

VERORDNUNG (EG) Nr. 1226/2002 DER KOMMISSION
vom 8. Juli 2002
zur Änderung von Anhang B der Richtlinie 64/432/EWG des Rates

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 64/432/EWG des Rates vom 26. Juni 1964 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handel mit Rindern und Schweinen⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 535/2002 der Kommission⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 16 Absatz 1 Unterabsatz 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) Am 11. Oktober 1999 hat der Wissenschaftliche Ausschuss für Tiergesundheit und Tierschutz den Bericht über die Änderung technischer Anhänge der Richtlinie 64/432/EWG zwecks Berücksichtigung der neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse auf dem Gebiet der Rindertuberkulose, der Rinderbrucellose und der enzootischen Rinderleukose⁽³⁾ angenommen.
- (2) Nach diesem Bericht sollten Tuberkulinproben im Einklang mit dem Handbuch des Internationalen Tierseuchenamtes (OIE) mit Normenempfehlungen zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen, dritte Ausgabe, 1996, durchgeführt werden.
- (3) Im August 2001 hat das OIE die vierte Ausgabe 2000 des genannten Handbuchs herausgegeben, mit der die Verfahrensvorschriften für Tuberkulinproben in bestimmten Punkten geändert wurden.

- (4) Im Januar 2002 hat die Europäische Direktion für Arzneimittelqualität (European Directorate for the Quality of Medicines) die vierte Ausgabe 2002 des Europäischen Arzneibuchs, einschließlich der Monografien 0535 und 0536 für bovines und aviäres PPD-Tuberkulin, herausgegeben.
- (5) Daher ist es angezeigt, Anhang B der Richtlinie 64/432/EWG zu ändern und zum Zwecke der Überwachung und des Handels innerhalb der Gemeinschaft Testmethoden festzulegen, die der Stellungnahme des Wissenschaftlichen Veterinärausschusses Rechnung tragen.
- (6) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Ausschusses für die Lebensmittelkette und Tiergesundheit —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Anhang B der Richtlinie 64/432/EWG wird durch den Anhang der vorliegenden Verordnung ersetzt.

Artikel 2

Diese Verordnung tritt am zwanzigsten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedsstaat.

Brüssel, den 8. Juli 2002

Für die Kommission

David BYRNE

Mitglied der Kommission

⁽¹⁾ ABl. 121 vom 29.7.1964, S. 1977/64.

⁽²⁾ ABl. L 80 vom 23.3.2002, S. 22.

⁽³⁾ SANCO/B3/R10/1999.

ANHANG

„ANHANG B

TUBERKULOSE

1. ERREGERIDENTIFIZIERUNG

Die Präsenz von *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), Erreger der Rindertuberkulose, in klinischen oder postmortal entnommenen Proben ist nachweisbar durch Untersuchung angefarbter Tupferproben oder Immunperoxidase-Methoden und kann durch Anzüchtung des Erregers auf einem primären Isolationsmedium bestätigt werden.

Pathologisches Material zur Bestätigung des *M.-bovis*-Erregers sollte von anomalen Lymphknoten und parenchymatösen Organen wie Lunge, Leber, Milz, usw. entnommen werden. Zeigt das Tier keine pathologischen Veränderungen, so sind zur Untersuchung und Anzüchtung Proben von Lymphknoten (Lnn. retropharyngeales, bronchiales, mediastinales, supramammalis, mandibulares und bestimmte Lnn. mesenterici) und Leber geeignet.

In der Regel lassen sich Isolate anhand ihrer kulturellen und biochemischen Merkmale identifizieren. Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction — PCR) eignet sich ebenfalls zum Nachweis des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes. *M. bovis* lässt sich mit DNA-Analysemethoden möglicherweise schneller und zuverlässiger von anderen Mitgliedern des Komplexes abgrenzen als mit biochemischen Methoden. ‚Genetic Fingerprinting‘ ermöglicht die Unterscheidung zwischen verschiedenen *M.-bovis*-Stämmen sowie die Beschreibung von Herkunfts-, Übertragungs- und Ausbreitungsmustern.

Die angewandten Verfahren und Medien, ihre Standardisierung und die Ergebnisauswertung müssen den Vorgaben von Kapitel 2.3.3 (Rindertuberkulose) des OIE-Handbuchs mit Normenempfehlungen zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen, vierte Ausgabe 2000, entsprechen.

2. INTRAKUTANE TUBERKULINPROBE

Für amtliche Intrakutanproben nach den Verfahrensvorschriften gemäß Nummer 2.2 darf nur (gereinigtes) PPD (Purified Protein Derivative) verwendet werden, das den Standards gemäß Nummer 2.1 entspricht.

2.1. Standards für (Rinder- und Geflügel-)Tuberkulin

2.1.1. Definition

Bovines oder aviäres PPD-Tuberkulin ist ein aus Stoffwechselprodukten und Lysaten von *Mycobacterium bovis* bzw. *Mycobacterium avium* gewonnenes Präparat, mit dem sich bei einem gegen Mikroorganismen derselben Art sensibilisierten Tier eine verzögerte Überempfindlichkeit (delayed hypersensitivity) feststellen lässt.

2.1.2. Herstellung

Tuberkulin wird hergestellt aus den wasserlöslichen Fraktionen von *M.-bovis*- bzw. *M.-avium*-Kulturen, die in synthetischen Flüssigmedien gewachsen sind und nach einer Bebrütungszeit in strömendem Dampf abgetötet, filtriert und anschließend im Wasserbad eingengt wurden. Die hauptsächlich aus Protein bestehende aktive Fraktion des Filtrats wird durch Präzipitation isoliert, gewaschen und erneut aufgelöst. Ein antimikrobielles Konservierungsmittel wie Phenol, das keine falsch-positiven Ergebnisse hervorruft, kann zugegeben werden. Das sterile mycobakterienfreie Endpräparat wird unter aseptischen Bedingungen in sterile, fälschungssichere Glasbehälter abgefüllt, die so verschlossen sind, dass jede Kontamination ausgeschlossen ist. Das Präparat kann gefriergetrocknet werden.

2.1.3. Identifikation des Erzeugnisses

Eine Reihe graduierter Tuberkulindosen wird angemessen sensibilisierten Albino-Meerschweinchen, jeweils mit einem Gewicht von mindestens 250 g, an verschiedenen Injektionsstellen intrakutan eingespritzt. Nach 24 bis 28 Stunden sind Reaktionen in Form ödematöser Schwellungen mit Erythem mit oder ohne Nekrose an den Injektionsstellen sichtbar. Umfang und Schwere der Reaktionen können je nach Dosis unterschiedlich sein. Nicht sensibilisierte Meerschweinchen reagieren auf derartige Injektionen nicht.

2.1.4. Testungen

2.1.4.1. pH: Der pH-Wert liegt zwischen 6,5 und 7,5.

- 2.1.4.2. Phenol: Enthält das Prüfpräparat Phenol, so darf seine Konzentration 5 g/l nicht überschreiten.
- 2.1.4.3. Sensibilisierende Wirkung: Eine Gruppe von drei Meerschweinchen verwenden, denen keine Substanzen verabreicht wurden, die das Testergebnis beeinträchtigen könnten. Jedem Tier dreimal im Abstand von jeweils fünf Tagen eine Dosis Prüfpräparat in Höhe von jeweils 500 IE/0,1 ml intrakutan injizieren. 15 bis 21 Tage nach der dritten Injektion diesen Tieren sowie einer Kontrollgruppe, bestehend aus drei Meerschweinchen desselben Gewichts, denen zuvor kein Tuberkulin eingespritzt wurde, intrakutan dieselbe Dosis (500 IE) injizieren. 24 bis 28 Stunden nach der letzten Injektion sind die Reaktionen beider Gruppen kaum unterschiedlich.
- 2.1.4.4. Toxizität: Zwei Meerschweinchen, jeweils mit einem Gewicht von mindestens 250 g, denen zuvor keine Substanzen verabreicht wurden, die das Testergebnis beeinträchtigen könnten, jeweils 0,5 ml Prüfpräparat einspritzen. Die Tiere sieben Tage lang beobachten. Während dieser Zeit wird keine anomale Wirkung verzeichnet.
- 2.1.4.5. Sterilität: Den Sterilitätstest gemäß der Monografie für Tiervakzine (monograph on Vaccines for veterinary use) des Europäischen Arzneibuchs, vierte Ausgabe, durchführen.

2.1.5. *Wirksamkeit*

Die Wirksamkeit von bovinem und aviärem PPD-Tuberkulin wird getestet, indem die Reaktionen sensibilisierter Meerschweinchen auf die intrakutane Injektion einer Verdünnungsreihe des Prüfpräparats mit den Reaktionen auf bekannte Konzentrationen eines in internationalen Einheiten (IE) kalibrierten Referenzpräparats aus bovinem bzw. aviärem PPD-Tuberkulin verglichen werden.

Für den Wirksamkeitstest mindestens 9 Albino-Meerschweinchen, jeweils mit einem Gewicht von 400 bis 600 g, durch tiefe intramuskuläre Injektion von 0,0001 mg Feuchtmasse lebender *M.-bovis*-Bakterien des Stammes AN5 (für Rindertuberkulin in 0,5 ml einer 9 g/l-Natriumchlorid-R-Lösung, für Geflügeltuberkulin in einer angemessenen Dosis inaktivierter oder lebender *M.-avium*-Bakterien suspendiert) sensibilisieren. Frühestens vier Wochen nach der Sensibilisierung die Flanken der Tiere beidseitig für maximal vier Injektionen scheren. Mittels isotonischer phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (pH 6,5-7,5) mit einem Gehalt an 0,005 g/l Polysorbat 80 R Verdünnungsreihen des Prüfpräparats und des Referenzpräparats anlegen. Dabei mindestens drei Dosen Prüfpräparat und mindestens drei Dosen Referenzpräparat verwenden. Die Dosen so auswählen, dass die entstehenden Läsionen mindestens 8 mm und höchstens 25 mm Durchmesser haben. Die Verdünnungen nach dem Zufallsprinzip und unter Verwendung eines lateinischen Quadrats den Injektionsstellen zuteilen. Die einzelnen Dosen mit einem konstantem Volumen von 0,1 ml oder 0,2 ml intrakutan injizieren. Nach 24 bis 28 Stunden die Durchmesser der Läsionen messen, und das Testergebnis nach gängigen statistischen Methoden berechnen, davon ausgehend, dass die Durchmesser der Läsionen zum Logarithmus der Tuberkulinkonzentration direkt proportional sind.

Der Test ist nur gültig, wenn die Fehlergrenzen ($P = 0,95$) nicht unter 50 % und nicht über 200 % der geschätzten Wirksamkeit liegen. Die geschätzte Wirksamkeit beträgt mindestens 66 % und höchstens 150 % der für Rindertuberkulin angegebenen Wirksamkeit. Sie beträgt mindestens 75 % und höchstens 133 % der für Geflügeltuberkulin angegebenen Wirksamkeit. Die angegebene Wirksamkeit beträgt mindestens 20 000 IE/ml für beide Tuberkuline.

2.1.6. *Lagerung*

Vor Licht geschützt bei einer Temperatur von 5 ± 3 °C lagern.

2.1.7. *Etikettierung*

Auf dem Etikett sind anzugeben:

- die Wirksamkeit, ausgedrückt in internationalen Einheiten je Milliliter,
- Bezeichnung und Menge etwa zugegebener Substanzen,
- bei gefriergetrockneten Präparaten:
 - Bezeichnung und Menge der zuzugebenden rekonstituierenden Flüssigkeit,
 - dass das Produkt nach der Rekonstitution umgehend zu verwenden ist.

2.2. **Testmethoden**

- 2.2.1. Die folgenden Methoden werden offiziell als Intrakutanprobe anerkannt:
- der Intrakutan-Monotest (einmalige Applikation von Rindertuberkulin);
 - der Simultantest (gleichzeitige Applikation von Rinder- und Geflügeltuberkulin).

- 2.2.2. Injektionsdosis:
- mindestens 2 000 IE Rindertuberkulin;
 - mindestens 2 000 IE Geflügeltuberkulin.
- 2.2.3. Eine Injektionsdosis umfasst maximal 0,2 ml.
- 2.2.4. Tuberkulinproben werden durchgeführt durch Einspritzen von Tuberkulin(en) in die Nackenhaut. Die Injektionsstellen liegen im Übergangsbereich zwischen dem ersten und mittleren Nackendrittel. Wird gleichzeitig Geflügel- und Rindertuberkulin injiziert, so liegt die Injektionsstelle für Geflügeltuberkulin ungefähr 10 cm vor oder hinter der Schulterblattgräte und für Rindertuberkulin ungefähr 12,5 cm tiefer auf einer mehr oder weniger parallel zur Schulterlinie verlaufenden Linie oder auf verschiedenen Nackenseiten. Bei Jungtieren, bei denen eine Nackenseite nicht genügend Platz zur Abgrenzung der Injektionsstellen bietet, wird das Tuberkulin beidseitig an identischen Stellen im Zentrum des mittleren Nackendrittels eingespritzt.
- 2.2.5. Für die Tuberkulinproben und Reaktionsauswertung gelten folgende Verfahrensvorschriften:
- 2.2.5.1. Vorgehensweise:
- Die Infektionsstellen scheren und säubern. Innerhalb des geschorenen Bereichs eine Hautfalte zwischen Zeigefinger und Daumen aufziehen und mit einem Greifzirkel abmessen. Die Hautfaltendicke aufzeichnen. Die Tuberkulindosis so einspritzen, dass gewährleistet ist, dass das Tuberkulin intrakutan deponiert wurde. Dazu die kurze, sterile Kanüle (abgeschrägte Seite nach außen) einer graduierten, mit Tuberkulin aufgezogenen Spritze schräg in die tieferen Hautschichten einführen. Danach muss an der Injektionsstelle eine kleine, linsenförmige Quaddel palpierbar sein. Die Hautfaltendicke an jeder Injektionsstelle 72 (+/- 4 Std.) Stunden nach der Injektion messen und aufzeichnen.
- 2.2.5.2. Auswertung der Reaktionen
- Die Auswertung der Reaktionen erfolgt auf der Grundlage beobachteter klinischer Veränderungen und der aufgezeichneten Zunahme(n) der Hautfaltendicke an den Injektionsstellen 72 Stunden nach der Tuberkulin-Applikation.
- a) Eine negative Reaktion liegt vor, wenn nur ein begrenztes Anschwellen der Hautfaltendicke um nicht mehr als 2 mm und keine klinischen Veränderungen wie verbreitete oder ausgedehnte Ödeme, seröse Ausschwitzungen, Schorf, Schmerzempfindlichkeit oder Entzündungen der Lymphgefäße in der Umgebung der Infektionsstelle oder der Lymphknoten festzustellen sind.
 - b) Eine zweifelhafte Reaktion liegt vor, wenn ein Anschwellen der Hautfaltendicke um 2 bis 4 mm und keine klinischen Veränderungen festzustellen sind.
 - c) Eine positive Reaktion liegt vor, wenn klinische Veränderungen im Sinne von Buchstabe a) oder ein Anschwellen der Hautfaltendicke an der Injektionsstelle um mehr als 4 mm festzustellen sind
- 2.2.5.3. Auswertung der amtlichen Intrakutanproben:
- 2.2.5.3.1. Intrakutan-Monotest:
- a) positive Reaktion: eine positive Reaktion des Rindes im Sinne von Nummer 2.2.5.2 Buchstabe c);
 - b) zweifelhafte Reaktion: eine zweifelhafte Reaktion im Sinne von Nummer 2.2.5.2 Buchstabe b);
 - c) negative Reaktion: eine negative Reaktion des Rindes im Sinne von Nummer 2.2.5.2 Buchstabe a).
- Tiere mit zweifelhafter Reaktion im Monotest werden nach frühestens 42 Tagen einem Wiederholungstest unterzogen.
- Tiere, die auch im Wiederholungstest nicht negativ reagieren, gelten als positiv.
- Tiere mit positiver Reaktion im Monotest können einem Simultantest unterzogen werden, wenn Verdacht auf eine falsch-positive Reaktion oder eine Störreaktion besteht.
- 2.2.5.3.2. Simultantest zur Feststellung und Erhaltung des Status der amtlich anerkannten Tuberkulosefreiheit eines Bestands:
- a) positive Reaktion: eine positive Reaktion liegt vor, wenn klinische Veränderungen festzustellen sind oder das Rindertuberkulin eine Reaktion hervorruft, bei der die Hautfaltendicke um mehr als 4 mm dicker ist als bei der Reaktion des Geflügeltuberkulins;
 - b) zweifelhafte Reaktion: eine zweifelhafte Reaktion liegt vor, wenn keine klinischen Veränderungen festzustellen sind und das Rindertuberkulin eine zweifelhafte oder positive Reaktion hervorruft, bei der die Hautfaltendicke um 1 bis 4 mm dicker ist als bei der Reaktion des Geflügeltuberkulins;
 - c) negative Reaktion: eine negative Reaktion liegt vor, wenn keine klinischen Veränderungen festzustellen sind und das Rindertuberkulin eine negative Reaktion zur Folge hat oder eine zweifelhafte oder positive Reaktion mit einer Zunahme der Hautfaltendicke hervorruft, die gleich oder kleiner ist als eine zweifelhafte oder positive Reaktion des Geflügeltuberkulins.
- Tiere mit zweifelhafter Reaktion im Simultantest werden nach frühestens 42 Tagen einem Wiederholungstest unterzogen. Tiere, die auch im Wiederholungstest nicht negativ reagieren, gelten als positiv.

- 2.2.5.3.3. Der Status der amtlich anerkannten Tuberkulosefreiheit eines Bestands kann ausgesetzt und Tiere aus diesem Bestand können für den innergemeinschaftlichen Handel gesperrt werden, bis der Gesundheitsstatus folgender Tiere geklärt ist:
- Tiere mit zweifelhafter Reaktion im Monotest;
 - Tiere mit positiver Reaktion im Monotest, bei denen die Tuberkulinprobe jedoch in Form eines Simultantests zu wiederholen ist;
 - Tiere mit zweifelhafter Reaktion im Simultantest.
- 2.2.5.3.4. Soweit Tiere nach geltendem Gemeinschaftsrecht vor der Umsetzung einem Intrakutantest unterzogen werden müssen, ist das Testergebnis so auszuwerten, dass Tiere mit einer Zunahme der Hautfaltendicken von mehr als 2 mm oder klinischen Veränderungen nicht in den innergemeinschaftlichen Handel gelangen.
- 2.2.5.3.5. Um in einem Bestand oder einer Region möglichst viele infizierte und kranke Tiere zu ermitteln, können die Mitgliedstaaten die Kriterien für die Testauswertung ändern und die Testempfindlichkeit dahin gehend erhöhen, dass alle zweifelhaften Reaktionen im Sinne von Nummer 2.2.5.3.1 Buchstabe b) und Nummer 2.2.5.3.2 Buchstabe b) als positive Reaktionen gelten.

3. ZUSÄTZLICHE TESTUNGEN

Um in einem Bestand oder einer Region möglichst viele infizierte und kranke Tiere zu ermitteln, können die Mitgliedstaaten zusätzlich zur Tuberkulinprobe den in Kapitel 2.3.3 (Rindertuberkulose) des OIE-Handbuchs mit Normenempfehlungen zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen, vierte Ausgabe, 2000, vorgesehenen Gamma-Interferon-Assay genehmigen.

4. STAATLICHE INSTITUTE UND NATIONALE REFERENZLABORATORIEN

4.1. Funktionen und Aufgaben

Um zu gewährleisten, dass die Tuberkuline und Reagenzien gemäß Nummern 2 und 3 den vorgenannten Standards entsprechen, erfolgt ihre amtliche Prüfung in den unter Nummer 4.2 aufgelisteten staatlichen Instituten und nationalen Referenzlaboratorien.

4.2. Staatlicher Institute und nationale Referenzlaboratorien

- Deutschland:
Paul-Ehrlich-Institut (PEI), Bundesamt für Sera und Impfstoffe, D-23207 Langen; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin — Bereich Jena — D-07743 Jena;
- Belgien:
Institut Scientifique de la Santé Publique — Louis Pasteur, 14 Rue Juliette Wytsman — B-1050 Brüssel;
- Frankreich:
Laboratoire national des médicaments vétérinaires, Fougères;
- Großherzogtum Luxemburg:
Institut des Lieferlandes;
- Italien:
Istituto superiore di Sanità, Rom;
- Niederlande:
Centraal Instituut voor Dierziekte Controle Lelystad (CIDC-Lelystad), Lelystad;
- Dänemark:
Danmarks Veterinærinstitut, Bülowsvej 27, DK-1790 Kopenhagen;
- Irland:
Institut des Lieferlandes;
- Vereinigtes Königreich:
Veterinary Laboratory Agency, Addlestone, Weybridge;
- Griechenland:
Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων, Νεαπόλεως 25, 153 10 Αθήνα

11. Spanien:
Laboratorio de Sanidad y producción animal de Granada;
 12. Portugal:
Laboratório Nacional de Investigaçao Veterinária, Lissabon;
 13. Österreich:
Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling;
 14. Finnland:
Eläinlääkintä- ja elintarviketutkimuslaitos — Forskningsanstalten för veterinärmedicin och livsmedel,
Helsinki;
 15. Schweden:
Statens veterinärmedicinska anstalt, Uppsala.“
-