

## II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

## KOMMISSION

## ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION

vom 25. Februar 1991

über die Protokolle für die Standardisierung von Materialien und Verfahren für die veterinärmedizinischen Untersuchungen sowie die Marktzulassungsbedingungen für aus Drittländern eingeführte Rinder und Schweine

(91/189/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN  
GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 72/462/EWG des Rates vom 12. Dezember 1972 zur Regelung viehseuchenrechtlicher und gesundheitlicher Fragen bei der Einfuhr von Rindern und Schweinen und von frischem Fleisch aus Drittländern<sup>(1)</sup>, zuletzt geändert durch die Richtlinie 91/69/EWG<sup>(2)</sup>, insbesondere auf Artikel 8 Absatz 1,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Gemäß der Richtlinie 72/462/EWG ist die Einfuhr von Rindern und Schweinen aus Drittländern gestattet, die in der Liste im Anhang der Entscheidung 79/542/EWG des Rates<sup>(3)</sup>, zuletzt geändert durch die Entscheidung 90/485/EWG<sup>(4)</sup>, aufgeführt sind.

Die viehseuchenrechtlichen Vorschriften für die Einfuhr lebender Tiere aus Drittländern sind entsprechend der tiergesundheitlichen Lage in den einzelnen Drittländern festzulegen.

Obwohl in den einzelnen Ländern unterschiedliche viehseuchenrechtliche Vorschriften bestehen können, gelten die Bestimmungen (Protokolle) für die tierärztlichen Untersuchungen und die Bedingungen für die Zulassung von Märkten in Drittländern zum Handelsverkehr mit Tieren, die zur Ausfuhr in die Gemeinschaft bestimmt sind, für alle Drittländer.

Um die Entscheidungen über viehseuchenrechtliche Vorschriften für die Einfuhr von Rindern und Schweinen aus Drittländern zu vereinfachen, sollte es eine gemeinsame Entscheidung geben, die alle Bestimmungen für die tierärztlichen Untersuchungen und die Marktzulassungsbedingungen enthält.

Eine Entscheidung zur Festlegung der Bestimmungen für tierärztliche Untersuchungen und der Bedingungen für die Zulassung von Märkten in Drittländern gilt nur für ein Drittland, für das eine Entscheidung erlassen wurde, die die viehseuchenrechtlichen Verhältnisse in diesem Land berücksichtigt.

Die in dieser Entscheidung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Veterinärausschusses —

HAT FOLGENDE ENTSCHEIDUNG ERLASSEN:

Artikel 1

(1) Diese Entscheidung enthält die Bestimmungen (Protokolle) für die tierärztlichen Untersuchungen und die Bedin-

(1) ABl. Nr. L 302 vom 31. 12. 1972, S. 28.

(2) ABl. Nr. L 46 vom 19. 2. 1991, S. 37.

(3) ABl. Nr. L 146 vom 14. 6. 1979, S. 15.

(4) ABl. Nr. L 267 vom 27. 9. 1990, S. 46.

gungen für die Zulassung von Märkten in Drittländern zum Handelsverkehr mit Tieren, die zur Ausfuhr in die Gemeinschaft bestimmt sind, und zwar in bezug auf die Einfuhr lebender Rinder und Schweine aus den in der Liste im Anhang der Entscheidung 79/542/EWG aufgeführten Drittländern.

(2) Die Bedingungen der Anhänge I und II gelten nur für Drittländer, für die Entscheidungen erlassen wurden, in denen die jeweiligen viehseuchenrechtlichen Bedingungen gemäß Artikel 8 der Richtlinie 72/462/EWG festgelegt worden sind.

*Artikel 2*

Diese Entscheidung ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 25. Februar 1991

*Für die Kommission*

Ray Mac SHARRY

*Mitglied der Kommission*

## ANHANG I

PROTOKOLLE FÜR DIE STANDARDISIERUNG VON MATERIALIEN UND VERFAHREN FÜR  
VETERINÄRMEDIZINISCHE UNTERSUCHUNGEN

## KAPITEL 1

## Rinder

1. *Tuberkulose*

Die intradermale Tuberkulinisierung (Monotest) mit Rindertuberkulin wird nach Anhang B der Richtlinie 64/432/EWG vom 26. Juni 1964 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen durchgeführt <sup>(1)</sup>.

2. *Brucellose*

Die Serumagglutinations- und Komplementbindungstests werden nach Abschnitt A und B von Anhang C der Richtlinie 64/432/EWG durchgeführt.

3. *Enzootische Rinderleukose*

Der Agargel-Immunodiffusionstest wird nach Anhang G der Richtlinie 64/432/EWG durchgeführt.

4. *Bluetongue*

A. Der Blocking- bzw. kompetitive ELISA wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Mit dem kompetitiven ELISA können unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 3-17-A3 Antikörper aller bekannten Serotypen des Blauzungenvirus (BTV) nachgewiesen werden.

Testprinzip ist die Unterbrechung der Reaktion zwischen BTV-Antigen und einem gruppenspezifischen monoklonalen Antikörper (3-17-A3) durch Zugabe von Testserumverdünnungen. Antikörper gegen im Testserum vorhandenes BTV blockieren die Reaktionsfähigkeit des monoklonalen Antikörpers (MaB) und reduzieren nach Zugabe von Enzymsubstrat die voraussichtliche Farbenentwicklung.

## Materialien und Reagenzien

1. Flachgrundige Mikrotiterplatten.
2. Antigen: wie folgt zubereitet.
3. Blocking-Puffer: 5 % (W/v) „Marvel“ Trockenmilchpulver, 0,1 % (v/v) Tween-20 (als Poloxyd-ethylensorbitonmonolauratsyrup) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS).
4. Monoklonaler Antikörper: 3-17-A3 (als aufschwimmende Hybridom-Gewebekultur), aufbewahrt bei -20 °C oder gefriergetrocknet, vor Verwendung mit Blocking-Puffer 1:50 verdünnt und gegen das gruppenspezifische Polypeptid p<sub>7</sub> gerichtet.
5. Konjugat: Kaninchen-Antimaus-Globulin (absorbiert und eluiert), zu Meerrettichperoxidase konjugiert und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.
6. Substrat und Chromogen: 0,2 g o-Phenylendiamin (OPD), aufgelöst in einer Pufferlösung aus 2,553 g Zitronensäure und 4,574 g Dinatrium-Hydrogenorthosphat und mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt, in 25 ml-Aliquoten aufgeteilt und bei -20 °C im Dunkeln aufbewahrt, unter Zusatz von 12 µl/25 ml Wasserstoffperoxyd (30 % w/v) unmittelbar vor der Verwendung.

*OPD mit Vorsicht angehen — Gummihandschuhe tragen — mutagenverdächtig.*

7. 1 Molar Schwefelsäure: 26,6 ml Säure, zugegeben zu 473,4 ml destilliertem Wasser.

*Vorsicht — stets Säure zu Wasser, niemals Wasser zur Säure geben.*

<sup>(1)</sup> ABl. Nr. 121 vom 29. 7. 1964, S. 1977/64.

8. Orbitalschüttler.

9. ELISA-Plattenleser (das Testergebnis kann visuell abgelesen werden).

**Test Format**

	H	G	F	E	D	C	B	A		
Blind- kontrolle			Antigen + Konjugat							1
Mab- kontrolle			Antigen + Mab + Konjugat							2
Positiv- kontrolle	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	3	
	1/2	1/4	1/8	Testseren		1/4	1/8	1/16	4	
									5	
									6	
Test- seren									7	
									8	
									9	
									10	
									11	
									12	

**Testprotokoll**

**Blindkontrolle**

Reihe 1 (A — H) ist eine Blindkontrolle, bestehend aus BTV-Antigen und Konjugat. Sie kann zur Nichtanzeige des ELISA-Lesers verwendet werden.

**Mab-Kontrolle**

Reihe 2 (A — H) ist die Mab-Kontrolle, bestehend aus BTV-Antigen, monoklonalem Antikörper und Konjugat. Sie stellt eine Negativ-Kontrolle dar. Der Mittelwert der optischen Dichte (OD) dieser Kontrollreihe entspricht dem Hemmungswert von 0 %.

**Positivkontrolle**

Reihe 3 (A — H) ist die Positivkontrolle, bestehend aus BTV-Antigen, BTV-positiven Antiserumverdünnungen, Mab und Konjugat. Damit soll angezeigt werden, daß der Test sachgerecht funktioniert, und ähnliche Hemmungsniveaus sollten von Test zu Test erzielt werden.

### Testseren

Im Testformat (siehe oben) können 18 Seren, verdünnt im Verhältnis 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16, getestet werden. So läßt sich der Titer von Antikörpern in den Testseren in etwa ermitteln. Die Verdünnungsreihe könnte bis zu Serumverdünnungsendpunkttitern fortgesetzt werden. Alternativ könnten bei großangelegten serologischen Untersuchungen Seren einmal (1:4) oder zweimal (1:2 und 1:4) verdünnt im Rapid-screening-Testverfahren getestet werden.

### Verfahren

1. BTV-Antigen zu vortitrierter Konzentration in PBS verdünnen, zusammengeballte Viren durch akustisches Abscheiden kurz dispergieren (falls kein akustischer Abscheider vorhanden, kräftig pipettieren) und 50 µl in alle Mulden der ELISA-Platte geben. Zur Dispergierung des Antigens Platte leicht antippen.
2. Bei 37 °C 60 Minuten auf einem Orbitalschüttler inkubieren. Platten dreimal durch Ausschwenmen der Mulden mit nicht steriler PBS waschen und auf Löschpapier abtropfen lassen.
3. 50 µl Blocking-Puffer in jede Mulde geben. Testseren und Positivserum in die entsprechenden Mulden geben, und über die Platte verteilt mit einer Mehrfach-Pipette verdünnen. Die Seren auf keinen Fall in die Blindkontrolle oder die Mab-Kontrolle geben.
4. Unmittelbar nach Zugabe der Testseren Mab im Blocking-Puffer (zu vortitrierter Verdünnung) verdünnen und 50 µl in alle Mulden, ausgenommen die Blindkontrolle, geben.
5. Bei 37 °C 60 Minuten auf einem Orbitalschüttler inkubieren. Dreimal mit PBS waschen und abtropfen lassen.
6. Kaninchen-Antimaus-Konzentrat in Blocking-Puffer 1:5 000 verdünnen und 50 µl in alle Mulden geben.
7. Bei 37 °C 60 Minuten auf einem Orbitalschüttler inkubieren. Dreimal mit PBS waschen und abtropfen lassen.
8. OPD auftauen, und unmittelbar vor der Verwendung 12 µl 30 %iges Wasserstoffperoxid zu je 25 ml OPD geben. 50 µl in alle Mulden geben. Farbe ungefähr 10 Minuten entwickeln lassen, und Reaktion mit 1 M Schwefelsäure (50 µl je Mulde) stoppen. Eine Färbung sollte sich in den Mab-Kontrollmulden und in den Mulden mit Seren *ohne* BTV-Antikörper entwickeln.
9. Plattenergebnisse entweder visuell oder mit einem spektralphotometrischen Leser prüfen und registrieren.

### Ergebnisanalyse

Den OD-Mittelwert, der einem Hemmungswert von 0 % entspricht, anhand der Mab-Kontrollen berechnen. Die OD-Werte der Testseren werden anhand folgender Formel in Hemmungsprozentwerten ausgedrückt:

$$\text{Hemmungsprozentwert} = 100 - \frac{\text{OD in Anwesenheit des Testserums}}{\text{OD in Abwesenheit des Testserums}} \times 100.$$

Hemmungswerte von über 40 % bei einer Serumverdünnung von 1:4 gelten als positiv. Visuelles Ablesen ist möglich, da eine 40 %ige Hemmung der niedrigste Wert ist, der mit bloßem Auge problemlos erfäßbar ist.

### Zubereitung des BTV-ELISA-ANTIGENS

1. 10 Roux konfluierende BHK-21-Zellen dreimal mit serumfreiem Zellzuchtungsmedium nach Eagle waschen und mit BTV-Serotyp 1 in vorgenanntem Medium infizieren.
2. Bei 37 °C inkubieren und täglich auf zytopathischen Effekt (cpe) prüfen.
3. Wird bei 80 bis 90 % der Zellschicht jedes Roux ein zytopathischer Effekt verzeichnet, das Virus durch Losschütteln noch befestigter Zellen vom Glas ernten.

4. Die Zellen bis zur Pelletierung bei 2 000 bis 3 000 rpm zentrifugieren.
5. Die Aufschwemmung abnehmen, und die Zellen in ungefähr 30 ml PBS mit 1 % „Sarkosyl“ und 2 ml Phenolmethylsulphonylfluorid (Lysis-Puffer) erneut suspendieren. Eine eventuelle Gelbildung kann durch Zugabe von mehr Lysis-Puffer reduziert werden.  
*Anmerkung:* Phenylmethylsulphonylfluorid ist schädlich — mit äußerster Vorsicht hantieren.
6. Die Zellen in 60 Sekunden mit einem Ultraschallprüfkopf bei 30 Mikron Amplitude trennen.
7. Bei 10 000 rpm 10 Minuten zentrifugieren.
8. Die aufschwimmende Flüssigkeit bei +4 °C aufbewahren, und das verbleibende Zellpelet in 10 bis 20 ml Lysis-Puffer erneut suspendieren.
9. Insgesamt dreimal akustisch abscheiden und klären; dabei die Aufschwemmung in jeder Phase aufbewahren.
10. Die Aufschwemmungen poolen, und bei 24 000 rpm 120 Minuten bei 4 °C über einem 5 ml-Kissen aus 40 % Sukrose (w/v in PBS) unter Verwendung von 30 ml Beckmann-Zentrifugenröhrchen und eines SW 28 Rotors zentrifugieren.
11. Die Aufschwemmungen abnehmen, die Röhrchen gründlich leeren und das Pellet durch akustische Abscheidung in PBS erneut suspendieren. Das Antigen in Aliquoten bei -70 °C aufbewahren.

#### Titrierung des BTV-ELISA-Antigens

Das BTV-ELISA-Antigen wird anhand des indirekten ELISA titriert. Zweifache Antigenverdünnungen werden gegenüber einer konstanten Verdünnung (1:50) des monoklonalen Antikörpers 3-17-A3 titriert. Das Protokoll ist wie folgt:

#### Verfahren

1. BTV-Antigen in PBS über die Mikrotiterplatte verteilt in Zweifach-Verdünnungsreihen mit einer Mehrfach-Pipette verdünnen (50 µl/Mulde).
2. Eine Stunde bei 37 °C auf einem Orbitalschüttler inkubieren.
3. Platten dreimal mit PBS waschen.
4. 50 µl monoklonalen Antikörper 3-17-A3 (verdünnt 1:50) in jede Mulde der Mikroiterplatte angeben.
5. Eine Stunde bei 37 °C auf einem Orbitalschüttler inkubieren.
6. Platten dreimal mit PBS waschen.
7. 50 µl Kaninchen-Antimaus-Globulin, zu Meerrettichperoxidase konjugiert und zu einer vortitrierten optimalen Konzentration verdünnt, in jede Mulde der Mikrotiterplatte geben.
8. Eine Stunde bei 37 °C auf einem Orbitalschüttler inkubieren.
9. Substrat und Chromogen wie vorstehend beschrieben zugeben. Die Reaktion nach 10 Minuten durch Zugabe von 1 Molar Schwefelsäure (50 µl/Mulde) stoppen.

Beim kompetitiven ELISA muß der monoklonale Antikörper überschüssig sein. Demnach wird eine Antigenverdünnung gewählt, die auf der Titrationskurve liegt, die nach 10 Minuten ungefähr 0,8 OD ergibt.

B. Der Agargel-Immunodiffusionstest wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

#### Antigen:

Präzipitierendes Antigen wird in einer Zellkultur bereit, die die schnelle Vermehrung eines BTV-Referenzstammes unterstützt. Es werden BHK- oder Vero-Zellen empfohlen. Nach abgeschlossenem Viruswachstum ist Antigen in der aufschwimmenden Flüssigkeit vorhanden, erfordert jedoch eine 50- bis 100fache Konzentration, um wirksam zu werden. Dazu kann jedes Standard-Proteinkonzentrationsverfahren herangezogen werden. Viren im Antigen können durch Zugabe von 0,3 % (v/v) Beta-Propiolacton inaktiviert werden.

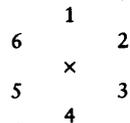
**Bekanntes positives Kontrollserum:**

Unter Verwendung des Internationalen Referenzserums und des Antigens wird ein nationales Standardserum hergestellt, für ein optimales Verhältnis gegenüber dem internationalen Referenzserum standardisiert, gefriergetrocknet und als das bekannte Kontrollserum in jedem Test verwendet.

**Testserum.****Verfahren**

1 % Agarose, bereitet in Borat oder Natriumbarbitalpuffer pH 8,5 bis 9,0 in eine mindestens 3 mm tiefe Petrischale gießen.

Ein Testmuster, bestehend aus sieben feuchtigkeitsfreien Mulden von 5 mm Durchmesser, in den Agar schneiden. Diese Gelstanze besteht aus einer zentralen Mulde und sechs im Umkreis von 3 mm um diese Zentralmulde angeordneten Mulden:



Die Zentralmulde mit dem Standardantigen füllen. Die peripheren Mulden 2, 4 und 6 mit dem bekannten Positivserum, die Mulden 1, 3 und 5 mit den Testseren füllen.

Die so vorbereitete Platte bis zu 72 Stunden bei Raumtemperatur in einer geschlossenen feuchten Kammer inkubieren.

**Auslegung**

Ein Testserum ist positiv, wenn sich eine spezifische Präzipitationslinie mit dem Antigen bildet, die der Leitlinie des Kontrollserums vollständig identisch ist. Ein Testserum ist negativ, wenn es keine spezifische Linie mit dem Antigen bildet und die Linie des Kontrollserums nicht wölbt. Die Petrischalen sollten bei schräger Beleuchtung gegen einen dunklen Hintergrund geprüft werden.

**5. Hämorrhagische Krankheit der Hirsche (EHD)**

Der Agargel-Immodiffusionstest wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**Antigen:**

Präzipitierendes Antigen wird in einer Zellkultur bereitet, die die schnelle Vermehrung der entsprechenden Serotypen des EHD-Virus unterstützt. Es werden BHK- oder Vero-Zellen empfohlen. Nach abgeschlossenem Viruswachstum ist Antigen in der aufschwimmenden Flüssigkeit vorhanden, erfordert jedoch eine 50- bis 100fache Konzentration, um wirksam zu werden. Dazu kann jedes Standard-Proteinkonzentrationsverfahren herangezogen werden. Viren im Antigen können durch Zugabe von 0,3 % (v/v) Beta-Proiolactin inaktiviert werden.

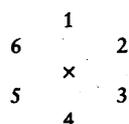
**Bekanntes positives Kontrollserum:**

Unter Verwendung des internationalen Referenzserums und des Antigens wird ein nationales Standardserum hergestellt, für ein optimales Verhältnis gegenüber dem internationalen Referenzserum standardisiert, gefriergetrocknet und als das bekannte Kontrollserum in jedem Test verwendet.

**Testserum****Verfahren**

11 % Agarose, bereitet in Borat oder Natriumbarbitalpuffer pH 8,5 bis 9,0, in eine mindestens 3 mm tiefe Petrischale gießen.

Ein Testmuster, bestehend aus sieben feuchtigkeitsfreien Mulden von 5 mm Durchmesser, in den Agar schneiden. Diese Gelstanze besteht aus einer zentralen Mulde und sechs im Umkreis von 3 mm um diese Zentralmulde angeordneten Mulden:



Die Zentralmulde mit dem Standardantigen füllen. Die peripheren Mulden 2, 4 und 6 mit dem bekannten Positivserum, die Mulden 1, 3 und 5 mit den Testseren füllen.

Die so vorbereitete Platte bis zu 72 Stunden bei Raumtemperatur in einer geschlossenen feuchten Kammer inkubieren.

#### Auslegung

Ein Testserum ist positiv, wenn sich eine spezifische Präzipitationslinie mit dem Antigen bildet, die der Leitlinie des Kontrollserums vollständig identisch ist. Ein Testserum ist negativ, wenn es keine spezifische Linie mit dem Antigen bildet und die Linie des Kontrollserums nicht wölbt. Die Petrischalen sollten bei schräger Beleuchtung gegen einen dunklen Hintergrund geprüft werden.

#### 6. *Leptospirose*

Die Mikroagglutinationsreaktion wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

##### Kulturen:

Die Leptospirenzucht erfolgt in Korthof-Nährboden oder EMJH-Medium bei 30 °C.

##### Antigen:

Erhält  $2 \times 10^8$  Organismen je ml Kulturmedium.

##### Verfahren:

Gleiche Mengen Antigen und Serum in flachgrundigen Mikrotiterplatten mischen, und bei 30 °C 2 Stunden bzw. bei 37 °C 1 bis 1 1/2 Stunden inkubieren. Das Testergebnis bei schwacher Dunkelfeldbeleuchtung und 60-100facher Vergrößerung ablesen.

##### Auslegung:

Ein negatives Testergebnis entspricht weniger als 50 % Agglutination bei einer Verdünnung von 1:50.

#### 7. *Infektiöse Rinder-Rhinotracheitis/infektiöse pustuläre Vulvovaginitis*

Der Serumneutralisationstest wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

##### Serum:

Alle Seren vor ihrer Verwendung bei 56 °C Hitze 30 Minuten inaktivieren.

##### Verfahren:

Für den konstanten virusspezifischen Serumneutralisationstest auf Mikrotiterplatten MDBK- oder sonstige empfindliche Zellen verwenden. Den Colorado-, Oxford- oder sonstigen Referenzstamm des Virus zu 100 TCID<sub>50</sub> je 0,025 ml verwenden.

Inaktivierte unverdünnte Serumproben mit gleicher Menge (0,025 ml) Virussuspension mischen. Die Virus-Serum-Gemische 2 Stunden bei 37 °C Hitze in den Mikrotiterplatten inkubieren, bevor die MDBK-Zellen zugegeben werden. Dabei die Zellen in einer Konzentration verwenden, die nach 24 Stunden einen kompletten Zellrasen bildet.

##### Kontrollen

Virusinfektiositätsanalyse,  
Serumtoxizitätskontrollen,  
unbeimpfte Zellkulturenkontrollen,  
Referenzantiseren.

##### Auslegung:

Die Ergebnisse des Neutralisationstests und der Titer des Testvirus werden nach drei bis sechs Tagen inkubiert bei 37 °C Hitze registriert. Seruntiter gelten als negativ, wenn bei einer Verdünnung von 1:2 (unverdünntes Serum) keine Neutralisation vorliegt.

## 8. *Virusdiarrhoe des Rindes (BVD)*

### A. Die Virusisolierung wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

#### Testmaterial und Nachweisverfahren:

Serum, Leukozytenfilm (*Crusta phlogistica*) und Blutgerinselsuspensionen von nicht hitzeinaktivierten Blutproben, die unter sechs Monate alten Rindern frisch entnommen wurden. Zum Nachweis des BVD-Virus in inokulierten Kulturen werden immunologische Färbungsverfahren wie die fluoreszierende Antikörpertechnik (FA) oder ein Test auf enzymgebundene Antikörper wie beispielsweise die Immunperoxidase-Reaktion (IPX) eingesetzt.

#### Testreagenzien:

Für die FA-Technik ist ein FITC-konjugiertes spezifisches BVD-Antiserum, für den IPX-Test ein unkonjugiertes spezifisches Anti-BVD-Rinderserum, ein Peroxidase-konjugiertes Anti-Rind-Antiserum und ein angemessenes Enzymsubstrat (wie 3-Amino-9-Äthylcarbazol) erforderlich. Ein Anti-BVD-Serum einer anderen Tierart als Rinder kann verwendet werden, sofern das Peroxidase-Konjugat gegen Serumglobuline dieser Tierart gerichtet ist. Alle verwendeten antiviralen Seren müssen nachweislich spezifiziert und weitgehend reaktionsfähig sein.

#### Verfahren:

Für den Test empfängliche Zellen wie Rindernasenschmel, Kälberniere oder Kälbertestes verwenden, die frei von endogenem BVD-Virus sind.

*Serumproben* — Testserum und Gewebekulturzellen in Deckglaskulturen oder in die Mulden von Mikrotiterplatten oder sonstige Gefäße geben, die eine 10 %ige Endverdünnung des Serums ermöglichen.

*Leukozytenfilm und Blutgerinsel* — Die Proben für 1 Stunde bei 37 °C zu konfluierenden Zellrasenkulturen geben, dann die Kulturen waschen und mit einem Kulturmedium mit 10 % BVD-freiem Kälberfötus-Serum überschichten.

Die Kulturen bei 37 °C inkubieren, fixieren und im FA- oder IPX-Verfahren färben.

#### Kontrollen:

positive BVD-Viruskontrolle,  
negative virusfreie Kontrolle,

#### Auslegung:

Im FA-Verfahren tritt die Färbung nach 4 bis 6-tägiger Inkubation auf und wird durch UV-Belichtung sichtbar gemacht. Das Ergebnis gilt als positiv, wenn bei Zellen, die mit der Testprobe inkubiert wurden, Fluoreszenz sichtbar ist.

Beim IPX-Verfahren tritt die Färbung nach 4-tägiger Inkubation ein und wird durch Hellfeldmikroskopie abgelesen. Eine dunkelbraune Färbung im Zellplasma einiger Zellen gilt als positives Testergebnis.

### B. Der Serumneutralisationstest wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

#### Serum:

Alle Seren vor ihrer Verwendung bei 56 °C Hitze 30 Minuten inaktivieren.

#### Verfahren:

Für den konstanten viruspezifischen Serumneutralisationstest auf Mikrotiterplatten geeignete Rinderzellen verwenden (z.B. Rinderohrmuschelzellen nach McClurkin and others, 1974, Arch. ges. Virusforsch., 45, 285-289).

Alle Reagenzien und Zellen müssen unbedingt frei von zufällig hinzugekommenem ansteckendem BVD/MD-Virus sein.

Das Testvirus (von jeglichem geeigneten zytopathischen Referenzstamm wie z.B. der NADL-Stamm) in einer Konzentration von 100 mittleren CCID (cell culture infectious doses) je 0,025 ml verwenden. Verdünnungen inaktivierter Seren mit gleichen Mengen Virussuspension (0,025 ml) mischen, und die Virus-Serum-Mischungen 1 Stunde bei 37 °C inkubieren, bevor gleiche Mengen Zellsuspension zugegeben werden. Dabei die Zellen in einer Konzentration verwenden, die binnen zwei Tagen einen kompletten Zellrasen bilden.

**Kontrollen:**

Virusinfektiositätsanalyse,  
Serumtoxizitätskontrollen,  
unbeimpfte Zellkulturkontrollen,  
Referenz-Antiseren.

**Auslegung:**

Beim NADL-System wird das Testergebnis am besten nach fünf Tagen Inkubation bei 37 °C abgelesen.

Ein mittlerer Neutralisationstiter von einem Zehntel gilt als Indikator für eine Immunreaktion auf eine zurückliegende akute Infektion.

**9. Milchanalyse auf Mastitis**

Die Milchanalyse wird nach Anlage D der Richtlinie 64/432/EWG durchgeführt.

**10. Maul- und Klauenseuche (MKS)**

A. Die Entnahme von Speiseröhren-/Rachenproben und die entsprechenden Analysen werden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**Reagenzien:**

Vor der Entnahme ein Transportmedium bereiten. Je 2 ml in so viele Gefäße wie Stichprobetiere geben. Die Gefäße sollten einer Gefrierlagerung über festem CO<sub>2</sub> oder Flüssigstickstoff standhalten.

Die Proben werden mit einem speziellen Sputum-Sammelgefäß oder „Probang“ (Schlundsonde) entnommen.

Dazu den Probang-Becher durch das Maul über den Zungenrücken in den oberen Teil der Speiseröhre einführen. Das Oberflächenepithel der oberen Speiseröhre und des Schlundes durch laterale und dorsale Bewegungen abschaben. Den Probang-Becher zurückziehen, vornehmlich, nachdem das Tier geschluckt hat. Der Becher sollte voll sein und eine Mischung aus Schleim, Speichel, Speiseröhrenflüssigkeit und zellulären Absonderungen enthalten. Es ist darauf zu achten, daß jede Probe sichtbare Zellsubstanzen enthält. Grobe Behandlung, die Blutungen verursachen könnte, ist zu vermeiden.

Mit Darminhalt stark verunreinigte Proben sind wegzuerwerfen, und das Maul des betreffenden Tieres ist vor erneuter Probennahme mit Wasser oder vorzugsweise physiologischer Kochsalzlösung auszuspülen.

**Behandlung der Proben:**

Jede im Probang-Becher gesammelte Probe auf Qualität prüfen. 2 ml davon zu einer gleichen Menge Transportmedium in ein Gefäß geben, das einer Gefrierlagerung standhalten kann. Die Gefäße fest verschließen, verplomben, desinfizieren und etikettieren. Die Proben kühl lagern (+ 4 °C) und binnen 3 bis 4 Stunden prüfen bzw. über Trockeneis (- 69 °C) oder Flüssigstickstoff lagern und bis zur Prüfung gefroren aufbewahren.

Vor jeder Entnahme ist der Probang-Becher zu desinfizieren und dreimal erneut in sauberem Wasser zu waschen.

**Untersuchung auf MKS-Virus:**

Kulturen aus Rinderschilddrüsen-Primärzellkulturen in Probematerial inokulieren. Dabei mindestens drei Reagenzgläser je Probe verwenden. Zwar können auch andere empfängliche Zellen wie Rinder- oder Schweinenieren-Primärzellen verwendet werden, doch ist dabei zu beachten, daß diese Zellen auf einige MKS-Virusstämme weniger empfindlich reagieren. Die Reagenzgläser bei 37 °C auf einem Zylinder inkubieren, und im Zeitraum von 48 Stunden täglich auf zytopathischen Effekt prüfen. Bei negativem Testergebnis eine Blindpassage auf neue Kulturen vornehmen, die ebenfalls in 48 Stunden zu prüfen sind. Die Spezifität jedes zytopathischen Effekts muß bestätigt sein.

**Empfohlene Transportmedien:**

1. 0,08 M Phosphatpuffer pH 7,2 mit 0,01 % Rinderserumalbumin, 0,002 % Phenoirot sowie Antibiotika.
2. Gewebekulturmedium (z.B. Zellzuchtungsmedium nach Eagle — Mem) mit 0,04 M HEPES-Puffer, 0,01 % Rinderserumalbumin sowie Antibiotika, pH 7,2.

Dem Transportmedium sind Antibiotika (je ml Endlösung) zuzugeben, z.B.:

— Penizillin	1 000 IE,
— Neomyzinsulphat	100 IE,
— Polymyxin-B-Sulphat	50 IE,
— Mycostatin	100 IE.

B. Die Virusneutralisierung wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**Reagenzien:**

In Zellkulturen oder auf Rinderzungen MKSV-Antigen bereiten und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  oder weniger bzw. bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , sofern 50 % Glycerin zugegeben werden, lagern. So erhält man das Vorratsantigen. Das MKS-Virus ist unter diesen Bedingungen stabil, und über Monate ändern sich die Titerwerte kaum

**Verfahren:**

Den Test in flachgrundigen Gewebekultur-Mikrotiterplatten durchführen. Dazu empfängliche Zellen wie IB-RS-2, BHK-21 oder Kalbsnierenzellen verwenden.

Die Testseren unter Zugabe von 100 IE-ml Neomycin oder anderen geeigneten Antibiotika in serumfreiem Zellkulturmedium 1:4 verdünnen. Die Seren bei  $56^{\circ}\text{C}$  30 Minuten inaktivieren, und aus 0,05 ml-Mengen unter Verwendung von 0,5 ml-Impfösen auf Mikrotiterplatten eine zweifache Verdünnungsreihe herstellen. Das ebenfalls in serumfreiem Kulturmedium verdünnte vortitrierte Virus, das 100 TCID<sub>50</sub> ml enthält, in jede Mulde geben. Zur Neutralisierung 1 Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubieren, 0,05 ml Suspensionszellen, die 0,5 bis  $1,0 \times 10^6$  Zellen je 1 ml Zellkulturmedium mit Serum enthalten, das frei von MKS-Antikörpern ist, in alle Mulden geben und die Platten verplomben.

Platten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubieren. Zellrasen konfluieren, in der Regel binnen 24 Stunden. Nach 48 Stunden ist der zytopathische Effekt normalerweise ausgeprägt genug, um ein *mikroskopisches* Ablesen des Testergebnisses zu ermöglichen. Zu diesem Zeitpunkt kann entweder das Schlußergebnis *mikroskopisch* abgelesen werden, oder die Platten können fixiert und für *makroskopisches* Ablesen gefärbt werden, z.B. mit 10 % Formol-Kochsalzlösung und 0,05 % Mehtylblau.

**Kontrollen:**

Die Kontrollen jedes Tests umfassen homologes Antiserum mit bekanntem Titer, eine Zellkontrolle, eine Serumtoxizitätskontrolle, eine Mediumkontrolle und eine Virustitration, auf deren Grundlage die tatsächliche Virusmenge im Test berechnet wird.

**Auslegung:**

Mulden mit nachweisbarem zytopathischen Effekt gelten als infiziert, und nach Spearman-Kärber gilt als Neutralisationsleiter der Kehrwert derjenigen Endverdünnungen des in den Serum-Virus-Gemischen vorhandenen Serums, bei welcher die Hälfte der Testobjekte reagiert (Kärber, G. 1931, *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 162, 480.).

Testergebnisse gelten als verbindlich, wenn die je Testmulde tatsächlich verwendete Virusmenge zwischen  $10^{1,5}$  und  $10^{2,5}$  TCID<sub>50</sub> liegt und wenn der Titer des Referenzserums seinen erwarteten Wert, der aus früheren Titrationen erschätzt wird, um das Zweifache übersteigt. Liegen die Ergebnisse der Kontrollen außerhalb dieser Werte, sind die Tests zu wiederholen.

Ein Endverdünnungstiter von 1:11 oder weniger gilt als negativ.

C. Der Nachweis und die Quantifizierung von Antikörpern im Rahmen des ELISA wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**Reagenzien:**

Kaninchen-Antiseren gegen 146S Antigen von 7 MKS-Virustypen, die in einer vorbestimmten optimalen Konzentration in Karbonat-Bikarbonatpuffer, pH 9,6, verwendet werden.

Aus selektierten, auf BHK-21-Zellrasen gezüchteten Virusstämmen Antigen bereiten. Die ungeklärten Aufschwemmungen dem Protokoll entsprechend verwenden und vortitrieren, jedoch ohne Serum, um eine Verdünnung zu erhalten, die nach Zugabe einer gleichen Menge phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween-20 und Phenoirot-Indikator (PBST) eine optische Dichte von 1,2 bis 1,5 ergibt. Die Viren können inaktiviert verwendet werden. PBST wird als Verdünnungsmittel verwendet. Durch Beimpfung von Meerschweinchen mit 146S Antigen jedes Stereotyps Meerschweinchen-Antiseren bereiten. In PBST mit 10 % normalem Rinder Serum und 5 % normalem Kaninchenserum eine vorbestimmte optimale Konzentration bereiten.

Kaninchen Meerschweinchen-Immunglobulin, zu Meerrettich-Peroxidase konjugiert, wird in vorbestimmter optimaler Konzentration in PBST mit 10 % normalem Rinderserum und 5 % normalem Kaninchenserum verwendet.

Testseren in PBST verdünnen.

#### Verfahren:

1. ELISA-Platten mit 50 µl antiviralen Kaninchenserum über Nacht in einer Feuchtigkeitskammer bei Raumtemperatur beschichten.
2. In U-förmigen Mehrfachmulden-Platten (Trägerplatten) 50 µl einer zweifachen Verdünnungsreihe jedes Testserums bereiten, beginnend mit einer Verdünnung von 1:4 50 µl einer konstanten Antigendosis in jede Mulde geben, und die Mischungen über Nacht bei 4 °C stehenlassen. Durch die Antigengabe wird die Anfangsverdünnung des Serums auf 1:8 reduziert.
3. Die ELISA-Platten fünfmal mit PBST waschen.
4. 50 µl des Serum-Antigen-Gemisches von den Trägerplatten auf die Kaninchenserum-beschichteten ELISA-Platten übertragen, und bei 37 °C eine Stunde auf einem Umlaufschüttler inkubieren.
5. Nach dem Waschen 50 µl Meerschweinchen-Antiserum gegen das Antigen gemäß Ziffer 4 in jede Mulde geben. Die Platten bei 37 °C eine Stunde auf einem Umlaufschüttler inkubieren.
6. Die Platten waschen, und 50 µl Kaninchen-Antimeerschweinchen-Immunglobulin, zu Meerrettich-Peroxidase konjugiert, in jede Mulde geben. Die Platten bei 37 °C eine Stunde auf einem Umlaufschüttler inkubieren.
7. Die Platten waschen, und 50 µl Orthophenylendiamin mit 0,05 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) in w/v in jede Mulde geben.
8. Die Reaktion nach 15 Minuten mit 1,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stoppen.

Die Platten auf einem an einen Mikrocomputer angeschlossenen ELISA-Leser bei 492 nm spektral-photometrisch ablesen.

#### Kontrollen:

40 Mulden für jedes verwendete Antigen, die kein Serum, sondern in PBST verdünntes Antigen enthalten.

Eine doppelte zweifache Verdünnungsreihe homologen Rinder-Referenzantiserums.

Eine doppelte zweifache Verdünnungsreihe negativen Rinderserums.

#### Auslegung:

Als Antikörper gelten die Endverdünnungen von Testseren, die 50 % der in den Viruskontrollmulden ohne Testserum verzeichneten mittleren optischen Dichte ergeben. Titerwerte über 1:40 gelten als positiv.

#### Referenzen:

Hamblin C, Barnett ITR and Hedger RE (1986) — „An new enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA.“ *Journal of Immunological Methods*, 93, 115-121.11.

## KAPITEL II

### Schweine

#### 1. Tuberkulose

Die intradermale Tuberkulinisierung (Monotest) mit Geflügeltuberkulin wird nach Anhang B der Richtlinie 64/432/EWG durchgeführt, wobei als Injektionsstelle jedoch die lose Haut an der Ohrenbasis vorgezogen wird.

## 2. *Brucellose*

Die Serumagglutinations- und Komplementbindungstests werden nach Abschnitt A und B von Anhang C der Richtlinie 64/432/EWG durchgeführt.

## 3. *Aujeszký-Krankheit*

Der Serumneutralisationstest wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Serum:

Alle Seren vor ihrer Verwendung 30 Minuten bei 56 °C Hitze inaktivieren.

Verfahren:

Zur konstanten virusspezifischen Serumneutralisation auf Mikrotiterplatten werden Vero- oder sonstige empfängliche Zellen verwendet. Das Virus oder Aujeszký-Krankheit zu 100 TCID<sub>50</sub> je 0,025 ml verwenden; inaktivierte und verdünnte Serumproben mit gleicher Menge (0,025 ml) Virussuspension mischen. Das Virus-Serum-Gemisch 2 Stunden bei 37 °C auf den Mikrotiterplatten inkubieren, bevor die entsprechenden Zellen zugegeben werden. Letztere in einer Konzentration verwenden, die nach 24 Stunden einen kompletten Zellrasen bildet.

Kontrollen:

Virusinfektiositätsanalyse,  
Serumtoxizitätskontrollen,  
unbeimpfte Zellkulturkontrollen,  
Referenz-Antiseren.

Auslegung:

Die Ergebnisse des Neutralisationstests und der Titer des Testvirus werden nach drei bis sieben Tagen Inkubation bei 37 °C abgelesen und registriert. Serumtiter von weniger als 1:2 (unverdünnte Seren) gelten als negativ.

## 4. *Transmissible Gastroenteritis (TGE)*

Der Serumneutralisationstest wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Serum:

Alle Seren vor ihrer Verwendung 30 Minuten bei 56 °C Hitze inaktivieren.

Verfahren:

Für die konstante virusspezifische Serumneutralisation auf Mikrotiterplatten werden A72-(Hundetumor-) oder sonstige empfängliche Zellen verwendet. Das TGE-Virus zu 100 TCID<sub>50</sub> je 0,025 ml verwenden; inaktivierte und verdünnte Serumproben mit gleicher Menge (0,025 ml) Virussuspension mischen. Das Virus-Serum-Gemisch 30 bis 60 Minuten bei 37 °C in den Mikrotiterplatten inkubieren, bevor die entsprechenden Zellen zugegeben werden. Die Zellen in einer Konzentration verwenden, die nach 24 Stunden einen kompletten Zellrasen bildet. In jede Mulde 0,1 ml Zellsuspension geben.

Kontrollen:

Virusinfektiositätsanalyse,  
Serumtoxizitätskontrollen,  
unbeimpfte Zellkulturkontrollen,  
Referenz-Antiseren.

Auslegung:

Die Ergebnisse des Neutralisationstests und der Titer des verwendeten Testvirus werden nach drei bis fünf Tagen Inkubation bei 37 °C abgelesen und registriert. Serumtiter von weniger als 1:2 (Endverdünnung) gelten als negativ. Sollten unverdünnte Serumproben auf die Gewebekulturen toxisch wirken, so können diese Seren vor Verwendung im Test im Verhältnis 1:2 verdünnt werden, was einer Serumendverdünnung von 1:4 entspricht. In diesen Fällen gelten Serumtiter von weniger als 1:4 (Endverdünnung) als negativ.

#### 5. Schweineinfluenza

Die Hämagglutinationshemmungsreaktion wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

##### Verfahren:

Die Tests werden nach Standardverfahren durchgeführt (*US Department of Health, Education and Welfare, Immunology series No 6*).

Zur Inaktivierung unspezifischer Hemmstoffe die Schweineseren entweder bei 37 °C über Nacht mit rezeptorzerstörendem Enzym (*Vibriocholera*-Filtrat) behandeln und anschließend zur Inaktivierung der restlichen Enzymtätigkeit für 30 Minuten auf 56 °C erhitzen, oder über Nacht bei 4 °C mit 25 % Kaolin behandeln (Carlk and Casáis, 1958, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 7, 561).

Nach 1-stündiger Absorption mit 10 % Hühnererythrozyten-Suspension bei 37 °C die Seren unter Verwendung von 1 % Hühnererythrozyten gegenüber vier hämagglutinierenden Einheiten des entsprechenden Virus testen. Vor Zugabe der Erythrozyten Virus und Serum 60 Minuten bei Raumtemperatur in Kontakt lassen.

##### Auslegung:

Titer von 1:10 oder mehr gelten als positiv.

#### 6. Maul- und Klauenseuche (MKS)

MKS-Tests an Schweinen werden nach den Protokollen gemäß Abschnitt 1 Ziffer 10 durchgeführt.

#### 7. Vesikuläre Schweinekrankheit

Der Serumneutralisationstest wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

##### Serum:

Alle Seren vor ihrer Verwendung 30 Minuten bei 56 °C Hitze inaktivieren.

##### Verfahren:

Zur konstanten viusspezifischen Serumneutralisation auf Mikrotiterplatten IB-RS-2- oder sonstige empfindliche Zellen verwenden. Den UKG 27/72- oder einen anderen Referenz-Virusstamm zu 100 TCID<sub>50</sub>/je 0,025 ml verwenden. Testseren 1:4 verdünnen, inaktivieren, und eine zweifache Verdünnungsreihe herstellen. Die Serumproben mit gleicher Menge Virussuspension mischen und eine Stunde bei 37 °C in den Mikrotiterplatten inkubieren, bevor 0,025 ml Zellsuspension mit 3 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml zugegeben werden.

##### Kontrollen:

Virusinfektiositätsanalyse,  
Serumtoxizitätskontrollen,  
unbeimpfte Zellkulturkontrollen,  
Referenz-Antiseren.

##### Auslegung:

Die Ergebnisse des Neutralisationstests und der Titer des Testvirus nach drei Tagen Inkubation bei 37 °C ablesen und registrieren. Serumtiter gelten als negativ, wenn bei einer Verdünnung von 1:11 keine Neutralisation vorliegt.

#### 8. Klassische Schweinepest

Die Untersuchungen auf klassische Schweinepest werden nach Anhang I der Richtlinie 80/217 EWG des Rates <sup>(1)</sup> durchgeführt.

#### 9. Leptospirose

Die Untersuchungen auf Leptospirose bei Schweinen werden nach Abschnitt 1 Ziffer 6 dieses Anhangs durchgeführt.

(<sup>1</sup>) ABl. Nr. L 47 vom 21. 2. 1980, S. 11.

## ANHANG II

**MINDESTVORAUSSETZUNGEN FÜR DIE ZULASSUNG VON MÄRKTEN ZUM HANDELSVERKEHR MIT RINDERN UND SCHWEINEN, DIE ZUR AUSFUHR IN DIE EUROPÄISCHE GEMEINSCHAFT VORGESEHEN SIND**

1. Die Märkte müssen der Aufsicht eines amtlichen Tierarztes unterstehen.
2. In einem Umkreis von 20 km um die Märkte herum darf nach amtlicher Feststellung seit mindestens 30 Tagen vor ihrer Nutzung als amtlich zugelassener Markt kein Fall von Maul- und Klauenseuche und — sofern die Märkte für den Handel mit Schweinen zugelassen sind — kein Fall von Schweinepest, Schweine-Bläschenkrankheit und ansteckender Schweinelähmung (Teschener Krankheit) aufgetreten sein.
3. Vor ihrer Nutzung als amtlich zugelassener Markt sind die Märkte zu reinigen und mit einem im Versandland amtlich zugelassenen Mittel zu desinfizieren, das gegen die unter Punkt 2 genannten Krankheiten wirksam ist.
4. Sammelplätze, Verladestellen oder sonstige Plätze, über die die Rinder oder Schweine bei der Ausfuhr in die Gemeinschaft befördert werden, müssen die Bedingungen der Punkte 1, 2 und 3 dieses Anhangs erfüllen.
5. Alle Rinder und Schweine, die auf zugelassene Märkte aufgetrieben werden, müssen den für die Einfuhr der jeweiligen Gattung in die Gemeinschaft geltenden viehseuchenrechtlichen Vorschriften entsprechen.
6. Tiere, die in die Gemeinschaft ausgeführt werden sollen und über einen amtlich zugelassenen Markt befördert werden, müssen innerhalb von sechs Tagen verladen und unmittelbar der Grenzübergangsstelle des Versandlandes zugesandt werden, und zwar:
  - a) abgesondert von allen anderen Klautieren, mit Ausnahme der Rinder und Schweine, die den für die Einfuhr der entsprechenden Gattung in die Gemeinschaft geltenden viehseuchenrechtlichen Vorschriften entsprechen;
  - b) getrennt nach Zucht- und Nutztieren und nach Schlachtieren;
  - c) in Transportfahrzeugen und Behältern, die vorher gereinigt und mit einem im Versandland amtlich zugelassenen Mittel desinfiziert wurden, das gegen die unter Punkt 2 genannten Krankheiten wirksam ist. Die Transportfahrzeuge oder Behälter müssen so gebaut sein, daß während des Transports weder Fäkalien, Urin, Einstreu noch Futtermittel ausfließen bzw. herausfallen können.
7. Nach den Vorschriften für die Ausfuhr von Tieren in die Gemeinschaft muß innerhalb einer festgesetzten Frist eine Kontrolle vor der Verladung vorgenommen werden. Auf diese Frist ist die Zeit — bis zu sechs Tage — anzurechnen, bis die auf solchen zugelassenen Märkten erworbenen Tiere versammelt sind.
8. Das Versandland gibt an, welche Märkte als Märkte für Zucht- und Nutztiere oder als Märkte für Schlachttiere zugelassen werden. Es teilt der Kommission und den zuständigen Zentralbehörden der Mitgliedstaaten Namen und Anschrift dieser Märkte mit.
9. Das Versandland regelt, in welcher Weise die amtliche Überwachung der Märkte, Sammelplätze und Verladestellen durchzuführen ist, und vergewissert sich, daß diese Überwachung durchgeführt wird.
10. Das Versandland trägt dafür Sorge, daß die Angaben über die Märkte und Sammelstellen an entsprechender Stelle in die Gesundheitsbescheinigung aufgenommen werden, die Tiersendungen in die Gemeinschaft begleitet.