

Αριθμός 138

Ο ΠΕΡΙ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΛΕΓΧΩΝ ΣΤΟ ΕΝΔΟΚΟΙΝΟΤΙΚΟ ΕΜΠΟΡΙΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΑΠΟ ΤΡΙΤΕΣ ΧΩΡΕΣ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΖΩΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΓΙΑ ΆΛΛΑ ΣΥΝΑΦΗ ΘΕΜΑΤΑ ΝΟΜΟΣ ΤΟΥ 2002

Διάταγμα δυνάμει του άρθρου 37.

Για σκοπούς εναρμόνισης -

Επίσημη  
Εφημερίδα της  
ΕΕ.: L 219,  
14.8.2008,  
σ. 40.

(α) με το Άρθρο 1, παραγράφους 1, 3 και 4, της πράξης της Ευρωπαϊκής Κοινότητας με τίτλο «Οδηγία 2008/73/ΕΚ του Συμβουλίου της 15ης Ιουλίου 2008 για την απλούστευση των διαδικασιών καταχώρισης και δημοσίευσης πληροφοριών στον κτηνιατρικό και ζωοτεχνικό τομέα και για την τροποποίηση των οδηγιών 64/432/ΕΟΚ, 77/504/ΕΟΚ, 88/407/ΕΟΚ, 88/661/ΕΟΚ, 89/361/ΕΟΚ, 89/556/ΕΟΚ, 90/426/ΕΟΚ, 90/427/ΕΟΚ, 90/428/ΕΟΚ, 90/429/ΕΟΚ, 90/539/ΕΟΚ, 91/68/ΕΟΚ, 91/496/ΕΟΚ, 92/35/ΕΟΚ, 92/65/ΕΟΚ, 92/66/ΕΟΚ, 92/119/ΕΟΚ, 94/28/ΕΚ, 2000/75/ΕΚ, της απόφασης 2000/258/ΕΚ και των οδηγιών 2001/89/ΕΚ, 2002/60/ΕΚ και 2005/94/ΕΚ», και

(β) με το Άρθρο 1 της πράξης της Ευρωπαϊκής Κοινότητας με τίτλο «Απόφαση της Επιτροπής 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 (2008/984/ΕΚ)»,

98 (I) του 2002.

Ο Υπουργός Γεωργίας, Φυσιικών Πόρων και Περιβάλλοντος, ασκώντας τις εξουσίες που του παρέχει το άρθρο 37 του περί Κτηνιατρικών Ελέγχων στο Ενδοκοινοτικό Εμπόριο και την Εισαγωγή από Τρίτες Χώρες καθώς και για άλλα Συναφή Θέματα Νόμου του 2002, εκδίδει το ακόλουθο Διάταγμα:

Συνοπτικός  
Τίτλος.

1. Το παρόν Διάταγμα θα αναφέρεται ως το περί Κτηνιατρικών Ελέγχων στο Ενδοκοινοτικό Εμπόριο (Υγειονομικοί Όροι που διέπουν το Εμπόριο Βοοειδών και Χοίρων) (Τροποποιητικό) Διάταγμα του 2010 και θα διαβάζεται μαζί με τα περί Κτηνιατρικών Ελέγχων στο Ενδοκοινοτικό Εμπόριο (Υγειονομικοί Όροι που διέπουν το Εμπόριο Βοοειδών και Χοίρων) Διατάγματα του 2005 και 2008 (που στο εξής θα αναφέρεται ως «το βασικό διάταγμα») και το βασικό διάταγμα και το παρόν Διάταγμα θα αναφέρονται μαζί ως τα περί Κτηνιατρικών Ελέγχων στο Ενδοκοινοτικό Εμπόριο (Υγειονομικοί Όροι που διέπουν το Εμπόριο Βοοειδών και Χοίρων) Διατάγματα του 2005 μέχρι 2010.

Επίσημη  
Εφημερίδα,  
Παράρτημα  
Τρίτο(I):  
24.3.2005  
(Κ.Δ.Π.  
160/2005).  
28.3.2008  
(Κ.Δ.Π.  
113/2008).

Τροποποίηση της  
παραγράφου 7  
του βασικού  
διατάγματος.

2. Το σημείο (α) της υποπαραγράφου (2) της παραγράφου 7 του βασικού διατάγματος τροποποιείται με την αντικατάσταση της φράσης «να προέρχονται από εκμετάλλευση βοοειδών επισήμως απαλλαγμένη φυματίωσης και, σε περίπτωση ζώων ηλικίας άνω των έξι εβδομάδων, να έχουν αντιδράσει αρνητικά σε ενδοδερμικό φυματινισμό που διεξάγεται κατά την περίοδο 30 ημερών πριν από την αναχώρησή τους από την αγέλη προέλευσης, σύμφωνα με τις προϋποθέσεις του σημείου 2.2.5.3.4 του Παραρτήματος II:» (πρώτη έως έβδομη γραμμή) με το ακόλουθο νέο κείμενο:

Παράρτημα II.

«(α) να προέρχονται από εκμετάλλευση βοοειδών επισήμως απαλλαγμένη φυματίωσης και, σε περίπτωση ζώων ηλικίας άνω των έξι εβδομάδων, να έχουν αντιδράσει αρνητικά σε ενδοδερμικό φυματινισμό που διεξάγεται σύμφωνα με το σημείο 2.2 του Παραρτήματος II, κατά την περίοδο 30 ημερών πριν από την αναχώρησή τους από την αγέλη προέλευσης ή σε τόπο και υπό τις προϋποθέσεις που ορίζονται από την Επιτροπή:»

Παράρτημα II.

Τροποποίηση της  
παραγράφου 12  
του βασικού  
διατάγματος.

3. Η παράγραφος 12 του βασικού διατάγματος τροποποιείται με την αντικατάσταση της υποπαραγράφου (2) με την ακόλουθη νέα υποπαραγραφή:

«(2) Ο Διευθυντής χορηγεί αριθμό έγκρισης σε κάθε εγκρινόμενο κέντρο συγκέντρωσης. Η έγκριση αυτή μπορεί να περιορίζεται σε ορισμένα είδη, σε ζώα αναπαραγωγής και αποδόσεων ή σε ζώα προς σφαγή. Η Αρμόδια Αρχή καταρτίζει και τηρεί επικαιροποιημένο κατάλογο με τα εγκεκριμένα κέντρα συγκέντρωσης και τους αριθμούς έγκρισης και θέτει τα στοιχεία αυτά στη διάθεση των λοιπών κρατών μελών και του κοινού:»

Τροποποίηση της παραγράφου 15 του βασικού διατάγματος. 4. Η παράγραφος 15 του βασικού διατάγματος τροποποιείται με την προσθήκη, αμέσως μετά την υποπαραγράφο (5), της ακόλουθης νέας υποπαραγράφου:

«(6) Η Αρμόδια Αρχή καταρτίζει και τηρεί επικαιροποιημένο κατάλογο με τους εγκεκριμένους εμπόρους και τις καταχωρισμένες στο Μητρώο εγκαταστάσεις τις οποίες χρησιμοποιούν για τις αγοραπωλησίες ζώων καθώς και με τους αριθμούς έγκρισής τους και θέτει τον εν λόγω κατάλογο στη διάθεση των λοιπών κρατών μελών και του κοινού.».

Αντικατάσταση του Παραρτήματος III του βασικού διατάγματος. 5. Το Παράρτημα III του βασικού διατάγματος αντικαθίσταται από το ακόλουθο νέο Παράρτημα:

### «ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III (παράγραφος 7)

#### ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗ

#### 1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Όταν με τροποποιημένη οξεάντοχη ή ανοσοειδική χρώση αποδεικνύεται η παρουσία οργανισμών της μορφολογίας της *Brucella* σε υλικό αποβολής, σε κοιλικές 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 θήλεα 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 (ΟΙΕELISAWPSS),
- ο ισχυρώς θετικός πρότυπος ορός του ΟΙΕ για δοκιμές ELISA (ΟΙΕELISASPSS),
- ο αρνητικός πρότυπος ορός του ΟΙΕ για δοκιμές ELISA (ΟΙΕELISANSS).

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

- ο ασθενώς θετικός πρότυπος ορός του ΟΙΕ για δοκιμές ELISA (ΟΙΕELISAWPSS),
- ο ισχυρώς θετικός πρότυπος ορός του ΟΙΕ για δοκιμές ELISA (ΟΙΕELISASPSS),

- ο αρνητικός πρότυπος ορός του ΟΙΕ για δοκιμές ELISA (ΟΙΕELISANSS).

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

2.1.6. Οι πρότυποι οροί ΟΙΕISS, ΟΙΕELISAWPSS, ΟΙΕELISASPSS και ΟΙΕELISANSS 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 ΟΙΕ 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 ΟΙΕISS ή προαραίωση 1/2 του ΟΙΕELISAWPSS ή προαραίωση 1/16 του ΟΙΕELISASPSS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) πρέπει να δίνουν θετική αντίδραση.

β) προαραίωση 1/600 του ΟΙΕISS ή προαραίωση 1/8 του ΟΙΕELISAWPSS ή προαραίωση 1/64 του ΟΙΕELISASPSS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) πρέπει να δίνουν αρνητική αντίδραση.

γ) ο ΟΙΕELISANSS 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 ΟΙΕISS ή προαραίωση 1/2 του ΟΙΕELISAWPSS ή προαραίωση 1/16 του ΟΙΕELISASPSS 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 ΟΙΕELISANSS 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 ΟΙΕISS ή προαραίωση 1/16 του ΟΙΕELISAWPSS ή προαραίωση 1/125 του ΟΙΕELISASPSS 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 ΟΙΕELISANSS, 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. Όπου οι δοκιμές ELISA χρησιμοποιούνται για σκοπούς πιστοποίησης σύμφωνα με την υποπαράγραφο (1) της παραγράφου 6 του Διατάγματος ή για το χαρακτηρισμό και τη διατήρηση του επίσημου χαρακτηρισμού μιας αγέλης σύμφωνα με το σημείο 10 του Μέρους II του Παραρτήματος I, 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.

2.2.3.4. Οι δοκιμές ELISA μπορούν να εκτελούνται σε δείγμα γάλακτος προερχόμενο από γάλα που έχει συλλεχθεί από εκμετάλλευση στην οποία αμείγεται 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 αντίγono 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 %, ΤΟΙΕΙSS). Το αποτέλεσμα της δοκιμής για τον ορό δοκιμής που δίνεται ως τίτλος (TTESTSERUM) 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 (TTESTSERUM) ο οποίος υποβάλλεται σε δοκιμή με τη συγκεκριμένη μέθοδο, υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$F = 1\ 000 \times 1/\text{TOIEISS}$$

και το περιεχόμενο σε διεθνείς μονάδες σύνδεσης του συμπληρώματος ανά ml ορού δοκιμής (ICFTUTESTSERUM) με χρήση του τύπου:

$$\text{ICFTUTESTSERUM} = F \times \text{TTESTSERUM}$$

### 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 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 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 ΟΙΕΙSS 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 μl) 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 ΟΙΕΙSS 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 ΟΙΕΙSS 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 ενδεικνύεται 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 επάγεται 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 ΟΙΕELISASPSS και ο ΟΙΕELISAWPSS δίνουν πάντα θετικά αποτελέσματα.

β) προαραίωση 1/8 του ΟΙΕELISAWPSS ή προαραίωση 1/64 του ΟΙΕELISASPSS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) δίνει πάντα αρνητική αντίδραση.

γ) ο ΟΙΕELISANSS 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) Βοσειδή 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) Βοσειδή 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 επισήμως 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 2mm 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 βοσειδή 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.»

*(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.*

## 4. Καθήκοντα και αρμοδιότητες του Επίσημου Κτηνιατρικού Εργαστηρίου

Το Επίσημο Κτηνιατρικό Εργαστήριο είναι υπεύθυνο για -

α) την έγκριση των αποτελεσμάτων των μελετών επικύρωσης που αποδεικνύουν την αξιοπιστία της δοκιμής που χρησιμοποιείται στη Δημοκρατία.

β) τον προσδιορισμό του μέγιστου αριθμού δειγμάτων που μπορούν να συνενωθούν στο χρησιμοποιούμενο διαγνωστικό πακέτο ELISA.

γ) τη βαθμονόμηση των προτύπων, όπως ορίζεται στο σημείο 2.1.6.

δ) τη διενέργεια ποιοτικών ελέγχους όλων των αντιγόνων και όλων των παρτίδων διαγνωστικών πακέτων ELISA που χρησιμοποιούνται στη Δημοκρατία.

ε) τη εφαρμογή των συστάσεων του κοινοτικού εργαστηρίου αναφοράς για τη βρουκέλλωση και τη συνεργασία με αυτό.».



Δημήτρης Ηλιάδης  
Υπουργός

Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος