II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

RAT

RICHTLINIE DES RATES

vom 14. Juni 1988

zur Änderung der Richtlinie 64/432/EWG hinsichtlich der Rinderleukose und zur Aufhebung der Richtlinie 80/1102/EWG

(88/406/EWG)

DER RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft, insbesondere auf Artikel 43,

auf Vorschlag der Kommission (1),

nach Stellungnahme des Europäischen Parlaments (2),

nach Stellungnahme des Wirtschafts- und Sozialausschusses (3),

in Erwägung nachstehender Gründe:

Eine der Aufgaben der Gemeinschaft auf dem Gebiet des Veterinärwesens besteht darin, den Gesundheitszustand des Viehbestands zu verbessern, damit eine bessere Rentabilität der Tierzucht erzielt wird.

In diesem Zusammenhang erweist es sich als notwendig, die Gemeinschaft vor der enzootischen Rinderleukose zu schützen. Mit den Richtlinien 77/391/EWG (4) und 78/52/EWG (5) sowie der Entscheidung 87/58/EWG (6) hat die Gemeinschaft im übrigen bereits Maßnahmen zur Tilgung dieser Krankheit getroffen.

Eine derartige Maßnahme muß außerdem dazu beitragen, daß die aufgrund der unterschiedlichen tiergesundheitlichen Verhältnisse noch bestehenden Behinderungen im Handel mit lebenden Tieren zwischen den Mitgliedstaaten beseitigt werden.

Daher wurden in die Richtlinie 64/432/EWG des Rates vom 26. Juni 1964 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen (7), zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 3805/87 (8), für die Zeit bis zum 31. Dezember 1988 Schutzmaßnahmen gegen die enzootische Rinderleukose aufgenommen.

Es ist angezeigt, die Geltungsdauer dieser Maßnahmen zu verlängern; gleichzeitig sind neue Verfahren zum Nachweis der enzootischen Rinderleukose anzuerkennen.

Die gegenwärtig bestehenden Sonderregelungen für die Mitgliedstaaten, die einzelstaatliche Programme gegen die Seuche durchführten, müssen nach Ablauf einer Übergangszeit außer Kraft treten.

Es bedarf einer Regelung über die Einstufung der Bestände bezüglich der enzootischen Rinderleukose.

Die Mitgliedstaaten müssen zur Einstufung ihrer Bestände ein Programm durchführen, nach dem diese nach Anlage G der Richtlinie 64/432/EWG auf Leukose zu untersuchen sind.

Mit Ausnahme der weniger als dreißig Monate alten Schlachttiere müssen die für den innergemeinschaftlichen Handelsverkehr bestimmten Tiere aus einem untersuchten Bestand stammen, und es muß bei ihnen ein Einzeltest durchgeführt worden sein —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Die Richtlinie 64/432/EWG wird mit Wirkung vom 1. Juli 1988 wie folgt geändert:

(1) ABl. Nr. C 5 vom 9. 1. 1988, S. 5.
(2) ABl. Nr. C 49 vom 22. 2. 1988, S. 164.
(3) ABl. Nr. C 80 vom 28. 3. 1988, S. 34.
(4) ABl. Nr. L 145 vom 13. 6. 1977, S. 44.
(5) ABl. Nr. L 15 vom 19. 1. 1978, S. 34.
(6) ABl. Nr. L 24 vom 27. 1. 1987, S. 51.
(7) ABl. Nr. 121 vom 29. 7. 1964, S. 1977/64.
(8) ABl. Nr. L 357 vom 19. 12. 1987, S. 1.

1. Dem Artikel 2 wird folgender Buchstabe angefügt:

„s) von der enzootischen Rinderleukose freier Bestand: Bestand,

i) in dem in den letzten beiden Jahren kein Fall von enzootischer Rinderleukose klinisch oder aufgrund eines nach Anlage G durchgeführten Tests festgestellt oder bestätigt wurde;

ii) von dem die über vierundzwanzig Monate alten Tiere in den letzten zwölf Monaten auf zwei Tests, denen sie nach Anlage G in einem Abstand von wenigstens vier Monaten unterzogen wurden, negativ reagiert haben, bzw. bei einem Bestand, für den diese Bedingung erfüllt ist, auf einen einzigen nach Anlage G durchgeführten Test;

iii) in dem sich ab dem Zeitpunkt der ersten Kontrolle nur noch Tiere befinden, die in dem betreffenden Bestand geboren sind oder die aus einem von enzootischer Rinderleukose freien Bestand stammen."

2. Dem Artikel 3 Absatz 2 wird folgender Buchstabe angefügt:

„j) wenn sie — im Falle reinrassiger Zuchtrinder im Sinne des Artikels 1 der Richtlinie 77/504/EWG, die ausschließlich zur Zucht bestimmt und sehr wertvoll sind — aus einem Bestand stammen,

i) über den dem amtlichen Tierarzt keine Tatsachen zur Kenntnis gelangt sind, die auf einen Fall von enzootischer Rinderleukose während der letzten zwei Jahre schließen lassen;

ii) dessen Besitzer erklärt hat, daß ihm solche Tatsachen nicht bekannt geworden sind, und außerdem schriftlich versichert hat, daß das oder die für den innergemeinschaftlichen Handelsverkehr bestimmte(n) Tier(e) entweder in dem betreffenden Bestand geboren und aufgezogen worden ist/sind oder in den vorangegangenen zwölf Monaten zu diesem Bestand gehört hat/haben;".

3. Dem Artikel 3 Absatz 3 wird folgender Buchstabe angefügt:

„d) aus einem Bestand stammen, in welchem nichts auf einen Fall von enzootischer Rinderleukose während der letzten zwei Jahre hat schließen lassen, und die, wenn sie mehr als zwölf Monate alt sind, auf einen innerhalb von dreißig Tagen vor der Verladung gemäß Anlage G durchgeführten Einzeltest negativ reagiert haben.

Dieser Test wird jedoch nicht verlangt bei unter dreißig Monate alten, für die Fleischerzeugung bestimmten männlichen sowie kastrierten Rindern, soweit diese Tiere bei der Verladung besonders gekennzeichnet sind und der Mitgliedstaat alle Vorkehrungen zur Vermeidung der Ansteckung einheimischer Bestände trifft."

4. Dem Artikel 7 Absatz 1 wird folgender Abschnitt angefügt:

„G. Zur Fleischerzeugung bestimmte weibliche Rinder im Alter von weniger als dreißig Monaten, bei denen abweichend von Artikel 3 Absatz 3 Buchstabe d) kein Einzeltest durchgeführt worden ist. Diese Tiere müssen besonders gekennzeichnet sein. Der Bestimmungsmitgliedstaat trifft alle Vorkehrungen zur Vermeidung der Ansteckung einheimischer Bestände."

5. In Artikel 8 Absatz 2 wird folgender Unterabsatz hinzugefügt:

„Was insbesondere die enzootische Rinderleukose bezüglich der in Artikel 3 Absatz 2 Buchstabe j) genannten Tiere betrifft, so sind die Mitgliedstaaten ermächtigt, darüber hinaus unter Beachtung der allgemeinen Bestimmungen des Vertrags vorzuschreiben, daß bei allen im Zeitpunkt des Tests über vierundzwanzig Monate alten Rindern, die zu dem Herkunftsbestand gehörten, ein Test gemäß Anlage G innerhalb der letzten zwölf Monate einen negativen Befund erbracht hat. Diese Garantien können jedoch bei der Einführung von Tieren aus einem Mitgliedstaat nicht verlangt werden, bei dem nach dem Verfahren des Artikels 12 anerkannt wurde, daß er ausreichende Garantien im Hinblick auf die enzootische Rinderleukose bietet."

6. Es wird folgender Artikel eingefügt:

„*Artikel 8a*

(1) Mitgliedstaaten, die seit 1980 ein bindendes einzelstaatliches Programm zur Vorbeugung gegen die enzootische Rinderleukose durchführen, können für die Verbringung von Zucht- und Nutzrindern in ihr Hoheitsgebiet, die in leukoseunverdächtige Rinderbestände eingestellt werden sollen, die Vorlage einer vom zuständigen amtlichen Tierarzt am Tag der Verladung mindestens in der oder den Sprachen des Bestimmungslandes ausgestellten Bescheinigung vorschreiben, aus der hervorgeht, daß

a) diesem Tierarzt keine Tatsachen zur Kenntnis gelangt sind, die auf enzootische Rinderleukose in dem Herkunftsbestand der Tiere während der letzten drei Jahre schließen lassen, und der Besitzer des Bestandes erklärt hat, daß ihm solche Tatsachen nicht bekannt geworden sind, und außerdem schriftlich versichert hat, daß das oder die für den innergemeinschaftlichen Handelsverkehr bestimmte(n) Tier(e) entweder in diesem Bestand geboren und aufgezogen worden ist/sind oder in den vorhergehenden zwölf Monaten zu diesem Bestand gehört hat/haben.

b) innerhalb der letzten zwölf Monate alle im Zeitpunkt des Tests über vierundzwanzig Monate alten Rinder, die zu dem Herkunftsbestand gehörten, negativ auf einen Test gemäß Anlage G reagiert haben.

(2) Nach dem Verfahren des Artikels 12 können andere als die in Absatz 1 genannten Mitgliedstaaten

ermächtigt werden, dieselben Erfordernisse für ihr Hoheitsgebiet beziehungsweise im Falle des Vereinigten Königreichs für Nordirland anzuwenden, wenn dort ein Plan zur Tilgung der enzootischen Rinderleukose gemäß der Entscheidung 87/58/EWG durchgeführt wird oder nachgewiesen wird, daß sie dort zum Zeitpunkt der Befassung des Ständigen Veterinärausschusses seit mindestens zwei Jahren ein Mindestprogramm zur Tilgung dieser Seuche durchführen, das mindestens folgende Anforderungen vorsieht:

— Alle Tumoren in den Organen und im lymphatischen System von Rindern müssen gemeldet und von einem tierärztlichen Labor, das unter unmittelbarer Aufsicht eines der in Anlage G genannten Institute steht, histologisch untersucht werden.

— Alle Rinder aus Beständen, die in ansteckendem Kontakt mit einem Tier standen, bei dem ein leukotischer Tumor festgestellt wurde, sind einem Test zum Nachweis der enzootischen Rinderleukose zu unterziehen, der gemäß Anlage G in einem Labor durchzuführen ist, das unter unmittelbarer Aufsicht eines der in Anlage G genannten Institute steht.

— Angesteckte Tiere aus einem Bestand, in dem bei einem Tier ein leukotischer Tumor festgestellt wurde und die Diagnose einer enzootischen Rinderleukose bestätigt worden ist, dürfen diesen nur zur Schlachtung unter der Aufsicht der zuständigen Veterinärbehörden verlassen. Der Bestand bleibt unter amtlicher Aufsicht, bis dort alle über vierundzwanzig Monate alten Tiere mindestens zwei Tests in Abständen von wenigstens vier Monaten mit negativem Ergebnis unterzogen worden sind, die gemäß Anlage G in einem Labor durchzuführen sind, das unter der unmittelbaren Aufsicht eines der in Anlage G aufgeführten Institute steht.

Die weiteren besonderen Bedingungen, die für diese Ausdehnung für jeden der betreffenden Mitgliedstaaten bzw. Teil dieser Mitgliedstaaten vorgeschrieben werden können, können in dem Beschluß gemäß Unterabsatz 1 festgelegt werden."

7. In Anlage E wird am Ende von Buchstabe a) folgender Gedankenstrich hinzugefügt:

„— enzootische Rinderleukose".

8. In Anlage F Muster I:

a) Abschnitt V:

aa) wird nach Buchstabe d) folgender Buchstabe eingefügt:

„e) — sie sind während der letzten zwölf Monate (5) und, wenn sie jünger sind als zwölf Monate, seit ihrer Geburt in einem Rinderbestand gehalten worden, in welchem während der letzten drei Jahre (5) nach Kenntnis des Unterzeichneten sowie nach der Versicherung des Besitzers keine Anzeichen für das Vorliegen enzootischer Rinderleukose festgestellt worden sind (2) (12);

— sie stammen aus einem Bestand, in welchem nichts auf einen Fall von enzootischer Rinderleukose während der letzten drei Jahre hat schließen lassen (2);

— alle zum Zeitpunkt der Untersuchung mehr als vierundzwanzig Monate alten Rinder des Bestandes sind innerhalb der letzten zwölf Monate (5) mit negativem Ergebnis (2) (12) auf enzootische Rinderleukose untersucht worden (13);

— sie haben bei einer innerhalb der vorgeschriebenen Frist von dreißig Tagen (5) durchgeführten Einzeluntersuchungen auf enzootische Rinderleukose negativ reagiert (2) (5) (11);

— sie sind zur Mast bestimmt (2) (11).";

bb) werden die bisherigen Buchstaben e) bis i) zu Buchstaben f) bis j);

b) werden nach der Fußnote 10 folgende Fußnoten hinzugefügt:

„(11) Diese Ausnahme ist nur zugelassen für weniger als dreißig Monate alte männliche Mastrinder, sofern diese Tiere besonders gekennzeichnet sind und im Bestimmungsland einer besonderen Kontrolle unterliegen.

(12) Diese Angabe ist nur für reinrassige Herdbuch-Zuchttiere erforderlich, die ausschließlich zur Zucht bestimmt und sehr wertvoll sind.

(13) Die Einzeluntersuchung wurde nach Anlage G der Richtlinie 64/432/EWG durchgeführt."

9. Anhang G im Anhang zur vorliegenden Richlinie wird angefügt.

Artikel 2

Die Richtlinie 64/432/EWG wird mit Wirkung vom 1. Juli 1990 wie folgt geändert:

1. In Artikel 3 Absatz 2 wird Buchstabe j) gestrichen.

2. In Artikel 3 Absatz 3 erhält Buchstabe d) die nachstehende Fassung; außerdem werden die Buchstaben e) und f) hinzugefügt:

„d) aus einem von enzootischer Rinderleukose freien Bestand nach Artikel 2 Buchstabe s) stammen,

e) — abgesehen von der Voraussetzung nach Buchstabe d) — wenn sie über zwölf Monate alt sind, auf einen Einzeltest nach Anlage G innerhalb von dreißig Tagen vor ihrer Verladung negativ reagiert haben,

f) von den Anforderungen der Buchstaben d) und e) freigestellt sein, wenn es sich um Rinder handelt, die weniger als dreißig Monate alt und für die Fleischerzeugung bestimmt sind, sofern diese Tiere

i) aus einem Bestand stammen, für den während der letzten zwei Jahre kein Fall von enzootischer Rinderleukose gemeldet und bestätigt wurde,

ii) bei der Verladung besonders gekennzeichnet werden und bis zur Schlachtung unter Aufsicht bleiben,

und der Bestimmungsmitgliedstaat alle zweckdienlichen Maßnahmen ergreift, um eine Ansteckung der einheimischen Bestände zu verhindern."

3. Artikel 7 Absatz 1 Abschnitt G wird gestrichen.

4. In Artikel 8 Absatz 2 wird der letzte Unterabsatz gestrichen.

5. Artikel 8a wird gestrichen.

6. In Muster I der Anlage F

— erhält Buchstabe e) folgende Fassung:

„e) — sie sind während der letzten zwölf Monate (5) und, wenn sie jünger als zwölf Monate (5) sind, seit ihrer Geburt in einem von der enzootischen Rinderleukose freien Bestand gehalten worden (2) (11),

— sie haben bei einem innerhalb der vorgeschriebenen Frist von dreißig Tagen (5) durchgeführten Einzeltest (12) auf enzootische Rinderleukose negativ reagiert (2) (11),

— sie sind zur Mast bestimmt (11)."

— erhält Fußnote 11 folgende Fassung:

„(11) Diese Ausnahme ist nur zugelassen für weniger als dreißig Monate alte Mastrinder, sofern diese Tiere

— aus einem Bestand stammen, in dem in den letzten beiden Jahren kein Fall von enzootischer Rinderleukose mitgeteilt und bestätigt worden ist,

— besonders gekennzeichnet sind und im Bestimmungsland einer besonderen Kontrolle unterliegen."

— wird Fußnote 12 gestrichen;

— wird Fußnote 13 zur Fußnote 12.

Artikel 3

(1) Die Mitgliedstaaten führen zur Einstufung ihrer Bestände als frei von enzootischer Rinderleukose ein Programm durch, in dessen Rahmen sie ihre Bestände einem der in Anlage G der Richtlinie 64/432/EWG genannten Tests unterziehen.

(2) Die Mitgliedstaaten unterrichten die Kommission mindestens einmal jährlich über den Ablauf ihres Programms und die damit erzielten Ergebnisse.

Artikel 4

Der Rat legt auf Vorlage der Kommission vor dem 1. Januar 1990 fest, unter welchen Voraussetzungen ein Mitgliedstaat oder Teil eines Mitgliedstaats als frei von der enzootischen Rinderleukose anerkannt werden kann, welche Bedingungen zur Beibehaltung dieses Status erfüllt sein müssen und welche Regelung für den Warenverkehr aus von enzootischer Rinderleukose freien Gebieten oder Mitgliedstaaten gilt.

Artikel 5

Die Mitgliedstaaten erlassen die erforderlichen Vorschriften, um

— den Artikeln 1 und 3 spätestens zum 1. Juli 1988,

— Artikel 2 spätestens am 1. Juli 1990

nachzukommen.

Sie setzen die Kommission unverzüglich davon in Kenntnis.

Artikel 6

Die Richtlinie 80/1102/EWG (1) wird aufgehoben.

Artikel 7

Diese Richtlinie ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

Geschehen zu Luxemburg am 14. Juni 1988

Im Namen des Rates

Der Präsident

I. KIECHLE

(1) ABl. Nr. L 325 vom 1. 12. 1980, S. 18.

ANHANG

„ANLAGE G

TESTS ZUM NACHWEIS DER ENZOOTISCHEN RINDERLEUKOSE

Der Nachweis der enzootischen Rinderleukose wird mit dem Immunodiffusionstest nach Maßgabe der Buchstaben A und B oder mit dem Enzyniummuntest (ELISA) nach Maßgabe des Buchstabens C durchgeführt. Der Immunodiffusionstest wird nur bei Tests an einzelnen Tieren angewandt.

Falls die Ergebnisse der Tests in Frage gestellt werden, wird als ergänzende Kontrolle ein Immunodiffusionstest durchgeführt.

A. Agargel-Immunodiffusionstest zum Nachweis der enzootischen Leukose der Rinder

1. Das bei dem Test zu verwendende Antigen muß Glykoproteine des enzootischen Rinderleukose-Virus enthalten. Das Antigen muß gegen ein Standardserum (E.I.-Serum), das vom State Veterinary Serum Laboratory, Kopenhagen, geliefert wird, geeicht worden sein.

2. Die nachstehend aufgeführten amtlichen Institute sind für die Eichung der Standard-Arbeitsantigens der einzelnen Laboratorien gegenüber dem amtlichen EWG-Standardserum (dem E.I.-Serum, geliefert vom State Veterinary Serum Laboratory, Kopenhagen) verantwortlich:

a) Deutschland:	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen;
b) Belgien:	Institut national de recherches vétérinaires, Bruxelles;
c) Frankreich:	Laboratoire national de pathologie bovine, Lyon
d) Luxemburg:	—
e) Italien:	Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Perugia;
f) Niederlande:	Centraal Diergeneeskundig Instituut, afdeling Rotterdam;
g) Dänemark:	Statens Veterinaere Serum Laboratorium, Kopenhagen;
h) Irland:	Veterinary Research Laboratory, Abbotstown, Dublin;
i) Vereinigtes Königreich:	
1. Großbritannien:	Central Veterinary Laboratory, Weybridge, England,
2. Nordirland:	Veterinary Research Laboratory, Stormont, Belfast,
j) Spanien:	Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Barcelona;
k) Portugal:	Laboratório Nácional de Investigação Veterinária — Lisboa.

3. Die Standard-Arbeitsantigene der einzelnen Laboratorien sind mindestens einmal jährlich dem vorstehend unter Ziffer 2 aufgeführten EWG-Bezugslaboratorium zum Testen gegenüber dem amtlichen EWG-Standardserum einzureichen. Außer dieser Normung kann das verwendete Antigen gemäß Abschnitt B geeicht werden.

4. Folgende Reagenzien werden für den Text benötigt:

   a) Antigen: Es muß spezifische Glykoproteine des enzootischen Rinderleukosevirus enthalten und gegen das amtliche EWG-Serum geeicht worden sein;

   b) das Test-Serum;

   c) als positiv bekanntes Kontrollserum;

   d) Agargel

   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 gefüllt, was eine Agar-Tiefe von 2,6 mm ergibt.

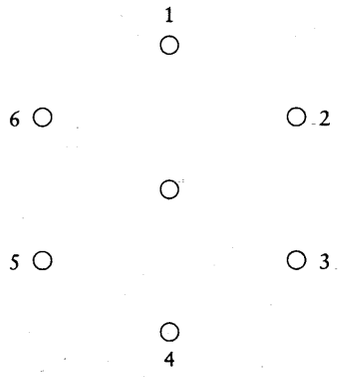
5. In das Agar wird ein Muster aus sieben bis zum Grund der Schale gehenden Löchern, die ohne Feuchtigkeit sein müssen, gestanzt — ein Loch in der Mitte und sechs andere ringsherum.

   Durchmesser des Loches in der Mitte: 4 mm,

   Durchmesser der umgebenden Löcher: 6 mm,

   Abstand zwischen dem Loch in der Mitte und den umgebenden Löchern: 3 mm.

6. In das Loch in der Mitte wird das Standard-Antigen gefüllt. Von den umgehenden Löchern werden 1 und 4 (siehe Zeichnung) mit dem bekannt positiven Serum gefüllt, die Löcher 2, 3, 5 und 6 mit Testserum. Die Löcher sind zu füllen, bis der Schalengrund nicht mehr zu sehen ist.



7. Dies ergibt folgende Mengen an Reagenzien:

Antigen:	32 Mikroliter,
Kontrollserum:	73 Mikroliter,
Testsera:	73 Mikroliter.

8. 72 Stunden lang wird bei Zimmertemperatur (20 bis 27 °C) im geschlossenen Klimaschrank inkubiert.

9. Der Test kann nach 24 und 48 Stunden abgelesen werden; ein endgültiges Ergebnis ist jedoch nicht vor 72 Stunden erhältlich.

   a) Ein Testserum ist positiv, wenn es mit dem Rinderleukosevirus-Antigen eine spezifische Fällungslinie und mit dem Kontrollserum eine Linie vollständiger Identität bildet;

   b) ein Testserum ist negativ, wenn es mit dem Rinderleukosevirus-Antigen keine spezifische Linie bildet und mit der Kontrollserumlinie nicht zusammenfällt;

   c) die Reaktion ist als zweifelhaft zu bewerten, wenn

      i) die Linie mit der Kontrollserums-Linie zum Loch mit dem Rinderleukosevirus-Antigen hin zusammenfällt, dabei aber keine sichtbare Fällungslinie mit dem Antigen bildet,

      oder

      ii) wenn sie weder als negativ noch als positiv gedeutet werden kann.

   Bei zweifelhaftem Ergebnis kann der Test wiederholt, und es kann konzentriertes Serum verwendet werden.

B. Methode zur Antigen-Standardisierung

Benötigte Lösungen und Materialien:

1. 40 ml 1,6 %ige Agarose in 0,05 M TRIS/HCl-Puffer, pH 7,2 mit 8,5 % NaCl.
2. 15 ml eines Rinderleukoseserums, das nur Antikörper gegen Glykoproteine des Rinderleukosevirus enthält; 1:10 verdünnt in 0,05 M TRIS/HCl-Puffer, pH 7,2 mit 8,5 % NaCl.
3. 15 ml eines Rinderleukoseserums, das nur Antikörper gegen Glykoproteine des Rinderleukosevirus enthält, 1:5 verdünnt in 0,05 M TRIS/HCl-Puffer, pH 7,2 mit 8,5 % NaCl.
4. Vier Kunststoff-Petrischalen von 85 mm Durchmesser.
5. Lochstanze von 4 bis 6 mm Durchmesser.
6. Bezugs-Antigen.
7. Das zu normende Antigen.
8. Wasserbad (56 °C).

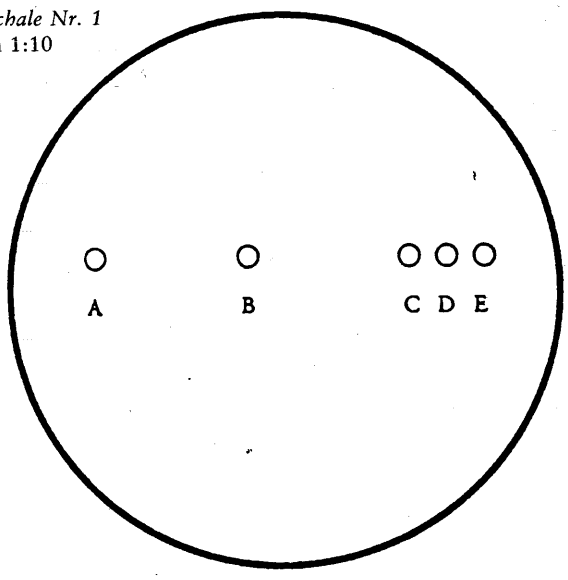
Verfahren:

Die 1,6 %ige Agarose wird im TRIS/HCl-Puffer durch vorsichtiges Erhitzen auf 100 °C aufgelöst. Sie wird dann etwa 1 Stunde lang in das Wasserbad von 56 °C gestellt. Ebenso werden die Rinderleukoseserum-Lösungen in das Wasserbad von 56 °C gestellt.

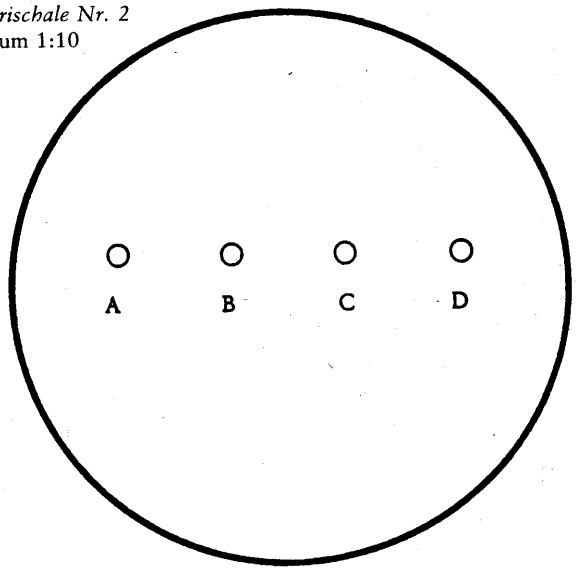
Dann werden 15 ml der Agaroselösung von 56 °C mit 15 ml Rinderleukoseserum-Lösung (1:10) vermischt und schnell geschüttelt; je 15 ml des Gemisches werden in 2 Petrischalen gegossen. Das gleiche Verfahren wird mit der Rinderleukoseserum-Lösung von 1:5 durchgeführt.

Wenn die Agarose hart geworden ist, werden nach folgendem Muster Löcher hineingestanzt:

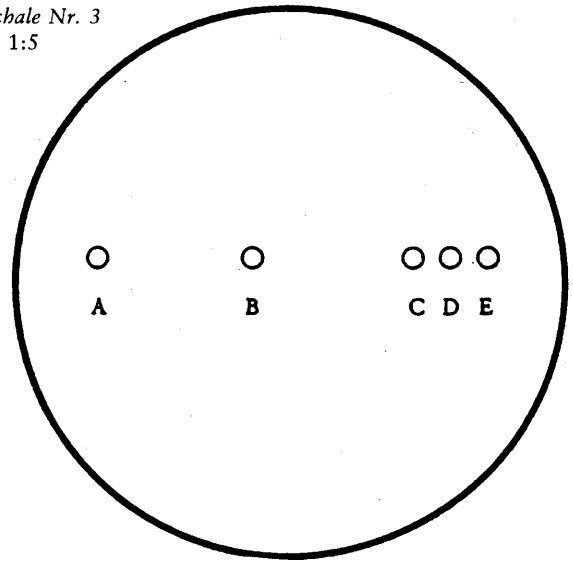
Petrischale Nr. 1
Serum 1:10



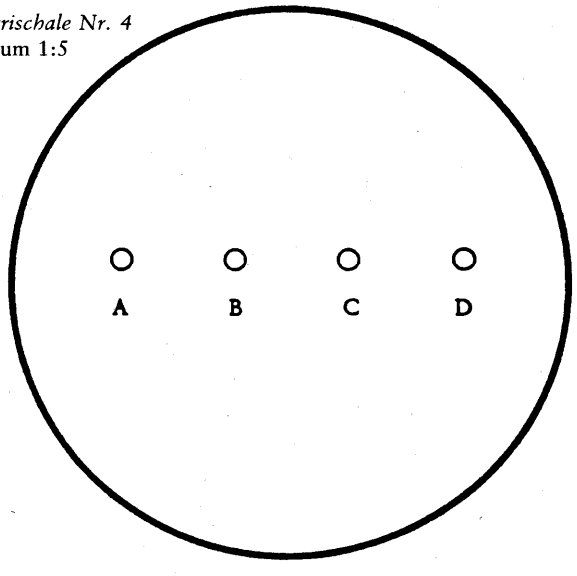
Petrischale Nr. 2
Serum 1:10



Petrischale Nr. 3
Serum 1:5



Petrischale Nr. 4
Serum 1:5



Zusatz des Antigens:

I. Petrischalen 1 und 3

Loch A	— unverdünntes Bezugsantigen,
Loch B	— 1:2 verdünntes Bezugsantigen,
Löcher C und E	— Bezugsantigen,
Loch D	— das zu untersuchende Antigen, unverdünnt;

II. Petrischalen 2 und 4

Loch A	— das zu untersuchende Antigen, unverdünnt,
Loch B	— das zu untersuchende Antigen, 1:2 verdünnt,
Loch C	— das zu untersuchende Antigen, 1:4 verdünnt,
Loch D	— das zu untersuchende Antigen, 1:8 verrdünnt.

Zusätzliche Anweisungen

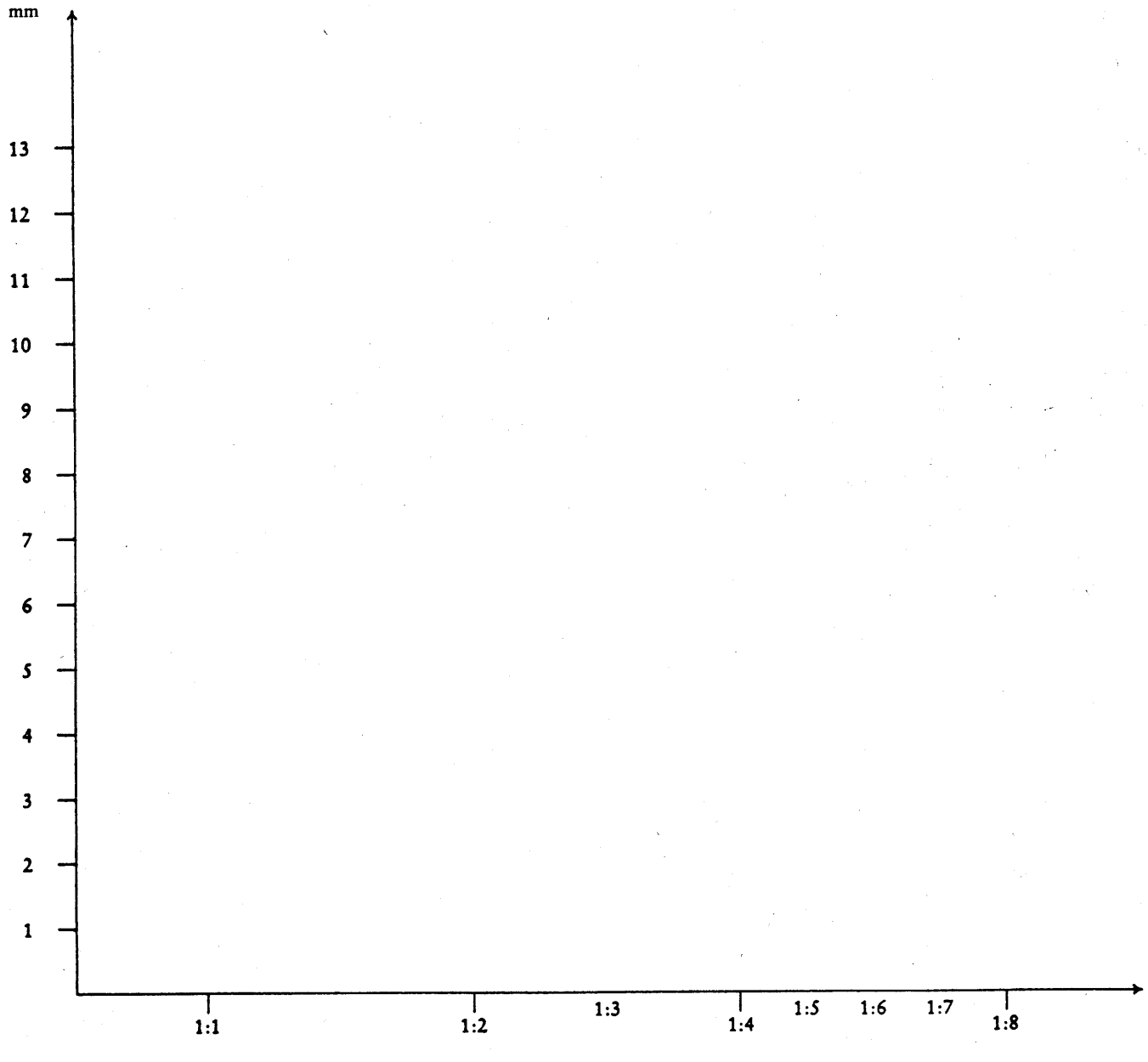
1. Der Versuch ist mit zwei Serumverdünnungen (1:5 und 1:10) auszuführen, um die bestmögliche Fällung zu erzielen.

2. Falls der Fällungsdurchmesser mit beiden Verdünnungen zu klein ist, ist das Serum weiter zu verdünnen.

3. Falls der Fällungsdurchmesser mit beiden Verdünnungen zu groß und zu schwach ist, ist eine schwächere Serumsverdünnung zu verwenden.

4. Die Endkonzentration der Agarose soll 0,8 %, die der Seren 5 bzw. 10 % betragen.

5. Die gemessenen Durchmesser werden in das nachstehende Koordinatensystem eingetragen. Die Lösung des zu testenden Antigens, die den gleichen Durchmesser hat wie das Bezugsantigen, ist die Arbeitslösung.



„C. **Enzymimmuntest (ELISA) für den Nachweis der enzootischen Leukose der Rinder**

1. Für den ELISA-Test werden folgende Materialien und Reagenzien benötigt

   a) Mikroplatten, Küvetten oder ähnliche für die Testphase geeignete Gefäße;

   b) das Antigen wird mit oder ohne Hilfe von poly- oder monoklonalen Antikörpern an die feste Phase gebunden. Ist das Antigen an die feste Phase fixiert, so sind alle Testproben mit positiven Reaktionen erneut auf Kontrollantigene zu testen. Das Kontrollantigen sollte mit dem Antigen identisch sein, außer bei den Antigenen der Rinderleukoseviren. Sind die wandständigen Antikörper an die feste Phase gebunden, so dürften die Antikörper gegen keine anderen Antigene reagieren als auf Antigene gegen Rinderleukoseviren;

   c) die zu untersuchende Probe (Serum oder Milch);

   d) eine positive und negative Kontrolle;

   e) Konjugat: ein biogespaltenes oder enzymmarkiertes Antibovin oder ein biogespaltenes oder enzymmarkiertes Anti-BLV-Immunoglobulin;

   f) Avidin: Enzym für Analysen unter Verwendung von biogespaltenen Immunoglobulin-Präparaten;

   g) ein auf das verwendete Enzym abgestimmte Substrat;

   h) eine Stopplösung;

   i) Pufferlösungen zur Verdünnung der Testproben für die Herstellung der Reagenzien und zum Waschen;

   j) ein Photometer mit passenden Filtern für das gewählte Substrat.

2. *Standardisierung und Empfindlichkeit des Tests*

   Die Empfindlichkeit des Enzymimmuntests muß so hoch sein, daß das E4-Serum positiv reagiert, wenn es zehnmal (Serumproben) bzw. 250 Mal (Milchproben) mehr verdünnt wird als die Lösung, die Einzelproben ergeben, wenn diese in Pools zusammengefaßt werden.

   In Versuchen, in denen Proben (Serum und Milch) einzeln getestet werden, muß das 1 : 10 (im Negativserum) oder 1 : 250 (in Negativmilch) verdünnte E4 positiv reagieren, wenn es in derselben Verdünnung getestet wird, wie sie für Einzelproben gewählt wird.

   Das E4-Serum wird vom National-Veterinary Laboratory, Kopenhagen, geliefert.

3. *Bedingungen für die Anwendung des ELISA-Tests*

   Das ELISA-Verfahren kann bei einer Milchprobe angewandt werden, die der Milchsammlung aus einem Betrieb entnommen worden ist, der mindestens ein Drittel laktierende milchgebende Rinder umfaßt. Die Probe muß sich auf Milch beziehen, die von weniger als 50 Kühen stammt, sowie auf eine Molkekonzentration von gesammelter Milch, die von 20 bis höchstens 50 Kühen stammt; bezieht sich die Milchsammlung auf mehr als 50 Kühe, so muß die Anzahl der Probenahmen anteilig erhöht werden.

   Das ELISA-Verfahren kann auch bei einer Blutprobe angewandt werden, die von höchstens 50 Tieren stammt.

   Wird von einer dieser Möglichkeiten Gebrauch gemacht, so sind Maßnahmen zu treffen, mit denen die Verbindung zwischen den entnommenen Proben und den Tieren, von denen die untersuchte Milch oder die Seren stammen, sichergestellt wird.

   Zeigt sich bei einer der Proben eine positive Reaktion, so ist der Bestand so lange amtlich zu überwachen, bis sich ein negativer Befund in mindestens zwei Einzeltests ergibt, die im Abstand von wenigstens vier Monaten bei allen mehr als sechs Monaten alten Rindern nach den vorgenannten Bestimmungen in einem Labor durchgeführt wurden, das unter der unmittelbaren Aufsicht eines unter Buchstabe A aufgeführten Instituts steht."