

**ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 535/2002 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**  
**της 21ης Μαρτίου 2002**  
**για την τροποποίηση του παραρτήματος Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ του Συμβουλίου και την τροποποίηση της απόφασης 2000/330/ΕΚ**

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

την οδηγία 64/432/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 26ης Ιουνίου 1964, περί προβλημάτων υγειονομικού ελέγχου τα οποία επηρεάζουν το ενδοκοινοτικό εμπόριο βοοειδών και χοιροειδών<sup>(1)</sup>, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την απόφαση 2001/298/ΕΚ της Επιτροπής<sup>(2)</sup>, και ιδίως το άρθρο 16 παράγραφος 1 δεύτερο εδάφιο,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Στις 11 Οκτωβρίου 1999 η επιστημονική επιτροπή για την υγεία και την ορθή μεταχείριση των ζώων ενέκρινε έκθεση<sup>(3)</sup> σχετικά με την τροποποίηση των τεχνικών παραρτημάτων της οδηγίας του Συμβουλίου 64/432/ΕΟΚ προκειμένου να ληφθούν υπόψη οι επιστημονικές εξελίξεις σχετικά με τη φυματίωση, τη βρουκέλωση και την ενζωτική λεύκωση των βοοειδών.
- (2) Σύμφωνα με την ανωτέρω έκθεση, οι δοκιμές για τη βρουκέλωση πρέπει να εκτελούνται σύμφωνα με το εγχειρίδιο προτύπων για τις διαγνωστικές δοκιμές και τα εμβόλια, τρίτη έκδοση του 1996, του διεθνούς γραφείου επιζωοτιών (ΔΓΕ).
- (3) Τον Αύγουστο του 2001 το διεθνές γραφείο επιζωοτιών δημοσίευσε την τέταρτη έκδοση του 2000 του εν λόγω εγχειριδίου, η οποία περιλαμβάνει ορισμένες τροποποιήσεις στην περιγραφή των δοκιμών για τη βρουκέλωση.
- (4) Κατέστη συνεπώς αναγκαία η τροποποίηση του παραρτήματος Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ προκειμένου να καθοριστούν διαδικασίες δοκιμών εφαρμόσιμες για σκοπούς επιτήρησης και για εμπορικούς σκοπούς εντός της Κοινότητας, οι οποίες να ανταποκρίνονται όσο το δυνατό περισσότερο στα πρότυπα του ΔΓΕ λαμβάνοντας παράλληλα υπόψη τις συμβουλές της επιστημονικής επιτροπής και των εθνικών εργαστηρίων αναφοράς των κρατών μελών, τα οποία συνερ-

γάζονται στο πλαίσιο του δικτύου της Ευρωπαϊκής Ένωσης των εθνικών εργαστηρίων αναφοράς για τη βρουκέλωση.

- (5) Η απόφαση 2000/330/ΕΚ της Επιτροπής, της 18ης Απριλίου 2000, για την έγκριση των δοκιμών για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά της βρουκέλωσης των βοοειδών στο πλαίσιο της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ<sup>(4)</sup> πρέπει να τροποποιηθεί αναλόγως.
- (6) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης κτηνιατρικής επιτροπής,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

*Άρθρο 1*

Το παράρτημα Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ αντικαθίσταται από το παράρτημα του παρόντος κανονισμού.

*Άρθρο 2*

Η απόφαση 2000/330/ΕΚ τροποποιείται ως εξής:

1. Το άρθρο 1 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

*«Άρθρο 1*

Η δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος, οι δοκιμές βρουκελικού αντιγόνου εντός ρυθμιστικού διαλύματος και οι δοκιμές ELISA οι οποίες εκτελούνται όπως προβλέπεται στο παράρτημα Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ εγκρίνονται για σκοπούς πιστοποίησης.»

2. Το παράρτημα απαλείφεται.

*Άρθρο 3*

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την εικοστή ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

Βρυξέλλες, 21 Μαρτίου 2002.

Για την Επιτροπή  
David BYRNE  
Μέλος της Επιτροπής

<sup>(1)</sup> ΕΕ 121 της 29.7.1964, σ. 1977/64.

<sup>(2)</sup> ΕΕ L 102 της 12.4.2001, σ. 63.

<sup>(3)</sup> SANCO/B3/R10/1999.

<sup>(4)</sup> ΕΕ L 114 της 13.5.2000, σ. 37.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## «ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

## ΒΡΟΥΚΕΛΩΣΗ

## 1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Όταν με τροποποιημένη οξείαντοχη ή ανοσοειδική χρώση αποδεικνύεται η παρουσία οργανισμών της μορφολογίας της *Brucella* σε υλικό αποβολής, σε κολπικές εκκρίσεις ή στο γάλα, τεκμαίρεται βρουκέλωση, ιδίως εάν υποστηρίζεται από ορολογικές δοκιμές.

Μετά από απομόνωση των μικροοργανισμών, προσδιορίζεται το είδος και ο βióτυπος, με λύση φάγων ή/και οξειδωτικές δοκιμές μεταβολισμού, με κριτήρια βιοχημικά, ορολογικά ή των καλλιεργειών.

Οι τεχνικές και τα μέσα που χρησιμοποιούνται, η τυποποίησή τους και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να συμφωνούν με τα προσδιοριζόμενα στο εγχειρίδιο προτύπων για διαγνωστικές δοκιμές και εμβόλια του ΔΓΕ, τέταρτη έκδοση του 2000, κεφάλαιο 2.3.1 (βρουκέλωση βοοειδών), κεφάλαιο 2.4.2 (βρουκέλωση αιγοπροβάτων) και κεφάλαιο 2.6.2 (βρουκέλωση χοιροειδών).

## 2. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

## 2.1. Πρότυπα

2.1.1. Με τα στελέχη Weybridge αριθ. 99 ή USDA 1119-3 του *biovar 1* του *Brucella abortus* πρέπει να παρασκευάζονται όλα τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή ερυθρού της Βεγγάλης (Rose Bengal)(RBT), στη δοκιμή συγκόλλησης ορού (SAT), στη δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος (CFT) και στη δακτυλοειδή δοκιμή στο γάλα (MRT).

2.1.2. Ο τυποποιημένος ορός αναφοράς για τις ανωτέρω δοκιμές είναι ο διεθνής πρότυπος ορός αναφοράς του ΔΓΕ (OIEISS), ο οποίος παλαιότερα καλούνταν δεύτερος διεθνής ορός κατά της *B.abortus* της ΠΟΥ (ISAbS).

2.1.3. Οι πρότυποι οροί αναφοράς για τις δοκιμές ELISA είναι:

- ο διεθνής πρότυπος ορός του ΔΓΕ (OIEISS),
- ο “ασθενώς θετικός” πρότυπος ορός για την ELISA του ΔΓΕ (OIEELISA<sub>WP</sub>SS),
- ο “ισχυρώς θετικός” πρότυπος ορός για την ELISA του ΔΓΕ (OIEELISA<sub>SP</sub>SS),
- ο “αρνητικός” πρότυπος ορός για την ELISA του ΔΓΕ (OIEELISA<sub>N</sub>SS).

2.1.4. Οι ανωτέρω αναφερόμενοι πρότυποι οροί διατίθενται από το Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, Ηνωμένο Βασίλειο.

2.1.5. Οι πρότυποι οροί OIEISS, OIEELISA<sub>WP</sub>SS, OIEELISA<sub>SP</sub>SS και OIEELISA<sub>N</sub>SS είναι διεθνή πρωτογενή πρότυπα από τα οποία πρέπει να καθιερωθούν δευτερογενή εθνικά πρότυπα αναφοράς (“πρότυπα εργασίας”) για κάθε δοκιμή σε κάθε κράτος μέλος.

## 2.2. Ενζυμοσύνδετες ανοσοπροσροφητικές δοκιμές (ELISAs) ή άλλες δοκιμές σύνδεσης για την ανίχνευση της βουοειδούς βρουκέλωσης στον ορό ή στο γάλα

## 2.2.1. Υλικό και αντιδραστήρια

Η χρησιμοποιούμενη τεχνική και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να έχουν αξιολογηθεί σύμφωνα με τις αρχές που καθορίζονται στο κεφάλαιο 1.1.3 της τέταρτης έκδοσης του 2000 του εγχειριδίου προτύπων για διαγνωστικές δοκιμές και εμβόλια του ΔΓΕ και πρέπει τουλάχιστον να περιλαμβάνουν εργαστηριακές και διαγνωστικές μελέτες.

## 2.2.2. Τυποποίηση της δοκιμής

2.2.2.1. Τυποποίηση της διαδικασίας δοκιμής για μεμονωμένα δείγματα ορού:

- α) προαραίωση 1/150 του OIEISS <sup>(1)</sup> ή προαραίωση 1/2 του OIEELISA<sub>WP</sub>SS ή προαραίωση 1/16 του OIEELISA<sub>SP</sub>SS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) πρέπει να δίνουν θετική αντίδραση.
- β) προαραίωση 1/600 του OIEISS ή προαραίωση 1/8 του OIEELISA<sub>WP</sub>SS ή προαραίωση 1/64 του OIEELISA<sub>SP</sub>SS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) πρέπει να δίνουν αρνητική αντίδραση.

<sup>(1)</sup> Για τους σκοπούς του παρόντος παραρτήματος, οι αναφερόμενες διαλύσεις για τη σύσταση υγρών αντιδραστηρίων εκφράζονται ως, παραδείγματος χάριν, 1/150 το οποίο σημαίνει διάλυση 1 προς 150.

- γ) ο OIEELISA<sub>N</sub>SS πρέπει να δίνει πάντα αρνητική αντίδραση.
- 2.2.2.2. Τυποποίηση της διαδικασίας δοκιμής για δείγματα ορού προερχόμενα από συνένωση δειγμάτων:
- α) προαραίωση 1/150 του OIEISS ή προαραίωση 1/2 του OIEELISA<sub>WP</sub>SS ή προαραίωση 1/16 του OIEELISA<sub>SP</sub>SS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) που αραιώνονται εκ νέου σε αρνητικό ορό, κατά τον αριθμό δειγμάτων που απαρτίζουν το συνενωμένο δείγμα, πρέπει να δίνουν θετική αντίδραση·
- β) ο OIEELISA<sub>N</sub>SS πρέπει να δίνει πάντα αρνητική αντίδραση·
- γ) η δοκιμή πρέπει να είναι ικανή να ανιχνεύσει την παρουσία μόλυνσης σε μεμονωμένο ζώο της ομάδας των ζώων, της οποίας έχουν συνενωθεί τα δείγματα ορού.
- 2.2.2.3. Τυποποίηση της διαδικασίας δοκιμής για συνενωμένα δείγματα γάλακτος ή ορού γάλακτος:
- α) προαραίωση 1/1 000 του OIEISS ή προαραίωση 1/16 του OIEELISA<sub>WP</sub>SS ή προαραίωση 1/125 του OIEELISA<sub>SP</sub>SS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) και εκ νέου αραιώση 1/10 σε αρνητικό γάλα πρέπει να δίνουν θετική αντίδραση·
- β) το OIEELISA<sub>N</sub>SS αραιωμένο σε 1/10 σε αρνητικό γάλα πρέπει πάντα να δίνει αρνητική αντίδραση·
- γ) η δοκιμή πρέπει να είναι ικανή να ανιχνεύσει την παρουσία μόλυνσης σε μεμονωμένο ζώο της ομάδας των ζώων, της οποίας έχουν συνενωθεί τα δείγματα γάλακτος ή ορού γάλακτος.
- 2.2.3. Προϋποθέσεις για τη χρησιμοποίηση των ELISA για διάγνωση βρουκέλλωσης στα βοοειδή:
- 2.2.3.1. Χρησιμοποιώντας τους προαναφερθέντες όρους βαθμονόμησης για δοκιμές ELISA σε δείγματα ορού, η διαγνωστική ευαισθησία της ELISA είναι ίση ή μεγαλύτερη από αυτήν της δοκιμής ερυθρού της Βεγγάλης (RBT) ή της δοκιμής σύνδεσης του συμπληρώματος (CFT) λαμβάνοντας υπόψη την επιδημιολογική κατάσταση υπό την οποία χρησιμοποιείται.
- 2.2.3.2. Χρησιμοποιώντας τους προαναφερθέντες όρους βαθμονόμησης για ELISA στα συνενωμένα δείγματα γάλακτος, η διαγνωστική ευαισθησία της ELISA είναι ίση ή μεγαλύτερη από αυτήν της δακτυλιοειδούς δοκιμής στο γάλα λαμβάνοντας υπόψη όχι μόνο την επιδημιολογική κατάσταση αλλά και τα μέσα και προβλεπόμενα ακραία συστήματα εκτροφής.
- 2.2.3.3. Όπου οι δοκιμές ELISA χρησιμοποιούνται για σκοπούς πιστοποίησης σύμφωνα με την παράγραφο 1 του άρθρου 6 ή για την καδιέρωση και τη διατήρηση του επίσημου χαρακτηρισμού ενός κοπαδιού σύμφωνα με το σημείο 10 της παραγράφου II του παραρτήματος Α, η συνένωση των δειγμάτων ορού πρέπει να εκτελείται κατά τέτοιο τρόπο ώστε τα αποτελέσματα των δοκιμών να σχετιστούν με αδιαμφισβήτητο τρόπο με κάθε μεμονωμένο ζώο του οποίου το δείγμα περιλήφθηκε στο συνενωμένο δείγμα. Οποιαδήποτε δοκιμή επιβεβαίωσης πρέπει να εκτελείται σε δείγματα ορού που λαμβάνονται από μεμονωμένα ζώα.
- 2.2.3.4. Οι δοκιμές ELISA μπορούν να εκτελούνται σε δείγμα γάλακτος προερχόμενο από γάλα που έχει συλλεχθεί από εκμετάλλευση στην οποία αμέλγεται τουλάχιστον το 30 % των αγελάδων που προορίζονται για παραγωγή γάλακτος και ευρίσκονται σε περίοδο θηλασμού. Εάν χρησιμοποιηθεί αυτή η μέθοδος, πρέπει να ληφθούν μέτρα για να εξασφαλιστεί ότι τα δείγματα που λαμβάνονται για εξέταση μπορούν να σχετιστούν με αδιαμφισβήτητο τρόπο με τα μεμονωμένα ζώα από τα οποία προήλθε το γάλα. Οποιαδήποτε δοκιμή επιβεβαίωσης πρέπει να εκτελείται σε δείγματα ορού που λαμβάνονται από μεμονωμένα ζώα.
- 2.3. **Δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος (CFT)**
- 2.3.1. Το αντιγόνο αντιπροσωπεύει βακτηριακό εναιώρημα σε αλατούχο φανόλη [NaCl 0,85 % (m/v) και φανόλη 0,5 % (v/v)] ή σε ρυθμιστικό διάλυμα βαρβιτάλης. Τα αντιγόνα είναι δυνατόν να παραδίδονται σε συμπυκνωμένη κατάσταση, εφόσον ο χρησιμοποιούμενος συντελεστής αραιώσεως αναγράφεται στην ετικέτα της φιάλης. Το αντιγόνο αποθηκεύεται σε 4 °C και δεν καταψύχεται.
- 2.3.2. Οι οροί πρέπει να αδρανοποιούνται ως εξής:
- βόειος ορός: σε θερμοκρασία 56 έως 60 °C για 30 έως 50 λεπτά,
  - ορός χοίρου: σε θερμοκρασία 60 °C για 30 έως 50 λεπτά.
- 2.3.3. Προκειμένου να επιτευχθεί η αντίδραση που αρμόζει στη δοκιμή, πρέπει να χρησιμοποιείται δόση συμπληρώματος υψηλότερη από την ελάχιστη δόση που είναι απαραίτητη για πλήρη αιμόλυση.
- 2.3.4. Σε κάθε δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος πρέπει να τοποθετούνται οι ακόλουθοι μάρτυρες:
- α) μάρτυρας της αντισυμπληρωματικής δράσης του ορού·
  - β) μάρτυρας του αντιγόνου·
  - γ) μάρτυρας των ευαισθητοποιημένων ερυθροκυττάρων του αίματος·
  - δ) μάρτυρας του συμπληρώματος·
  - ε) έλεγχος της ευαισθησίας στην έναρξη της αντίδρασης, με χρήση θετικού ορού·
  - στ) έλεγχος της ειδικότητας της αντίδρασης με χρήση αρνητικού ορού.

## 2.3.5. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Ο ΟΙΕΙSS περιέχει 1 000 διεθνείς μονάδες δοκιμής σύνδεσης του συμπληρώματος (ICFTU) ανά ml. Όταν ο ΟΙΕΙSS δοκιμάζεται σε συγκεκριμένη μέθοδο, το αποτέλεσμα συνιστά τον τίτλο ( $T_{\text{OIEISS}}$ ). Το αποτέλεσμα της δοκιμής για τον ορό δοκιμής που δίνεται ως τίτλος ( $T_{\text{TESTSERUM}}$ ) πρέπει να εκφράζεται σε ICFTU ανά ml. Για τη μετατροπή του τίτλου ενός ορού σε ICFTU, χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος για να υπολογιστεί ο παράγοντας (F) ο οποίος είναι απαραίτητος για τη μετατροπή του τίτλου ενός αγνώστου ορού δοκιμής ( $T_{\text{TESTSERUM}}$ ) ο οποίος υποβάλλεται σε δοκιμή με τη συγκεκριμένη μέθοδο σε ICFTU:

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

και το περιεχόμενο σε διεθνείς μονάδες σύνδεσης του συμπληρώματος ανά ml ορού δοκιμής ( $\text{ICFTU}_{\text{TESTSERUM}}$ ) με χρήση της εξίσωσης:

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

## 2.3.6. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Ένας ορός που περιέχει 20 ή περισσότερες ICFTU ανά ml θεωρείται θετικός.

## 2.4. Δακτυλιοειδής δοκιμή στο γάλα (MRT)

2.4.1. Το αντιγόνο αντιπροσωπεύει βακτηριακό εναιώρημα σε αλατούχο φαινόλη [NaCl 0,85 % (m/v)] και φαινόλη 0,5 % (v/v)] χρωματισμένο με αιματοξυλίνη. Το αντιγόνο αποθηκεύεται σε 4 °C και δεν καταψύχεται.

2.4.2. Η ευαισθησία του αντιγόνου πρέπει να τυποποιηθεί σε σχέση με τον ΟΙΕΙSS κατά τέτοιον τρόπο ώστε το αντιγόνο να παράγει θετική αντίδραση σε αραιώση 1/500 του ΟΙΕΙSS σε αρνητικό γάλα, ενώ σε αραιώση 1/1 000 να παράγει αρνητική αντίδραση.

2.4.3. Η δακτυλιοειδής δοκιμή εκτελείται σε δείγματα που αντιπροσωπεύουν το περιεχόμενο εκάστου δοχείου γάλακτος ή εκάστης δεξαμενής της εκμετάλλευσης.

2.4.4. Τα δείγματα γάλακτος δεν πρέπει να έχουν καταψυχθεί, θερμανθεί ή υποβληθεί σε έντονη ανατάραξη.

2.4.5. Η αντίδραση εκτελείται χρησιμοποιώντας μία από τις ακόλουθες μεθόδους:

- σε στήλη γάλακτος ύψους τουλάχιστον 25 mm και σε όγκο γάλακτος 1 ml, στο οποίο έχουν προστεθεί 0,03 ή 0,05 ml ενός από τα τυποποιημένα χρωματισμένα αντιγόνα,
- σε στήλη γάλακτος ύψους τουλάχιστον 25 mm και σε όγκο γάλακτος 2 ml, στο οποίο έχουν προστεθεί 0,05 ml ενός από τα τυποποιημένα χρωματισμένα αντιγόνα,
- σε όγκο γάλακτος 8 ml, στο οποίο έχουν προστεθεί 0,08 ml ενός από τα τυποποιημένα χρωματισμένα αντιγόνα.

2.4.6. Το μείγμα γάλακτος και αντιγόνων επωάζεται σε 37 °C για 60 λεπτά, μαζί με θετικά και αρνητικά πρότυπα εργασίας. Με περαιτέρω επώαση για 16 έως 24 ώρες σε θερμοκρασία 4 °C αυξάνεται η ευαισθησία της δοκιμής.

2.4.7. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων:

- a) αρνητική αντίδραση: χρωματισμένο γάλα, άχρωμη κρέμα·
- β) θετική αντίδραση:
  - γάλα και κρέμα χρωματισμένα εξίσου ή
  - άχρωμο γάλα και χρωματισμένη κρέμα.

## 2.5. Δοκιμή ερυθρού της Βεγγάλης σε πλακίδιο (Rose Bengal)(RBT)

2.5.1. Το αντιγόνο αντιπροσωπεύει βακτηριακό εναιώρημα σε ρυθμιστικό διάλυμα βρουκελικού αντιγόνου με pH 3,65, με απόκλιση  $\pm 0,05$ , χρωματισμένο με χρωστική ερυθρού της Βεγγάλης (Rose Bengal). Το αντιγόνο παραδίδεται έτοιμο προς χρήση, αποθηκεύεται σε 4 °C και δεν καταψύχεται.

2.5.2. Το αντιγόνο παρασκευάζεται χωρίς αναφορά στη συγκέντρωση των κυττάρων, αλλά η ευαισθησία του πρέπει να τυποποιείται σε σχέση με τον ΟΙΕΙSS με τέτοιον τρόπο ώστε το αντιγόνο να παράγει θετική αντίδραση σε αραιώση του ορού 1/45 και αρνητική αντίδραση σε αραιώση 1/55.

2.5.3. Η δοκιμή ερυθρού της Βεγγάλης πρέπει να εκτελείται ως εξής:

- a) ο ορός όγκου (20-30  $\mu$ l) αναμειγνύεται με ίσο όγκο αντιγόνου σε λευκό κεραμικό ή εμαγιέ πλακίδιο ώστε να σχηματίζεται ζώνη διαμέτρου περίπου 2 cm. Το μείγμα ανακινείται ελαφρώς για τέσσερα λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατόπιν παρατηρείται, σε επαρκώς φωτισμένο σημείο, για συγκόλληση·
- β) μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτοματοποιημένη μέθοδος, αλλά πρέπει να είναι τουλάχιστον εξίσου ευαίσθητη και ακριβής με τη χειροκίνητη μέθοδο.

#### 2.5.4. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Οποιαδήποτε ορατή αντίδραση θεωρείται θετική, εκτός και αν υπήρξε υπερβολική ξήρανση των άκρων.

Θετικά και αρνητικά πρότυπα εργασίας πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε σειρά δοκιμών.

#### 2.6. Δοκιμή συγκόλλησης ορού (SAT)

##### 2.6.1. Το αντιγόνο αντιπροσωπεύει βακτηριακό εναιώρημα σε αλατούχο φανόλη [NaCl 0,85 % (m/v) και φανόλη 0,5 % (v/v)]. Δεν χρησιμοποιείται φορμαλδεΰδη.

Τα αντιγόνα είναι δυνατόν να παραδίδονται σε συμπυκνωμένη κατάσταση, εφόσον ο χρησιμοποιούμενος συντελεστής αραιώσης αναγράφεται στην ετικέτα της φιάλης.

Στο αιώρημα αντιγόνου μπορεί να προστεθεί EDTA σε τελική διάλυση δοκιμής 5 mM για να μειωθεί το επίπεδο ψευδών θετικών αποτελεσμάτων στη δοκιμή συγκόλλησης ορού. Στη συνέχεια το pH 7,2 πρέπει να επαναπροσαρμοστεί στο αιώρημα αντιγόνου.

##### 2.6.2. Ο ΟΙΕΙΣΣ περιέχει 1 000 διεθνείς μονάδες συγκόλλησης.

##### 2.6.3. Το αντιγόνο παρασκευάζεται χωρίς αναφορά στη συγκέντρωση των κυττάρων, αλλά η ευαισθητοποίησή του πρέπει να τυποποιείται σε σχέση με τον ΟΙΕΙΣΣ με τέτοιον τρόπο ώστε το αντιγόνο να παράγει είτε 50 % συγκόλληση με τελική αραιώση ορού 1/600 έως 1/1 000 είτε 75 % συγκόλληση με τελική αραιώση ορού 1/500 έως 1/750.

Μπορεί επίσης να είναι ενδεδειγμένο να συγκρίνεται η δραστηριότητα των νέων με τις παλαιότερα τυποποιημένες παρτίδες αντιγόνου χρησιμοποιώντας ομάδα καθορισμένων ορών.

##### 2.6.4. Η δοκιμή εκτελείται είτε σε δοκιμαστικούς σωλήνες είτε σε μικροπλάκες. Το μείγμα αντιγόνου και αραιώσεων ορού επωάζεται για 16 έως 24 ώρες σε 37 °C.

Παρασκευάζονται τρεις τουλάχιστον αραιώσεις κάθε ορού. Οι αραιώσεις του ύποπτου ορού πρέπει να εκτελούνται με τέτοιον τρόπο ώστε η μέτρηση της αντίδρασης στο όριο θετικότητας να καταγράφεται στο μεσαίο σωλήνα (ή τοίχωμα για τη μέθοδο με μικροπλάκες).

#### 2.6.5. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Ο βαθμός συγκόλλησης της βρουκέλας στον ορό εκφράζεται σε διεθνείς μονάδες IU ανά ml.

Ορός που περιέχει 30 ή περισσότερες διεθνείς μονάδες ανά ml θεωρείται θετικός.

### 3. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

#### 3.1. Δερματική δοκιμή βρουκέλωσης (BST)

##### 3.1.1. Προϋποθέσεις για τη χρησιμοποίηση της δοκιμής

- Η δερματική δοκιμή βρουκέλωσης δεν χρησιμοποιείται στην πιστοποίηση για σκοπούς ενδοκοινοτικού εμπορίου.
- Η δερματική δοκιμή βρουκέλωσης είναι μία από τις πλέον ειδικές δοκιμές για την ανίχνευση βρουκέλωσης σε μη εμβολιασμένα ζώα, εντούτοις η διάγνωση δεν πρέπει να γίνεται βάσει μόνο θετικών ενδοδερμικών αντιδράσεων.
- Βοοειδή τα οποία έχουν εξεταστεί με αρνητικά αποτελέσματα σε μία από τις ορολογικές δοκιμές του παρόντος παραρτήματος και τα οποία αντιδρούν θετικά στη δερματική δοκιμή βρουκέλωσης θεωρούνται μολυσμένα.
- Βοοειδή τα οποία έχουν εξεταστεί με θετικά αποτελέσματα σε μία από τις ορολογικές δοκιμές του παρόντος παραρτήματος μπορούν να υποβληθούν σε δερματική δοκιμή βρουκέλωσης προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των ορολογικών δοκιμών, ιδίως στις περιπτώσεις όπου, σε κοπάδια απαλλαγμένα βρουκέλωσης ή επισήμως απαλλαγμένα βρουκέλωσης, δεν μπορεί να αποκλειστεί διασταυρούμενη αντίδραση με αντισώματα κατά άλλων βακτηριδίων.

##### 3.1.2. Η δοκιμή πρέπει να εκτελείται με χρήση τυποποιημένου και καθορισμένου παρασκευάσματος αλλεργιογόνου βρουκέλωσης που δεν περιέχει αντιγόνο λείου λιποπολυσακχαρίτη (LPS), δεδομένου ότι αυτό μπορεί να προκαλέσει μη ειδική φλεγμονώδη αντίδραση ή να επηρεάσει επόμενες ορολογικές δοκιμές.

Ένα από αυτά τα παρασκευάσματα είναι η βρουκελίνη INRA η οποία παρασκευάζεται από μη λείο στέλεχος *B. melitensis*. Οι απαιτήσεις για την παρασκευή του αναφέρονται αναλυτικά στο τμήμα B2 του κεφαλαίου 2.4.2 της τέταρτης έκδοσης του 2000 του εγχειριδίου προτύπων για τις διαγνωστικές δοκιμές και τα εμβόλια του ΔΓΕ.

##### 3.1.3. Διαδικασία δοκιμής

##### 3.1.3.1. Όγκος 0,1 ml του αλλεργιογόνου βρουκέλωσης ενίεται ενδοδερμικά στις ουραίες πτυχές ή στο δέρμα του πλευρού ή στο πλαϊνό τμήμα του λαιμού.

##### 3.1.3.2. Η ανάγνωση του αποτελέσματος γίνεται μετά από 48-72 ώρες.

##### 3.1.3.3. Το πάχος του δέρματος στο σημείο της έγχυσης μετράται με χάχμετρο πριν από την έγχυση και κατά την επανεξέταση.

## 3.1.3.4. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων:

Οι ισχυρές αντιδράσεις αναγνωρίζονται εύκολα από την τοπική διόγκωση και σκλήρυνση.

Διόγκωση του δέρματος 1,5 έως 2 mm θεωρείται ως θετική αντίδραση στη δερματική δοκιμή βρουκέλωσης.

3.2. **Ανταγωνιστική ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική δοκιμή (cELISA)**

## 3.2.1. Προϋποθέσεις για τη χρησιμοποίηση της δοκιμής

α) Η ανταγωνιστική ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική δοκιμή (cELISA) δεν χρησιμοποιείται στην πιστοποίηση για σκοπούς ενδοκοινοτικού εμπορίου.

β) Έχει δειχθεί ότι η ανταγωνιστική ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική δοκιμή (cELISA) διαθέτει μεγαλύτερη ειδικότητα από ό,τι η έμμεση ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική δοκιμή (iELISA) και κατά συνέπεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να υποστηριχτεί η ερμηνεία των αποτελεσμάτων ορολογικών δοκιμών.

## 3.2.2. Διαδικασία δοκιμής

Η δοκιμή πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου προτύπων για διαγνωστικές δοκιμές και εμβόλια του ΔΓΕ, τέταρτη έκδοση του 2000, κεφάλαιο 2.3.1 (2)(α).

## 4. ΕΘΝΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

4.1. **Καθήκοντα και αρμοδιότητες**

Τα εθνικά εργαστήρια αναφοράς έχουν τις ακόλουθες αρμοδιότητες:

- α) εγκρίνουν τα αποτελέσματα των μελετών αξιολόγησης που αποδεικνύουν την αξιοπιστία της δοκιμής που χρησιμοποιείται στο κράτος μέλος·
- β) προσδιορίζουν το μέγιστο αριθμό δειγμάτων που μπορούν να συνενωθούν στο χρησιμοποιούμενο διαγνωστικό πακέτο ELISA·
- γ) βαθμονομούν τα τυποποιημένα δευτερογενή εθνικά πρότυπα ορών αναφοράς ("πρότυπα εργασίας") βάσει του πρωτογενούς εθνικού προτύπου ορού που αναφέρεται στο σημείο 2.1·
- δ) διενεργούν ποσοτικούς ελέγχους όλων των αντιγόνων και όλων των παρτίδων διαγνωστικών πακέτων ELISA που χρησιμοποιούνται στο κράτος μέλος·
- ε) συνεργάζονται στο πλαίσιο του δικτύου της Ευρωπαϊκής Ένωσης των εθνικών εργαστηρίων αναφοράς για τη βρουκέλωση.

4.2. **Κατάλογος εθνικών εργαστηρίων αναφοράς**

## ΒΕΛΓΙΟ

Centre d'étude et de recherches vétérinaires et agrochimiques (CERVA/CODA)  
Groeselenberg 99  
B-1180 Bruxelles/Brussel

## ΔΑΝΙΑ

Danish Veterinary Institute  
Bulowsvej 27  
DK-1790 Copenhagen

## ΓΕΡΜΑΝΙΑ

Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV)  
Nationales Veterinärmedizinisches Referenzlabor für Brucellose  
Postfach 33 00 13  
D-14191 Berlin

## ΕΛΛΑΔΑ

Κτηνιατρικό εργαστήριο Λαρίσης  
Τμήμα Διαγνωστικής  
6ο χλμ. Εθνικής οδού Λαρίσης-Τρικάλων  
GR-411 10 Λάρισα

## ΙΣΠΑΝΙΑ

Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe  
Camino del Jau S/N  
E-18320 Santa Fe (Granada)

## ΓΑΛΛΙΑ

Laboratoire national et OIE/FAO de référence pour la brucellose  
Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA)  
BP 67  
F-94703 Maisons-Alfort Cedex

## ΙΡΑΝΔΙΑ

Brucellosis Laboratory  
Model Farm Road  
Cork  
Ireland

## ΙΤΑΛΙΑ

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise  
Via Campo Boario  
I-64100 Teramo

## ΛΟΥΞΕΜΒΟΥΡΓΟ

Statelaboratory for Veterinarian Medicine  
54 av Gaston Diderich  
B.P. 2081  
L-1020 Luxembourg

## ΚΑΤΩ ΧΩΡΕΣ

Centraal Instituut voor DierziekteControle  
CIDC-Lelystad  
Houtribweg 39  
PO Box 2004  
8203 AA Lelystad  
Nederland

## ΑΥΣΤΡΙΑ

Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen  
Robert-Koch-Gasse 17  
A-2340 Modling

## ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑ

Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV)  
Estrada de Benfica, n.º 701  
P-1549-011 Lisboa

## ΦΙΝΛΑΝΔΙΑ

National Veterinary and Food Research Institute  
Hämeentie 57  
PO Box 45  
FIN-00581 Helsinki

## ΣΟΥΗΔΙΑ

National Veterinary Institute  
S-751 89 Uppsala

## ΗΝΩΜΕΝΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ

1. FAO/WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Brucellosis  
Veterinary Laboratories Agency  
New Haw  
Addlestone  
Surrey KT15 3NB  
United Kingdom
  2. Immunodiagnosics Department  
Veterinary Sciences Division  
Stoney Road Stormont  
Belfast BT4 3SD  
United Kingdom»
-