

## **Richtlinien der Landwirtschaftskammer Rheinland-Pfalz über die Durchführung der amtlichen Prüfung von Rebenbeständen auf Viren nach Nr. 2 der Anlage 1 zur RebenpflanzgutV**

### **1. Einführung:**

- 1.1 Die Landwirtschaftskammer Rheinland-Pfalz ist aufgrund von § 1 Nr. 3 der Landesverordnung über saatgutrechtliche Zuständigkeiten vom 09. November 1993 (GVBl. S. 531) zuletzt geändert durch Verordnung vom 14. Januar 2005 (GVBl. S. 16) BS 7822-1, in Verbindung mit § 2 Nr. 13 des Saatgutverkehrsgesetzes in der Fassung vom 16. Juli 2004 (BGBl. I S. 1673) zuletzt geändert durch Artikel 2 der Verordnung vom 21. Oktober 2005 (BGBl. I S. 3013) Anerkennungsstelle in Sinne der Rebenpflanzgutverordnung (RebenpflanzgutV).
- 1.2 Anlage 1 zur RebenpflanzgutV regelt die Anforderungen an den Rebenbestand. Nach Nr. 2.2 bis 2.6 ist in den Rebenbeständen zu den dort näher geregelten Zeitpunkten eine amtliche Prüfung auf Viren durchzuführen. Abschnitt 2 dieser Richtlinie regelt Einzelheiten über die Durchführung der amtlichen Prüfung.
- 1.3 Die Landwirtschaftskammer setzt bei der Umsetzung der amtlichen Virenprüfungen auf größtmögliche Eigenverantwortung der Antragsteller/innen. Diese sollen in die Lage versetzt werden, die Prüfungen in Kooperation mit der Anerkennungsstelle flexibel und unabhängig selbst zu veranlassen.
- 1.4 Die Landwirtschaftskammer bedient sich für die amtliche Prüfung eigens dafür zugelassener Privatpersonen zur Probenahme (zugelassene Probenehmer/innen) sowie amtlicher Untersuchungsstellen und zugelassener privater Labore. Einzelheiten zur Zulassung der Probenehmer und Labore regeln die Abschnitte 3 und 4 dieser Richtlinie.
- 1.5 Amtliche Untersuchungsstellen im Sinne dieser Richtlinie sind das Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinland-Pfalz, die Forschungsanstalt Geisenheim und das Weinbauinstitut Freiburg.

### **2. Durchführung der amtlichen Prüfung**

- 2.1 Die amtliche Prüfung erfolgt durch die Probenahme und eine darauffolgende Laboruntersuchung. Die Probenahme wird dabei nach den Vorgaben der amtlichen Untersuchungsstellen zur Probennahme (Anlage 1 dieser Richtlinien) durchgeführt.
- 2.2 Die Probenehmer/innen haben für jede beprobte Vermehrungsanlage ein amtliches Probenahmeprotokoll (Anlage 2) auszufüllen. Die Probe ist sodann mit dem Protokoll an eine amtliche Untersuchungsstelle oder ein zugelassenes Labor zu senden. Der Anerkennungsstelle und dem/der Antragsteller/in ist eine Zweitschrift des Probenahmeprotokolls zuzuleiten.  
Die Anerkennungsstelle führt eine Liste zugelassener Probenehmer/innen und Labore.
- 2.3 Bei der Laboruntersuchung wird die Probe auf die in Nr. 2.1 der Anlage 1 zur RebenpflanzgutV genannten Viren untersucht. Die amtliche Untersuchungsstelle bzw. das zugelassene Labor informiert auch die Anerkennungsstelle über das Untersuchungsergebnis.
- 2.4 Die Anerkennungsstelle erhebt für die Probenahme Gebühren nach Abschnitt 1.4.1.12 der Landesverordnung über die Gebühren der landwirtschaftlichen Verwaltung (Besonderes Gebührenverzeichnis) und Auslagen nach § 10 des Landesgebührengesetzes. Zu den Auslagen gehören insbesondere die Wegstreckenentschädigung der Probenehmer/innen.

### **3. Zur Probenahme zugelassene Privatpersonen**

- 3.1 Die Probenahme wird von Personen, die von der Anerkennungsstelle zur Probenahme zugelassen worden sind, durchgeführt. Die Zulassung erfolgt widerruflich für die Dauer von höchstens fünf Jahren, eine erneute Zulassung ist möglich.

- 3.2 Bei der Zulassung sind die Probenehmer/innen zur gewissenhaften Erfüllung ihrer Aufgabe und zur Beachtung der einschlägigen Vorschriften, insbesondere Abschnitt 2 dieser Richtlinien sowie die dazugehörigen Anlagen, zu verpflichten. Die Anerkennungsstelle bildet die Probenehmer/innen aus und ist für deren Weiterbildung verantwortlich. Die Probenehmer/in erhält mit der Zulassung eine Abschrift der Vorgaben der amtlichen Untersuchungsstellen zur Probenahme (Anlage 1). Die Anerkennungsstelle informiert die zugelassenen Probenehmer/innen unverzüglich über Änderungen der Vorgaben.
- 3.3 Es dürfen nur Personen zugelassen werden, welche die erforderliche persönliche Zuverlässigkeit und die fachliche Befähigung für diese Aufgabe besitzen.
- 3.4 Die Probenehmer/innen tragen Sorge für eine unter Beachtung der einschlägigen Vorschriften gewissenhafte Erledigung ihrer Arbeiten, die im Rahmen der Probenahmetätigkeit von ihnen selbst oder unter ihrer Aufsicht durchgeführt werden. Sie haben die in Ausübung und bei Gelegenheit ihrer Tätigkeit wahrgenommenen Betriebs- und Geschäftsvorgänge geheim zu halten.
- 3.5 Die Anerkennungsstelle sorgt für eine angemessene Überwachung der Tätigkeit der zugelassenen Probenehmer/innen.
- 3.6 Für die Zulassung erhebt die Anerkennungsstelle pro Person eine Gebühr in Höhe von 25 € nach Nr. 4.3 der Landesverordnung über die Gebühren und für Amtshandlungen allgemeiner Art (allgemeines Gebührenverzeichnis).
- 3.7 Die Anerkennungsstelle kann bei Probenehmer/innen, die nachhaltig gegen wesentliche Bestimmungen dieser Richtlinie oder anderer relevanter rechtlicher Bestimmungen verstoßen, die Zulassung widerrufen. Hierauf ist im Zulassungsbescheid hinzuweisen. Den Beauftragten ist vorher Gelegenheit zur Stellungnahme zu geben. Für die Rücknahme und den Widerruf der Zulassung gelten § 1 Abs. Landesverwaltungsverfahrensgesetz (LVwVfG) in Verbindung mit §§ 48, 49 Verwaltungsverfahrensgesetz (VwVfG).
- 3.8 Die zugelassenen Probenehmer/innen erhalten für ihre Tätigkeit eine Aufwandsentschädigung sowie eine Wegstreckenentschädigung. Die Aufwandsentschädigung entspricht der Gebühr für die Probenahme nach Nr. 2.4 dieser Richtlinie. Die Wegstreckenentschädigung richtet sich nach der in der Landesverordnung über die Wegstrecken- und Mitnahmeentschädigung nach § 6 des Landesreisekostengesetzes vom 7. Dezember 1999 (GVBl. S. 444) in der jeweils geltenden Fassung für anerkannt privateigene Kraftfahrzeuge festgesetzten Kilometervergütung.
- 3.9 Die Probenehmer/innen werden ermächtigt, die Gebühren und die Wegstreckenentschädigung als Auslagen im Sinne von 2.4 dieser Richtlinie für die Anerkennungsstelle einzuziehen. Mit dem Einzug erlischt der Anspruch der Probenehmer/innen nach Nr. 3.8 Satz 1.

#### **4. Zugelassene Labore**

- 4.1 Neben den amtlichen Untersuchungsstellen lässt die Landwirtschaftskammer private Labore zur Durchführung der Virustests zu. Die Zulassung erfolgt schriftlich auf formlosen Antrag und kann – auch nachträglich - inhaltlich beschränkt oder mit Auflagen verbunden werden.
- 4.2 Es dürfen nur Labors zugelassen werden, die über hinreichend qualifiziertes Fachpersonal und eine ausreichende Laboreinrichtung verfügen. Näheres zu den Voraussetzungen regeln die amtlichen Untersuchungsstellen in entsprechenden Vorgaben (Anlage 3). Die Anerkennungsstelle holt vor der Zulassung die fachliche Stellungnahme des Dienstleistungszentrums Ländlicher Raum - Rheinpfalz ein.

4.3 Zugelassene Labore sind dazu verpflichtet,

1. die Untersuchung neutral nach den international üblichen Verfahren durchzuführen
2. der Anerkennungsstelle und dem Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum - Rheinpfalz jederzeit die Besichtigung der Laborräume und die Einsichtnahme in die Testprotokolle zu ermöglichen
3. die Untersuchung nur in ihren eigenen, zugelassenen Laborräumen durch eigenes Personal durchzuführen. Ausnahmen hiervon können zugelassen werden.

Diese Pflichten sind als Auflagen in den Zulassungsbescheid aufzunehmen.

4.4 Die Anerkennungsstelle erhebt für die Zulassung pro Labor eine Gebühr (in Höhe von 51,50 Euro) nach Nr. 4.3 der Landesverordnung über die Gebühren für Amtshandlungen allgemeiner Art (Allgemeines Gebührenverzeichnis).

4.5 Die Anerkennungsstelle überprüft die zugelassenen Labore regelmäßig anhand von Blindproben aus gesunden und kranken Reben und nimmt Einsicht in die Testprotokolle.

4.6 Rücknahme und Widerruf der Zulassung richten sich nach §§ 1 Abs. 1 LVwVfG i.V.m. 48, 49 VwVfG.

## **Vorgaben der amtlichen Untersuchungsstellen zur Probenahme**

### **1. Allgemeines**

Die Probenahme muss so nachvollziehbar sein, dass bei einem positiven Befund eindeutig erkennbar ist, wo die jeweilige Probe gezogen wurde. Eine erneute Testung der positiven Mischproben durch Tests der entsprechend gekennzeichneten Einzelstöcke ist notwendig.

### **2. Probenahme**

#### **2.1. Vorstufenanlage:**

- zu testen sind alle Pflanzen einer Anlage
- Mischproben von 4-5 Stöcken (1 Stickellänge)

#### **2.2. Basisanlage:**

- zu testen sind alle Pflanzen einer Anlage
- Mischproben von je 10 Pflanzen

#### **2.3. Z-Anlage:**

- stichprobenartige Tests der Anlage
- Größe der Stichprobe
  - Mindestens jeder 20. Stock, unabhängig von der Größe der Fläche
  - Bei kleinen Untersuchungsflächen mindestens 1 Probe
  - Mischproben von je 10 Pflanzen

#### **2.4. Probematerial:**

- Sowohl Blattproben als auch Holzproben sind zulässig
  
- Bei Untersuchung von **Blattproben:**
  - Zeitpunkt der Probennahme: Juli
  - je 1 Blatt/Stock aus dem Traubenbereich (3. – 8. Blatt von der Triebbasis aus)
  - Blätter mit Stiel entnehmen und übereinander legen
  - Blätter einer Mischprobe in eine mit der Probennummer beschriftete Plastiktüte geben und diese verschließen
  - Probennahme auf keinen Fall bei hohen Temperaturen (> 28 °C) und intensiver Sonneneinstrahlung durchführen
  - Entnommene Proben in einer Kühltasche lagern bzw. in einem kühlen Keller und umgehend an das untersuchende Labor weiterleiten
  
- Bei Untersuchung von **Holzproben:**
  - Zeitpunkt der Probennahme: ab November
  - pro Pflanze je ein 20-30 cm langes Teil des einjährigen, ausgereiften Holzes (mittlerer Bereich)
  - Hölzer einer Mischprobe bündeln, in eine mit der Probennummer beschriftete Plastiktüte geben und diese verschließen
  - entnommene Proben bis zur Weiterleitung an das untersuchende Labor kühl lagern

**Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum – Rheinpfalz  
Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstrasse**

**Vorgaben der amtlichen Untersuchungsstellen für die Zulassung von Privatlaboren zur Durchführung der Virentests nach der Rebenpflanzgutverordnung**

Nach der Richtlinie 2005/43/EG der Kommission vom 23. Juni 2005 ist künftig eine regelmäßige amtliche Überprüfung von Mutterrebenbeständen in einem international anerkannten Testverfahren auf Virusbefall durchzuführen und zu bescheinigen, dass in dem überprüften Bestand ein Befall mit GFLV, ArMV (beide Viren sind Verursacher des Komplexes der Reisigkrankheit), GLRaV-1 und -3 (beide Viren sind Verursacher der Blattrollkrankheit) nicht nachzuweisen sind.

Um das erwartete große Probenaufkommen bewältigen zu können, soll es privaten Testlaboren als amtlich anerkannte Labore ermöglicht werden, neben den amtlichen Untersuchungsstellen diese Tests durchzuführen. Dabei müssen vorab die Bedingungen geprüft werden, die eine ordnungsgemäße Arbeitsweise gewährleisten.

**1. Allgemeine Voraussetzungen für die Zulassung**

- Das Labor arbeitet nach den Grundsätzen der guten fachlichen Praxis.
- Die Ergebnisse der Virustestungen werden aus phytosanitären Gründen den amtlichen Stellen zur Verfügung gestellt.

**2. Technische Voraussetzungen für die Zulassung**

Das Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum – Rheinpfalz Neustadt/W. (DLR – Rheinpfalz), das Staatl. Weinbauinstitut, Freiburg/Br. (WBI) und die Forschungsanstalt Geisenheim (FA Geisenheim) sind sich als amtliche Untersuchungsstellen einig, dass die erforderlichen Tests als serologische Virustests durchgeführt werden sollen.

Es muss gewährleistet sein, dass

- die notwendigen Testkits mit Seren eingeführter Serumhersteller verwendet werden, für die bereits Erfahrungen mit Reben vorliegen. Positiv- und Negativ-Kontrollen müssen den Privatlaboren von den amtlichen Stellen zur Verfügung gestellt werden
- die Testverfahren mit dem amtlichen Stellen abgestimmt werden, Positiv- und Negativkontrollen sind unbedingt einzubeziehen
- die Tests photometrisch ausgewertet und die Ergebnisse dokumentiert werden
- die angelieferten Proben ordnungsgemäß gelagert werden können (Kühlschrank bzw. Kühlraum)
- Restmengen der Proben nach der Aufarbeitung bis zum Abschluss des Anerkennungsverfahrens ordnungsgemäß gelagert werden
- als Probematerial Holz bzw. Blätter verwendet werden
- die Aufarbeitung des Probematerials nach einer der unter Nr. 4 dargestellten Methoden erfolgt
- aufgearbeitete Proben bis zum Abschluss des Anerkennungsverfahrens im Gefrierschrank aufbewahrt werden.

Über den Ablauf des Verfahrens ist ein Testprotokoll vorzulegen, in dem die Verarbeitungsschritte und die verwendeten Materialien und Reagenzien von der Aufarbeitung bis zur Testauswertung aufgeführt sind.

**Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum – Rheinpfalz  
Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstrasse**

### **3. Laufende Kontrollen**

Mindestens im Abstand von 2 Jahren werden folgende Kontrollen durchgeführt:

- Überprüfung des ELISA-Testes anhand von Blindproben aus gesunden und kranken Reben, die die amtlichen Stellen zur Verfügung stellen
- Einsicht in die Testprotokolle
- Absprachen über neue Methoden, Verfahren, Seren, Diskussion von Ergebnissen

### **4. Aufarbeitung des Probenmaterials für die Serologie**

Die Aufarbeitung der Proben soll mit den in den Untersuchungsstellen üblichen Methoden durchgeführt werden.

#### **4.1. Methode DLR Rheinpfalz, Neustadt/W.**

##### 4.1.1. Aufarbeitung von Blattproben:

- Blätter so übereinander legen, dass aus jeder Blattspreite gleichgroße Stücke entnommen werden können
- darauf achten, dass jedes Blatt erfasst wird
- Blattmaterial wiegen
- 10 ml Extraktionspuffer für 1 g Blattmaterial
- Blattmaterial mit Puffer homogenisieren

##### 4.1.2. Aufarbeitung von Holzproben (Methode DLR Rheinpfalz):

- Rinde der einjährigen Triebe abschälen
- jeweils 0,1 g Phloemschabel pro Trieb (d.h. von einer Rebe)
- → 1 g Mischprobe bei 10 Pflanzen
- Schabel mit flüssigem Stickstoff im Mörser pulverisieren
- sofort mit Extraktionspuffer versetzen
- 10 ml Extraktionspuffer für 1 g Phloemschabel

##### 4.1.3. Serologischer Test zum Nachweis der gewünschten Rebviren

Durchführung gemäß Anleitung der Antisera-Hersteller

##### 4.1.4. Auswertung

Die Testplatten werden photometrisch ausgewertet unter Einbeziehung von Positiv-, Negativ- und Pufferproben.

#### **4.2. Methode WBI Freiburg**

##### 4.2.1. Aufarbeitung von Blattproben:

- Blätter so übereinander legen, dass aus jeder Blattspreite gleichgroße Stücke mit Hilfe eines Stanzers (ca. 2 cm Durchmesser) entnommen werden können
- darauf achten, dass jedes Blatt erfasst wird
- 20 Blattscheiben ergeben etwa 1g
- 9 ml Extraktionspuffer für 1 g Blattmaterial Verdünnung 1:10
- Blattmaterial mit Puffer homogenisieren

##### 4.2.2. Aufarbeitung von Holzproben :

- Holzscheiben von 1 jährigem Holz aus 4-5 verschiedenen Ruten schneiden
- → 1 g Holz mit 9 ml Extraktionspuffer versetzen
- Schabel im Extraktionsbeutel mit dem Gummihammer aufspalten und dann mit dem Homogenisator aufarbeiten
- Bisher keine Mischproben

**Puffer werden nach Angaben der Firma Bioreba angesetzt  
Durchführung des ELISA nach Angaben der Firma Bioreba !**

**Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum – Rheinland-Pfalz**  
**Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstraße**

### **4.3. Methode FA Geisenheim**

#### 4.3.1. Aufarbeiten von Holzproben

- einjähriges Holz in Scheiben schneiden und ca. 0,5 g einwiegen ( Scheiben sollten ca. 2 mm dick sein )
- alle Holzstücke müssen bei Mischproben in die Probe mit einbezogen werden. Eventuell Scheiben etwas dünner schneiden oder mehr Puffer zusetzen ( 1 / 10 w/v )
- Mit 5 ml Puffer versetzen und anschließend im Extraktionsbeutel ( Fa. Bioreba AG ) mit einem Kunststoffhammer vorzerkleinern.
- Anschließend im TECAN-Homogenisator (HOMEX) für 20 – 30 Sekunden homogenisieren.
- Probe kann jetzt direkt auf die Platte aufgetragen werden, ist aber im Kühlschrank auch für mind. 1 Woche haltbar ohne Aktivitätsverlust.
- Weitere Bearbeitung nach Vorschrift des Serumherstellers

#### 4.3.2. Aufarbeiten von Blattproben

- entnommene Blattproben möglichst frisch verarbeiten.
- Im Verhältnis 1/10 mit Extraktionspuffer versetzen und im Homex homogenisieren.
- Anschließend aufpipettieren auf die Testplatten.
- Weiteres Vorgehen entsprechend den Vorgaben des Serumherstellers.

#### 4.3.3. Auswertung

- photometrische Auswertung im 2-strahl Reader 405 / 460 nm
- immer gesunde und kranke Kontrolle mitführen.
- Ab dem 2-fachen Wert des Mittelwertes der gesunden Kontrolle ist die Probe als krank zu betrachten. In besonderen Fällen – je nach Platte – kann die Grenze auch tiefer angenommen werden.

Die Readerergebnisse sind zu speichern und müssen jederzeit nachvollziehbar sein.