liczby ptaków wymienionej w lit. a) lub – jeśli w gospodarstwie, w którym podejrzewa się wystąpienie choroby, jest mniej ptaków – od wszystkich ptaków. Do próby należy wybrać ptaki wykazujące kliniczne objawy choroby.

Wymazy z kloaki muszą być dostarczone wraz z kałem (optymalnie 1 g). Jeśli z jakiegokolwiek powodu pobranie wymazów z kloaki od żywych ptaków jest niemożliwe, można je zastąpić ostrożnie zebranymi próbkami świeżego kału.

Często najbardziej praktycznym rozwiązaniem jest pobieranie wymazów tchawicy lub jamy ustno-gardłowej ze szpary podniebiennej.

Po ustaleniu cech namnażania się wirusa właściwy organ może podjąć decyzję o pobieraniu wymazów wyłącznie bądź z tchawicy lub jamy ustno-gardłowej, bądź z kloaki, zależnie od tego, czy wirus rozmnaża się lepiej w układzie oddechowym czy w układzie żołądkowo-jelitowym, a także biorąc pod uwagę gatunek ptaków.

b) Standardowy zestaw próbek do badania serologicznego obejmuje co najmniej 20 próbek krwi.

Próbki należy pobrać od liczby ptaków wymienionej w lit. b) lub – jeśli w gospodarstwie, w którym podejrzewa się wystąpienie choroby, jest mniej ptaków – od wszystkich ptaków. Próbki należy pobrać od ptaków, które wydają się chore lub ozdrowiałe.

Właściwy organ może podjąć decyzję, że nie jest konieczne pobieranie pełnego zakresu próbek standardowych, lecz może on być zastąpiony ograniczonym zakresem próbek standardowych.

5. Transport próbek

Przechowywanie i transport próbek do laboratorium w celu badania musi odbywać się z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności.

Wymazy muszą zostać natychmiast schłodzone lodem lub żelowymi wkładami chłodzącymi i dostarczone do laboratorium w jak najkrótszym czasie. Próbki nie powinny być zamrażane, chyba że jest to bezwzględnie konieczne. Jeśli niemożliwe jest zagwarantowanie szybkiego transportu do laboratorium w ciągu 24 godzin, próbki należy natychmiast zamrozić i przechowywać, a następnie przewozić na suchym lodzie.

Ponadto – co nie zastępuje chłodzenia – wymazy muszą być umieszczone (zanurzone całkowicie) w płynie z antybiotykami lub specjalnym środku do transportu wirusów w temperaturze 4 °C. W braku takiego środka wymazy należy umieścić ponownie w pojemnikach i dostarczyć w postaci suchej do laboratorium w celu badania.

Na przechowywanie i transport mogą wpływać różnorodne czynniki, zatem wybrana metoda transportu musi być odpowiednia do tego celu.

6. Płyn z antybiotykami

Płyn z antybiotykami, o którym mowa w pkt 5, powinien być sporządzony na bazie buforowanego roztworu chlorku sodu, fosforanu sodu i fosforanu potasu (PBS) o pH 7,0–7,4 (sprawdzonym po dodaniu antybiotyku).

Podłoża z dodatkiem białek, np. wyciąg mózgowo-sercowy lub tris buforowany bulion tryptozowy, mogą zwiększyć stabilność wirusa, zwłaszcza w czasie transportu. Stosowane antybiotyki i ich stężenia mogą być różne w zależności od lokalnej sytuacji i dostępności.

W przypadku próbek kału mogą być konieczne bardzo wysokie stężenia antybiotyków. Odpowiednie poziomy wynoszą: 10 000 j.m./ml penicyliny, 10 mg/ml streptomycyny, 0,25 mg/ml gentamycyny i 5 000 j.m./ml nystatyny. Podane stężenia można zredukować nawet pięciokrotnie w przypadku tkanek i wymazów z tchawicy.

Jeśli konieczna jest kontrola *Chlamydomphila*, należy dodać 0,05–0,1 mg/ml oksytetracykliny.

7. Płyn zawierający wyciąg mózgowo-sercowy

Roztwór musi być przygotowany w wodzie i zawierać 15 % wyciągu mózgowo-sercowego przed sterylizacją (dokonywaną przez autoklawowanie w temperaturze 121 °C przez okres 15 minut).

Po sterylizacji należy dodać antybiotyki w następujących ilościach: 10 000 j.m./ml penicyliny G, 20 µg amfoterycyny B i 1 000 µg/ml gentamycyny. Płyn może być przechowywany w temperaturze 4 °C przez okres maksymalnie dwóch miesięcy.

8. Procedury stosowane w odniesieniu do odpowiednich przepisów dyrektywy 2005/94/WE

8.A. Podejrzenie wystąpienia ognisk

8.1. Artykuł 7 ust. 1 – Środki stosowane w gospodarstwach, w których podejrzewa się wystąpienie ogniska

W ramach inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie, w którym podejrzewa się ognisko choroby, należy zastosować następujące środki:

- kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa, jeśli ewidencja taka istnieje. W sprawozdaniu z inspekcji urzędowego lekarza weterynarii należy zawrzeć dane dotyczące dziennej upadkowości oraz dzienne dane dotyczące produkcji jaj oraz przyjmowania pokarmów i płynów, odnoszące się do okresu rozpoczynającego się tydzień przed datą pojawienia się pierwszych objawów klinicznych grypy ptaków, aż do dnia inspekcji gospodarstwa przez urzędowego lekarza weterynarii;
- inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej oraz badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, zwłaszcza tych, które sprawiają wrażenie chorych;
- z każdej jednostki produkcyjnej należy pobrać próbki standardowe, chyba że właściwy organ jest przekonany, że na podstawie inspekcji klinicznej przeprowadzonej zgodnie z lit. a) i b) można wykluczyć podejrzenie ogniska choroby;
- niezależnie od negatywnych wyników badań próbek standardowych i z uwzględnieniem czynników lokalnych, w każdej jednostce produkcyjnej przed uchyleniem nadzoru urzędowego musi być przeprowadzona inspekcja kliniczna drobiu.

8.2. Artykuł 10 ust. 3 – Dodatkowe środki w oparciu o dochodzenie epidemiologiczne

W każdej jednostce produkcyjnej należy pobrać próbki od zabitego drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka.

8.B. Wysoce zjadliwa grypa ptaków (HPAI)

8.3. Artykuł 11 ust. 4 – Środki, które mają być stosowane w odniesieniu do drobiu wylężonego z jaj zebranych w gospodarstwach, w których stwierdzono wystąpienie ogniska

W przypadku inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie, w którym znajduje się drób wylężony z jaj zebranych w okresie inkubacji w gospodarstwie, w którym stwierdzono HPAI, należy zastosować następujące środki:

- kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa. W sprawozdaniu z inspekcji urzędowego lekarza weterynarii należy zawrzeć dane dotyczące dziennej upadkowości oraz dzienne dane dotyczące przyjmowania pokarmów i płynów, odnoszące się do okresu rozpoczynającego się tydzień przed datą pojawienia się pierwszych objawów klinicznych HPAI, aż do dnia inspekcji gospodarstwa przez urzędowego lekarza weterynarii, jeśli dane takie są dostępne;

- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą badanie kliniczne drobiu, zwłaszcza tych ptaków, które sprawiają wrażenie chorych lub nie rosną w oczekiwany sposób;
- c) należy pobrać próbki standardowe od drobiu w wieku od dwóch do trzech tygodni;
- d) nadzór urzędowy nad gospodarstwem może być zniesiony po badaniu klinicznym drobiu w wieku powyżej 21 dni oraz uzyskaniu negatywnych wyników badania próbek standardowych.

8.4. *Artykuł 13 ust. 2 lit. b) – Odstępstwa dotyczące pewnych gospodarstw*

W przypadku inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie, któremu przyznano odstępstwo od przepisów art. 11 ust. 2 akapit pierwszy dyrektywy 2005/94/WE, należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa, jeśli ewidencja taka istnieje;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, zwłaszcza tych, które sprawiają wrażenie chorych;
- c) zamiast próbek standardowych, z każdej jednostki produkcyjnej należy 21 dni po dniu ostatniego pozytywnego wyniku HPAI oraz w odstępach 21 dni pobierać następujące próbki do badania laboratoryjnego:
 - i) próbki wszelkiego padłego drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, dostępne w momencie pobierania próbek;
 - ii) o ile jest to możliwe – wymazy z tchawicy lub jamy ustno-gardłowej oraz z kloaki od co najmniej 60 sztuk drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka bądź – jeśli w danym gospodarstwie jest mniej niż 60 sztuk drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka – od wszystkich tych ptaków; w przypadku ptaków małych, egzotycznych, nienawykłych do dotykania przez ludzi lub których dotykanie mogłoby być niebezpieczne dla ludzi, należy zebrać próbki świeżego kału.

Właściwy organ może jednak przyznać odstępstwa od wielkości próbek, określonych w ppkt i) oraz ii), na podstawie oceny ryzyka;

- d) pobieranie próbek, o których mowa w lit. c), oraz ich badanie laboratoryjne należy prowadzić aż do otrzymania negatywnych wyników dwóch kolejnych badań laboratoryjnych przeprowadzonych w odstępie co najmniej 21 dni.

8.5. *Artykuł 15 ust. 1 i 3 – Środki, które mają być stosowane w gospodarstwach kontaktowych*

W ramach inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie kontaktowym należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa, jeśli ewidencja taka istnieje. W sprawozdaniu z inspekcji urzędowego lekarza weterynarii należy zawrzeć dane dotyczące dziennej upadkowości oraz dzienne dane dotyczące przyjmowania pokarmów i płynów, odnoszące się do okresu rozpoczynającego się tydzień przed datą kontaktu ze stadem, w którym podejrzewa się zakażenie grypą ptaków, aż do dnia inspekcji gospodarstwa przez urzędowego lekarza weterynarii, jeśli dane takie są dostępne;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, zwłaszcza tych, które sprawiają wrażenie chorych;
- c) jeśli u drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka obecne są objawy kliniczne lub widoczny jest wzrost dziennej upadkowości (ponadtrzykrotne przekroczenie normalnego współczynnika upadkowości w stadzie) lub spadek dziennej produkcji jaj (o ponad 5 %) lub spadek dziennego wskaźnika przyjmowania pokarmów i/lub płynów (o ponad 5 %), z każdej jednostki produkcyjnej należy natychmiast pobrać próbki standardowe;
- d) w przypadku braku oznak, o których mowa w lit. b) i c), próbki standardowe należy pobrać 21 dni po dniu ostatniego podejrzanego kontaktu z zakażonym gospodarstwem lub w momencie zabicia drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka.

8.6. *Artykuł 18 lit. b) i c) – Spis i wizyty urzędowego lekarza weterynarii oraz nadzór gospodarstw w obszarze zapowietrzonym*

W ramach inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie komercyjnym należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa. Jeśli widoczny jest wzrost dziennej upadkowości (ponadtrzykrotne przekroczenie normalnego współczynnika upadkowości w stadzie) lub spadek dziennej produkcji jaj (o ponad 5 %) lub spadek dziennego wskaźnika przyjmowania pokarmów i/lub płynów (o ponad 5 %), z każdej jednostki produkcyjnej należy pobrać próbki standardowe;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, zwłaszcza tych, które sprawiają wrażenie chorych;

- c) w odniesieniu do drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, w przypadku których nie oczekuje się wyraźnego przejawiania klinicznych objawów choroby, lub w odniesieniu do ptaków szczepionych, właściwy organ może na podstawie wyników oceny ryzyka podjąć decyzję o obowiązkowym pobraniu próbek standardowych z każdej jednostki produkcyjnej;
- d) na podstawie wyników oceny ryzyka właściwy organ ma obowiązek podjąć decyzję dotyczącą dodatkowego urzędowego nadzoru w postaci inspekcji klinicznych oraz pobierania próbek do badań laboratoryjnych w wybranych gospodarstwach bądź grupach lub w odniesieniu do wybranych typów produkcji.

8.7. *Artykuł 19 lit. f) – Środki, które mają być stosowane w gospodarstwach w obszarach zapowietrzonych*

W ramach inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie, w którym zaobserwowano zwiększoną zachorowalność, upadkowość lub zmiany w danych produkcyjnych, należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa. Jeśli widoczny jest wzrost dziennej upadkowości (ponadtrzykrotne przekroczenie normalnego współczynnika upadkowości w stadzie) lub spadek dziennej produkcji jaj (o ponad 5 %) lub spadek dziennego wskaźnika przyjmowania pokarmów i/lub płynów (o ponad 5 %), z każdej jednostki produkcyjnej należy pobrać próbki standardowe;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, zwłaszcza tych, które sprawiają wrażenie chorych.

8.8. *Artykuł 23 lit. b) – Odstępstwa dla bezpośredniego transportu drobiu w celu natychmiastowego uboju*

W przypadku inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie, któremu przyznano odstępstwo od przepisów art. 22 dyrektywy 2005/94/WE, należy zastosować następujące środki:

- a) kontrola ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne wszelkiego drobiu, zwłaszcza tych sztuk, które sprawiają wrażenie chorych, w okresie krótszym niż 24 godziny przed opuszczeniem gospodarstwa przez drób;
- c) na podstawie wyników oceny ryzyka dokonanego przez właściwy organ zamiast pobierania próbek standardowych należy pobrać co najmniej 60 wymazów z tchawicy lub jamy ustno-gardłowej i/lub 60 wymazów z kloaki od drobiu przeznaczonego na ubój z każdej jednostki produkcyjnej, w okresie krótszym niż 48 godzin przed opuszczeniem gospodarstwa przez drób.

8.9. *Artykuł 25 lit. b) – Odstępstwa dla bezpośredniego transportu drobiu odchowanego, tuż przed okresem nieśnym*

W przypadku inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie, któremu przyznano odstępstwo od przepisów art. 22, przed bezpośrednim transportem drobiu odchowanego, tuż przed okresem nieśnym należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu, zwłaszcza tych sztuk, które sprawiają wrażenie chorych, w okresie krótszym niż 24 godziny przed opuszczeniem gospodarstwa przez drób;
- c) na podstawie wyników oceny ryzyka dokonanego przez właściwy organ zamiast pobierania próbek standardowych należy pobrać co najmniej 60 wymazów z tchawicy lub jamy ustno-gardłowej i/lub wymazów z kloaki od drobiu z każdej jednostki produkcyjnej, w okresie krótszym niż 48 godzin przed opuszczeniem gospodarstwa przez drób.

8.10. *Artykuł 26 ust. 1 lit. a) – Odstępstwo dla bezpośredniego transportu jaj wylęgowych i konsumpcyjnych*

W przypadku inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie utrzymującym stado rodzicielskie, któremu przyznano odstępstwo od przepisów art. 22, przed bezpośrednim transportem jaj wylęgowych należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa;
- b) inspekcję kliniczną każdej jednostki produkcyjnej co 15 dni;
- c) z każdej jednostki produkcyjnej należy pobrać próbki standardowe.

8.11. *Artykuł 29 ust. 1 – Okres obowiązywania środków*

Środki obowiązujące w obszarze zapowietrzonym zgodnie z rozdziałem IV sekcją 3 dyrektywy 2005/94/EC mogą zostać uchylone nie wcześniej niż po 21 dniach od dnia wstępnego oczyszczenia i odkażenia zakażonych gospodarstw, pod warunkiem że:

- a) urzędowy lekarz weterynarii przeprowadził inspekcje we wszystkich gospodarstwach komercyjnych znajdujących się w obszarze zapowietrzonym, a wszelkie kontrole, inspekcje kliniczne i badania laboratoryjne wymienione w pkt 8.6 lit. a), b) i c) oraz w pkt 8.7 przyniosły wyniki negatywne;
- b) urzędowy lekarz weterynarii przeprowadził inspekcje we wszystkich gospodarstwach niekomercyjnych znajdujących się w obszarze zapowietrzonym i ani badanie kliniczne, ani wyniki żadnych przeprowadzonych badań laboratoryjnych nie dały podstaw do podejrzeń zakażenia grypą ptaków;
- c) wszelkie dodatkowo przeprowadzone środki nadzoru urzędowego, określone w pkt 8.6 lit. d), przyniosły wyniki negatywne.

8.12. *Artykuł 30 lit. g) – Środki, które mają być stosowane w obszarach zagrożonych*

W ramach inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie, w którym zaobserwowano zwiększoną zachorowalność, upadkowość lub zmiany w danych produkcyjnych, należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, zwłaszcza tych, które sprawiają wrażenie chorych;
- c) z każdej jednostki produkcyjnej należy pobrać próbki standardowe.

8.13. *Artykuł 35 – Dochodzenie w sprawie podejrzenia występowania HPAI w rzeźniach i w środkach transportu*

W ramach inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie pochodzenia ptaków, u których podejrzewa się lub stwierdzono HPAI w rzeźniach lub środkach transportu, należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa, jeśli ewidencja taka istnieje;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, z uwzględnieniem konsultacji z urzędowym lekarzem weterynarii w rzeźni, który zobowiązany jest przedstawić szczegółowo wszelkich danych z poprzednich inspekcji oraz wyniki badań przed- i poubojowych ptaków;
- c) z każdej jednostki produkcyjnej należy pobrać próbki standardowe, chyba że właściwy organ jest przekonany, że na podstawie dochodzenia weterynaryjnego przeprowadzonego zgodnie z lit. a) i b) można wykluczyć podejrzenie obecności HPAI;
- d) oprócz próbek standardowych, do badania laboratoryjnego należy dostarczyć próbki co najmniej pięciu ptaków chorych, padłych lub ubitych w rzeźni, u których zaobserwowano zmiany patologiczne.

8.14. *Artykuł 36 ust. 1 – Środki, które mają być stosowane w rzeźniach*

Po zakończeniu dochodzeń, o których mowa w pkt 8.13, pod warunkiem że wyniki badań laboratoryjnych są negatywne i nie ma klinicznego podejrzenia obecności HPAI w gospodarstwie pochodzenia ptaków ani w rzeźni, urzędowe środki nadzoru mogą zostać uchylone.

8.15. *Artykuł 37 ust. 1 i 2 – Środki, które mają być stosowane w placówkach kontroli granicznej lub w środkach transportu*

8.15.1. W ramach dokonywanego przez urzędowego lekarza weterynarii badania drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, trzymany w izolacji po wycofaniu ich z placówki kontroli granicznej lub ze środków transportu ze względu na podejrzenie lub stwierdzenie HPAI, należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę odpowiedniej dokumentacji i ewidencji, jeśli taka istnieje;
- b) badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, trzymany w izolacji, oraz inspekcję kliniczną wszelkiego innego drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, w szczególności tych, które sprawiają wrażenie chorych;
- c) należy pobrać próbki od drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, wybranych z różnych skrzyń lub klatek, w których odbywał się transport.

8.15.2. W ramach inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w zidentyfikowanym gospodarstwie pochodzenia ptaków w przypadku uboju drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, o których mowa, należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa, jeśli ewidencja taka istnieje;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, z uwzględnieniem konsultacji z urzędowym lekarzem weterynarii w rzeźni, który zobowiązany jest przedstawić szczegóły wszelkich danych z poprzednich inspekcji oraz wyniki badań przed- i poubojowych ptaków;
- c) z każdej jednostki produkcyjnej należy pobrać próbki standardowe, chyba że właściwy organ jest przekonany, że na podstawie dochodzenia weterynaryjnego przeprowadzonego zgodnie z lit. a) i b) można wykluczyć podejrzenie obecności HPAI;
- d) oprócz próbek standardowych, o których mowa w lit. c), do badania laboratoryjnego należy dostarczyć próbki co najmniej pięciu ptaków chorych, padłych lub ubitych w rzeźni, u których zaobserwowano zmiany patologiczne;
- e) pod warunkiem że wyniki badań laboratoryjnych próbek, o których mowa w lit. c) i d), są negatywne i nie ma klinicznego podejrzenia obecności HPAI w gospodarstwie pochodzenia ptaków ani w rzeźni, urzędowe środki nadzoru mogą zostać uchylone.

8.C. Nisko zjadliwa grypa ptaków (LPAI)

8.16. *Artykuł 39 ust. 6 lit. b) i h) – Środki, które mają być stosowane w gospodarstwach, w których stwierdzono występowanie ogniska LPAI*

W przypadku inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie przed transportem drobiu do rzeźni lub w gospodarstwie, w którym znajduje się drób wylężony z jaj zebranych w okresie inkubacji, należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne danego drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka;
- c) z każdej jednostki produkcyjnej należy zebrać próbki standardowe od ptaków przeznaczonych na ubój, w okresie krótszym niż 48 godzin przed opuszczeniem gospodarstwa przez drób;
- d) z każdej jednostki produkcyjnej należy pobrać próbki standardowe od drobiu już wylężonego z jaj zebranych w okresie inkubacji.

8.17. *Artykuł 40 ust. 2 lit. b) – Odstępstwo dla niektórych gospodarstw od środków, które mają być stosowane w przypadku potwierdzenia wystąpienia ogniska*

W przypadku inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie, któremu przyznano odstępstwo od przepisów art. 39 ust. 2 oraz art. 39 ust. 5 lit. b) dyrektywy 2005/94/WE, należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa, jeśli ewidencja taka istnieje;
- b) inspekcje kliniczne w każdej jednostce produkcyjnej w regularnych odstępach czasu, obejmujące ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, zwłaszcza tych, które sprawiają wrażenie chorych;
- c) zamiast próbek standardowych z każdej jednostki produkcyjnej należy, 21 dni po dniu ostatniego pozytywnego wyniku LPAI oraz w odstępach 21 dni, pobierać następujące próbki do badania laboratoryjnego:
 - i) próbki wszelkiego padłego drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, dostępne w momencie pobierania próbek;
 - ii) wymazy z tchawicy lub jamy ustno-gardłowej oraz z kloaki od 60 sztuk drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka bądź – jeśli w danym gospodarstwie jest mniej niż 60 sztuk drobiu lub ptaków utrzymywanych przez człowieka – od wszystkich tych ptaków; w przypadku gdy dotyczy to ptaków małych, egzotycznych, nienawykłych do dotykania przez ludzi lub których dotykanie mogłoby być niebezpieczne dla ludzi, należy zebrać próbki świeżego kału.

Właściwy organ może jednak przyznać odstępstwa od wielkości próbek, określonych w ppkt i) i ii), na podstawie oceny ryzyka;

- d) pobieranie próbek, o których mowa w lit. c), oraz ich badanie laboratoryjne należy prowadzić aż do otrzymania negatywnych wyników dwóch kolejnych badań laboratoryjnych przeprowadzonych w odstępie co najmniej 21 dni.

8.18. *Artykuł 42 ust. 1 i 3 – Środki, które mają być stosowane w gospodarstwach kontaktowych*

W ramach inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie kontaktowym należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa kontaktowego, jeśli ewidencja taka istnieje;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, zwłaszcza tych, które sprawiają wrażenie chorych;
- c) należy pobrać próbki z każdej jednostki produkcyjnej lub w przypadku zabicia drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka.

8.19. *Artykuł 44 ust. 1 lit. b) – Środki, które mają być stosowane w strefach zamkniętych*

W ramach inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie komercyjnym w strefie zamkniętej należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, zwłaszcza tych, które sprawiają wrażenie chorych;
- c) z każdej jednostki produkcyjnej należy pobrać próbki standardowe;
- d) na podstawie wyników oceny ryzyka właściwy organ ma obowiązek podjąć decyzję dotyczącą dodatkowego urzędowego nadzoru w postaci inspekcji klinicznych oraz pobierania próbek do badań laboratoryjnych w wybranych gospodarstwach bądź grupach lub w odniesieniu do wybranych typów produkcji.

8.20. *Artykuł 45 lit. a) i b) – Okres obowiązywania środków*

Środki obowiązujące w obszarze zamkniętym zgodnie z rozdziałem V sekcją 3 dyrektywy 2005/94/EC mogą zostać uchylone nie wcześniej niż po 21 dniach od dnia wstępnego oczyszczenia i odkażenia zakażonych gospodarstw po likwidacji ptaków w gospodarstwie lub nie wcześniej niż po 42 dniach od dnia stwierdzenia LPAI, pod warunkiem że:

- a) urzędowy lekarz weterynarii przeprowadził inspekcje we wszystkich gospodarstwach komercyjnych w obszarze zamkniętym, a także przeprowadzone zostały wszystkie badania laboratoryjne próbek, o których mowa w pkt 8.13 lit. c) i d), i ich wyniki są dostępne;
- b) dostępne są wyniki wszystkich dotychczasowych inspekcji klinicznych i badań laboratoryjnych, które mogą obejmować gospodarstwa niekomercyjne w celu określenia ryzyka rozprzestrzenienia się LPAI;
- c) na podstawie wyników oceny ryzyka z uwzględnieniem sytuacji epidemiologicznej oraz wyników badań laboratoryjnych, o których mowa w lit. a) i b), właściwy organ uzna, że ryzyko rozprzestrzenienia się LPAI jest niewielkie; ocena taka może stwierdzać, że w przypadku pozytywnych wyników serologicznych i negatywnych wyników wirusologicznych ograniczenia mogą zostać zniesione.

8.D. *Środki zmierzające do uniknięcia rozprzestrzeniania się wirusów grypy pochodzących od ptaków na inne gatunki*

8.21. *Artykuł 47 ust. 1 i 6 – Badania laboratoryjne i inne środki dotyczące świń i innych gatunków*

W ramach inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie, w którym hodowane są świnię, po stwierdzeniu grypy ptaków należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa, jeśli ewidencja taka istnieje;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne świń, zwłaszcza tych, które sprawiają wrażenie chorych;
- c) przed dniem zabicia zakażonego drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka lub w tym dniu należy pobrać wymazy z nosa lub jamy ustno-gardłowej od co najmniej 60 świń z każdej jednostki produkcyjnej lub – jeśli w danej jednostce produkcyjnej jest mniej niż 60 świń – od wszystkich świń w tej jednostce. W okresie od dwóch do czterech tygodni od daty zabicia należy pobrać co najmniej 60 próbek krwi od świń. Probki należy pobierać w taki sposób, aby od każdej grupy świń będących ze sobą w bezpośrednim kontakcie pobrać co najmniej po jednej próbce;

- d) na przemieszczenie świń do innych gospodarstw można zezwolić, o ile uzyskano wynik negatywny w odniesieniu do co najmniej 60 wymazów z nosa lub jamy ustno-gardłowej oraz 60 próbek krwi pobranych od świń z każdej jednostki produkcyjnej 14 dni po uzyskaniu pozytywnych wyników badań na obecność grypy ptaków.

Na przemieszczenie świń do rzeźni można zezwolić, o ile uzyskano wynik negatywny w odniesieniu do co najmniej 60 wymazów z nosa lub jamy ustno-gardłowej pobranych z każdej jednostki produkcyjnej 14 dni po uzyskaniu pozytywnych wyników badań na obecność grypy ptaków.

W przypadku uzyskania nierozstrzygujących lub pozytywnych wyników laboratoryjnych wszelkie dalsze dochodzenia są wymagane do wykluczenia zakażenia lub przeniesienia grypy ptaków na świnie;

- e) jeśli urzędowy lekarz weterynarii podejrzewa, że inne ssaki domowe znajdujące się w gospodarstwie, szczególnie te, u których stwierdzono podatność na zakażenie wirusami grypy ptaków podtypów H5 i H7, mogły mieć kontakt z zakażonym drobiem lub innymi utrzymywanymi ptakami, należy pobrać próbki do badań laboratoryjnych.

8.E. Ponowne zasiedlenie

8.22. Artykuł 49 ust. 3 lit. b) i c) – Ponowne zasiedlenie gospodarstwa

W ramach inspekcji dokonywanej przez urzędowego lekarza weterynarii w gospodarstwie komercyjnym, które zostało ponownie zasiedlone, należy zastosować następujące środki:

- a) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa;
- b) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, zwłaszcza tych, które sprawiają wrażenie chorych;
- c) zamiast pobierania próbek standardowych, z każdej jednostki produkcyjnej należy pobrać następujące próbki:
 - i) co najmniej 20 próbek krwi – bezpośrednio po umieszczeniu drobiu w gospodarstwie, z wyjątkiem piskląt jednodniowych; jeśli jest to właściwe, próbki takie mogą być pobrane w gospodarstwie pochodzenia drobiu przed jego przemieszczeniem do gospodarstwa, które ma zostać ponownie zasiedlone;
 - ii) próbki martwego drobiu lub wymazy pobrane z jego zwłok, od co najmniej 10 martwych ptaków na tydzień w okresie 21 dni od dnia ponownego zasiedlenia;
- d) jeśli dane gospodarstwo było poprzednio zakażone HPAI, w stosownych przypadkach należy również w ostatnim tygodniu okresu 21 dni po dacie ponownego zasiedlenia pobrać 20 wymazów z tchawicy lub jamy ustno-gardłowej oraz 20 wymazów z kloaki od ptactwa wodnego (kaczek i/lub gęsi) z każdej jednostki produkcyjnej;
- e) jeśli dane gospodarstwo było poprzednio zakażone LPAI, należy również pobrać 20 wymazów z tchawicy lub jamy ustno-gardłowej, 20 wymazów z kloaki oraz 20 próbek krwi z każdej jednostki produkcyjnej.

8.F. Szczepienia

8.23. Artykuł 56 ust. 2 lit. i) – Szczepienie zapobiegawcze drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka

Szczepiony drób lub inne utrzymywane ptaki muszą zostać poddane badaniom laboratoryjnym określonym w rozdziale IX dyrektywy 2005/94/WE z wykorzystaniem zatwierdzonych testów DIVA, o ile znany jest wirus terenowy.

W przypadku wykorzystania ptaków wskaźnikowych muszą one być obecne w każdym szczepionym stadzie oraz muszą być poddane inspekcji klinicznej i przebadane testem zahamowania hemaglutynacji (HI). W tym celu przynajmniej co 60 dni należy pobierać po 20 próbek krwi od nieszczepionych ptaków wskaźnikowych w każdym gospodarstwie, w którym przeprowadzono szczepienie.

8.24. Załącznik IX – Wymogi dotyczące przemieszczania drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka i produktów drobiowych, stosowane w odniesieniu do szczepienia interwencyjnego

W odniesieniu do przemieszczania żywego drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka oraz ich jaj należy stosować rygorystyczne środki monitorujące w celu zminimalizowania ryzyka dalszego rozprzestrzeniania się zakażenia grypą ptaków.

W tym celu na początku kampanii szczepienia interwencyjnego należy stosować te same środki monitorujące w odniesieniu do przemieszczania żywego drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka oraz ich jaj w celu zminimalizowania ryzyka dalszego rozprzestrzenienia się zakażenia grypą ptaków w obszarze szczepienia i poza nim.

- a) Przed pierwszym przemieszczeniem jaj wylęgowych i jaj konsumpcyjnych w ramach obszaru szczepienia i poza ten obszar, a także po tym przemieszczeniu, przynajmniej co 30 dni urzędowy lekarz weterynarii musi zastosować następujące środki:
 - i) inspekcję kliniczną nieszczepionego drobiu reprodukcyjnego lub nieśnego w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu, zwłaszcza tych sztuk, które sprawiają wrażenie chorych; z każdej jednostki produkcyjnej należy pobrać od drobiu próbki standardowe; lub
 - ii) inspekcję kliniczną nieszczepionego drobiu reprodukcyjnego lub nieśnego w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne ptaków wskaźnikowych znajdujących się w tych stadach; od ptaków wskaźnikowych należy pobrać próbki standardowe.
- b) W przypadku przemieszczania żywego szczepionego drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka do innych gospodarstw lub w przypadku przemieszczania żywego szczepionego drobiu wewnątrz obszaru szczepienia i poza ten obszar, urzędowy lekarz weterynarii musi zastosować następujące środki:
 - i) kontrolę ewidencji produkcyjnej i zdrowotnej gospodarstwa;
 - ii) inspekcję kliniczną w każdej jednostce produkcyjnej, obejmującą ocenę jej historii klinicznej, oraz badanie kliniczne drobiu i innych ptaków utrzymywanych przez człowieka, w okresie 72 godzin przed opuszczeniem gospodarstwa przez drób, ze szczególnym uwzględnieniem ptaków wskaźnikowych;
 - iii) w wypadkach gdy wyniki kontroli oraz inspekcji klinicznej i badań wymienionych w pkt i) i ii) nie są zadowalające, należy pobrać próbki standardowe od ptaków wskaźnikowych; jeśli jednak wyniki te są zadowalające, należy pobrać próbki określone poniżej od:
 - szczepionego drobiu lub innych ptaków utrzymywanych przez człowieka: co najmniej 20 wymazów z tchawicy lub jamy ustno-gardłowej, 20 wymazów z kloaki i 20 próbek krwi do badania w odpowiednim teście DIVA, w okresie 72 godzin przed opuszczeniem gospodarstwa,
 - ptaków wskaźnikowych: co najmniej 20 wymazów z tchawicy lub jamy ustno-gardłowej, 20 wymazów z kloaki i 20 próbek krwi w celu przeprowadzenia badań serologicznych z wykorzystaniem testu HI przed opuszczeniem gospodarstwa.

ROZDZIAŁ V

Wirusologiczne badania diagnostyczne i ocena wyników

1. Do czasu pojawienia się i rozwoju testów molekularnych za zdecydowanie najbardziej wrażliwe badanie diagnostyczne wykrywające grypę ptaków uznawano wyizolowanie wirusa poprzez inokulację zarodków kurzych; było to niezbędne dla późniejszego określenia i scharakteryzowania zakażającego wirusa. Zasadnicze etapy tego rodzaju badania opisano w niniejszym rozdziale.
2. **Przygotowanie próbek**

Wymazy dostarczane w postaci „suchej” powinny być zanurzone całkowicie w płynie o wystarczającym stężeniu antybiotyków. Próbki mogą być łączone w partie złożone z pięciu sztuk, pod warunkiem że pochodzą one od tego samego gatunku i jednostki epidemiologicznej oraz zostały pobrane w tym samym czasie.

Zwłoki dostarczane do laboratorium muszą zostać poddane badaniu pośmiertnemu oraz należy pobrać próbki z następujących organów: kał lub treść jelit, tkanka mózgu, tchawica, płuca, wątroba, śledziona i inne organy w widoczny sposób zmienione. Wymienione narządy i tkanki mogą być łączone, ale materiał kałowy musi być trzymany oddzielnie.

Próbki kału i narządy muszą być homogenizowane (w załączonym homogenizatorze lub w moździerzku aptekarskim z użyciem jałowego piasku) w płynie z antybiotykami, tak aby uzyskać 10–20-procentową zawiesinę.

Zanurzone wymazy i zawiesiny należy pozostawić w temperaturze pokojowej przez okres około 2 godzin (lub w temperaturze 4 °C przez dłuższy okres czasu), a następnie wyklarować przez odwirowanie (np. 800–1 000 × g przez 10 minut).

3. Izolacja wirusa w zarodkach kurzych

Sklarowany supernatant powinien być podany do jamy omoczniowej co najmniej czterech zarodków kurzych inkubowanych przez 9–11 dni, w ilości po 0,1–0,2 ml do każdej z nich. W zasadzie zarodki te należy pozyskiwać ze stada wolnego od specyficznych patogenów (SPF), ale jeśli jest to niemożliwe, dopuszczalne jest wykorzystywanie zarodków ze stada, u którego nie stwierdza się przeciwciał przeciwko grypie ptaków (wolne od specyficznych przeciwciał – SAN).

Zakażone zarodki należy inkubować w temp. 37 °C i codziennie prześwietlać. Jaja z martwymi lub chorymi zarodkami w miarę ich wykrywania, a pozostałe po upływie sześciu dni od zakażenia należy schłodzić do temp. 4 °C, a płyn omocznioowo-owodniowy należy zbadać pod kątem właściwości hemaglutynacyjnych. W przypadku niestwierdzenia hemaglutynacji powyższe postępowanie należy powtórzyć, stosując jako inoculum nierozcieńczony płyn omocznioowo-owodniowy. W przypadku stwierdzenia hemaglutynacji należy wykluczyć obecność bakterii w badaniu hodowlanym. W przypadku obecności bakterii płyny można przesączyć przez filtr z membraną o średnicy 450 nm, następnie dodać antybiotyki i wprowadzić do jaj z zarodkami w sposób opisany powyżej.

W celu przyspieszenia diagnozy niektóre laboratoria stosowały dwa pasaż trzyniowe lub pasaż dwudniowy i czterodniowy, uzyskując wyniki podobne do otrzymywanych w dwóch pasażach sześciodniowych, jednak nie zostało to jeszcze w pełni ocenione.

Płyny, w których uzyskano wynik pozytywny, muszą być przebadane dla wykluczenia obecności bakterii. W przypadku obecności bakterii płyny można przesączyć przez filtr z membraną 450 nm lub odwirować w celu usunięcia bakterii oraz ponownie pasażować na zarodkach po dodaniu większej ilości antybiotyków.

4. Rozpoznanie różnicowe

a) Różnicowanie wstępne

Ponieważ istotne jest, aby środki zwalczające, mające na celu ograniczenie rozprzestrzeniania się wirusa grypy ptaków, były wdrożone jak najszybciej, każde krajowe laboratorium referencyjne, które wyizolowało hemaglutynującego wirusa, musi mieć możliwość stwierdzenia, czy jest to wirus grypy A podtypu H5 bądź H7 czy też wirus rzekomego pomoru drobiu. Do wykonania testu zahamowania hemaglutynacji należy użyć płynów wykazujących hemaglutynację w sposób opisany w rozdziale IX. Hamowanie dodatnie, np. miano w przedziale 2–3 log₂ pozytywnej kontroli, uzyskane przy zastosowaniu swoistych surowic poliklonalnych w stosunku do podtypów H5 i H7 grypy A, może służyć jako wstępna identyfikacja umożliwiająca wprowadzenie tymczasowych środków zwalczania.

b) Identyfikacja potwierdzająca

Ponieważ w obrębie wirusów grypy istnieje 16 podtypów hemaglutyniny i 9 podtypów neuraminidazy, a w każdym z nich występuje zmienność, nie jest możliwe ani z punktu widzenia praktycznego, ani finansowego, aby każde krajowe laboratorium przechowywało surowice pozwalające na pełną identyfikację podtypów izolatów grypy. Jednak każde krajowe laboratorium referencyjne musi przynajmniej:

- i) potwierdzić, z wykorzystaniem testu podwójnej immunodufuzji w celu określenia antygenów grupowych, czy dany izolat jest wirusem grypy A;
- ii) stwierdzić, czy dany izolat jest typu H5 lub H7 (pozytywna identyfikacja wymaga wdrożenia środków zwalczających w odniesieniu do LPAI podtypów H5 i H7);
- iii) natychmiast dostarczyć wszystkie izolaty HPAI oraz H5 i H7 do wspólnotowego laboratorium referencyjnego w celu potwierdzenia i ustalenia pełnej charakterystyki, chyba że udzielono odstępstwa zgodnie z lit. d).

Ponadto w przypadku laboratoriów dysponujących odpowiednimi urządzeniami pożądane jest:

- iv) wykonanie testu określającego wskaźnik dożylny zjadliwości na 6-tygodniowych kurczętach, zgodnie z opisem w rozdziale VII. Indeks dożylny zjadliwości przekraczający 1,2 wskazuje na obecność wirusa wymagającego pełnego zastosowania środków zwalczania HPAI.

Krajowe laboratoria referencyjne muszą również rozważyć pozyskanie wiedzy i sprzętu pozwalającego na sekwencjonowanie nukleotydów genu hemaglutyniny w celu określenia, czy występują liczne aminokwasy zasadowe w miejscu cięcia białka prekursora hemaglutyniny w przypadku każdego wirusa LPAI podtypów H5 lub H7. Choć wspólnotowe laboratorium referencyjne, w ramach swoich obowiązków określonych w załączniku VII pkt 2 lit. b) do dyrektywy 2005/94/WE, przeprowadzi określenie zjadliwości jako procedurę o priorytetowym znaczeniu, to opisane powyżej scharakteryzowanie wirusa na poziomie krajowym istotnie skróci czas diagnozy, a w przypadku uzyskania pozytywnego wyniku – czas pełnego wprowadzenia środków zwalczania HPAI.

c) Dalsze typowanie i charakterystyka izolatów

Wspólnotowe laboratorium referencyjne musi otrzymać od krajowych laboratoriów referencyjnych wszystkie wirusy powodujące hemaglutynację w celu wykonania dalszych badań antygenowych i genetycznych, aby umożliwić lepsze zrozumienie epidemiologii choroby (chorób) we Wspólnocie, zgodnie z funkcjami i obowiązkami wspólnotowego laboratorium referencyjnego, określonymi w załączniku VII do dyrektywy 2005/94/WE.

Oprócz tych funkcji i obowiązków wspólnotowe laboratorium referencyjne ma obowiązek pełnego określenia typów antygenowych wszystkich otrzymanych szczepów wirusa. W przypadku wirusów H5 i H7, których wskaźnik dożylnej zjadliwości nie przekracza 1,2, należy również natychmiast przeprowadzić badanie sekwencjonowania nukleotydów genu hemaglutyniny w celu określenia, czy występują liczne aminokwasy zasadowe w miejscu cięcia białka prekursora hemaglutyniny; niezwłocznie po uzyskaniu wyników należy poinformować krajowe laboratorium referencyjne oraz właściwy organ w kraju pochodzenia, aby umożliwić pełne wprowadzenie środków zwalczania HPAI.

d) Z uwagi na zmieniającą się sytuację epidemiologiczną w odniesieniu do HPAI/LPAI możliwe jest, w drodze umowy zawartej z Komisją oraz wspólnotowym laboratorium referencyjnym, udzielenie odstępstwa laboratoriom dysponującym pełnymi możliwościami szybkiej charakteryzacji wirusa, przewidującego dostarczenie ograniczonego zbioru tych wirusów po analizie danych oraz dokonanie przez wspólnotowe laboratorium referencyjne odpowiedniej selekcji. Odstępstwo takie może być dopuszczalne jedynie w sytuacji, gdy krajowe laboratorium referencyjne jest w stanie szybko wygenerować dane i udostępnić je wspólnotowemu laboratorium referencyjnemu.

ROZDZIAŁ VI

Badania molekularne i ocena wyników

Obecna definicja HPAI pozwala na molekularną identyfikację czynników zjadliwości i potwierdza możliwość stosowania technik molekularnych w diagnozie grypy ptaków. Ostatnio dokonano postępów w ich stosowaniu w detekcji i charakteryzowaniu wirusa grypy ptaków bezpośrednio na podstawie materiału klinicznego pobranego od zakażonych ptaków. Zastosowanie konwencjonalnych technik RT-PCR na materiale klinicznym, przy właściwie zdefiniowanych starterach, może pozwolić na szybkie wykrycie i określenie podtypu (przynajmniej w odniesieniu do H5 i H7) oraz otrzymanie amplikonu PCR, który może być wykorzystywany do badania sekwencjonowania nukleotydów; wykazano również, że techniki te mają dużą przydatność, pozwalając na szybkie identyfikowanie kolejnych ognisk po wykryciu zakładu, w którym nastąpiło pierwotne zakażenie, i scharakteryzowaniu wirusa. Jednoetapowe badanie RT-PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem systemów starterów i sond fluorescencyjnych (rRT-PCR) pozwala na jeszcze szybszą i bardziej czułą diagnozę obejmującą wykrycie wirusów grypy ptaków oraz określenie podtypu H5 lub H7 w próbkach klinicznych.

W przypadku systemów RT-PCR i rRT-PCR istotnym problemem jest fakt, że do tej pory różne laboratoria opracowały różne systemy, które, choć w pełni uprawnione, nie zostały zatwierdzone ani poddane testom na dużych liczbach próbek w różnych laboratoriach. Wspólnotowe laboratorium referencyjne oraz określone krajowe laboratoria referencyjne zajmowały się tym problemem w ramach projektu finansowanego przez Wspólnotę (EU AVIFLU), mającego na celu stworzenie ratyfikowanych protokołów dotyczących konwencjonalnego RT-PCR oraz rRT-PCR, które mogłyby być przyjęte przez pozostałe krajowe laboratoria referencyjne. Jeśli parametry badania, jak liczba cykli oraz czas niezbędny do osiągnięcia poszczególnych etapów temperaturowych PCR, odbiegają od zaleceń w określonych protokołach, przed ich zastosowaniem należy wykazać, że są one odpowiednie do przewidzianego celu, zgodnie z pkt 6 rozdziału I niniejszego podręcznika diagnostycznego.

Stosowane przez wspólnotowe laboratorium referencyjne standardowe protokoły dla wymienionych testów molekularnych oraz ich oceny znajdują się na stronie internetowej:

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

ROZDZIAŁ VII

Badanie zjadliwości *in vivo* i ocena wyników

Zjadliwość dla kur wirusów grypy A wyizolowanych od ptaków należy ocenić przy zastosowaniu testu indeksu dożylnej zjadliwości (IVPI), który należy przeprowadzić następująco:

- świeży zakaźny płyn omocznioowy o mianie HA > 1/16 (> 2⁴ lub > log₂ 4, jeśli wyrażone jako odwrotność z możliwie najniższego pasażu, najlepiej z początkowej izolacji bez uprzedniej selekcji, należy rozcieńczyć w proporcji 1/10 w jałowym izotonicznym roztworze soli;
- 0,1 ml rozcieńczonego wirusa należy podać drogą dożylną wszystkim dziesięciu sześciotygodniowym kurczętom SPF lub SAN;

- c) kurczęta poddawane są badaniu w odstępach 24-godzinnych przez 10 dni. W trakcie każdej obserwacji każdemu ptakowi przyznaje się punkty: 0 (zdrowy), 1 (chory), 2 (bardzo chory) lub 3 (padły). Rozróżnienie ptaków chorych i bardzo chorych zależy od subiektywnej oceny klinicznej.

Zazwyczaj za „chore” uznaje się ptaki wykazujące jeden z poniższych objawów, a za „bardzo chore” – ptaki wykazujące więcej niż jeden z nich: objawy ze strony układu oddechowego, depresja, biegunka, sinienie widocznych partii skóry lub dzwonek, obrzęk głowy, objawy nerwowe. Ptakom padłym przyznaje się po 3 punkty w każdym z pozostałych dni obserwacji po padnięciu.

Ze względu na dobrostan zwierząt, jeśli ptaki są zbyt chore, aby jeść lub pić, należy je zabić w sposób humanitarny i w kolejnej obserwacji zapisać jako padłe, ponieważ bez podjęcia działań padną w ciągu 24 godzin. Taki sposób postępowania jest akceptowany przez organy akredytacyjne;

- d) IVPI to średnia wartość z poszczególnych obserwacji dla poszczególnych ptaków z okresu 10 dni. Indeks równy 3,00 oznacza, że wszystkie ptaki padły w ciągu 24 godzin, natomiast indeks równy 0,00 oznacza, że w ciągu 10 dni obserwacji żaden ptak nie wykazał objawów klinicznych.

Poniższy przykład obrazuje prostą metodę zapisywania wyników i obliczania indeksów:

Objawy kliniczne	Dzień po zakażeniu										Łączny wynik
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Zdrowe	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	$12 \times 0 = 0$
Chore	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	$6 \times 1 = 6$
Bardzo chore	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	$6 \times 2 = 12$
Padłe	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	$76 \times 3 = 228$
											Razem 246

Uwagi:

10 ptaków obserwowanych przez 10 dni = 100 obserwacji

Indeks = średni wynik na obserwację na badanego ptaka = $246/100 = 2,46$

Każdy wirus grypy A, niezależnie od podtypu, dający w teście IVPI wartość powyżej 1,2, jest uważany za wirusa HPAI.

ROZDZIAŁ VIII

Badania serologiczne i ocena wyników

Najlepszą metodą wykazania obecności wirusa grypy A jest stwierdzenie obecności antygenów nukleoproteiny lub matrix, które posiadają wszystkie wirusy grypy A.

Można tego dokonać poprzez badanie testem podwójnej immunodifuzji z użyciem skoncentrowanego wirusa lub wyciągów z zakażonych błon kosmówkowo-omocznionych.

Preferowanymi metodami wykonywania testów serologicznych na obecność przeciwciał przeciwko wirusowi grypy ptaków są testy hemaglutynacji (HA) i testy zahamowania hemaglutynacji (HI).

Szczegółowe informacje dotyczące technik laboratoryjnych oraz oceny wyników zawiera rozdział 2.7.12 Podręcznika badań diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt lądowych (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*) Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE).

Stosowane przez wspólnotowe laboratorium referencyjne standardowe protokoły dla testów serologicznych oraz oceny ich wyników znajdują się na stronie internetowej:

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

ROZDZIAŁ IX

Systemy monitorowania związane ze szczepieniem

1. Dyrektywa 2005/94/WE i przewodnik diagnostyczny

W sekcjach 2 i 3 rozdziału IX dyrektywy 2005/94/WE dopuszcza się pod pewnymi warunkami stosowanie szczepienia interwencyjnego i zapobiegawczego. Jednym z warunków jest stosowanie strategii DIVA, czyli strategii odróżniania zwierzęcia zakażonego od szczepionego.

Celem szczepienia musi być zapobieganie zakażeniu oraz późniejszemu rozprzestrzenianiu się wirusa pomiędzy stadami. Istnieją niepodważalne dowody, że szczepienie powoduje wzrost ilości wirusa potrzebnej do zakażenia ptaków i zmniejszenie ilości wirusa wydalanego. Tym niemniej, choć ptaki szczepione nie wykazują objawów klinicznych, to również one mogą w przypadku zakażenia rozsiewać wirusa. W ten sposób wirusy HPAI podtypów H5 i H7 mogą przez jakiś czas krążyć niezauważone w stadzie o niższym od optymalnego poziomie odporności w taki sam sposób, jak wirusy LPAI krążą w stadzie nieszczepionym. Konieczna jest zatem możliwość zidentyfikowania stad zaszczepionych, które zostały zakażone wirusem terenowym, aby można było wdrożyć inne środki zwalczania, np. likwidację.

2. Wykorzystanie ptaków wskaźnikowych do monitorowania zakażenia

Na poziomie stada prostą metodą jest regularne monitorowanie ptaków wskaźnikowych pozostawionych bez szczepienia w każdym zaszczepionym stadzie; podejście to jednak stwarza pewne problemy w zarządzaniu, szczególnie jeśli chodzi o identyfikację ptaków wskaźnikowych, zwłaszcza w dużych stadach. Zapewniony musi być kontakt między ptakami wskaźnikowymi a ptakami zaszczepionymi.

3. Badanie laboratoryjne DIVA do monitorowania zakażenia

Jako działanie alternatywne lub uzupełniające można prowadzić badanie narażenia na zakażenie terenowe na ptakach szczepionych z wykorzystaniem testów laboratoryjnych DIVA. W ostatnich latach opracowano szereg systemów testowych, które pozwalają również na wykrycie zakażenia terenowego (*field challenge*) zaszczepionych ptaków. Metodą, która okazała się skuteczna, jest wykorzystanie szczepionki zawierającej wirusa o tym samym podtypie hemaglutyniny (H), ale o innym typie neuraminidazy (N) niż dominujący wirus terenowy. Przeciwciała przeciwko N wirusa terenowego są naturalnym wskaźnikiem zakażenia.

System ten był wykorzystywany we Włoszech po ponownym pojawieniu się wirusa LPAI H7N1 w 2000 r. Jako uzupełnienie bezpośrednich środków zwalczania wprowadzono strategię DIVA, obejmującą wykorzystanie szczepionki zawierającej wirusa H7N3 w celu zwalczania zakażenia terenowego wirusem H7N1. Ptaki szczepione i ptaki narażone w terenie były różniane poprzez zastosowanie testu serologicznego wykrywającego specyficzne przeciwciała przeciwko N1. Tę samą strategię zastosowano do zwalczania LPAI wywołanej wirusem H7N3 we Włoszech w latach 2002–2003 – tym razem zastosowano szczepionkę H7N1 i test serologiczny wykrywający specyficzne przeciwciała przeciwko N3. W obu przypadkach szczepienia połączone z likwidacją stad, przeprowadzone z wykorzystaniem opisanej strategii DIVA, spowodowały zwalczenie wirusa terenowego.

Problemy z opisanym systemem powstają wówczas, gdy pojawia się wirus terenowy o tym samym antygenie N, co dotychczasowy wirus terenowy, ale o podtypie H innym niż H5 lub H7, bądź gdy podtypy o tych samych antygenach N krążą już w terenie. Wiadomo że w szczególności kaczki bywają nosicielami więcej niż jednego podtypu. Istniała również potrzeba opracowania odpowiedniego testu, który pozwalałby na rutynowe monitorowanie stad dla stwierdzenia obecności przeciwciał przeciwko neuraminidazie. We Włoszech opracowano „doraźny” test serologiczny oparty na metodzie pośredniej immunofluorescencji, w którym jako antygen wykorzystano białka N ulegające ekspresji w rekombinantach bakulowirusowych. Jego zastosowanie może być łatwiejsze i bardziej powszechne po opracowaniu testu ELISA.

Wykorzystanie szczepionek zawierających tylko HA, takich jak rekombinowane szczepionki wektorowe, umożliwia stosowanie w wykrywaniu zakażeń u szczepionych ptaków klasycznych testów AGID lub testów ELISA opartych na nukleoproteinach, białkach niestrukturalnych lub białkach otoczki.

W przypadku szczepionek inaktywowanych opisano test wykrywający przeciwciała przeciwko niestrukturalnym białkom wirusa, które są produkowane tylko w czasie naturalnego zakażenia. System taki wymaga jeszcze potwierdzenia w terenie; ma jednak takie ograniczenie, że naturalne zakażenie stada jakimkolwiek wirusem grypy, niezależnie od podtypu, prowadzi do wytworzenia przeciwciał przeciwko temu białku niestrukturalnemu.

Opracowanie szybkich i czułych metod wykrywania wirusa, szczególnie takich, które mogą być zautomatyzowane, tak jak RT-PCR w czasie rzeczywistym, oznacza możliwość ich wykorzystania do prostego, powszechnego i regularnego badania zaszczepionych ptaków na obecność wirusa terenowego. Możliwość wykrywania wirusa będzie jednak ograniczona w czasie do krótkiego okresu w ostrej fazie zakażenia, a wykrywanie takie nie będzie mogło być podstawą stwierdzenia, że stado nie było narażone na zakażenie wirusem w przeszłości. To podejście jest najwłaściwsze do badania szczepionych ptaków przed ich przemieszczeniem dla wykazania, że są one wolne od aktywnego zakażenia.

Liczba próbek, które mają być poddane badaniu wybranym systemem, musi umożliwiać wykluczenie rozprzestrzenienia zakażenia wirusem grypy ptaków w stadzie przekraczającego 15 %, na poziomie ufności wynoszącym 95 %.

ROZDZIAŁ X

Strategie diagnozowania grypy ptaków

Jak stwierdzono w załączniku IV do dyrektywy 2005/94/WE, decyzje o zastosowaniu środków w konkretnych obszarach lub gospodarstwach kontaktowych oraz nasilenie tych środków mogą być bardzo różne w zależności od tego, jak duże jest ryzyko. Podobnie wymagane potwierdzenie diagnostyczne choroby powinno być dostosowane do panującej sytuacji, wielkości zagrożenia i stopnia ryzyka. Decyzje podejmowane przez organy weterynaryjne w odniesieniu do dowodów diagnostycznych muszą w zrównoważony sposób brać pod uwagę potrzebę szybkiego opanowania i zwalczania choroby oraz potencjalne skutki błędnej diagnozy. Oceny takie muszą uwzględniać okoliczności w danym momencie, na które składa się wiele czynników; niektóre sytuacje można jednak przewidzieć.

Sytuacja epidemiologiczna	Potencjalne problemy	Kryteria diagnostyczne
Brak specyficznych oznak, brak oficjalnych podejrzeń	Odosobnione gospodarstwo	Przeprowadzenie szybkiego wykrywania na podstawie RT-PCR dla genu M. Diagnoza różnicowa w razie potrzeby.
Podejrzenie pierwotnego ogniska	Odosobnione gospodarstwo	Przeprowadzenie pełnego badania diagnostycznego, wyizolowanie i scharakteryzowanie wirusa.
Podejrzenie pierwotnego ogniska	Gospodarstwo w terenie o dużym zagęszczeniu drobiu	Przeprowadzenie pełnego badania diagnostycznego, wyizolowanie i scharakteryzowanie wirusa, ale jednocześnie koncentracja na metodach szybkiego wykrycia i scharakteryzowania, szczególnie opartych na RT-PCR i sekwencjonowaniu (¹).
Podejrzenie drugiego i kolejnych ognisk	Odosobnione gospodarstwa, powiązane epidemiologicznie z pierwotnym podejrzewanym ogniskiem	Koncentracja na metodach szybkiego wykrywania i scharakteryzowania, szczególnie opartych na RT-PCR i sekwencjonowaniu (¹).
Podejrzenie drugiego i kolejnych ognisk	Gospodarstwa w terenie o dużym zagęszczeniu drobiu lub z wieloma powiązaniem epidemiologicznymi	Oparcie się na metodach szybkiego wykrywania, pozwalających na jak najwcześniejsze uzyskanie dowodów obecności jakiegokolwiek wirusa grypy ptaków (¹).
Podejrzenie wielu ognisk lub szybkie rozprzestrzenianie się choroby pomimo wprowadzonego nadzoru	Bez szybkiej interwencji grozi niekontrolowane rozprzestrzenianie się choroby	Oparcie się na metodach szybkiego wykrywania, pozwalających na jak najwcześniejsze uzyskanie dowodów obecności jakiegokolwiek wirusa grypy ptaków bądź oparcie się na objawach klinicznych (¹).

(¹) W tych przypadkach należy przeprowadzić pełne pobieranie próbek i przechowywać próbki w celu późniejszej oceny.

ROZDZIAŁ XI

Rozpoznanie zakażenia wirusami grypy ptaków u świń i innych ssaków**1. Grypa ptaków u świń**

Wirusy grypy ptaków łatwo zakażają świnię i choć replikacja jest w większości wypadków stosunkowo ograniczona, to istnieje możliwość przenoszenia choroby przez świnię na drób i inne podatne zwierzęta. Do tej pory nie ma dowodów terenowych przenoszenia przez świnię wirusów grypy ptaków podtypów H5 i H7.

Doświadczenie uzyskane przy okazji ognisk choroby w Niderlandach w 2003 r. wskazuje, że świnię zarażone wirusem H7N7 nie wykazywały objawów klinicznych, które można by przypisać zakażeniu H7N7. Ponadto do tej pory nie były notowane przypadki występowania choroby u świń przy okazji ognisk H5N1 w Azji i w innych obszarach.

Dlatego też ustalenie, czy świnie są zarażone, nie może opierać się na objawach klinicznych, chociaż oznaki kliniczne wynikające z zakażenia świń innymi wirusami grypy pochodzącymi od ptaków mogą wystąpić po zaadaptowaniu się wirusa do gospodarza. Diagnostyka zakażeń wirusem grypy ptaków u świń jest zasadniczo podobna do diagnozy u ptaków i polega na wyizolowaniu wirusa, technikach molekularnych oraz wykryciu specyficznych przeciwciał przy zastosowaniu testów zahamowania hemaglutynacji. Są jednak pewne różnice; ponadto żaden test nie został w pełni zatwierdzony w celu stwierdzenia zakażenia wirusami grypy ptaków u świń.

2. Próbkę do wyizolowania wirusa

Zakażenia wirusami grypy ptaków u świń mają zwykle zasięg ograniczony do układu oddechowego. Należy pobrać próbki tkanek układu oddechowego oraz, w razie potrzeby, wymazy z jamy ustno-gardłowej lub z nosa, najlepiej od świń wykazujących objawy choroby. Próbkę i wymazy mogą być poddawane obróbce w celu wyizolowania wirusa lub jego wykrycia molekularnego z wykorzystaniem tych samych technik, jakie opisano wyżej w przypadku próbek pochodzących od ptaków. Jednak w przypadku zastosowania technik PCR należy zapewnić odpowiednie środki kontroli zapewniające, że substancje obecne w próbkach pochodzących od świń nie będą hamować amplifikacji.

3. Inokulacja i inkubacja jaj

W celu wyizolowania wirusów grypy ssaków u 9–11-dniowych zarodków kurzych stosuje się zwykle inokulację każdego jaja przez jamę omoczniową do jamy owodniowej. Jednak podczas badania świń mających kontakt z wirusami grypy ptaków w sytuacji, gdy wirus miał mało czasu na adaptację, prawdopodobnie wystarczająca jest inokulacja do jamy omoczniowej.

Podobnie jako temperaturę inkubacji w celu izolacji wirusów grypy ssaków typu A zaleca się zwykle 35 °C, jednak w przypadku wirusów słabo zaadaptowanych do organizmu świni temperatura 37 °C nie przeszkodzi w wyizolowaniu wirusa.

4. Badanie na obecność specyficznych przeciwciał w testach HI

Wyizolowanie wirusa lub wykrywanie molekularne są prawdopodobnie najbardziej czułymi środkami wykrywania zakażenia wirusem grypy ptaków u świń. Jednak w niektórych przypadkach wykrywano u świń reakcję serologiczną w braku wyizolowania lub wykrycia wirusa. Testy HI z wykorzystaniem surowic świńskich wymagają pewnych modyfikacji w stosunku do testów wykorzystujących surowice ptasie, o których mowa w rozdziale VIII.

Surowice świń mają znaną właściwość niespecyficznego hamowania w testach HI, dlatego też, aby temu zapobiec, każda próbka surowicy musi być potraktowana enzymem niszczącym receptory (RDE). Należy zastosować następującą metodę:

- a) do 100 µl surowicy świń dodać 400 µl RDE (uprzednio ustalone robocze rozcieńczenie) i dokładnie wymieszać;
- b) inkubować w temperaturze 37 °C przez jedną godzinę;
- c) następnie inkubować przez 30 minut w temperaturze 56 °C;
- d) schładzać próbki w temperaturze 4 °C przez co najmniej 15 minut;
- e) dodać 10 µl 30 % roztworu czerwonych krwinek kurcząt (krwinki opłaszczony v/v) i mocno zamieszać;
- f) inkubować przez noc w temperaturze 4 °C. Jeśli konieczne jest wykorzystanie próbek w tym samym dniu, alternatywnym sposobem jest inkubowanie w temperaturze 37 °C przez jedną godzinę i odwirowywanie 300 × g przez pięć minut.

Surowica poddana takiej obróbce jest następnie wykorzystywana w testach HI zgodnie z opisem dotyczącym surowic ptasich w pkt [...], przy wstępnym rozcieńczeniu w stosunku 1:10. Zestaw surowic uzyskanych od świń o znanym statusie seronegatywnym pod względem grypy ptaków musi być wykorzystany do oceny swoistości testu HI do szczepu wirusa, który ma zostać użyty (patrz: wykorzystanie szczepów wirusa do serologii otrzymanej z ogniska – rozdział VIII). Podczas ogniska choroby w Niderlandach w 2003 r. wykryto do 2,6 % niespecyficznych reagentów w testach HI z wykorzystaniem surowic świń zebranych niezależnie od ogniska.

5. Pobieranie próbek od świń

Szczególnie w gospodarstwach hodujących równocześnie świnie i drób, w budynkach wspólnych lub oddzielnych, istnieje ryzyko zakażenia świń grypą ptaków bezpośrednio lub pośrednio poprzez kontakt z drobiem lub produktami z drobiu. W celu wykluczenia takiego zakażenia należy zebrać wymazy z jamy ustno-gardłowej lub z nosa oraz próbki krwi zgodnie z procedurami opisanymi w pkt 8.21 rozdziału IV. Próbkę muszą być uzyskane od świń wykazujących objawy kliniczne choroby. Jednak jeśli zwierzęta nie wykazują objawów klinicznych, próbki mogą być zebrane od świń wybranych losowo ze wszystkich części budynku. Wymazy muszą być przebadane szybkimi testami molekularnymi oraz/lub testami w celu wyizolowania wirusa, o ile takie testy są dostępne w laboratorium. Testy RT-PCR muszą być odpowiednio zatwierdzone, a ich czułość musi być co najmniej równa czułości testów izolacji wirusa grypy A w jajach.

Dwa do czterech tygodni po zabiciu drobiu zakażonego grypą ptaków należy od świń pobrać co najmniej 60 próbek krwi w taki sposób, aby od każdej grupy świń będących ze sobą w bezpośrednim kontakcie pobrać co najmniej po kilka próbek. Próbkę należy przebadać testem HI z użyciem wirusa uzyskanego z ogniska choroby u drobiu. Próbkę zarówno z fazy ostrej, jak i z fazy zdrowienia muszą być przebadane tym samym testem. Uzyskane z próbek wyniki pozytywne mogą być potwierdzone z wykorzystaniem metod neutralizacji wirusa i/lub *Western blot*.

W przypadku pozytywnego wyniku badań którejkolwiek próbki należy przeprowadzić dochodzenie epidemiologiczne na wszystkich gospodarstwach hodujących świnie w obszarze zapowietrzonym, niezależnie od tego, czy są to gospodarstwa typu mieszanego.

6. Wirusy grypy ptaków u ssaków innych niż świnie

Należy podjąć dochodzenia dotyczące ssaków innych niż świnie, podatnych na grypę ptaków, w tym u kotów. W odniesieniu konkretnie do HPAI H5N1 należy przeprowadzić następujące działania w celu badania kotów:

Poważne zmiany patologiczne związane z replikacją wirusa koncentrują się na płucach i wątrobie, dlatego próbki do badań wirusologicznych powinny być pobrane z tych organów padłych zwierząt. Od żywych zwierząt należy pobierać wymazy z tchawicy lub jamy ustno-gardłowej w celu wykrycia wirusa. Dodatkowo można oddzielnie pobrać wymazy kałowe.

Próbki krwi, które mają być przebadane w teście HI, wymagają obróbki cieplnej w temperaturze 56 °C przez 30 minut; obróbkę RDE można pominąć.

ROZDZIAŁ XII

Minimalne wymagania bezpieczeństwa dotyczące transportu próbek

1. Transport próbek, o których wiadomo lub podejrzewa się, że znajdują się w nich czynniki chorobotwórcze, podlega rygorystycznym uregulowaniom krajowym i narodowym, które muszą zawsze być przestrzegane. Izolaty wirusa nie są klasyfikowane jako próbki diagnostyczne, ale należy je opakowywać zgodnie z normami międzynarodowymi.

Instrukcje zawarte w niniejszym rozdziale dotyczą transportu lotniczego, ale podobny sposób opakowywania obowiązuje w przypadku transportu próbek drogą lądową lub morską.

2. Opakowywanie materiału diagnostycznego do transportu

Materiałowi diagnostycznemu transportowanemu na mocy przepisów IATA przypisuje się, w zależności od przypadku, numer identyfikacyjny UN 2814, 2900 lub 3373.

Za wysyłkę, do momentu dotarcia przesyłki do odbiorcy, odpowiada nadawca, a nie przedsiębiorstwo transportowe.

3. Opakowanie bezpośrednie

- a) Pojemniki bezpośrednio zawierające substancję muszą być wodoszczelne, np. zakrętki muszą być oklejone folią Parafilm lub taśmą samoprzylepną albo zabezpieczone w inny sposób.
- b) Pojemniki bezpośrednie w większej ilości muszą być osobno owinięte, aby zapobiec stłuczeniu.
- c) Przy określaniu objętości wysyłanego materiału diagnostycznego należy wziąć pod uwagę płyn do transportu wirusów.
- d) Pojemniki bezpośrednie mogą zawierać maksymalnie 500 ml lub 500 g substancji.

Cała zawartość pojemnika bezpośredniego jest materiałem diagnostycznym.

4. Opakowanie pośrednie

- a) Pojemnik pośredni musi zawierać odpowiednią ilość materiału absorbującego, pozwalającą na wchłonięcie całej zawartości pojemnika bezpośredniego w razie jego uszkodzenia lub wycieku.
- b) Opakowanie pośrednie musi spełniać wymogi IATA dotyczące opakowań materiału diagnostycznego, w tym procedurę testu upadku z wysokości 1,2 m (3,9 stopy). Ponieważ wymogi dotyczące pakowania substancji zakaźnych przewidziane w Instrukcji pakowania IATA 602 są bardziej rygorystyczne niż wymogi dotyczące pakowania materiału diagnostycznego, mogą one być stosowane.

- c) Opakowania substancji zakaźnej muszą być opatrzone odpowiednimi oznaczeniami („UN” otoczone kółkiem), np.:
- „UN 4G/CLASS 6.2/99/GB/2450”
- d) Opakowanie pośrednie musi być wodoszczelne. Należy przestrzegać instrukcji pakowania pochodzącej od producenta opakowania lub innego uprawnionego podmiotu, dołączonej do opakowania pośredniego.
- e) Najmniejszy ogólny wymiar zewnętrzny opakowania pośredniego musi wynosić co najmniej 100 mm (cztery cale).
- f) Opakowanie pośrednie musi być wystarczająco duże na potrzeby dokumentów przewozowych, np. lotniczego listu przewozowego.

5. Opakowanie zewnętrzne

- a) Opakowanie zewnętrzne może zawierać maksymalnie 4 l lub 4 kg substancji.
- b) Jeśli jest to wymagane, opakowanie pośrednie musi być umieszczone w suchym lub mokrym lodzie. W wypadku użycia suchego lodu opakowanie musi umożliwiać uwalnianie dwutlenku węgla i uniemożliwiać wzrost ciśnienia, które mogłoby spowodować pęknięcie opakowania. W wypadku użycia mokrego lodu opakowanie musi być szczelne.

Każde opakowanie oraz lotniczy list przewozowy musi być oznaczone dokładnie w następujący sposób:

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

- c) Pomędzy opakowaniem pośrednim a opakowaniem zewnętrznym należy umieścić szczegółowy wykaz zawartości.
- d) Opakowanie zewnętrzne należy umieścić w zaklejonej torbie z tworzywa sztucznego w celu ochrony przed wilgocią.
- e) Deklaracja wysyłki materiałów niebezpiecznych (Shipper's Declaration for Dangerous Goods) nie jest wymagana.

ROZDZIAŁ XIII

Wysyłka wirusów i próbek do wspólnotowego laboratorium referencyjnego

1. Próbkę wysyłaną do wspólnotowego laboratorium referencyjnego muszą być wysyłane w sposób zgodny z zaleceniami dotyczącymi transportu niebezpiecznych czynników chorobotwórczych wewnątrz Wspólnoty oraz uregulowań i ustawodawstwa obowiązującego w Zjednoczonym Królestwie.

Należy przestrzegać instrukcji zawartych w niniejszym rozdziale.

2. Wysyłka wirusów lub innych materiałów do wspólnotowego laboratorium referencyjnego

- a) Wszystkie materiały muszą być opakowane zgodnie z instrukcjami zawartymi w niniejszym rozdziale.
- b) Opakowanie zewnętrzne musi być oznaczone w następujący sposób:

„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) W powyższym oznaczeniu należy wpisać jeden z następujących numerów zezwolenia:

- i) w przypadku wirusów grypy ptaków: „AHZ/2232/2002/5*”;
- ii) w przypadku tkanek i innych materiałów: „AHZ/2074C/2004/3*”.

Ponieważ wymienione numery zezwoleń ulegają zmianom, laboratoria wysyłające próbki muszą przed dokonaniem wysyłki zapewnić stosowanie aktualnych numerów zezwoleń.

d) Przesyłka musi być zaadresowana do:

Avian Virology
VLA Weybridge,
New Haw, Addlestone,
Surrey KT15 3NB
Zjednoczone Królestwo

e) Do przesyłki musi być dołączony list opisujący w możliwie najpełniejszy sposób historię izolatów, w tym gatunek i wiek zwierząt, obszar lub kraj, w którym dokonano izolacji, historię kliniczną.

f) Przesyłki muszą być wysłane pocztą lotniczą lub frachtem lotniczym.

W przypadku wysyłki frachtem lotniczym należy przed przybyciem materiałów do wspólnotowego laboratorium referencyjnego przesłać temu laboratorium faksem, telefonicznie lub pocztą elektroniczną numer lotniczego listu przewozowego (airway bill).

Przesyłki wysyłane frachtem lotniczym muszą być wyraźnie oznaczone:

„CARE OF TRANSGLOBAL”, dla zapewnienia szybkiego poddania ich odpowiedniej procedurze w porcie lotniczym.

Dane kontaktowe wspólnotowego laboratorium referencyjnego:

Ian H. Brown, Dyrektor Laboratorium Referencyjnego
Tel. bezpośredni: (44-1932) 35 73 39;
Faks bezpośredni: (44-1932) 35 72 39;
E-mail: i.h.brown@vla.defra.gsi.gov.uk

Ruth Manvell, Kierownik Laboratorium Referencyjnego
Tel. bezpośredni: (44-1932) 35 77 36 lub (44-1932) 35 77 08;
Faks bezpośredni: (44-1932) 35 78 56;
E-mail: r.manvell@vla.defra.gsi.gov.uk

ROZDZIAŁ XIV

Minimalne wymagania bezpieczeństwa dla laboratoriów diagnostycznych grypy ptaków

1. Wymogi bezpieczeństwa w laboratoriach diagnostycznych prowadzących prace z wirusami grypy ptaków muszą obejmować zarówno zapobieganie rozprzestrzenianiu się wirusa, stanowiącego zagrożenie zdrowia zwierząt, jak i ochronę osób pracujących w laboratorium (oraz znajdujących się poza nim) przed ryzykiem chorób odzwierzęcych.

We Wspólnocie minimalne wymagania bezpieczeństwa dotyczące laboratoriów są określone w kilku dyrektywach. Ponadto aspekty operacyjne są opisane i określone w podstawowych normach europejskich (EN). Działalności laboratoriów w dziedzinie diagnostyki dotyczą dodatkowe uregulowania (EN), np. zasady dobrej praktyki laboratoryjnej.

2. Dyrektywy Wspólnoty dotyczące laboratoriów

Dyrektywa Rady 89/391/EWG z dnia 12 czerwca 1989 r. w sprawie wprowadzenia środków w celu poprawy bezpieczeństwa i zdrowia pracowników w miejscu pracy (Dz.U. L 183 z 29.6.1989, str. 1).

Dyrektywa Rady 90/679/EWG z dnia 26 listopada 1990 r. w sprawie ochrony pracowników przed ryzykiem związanym z narażeniem na działanie czynników biologicznych w miejscu pracy (siódma dyrektywa szczegółowa w rozumieniu art. 16 ust. 1 dyrektywy 89/391/EWG) (Dz.U. L 374 z 31.12.1990, str. 1).

W przypadku diagnozowania metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) oraz klonowania produktów PCR do plazmidu bakteryjnego w celu namnażania, na przykład w celu sekwencjonowania DNA, poza dyrektywami wymienionymi powyżej stosuje się następującą dyrektywę i normy europejskie (EN):

Dyrektywa Rady 90/219/EWG z dnia 23 kwietnia 1990 r. w sprawie ograniczonego używania mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie (Dz.U. L 117 z 8.5.1990, str. 1).

3. Oprócz dyrektyw Wspólnoty należy stosować następujące normy europejskie (EN):

EN 12128 Biotechnologia. Laboratoria badawcze, rozwoju i analizy. Stopnie hermetyczności laboratoriów mikrobiologicznych, strefy ryzyka i wymagania względem lokalizacji i bezpieczeństwa fizycznego.

EN 12738 Biotechnologia. Laboratoria badawcze, rozwojowe i analityczne. Wytyczne dotyczące hermetyczności pomieszczeń dla zwierząt doświadczalnych zaszczepionych mikroorganizmami.

EN 12740 Biotechnologia. Laboratoria badawcze, rozwojowe i analityczne. Wytyczne do postępowania z odpadami, ich inaktywacji i kontroli.

EN 12741 Biotechnologia. Laboratoria badawcze, rozwojowe i analityczne. Wytyczne dotyczące funkcjonowania laboratorium biotechnologicznego.

Do prowadzenia laboratorium lub zarządzania nim stosują się następujące warunki:

4. Wymagania dotyczące laboratoriów (stopnie hermetyczności od 1 do 4)

Zgodnie z **dyrektywą 2000/54/WE** Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 września 2000 r. w sprawie ochrony pracowników przed ryzykiem związanym z narażeniem na działanie czynników biologicznych w miejscu pracy (siódma dyrektywa szczegółowa w rozumieniu art. 16 ust. 1 dyrektywy 89/391/EWG) (Dz.U. L 262 z 17.10.2000, str. 21), dyrektywą 90/219/EWG oraz normami europejskimi: EN 12128; EN 12740; EN 12741.

Środki hermetyczności	Stopień hermetyczności			
	1	2	3	4
Pomieszczenie laboratoryjne: izolacja	nie	tak	tak	tak
Laboratoria rozdzielone drzwiami	nie	tak	tak	tak
Konieczne okno do obserwacji lub podobne rozwiązanie, tak aby znajdujący się wewnątrz mogli być widoczni	fakultatywne	fakultatywne	fakultatywne	tak
Konieczne urządzenia do mycia rąk dla personelu	tak	tak	tak	tak
Konieczne urządzenia do odkażania (rąk)	fakultatywne	tak	tak	tak
Ograniczony dostęp	nie	tak	tak	tak
Szczególne środki w celu kontroli rozprzestrzeniania się aerozoli	nie	tak –minimalizacja	tak –zapobieganie	tak –zapobieganie
Znak o zagrożeniu biologicznym na drzwiach	nie	tak	tak	tak
Prysznic	nie	nie	fakultatywny	tak
Przepłukiwanie oczu	tak	tak	tak	tak
Laboratorium: dostosowane do fumi-gacji	nie	nie	tak	tak
Powierzchnie odporne na wodę, kwasy, zasady, rozpuszczalniki, środki dezynfekujące, środki odkażające oraz łatwe do czyszczenia	tak (stół)	tak (stół)	tak (stół, podłoga)	tak (stół, podłoga)
Wejście do laboratorium przez służbę powietrzną	nie	nie	fakultatywne	tak
Podciśnienie w stosunku do ciśnienia bezpośredniego otoczenia	nie	nie	fakultatywne	tak
Powietrze pobierane i odprowadzane z laboratorium powinno być filtrowane metodą HEPA	nie	nie	tak (powietrze odprowadzanie)	tak
Autoklaw	na miejscu	w budynku	w sąsiednim pomieszczeniu	w laboratorium, obustronny

Środki hermetyczności	Stopień hermetyczności			
	1	2	3	4
Odzież ochronna	Odpowiednia odzież ochronna	Odpowiednia odzież ochronna	Odpowiednia odzież ochronna i (fakultatywnie) obuwie	Całkowita zmiana odzieży
Rękawiczki	nie	fakultatywne	tak	tak
Skuteczna kontrola wektora (np. dla gryzoni i owadów)	fakultatywne	tak	tak	tak
Bezpieczne sposoby przechowywania czynnika biologicznego	tak	tak	tak	tak
Laboratorium ma zawierać swoje własne wyposażenie	nie	nie	zalecane	tak

Dodatkowe normy europejskie poruszają kwestię zarządzania laboratoriami i ich organizacji.

Istnieją również inne uregulowania i zalecenia krajowe i międzynarodowe, które muszą być przestrzegane. WHO opublikowała 3. edycję Podręcznika bezpieczeństwa biologicznego w laboratoriach na swoich stronach internetowych:

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

5. Środki zapobiegające rozprzestrzenianiu się wirusów w odniesieniu do zdrowia zwierząt

Organy weterynaryjne w państwach członkowskich muszą wdrożyć przepisy dotyczące zapobiegania rozprzestrzenianiu się wirusów grypy ptaków, szczególnie HPAI, ale również wszystkich wirusów grypy ptaków podtypów H5 i H7. Pewne wytyczne zostały przedstawione przez Światową Organizację Zdrowia Zwierząt (OIE) w rozdziale 1.4.5 Kodeksu zdrowia zwierząt lądowych; HPAI został uznany za czynnik chorobotwórczy należący do grupy 4 stopnia hermetyczności OIE.

Przepisy dotyczące obchodzenia się z wirusami grypy ptaków zostaną wprowadzone przez organy weterynaryjne państwa członkowskiego.

Minimalne wymagania bezpieczeństwa stosowane przez wspólnotowe laboratorium referencyjne, którymi są krajowe zasady obowiązujące w Zjednoczonym Królestwie, są przedstawione na stronie internetowej:

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

6. Środki zapobiegające rozprzestrzenianiu się wirusów w odniesieniu do zdrowia ludzi

W laboratoriach prowadzących prace nad wirusami grypy ptaków konieczna jest stała świadomość, że wirusy te mogą, przynajmniej potencjalnie, wywoływać choroby u ludzi. Prace laboratorium należy prowadzić w taki sposób, aby uniknąć zakażenia osób pracujących w laboratorium oraz wydostania się wirusa na zewnątrz.

Wytyczne dotyczące obchodzenia się z materiałem, co do którego istnieją podejrzenia, że zawiera wirus grypy ptaków typu A, znajdują się na stronie Światowej Organizacji Zdrowia (WHO):

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