

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION

vom 10. Dezember 2008

zur Änderung des Anhangs C der Richtlinie 64/432/EWG des Rates sowie der Entscheidung 2004/226/EG in Bezug auf Tests zur Diagnose von Rinderbrucellose

(Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2008) 7642)

(Text von Bedeutung für den EWR)

(2008/984/EG)

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 Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen ⁽¹⁾, insbesondere auf Artikel 6 Absatz 2 Buchstabe b und Artikel 16 Absatz 1 Unterabsatz 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) In Anhang C der Richtlinie 64/432/EWG sind die Diagnoseverfahren für Rinderbrucellose festgelegt, die zur Eindämmung und Tilgung dieser Tierseuche, zur Überwachung und Kontrolle, zur Feststellung bzw. Aufrechterhaltung des Status der amtlich anerkannten Brucellosefreiheit von Beständen sowie zur Ausstellung der für den innergemeinschaftlichen Handel mit Rindern erforderlichen Bescheinigungen anzuwenden sind.
- (2) Mit der Entscheidung 2004/226/EG der Kommission vom 4. März 2004 zur Genehmigung von Tests für den Nachweis von Antikörpern gegen Rinderbrucellose im Rahmen der Richtlinie 64/432/EWG des Rates ⁽²⁾ wurden bestimmte Tests für Rinderbrucellose genehmigt, die alternativ zum obligatorischen Serumagglutinationstest (SAT) angewendet werden können, damit bescheinigt wird, dass Rinder die Anforderungen des Artikels 6 Absatz 2 Buchstabe b der Richtlinie 64/432/EWG erfüllen.
- (3) Der Fluoreszenz-Polarisations-Assay (FPA) ist eine neue Untersuchungsmethode, die als obligatorischer Test für den internationalen Handel in Kapitel 2.4.3 (Rinderbrucellose) des Handbuchs der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen für Landtiere, sechste Ausgabe (2008), aufgenommen wurde.
- (4) Die Kommission hat bei der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) ein wissenschaftliches Gutachten zur Eignung des FPA für die Aufnahme in Anhang C der Richtlinie 64/432/EWG angefordert.

- (5) Ferner hat die Kommission die EFSA aufgefordert, zu untersuchen, inwieweit der FPA und die in Artikel 1 der Entscheidung 2004/226/EG genannten Tests dazu geeignet sind, die Brucellosefreiheit von Rindern für den innergemeinschaftlichen Handel zu bescheinigen.
- (6) Am 11. Dezember 2006 nahm das Gremium für Tiergesundheit und Tierschutz der EFSA ein wissenschaftliches Gutachten über Brucellose-Diagnoseverfahren für Rinder an ⁽³⁾, in dem es zu dem Ergebnis kam, dass abgesehen vom SAT alle in Anhang C der Richtlinie 64/432/EWG genannten Diagnoseverfahren nach wie vor als Standardtests für die Bescheinigung der Brucellosefreiheit einzelner Rinder für den innergemeinschaftlichen Handel geeignet sind.
- (7) Da Artikel 6 Absatz 2 Buchstabe b der Richtlinie 64/432/EWG jedoch ausdrücklich vorsieht, dass beim Handel mit Rindern vor der Verbringung der SAT durchzuführen ist, muss auch dieser Test in Anhang C dieser Richtlinie spezifiziert werden.
- (8) Zudem wurde im wissenschaftlichen Gutachten vom 11. Dezember 2006 festgestellt, dass der FPA in puncto Empfindlichkeit und Spezifität mit den anderen in Anhang C der Richtlinie 64/432/EWG genannten Tests vergleichbar ist; daher wurde der Schluss gezogen, dass er als Standardtest zur Brucellosediagnose für den innergemeinschaftlichen Handel mit Rindern in diesen Anhang aufgenommen werden kann.
- (9) Die kürzlich entwickelten Polymerase-Kettenreaktionsverfahren, die in Kapitel 2.4.3 Abschnitt 1 Buchstabe d des OIE-Handbuchs zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen für Landtiere, sechste Ausgabe (2008), beschrieben werden, können als zusätzliche Methoden zum Nachweis und zur Identifizierung von *Brucella* spp. dienen; sie sollten daher ebenfalls in Anhang C der Richtlinie 64/432/EWG genannt werden.
- (10) Anhang C der Richtlinie 64/432/EWG sowie die Entscheidung 2004/226/EG sollten daher entsprechend geändert werden.
- (11) Die in dieser Entscheidung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Ausschusses für die Lebensmittelkette und Tiergesundheit —

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

⁽²⁾ ABl. L 68 vom 6.3.2004, S. 36.

⁽³⁾ http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753824_1178620772731.htm

HAT FOLGENDE ENTSCHEIDUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Anhang C der Richtlinie 64/432/EWG wird durch den Anhang der vorliegenden Entscheidung ersetzt.

Artikel 2

Artikel 1 der Entscheidung 2004/226/EG erhält folgende Fassung:

„Artikel 1

Zur Bescheinigung der Brucellosefreiheit werden die Komplementbindungsreaktion, der gepufferte *Brucella*-Antigen-Test

(Rose-Bengal-Test (RBT)), die ELISA-Tests und der Fluoreszenz-Polarisations-Assay (FPA) genehmigt, soweit sie gemäß Anhang C der Richtlinie 64/432/EWG durchgeführt werden.“

Artikel 3

Diese Entscheidung ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 10. Dezember 2008

Für die Kommission

Androulla VASSILIOU

Mitglied der Kommission

ANHANG

1. Die Punkte 1, 2 und 3 des Anhangs C der Richtlinie 64/432/EWG erhalten folgende Fassung:

„ANHANG C

BRUCELLOSE**1. IDENTIFIZIERUNG DES KRANKHEITSERREGERS**

Die Diagnose gilt als gesichert, wenn durch modifizierte Färbung zum Nachweis der Säurefestigkeit oder durch immunspezifische Färbung Organismen der *Brucella*-Gattung in Abortmaterial, Vaginalsekret oder Milch nachgewiesen werden, besonders, wenn dieser Befund durch serologische Untersuchungen untermauert wird. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bietet zusätzliche Nachweismethoden.

Soweit möglich sollte *Brucella* spp. isoliert werden, indem mit Material aus Uterussekret, abortierten Föten, Eutersekret oder bestimmten Geweben (z. B. von Lymphknoten sowie männlichen und weiblichen Fortpflanzungsorganen) Kulturen auf herkömmlichen Nährböden oder Auswahlnährböden angelegt werden.

Nach der Isolierung werden Spezies und Biovar durch Phagenlysis und/oder oxidative Stoffwechseluntersuchungen sowie nach kulturellen, biochemischen und serologischen Kriterien identifiziert. Die PCR kann sowohl als ergänzende Methode als auch zur Biotypisierung anhand bestimmter Gensequenzen dienen.

Die eingesetzten Methoden und Medien, ihre Standardisierung und die Auswertung der Testbefunde müssen den Vorgaben der Kapitel 2.4.3 (Rinderbrucellose), 2.7.2 (Schaf- und Ziegenbrucellose) und 2.8.5 (Schweinebrucellose) des OIE-Handbuchs zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen für Landtiere, sechste Ausgabe (2008), entsprechen.

2. IMMUNOLOGISCHE TESTMETHODEN**2.1. Standards**

- 2.1.1. Zur Herstellung der Antigene für den Rose-Bengal-Test (RBT), den Serumagglutinationstest (SAT), die Komplementbindungsreaktion (KBR) und den Milch-Ring-Test (MRT) sind der Weybridge-Stamm Nr. 99 oder der USDA-Stamm 1119-3 von *Brucella abortus* Biovar 1 zu verwenden.

- 2.1.2. Standardreferenzserum für die genannten Tests ist das Internationale Referenz-Standardserum des OIE (International Reference Standard Serum — OIEISS), früher bekannt als Zweites Internationales Anti-*Brucella abortus*-Serum der WHO (ISAbs).

- 2.1.3. Standardreferenzseren für Enzym-Immuntests (ELISA-Tests) sind:

- das OIEISS,
- das schwachpositive OIE-ELISA-Standardserum (weak-positive OIE ELISA Standard Serum — OIEELISA_{WPSS}),
- das starkpositive OIE-ELISA-Standardserum (strong-positive OIE ELISA Standard Serum — OIEELISA_{SPSS}),
- das negative OIE-ELISA-Standardserum (negative OIE ELISA Standard Serum — OIEELISA_{NSS}).

- 2.1.4. Standardreferenzseren für Fluoreszenz-Polarisations-Assays (FPA) sind:

- das schwachpositive OIE-ELISA-Standardserum (weak-positive OIE ELISA Standard Serum — OIEELISA_{WPSS}),
- das starkpositive OIE-ELISA-Standardserum (strong-positive OIE ELISA Standard Serum — OIEELISA_{SPSS}),
- das negative OIE-ELISA-Standardserum (negative OIE ELISA Standard Serum — OIEELISA_{NSS}).

- 2.1.5. Die unter den Nummern 2.1.3 und 2.1.4 genannten Standardseren sind beim Gemeinschaftsreferenzlabor für Brucellose und bei der Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, Vereinigtes Königreich, erhältlich.

2.1.6. Das OIEISS, das OIEELISA_{WP}SS, das OIEELISA_{SP}SS und das OIEELISA_NSS sind internationale Primärstandards, aus denen in jedem Mitgliedstaat für jeden der unter Nummer 2.1.1 genannten Tests sekundäre nationale Referenzstandards („Arbeitsstandards“) herzustellen sind.

2.2. **Enzym-Immuntests (ELISA-Tests) oder andere Bindungstests zum indirekten Nachweis des Erregers der Rinderbrucellose in Serum oder Milch**

2.2.1. *Material und Reagenzien*

Die angewendete Testmethode und die Auswertung der Testbefunde müssen entsprechend den Prinzipien des Kapitels 1.1.4 des OIE-Handbuchs zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen für Landtiere, sechste Ausgabe (2008), validiert worden sein und zumindest Labor- und diagnostische Untersuchungen umfassen.

2.2.2. *Teststandardisierung*

2.2.2.1. Standardisierung der Testmethode für einzelne Serumproben:

- a) Eine 1:150-Vorverdünnung ⁽¹⁾ des OIEISS oder eine 1:2-Vorverdünnung des OIEELISA_{WP}SS oder eine 1:16-Vorverdünnung des OIEELISA_{SP}SS in einem negativen Serum (oder in einer Sammelprobe negativer Seren) muss eine positive Reaktion ergeben;
- b) eine 1:600-Vorverdünnung des OIEISS oder eine 1:8-Vorverdünnung des OIEELISA_{WP}SS oder eine 1:64-Vorverdünnung des OIEELISA_{SP}SS in einem negativen Serum (oder in einer Sammelprobe negativer Seren) muss eine negative Reaktion ergeben;
- c) das OIEELISA_NSS muss stets eine negative Reaktion ergeben.

2.2.2.2. Standardisierung der Testmethode für Serumsammelproben:

- a) Eine 1:150-Vorverdünnung des OIEISS oder eine 1:2-Vorverdünnung des OIEELISA_{WP}SS oder eine 1:16-Vorverdünnung des OIEELISA_{SP}SS in einem negativen Serum (oder in einer Sammelprobe negativer Seren), erneut verdünnt in negativen Seren um die Zahl der die Sammelprobe ausmachenden Proben, muss eine positive Reaktion ergeben;
- b) das OIEELISA_NSS muss stets eine negative Reaktion ergeben;
- c) der Test muss dazu geeignet sein, bei einem einzelnen Tier einer Gruppe von Tieren, von denen Serumproben in einer Sammelprobe zusammengefasst wurden, eine Brucella-Infektion nachzuweisen.

2.2.2.3. Standardisierung der Testmethode für Milch- oder Molkenammelproben:

- a) Eine 1:1 000-Vorverdünnung des OIEISS oder eine 1:16-Vorverdünnung des OIEELISA_{WP}SS oder eine 1:125-Vorverdünnung des OIEELISA_{SP}SS in einem negativen Serum (oder in einer Sammelprobe negativer Seren), in negativer Milch erneut 1:10 verdünnt, muss eine positive Reaktion ergeben;
- b) das OIEELISA_NSS, in negativer Milch 1:10 verdünnt, muss stets eine negative Reaktion ergeben;
- c) der Test muss dazu geeignet sein, bei einem einzelnen Tier einer Gruppe von Tieren, von denen Milch- oder Molkenproben in einer Sammelprobe zusammengefasst wurden, eine Brucella-Infektion nachzuweisen.

2.2.3. *Bedingungen für die Anwendung der ELISA-Testmethoden zum Nachweis der Rinderbrucellose*

2.2.3.1. Bei Anwendung der unter den Nummern 2.2.2.1 und 2.2.2.2 vorgegebenen Kalibrierungen auf Untersuchungen von Serumproben nach ELISA-Testmethoden und unter Berücksichtigung der vorherrschenden Seuchelage muss der ELISA diagnostisch zumindest ebenso empfindlich sein wie der RBT oder die KBR.

2.2.3.2. Bei Anwendung der unter der Nummer 2.2.2.3 vorgegebenen Kalibrierungen auf die Untersuchung von Milchsammelproben nach ELISA-Testmethoden und unter Berücksichtigung nicht nur der Seuchelage, sondern auch der durchschnittlichen und erwarteten extremen Haltungsformen muss der ELISA diagnostisch zumindest ebenso empfindlich sein wie der MRT.

2.2.3.3. Werden ELISA-Testmethoden zur Bescheinigung im Sinne des Artikels 6 Absatz 1 oder zur Feststellung und Erhaltung des Bestandsstatus gemäß Anhang A Teil II Nummer 10 angewendet, so sind die Serumproben so zur Sammelprobe zusammenzufassen, dass die Testbefunde zweifelsfrei den unter die Sammelprobe fallenden einzelnen Tieren zugeordnet werden können. Etwaige Bestätigungstests sind an Serumproben einzelner Tiere durchzuführen.

⁽¹⁾ In diesem Anhang werden Verdünnungen zur Herstellung von Flüssigreagenzien beispielsweise ausgedrückt als 1:150, was gleichbedeutend ist mit einer Verdünnung von 1 in 150.

2.2.3.4. ELISA-Testmethoden eignen sich zur Untersuchung von Milchproben aus Milch, die in einem Betrieb mit mindestens 30 % laktierenden Milchkühen gesammelt wurde. Wird diese Methode angewendet, so sind alle erforderlichen Vorkehrungen zu treffen, um sicherzustellen, dass die zur Untersuchung entnommenen Proben zweifelsfrei den einzelnen Tieren zugeordnet werden können, von denen die Milch gewonnen wurde. Etwaige Bestätigungstests sind an Serumproben einzelner Tiere durchzuführen.

2.3. Komplementbindungsreaktion (KBR)

2.3.1. Das Antigen entspricht einer Bakteriensuspension in Phenol-Kochsalzlösung (NaCl mit einer Massenkonzentration von 0,85 %, Phenol mit einer Volumenkonzentration von 0,5 %) oder in Veronalpuffer. Antigene können in konzentrierter Form abgegeben werden, vorausgesetzt, der anzuwendende Verdünnungsfaktor ist auf dem Flaschenetikett angegeben. Das Antigen ist bei 4 °C zu lagern und darf nicht eingefroren werden.

2.3.2. Seren sind wie folgt zu inaktivieren:

— Rinderserum: bei 56 bis 60 °C für 30 bis 50 Minuten;

— Schweinserum: bei 60 °C für 30 bis 50 Minuten.

2.3.3. Im Interesse einer aussagekräftigen Testreaktion wird eine Komplementdosis verwendet, die höher ist als die für die komplette Hämolyse erforderliche Mindestdosis.

2.3.4. Bei jedem Reaktionstest sind folgende Funktionskontrollen durchzuführen:

- a) Kontrolle der antikomplementären Wirkung des Serums;
- b) Antigenkontrolle;
- c) Kontrolle des hämolysierenden Systems;
- d) Komplementkontrolle;
- e) Empfindlichkeitskontrolle zu Beginn der Reaktion anhand eines positiven Serums;
- f) Kontrolle der Spezifität der Reaktion anhand eines negativen Serums.

2.3.5. Ergebnisberechnung

Das OIEISS enthält 1 000 internationale KBR-Einheiten (IKBRE) je ml. Wird das OIEISS nach einer gegebenen Methode getestet, so wird das Testergebnis als Titerwert (T_{OIEISS} ; höchste direkte Verdünnung, die eine 50 %ige Hämolyse herbeiführt) ausgedrückt. Das als Titerwert vorliegende Testergebnis für das Testserum ($T_{\text{TESTSERUM}}$) ist als IKBRE je ml auszudrücken. Um einen Titer eines nach dieser Methode getesteten unbekannten Testserums ($T_{\text{TESTSERUM}}$) in den IKBRE-Wert umzurechnen (Faktor F), ist nach folgender Formel zu verfahren:

$$F = 1\,000 \times 1/T_{\text{OIEISS}}$$

Der Gehalt an internationalen KBR-Einheiten je ml Testserum ($\text{IKBRE}_{\text{TESTSERUM}}$) ist nach folgender Formel zu berechnen:

$$\text{ICFTU}_{\text{TESTSERUM}} = F \times T_{\text{TESTSERUM}}$$

2.3.6. Ergebnisauswertung

Ein Serum mit 20 oder mehr IKBRE je ml gilt als positiv.

2.4. Milch-Ring-Test (MRT)

2.4.1. Das Antigen entspricht einer mit Hämatoxylin angefärbten Bakteriensuspension in Phenol-Kochsalzlösung (NaCl mit einer Massenkonzentration von 0,85 %, Phenol mit einer Volumenkonzentration von 0,5 %). Das Antigen ist bei 4 °C zu lagern und darf nicht eingefroren werden.

2.4.2. Die Antigenempfindlichkeit ist im Verhältnis zum OIEISS so zu standardisieren, dass das Antigen bei einer 1:500-Verdünnung des OIEISS in negativer Milch positiv und bei einer 1:1 000-Verdünnung negativ reagiert.

- 2.4.3. Der MRT ist an Proben durchzuführen, die für den Inhalt jeder Milchkanne bzw. jedes Sammel tanks des betreffenden Betriebs repräsentativ sind.
- 2.4.4. Die Milchproben dürfen weder eingefroren noch erhitzt noch heftig geschüttelt worden sein.
- 2.4.5. Der Test ist nach einer der folgenden Methoden durchzuführen:
- an einer mindestens 25 mm hohen Milchsäule mit einem Milchvolumen von 1 ml, dem entweder 0,03 ml oder 0,05 ml eines der standardisierten angefärbten Antigene zugegeben wurde;
 - an einer mindestens 25 mm hohen Milchsäule mit einem Milchvolumen von 2 ml, dem 0,05 ml eines der standardisierten angefärbten Antigene zugegeben wurde;
 - an einem Milchvolumen von 8 ml, dem 0,08 ml eines der standardisierten angefärbten Antigene zugegeben wurde.
- 2.4.6. Das Milch-Antigen-Gemisch ist zusammen mit positiven und negativen Arbeitsstandards für 60 Minuten bei 37 °C zu inkubieren. Eine anschließende Inkubation während 16 bis 24 Stunden bei 4 °C erhöht die Testempfindlichkeit.
- 2.4.7. Ergebnisauswertung
- a) negative Reaktion: gefärbte Milch, farbloser Rahm;
 - b) positive Reaktion:
 - Milch und Rahm gleichermaßen gefärbt oder
 - farblose Milch und gefärbter Rahm.
- 2.5. **Gepufferter Brucella-Antigen-Test (Rose-Bengal-Test (RBT))**
- 2.5.1. Das Brucella-Antigen entspricht einer mit Bengalrosa angefärbten Bakteriensuspension in Verdünnungspuffer mit einem pH-Wert von $3,65 \pm 0,05$. Das Antigen wird gebrauchsfertig geliefert. Es ist bei 4 °C zu lagern und darf nicht eingefroren werden.
- 2.5.2. Das Antigen wird ohne Bezug zur Zellkonzentration hergestellt. Seine Empfindlichkeit muss jedoch im Verhältnis zum OIEISS so standardisiert werden, dass es bei einer Serumverdünnung von 1:45 positiv und bei einer Serumverdünnung von 1:55 negativ reagiert.
- 2.5.3. Der RBT ist wie folgt durchzuführen:
- a) 20-30 µl Serum mit einer gleichen Menge Antigen auf einer weißen oder emaillierten Platte über eine Fläche von ungefähr 2 cm Durchmesser verteilt mischen. Die Mischung über einen Zeitraum von vier Minuten bei Umgebungstemperatur leicht schwenken und anschließend bei guter Beleuchtung auf Agglutinationsreaktion beobachten.
 - b) Testautomaten können verwendet werden, jedoch nur, wenn sie ebenso empfindlich und exakt sind wie die manuelle Methode.
- 2.5.4. *Ergebnisauswertung*
- Jede sichtbare Reaktion gilt als positiv, es sei denn, die Ränder sind stark angetrocknet.
- Positive und negative Arbeitsstandards sind in jede Testreihe einzubeziehen.
- 2.6. **Serumagglutinationstest (SAT)**
- 2.6.1. Das Antigen entspricht einer Bakteriensuspension in Phenol-Kochsalzlösung (NaCl mit einer Massenkonzentration von 0,85 %, Phenol mit einer Volumenkonzentration von 0,5 %).
- Formaldehyd darf nicht verwendet werden.
- Antigene können in konzentrierter Form abgegeben werden, vorausgesetzt, der anzuwendende Verdünnungsfaktor ist auf dem Flaschenetikett angegeben.
- Damit die Zahl falschpositiver Testergebnisse reduziert wird, kann der Antigensuspension in der Endverdünnung bis zu 5 mM EDTA zugesetzt werden. Der pH-Wert von 7,2 ist anschließend in der Antigensuspension neu anzupassen.

2.6.2. Das OIEISS enthält 1 000 internationale Agglutinationseinheiten.

2.6.3. Das Antigen wird ohne Bezug auf die Zellkonzentration aufbereitet; seine Empfindlichkeit ist jedoch im Verhältnis zum OIEISS so zu standardisieren, dass entweder 50 % Agglutination mit einer Serum-Endverdünnung zwischen 1:600 und 1:1 000 oder 75 % Agglutination mit einer Serum-Endverdünnung zwischen 1:500 und 1:750 gewährleistet ist.

Es kann sich auch als sinnvoll erweisen, anhand einer Gruppe definierter Seren die Reaktivität neuer Antigenchargen mit bereits standardisierten Chargen zu vergleichen.

2.6.4. Der Test wird entweder in Reagenzgläsern oder auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Mischung aus Antigen und Serumverdünnungen wird bei 37 °C für 16 bis 24 Stunden inkubiert.

Für jedes Serum sind mindestens drei Verdünnungen anzulegen. Verdächtiges Serum ist so zu verdünnen, dass die im positiven Limit liegende Reaktion am mittleren Glas (beziehungsweise an der mittleren Vertiefung im Falle von Mikrotiterplatten) abgelesen wird.

2.6.5. *Ergebnisauswertung*

Die Stärke der Brucella-Agglutination im Serum ist als IE je ml auszudrücken.

Ein Serum mit mehr als 30 IE je ml gilt als positiv.

2.7. **Fluoreszenz-Polarisations-Assay (FPA)**

2.7.1. Der FPA kann in Reagenzgläsern oder auf Platten mit 96 Vertiefungen durchgeführt werden. Die angewendete Methode, ihre Standardisierung und die Auswertung der Testbefunde müssen den Vorgaben von Kapitel 2.4.3 (Rinderbrucellose) des OIE-Handbuchs zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen für Landtiere, sechste Ausgabe (2008), entsprechen.

2.7.2. *Teststandardisierung*

Standardisierung des FPA:

- a) das OIEELISA_{SpSS} und das OIEELISA_{WpSS} ergeben stets eine positive Reaktion;
- b) eine 1:8-Vorverdünnung des OIEELISA_{WpSS} oder eine 1:64-Vorverdünnung des OIEELISA_{SpSS} in einem negativen Serum (oder in einer Sammelprobe negativer Seren) ergeben stets eine negative Reaktion;
- c) das OIEELISA_{NSS} ergibt stets eine negative Reaktion.

Jede Testserie hat Folgendes zu beinhalten: ein starkpositives, ein schwachpositives und ein negatives Standardserum (kalibriert anhand der OIE-ELISA-Standardseren).

3. **ERGÄNZENDE TESTMETHODEN**

3.1. **Intrakutantest (Brucellintest)**

3.1.1. *Bedingungen für die Durchführung des Intrakutantests:*

- a) Zur Bescheinigung der Brucellosefreiheit für den innergemeinschaftlichen Handel darf der Intrakutantest nicht verwendet werden;
- b) Der Intrakutantest ist eine der spezifischsten Testmethoden zum Nachweis einer Brucellose-Infektion bei nicht geimpften Tieren; die Diagnose darf jedoch nicht nur auf Grundlage des Intrakutantests erfolgen;
- c) Rinder, die auf eine der serologischen Untersuchungen gemäß diesem Anhang negativ, auf den Intrakutantest jedoch positiv reagiert haben, sind als infiziert bzw. unter Infektionsverdacht zu betrachten;
- d) Rinder, die auf eine der serologischen Untersuchungen gemäß diesem Anhang positiv reagiert haben, können einem Intrakutantest unterzogen werden, damit die serologischen Testbefunde untermauert werden, insbesondere wenn in brucellosefreien oder amtlich anerkannt brucellosefreien Rinderbeständen eine Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen andere Bakterien nicht ausgeschlossen werden kann.

- 3.1.2. Der Test ist mit einem standardisierten und definierten Brucellin-Präparat durchzuführen, das kein Lipopolysaccharid-Antigen (LPS-Antigen)) der S-Form enthält, welches unspezifische Entzündungsreaktionen hervorrufen oder spätere serologische Untersuchungen beeinträchtigen kann.

Die Methode zur Herstellung von Brucellin muss den Vorgaben des Kapitels 2.4.3 Abschnitt C1 des OIE-Handbuchs zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen für Landtiere, sechste Ausgabe (2008), entsprechen.

3.1.3. *Testmethode*

- 3.1.3.1. 0,1 ml Brucellin wird intrakutan in die Schwanzfalte, die Flankenhaut oder die Halsseite injiziert.

- 3.1.3.2. Das Testergebnis ist nach 48 bis 72 Stunden abzulesen.

- 3.1.3.3. Die Hautdicke an der Injektionsstelle vor der Injektion und bei der Nachuntersuchung wird mit Hilfe eines Mess-Schiebers mit Feineinstellung gemessen.

3.1.3.4. Ergebnisauswertung

Heftige Reaktionen manifestieren sich durch lokale Schwellung und Induration und sind leicht erkennbar.

Eine Hautverdickung von 1,5 bis 2 mm gilt als positiver Testbefund.

3.2. **Kompetitiver Enzymimmunoassay (cELISA)**

3.2.1. *Bedingungen für die Anwendung des cELISA*

Zur Bescheinigung der Brucellosefreiheit für den innergemeinschaftlichen Handel darf der cELISA nicht verwendet werden.

Rinder, die auf eine der anderen in diesem Anhang genannten serologischen Untersuchungen positiv reagiert haben, können einem cELISA unterzogen werden, damit die anderen serologischen Testbefunde untermauert werden, insbesondere wenn in brucellosefreien oder amtlich anerkannt brucellosefreien Rinderbeständen eine Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen andere Bakterien nicht ausgeschlossen werden kann, oder damit Reaktionen aufgrund von Restantikörpern ausgeschlossen werden, die sich wegen einer Impfung mit S19 gebildet haben.

3.2.2. *Testmethode*

Der Test ist in Übereinstimmung mit den Vorschriften des Kapitels 2.4.3 Abschnitt B Nummer 2 des OIE-Handbuchs zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen für Landtiere, sechste Ausgabe (2008), durchzuführen.“

2. Punkt 4.1 des Anhangs C der Richtlinie 64/432/EWG erhält folgende Fassung:

„4.1. **Aufgaben und Befugnisse**

Gemäß Artikel 6a benannte nationale Referenzlaboratorien sind zuständig für

- a) die Bestätigung der Ergebnisse von Validierungsstudien, mit denen die Zuverlässigkeit der in dem betreffenden Mitgliedstaat angewendeten Testmethode nachgewiesen wird;
 - b) die Festsetzung der Höchstanzahl Proben, die als Sammelprobe in den verwendeten ELISA-Testkits gepoolt werden können;
 - c) die Kalibrierung der Arbeitsstandards gemäß Nummer 2.1.6;
 - d) die Kontrolle der Qualität aller in dem betreffenden Mitgliedstaat verwendeten Antigenpartien und ELISA-Testkits;
 - e) die Umsetzung von Empfehlungen des Gemeinschaftsreferenzlabors für Brucellose und die Zusammenarbeit mit diesem Labor.“
-