

BESCHLUSS DER KOMMISSION**vom 15. Dezember 2009****zur Änderung des Anhangs D der Richtlinie 64/432/EWG in Bezug auf Tests zur Diagnose von enzootischer Rinderleukose***(Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2009) 9951)***(Text von Bedeutung für den EWR)***(2009/976/EU)*

DIE EUROPÄISCHE KOMMISSION —

gestützt auf den Vertrag über die Arbeitsweise der Europäischen Union,

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 16 Absatz 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) Die Richtlinie 64/432/EWG gilt für den Handel innerhalb der Union mit Rindern; in Anhang D Kapitel II sind die Diagnoseverfahren für enzootische Rinderleukose (ERL) festgelegt, die zur Eindämmung und Tilgung dieser Tierseuche, zur Überwachung und Kontrolle, zur Feststellung bzw. Aufrechterhaltung des Status der ERL-Freiheit von Beständen sowie zur Ausstellung der für den Handel innerhalb der Union mit Rindern erforderlichen Bescheinigungen anzuwenden sind.
- (2) In Anhang D Kapitel II der Richtlinie 64/432/EWG ist vorgesehen, dass die ERL entweder im Agar-Gel-Immunitätsdiffusionstest (AGID) mit einem anhand des amtlichen EG-Standardserums (EI-Serum) standardisierten Antigen oder mit dem anhand des E4-Serums standardisierten Enzymimmunoassay (ELISA) nachgewiesen wird. Beide Standardseren werden vom National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, bereitgestellt.
- (3) Kürzlich hat das Referenzlaboratorium der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) für Enzootische Bovine Leukose in Deutschland (Friedrich-Loeffler-Institut) in Zusammenarbeit mit dem OIE-Referenzlaboratorium im Vereinigten Königreich (Veterinary Laboratories Agency) und in Polen (National Veterinary Research Institute) ein neues ERL-Standardserum (E05-Serum) entwickelt, das in einem Ringversuch zwischen den genannten Laboratorien getestet wurde. Das E05-Serum wurde mittels unterschiedlicher AGID- und ELISA-Tests anhand der EI- und E4-Seren validiert und anschließend als zugelassenes OIE-Standardserum in Kapitel 2.4.11 Abschnitt B(2) des OIE-

Handbuchs zu Untersuchungsmethoden und Vakzinen für Landtiere, sechste Ausgabe 2008, aufgenommen. Dieses Serum wird vom OIE-Referenzlaboratorium für Enzootische Bovine Leukose in Deutschland bereitgestellt.

- (4) Außerdem hat das National Veterinary Institute, Technical University of Denmark der Kommission mitgeteilt, dass es seiner Verpflichtung zur Bereitstellung der derzeit in Anhang D Kapitel II der Richtlinie 64/432/EWG vorgesehenen Standardseren nicht mehr nachkommen kann.
- (5) Die zuständigen deutschen Behörden und das Friedrich-Loeffler-Institut haben sich bereit erklärt, das E05-Serum bereitzustellen, das damit zum neuen amtlichen Standardserum der Union für ERL wird.
- (6) Die Richtlinie 64/432/EWG sollte daher entsprechend geändert werden.
- (7) Die in diesem Beschluss vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Ausschusses für die Lebensmittelkette und Tiergesundheit —

HAT FOLGENDEN BESCHLUSS ERLASSEN:

Artikel 1

Anhang D Kapitel II der Richtlinie 64/432/EWG wird durch den Text im Anhang zu diesem Beschluss ersetzt.

Artikel 2

Dieser Beschluss ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 15. Dezember 2009

Für die Kommission
 Androulla VASSILIOU
 Mitglied der Kommission

⁽¹⁾ ABl. 121 vom 29.7.1964, S. 1977.

ANHANG

Anhang D Kapitel II der Richtlinie 64/432/EWG erhält folgende Fassung:

„KAPITEL II

TESTS ZUM NACHWEIS DER ENZOOTISCHEN RINDERLEUKOSE

Die enzootische Rinderleukose (ERL) wird nachgewiesen im Immundiffusionstest nach Maßgabe der Bestimmungen gemäß den Abschnitten A und B oder im Enzymimmunoassay (ELISA) nach Maßgabe der Bestimmung gemäß Abschnitt C. Die Immundiffusionstechnik kann nur im Einzeltest angewandt werden. Werden die Testergebnisse gerechtfertigterweise in Frage gestellt, so wird als zusätzliche Kontrolle ein Agar-Gel-Immundiffusionstest durchgeführt.

AGID und ELISA werden anhand des E05-Serums standardisiert, das amtliches Standardserum der Union wird und bereitgestellt wird von:

Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
OIE-Referenzlabor für Enzootische Bovine Leukose (EBL)
Stüdufer 10
17493 Greifswald — Insel Riems
Deutschland

A. Agar-Gel-Immundiffusion zum Nachweis der enzootischen Rinderleukose

1. Das Testantigen muss Glykoproteine des ERL-Virus enthalten. Das Antigen ist anhand des E05-Serums zu standardisieren.
2. Die gemäß Artikel 6a benannten staatlichen Institute, nationalen Referenzlaboratorien oder amtlichen Institute für die Koordinierung der Standards und Diagnosemethoden der Tests auf enzootische Rinderleukose müssen die Zuständigkeit für die Eichung des Standard-Arbeitsantigens des Labors anhand des E05-Serums erhalten.
3. Die im Labor verwendeten Standardantigene müssen den gemäß Artikel 6a benannten staatlichen Instituten, nationalen Referenzlaboratorien oder amtlichen Instituten mindestens einmal jährlich zur Prüfung gegen das E05-Serum zur Verfügung gestellt werden. Von dieser Standardisierung abgesehen kann das verwendete Antigen gemäß der Methode in Abschnitt B geeicht werden.
4. Reagenzien:
 - a) Antigen: Das Antigen muss ERL-Virus-spezifische Glykoproteine enthalten und muss anhand des E05-Serums standardisiert worden sein;
 - b) das Testserum;
 - c) ein bekanntes positives Kontrollserum;
 - d) Agar-Gel:
 - 0,8 % Agar,
 - 8,5 % NaCl,
 - 0,05 M Tris-Puffer, pH 7,2;
 - 15 ml dieses Agar werden in eine Petrischale von 85 mm Durchmesser gegeben, was eine Agar-Tiefe von 2,6 mm ergibt.
5. Nach dem Testschema sieben bis zum Boden der Schale reichende Vertiefungen, die frei von Feuchtigkeit sein müssen, in den Agar stanzen; das Schema besteht aus einer zentralen Vertiefung, um die kreisförmig sechs weitere Vertiefungen angeordnet sind.

Durchmesser der zentralen Vertiefung: 4 mm;

Durchmesser der Randvertiefung: 6 mm;

Abstand zwischen zentraler Vertiefung und Randvertiefungen: 3 mm.

6. Die zentrale Vertiefung mit Standardantigen, die Randvertiefungen 1 und 4 (siehe B.3) mit dem bekannten Positivserum und die Vertiefungen 2, 3, 5 und 6 mit dem Testserum soweit auffüllen, bis der Schalenboden nicht mehr zu sehen ist.
7. Daraus ergeben sich folgende Mengen:
 - Antigen: 32 µl,
 - Kontrollserum: 73 µl,
 - Testserum: 73 µl.
8. Für 72 Stunden bei Raumtemperatur (20 bis 27 °C) in geschlossener feuchter Atmosphäre inkubieren.
9. Das Testergebnis kann nach 24 und nach 48 Stunden abgelesen werden, ein endgültiges Ergebnis liegt jedoch erst nach 72 Stunden vor.
 - a) Ein Testserum ist positiv, wenn es mit dem ERL-Antigen eine deutlich sichtbare Präzipitationslinie bildet, die Präzipitate ineinander übergehen und vollständig verschmelzen, das Antiserum also mit der Kontrollprobe identisch ist;
 - b) ein Testserum ist negativ, wenn es mit dem ERL-Antigen keine deutlich sichtbare Präzipitationslinie bildet und die Linie des Kontrollserums nicht biegt;
 - c) die Reaktion ist nicht eindeutig,
 - i) wenn das Testserum die Linie des Kontrollserums zur das ERL-Antigen enthaltenen Vertiefung hin biegt, ohne jedoch eine sichtbare Präzipitationslinie mit dem Antigen zu bilden, oder
 - ii) wenn das Testserum weder als negativ noch als positiv abgelesen werden kann.

Bei fraglichen Ergebnissen kann der Test mit Konzentratserum wiederholt werden.
10. Es können andere Vertiefungsanordnungen oder Testschemata verwendet werden, wenn das E05-Serum, 1:10 in negativem Serum verdünnt, sich als positiv nachweisen lässt.

B. Verfahren der Antigenstandardisierung

1. Reagenzien und Geräte

- a) 40 ml 1,6 %iger Agarose in 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,2 mit 8,5 % NaCl;
- b) 15 ml eines Rinderleukoseresums, das nur Antikörper gegen ERL-Virus-Glykoproteine enthält, 1:10 verdünnt in 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,2 mit 8,5 % NaCl;
- c) 15 ml eines Rinderleukoseresums, das nur Antikörper gegen ERL-Virus-Glykoproteine enthält, 1:5 verdünnt in 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,2 mit 8,5 % NaCl;
- d) vier Kunststoff-Petrischalen von 85 mm Durchmesser;
- e) eine Lochstanze mit 4 bis 6 mm Durchmesser;
- f) ein Referenzantigen;
- g) das zu standardisierende Antigen;
- h) ein Wasserbad (56 °C).

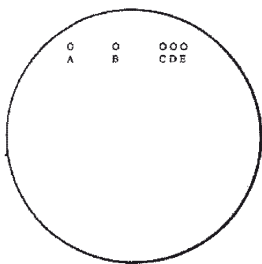
2. Verfahrensweise

1,6 %ige Agarose in Tris/HCl-Puffer durch vorsichtiges Erhitzen auf 100 °C lösen. Lösung und die Rinderleukoseresum-Verdünnungen für etwa eine Stunde ins Wasserbad (56 °C) stellen.

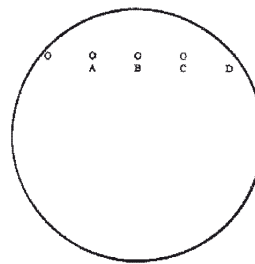
15 ml der auf 56 °C erhitzten Agarose-Lösung mit den 15 ml Rinderleukoseresum, 1:10 verdünnt, mischen, kurz schütteln und jeweils 15 ml in zwei Petrischalen füllen. Das Verfahren mit dem 1:5 verdünnten Rinderleukoseresum wiederholen.

Agarose erstarren lassen, und wie folgt Löcher in das Agarose-Gel stanzen:

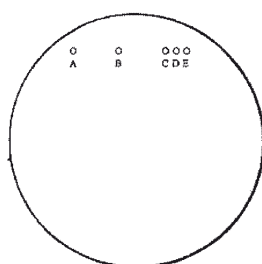
Petrischale 1
Serum 1:10



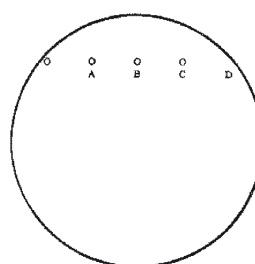
Petrischale 2
Serum 1:10



Petrischale 3
Serum 1:5



Petrischale 4
Serum 1:5



3. Zugabe von Antigen

a) Petrischalen 1 und 3:

- i) Vertiefung A — unverdünntes Referenzantigen,
- ii) Vertiefung B — 1:2 verdünntes Referenzantigen,
- iii) Vertiefung C und E — Referenzantigen,
- iv) Vertiefung D — unverdünntes Testantigen;

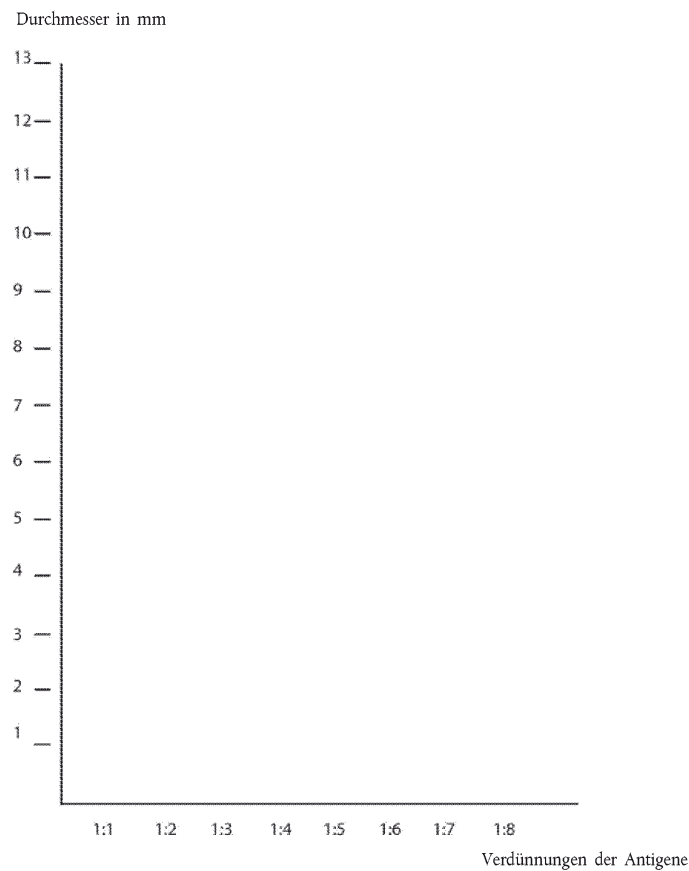
b) Petrischalen 2 und 4:

- i) Vertiefung A — unverdünntes Testantigen,
- ii) Vertiefung B — 1:2 verdünntes Testantigen,
- iii) Vertiefung C — 1:4 verdünntes Testantigen,
- iv) Vertiefung D — 1:8 verdünntes Testantigen.

4. Zusätzliche Anweisungen

- a) Den Versuch mit zwei Serumverdünnungen (1:5 und 1:10) durchführen, um die bestmögliche Präzipitation zu erzielen.
- b) Ist der Präzipitationsdurchmesser mit beiden Verdünnungen zu klein, das Serum weiter verdünnen.
- c) Ist der Präzipitationsdurchmesser mit beiden Verdünnungen zu groß und zu schwach, eine schwächere Serumverdünnung verwenden.
- d) Die Endkonzentration der Agarose muss 0,8 %, die der Seren 5 % bzw. 10 % betragen.

- e) Die gemessenen Durchmesser in das folgende Koordinatensystem einzeichnen. Die Verdünnung des Testantigens, die den gleichen Durchmesser hat wie das Bezugsantigen, ist die Arbeitsverdünnung.



C. Enzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis der enzootischen Rinderleukose

1. Reagenzien und Geräte:

- a) Festphasen-Mikroplatten, Küvetten oder sonstige Festphasen;
- b) das Antigen, mit oder ohne Hilfe von polyklonalen oder monoklonalen bindungsstarken Antikörpern an die feste Phase gebunden. Ist das Antigen direkt an den Festphasenantikörper gebunden, so sind alle Testproben mit positiven Reaktionen erneut gegen das Kontrollantigen zu testen. Das Kontrollantigen sollte mit dem Antigen identisch sein, allerdings ohne ERL-Virus-Antigene. Sind bindungsstarke Antikörper an die feste Phase gebunden, so dürfen die Antikörper nur auf Antigene gegen Rinderleukoseviren reagieren;
- c) die zu untersuchende Körperflüssigkeit;
- d) eine entsprechende positive und negative Kontrolle;
- e) Konjugat;
- f) ein dem verwendeten Enzym entsprechendes Substrat;
- g) erforderlichenfalls eine Stopplösung;
- h) Lösungen zur Verdünnung der Testproben für die Herstellung der Reagenzien und zum Waschen;
- i) ein für das gewählte Substrat geeignetes Ablesegerät.

2. Standardisierung und Empfindlichkeit des Tests

Der ELISA-Test muss so empfindlich sein, dass das E05-Serum positiv reagiert, wenn es 10-mal (Serumproben) bzw. 250-mal (Milchproben) so stark verdünnt wird wie die Lösung, die sich aus der Zusammenfassung von Einzelproben in Pools ergibt. Bei Versuchen, in denen Proben (Serum und Milch) einzeln getestet werden, muss das im Verhältnis 1:10 (im Negativserum) oder 1:250 (in Negativmilch) verdünnte E05-Serum positiv reagieren, wenn es in derselben Verdünnung wie die Einzelproben getestet wird. Die in Abschnitt A Nummer 2 angeführten amtlichen Institute sind für die Qualitätskontrolle des ELISA-Verfahrens zuständig und bestimmen insbesondere, wie viele Einzelproben aus jeder Produktionspartie auf der Grundlage des für das E05-Serum erhaltenen Titer in Pools zusammenzufassen sind.

3. Voraussetzungen für die Verwendung des ELISA-Tests zum Nachweis der enzootischen Rinderleukose

- a) Das ELISA-Verfahren kann bei Serum- oder Milchproben angewandt werden.
 - b) Werden ELISA-Testmethoden zur Bescheinigung im Sinne des Artikels 6 Absatz 2 Buchstabe c oder zur Feststellung und Erhaltung des Bestandsstatus gemäß Anhang D Teil I angewendet, so sind die Serum- oder Milchproben so zur Sammelprobe zusammenzufassen, dass die zur Untersuchung genommenen Proben zweifelsfrei den unter die Sammelprobe fallenden einzelnen Tieren zugeordnet werden können. Etwaige Bestätigungstests sind an bei einzelnen Tieren genommenen Proben durchzuführen.
 - c) Werden ELISA-Testmethoden zur Untersuchung von Sammelmilchproben verwendet, so müssen diese aus Milch gebildet werden, die in einem Betrieb mit mindestens 30 % laktierenden Milchkühen gesammelt wurde. Etwaige Bestätigungstests sind an Serum- oder Milchproben einzelner Tiere durchzuführen.“
-