

ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 10ης Δεκεμβρίου 2008

για την τροποποίηση του παραρτήματος Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ του Συμβουλίου και της απόφασης 2004/226/ΕΚ όσον αφορά τις διαγνωστικές δοκιμές για τη βρουκέλλωση των βοοειδών

[κοινοποιείται υπό τον αριθμό Ε(2008) 7642]

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

(2008/984/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 στον τομέα των ενδοκοινοτικών συναλλαγών βοοειδών και χοιροειδών⁽¹⁾, και ιδίως το άρθρο 6 παράγραφος 2 στοιχείο β) και το άρθρο 16 παράγραφος 1 δεύτερο εδάφιο,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Το παράρτημα Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ καθορίζει τις διαγνωστικές μεθόδους για τη βρουκέλλωση των βοοειδών οι οποίες πρέπει να χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση και την εξάλειψη αυτής της νόσου, για την επιτήρηση και την παρακολούθησή της, για την αναγνώριση της αγέλης ως επίσημα απαλλαγμένης από τη βρουκέλλωση και τη διατήρηση του χαρακτηρισμού αυτού, καθώς και για την πιστοποίηση που απαιτείται για το ενδοκοινοτικό εμπόριο βοοειδών.
- (2) Η απόφαση 2004/226/ΕΚ της Επιτροπής, της 4ης Μαρτίου 2004, για έγκριση των δοκιμών για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά της βρουκέλλωσης των βοοειδών στο πλαίσιο της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ του Συμβουλίου⁽²⁾ εγκρίνει ορισμένες δοκιμές για τη βρουκέλλωση των βοοειδών οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντί της υποχρεωτικής δοκιμής συγκόλλησης ορού (SAT) για την πιστοποίηση των βοοειδών, σύμφωνα με το άρθρο 6 παράγραφος 2 στοιχείο β) της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ.
- (3) Η δοκιμασία φθορισμομετρίας πολωμένου φωτός (FPA) είναι μια νέα διαγνωστική δοκιμή που έχει περιληφθεί ως υποχρεωτική δοκιμή για το διεθνές εμπόριο στο κεφάλαιο 2.4.3 (βρουκέλλωση βοοειδών) του Εγχειριδίου διαγνωστικών δοκιμών και εμβολίων σε χερσαία ζώα (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*), έκτη έκδοση, 2008, του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας των Ζώων (OIE).
- (4) Η Επιτροπή ζήτησε από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (ΕΑΑΤ) να εκδώσει επιστημονική γνωμοδότηση για τη σκοπιμότητα καταχώρισης της FPA στο παράρτημα Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ.

- (5) Επιπροσθέτως, η Επιτροπή ζήτησε από την ΕΑΑΤ να αξιολογήσει την καταλληλότητα της FPA και των δοκιμών που αναφέρονται στο άρθρο 1 της απόφασης 2004/226/ΕΚ για το σκοπό της πιστοποίησης των βοοειδών για το ενδοκοινοτικό εμπόριο.
- (6) Στις 11 Δεκεμβρίου 2006 η ομάδα για την υγεία και την καλή μεταχείριση των ζώων εξέδωσε επιστημονική γνωμοδότηση για τις διαγνωστικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τη βρουκέλλωση των βοοειδών⁽³⁾, στην οποία κατέληξε στο συμπέρασμα ότι, με εξαίρεση τη SAT, οι διαγνωστικές δοκιμές για τη βρουκέλλωση των βοοειδών, οι οποίες περιλαμβάνονται στο παράρτημα Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ, είναι κατάλληλες και μπορούν να παραμείνουν ως τυποποιημένες δοκιμές για την πιστοποίηση των μεμονωμένων βοοειδών στο πλαίσιο του ενδοκοινοτικού εμπορίου.
- (7) Ωστόσο, επειδή, σύμφωνα με το άρθρο 6 παράγραφος 2 στοιχείο β) της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ, η SAT είναι η υποχρεωτική δοκιμή που προβλέπεται ρητά για το εμπόριο βοοειδών πριν από τη μετακίνησή τους, πρέπει να υπάρχει μια τεχνική προδιαγραφή στο παράρτημα Γ της εν λόγω οδηγίας.
- (8) Επιπροσθέτως, η επιστημονική γνωμοδότηση της 11ης Δεκεμβρίου 2006 κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ευαισθησία και η εξειδίκευση της FPA είναι ανάλογες με εκείνες των δοκιμών που περιλαμβάνονται στο παράρτημα Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ· διαπιστώθηκε επίσης ότι η δοκιμή αυτή είναι κατάλληλη για καταχώριση στο εν λόγω παράρτημα ως τυποποιημένη δοκιμή για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης σε ζώα αυτού του είδους για το ενδοκοινοτικό εμπόριο.
- (9) Οι πρόσφατα αναπτυχθείσες μέθοδοι αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, που περιγράφονται στο τμήμα 1d) του κεφαλαίου 2.4.3 του Εγχειριδίου διαγνωστικών δοκιμών και εμβολίων σε χερσαία ζώα, έκτη έκδοση, 2008, του OIE, προσφέρουν πρόσθετα μέσα ανίχνευσης και προσδιορισμού της *B. cella* spp. και, συνεπώς, πρέπει να περιληφθούν στο παράρτημα Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ.
- (10) Συνεπώς, το παράρτημα Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ και η απόφαση 2004/226/ΕΚ πρέπει να τροποποιηθούν ανάλογα.
- (11) Τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα απόφαση είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής για την τροφική αλυσίδα και την υγεία των ζώων,

⁽¹⁾ ΕΕ 121 της 29.7.1964, σ. 1977/64.⁽²⁾ ΕΕ L 68 της 6.3.2004, σ. 36.⁽³⁾ http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620727231.htm

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΑΠΟΦΑΣΗ:

Άρθρο 1

Το παράρτημα Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος της παρούσας απόφασης.

Άρθρο 2

Το άρθρο 1 της απόφασης 2004/226/ΕΚ αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«Άρθρο 1

Η δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος, οι δοκιμές βρουκελλικού αντιγόνου εντός ρυθμιστικού διαλύματος [δοκιμή ερυθρού της Βεγγάλης (RBT)], οι δοκιμές ELISA και η δοκιμασία φθορι-

μομετρίας πολωμένου φωτός (FPA), οι οποίες εκτελούνται όπως προβλέπεται στο παράρτημα Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ, εγκρίνονται για σκοπούς πιστοποίησης.»

Άρθρο 3

Η παρούσα απόφαση απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 10 Δεκεμβρίου 2008.

Για την Επιτροπή
Ανδρούλλα ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ
Μέλος της Επιτροπής

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Στο παράρτημα Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ τα σημεία 1, 2 και 3 αντικαθίστανται από το ακόλουθο κείμενο:

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗ

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 βρουκέλλωση, ιδίως εάν υποστηρίζεται από ορολογικές δοκιμές. Οι μέθοδοι με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) προσφέρουν συμπληρωματικά μέσα ανίχνευσης.

Ει δυνατόν, η *Brucella* spp. πρέπει να απομονώνεται με χρήση απλών ή επιλεγμένων μέσων με καλλιέργεια από εκκρίσεις της μήτρας, αποβληθέντα έμβρυα, εκκρίσεις μαστών ή επιλεγμένους ιστούς, όπως λεμφογάγγλια και άρρενα και θήλα αναπαραγωγικά όργανα.

Μετά την απομόνωση προσδιορίζεται το είδος και ο βιότυπος με λύση φάγων ή/και με οξειδωτικές δοκιμές μεταβολισμού, με κριτήρια βιοχημικά, ορολογικά ή καλλιεργείων. Η PCR μπορεί να αποτελέσει τόσο συμπληρωματική τεχνική όσο και μέθοδο προσδιορισμού βιοτύπων με βάση ειδικές γονιδιωματικές ακολουθίες.

Οι τεχνικές και τα μέσα που χρησιμοποιούνται, η τυποποίησή τους και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να συμφωνούν με τα οριζόμενα στο *Εγχειρίδιο διαγνωστικών δοκιμών και εμβολίων σε χερσαία ζώα*, έκτη έκδοση, 2008, του ΟΙΕ, κεφάλαιο 2.4.3 (βρουκέλλωση βοοειδών), κεφάλαιο 2.7.2 (βρουκέλλωση αιγοπροβάτων) και κεφάλαιο 2.8.5 (βρουκέλλωση των χοίρων).

2. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

2.1. Πρότυπα

2.1.1. Για την παρασκευή όλων των αντιγόνων που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή ερυθρού της Βεγγάλης (Rose Bengal) (RBT), στη δοκιμή συγκόλλησης ορού (SAT), στη δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος (CFT) και στη δακτυλιοειδή δοκιμή στο γάλα (MRT) πρέπει να χρησιμοποιούνται τα στελέχη Weybridge αριθ. 99 ή USDA 1119-3 του βιοτύπου 1 της *Brucella abortus*.

2.1.2. Ο τυποποιημένος ορός αναφοράς για τις ανωτέρω δοκιμές (RBT, SAT, CFT και MRT) είναι ο διεθνής πρότυπος ορός αναφοράς του ΟΙΕ (ΟΙΕISS), ο οποίος παλαιότερα ονομαζόταν δεύτερος διεθνής ορός της ΠΟΥ κατά της *Brucella abortus* (ISAbS).

2.1.3. Οι πρότυποι οροί αναφοράς για τις ενζυμικές δοκιμές ανοσοπροσρόφησης (ELISA) είναι:

— ο ΟΙΕISS,

— ο ασθενώς θετικός πρότυπος ορός του ΟΙΕ για δοκιμές ELISA (ΟΙΕELISA_{WPSS}),

— ο ισχυρώς θετικός πρότυπος ορός του ΟΙΕ για δοκιμές ELISA (ΟΙΕELISA_{SPSS}),

— ο αρνητικός πρότυπος ορός του ΟΙΕ για δοκιμές ELISA (ΟΙΕELISA_{NSS}).

2.1.4. Οι πρότυποι οροί αναφοράς για τις δοκιμασίες φθορισμομετρίας πολωμένου φωτός (FPA) είναι:

— ο ασθενώς θετικός πρότυπος ορός του ΟΙΕ για δοκιμές ELISA (ΟΙΕELISA_{WPSS}),

— ο ισχυρώς θετικός πρότυπος ορός του ΟΙΕ για δοκιμές ELISA (ΟΙΕELISA_{SPSS}),

— ο αρνητικός πρότυπος ορός του ΟΙΕ για δοκιμές ELISA (ΟΙΕELISA_{NSS}).

2.1.5. Οι πρότυποι οροί που αναφέρονται στα σημεία 2.1.3 και 2.1.4 διατίθενται από το κοιντικό εργαστήριο αναφοράς για τη βρουκέλλωση ή από το Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, Ηνωμένο Βασίλειο.

- 2.1.6. Οι πρότυποι οροί OIEISS, OIEELISA_{WP}SS, OIEELISA_{SP}SS και OIEELISA_NSS είναι διεθνή πρωτογενή πρότυπα από τα οποία πρέπει να καθιερωθούν δευτερογενή εθνικά πρότυπα αναφοράς ("πρότυπα εργασίας") για κάθε δοκιμή που προβλέπεται στο σημείο 2.1.1 σε κάθε κράτος μέλος.
- 2.2. **Ενζυμοσύνδετες ανοσοπροσροφητικές δοκιμές (ELISA) ή άλλες δοκιμές σύνδεσης για την ανίχνευση της βρουκέλλωσης των βοοειδών στον ορό ή στο γάλα**
- 2.2.1. **Υλικό και αντιδραστήρια**
- Η χρησιμοποιούμενη τεχνική και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με τις αρχές που καθορίζονται στο κεφάλαιο 1.1.4 του εγχειριδίου του OIE για διαγνωστικές δοκιμές και εμβόλια σε χερσαία ζώα, έκτη έκδοση του 2008, και πρέπει να περιλαμβάνουν τουλάχιστον 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 ⁽¹⁾ του OIEISS ή προαραίωση 1/2 του OIEELISA_{WP}SS ή προαραίωση 1/16 του OIEELISA_{SP}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_{WP}SS ή προαραίωση 1/64 του OIEELISA_{SP}SS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) πρέπει να δίνουν αρνητική αντίδραση·
- γ) ο OIEELISA_NSS 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_{WP}SS ή προαραίωση 1/16 του OIEELISA_{SP}SS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) και εκ νέου αραίωση σε αρνητικό ορό, κατά τον αριθμό δειγμάτων που απαρτίζουν το συνενωμένο δείγμα, πρέπει να δίνουν θετική αντίδραση·
- β) ο OIEELISA_NSS 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_{WP}SS ή προαραίωση 1/125 του OIEELISA_{SP}SS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) και εκ νέου αραίωση 1/10 σε αρνητικό γάλα πρέπει να δίνουν θετική αντίδραση·
- β) ο OIEELISA_NSS, αραιωμένος σε αναλογία 1/10 σε αρνητικό γάλα, 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 γάλακτος ή ορού γάλακτος.
- 2.2.3. **Προϋποθέσεις για τη χρησιμοποίηση των δοκιμών ELISA για τη διάγνωση βρουκέλλωσης στα βοοειδή:**
- 2.2.3.1. Χρησιμοποιώντας σε δείγματα ορού τους προσδιοριζόμενους στα σημεία 2.2.2.1 και 2.2.2.2 όρους βαθμονόμησης για δοκιμές ELISA, η διαγνωστική ευαισθησία της ELISA πρέπει να είναι ίση ή μεγαλύτερη από αυτήν της δοκιμής ερυθρού της Βεγγάλης (RBT) ή της δοκιμής σύνδεσης του συμπληρώματος (CFT), λαμβανομένης υπόψη της επιδημιολογικής κατάστασης υπό την οποία χρησιμοποιείται.
- 2.2.3.2. Χρησιμοποιώντας σε συνενωμένα δείγματα γάλακτος τους προσδιοριζόμενους στο σημείο 2.2.2.3 όρους βαθμονόμησης για δοκιμές ELISA, η διαγνωστική ευαισθησία της ELISA πρέπει να είναι ίση ή μεγαλύτερη από αυτήν της δακτυλιοειδούς δοκιμής στο γάλα (MRT), λαμβανομένης υπόψη όχι μόνο της επιδημιολογικής κατάστασης αλλά και των μέσων και αναμενόμενων ακραίων συστημάτων εκτροφής.
- 2.2.3.3. Αν οι δοκιμές ELISA χρησιμοποιούνται για σκοπούς πιστοποίησης σύμφωνα με την παράγραφο 1 του άρθρου 6 ή για το χαρακτηρισμό και τη διατήρηση του επίσημου χαρακτηρισμού μιας αγέλης σύμφωνα με το σημείο 10 της ενότητας II του παραρτήματος Α, η συνένωση των δειγμάτων ορού πρέπει να γίνεται κατά τρόπον τρόπο ώστε τα αποτελέσματα των δοκιμών να μπορούν να συσχετιστούν με αδιαμφισβήτητο τρόπο με κάθε μεμονωμένο ζώο το δείγμα του οποίου περιλήφθηκε στο συνενωμένο δείγμα. Οποιαδήποτε δοκιμή επιβεβαίωσης πρέπει να εκτελείται σε δείγματα ορού που λαμβάνονται από μεμονωμένα ζώα.

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

2.2.3.4. Οι δοκιμές ELISA μπορούν να εκτελούνται σε δείγμα γάλακτος προερχόμενο από γάλα που έχει συλλεχθεί από εκμετάλλευση στην οποία αμελείται τουλάχιστον το 30 % των αγελάδων που προορίζονται για παραγωγή γάλακτος και ευρίσκονται σε περίοδο θηλασμού. Αν χρησιμοποιηθεί αυτή η μέθοδος, πρέπει να ληφθούν μέτρα για να εξασφαλιστεί ότι τα δείγματα που λαμβάνονται για εξέταση μπορούν να συσχετιστούν 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 φαινόλη [NaCl 0,85 % (m/v) και φαινόλη 0,5 % (v/v)] ή σε ρυθμιστικό διάλυμα βαρβιτάλης. Τα αντιγόνα είναι δυνατόν να παραδίδονται σε συμπυκνωμένη κατάσταση, με την προϋπόθεση ότι ο ενδεικνυόμενος συντελεστής αραίωσης αναγράφεται στην ετικέτα της φιάλης. Το αντιγόνο αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C και δεν καταψύχεται.

2.3.2. Οι οροί πρέπει να αδρανοποιούνται ως εξής:

— βόειος ορός: σε θερμοκρασία 56 °C έως 60 °C για 30 έως 50 λεπτά,

— ορός χοίρου: σε θερμοκρασία 60 °C για 30 έως 50 λεπτά.

2.3.3. Για 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) μάρτυρας της ευαισθησίας στην έναρξη της αντίδρασης, με χρήση θετικού ορού·
- στ) μάρτυρας 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. Αν ο ΟΙΕΙSS δοκιμάζεται σε συγκεκριμένη μέθοδο, το αποτέλεσμα δίνεται ως τίτλος (δηλαδή υψηλότερη άμεση αραίωση του ΟΙΕΙSS που δίνει αιμόλυση 50 %, $T_{\text{ΟΙΕΙSS}}$). 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, ο παράγοντας (F), ο οποίος είναι απαραίτητος για τη μετατροπή σε ICFTU του τίτλου ενός άγνωστου ορού δοκιμής ($T_{\text{TESTSERUM}}$) ο οποίος υποβάλλεται σε δοκιμή με τη συγκεκριμένη μέθοδο, υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

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

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

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

2.3.6. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

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 θερμοκρασία 4 °C και δεν καταψύχεται.

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

- 2.4.3. Η δακτυλιοειδής δοκιμή εκτελείται σε δείγματα που αντιπροσωπεύουν το περιεχόμενο κάθε δοχείου γάλακτος ή κάθε 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 με 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 θερμοκρασία 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:
- α) αρνητική αντίδραση: χρωματισμένο γάλα, άχρωμη κρέμα·
 - β) θετική αντίδραση:
 - γάλα και κρέμα χρωματισμένα εξίσου ή
 - άχρωμο γάλα και χρωματισμένη κρέμα.
- 2.5. **Δοκιμή ρυθμιστικού διαλύματος βρουκελλικού αντιγόνου [δοκιμή ερυθρού της Βεγγάλης (RBT)]**
- 2.5.1. Το αντιγόνο αντιπροσωπεύει βακτηριακό εναιώρημα σε ρυθμιστικό διάλυμα βρουκελλικού αντιγόνου με pH 3,65, με απόκλιση $\pm 0,05$, χρωματισμένο με χρωστική ερυθρού της Βεγγάλης. Το αντιγόνο παραδίδεται έτοιμο προς χρήση, αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 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 ΟΙΕΙΣΣ με τέτοιο 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:
- α) ο ορός (όγκου 20-30 μ 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 χειρωνακτική μέθοδο.
- 2.5.4. *Ερμηνεία των αποτελεσμάτων*
- Οποιαδήποτε ορατή αντίδραση θεωρείται θετική, εκτός αν υπήρξε υπερβολική ξήρανση των άκρων.
- Σε κάθε σειρά δοκιμών πρέπει να περιλαμβάνονται θετικά και αρνητικά πρότυπα εργασίας.
- 2.6. **Δοκιμή συγκόλλησης ορού (SAT)**
- 2.6.1. Το αντιγόνο αντιπροσωπεύει βακτηριακό εναιώρημα σε αλατούχο φαινόλη [NaCl 0,85 % (m/v) και φαινόλη 0,5 % (v/v)].
- Δεν πρέπει να χρησιμοποιείται φορμαλδεΐδη.
- Τα αντιγόνα είναι δυνατόν να παραδίδονται σε συμπυκνωμένη κατάσταση, με την προϋπόθεση ότι ο ενδεικνυόμενος συντελεστής αραιώσης αναγράφεται στην ετικέτα της φιάλης.
- Στο εναιώρημα αντιγόνου μπορεί να προστεθεί EDTA σε τελική διάλυση δοκιμής 5 mM, για να μειωθεί το επίπεδο ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων στη δοκιμή συγκόλλησης ορού. Στη συνέχεια το pH 7,2 πρέπει να επαναπροσαρμοστεί στο εναιώρημα αντιγόνου.

- 2.6.2. Ο ΟΙΕISS περιέχει 1 000 διεθνείς μονάδες συγκόλλησης.
- 2.6.3. Το αντιγόνο παρασκευάζεται χωρίς αναφορά στη συγκέντρωση των κυττάρων, αλλά η ευαισθησία του πρέπει να τυποποιείται σε σχέση με τον ΟΙΕISS με τέτοιο 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 ενδείκνυται να συγκριθεί η δραστηριότητα των νέων με τις παλαιότερα τυποποιημένες παρτίδες αντιγόνου με χρήση ομάδας 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 θερμοκρασία 37 °C.
- Παρασκευάζονται τρεις τουλάχιστον αραιώσεις κάθε ορού. Οι αραιώσεις του ύποπτου ορού πρέπει να εκτελούνται με τέτοιο τρόπο ώστε η μέτρηση της αντίδρασης στο όριο θετικότητας να καταγράφεται στο μεσαίο σωλήνα (ή κυψέλη για τη μέθοδο με μικροπλάκες).
- 2.6.5. *Ερμηνεία των αποτελεσμάτων*
- Ο βαθμός συγκόλλησης της βρουκέλλας στον ορό εκφράζεται σε διεθνείς μονάδες IU ανά ml.
- Ορός που περιέχει 30 ή περισσότερες διεθνείς μονάδες ανά ml θεωρείται θετικός.
- 2.7. **Δοκιμασία φθορισμομετρίας πολωμένου φωτός (FPA)**
- 2.7.1. Η FPA μπορεί να εκτελεστεί σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες ή σε μικροπλάκες 96 κυψελών. Η χρησιμοποιούμενη τεχνική, η τυποποίησή της και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να συνάδουν με τα οριζόμενα στο κεφάλαιο 2.4.3 (βρουκέλλωση βοοειδών) του *Εγχειριδίου διαγνωστικών δοκιμών και εμβολίων σε χερσαία ζώα*, έκτη έκδοση, 2008, του ΟΙΕ.
- 2.7.2. *Τυποποίηση της δοκιμής*
- Η FPA τυποποιείται, ούτως ώστε:
- α) ο ΟΙΕELISA_{SP}SS και ο ΟΙΕELISA_{WP}SS δίνουν πάντα θετικά αποτελέσματα·
 - β) προαραίωση 1/8 του ΟΙΕELISA_{WP}SS ή προαραίωση 1/64 του ΟΙΕELISA_{SP}SS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) δίνει πάντα αρνητική αντίδραση·
 - γ) ο ΟΙΕELISA_NSS δίνει πάντα αρνητική αντίδραση.
- Κάθε παρτίδα δοκιμών πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής: έναν ισχυρώς θετικό, έναν ασθενώς θετικό και έναν αρνητικό πρότυπο ορό εργασίας (βαθμονομημένους με βάση τους πρότυπους ορούς ELISA του ΟΙΕ).
3. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ
- 3.1. **Δερματική δοκιμή βρουκέλλωσης (BST)**
- 3.1.1. *Προϋποθέσεις για τη χρησιμοποίηση της δοκιμής BST*
- α) Η δερματική δοκιμή βρουκέλλωσης δεν χρησιμοποιείται στην πιστοποίηση για σκοπούς ενδοκοινοτικού εμπορίου.
 - β) Η δερματική δοκιμή βρουκέλλωσης είναι μία από τις πλέον ειδικές δοκιμές για την ανίχνευση βρουκέλλωσης σε μη εμβολιασμένα ζώα· ωστόσο, η διάγνωση δεν πρέπει να γίνεται βάσει μόνο θετικών ενδοδερμικών αντιδράσεων.
 - γ) 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 βρουκέλλωσης θεωρούνται μολυσμένα ή ύποπτα ότι έχουν μολυνθεί.
 - δ) Βοοειδή τα οποία έχουν εξεταστεί με θετικά αποτελέσματα σε μία από τις ορολογικές δοκιμές του παρόντος παραρτήματος μπορούν να υποβληθούν σε δερματική δοκιμή βρουκέλλωσης για να υποστηριχθεί η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των ορολογικών δοκιμών, ιδίως όταν, σε αγέλες απαλλαγμένες από βρουκέλλωση ή επίσημως απαλλαγμένες από βρουκέλλωση, 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 βρουκέλλωσης που δεν περιέχει αντιγόνο λείου λιποπολυσακχαρίτη (LPS), δεδομένου ότι αυτό μπορεί να προκαλέσει μη ειδική φλεγμονώδη αντίδραση ή να επηρεάσει επόμενες ορολογικές δοκιμές.

Οι απαιτήσεις για την παρασκευή βρουκελλίνης συνάδουν με το *Εγχειρίδιο διαγνωστικών δοκιμών και εμβολίων σε χερσαία ζώα*, έκτη έκδοση, 2008, του ΟΙΕ, κεφάλαιο 2.4.3, τμήμα C1.

3.1.3. Διαδικασία δοκιμής

- 3.1.3.1. Όγκος 0,1 ml του αλλεργιογόνου βρουκέλλωσης 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 ύστερα από 48-72 ώρες.

- 3.1.3.3. Το πάχος του δέρματος στο σημείο της έγχυσης μετράται με παχύμετρο 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 κατά 1,5 έως 2 mm θεωρείται ως θετική αντίδραση στη δερματική δοκιμή βρουκέλλωσης.

3.2. **Ανταγωνιστική ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης (cELISA)**

- 3.2.1. Προϋποθέσεις για τη χρησιμοποίηση της δοκιμής cELISA

Η cELISA δεν χρησιμοποιείται στην πιστοποίηση για σκοπούς ενδοκοινοτικού εμπορίου.

Τα βοοειδή για τα οποία έχει ληφθεί θετικό αποτέλεσμα σε κάποια από τις άλλες ορολογικές δοκιμές που προβλέπονται στο παρόν παράρτημα μπορούν να υποβληθούν σε δοκιμή cELISA για να υποστηριχθεί η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των άλλων ορολογικών δοκιμών, ιδίως όταν, σε αγέλες απαλλαγμένες από βρουκέλλωση ή επισήμως απαλλαγμένες από βρουκέλλωση, δεν μπορεί να αποκλειστεί διασταυρούμενη αντίδραση με αντισώματα κατά άλλων βακτηριδίων, ή για να εξαλειφθούν οι αντιδράσεις λόγω εναπομενόντων αντισωμάτων που παράγονται ως αντίδραση στον εμβολιασμό με S19.

3.2.2. Διαδικασία δοκιμής

Η δοκιμή πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με τις οδηγίες του *Εγχειριδίου διαγνωστικών δοκιμών και εμβολίων σε χερσαία ζώα*, έκτη έκδοση, 2008, του ΟΙΕ, κεφάλαιο 2.4.3, τμήμα B2.»

2. Στο παράρτημα Γ της οδηγίας 64/432/ΕΟΚ το σημείο 4.1 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«4.1. **Καθήκοντα και αρμοδιότητες**

Τα εθνικά εργαστήρια αναφοράς που έχουν οριστεί σύμφωνα με το άρθρο 6α έχουν τις ακόλουθες αρμοδιότητες:

- α) εγκρίνουν τα αποτελέσματα των μελετών επικύρωσης που αποδεικνύουν την αξιοπιστία της δοκιμής που χρησιμοποιείται στο κράτος μέλος·
- β) προσδιορίζουν τον μέγιστο αριθμό δειγμάτων που μπορούν να συνενωθούν στο χρησιμοποιούμενο διαγνωστικό πακέτο ELISA·
- γ) βαθμονομούν τα πρότυπα εργασίας, όπως ορίζεται στο σημείο 2.1.6·
- δ) διενεργούν ποιοτικούς ελέγχους όλων των αντιγόνων και όλων των παρτίδων διαγνωστικών πακέτων ELISA που χρησιμοποιούνται στο κράτος μέλος·
- ε) ακολουθούν τις συστάσεις του κοινοτικού εργαστηρίου αναφοράς για τη βρουκέλλωση και συνεργάζονται μ' αυτό.»