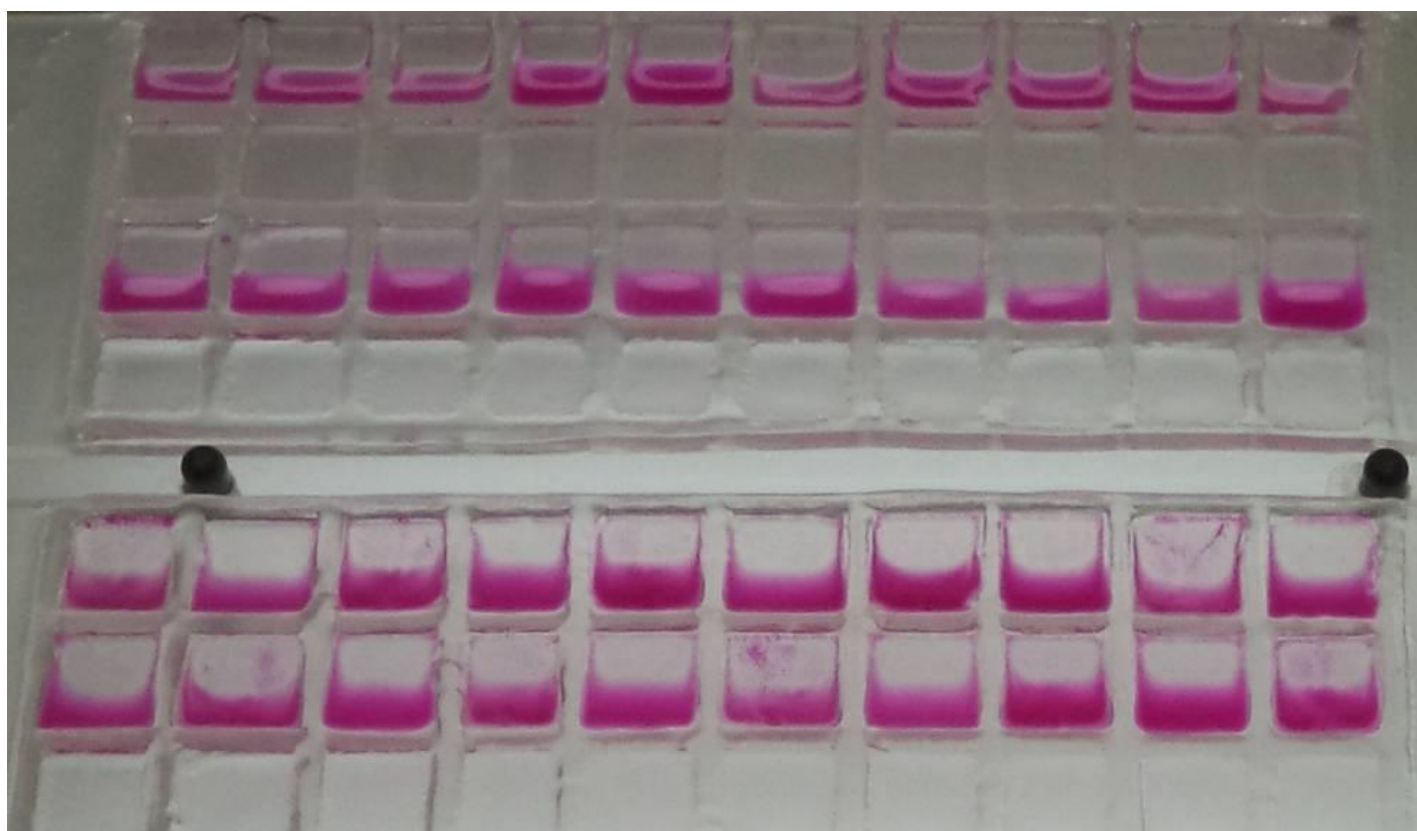




**ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΑΝΑΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗΣ,  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ & ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ**  
ΓΕΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΒΙΩΣΙΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΥΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΖΩΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΖΩΟΑΝΘΡΩΠΟΝΟΣΩΝ

# **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗΣ**



**Αθήνα 2015**

**1<sup>η</sup> Έκδοση**

<b>Πρόλογος</b>		4
<b><u>A</u></b>	<b><u>Νομικό πλαίσιο για τα κτηνιατρικά εργαστήρια που ελέγχουν τη βρουκέλλωση των βοοειδών και των αιγοπροβάτων</u></b>	5
<b><u>B</u></b>	<b><u>Ιστορική αναδρομή και στάδια του προγράμματος στην Ελλάδα</u></b>	6
<b><u>Γ</u></b>	<b><u>Η βρουκέλλωση παγκοσμίως</u></b>	7
<b><u>Δ</u></b>	<b><u>Μορφολογία – Δομή των βακτηρίων <i>Brucella</i> spp.</u></b>	9
1	Γενικά	9
2	Αντιγονική δομή των βακτηρίων <i>Brucella</i> spp.	10
	Αντιγόνα του κυτταρικού τοιχώματος	10
α	[i. Λίποπολυσακχαρίτες (LPS), ii. Πολυσακχαρίτες Β (poly-B), iii. Απτενία (Haptens), iv. Οι πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος (Outer membrane proteins, Ompr)]	
β	Εσωτερικά αντιγόνα	14
γ	In vivo αντιγόνα (In vivo antigens)	15
<b><u>E</u></b>	<b><u>Ανοσολογία της βρουκέλλωσης των αιγών και προβατων</u></b>	15
1	Μηχανισμοί ανοσίας	15
2	Αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστή και βακτηρίων <i>Brucella</i> spp	16
3	Ο ρόλος της κυτταρικής ανοσίας	16
4	Ανοσοσφαιρίνες	18
5	Παραγωγή ανοσοσφαιρινών μετά από φυσική ή πειραματική μόλυνση	18
6	Παραγωγή ανοσοσφαιρινών μετά από εμβολιασμό	19
<b><u>ΣΤ</u></b>	<b><u>Εργαστηριακή Διάγνωση της βρουκέλλωσης</u></b>	20
<b><u>1</u></b>	<b><u>Άμεση Διάγνωση</u></b>	20
<b><u>α</u></b>	<b><u>Μικροσκοπική εξέταση παρασκευασμάτων</u></b>	20
<b><u>β</u></b>	<b><u>Απομόνωση του μικροοργανισμού</u></b>	21
<b><u>γ</u></b>	<b><u>Μοριακές μέθοδοι (PCR, Real Time PCR)</u></b>	31
<b><u>2</u></b>	<b><u>Έμμεση Διάγνωση</u></b>	31
<b><u>α</u></b>	<b><u>Δοκιμή του Ερυθρού της Βεγγάλης (Rose Bengal, RB)</u></b>	32
<b><u>β</u></b>	<b><u>Δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος (Complement Fixation Test, CFT)</u></b>	38
<b><u>γ</u></b>	<b><u>Έμμεση ανοσοενζυμική δοκιμή (indirect ELISA, i-ELISA)</u></b>	40
<b><u>δ</u></b>	<b><u>Ανταγωνιστική ανοσοενζυμική δοκιμή (competitive ELISA, c-ELISA)</u></b>	42
<b><u>ε</u></b>	<b><u>Δοκιμή πόλωσης φθορίζοντος φωτός (FPA)</u></b>	42
<b><u>Z</u></b>	<b><u>Αποστολή – Παραλαβή δειγμάτων</u></b>	43
	Γενικές Αρχές για τη συλλογή και αποστολή δειγμάτων παθολογικού υλικού	43
	Οδηγίες δειγματοληψίας, συσκευασίας και αποστολής δειγμάτων αιμοληψίας	43
	Λόγοι ακαταλληλότητας δείγματος	45
	Διαδικασία απόρριψης μετά την εργαστηριακή ανάλυση	45
	Αποτελέσματα των εργαστηριακών εξετάσεων	45
	Αιμοδείγματα από τη ΖΕΜ	45
	Αιμοδείγματα από τη ΖΕΚ	46
	Διαδικασία σε περίπτωση ατυχήματος από αιμοδείγματα	47
	Προληπτικά μέτρα για αποφυγή ατυχημάτων	47
<b><u>H</u></b>	<b><u>Ευρωπαϊκή και Εθνική Νομοθεσία</u></b>	48
<b>Παράρτημα (Υποδείγματα)</b>		49
<b>A1<sup>α</sup></b>	<b><u>Δελτίο Εμβολιασμού (ΔΕ) κατά της Βρουκέλλωσης των Αιγοπροβάτων</u></b>	50
<b>A1<sup>β</sup></b>	Κατάλογος με τα εμβολιασθέντα ζώα	51
<b>A2</b>	Αποστολή δειγμάτων αίματος από αιγοπρόβατα	52
<b>A3<sup>α</sup></b>	Δελτίο Ορολογικού Ελέγχου (ΔΟΕ) για τη Βρουκέλλωση των Αιγοπροβάτων (1/2)	53
<b>A3<sup>β</sup></b>	Δελτίο Ορολογικού Ελέγχου (ΔΟΕ) για τη Βρουκέλλωση των Αιγοπροβάτων (2/2)	54

B1	Αποστολή <a href="#">δειγμάτων αίματος/ δειγμάτων γάλακτος</a> από βοοειδή	55
B2	Δελτίο Ορολογικού Ελέγχου για τη Βρουκέλλωση Βοοειδών	56
B3 <sup>α</sup>	Δελτίο Ορολογικού Ελέγχου για τη Βρουκέλλωση στα αγελαία βοοειδή (1/2)	57
B3 <sup>β</sup>	Δελτίο Ορολογικού Ελέγχου για τη Βρουκέλλωση στα αγελαία βοοειδή (2/2)	58
B4	Δελτίο Γαλακτοληψίας για τη Βρουκέλλωση Βοοειδών	59
B5 <sup>α</sup>	Δελτίο Εμβολιασμού κατά της <i>Br. melitensis</i> στα αγελαία βοοειδή	60
B5 <sup>β</sup>	Κατάλογος με τα εμβολιασθέντα θηλυκά βοοειδή με Rev-1 (ή RB-51)	61
B5 <sup>γ</sup>	Δελτίο Εμβολιασμού στα βοοειδή με RB-51	62
B6	Βεβαίωση Υγειονομικού Καθεστώτος της Αγέλης	63
A7	Αποστολή παθολογικού υλικού	64
8	<a href="#">Εργαστηριακός έλεγχος εμβολίων από το ΕΕΑΒ στη Λάρισα</a>	65
	<a href="#">Τεχνικές προδιαγραφές αντιδραστήριων και υποστρωμάτων για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης</a>	67
	Διευθύνσεις και στοιχεία των κτηνιατρικών εργαστηρίων που συμμετέχουν στο πρόγραμμα	79
	Γεωγραφική αρμοδιότητα Κτηνιατρικών Εργαστηρίων	80
	Αφίσες για τους κτηνοτρόφους και τους καταναλωτές σχετικά με τη βρουκέλλωση	81
	Φυλλάδιο για τη βρουκέλλωση	83
	<a href="#">Βιβλιογραφία</a>	85
	Συντμήσεις	86

## Πρόλογος

Σε αυτό το εγχειρίδιο έγινε μια προσπάθεια ώστε να συμπεριληφθούν όλες οι χρήσιμες πληροφορίες, οι οδηγίες, η νομοθεσία και τα υποδείγματα των εγγράφων που απαιτούνται κατά την εφαρμογή του προγράμματος ελέγχου και εκρίζωσης της βρουκέλλωσης των μηρυκαστικών από τα κτηνιατρικά εργαστήρια.

Σκοπός του συγκεκριμένου εγχειριδίου είναι να συμπληρώσει στο μέτρο του δυνατού απορίες εργαστηριακών κτηνιάτρων σχετικά με τη θεωρία στην οποία στηρίζονται οι ορολογικές δοκιμές και να περιγράψει με λεπτομέρεια τη μεθοδολογία – τεχνική των ορολογικών δοκιμών Rose Bengal και Σύνδεσης του Συμπληρώματος, οι οποίες θα πρέπει να εφαρμόζονται με βάση τα πρότυπα της ΕΕ.

Ελπίζουμε ότι θα βρείτε τις βασικότερες πληροφορίες που χρειάζεστε και θα αποτελέσει τον οδηγό για τους νέους και παλιούς κτηνιάτρους που ασχολούνται με τη βρουκέλλωση, σε εργαστηριακό επίπεδο.

Για την έκδοση του παρόντος εγχειριδίου συνεργάστηκαν οι:

1. **Δηλέ Χρυσούλα** – κτηνίατρος, (MSc). Προϊσταμένη της Διεύθυνσης Υγείας των Ζώων (ΔΥΖ) της Γενικής Διεύθυνσης Βιώσιμης Ζωικής Παραγωγής & Κτηνιατρικής του Υπουργείου Παραγωγικής Ανασυγκρότησης, Περιβάλλοντος & Ενέργειας. Τηλ.: 210-8836420, [ka6u053@minagric.gr](mailto:ka6u053@minagric.gr).
2. **Τζανή Μυρσίνη** – κτηνίατρος, (MSc) Προϊσταμένη του Τμήματος Ζωοανθρωπονόσων της ΔΥΖ του ΥΠΑΑΤ. Τηλ.: 210-2125727, [ka6u058@minagric.gr](mailto:ka6u058@minagric.gr).
3. **Κορού Λασκαρίνα – Μαρία** (MSc) PhD – κτηνίατρος στο Τμήμα Ζωοανθρωπονόσων της ΔΥΖ. Τηλ.: 210-2125725, [ka6u041@minagric.gr](mailto:ka6u041@minagric.gr).
4. **Στουρνάρα Αθανασία** PhD – Υπεύθυνη κτηνίατρος στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Βρουκέλλωσης Λάρισας.
5. **Κυρμά Άννα** – κτηνίατρος (MSc) στο Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθήνας.
6. **Παπαποστόλου Κατερίνα** – κτηνίατρος (MSc) στο Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Θεσσαλονίκης.
7. **Πανάγιου Αθηνά** PhD – κτηνίατρος στο Εργαστήριο Βρουκέλλωσης Ιωαννίνων.
8. **Φούσκης Ιωάννης** – κτηνίατρος (MSc) στο Εργαστήριο Βρουκέλλωσης Ηρακλείου.
9. **Ζαρουχλιώτη Αγγελική** – κτηνίατρος στο Εργαστήριο Βρουκέλλωσης Τρίπολης.
10. **Κωνσταντινίδης Αθανάσιος** PhD – κτηνίατρος στο Τμήμα Κτηνιατρικής Λάρισας.

Συντονισμός, συγγραφή και επιμέλεια έκδοσης: **Αριστομένης Κατσιώλης** – κτηνίατρος (MSc) στο Τμήμα Ζωοανθρωπονόσων της ΔΥΖ του ΥΠΑΑΤ. Τηλ.: 210-2125726, [ka6u013@minagric.gr](mailto:ka6u013@minagric.gr).

Fax: 210-2128252614

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων  
Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικής – Διεύθυνση Υγείας των Ζώων – Τμήμα  
Ζωοανθρωπονόσων. Ιστότοπος: [www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)

**A. Νομικό πλαίσιο για τα κτηνιατρικά εργαστήρια που ελέγχουν τη βρουκέλλωση των βοοειδών και των αιγοπροβάτων**



**ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ**  
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ

ΤΕΥΧΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

Αρ. Φύλλου 3545  
31 Δεκεμβρίου 2012

**ΑΠΟΦΑΣΕΙΣ**

Αριθμ. 4888/130873  
Πρόγραμμα ελέγχου και εκρίζωσης της βρουκέλλωσης των αιγών και των προβάτων.  
Ο ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΥΠΟΥΡΓΟΣ  
ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Το πρόγραμμα ελέγχου και εκρίζωσης της βρουκέλλωσης των αιγών και των προβάτων περιγράφεται αναλυτικά στην **Υπουργική Απόφαση με αριθμό 4888/130873 (ΦΕΚ Β` 3545/31-12-2012)**. Ειδικά στα άρθρα 3 και 17 γίνεται αναφορά στις αρμοδιότητες των εργαστηρίων και στη διαδικασία διάγνωσης της βρουκέλλωσης.

Στο πλαίσιο της εξυγίανσης της χώρας μας από τη νόσο που προκαλεί το βακτήριο *Brucella melitensis* σε αγελαία βοοειδή συγκεκριμένων Περιφερειακών Ενοτήτων της ηπειρωτικής Ελλάδας εκδόθηκε η σχετική **Υπουργική Απόφαση με αριθμό 4887/130865 (ΦΕΚ Β` 3544/31-12-2012)**. Η περιγραφή των αρμοδιοτήτων και της διαδικασίας διάγνωσης της βρουκέλλωσης γίνεται στα άρθρα 3 και 10.



18383

**ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ**  
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ

ΤΕΥΧΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

Αρ. Φύλλου 1216  
17 Ιουλίου 2007

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

**ΑΠΟΦΑΣΕΙΣ**

Πρόγραμμα εκρίζωσης της φυματίωσης των βοοειδών..... 1  
Πρόγραμμα εκρίζωσης της βρουκέλλωσης των βοοειδών..... 2

Εγκρίνουμε τη συνέχιση του προγράμματος εκρίζωσης της φυματίωσης των βοοειδών σε όλους τους νομούς της Ελλάδας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

Άρθρο 1

Εφαρμογή του Προγράμματος

Το πρόγραμμα εφαρμόζεται υποχρεωτικά σε ολόκληρη την χώρα από τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες της Νο-

207403/29-01-2003 (ΦΕΚ Β` 87). Επίσης, με το ΠΔ 308/2000 (ΦΕΚ Α` 252) και το ΠΔ 115/2010 (ΦΕΚ Α` 196), εναρμονίζεται η Ευρ. Οδηγία 64/432, όπου περιγράφονται οι βασικοί κανόνες του προγράμματος εκρίζωσης της βρουκέλλωσης (Παράρτημα Α` της Οδηγίας).

Με το ΠΔ 41 (ΦΕΚ Α` 44/02-03-2006, άρθρο 10) ορίζεται ως εθνικό εργαστήριο αναφοράς για τη βρουκέλλωση το Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας, Τμήμα Διαγνωστικής.



**ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ**  
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ

ΤΕΥΧΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

Αρ. Φύλλου 3544  
31 Δεκεμβρίου 2012

**ΑΠΟΦΑΣΕΙΣ**

Αριθμ. 4887/130865  
Πρόγραμμα ελέγχου της βρουκέλλωσης των αγελαίων βοοειδών από το βακτήριο *Br. melitensis*.

Ο ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΥΠΟΥΡΓΟΣ  
ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Το πρόγραμμα για τη βρουκέλλωση των βοοειδών σε όλη τη χώρα (εξαιρουμένων των παραπάνω αγελαίων βοοειδών) περιγράφεται αναλυτικά στις Υπουργικές Αποφάσεις με αριθμό α) την ΥΑ 1293/39319/18-04-2013 (ΦΕΚ Β` 938), β) την ΥΑ 258734/17-07-2007 (ΦΕΚ Β` 1216), γ) την ΥΑ 241816/04-04-2005 (ΦΕΚ Β` 427), δ) την ΥΑ 232929/08-05-2003, (ΦΕΚ Β` 551) και ε) την ΥΑ



429

**ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ**  
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ

ΤΕΥΧΟΣ ΠΡΩΤΟ

Αρ. Φύλλου 44  
2 Μαρτίου 2006

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

**ΠΡΟΕΔΡΙΚΑ ΔΙΑΤΑΓΜΑΤΑ**

41. Παρακολούθηση των ζωνών και των ζωονοσθέντων παραγόντων, σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 2003/59/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου..... 1

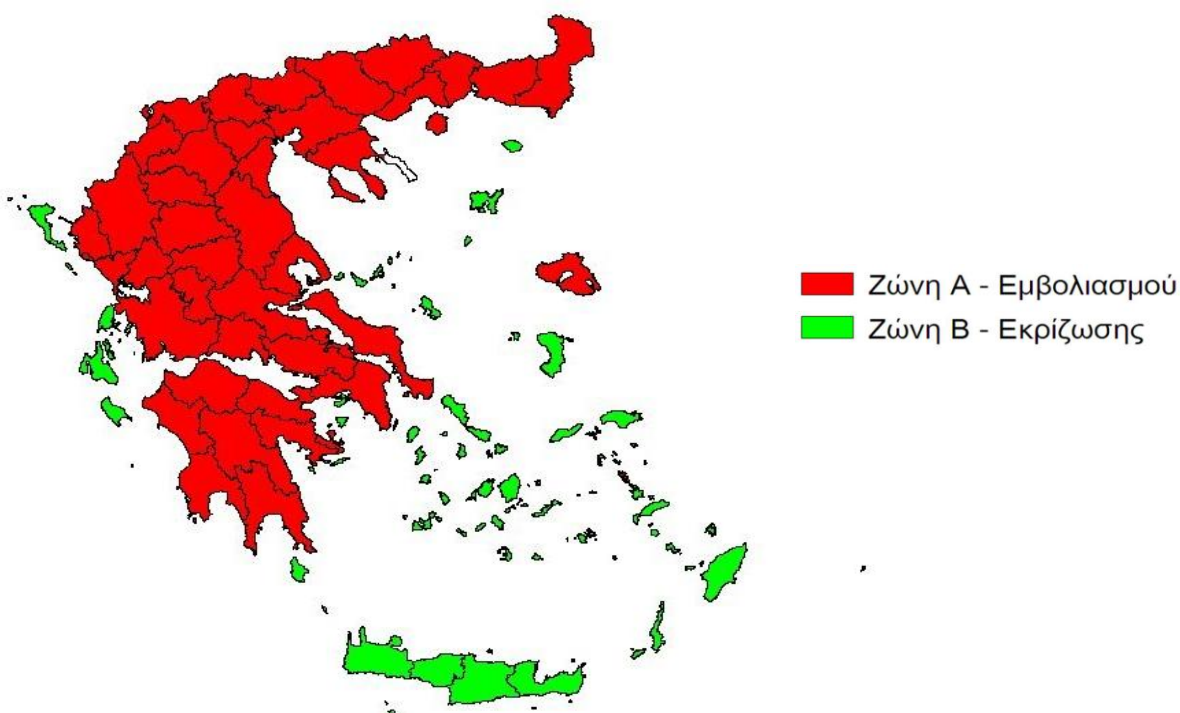
το άρθρο 65 του ν. 1892/1990 «Για τον εκσυγχρονισμό και την ανάπτυξη και άλλες διατάξεις» (Α` 101).  
γ) Του άρθρου 90 του «Κώδικα Νομοθεσίας για την Κυβέρνηση και τα Κυβερνητικά Όργανα», το οποίο τέθηκε σε ισχύ με το άρθρο πρώτο του π.δ. 63/2005 «Κωδικοποίηση της νομοθεσίας για την Κυβέρνηση και τα Κυβερνητικά Όργανα» (Α` 98).

## **B. Ιστορική αναδρομή και τα στάδια του προγράμματος στην Ελλάδα**

Στην Ελλάδα, η οργανωμένη προσπάθεια για την καταπολέμηση της νόσου ξεκίνησε το 1975 με τον υποδόριο (sc) εμβολιασμό των νεαρών αιγοπροβάτων (3-6 μηνών), πρόγραμμα το οποίο και οδήγησε σε σημαντική μείωση των κρουσμάτων στα ζώα και στον άνθρωπο. Όμως από το 1992 – 1998, λόγω υπερεκτίμησης της κατάστασης σταμάτησε το πρόγραμμα εμβολιασμών στα ζώα και μετατράπηκε σε πρόγραμμα εκρίζωσης σε όλη την Ελλάδα ξεκινώντας από τα νησιά (1992), Πελοπόννησο (1993), υπόλοιπη Ελλάδα (1994) με αποτέλεσμα τη δραματική αύξηση των περιστατικών βρουκέλλωσης. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος, άρχισε ξανά από το 1998 – 1999 ο μαζικός εμβολιασμός ενήλικων και νεαρών αιγοπροβάτων με το εμβόλιο Rev-1 (οφθαλμική ενστάλαξη) στην ηπειρωτική Ελλάδα και στην Εύβοια, ενώ στη νησιωτική Ελλάδα, όπου ο επιπολασμός ήταν χαμηλότερος, συνεχίστηκε το πρόγραμμα εκρίζωσης (δλδ. καθολική αιμοληψία των ζώων  $\geq 6$  μηνών και σφαγή των θετικών). Το 2003 επανήλθε το καθεστώς εμβολιασμών στη Λέσβο και στη Λέρο, λόγω εμφάνισης ανθρώπινων κρουσμάτων και το 2008 στη Θάσο (Άνοιξη 2008, κρούσμα με 177 ανθρώπινα κρούσματα, το οποίο ξεκίνησε από γαμήλιο τραπέζι στο Θεολόγο Θάσου).

Εξαιτίας της βρουκέλλωσης έχουν απαγορευτεί οι μετακινήσεις των αιγοπροβάτων από τη Ζώνη Εμβολιασμού (ZEM) προς τη Ζώνη Εκρίζωσης (ZEK) με αποτέλεσμα ο ζωικός πληθυσμός στα νησιά να ανανεώνεται μόνο με μεταξύ τους αγοραπωλησίες ή αγορά από χώρες της ΕΕ απαλλαγμένες από βρουκέλλωση. Επίσης, απαγορεύεται η κατανάλωση νωπού γάλακτος και η κατανάλωση παραδοσιακών τυροκομικών προϊόντων αν πρώτα δεν υποστούν ωρίμανση μεγαλύτερη των δύο μηνών.

Η λειτουργία των οκτώ (8) κτηνιατρικών εργαστηρίων συμπεριλαμβανομένου και του Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς στη Λάρισα εφαρμόστηκε από 01-01-2008. Μέχρι τότε λειτουργούσαν επιπλέον τα κτηνιατρικά εργαστήρια της Κοζάνης, της Λαμίας, των Πατρών, της Ρόδου, των Σερρών και των Χανίων.



**Εικόνα 1.** Η ζώνη εμβολιασμού και η ζώνη εκρίζωσης όπως ισχύει από το 2007.

Από τις αρχές του 2013 ξεκίνησε η συμμετοχή των ιδιωτών κτηνιάτρων στο πρόγραμμα, καθώς και των κτηνιάτρων από τους κτηνοτροφικούς και αγροτικούς συνεταιρισμούς, έτσι ώστε να συνδράμουν στην έλλειψη των κρατικών κτηνιάτρων. Από το Μάρτιο του 2015 τέθηκε σε εφαρμογή ο θεσμός του κτηνιάτρου εκτροφής.

Υπάρχουν διάφορα στάδια για την εκρίζωση ενός ενδημικού νοσήματος. Ανάλογα με τον επιπολασμό του νοσήματος, τους οικονομικούς πόρους και τις κοινωνικές συνθήκες διαμορφώνεται η πολιτική αντιμετώπισής του. Έτσι, στην περίπτωση της βρουκέλλωσης τα στάδια είναι συνοπτικά τα εξής:

**1<sup>ο</sup> στάδιο:** μαζικός εμβολιασμός ενήλικων και νεαρών ζώων. Χρειάζεται περίπου 1-3 χρόνια για την πλήρη εφαρμογή του, ώστε στο τέλος αυτού του διαστήματος όλος ο ζωικός πληθυσμός να είναι εμβολιασμένος. Σε αυτό το στάδιο βρίσκεται η ηπειρωτική Ελλάδα και 4 νησιά της.

**2<sup>ο</sup> στάδιο:** εμβολιασμός ΜΟΝΟ των νεαρών ζώων (αντικατάστασης, ηλικίας 3-6 μηνών).

**3<sup>ο</sup> στάδιο:** Από τη στιγμή που ο επιπολασμός βρεθεί ότι είναι μικρότερος του 4-5%, μπορεί να ξεκινήσει η «εκρίζωση», δηλαδή αιμοληψίες από όλα τα ζώα, σφαγή και αποζημίωση των οροθετικών και καθολική σφαγή στις εκμεταλλεύσεις που τα μολυσμένα ζώα είναι πάνω από το 50% στο σύνολο της εκμετάλλευσης. Οι οροαρνητικές εκμεταλλεύσεις χαρακτηρίζονται ως «επίσημα απαλλαγμένες εκμεταλλεύσεις» (M4, Officially Brucellosis (*Br. melitensis*)-free ovine or caprine holding). Σε αυτό το στάδιο βρίσκεται η νησιωτική χώρα.

**4<sup>ο</sup> στάδιο:** «Επίσημα απαλλαγμένες περιοχές» (Officially Brucellosis-free region), οι οποίες περιλαμβάνουν ΜΟΝΟ «επίσημα απαλλαγμένες εκμεταλλεύσεις». Οι ορολογικοί έλεγχοι στα ζώα των εκμεταλλεύσεων πραγματοποιούνται στο 10% των Μ4 εκμεταλλεύσεων την πρώτη χρονιά και στο 5% στις επόμενες.

**5<sup>ο</sup> στάδιο:** «Χώρα ελεύθερη βρουκέλλωσης» (Officially Brucellosis-free Member State). (Παράρτημα Α, Κεφάλαιο Ι της Οδηγίας 91/68/ΕΟΚ).



## Γ. Η βρουκέλλωση παγκοσμίως

Η βρουκέλλωση είναι λοιμώδης νόσημα, με παγκόσμια εξάπλωση και μακρόχρονη ιστορία που προκαλείται από βακτήρια του γένους *Brucella*. Προσβάλλονται κυρίως τα μηρυκαστικά και άλλα κατοικίδια και άγρια θηλαστικά, αλλά η νόσος μπορεί να μεταδοθεί και στον άνθρωπο.

Στο γένος *Brucella* έχουν αναγνωριστεί έξι είδη τα οποία παρουσιάζουν σχετική ειδικότητα στον ξενιστή, ωστόσο κάτω από κατάλληλες συνθήκες, τα περισσότερα είδη είναι δυνατό να μολύνουν ευρύ φάσμα ξενιστών.

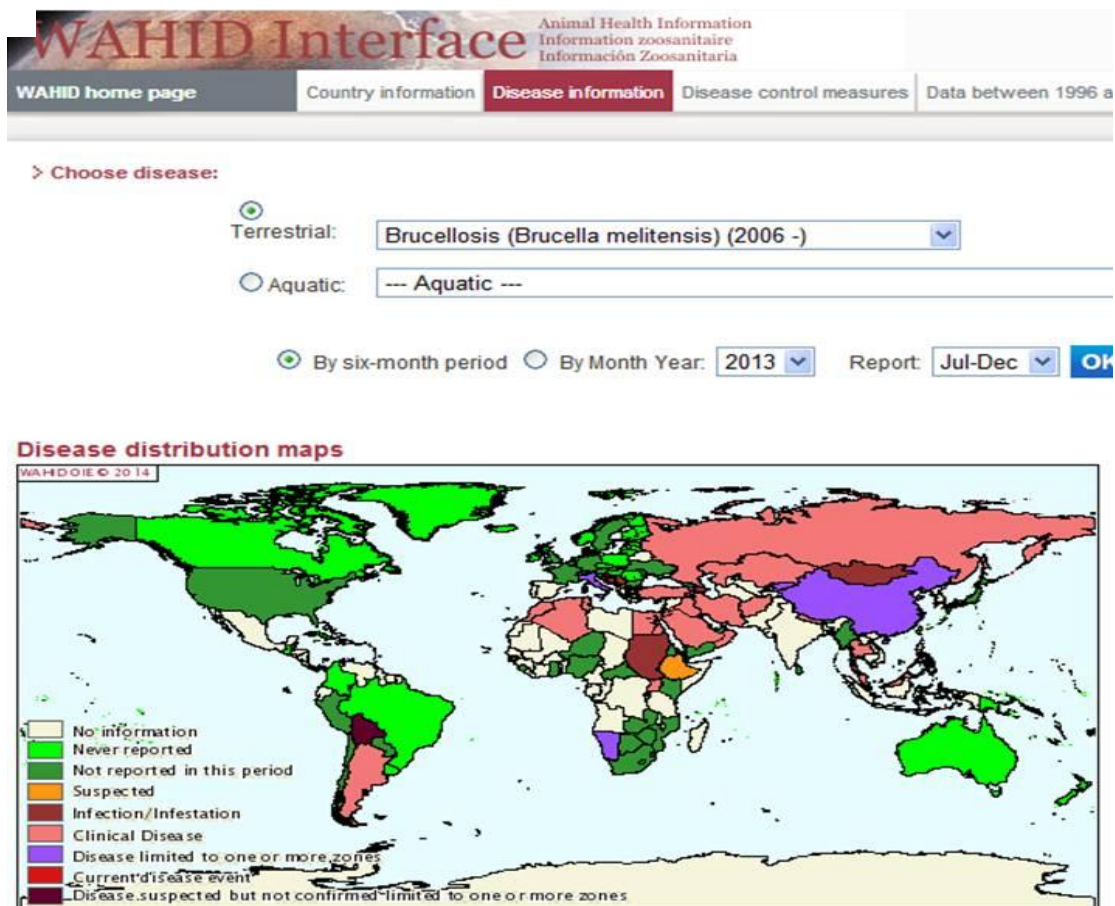
Η βρουκέλλωση στα παραγωγικά ζώα έχει παγκόσμια εξάπλωση. Η *Br. melitensis* ενδημεί στις Μεσογειακές χώρες, στις χώρες της Μέσης Ανατολής και της Αραβικής χερσονήσου. Η λοίμωξη προκαλεί αποβολές και οδηγεί στη μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας και της παραγωγικότητας των μολυσμένων ζώων. Ως εκ τούτου, προκαλούνται σημαντικές οικονομικές απώλειες στους εκτροφείς παραγωγικών ζώων, λόγω ποσοτικής μείωσης των παραγόμενων προϊόντων, αλλά και υποβάθμισης της ποιότητας αυτών. Παράλληλα, η παρουσία του λοιμογόνου παράγοντα στον πληθυσμό των ζώων, αφενός μεν θέτει σε σοβαρό κίνδυνο τη δημόσια υγεία, αφετέρου δε, προκαλεί σημαντική οικονομική επιβάρυνση στο κοινωνικό σύνολο (Nicoletti 1989; Corbel 1989b).

Ιδιαίτερη είναι η σημασία της βρουκέλλωσης στα μικρά μηρυκαστικά, λόγω της σημαντικής συμβολής της εκτροφής προβάτων και αιγών στην οικονομία ορισμένων χωρών. Επιπλέον, τα πρόβατα και οι αίγες προσβάλλονται σχεδόν αποκλειστικά από το είδος *Br. melitensis*, το οποίο θεωρείται ως το πλέον λοιμογόνο του γένους, και προκαλεί σοβαρό νόσημα στον άνθρωπο.

Για τους παραπάνω λόγους, η βρουκέλλωση των μικρών μηρυκαστικών, περιλαμβάνεται στα νοσήματα για τα οποία, σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ), εφαρμόζονται προγράμματα ελέγχου ή εκρίζωσης (ECD 1991).

**Εικόνα 3.** Παγκόσμια εξάπλωση της βρουκέλλωσης των αιγοπροβάτων κατά το β' εξάμηνο του 2013. Τελευταία προσπέλαση 24/10/2014:

[http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap)





Είναι ευρέως αποδεκτό, ότι η εκρίζωση της νόσου σε χώρες όπου η μόλυνση των μικρών μηρυκαστικών από *Br. melitensis* ενδημεί, είναι αδύνατον να επιτευχθεί βασιζόμενη αποκλειστικά σε προγράμματα ελέγχου και σφαγής των οροθετικών ζώων. Η εφαρμογή προγράμματος εμβολιασμού με το εμβόλιο *Br. melitensis* Rev-1, είναι απαραίτητη, προκειμένου να περιοριστεί ο λοιμογόνος παράγοντας και συνεπώς ο επιπολασμός της νόσου στις εκτροφές και κατ' επέκταση σε μία περιοχή.

Ιδιαίτερα σημαντικός κρίνεται και ο ρόλος των ορολογικών δοκιμών αφενός για να εκτιμηθεί το επίπεδο υγείας των εκτροφών και για να απομακρυνθούν τα μολυσμένα ζώα και αφετέρου, για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα του εμβολιασμού. Οι επίσημες ορολογικές δοκιμές που εφαρμόζονται για το σκοπό αυτό από τα κράτη μέλη της ΕΕ, είναι η δοκιμή του Ερυθρού της Βεγγάλης (Rose Bengal, RB) και η δοκιμή της Σύνδεσης του Συμπληρώματος (Complement Fixation, CF) (ECD 1991).

## **Δ. Μορφολογία – Δομή των βακτηρίων *Brucella* spp.**

### **1. Γενικά**

Τα είδη του γένους *Brucella* είναι ακίνητα μη σπορογόνα, αρνητικά κατά Gram βακτήρια (G-). Στα μικροσκοπικά παρασκευάσματα ανευρίσκονται συνήθως με τη μορφή κοκκοβακίλων, με διάμετρο 0,5-0,7μm και μήκος 0,6-1,5μm.

Στους μολυσμένους ιστούς (in vivo) ανευρίσκονται ενδοκυτταρικά υπό μορφή κόκκων, συνήθως σε αθροίσματα και σπανιότερα μεμονωμένα. Στις καλλιέργειες (in vitro) εμφανίζονται συνήθως με τη μορφή αλυσίδων 4-5 κυττάρων, ενώ μπορεί να παρατηρηθεί και πολυμορφισμός (Corbel 1989c). Δε διαθέτουν έλυτρο, ωστόσο σχηματισμοί που προσομοιάζουν με έλυτρο έχουν αναφερθεί μετά από επεξεργασία των μικροοργανισμών με αντι-ορούς (Huddleson 1940, European Union Committee 2001).

Το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων προσομοιάζει με το αντίστοιχο των εντεροβακτηριοειδών. Αποτελείται από εξωτερική στοιβάδα πάχους 9nm συγκροτούμενη από σύμπλεγμα λιποπολυσακχαριτών και πρωτεϊνών. Η αλυσίδα των πολυσακχαριτών παραμένει ελεύθερη, ενώ αυτή των λιπιδίων διατάσσεται πλησίον της στοιβάδας της πεπτιδογλυκάνης, η οποία και αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα του κυτταρικού τοιχώματος (De Petris και συν. 1964; Dubray 1972; Gomez και συν. 1987; Cardoso και συν. 2006). Μεταξύ της στοιβάδας της πεπτιδογλυκάνης και του κυτταρικού τοιχώματος περιλαμβάνεται ο περιπλασματικός χώρος, το πάχος του οποίου ποικίλλει, από 3-6nm σε κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες λείας μορφής (Smooth-S), ενώ αγγίζει τα 30nm σε κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες αδρής μορφής (Rough-R). Στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου βρίσκεται το πυρηνοειδές, όπως επίσης κοκκία, μικρά κενοτόπια, συμπλέγματα ριβοσωματίων και κοκκία πολυσακχαριτών. Το μοριακό βάρος του γενώματος ανέρχεται σε  $2.37 \times 10^9$  Da (Daltons), ενώ η αναλογία βάσεων Γουανίνης-Κυτοσίνης (G+C) είναι 58-59% (De Ley *et al* 1987; Cardoso *et al* 2006). Το γένωμά τους περιλαμβάνει δύο χρωμοσώματα με μία μακρά αλυσίδα που περιέχει 2.1 Mbp (εκατομμύρια ζεύγη βάσεων) και μία βραχύτερη, με 1.2 Mbp. Στις αλυσίδες του γενώματος κωδικοποιούνται οι απαραίτητες μεταβολικές και αναπαραγωγικές λειτουργίες. Στα κύτταρα των βακτηρίων δεν έχει διαπιστωθεί μέχρι σήμερα, η ύπαρξη φυσικών πλασμιδίων (Michaux *et al* 1993; Jumas-Bitlak *et al* 1995). Εντούτοις, μεταλλάξεις του βακτηρίου έχουν διαπιστωθεί ως

αποτέλεσμα επίδρασης ποικίλων πλασμιδίων που εισήχθησαν στο γένωμα, μετά από σύζευξη ή ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) (Rigby *et al* 1989; Cardoso *et al* 2006).

## 2. Αντιγονική δομή των βακτηρίων *Brucella* spp.

Στο κύτταρο των βακτηρίων *Brucella* έχει αναγνωριστεί σημαντικός αριθμός συστατικών, τα οποία δρουν ως αντιγόνα και προκαλούν την παραγωγή αντισωμάτων.

Το κύριο δομικό αντιγονικό συστατικό είναι οι λιποπολυσακχαρίτες, οι οποίοι βρίσκονται ενσωματωμένοι στην εξωτερική στιβάδα του κυτταρικού τοιχώματος. Εκτός από τους λιποπολυσακχαρίτες της εξωτερικής στιβάδας και άλλα μακρομόρια, όπως πρωτεΐνες του περιπλασματικού χώρου και πρωτεΐνες του εσωτερικού του κυττάρου, δρουν ως αντιγόνα.

Επιπλέον, στα είδη του γένους *Brucella* έχουν διαπιστωθεί πολυσακχαρίτες και απτένια, όπως επίσης και λιπίδια, τα οποία αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα των ξενιστών και προκαλούν την παραγωγή αντισωμάτων (Goldbaum και συν. 1993). Τα αντιγόνα των βακτηρίων του γένους *Brucella* διακρίνονται στα αντιγόνα του κυτταρικού τοιχώματος και στα αντιγόνα του εσωτερικού του κυττάρου (Tizard 2007).

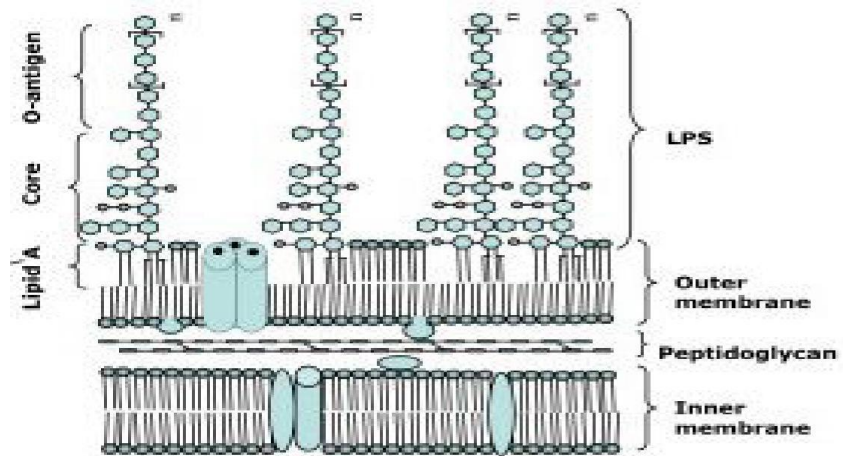
**α) Αντιγόνα του κυτταρικού τοιχώματος:** Στο κυτταρικό τοίχωμα των στελεχών του γένους *Brucella* υπάρχουν α) λιποπολυσακχαρίτες (Lipopolysaccharide-LPS), β) πολυσακχαρίτες, γ) απτένια και δ) πρωτεΐνες (Diaz και συν. 1968; Cherwonogrodzky και συν. 1990; Cardoso και συν. 2006).

**ι) Λίποπολυσακχαρίτες (LPS):** Στην εξωτερική στιβάδα του κυτταρικού τοιχώματος βρίσκεται ο λίποπολυσακχαρίτης (LPS), ο οποίος είναι ζωτικής σημασίας για τη δομή και τη βιολογική δραστηριότητα του βακτηριακού κυττάρου, αλλά και ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας της παθογόνου δράσης των Gram αρνητικών βακτηρίων (Laraque και συν. 2005; Cardoso και συν. 2006).

Ο λίποπολυσακχαρίτης από έξω προς τα έσω αποτελείται από το Ο-αντιγόνο γνωστό και ως Ο αλυσίδα, τον κεντρικό πυρήνα ολιγοσακχαρίτη (core) και το λιπίδιο Α (lipide A). Το Ο-αντιγόνο των S στελεχών της *Brucella*, είναι πολυσακχαρίτης. Πρόκειται για ομοιοπολυμερές χωρίς διακλαδώσεις του 4,6-dideoxy-4-formamido- $\alpha$ -D-mannopyranosyl με δεσμούς στις θέσεις 1,2. Το μήκος της αλυσίδας ποικίλλει από 96 έως 100 γλυκοσιδικές υπομονάδες (Bundle και συν. 1989; Cardoso και συν. 2006). Στο βακτηριακό κύτταρο το Ο-αντιγόνο βρίσκεται συνδεδεμένο με τον κεντρικό πυρήνα του ολιγοσακχαρίτη που αποτελείται από μανόζη, γλυκόζη, γλυκοζαμίνη, 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) και από σάκχαρα των οποίων η σύσταση δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί (Bundle και συν. 1987; Cherwonogrodzky και συν. 1990; Cardoso και συν. 2006).

Το λιπίδιο Α είναι συνδεδεμένο επίσης στον κεντρικό πυρήνα του ολιγοσακχαρίτη και αποτελεί τον παράγοντα στον οποίο αποδίδονται οι τοξικές ιδιότητες του λιποπολυσακχαρίτη (Raetz 1996; Cardoso και συν. 2006). Σε αυτό είναι ισχυρά συνδεδεμένες και πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης. Στα είδη *Br. abortus* και *Br. melitensis*, το λιπίδιο Α αποτελείται από μόριο δισακχαρίτη, το οποίο έχει δεσμούς έτσι ώστε να σχηματίζει  $\beta$  1-6 δομή (Moreno και συν. 1990; Rojas και συν. 1994; Cardoso και συν. 2006).

Ο LPS θεωρείται σημαντικό αντιγόνο και αξιοποιείται για την ταυτοποίηση των ειδών αλλά και τη διάγνωση της μόλυνσης από βακτήρια του γένους *Brucella*. Οι περισσότερες ορολογικές δοκιμές, ιδιαίτερα αυτές στις οποίες χρησιμοποιούνται εναιωρήματα ολόκληρων κυττάρων ως διαγνωστικά αντιγόνα (RB, CF, i-Elisa), ανιχνεύουν αντισώματα κατά του LPS αντιγόνου (Diaz και συν., 1968). Η δομή του LPS αντιγόνου των *S* στελεχών του γένους *Brucella* απεικονίζεται στην εικόνα 4 (Cardoso και συν. 2006).



**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση της δομής του LPS αντιγόνου των *S* στελεχών του γένους *Brucella* (Cardoso και συν., 2006).

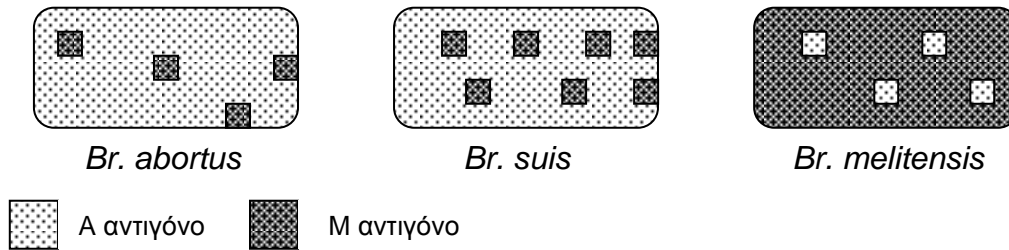
Σε όλους τους βιότυπους των ειδών του γένους *Brucella* και στην απλή αλυσίδα του Ο-αντιγόνου, έχουν διαπιστωθεί επίτοποι Α και Μ. Ο επίτοπος Α, είναι απαραίτητως ομοιοπολυμερές της 4,6-dideoxy-4-formamido-D-mannopyranose συνδεδεμένο με δεσμούς στις θέσεις 1,2. Ο επίτοπος Μ, είναι γραμμικό ομοιοπολυμερές επαναλαμβανόμενων μονάδων πεντασακχαριτών (Bandle και συν., 1987; Cloeckert και συν., 1998).

Οι ποσοτικές αναλογίες των επιτόπων Α και Μ, ποικίλλουν μεταξύ των *S* στελεχών και βιοτύπων του γένους *Brucella*, με συνέπεια ορισμένα να χαρακτηρίζονται ως Α και άλλα ως Μ επικρατούντα. Ως Α επικρατούντες θεωρούνται οι βιότυποι 1, 2, 3 και 6, της *Br. abortus*, ο βιότυπος 2 της *Br. melitensis*, οι βιότυποι 1, 2 και 4 της *Br. suis* και η *Br. neotomae*. Ως Μ επικρατούντες θεωρούνται οι βιότυποι 4, 5 και 9 της *B. abortus*, ο βιότυπος 1 της *Br. melitensis* και ο βιότυπος 5 της *Br. suis*. Στους βιότυπους 3 της *Br. melitensis* και *Br. suis*, παρατηρείται ισόποση αναλογία και των δύο αντιγονικών καθοριστών Α και Μ (Meikler και συν., 1986).

Οι δύο αυτοί επίτοποι βρίσκονται και στα τρία είδη *Brucella S* φάσης (*Br. abortus*, *Br. melitensis* και *Br. suis*), σε διαφορετική όμως αναλογία στο κάθε είδος. Επομένως, οι αντιγονικές διαφορές μεταξύ τους είναι ποσοτικές και όχι ποιοτικές. Η αναλογία σε κάθε είδος είναι:

<i>Brucella abortus</i>	A : M = 20 : 1	(Παπαπαναγιώτου Ι.Κ.& Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα Β. 2001).
<i>Brucella melitensis</i>	A : M = 1 : 20	
<i>Brucella suis</i>	A : M = 1 : 1	

**Εικόνα 5:** φαίνεται η αναλογία των A και M αντιγόνων σε κάθε είδος. (Buxton A. & Fraser G. 1977)



Λόγω της διαφορετικής αναλογίας των A και M αντιγόνων το κάθε είδος συγκολλείται από τον αντίστοιχο ειδικό αντιορό. Έτσι το *Br. abortus* συγκολλείται από τον ειδικό A αντιορό, το *Br. melitensis* από τον ειδικό M αντιορό, ενώ στο *Br. suis* η συγκόλληση ποικίλλει ανάλογα με το βιότυπο. Τα είδη που βρίσκονται στην R φάση (*Br. canis* και *Br. onis*) δε φέρουν τα A και M αντιγόνα, αλλά ένα τρίτο, το R αντιγόνο, και έτσι συγκολλούνται μόνο από τον ειδικό R αντιορό.

Εκτός από την παρουσία των επιτόπων A και M, ο Douglas και οι συνεργάτες του (1988), ανακάλυψαν στα στελέχη των *Br. abortus* βιότυπος 1 και *Br. melitensis* βιότυπος 1, την ύπαρξη ενός επιπλέον επιτόπου, ο οποίος ονομάστηκε C. Ο επίτοπος C, συγκροτείται από κοινά ολιγοσακχαρίδια τεσσάρων ή λιγότερων σακχάρων και θεωρείται υπεύθυνος για την ικανότητα των αντιγόνων A-επικρατούντων στελεχών του *Br. abortus* βιότυπος 1, να ανιχνεύουν αντισώματα που παράγονται μετά από μόλυνση με M-επικρατούντα στελέχη της *Br. melitensis* βιότυπος 1 (Mac Millan, 1990; Diaz-Aparicio και συν., 1993; Cloeckaert και συν., 1998).

Στα στελέχη του γένους *Brucella* που σχηματίζουν αδρές αποικίες (Rough στελέχη, R στελέχη), το O-αντιγόνο απουσιάζει (Corbel και συν., 1984). Εξαιτίας αυτού, η σύσταση της εξωτερικής στιβάδας του βακτηρίου είναι τροποποιημένη, με συνέπεια, οι πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης (Outer membrane proteins) να αποτελούν τα κύρια και ανοσοεπικρατούντα αντιγόνα (Moriyon, 2002). Στα R στελέχη, το λιποειδές A είναι πλούσιο σε λιπαρά οξέα και προσομοιάζει με το αντίστοιχο των S στελεχών. Ο πυρήνας του ολιγοσακχαρίτη αποτελείται από γλυκόζη και μαννόζη, ενώ τα υπόλοιπα σάκχαρα που υπάρχουν στα S στελέχη απουσιάζουν (Moreno και συν., 1984).

**ii) Πολυσακχαρίτες B (poly-B):** Στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων του γένους *Brucella*, διαπιστώθηκε η ύπαρξη πολυσακχαριτών μικρού μοριακού βάρους, οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν ως πολυσακχαρίτες B (poly-B). Οι πολυσακχαρίτες αυτού του είδους λήφθηκαν μετά από επεξεργασία με τριχλωρο-οξικό οξύ κυττάρων των στελεχών *Br. melitensis* 16M και *Br. abortus* 45/20 και την εφαρμογή μεθόδων ήπιου διαχωρισμού. Από την ανάλυση κεκαθαρμένων poly-B αντιγόνων, διαπιστώθηκε ότι αυτά αποτελούνται από αμιγή γλυκάνη, η οποία ανήκει στην κατηγορία των κυκλικών πολυμερών της β-D-γλυκοπυρανόζης. Τα πολυμερή αυτά συγκροτούνται από 17 έως 24 αντίστοιχες μονάδες, ενωμένες με δεσμούς στις θέσεις 1,2, οι οποίες διατάσσονται κυκλικά, ώστε να σχηματίζεται δακτύλιος και προσομοιάζουν με τη κυκλική D-γλυκάνη που παράγεται και από άλλα είδη βακτηρίων, όπως *Rhizobium*, *Agrobacterium*, κτλ (Bundle και συν., 1987).

Τα κεκαθαμένα poly B αντιγόνα, δε σχετίζονται αντιγονικά με τους επιτόπους A και M των βακτηρίων του γένους *Brucella*. Επομένως δε σχηματίζουν σύμπλοκα με

αντισώματα που περιέχονται σε αντι-A και αντι-M ορούς. Η αντιγονική αυτή ιδιότητα, η οποία αρχικά αποδόθηκε στους πολυσακχαρίτες αυτού του είδους (Jones και συν., 1980), με (σε) μεταγενέστερες έρευνες αποδείχθηκε ότι οφειλόταν στην έκφραση των αντιγονικών χαρακτηριστικών του Ο-αντιγόνου που υπήρχε στα μη κεκαθαρμένα εκχυλίσματα κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν (L'von και συν., 1987; Bundle και συν., 1987).

Σε έρευνες αποδείχθηκε ότι τα poly-B αντιγόνα είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης βοοειδών, προβάτων και αιγών, αλλά και για τη διαφοροποίηση των αντισωμάτων που παράγονται μετά από φυσική μόλυνση, από τα αντίστοιχα που παράγονται μετά από εμβολιασμό (Lord και συν. 1992; Erdenebaatar και συν. 2002). Οι δοκιμές ανοσοδιάχυσης που στηρίζονται στη χρήση αυτού του είδους των αντιγόνων έχουν χρησιμοποιηθεί στην Ισπανία κατά την εφαρμογή προγραμμάτων εκρίζωσης της βρουκέλλωσης των βοοειδών. Ωστόσο, οι συγκεκριμένες δοκιμές δε συμπεριλαμβάνονται μεταξύ των εγκεκριμένων που έχουν οριστεί σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης των προβάτων και των αιγών (ΟΙΕ 2004a).

**iii) Απτένια (Haptens):** Τα απτένια είναι μόρια ή χημικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, (χαμηλότερο από 1000 Da), τα οποία δεν έχουν αντιγονικές ιδιότητες. Ωστόσο, η σύνδεσή τους με μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια-φορείς, αφενός οδηγεί στο σχηματισμό συμπλόκων μοριακού βάρους μεγαλύτερου από το αντίστοιχο των απτενίων, αφετέρου τροποποιεί την επιφάνεια των πρωτεϊνών-φορέων, με το σχηματισμό νέων επιτόπων. Τα παραγόμενα σύμπλοκα απτενίων-φορέων, ως μεγαλομοριακές ουσίες, δρουν ως αντιγόνα και διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα προς παραγωγή αντισωμάτων έναντι τριών τύπων επιτόπων: α) των αμετάβλητων επιτόπων του φορέα, β) των τροποποιημένων που δημιουργήθηκαν από τη σύνδεση απτενίου-φορέα και γ) των επιτόπων του απτενίου (Tizard 2007; Κοπτόπουλος 2008).

Η ύπαρξη απτενίων στο βακτηριακό κύτταρο *Brucella*, διαπιστώθηκε από τους Miles και Pirie (1939) πριν από περίπου 69 χρόνια, τα οποία και ταυτοποιήθηκαν ως υδατοδιαλυτά, «γηγενή απτένια» (Native Haptens - NH) (Cherwonogrodzky και συν. 1990). Αυτά είναι δυνατόν να εξαχθούν μετά από ήπια επεξεργασία του λιποπολυσακχαρίτη των βακτηρίων του γένους *Brucella* με μεθόδους που δεν καταστρέφουν τους ομοιοπολικούς δεσμούς στη δομή του S-LPS. Τα αντιγόνα αυτού του είδους έχουν χαρακτηριστεί ως πολυσακχαρίτες μεγάλου μεγέθους, οι οποίοι δε διαθέτουν KDO και μπορεί να βρίσκονται συνδεδεμένοι με πρωτεΐνη. Άλλοι ερευνητές έχουν μελετήσει κεκαθαρμένα NH και έχουν διαπιστώσει ότι προσομοιάζουν αντιγονικά με το Ο-αντιγόνο που απομονώνεται μετά από επεξεργασία του S-LPS με οξύ. Στα κεκαθαρμένα NH, έχουν ανιχνευτεί γλυκόζη και υπολείμματα KDO, γεγονός που υποδεικνύει ότι προέρχονται από τον λιποπολυσακχαρίτη (Moreno και συν. 1981; Perera και συν. 1984; Hoffman και συν. 1986; Zygmunt και συν. 1988).

Οι Aragon και συν. (1996) διαπίστωσαν ότι τα NH βρίσκονται σε σημαντική ποσότητα στην εξωτερική μεμβράνη του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων του γένους *Brucella*, ενώ αντίθετα στο κυτταρόπλασμα ανιχνεύεται εξαιρετικά μικρή ποσότητα. Τα NH είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν και ως διαγνωστικά αντιγόνα για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης σε πρόβατα και αίγες, ενώ αναφέρεται ότι διαθέτουν και την ικανότητα να διακρίνουν αντισώματα που παράγονται μετά από εμβολιασμό, από τα αντίστοιχα που παράγονται μετά από φυσική μόλυνση (Diaz-Aparicio και συν. 1993; Marin και συν. 1999; ΟΙΕ 2004b).

**iv) Οι πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος (Outer membrane proteins, Omps):**

Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του κυτταρικού τοιχώματος (Omps) των βακτηρίων του γένους *Brucella* ταυτοποιήθηκαν το 1980 και ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες με βάση το μοριακό τους βάρος (MB). Στην πρώτη και δεύτερη κατηγορία, κατατάσσονται πρωτεΐνες με MB 88-94 kDa και 36-38 kDa αντίστοιχα, ενώ στην τρίτη κατηγορία κατατάσσονται πρωτεΐνες με MB 25-27 και 31-34 kDa (Winter 1987, Cloeckaert και συν. 1990).

Σύμφωνα με τον Cloeckaert (1990), τα Omp αντιγόνα φέρουν επίτοπους στην εξωτερική μεμβράνη του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων του γένους *Brucella*. Διαπιστώθηκε ότι η αναλογία των επίτοπων είναι ιδιαίτερα χαμηλή στα S στελέχη, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους των R στελεχών. Τα Omp αντιγόνα κωδικοποιούνται από ποικίλα γονίδια, τα οποία διαφέρουν μεταξύ των ειδών, βιοτύπων και στελεχών των βακτηρίων του γένους *Brucella* (Moriyón και συν. 1998).

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν πρωτεΐνες της ομάδας των πουρινών, όπως επίσης και λιποπρωτεΐνες που προσομοιάζουν με τις λιποπρωτεΐνες Braun του κυτταρικού τοιχώματος της *E. coli*. Οι πρωτεΐνες Omp 36 kDa και Omp 38 kDa, κωδικοποιούνται από τα γονίδια *omp2a* και *omp2b*, τα οποία παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό ομόλογων αλληλουχιών, γεγονός που υποδεικνύει μεγαλύτερη από 85% ομοιογένεια. Εικάζεται ότι ορισμένες πουρίνες είναι στενά συνδεδεμένες με τα LPS αντιγόνα και τα λιπίδια του κυτταρικού τοιχώματος (Moriyón και συν. 1983).

Οι πρωτεΐνες της τρίτης κατηγορίας, Omp 25 kDa και Omp 31 kDa κωδικοποιούνται από τα γονίδια *omp25* and *omp31* αντίστοιχα και παρουσιάζουν μεταξύ τους περιορισμένη ομοιογένεια που ανέρχεται σε ποσοστό 34%. Σε σύγκριση με τις πουρίνες, φέρουν περισσότερους επιτόπους στο επιμέρους τμήμα που καλύπτεται από την εξωτερική στοιβάδα του κυτταρικού τοιχώματος (Winter 1987).

Οι Omp 25 kDa, παρουσιάζουν μεγαλύτερο αριθμό συνδέσεων με τα LPS αντιγόνα σε σχέση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος και θεωρείται ότι αποτελούν παράγοντες που σχετίζονται με την παθογόνο δράση των στελεχών *Br. melitensis*, *Br. abortus* και *Br. ovis*. Όσον αφορά τις Omp 31 kDa, αυτές απουσιάζουν από το κυτταρικό τοίχωμα της *B. abortus*, ενώ υπάρχουν στα υπόλοιπα είδη του γένους *Brucella* (Cloeckaert και συν. 2002).

**β) Εσωτερικά αντιγόνα:** Στο εσωτερικό του κυτάρου των βακτηρίων *Brucella* spp., έχουν ταυτοποιηθεί πρωτεΐνες και λιπίδια. Τα δομικά αυτά συστατικά, χαρακτηρίζονται από ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες και η αναλογία τους ποικίλλει μεταξύ των S και R στελεχών (Cherwonogrodzky και συν. 1990). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ελάχιστες διαφορές μεταξύ των ειδών του γένους *Brucella*, όπως αποδείχθηκε με την εφαρμογή της μεθόδου της ανοσοηλεκτροφόρησης και τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων (Cherwonogrodzky και συν. 1990).

Σύμφωνα με έρευνες που έγιναν με σκοπό την αξιολόγηση της αντιγονικότητας αυτών των πρωτεϊνών, εκτιμάται ότι οι πρωτεΐνες MB 15 kDa, 17 kDa, 18 kDa, 28 kDa (bp26) και 39 kDa, μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως αντιγόνα για τη διάγνωση της μόλυνσης από βακτήρια του γένους *Brucella* (Goldbaum και συν. 1993; Hemmen και συν. 1995; Rossetti και συν. 1996; Letesson και συν. 1997). Επιπλέον, θεωρείται ότι πρωτεΐνες MB 19, kDa 24 kDa, 28 kDa, 32 kDa και 54 kDa, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στην εφαρμογή ορολογικών δοκιμών, προκειμένου να καταστεί δυνατή η διαφοροποίηση ζώων εμβολιασμένων με εμβόλιο Rev-1, από τα αντίστοιχα μολυσμένα με φυσικό στέλεχος *Br. melitensis* (Debbarh και συν., 1995). Έχει

διαπιστωθεί επίσης ότι, ορισμένες από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες των S και R στελεχών *Brucella* spp., χαρακτηρίζονται από αλλεργιογόνο ιδιότητα. Τα πρωτεϊνικά αντιγόνα που λαμβάνονται ως προϊόντα εκχύλισης μετά από επεξεργασία R στελεχών με αλατούχα διαλύματα, δεν περιέχουν S-LPS αντιγόνα και είναι γνωστά αλλεργιογόνα με την ονομασία «βρουκελλίνη». Τα κλάσματα αυτά, τα οποία αναμφίβολα δε σχετίζονται με τις πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος, μετά από ενδοδερμική έγχυσή σε ζώα, προκαλούν υπερευαισθησία επιβραδυνόμενου τύπου (DTH) (Alton *et al* 1988; Blasco *et al* 1994b).

Από τις πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος διαπιστώθηκε ότι η ριβοσωμική πρωτεΐνη MB 12 kDa, που κωδικοποιείται από το ριβοσωμικό γονίδιο L7/L12, αποτελεί το κύριο αλλεργιογόνο συστατικό της βρουκελλίνης INRA. Η βρουκελλίνη αναφοράς παρασκευάζεται από το INRA-II (Nouzilly-Γαλλία) και διεγείρει μηχανισμούς κυτταρικής ανοσίας (Bachrach και συν., 1994). Οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες θεωρείται ότι προσφέρουν ικανοποιητικά επίπεδα προστασίας κατά της μόλυνσης με βακτήρια του γένους *Brucella*. Αναφέρεται ότι οι πρωτεΐνες αυτές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή εμβολίων DNA, για την πρόληψη της βρουκέλλωσης στα μικρά μηρυκαστικά (Corbel 1976; Oliveira *et al* 1996; *et al* 1997).

**γ) In vivo αντιγόνα (In vivo antigens):** Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα των *Brucella* spp., που αναπτύσσονται μέσα στον ξενιστή εμφανίζουν αξιοσημείωτες διαφορές σε σχέση με αυτά των καλλιεργειών. Για παράδειγμα, κύτταρα *Br. abortus* που απομονώθηκαν από πλακούντα ασθενών βοοειδών εμφάνιζαν μεγαλύτερη αντοχή στην ενδοκυτταρική καταστροφή τους μέσα στα μακροφάγα, σε σχέση με τις ίδιες κυτταρικές σειρές που αναπτύχθηκαν *in vitro* (Corbel M.J. 1998). Φαίνεται ότι κατά την *in vivo* ανάπτυξη παράγεται κάποιος προστατευτικός παράγοντας που δεν παράγεται *in vitro*. Η σύσταση του προστατευτικού αυτού παράγοντα που σχετίζεται με το κυτταρικό περίβλημα, δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη.

Το βακτήριο επίσης σε δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος απαντά με την παραγωγή πρωτεϊνών θερμικού shock (heat shock proteins) παρόμοιων με τις GroEL και Htr πρωτεΐνες της *E. coli*.

Σε συνθήκες όξινου περιβάλλοντος συνθέτει πρωτεΐνες σχετιζόμενες με καταστάσεις stress. Σε pH 6,5 – 4,5 οι πρωτεΐνες που παράγονται έχουν σχέση με τη διατήρηση της ομοιόστασης, ενώ σε pH 3,8 έχουν σχέση με την προσπάθεια για επιβίωση σε πολύ όξινο περιβάλλον (Lin J. & Ficht T.A. 1995). Τα *in vivo* αντιγόνα που παράγονται βοηθούν στη κατανόηση των μηχανισμών επιβίωσης των βακτηρίων *Brucella* spp. μέσα στα μακροφάγα κύτταρα του ξενιστή (Corbel M.J. 1998).

## **E. Ανοσολογία της βρουκέλλωσης των αιγών και προβατων**

### **1. Μηχανισμοί ανοσίας**

Η αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή στη μόλυνση με βακτήρια του γένους *Brucella* spp. στηρίζεται σε μηχανισμούς όμοιους με τους αντίστοιχους που ενεργοποιούνται μετά από μόλυνση με βακτήρια, τα οποία αναπτύσσονται ενδοκυτταρικά. Ουσιαστικά, πρόκειται για την ανάπτυξη ενός αμυντικού μηχανισμού που βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ παραγόντων της χυμικής και της κυτταρικής ανοσίας. Η χυμική ανοσία σχετίζεται άμεσα με τη δραστηριοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων, ενώ η

κυτταρική με τη διέγερση των Τ-λεμφοκυττάρων και την χρήση αυτών και των προϊόντων τους. Ωστόσο, επειδή τα βακτήρια εντοπίζονται και αναπαράγονται ενδοκυτταρικά, η εγκατάσταση της κυτταρικής ανοσίας θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική για την προστασία του ξενιστή από τα βακτήρια αυτού του είδους (Mackaness 1964 & 1969; Araya *et al* 1989; Tizard 2007; Κοπτόπουλος 2008).

## 2. Αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστή και βακτηρίων *Brucella* spp.

Τα βακτήρια *Brucella* spp., μετά την είσοδό τους στον οργανισμό των ξενιστών, αφού επιβιώσουν από τη δράση των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων κυττάρων, προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα των πλησιέστερων προς τις πύλες εισόδου, λεμφογαγγλίων. Στο εσωτερικό των μακροφάγων τα βακτήρια αναστέλλουν τη δράση των λυσοσωμάτων και αναπτύσσουν αντισταθμιστικούς μηχανισμούς, προκειμένου να καταστήσουν το μικροπεριβάλλον του φαγοσώματος ιδανικό για την επιβίωση και την αναπαραγωγή τους (Frenchick *et al* 1985; Canning *et al* 1986; Jiang *et al* 1993; Celli 2006; Alton *et al* 2006).

Η μοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστή και βακτηρίων *Brucella* spp. πυροδοτείται μετά από «παρουσίαση» των βακτηριακών αντιγόνων από τα μακροφάγα. Προϋπόθεση για την έναρξη της διαδικασίας αυτής είναι η επαφή των μακροφάγων με τα βακτήρια (Tizard 2007). Εικάζεται ότι η σύνδεση των LPS αντιγόνων των ειδών *Brucellae* στην επιφάνεια των μακροφάγων, πραγματοποιείται μέσω των υποδοχέων CD14 (Splitter 2006). Η ενεργοποίηση των μηχανισμών της χυμικής και κυτταρικής ανοσίας, επιτυγχάνεται με τη διέγερση των Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων (Th2 και Th1) μετά από παρουσίαση των αντιγόνων επιφάνειας των μακροφάγων στα κύτταρα αυτά. Η αναγνώριση των αντιγόνων αυτών επιτυγχάνεται μέσω των ειδικών υποδοχέων CD4 (Roitt *et al* 1998; Tizard 2007). Μετά από αναγνώριση των αντιγόνων από τα Th2 και Th1 κύτταρα, ακολουθεί η σύνδεσή τους με τα μακροφάγα. Η σύνδεση αυτή, πυροδοτεί την παραγωγή ποικίλων κιτοκινών (Ιντερλευκίνες, Interleukines-IL και ιντερφερόνη-γ, INF-γ) (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 και INF-γ) οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διαφοροποίηση των ανοσοκυττάρων σε πλασμοκύτταρα και κύτταρα μνήμης.

Τα κύτταρα μνήμης, έχουν την ικανότητα να «θυμούνται» προηγούμενες εκθέσεις στο ίδιο αντιγόνο. Καθώς είναι ευαισθητοποιημένα, δραστηριοποιούνται πολύ γρήγορα όταν δεχθούν το ίδιο αντιγονικό ερέθισμα και παράγουν νέα αντισώματα (Splitter 2006; Tizard 2007; Κοπτόπουλος 2008). Παράλληλα με την παραγωγή αντισωμάτων, διεγείρονται οι μηχανισμοί της κυτταρικής ανοσίας, οι οποίοι πυροδοτούνται από τη διέγερση των Th1 κυττάρων. Τα Th1 κύτταρα παράγουν INF-γ αλλά και IL-2, οι οποίες σηματοδοτούν την παραγωγή θυγατρικών διαφοροποιημένων Τ κλώνων, με ποικίλες δραστηριότητες. Τα κύτταρα αυτά είναι ευαισθητοποιημένα εκκρίνουν διάφορα είδη κιτοκινών και διακρίνονται στα Τ-δραστικά, Τ-κυτταροτοξικά και Τ-κύτταρα μνήμης (Tizard 2007; Κοπτόπουλος 2008).

## 3. Ο ρόλος της κυτταρικής ανοσίας

Η ρόλος της κυτταρικής ανοσίας, επισημάνθηκε αρχικά από τον Mackaness το 1964. Ο εν λόγω ερευνητής, παρατήρησε ότι επίμυες που μολύνθηκαν ενδοφλέβια με *B. abortus* στέλεχος 19, παρουσίασαν ανθεκτικότητα στη μόλυνση από *Listeria*



*monocytogenes*. Μετά από *in vitro* δοκιμές, ο ίδιος ερευνητής προσδιόρισε την ύπαρξη μη ειδικού ανοσολογικού μηχανισμού, μετά από τη διαπίστωση, ότι τα μακροφάγα των μολυσμένων με *Br. abortus* επίμυων, εξουδετέρωσαν το 99% του πληθυσμού των βακτηρίων *Listeria* που φαγοκυτταρώθηκαν (Mackanness 1964 & 1969).

Μεταγενέστερες έρευνες, οι οποίες στηρίχθηκαν στη χρήση ποικίλων μικροβιακών προτύπων που αναπτύσσονται ενδοκυτταρικά (*Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*), αναφέρουν τη σπουδαιότητα του ρόλου της κυτταρικής ανοσίας στην εγκατάσταση αμυντικού μηχανισμού που παρέχει προστασία κατά της μόλυνσης με βακτήρια αυτού του είδους (Cheers 1997).

Η εγκατάσταση της κυτταρικής ανοσίας μετά από μόλυνση με βακτήρια *Brucella* θεωρείται θεμελιώδης τόσο για την εξουδετέρωση των βακτηρίων, όσο και για την ανάπτυξη ισχυρού αμυντικού μηχανισμού του ξενιστή (Araya *et al* 1989). Η προστασία η οποία παρέχεται, οφείλεται στην αλληλεπίδραση παραγόντων, ως αποτέλεσμα παρουσίασης των αντιγόνων των βακτηρίων στα ανοσοκύτταρα του ξενιστή.

Μεταξύ των παραγόντων, οι κιτοκίνες και ιδιαίτερα η INF- $\gamma$ , διαδραματίζει το σημαντικότερο ρόλο. Σύμφωνα με έρευνες, η χορήγηση ανασυνδυασμένης INF- $\gamma$  σε επίμυες, αυξάνει την αντίσταση κατά της μόλυνσης με *Br. abortus* (Stevens και συν. 1992). Μετά από *in vitro* δοκιμές, διαπιστώθηκε ότι μακροφάγα που έχουν ενεργοποιηθεί μετά από δράση της INF- $\gamma$ , αναστέλλουν αποτελεσματικότερα την ενδοκυτταρική ανάπτυξη της *B. abortus*, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μη ενεργοποιημένα (Jones και συν. 1992; Jiang και συν. 1993). Αντίθετα, σε επίμυες που μολύνθηκαν με *Br. abortus*, η αναστολή δράσης της INF- $\gamma$ , που προκαλείται με χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAb), έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της ικανότητας «εκκαθάρισης» των βακτηρίων *in vivo*, όπως αποδεικνύεται μετά από έρευνες (Zhan *et al* 1993). Μεταγενέστερες έρευνες αποδεικνύουν τη σπουδαιότητα της INF- $\gamma$  στον περιορισμό, τον έλεγχο της διασποράς και την εξουδετέρωση των βακτηρίων στον οργανισμό των ξενιστών (Oliveira *et al* 1995; Murphy *et al* 2001).

Η INF- $\gamma$  επιδρά στα μακροφάγα αντισταθμιστικά. Επαναφέρει τις φυσιολογικές τους λειτουργίες πυροδοτώντας τον οξειδωτικό μεταβολισμό, και την παραγωγή τοξικών προϊόντων από αυτά. Ως εκ τούτου, διεγείρει τη βακτηριοκτόνο δράση των μακροφάγων και κατά συνέπεια, η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων καθίσταται αδύνατος στο εσωτερικό τους (Jones *et al*, 1992; Stevens *et al*, 1992; Jiang *et al*, 1993; Zhan *et al*, 1993; Tizard, 2007). Ιδιαίτερος είναι και ο ρόλος της IL-12. Η κιτοκίνη αυτή πυροδοτεί έμμεσα τους μηχανισμούς διαφοροποίησης των T-λεμφοκυττάρων και την έκκριση INF- $\gamma$ , που είναι απαραίτητη για τη διέγερση της βακτηριοκτόνου δράση των μακροφάγων (Hsieh *et al* 1993; Sypek *et al* 1993). Εκτός από τις κιτοκίνες, τα T-κυτταροτοξικά κύτταρα, ως προϊόντα εγκατάστασης της κυτταρικής ανοσίας, αναγνωρίζουν μέσω των υποδοχέων τους τα μολυσμένα μακροφάγα, συνδέονται με αυτά και προκαλούν τη λύση τους, με αποτέλεσμα την καταστροφή των βακτηρίων (Oliveira 1995; Jinkyung *et al* 2003).

Η εγκατάσταση της κυτταρικής ανοσίας ανιχνεύεται με δοκιμές *in vivo* και *in vitro*, οι οποίες μπορεί να εφαρμοστούν στα ζώα για τη διάγνωση της μόλυνσης από βακτήρια *Brucella*. Με τις δοκιμές αυτές προσδιορίζεται η δραστηριότητα των T-λεμφοκυττάρων, όπως επίσης και η ποσότητα των κιτοκινών που εκκρίνονται από αυτά (FAO/WHO 1986; Blasco *et al* 1994b; Weynants *et al* 1995).

*In vivo*, τα ευαισθητοποιημένα T-λεμφοκύτταρα μετά από νέα επαφή με αντιγόνα του γένους *Brucella*, εκκρίνουν κιτοκίνες, οι οποίες προσελκύουν τα

μακροφάγα στον τόπο της φλεγμονής, προκαλώντας κυτταρική διήθηση και οίδημα (δερματική αντίδραση) (Tizard 2007; Κοπτόπουλος 2008). In vitro, είναι δυνατό να προσδιοριστεί με ορολογική δοκιμή ELISA, η ποσότητα INF- $\gamma$  που παράγεται από τα ευαισθητοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, μετά από επώαση με αντιγόνα *Brucella* (Weynants *et al* 1995).

#### 4. Ανοσοσφαιρίνες

Δεδομένου ότι η ορολογική διάγνωση στηρίζεται στην εφαρμογή δοκιμών που ανιχνεύουν ανοσοσφαιρίνες των κλάσεων M (IgM) και G (IgG), θεωρείται σκόπιμο να αναφερθούν τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά αυτών.

Οι IgM είναι θερμοευαίσθητες. Σε όξινο περιβάλλον (pH 3,6) η ικανότητα συγκόλλησης τους με βακτηριακά αντιγόνα μειώνεται σημαντικά (Corbel 1973), ενώ μεταξύ των υπολοίπων ανοσοσφαιρινών, είναι οι μόνες ευαίσθητες στη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων. Οι προαναφερθείσες ιδιότητες επιτρέπουν τη διάκριση των IgM από τις IgG.

Σε σύγκριση με τις IgG, οι IgM χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ικανότητα συγκόλλησης με αντιγόνα, ενεργοποίησης παραγόντων του συμπληρώματος και οψονοποίησης (Tizard 2007).

Όσον αφορά στην ικανότητα των IgM να δεσμεύουν το συμπλήρωμα, αυτή επηρεάζεται από τη θερμοκρασία αδρανοποίησης των υπό εξέταση ορών. Όταν οι οροί αδρανοποιούνται σε θερμοκρασία 56°C η ικανότητα δέσμευσης του συμπληρώματος επηρεάζεται ελάχιστα, ενώ όταν αδρανοποιούνται στους 62-65°C, αυτή αναστέλλεται πλήρως (Amerault *et al* 1962; Alton *et al* 1988; Nielsen 2002). Οι IgG περιλαμβάνουν δύο υποκλάσεις, την IgG<sub>1</sub> και IgG<sub>2</sub>. Σε όξινο περιβάλλον (pH 3,6) η ικανότητα συγκόλλησης των IgG<sub>1</sub> με βακτηριακά αντιγόνα αυξάνεται σημαντικά (Corbel 1973). Στα πρόβατα και στις αίγες, οι κύριες ανοσοσφαιρίνες που δεσμεύουν το συμπλήρωμα ανήκουν στην υποκλάση G<sub>1</sub>(IgG<sub>1</sub>), ενώ αντίθετα οι ανοσοσφαιρίνες της υποκλάσης G<sub>2</sub> (IgG<sub>2</sub>), δεν το δεσμεύουν. Επιπλέον, οι IgG<sub>2</sub> παρεμποδίζουν τη σύνδεση του συμπληρώματος με άλλες ανοσοσφαιρίνες και κατά συνέπεια, οδηγούν στην εμφάνιση του φαινομένου της προζώνης (Alton *et al* 1988; Nielsen 2002). Οι IgG διατηρούν τη συγκολλητινογόνο ικανότητά τους μετά από θέρμανση στους 62-65°C για 15min και παραμένουν ανθεκτικές στη δράση της  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλης, διθειοθειτρώλης και ριβανόλης (Alton *et al* 1988).

#### 5. Παραγωγή ανοσοσφαιρινών μετά από φυσική ή πειραματική μόλυνση

Μετά τη μόλυνση προβάτων και αιγών με φυσικά στελέχη του *Br. melitensis*, παράγονται αντισώματα κατά του κύριου και ανοσοεπικρατούντος αντιγόνου S-LPS του βακτηρίου, τα οποία και ανιχνεύονται με τις κλασικές ορολογικές δοκιμές RB και CF (Jimenez de Bagüés *et al* 1992). Παραγωγή αντισωμάτων κατά του ίδιου S-LPS αντιγόνου ανιχνεύθηκε και σε επίμυες που μολύνθηκαν πειραματικά με βακτήρια *Br. melitensis* (Cloekaert *et al* 1992; Cloekaert *et al* 1995a).

Ωστόσο, έχει αποδειχθεί σε πρόβατα ότι μετά από φυσική ή πειραματική μόλυνση, αντισώματα δεν παράγονται αποκλειστικά και μόνο κατά των S-LPS αντιγόνων. Διαπιστώθηκε ότι αντισώματα παράγονται κατά των Omps αντιγόνων του κυτταρικού τοιχώματος, αλλά και κατά κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών ποικίλου MB.

Σύμφωνα με έρευνα των Zygmunt *et al* (1994), αποδείχθηκε σε πρόβατα ότι μετά από φυσική μόλυνση παρατηρείται έντονη ανοσολογική απάντηση, η οποία εκδηλώνεται με παραγωγή αντισωμάτων κατά των κύριων Omps αντιγόνων MB 25-27, 31-34, 36-38 kDa, αλλά και μικρού MB, όπως 16.5, 19, 89 kDa. Σε παρόμοια μελέτη ο Debbarch, διαπίστωσε επίσης σε πρόβατα ότι μετά από φυσική και πειραματική μόλυνση, παρατηρείται ανοσολογική αντίδραση με παραγωγή IgG ανοσοσφαιρινών κατά πρωτεϊνών MB 19, 24, 28, 32, και 54 kDa. Επίσης, μετά από μόλυνση με φυσικά στελέχη της *Br. melitensis*, διαπιστώθηκε η ύπαρξη ανοσοσφαιρινών κατά πρωτεϊνών διαφορετικού MB (10, 12, 23, 36, 38, 42, 46, 68, 80, και 92 kDa) (Debbarch *et al* 1996).

Η ανίχνευση υψηλών τίτλων IgM στον ορό του αίματος, υποδηλώνει πρόσφατη μόλυνση, ενώ χαμηλών δεν αποκλείει την ενεργό μόλυνση. Το είδος και η κατανομή των παραγόμενων ανοσοσφαιρινών, επηρεάζεται από παράγοντες που σχετίζονται με την οδό μόλυνσης, τη μολύνουσα δόση, τη διάρκεια έκθεσης στα βακτηριακά αντιγόνα, την ηλικία και το στάδιο εγκυμοσύνης του ξενιστή. Μεγάλη διακύμανση, όσον αφορά τη συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών, παρατηρείται και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους (FAO/WHO 1986). Όταν η μόλυνση με βακτήρια *Brucella* πραγματοποιείται μέσω του βλεννογόνου του επιπεφυκότα, το χρονικό διάστημα το οποίο μεσολαβεί μέχρι να αναπτυχθούν τίτλοι αντισωμάτων διαγνωστικά σημαντικοί, είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο, μετά από υποδόρια μόλυνση (Mac Millan 1990a). Η σταθερή και παρατεταμένη έκθεση του ξενιστή σε μικρό αριθμό βακτηρίων, όπως παρατηρείται στις χρόνιες μολύνσεις, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη χαμηλού τίτλου ανοσοσφαιρινών που δε συνοδεύεται από κλινικά συμπτώματα. Επίσης, σε σημαντικό αριθμό μολυσμένων ζώων, δεν ανιχνεύονται IgG μέχρι τον τοκετό ή την αποβολή ή ακόμα και 1 έως 3 εβδομάδες αργότερα (FAO/OMS 1971; FAO/WHO 1986). Ο τίτλος των IgG<sub>2</sub> αυξάνει μετά από επαναλαμβανόμενη έκθεση στα βακτηριακά αντιγόνα. Όπως συμβαίνει στα βοοειδή, εικάζεται ότι και στα πρόβατα και στις αίγες η σχέση ολικής συγκέντρωσης μεταξύ των IgG<sub>2</sub> και IgG<sub>1</sub> στον ορό αίματος μεταβάλλεται στο τελευταίο στάδιο της κυοφορίας, λόγω εκλεκτικής μετακίνησης των IgG<sub>1</sub> στους μαστικούς αδένες και τον εντοπισμό τους στο πρωτόγαλα (FAO/WHO 1986). Τα νεογέννητα, τα οποία προέρχονται από μολυσμένες μητέρες, δεν παράγουν ανοσοσφαιρίνες μέχρι την ηλικία των δύο μηνών, ενώ στον ορό του αίματός τους, μπορεί να ανιχνεύονται ανοσοσφαιρίνες που έχουν προσλάβει με το πρωτόγαλα. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή ορολογικών δοκιμών σε αμνούς αυτής της ηλικίας, δεν έχει καμία διαγνωστική αξία (Alton 1990b).

## 6. Παραγωγή ανοσοσφαιρινών μετά από εμβολιασμό

Σε εμβολιασμένα πρόβατα παράγονται αντισώματα κατά του λιποπολυσακχαρίτη (S-LPS) του βακτηρίου (Jimenez de Bagüés *et al* 1992, Zygmunt *et al* 1994), αλλά και κατά των Omps αντιγόνων του κυτταρικού τοιχώματος και των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών ποικίλου MB, όμοια με τα αντίστοιχα που παράγονται μετά από μόλυνση με φυσικά στελέχη της *Br. melitensis* (Zygmunt *et al* 1994; Debbarch *et al* 1995).

Σε πρόβατα εμβολιασμένα με εμβόλιο Rev-1 παράγονται ανοσοσφαιρίνες κατά των Omps αντιγόνων MB 36-38, 60, 70-73 και 89 kDa (Zygmunt *et al* 1994). Αναφέρεται επίσης ότι παράγονται ανοσοσφαιρίνες IgG κατά των Omps αντιγόνων MB 39 και 50 kDa, ενώ δεν παράγονται ανοσοσφαιρίνες κατά των Omps αντιγόνων

MB 25-27, 31-34 ή άλλων πρωτεϊνών χαμηλού MB 19, 24, 28, 32, και 54 kDa, όπως συμβαίνει μετά από μόλυνση με φυσικά στελέχη της *Br. melitensis* (Debbarch *et al* 1995). Τα αποτελέσματα των ερευνών υποδεικνύουν ότι πιθανόν, κατά τη φυσική μόλυνση, παράγονται ειδικά αντισώματα κατά πρωτεϊνών συγκεκριμένου MB. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι οι πρωτεΐνες αυτές θα μπορούσαν να αποδειχθούν διαγνωστικά χρήσιμα αντιγόνα, για τη διαφοροποίηση των μολυσμένων ζώων, από τα αντίστοιχα εμβολιασμένα με εμβόλιο Rev-1.

Σχετικά με την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος των προβάτων και αιγών στον εμβολιασμό με Rev-1, τα στοιχεία που υπάρχουν είναι ελλιπή και περιορισμένα. Ο Madad (1979), μελέτησε τις ειδικές ανοσοσφαιρίνες που παράγονται σε ορό αίματος προβάτων μετά από υποδόρια χορήγηση του εμβολίου Rev-1. Σύμφωνα με τον προαναφερόμενο ερευνητή, 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό ανιχνεύονται οι IgM, η συγκέντρωση των οποίων αυξάνεται έως και την 6<sup>η</sup> εβδομάδα. Οι IgG<sub>1</sub> εμφανίζονται παράλληλα με τις IgM ή λίγο καθυστερημένα, μεταξύ της 7<sup>ης</sup> και 14<sup>ης</sup> ημέρας και η συγκέντρωσή τους αυξάνεται έως και την 3<sup>η</sup>-4<sup>η</sup> εβδομάδα. Ο ίδιος ερευνητής αναφέρει ότι 6 μήνες μετά τον εμβολιασμό επικρατούν οι IgM, σε αντίθεση με τις IgG οι οποίες επικρατούν 6 μήνες μετά από πειραματική μόλυνση.

## **ΣΤ. Εργαστηριακή Διάγνωση της βρουκέλλωσης**

Οι εξετάσεις για την εργαστηριακή διάγνωση της νόσου διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Στην Άμεση Διάγνωση, όπου ανιχνεύεται ο ίδιος ο μικροοργανισμός, αντιγονικά στοιχεία του ή το γενετικό του υλικό, [πχ μικροσκοπική ανάδειξη βακτηρίου με χρώση Ziehl-Nielsen, καλλιέργεια, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης αληθούς χρόνου (Real time PCR) κá] και στην Έμμεση Διάγνωση, όπου εξετάζεται η ανοσοποιητική απάντηση του ξενιστή μέσω ανίχνευσης αντισωμάτων κατά των βακτηρίων του γένους *Brucella* spp., χρησιμοποιώντας ορολογικές δοκιμές σε ορό αίματος ή γάλακτος, (πχ Rose Bengal Test, Σύνδεση συμπληρώματος, ELISA).

### **1. Άμεση Διάγνωση**

#### **α. Μικροσκοπική εξέταση παρασκευασμάτων**

Είναι η απευθείας αναζήτηση των βακτηρίων του γένους *Brucella* σε μολυσμένους ιστούς ή εκκρίματα. Διενεργείται με τη μικροσκοπική εξέταση επιχρισμάτων μετά από ειδική χρώση. Το πλέον κατάλληλο παθολογικό υλικό για μικροσκοπική εξέταση είναι οι εμβρυϊκές μεμβράνες, το κολπικό έκκριμα μετά την αποβολή, το περιεχόμενο του στομάχου του εμβρύου, το σπέρμα κτλ.

Η ειδική χρώση που χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό, είναι η Ziehl-Neelsen, όπως τροποποιήθηκε από τον Stamp. Στους μολυσμένους ιστούς, τα βακτήρια του γένους *Brucella*, ανευρίσκονται ενδοκυτταρικά και εμφανίζονται ερυθρόχρωμα σε βαθύ κυανό υπόστρωμα. Ωστόσο, εκτός από τα βακτήρια *Brucella* και άλλα οξεάντοχα ενδοκυτταρικά βακτήρια, όπως *Chlamydia psittaci* και *Coxiella burneti*, τα οποία προσομοιάζουν μορφολογικά, είναι δυνατό να ανευρίσκονται σε μολυσμένους ιστούς. Κατά συνέπεια, η παρουσία τους μπορεί να οδηγήσει σε διαγνωστικά σφάλματα.

Επομένως, τα αποτελέσματα που προκύπτουν μετά από μικροσκοπική εξέταση επιχρισμάτων παθολογικού υλικού, θα πρέπει να αξιολογούνται και να συγκρίνονται, με τα αντίστοιχα των καλλιεργειών.

## β. Απομόνωση του μικροοργανισμού

### ι) Γενικές Αρχές

Η μόνη αναμφισβήτητη μέθοδος διάγνωσης της μόλυνσης από βακτήρια *Brucella* spp., τίθεται μετά από καλλιέργεια, απομόνωση και ταυτοποίηση του λοιμογόνου παράγοντα. Το καταλληλότερο υλικό για την απομόνωση του βακτηρίου από ζωντανά ζώα, θεωρείται το κολπικό έκκριμα και το γάλα, ενώ από νεκρά, ο σπλήνας και τα λεμφογάγγλια (οπισθοφαρυγγικά, ειλιακά, **οπισθομαστικά**, προμηριαία). Επίσης, κατάλληλο υλικό θεωρείται ο πλακούντας (μια καθαρή κοτυληδόνα) και ιστοί από το έμβρυο (πχ ήπαρ, περιεχόμενο στομάχου μέσα σε σύριγγα) που λαμβάνονται μετά από αποβολή του ζώου.

Η ευαισθησία της καλλιέργειας επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες, όπως: α) το πλήθος και την ικανότητα επιβίωσης των βακτηρίων, β) το είδος του δείγματος και τις συνθήκες συντήρησής του, γ) τον αριθμό των δειγμάτων που εξετάζονται από κάθε ζώο, δ) το είδος του θρεπτικού υλικού που χρησιμοποιείται και ε) τις συνθήκες επώασης των καλλιεργειών.

Για την απομόνωση του *Br. melitensis* από επιμολυσμένα παθολογικά υλικά, ως καταλληλότερο, θεωρείται το εκλεκτικό υπόστρωμα Farrell, το οποίο περιέχει τα αντιβιοτικά ναλιδιξικό οξύ και βακιτρακίνη για τον έλεγχο των επιμολύνσεων. Ωστόσο, η παρουσία των αντιβιοτικών αυτών στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται (5mg/l και 25.000U/l) σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να δράσει ανασταλτικά και να παρεμποδίσει και την ανάπτυξη ορισμένων στελεχών *Br. melitensis*.

Σε περίπτωση έντονης επιμόλυνσης του δείγματος που πρόκειται να εξεταστεί, ή όταν ο αριθμός των βακτηρίων είναι μικρός και τα απαραίτητα αντιβιοτικά για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων δεν είναι διαθέσιμα, ο ενοφθαλμισμός του παθολογικού υλικού σε πειραματόζωα (ινδικά χοιρίδια), είναι η ενδεδειγμένη μέθοδος για την ανάπτυξη και απομόνωση των βακτηρίων. Στην περίπτωση αυτή, τα πειραματόζωα λειτουργούν ως εμπλουτιστικό υπόστρωμα. Η απομόνωση του βακτηρίου επιτυγχάνεται στη συνέχεια, μετά από καλλιέργεια στα κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα, του σπλήνα, των λεμφογαγγλίων αλλά και των ιστών του πειραματόζωου που παρουσιάζουν αλλοιώσεις (ήπαρ, όρχεις, επιδιδυμίδα, αρθρώσεις).

Πιο αναλυτικά, τα βακτήρια *Brucella* spp. αναπτύσσονται στις συνήθεις αερόβιες συνθήκες εκτός από κάποια είδη, για την ανάπτυξη των οποίων απαιτείται παρουσία CO<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 5-10% (μικροαερόφιλο περιβάλλον) (Παπαπαναγιώτου Ι.Κ. & Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα Β. 2001). Για την ανάπτυξή τους είναι απαραίτητη η παρουσία διαφόρων αμινοξέων, θειαμίνης, βιοτίνης, νικοτιναμίδης, μαγνήσιου, σιδήρου και μαγγάνιου.

Η ανάπτυξη αρκετών στελεχών βελτιώνεται με την παρουσία παντοθενικού οξέος και ισοερυθριτόλης. Ειδικότερα, τα *Br. abortus*, *Br. melitensis* και *Br. suis* χρησιμοποιούν την ισοερυθριτόλη ως πηγή ενέργειας αντί της γλυκόζης. Έτσι εξηγείται και το κυριότερο σύμπτωμα της βρουκέλλωσης των αιγοπροβάτων, βοοειδών και χοίρων, το οποίο είναι η αποβολή, αφού στον πλακούντα των ζώων

αυτών υπάρχει υψηλή συγκέντρωση ισοερυθριτόλης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και τα βακτήρια *Brucella* spp. εμφανίζουν σαφή τροπισμό προς την κυοφορούσα μήτρα.

Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι 37°C με εύρος 10-40°C, ενώ το ιδανικό pH είναι 6,6-7,4. Οι πρώτες αποικίες διαμέτρου 1mm εμφανίζονται μετά από επώαση 48-72 ωρών, ενώ το μέγεθος τους φθάνει τα 2-3mm μετά από 4-5 ημέρες (Hausler W.J. *et al* 1985).

Όλα τα είδη του γένους δίνουν κατά την ανάπτυξή τους αποικίες S (Smooth) φάσης, εκτός από τα *Br. onis*, *Br. canis* και κάποια εμβολιακά στελέχη της *Br. abortus* (εμβολιακό στέλεχος RB-51), που δίνουν αποικίες R (Rough) φάσης. Στις συνθήκες ανάπτυξης στο εργαστήριο, είναι συχνή η μετάπτωση (dissociation) των S αποικιών σε αποικίες R, ενώ το αντίστροφο είναι σχετικά σπάνιο φαινόμενο. Επίσης, αρκετά συχνά εμφανίζονται αποικίες M (Mucoid) φάσης (Hausler W.J. *et al* 1985).

Όσον αφορά στη μορφολογία τους, οι αποικίες S είναι στρογγυλές, διαφανείς, γυαλιστερές, υγρές, με απαλό μελί χρώμα, ενώ διαθλούν το έμμεσο φως που προσπίπτει από πλάγια. Με την πάροδο του χρόνου, το χρώμα τους γίνεται σκοτεινότερο. Οι αποικίες της R φάσης συνήθως είναι μεγαλύτερες, ξηρές, με κοκκώδη εμφάνιση, η επιφάνεια τους εμφανίζει ρωγμές, δεν είναι διαφανείς και το χρώμα τους συνήθως είναι υπόλευκο έως ελαφρά κίτρινο. Οι αποικίες M φάσης εμφανίζονται διαυγείς με ανοικτό γκριζο χρώμα και διακρίνονται λόγω της βλεννώδους υφής τους, όταν τις αγγίξουμε με βελόνα ή κρίκο (Alton G.G. *et al* 1988).

## ii) Καλλιεργητικά υποστρώματα

Τα καλλιεργητικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των βακτηρίων *Brucella* spp. βρουκέλλας από διάφορα παθολογικά υλικά ή την ανάπτυξη πρότυπων στελεχών αναφοράς ή εμβολιακών στελεχών που χρησιμοποιούνται στην πράξη διακρίνονται σε:

### Βασικά θρεπτικά υποστρώματα:

- **Serum Dextrose agar (SDA):** χρησιμοποιείται κυρίως για την πραγματοποίηση ανακαλλιεργειών από ύποπτες καλλιέργειες, για την ανάπτυξη και διατήρηση εργαστηριακών στελεχών, καθώς επίσης και για την απομόνωση του βακτηρίου από μη επιμολυσμένο παθολογικό υλικό (Corbel M.J. *et al* 1983). Περιέχει:

- Βασικό αιματούχο άγαρ (Oxoid N° 2)
- Αδρανοποιημένο ορό ίππου
- Γλυκόζη
- Αποσταγμένο - αποστειρωμένο νερό

- **Glycerol Dextrose agar (GDA):** χρησιμοποιείται κυρίως για την εξέταση των αποικιών, όσον αφορά στο διαχωρισμό σε S, R ή M φάση (dissociation) (Corbel J. *et al* 1983). Περιέχει:

- Βασικό αιματούχο άγαρ (Oxoid)
- Γλυκερόλη
- Γλυκόζη
- Αποσταγμένο - αποστειρωμένο νερό

- **Albimi Brucella broth:** χρησιμοποιείται κυρίως για τον πολλαπλασιασμό των φάγων που λύνουν τα βακτήρια *Brucella* spp., καθώς επίσης και, όταν απαιτείται, για την καλλιέργεια των βακτηρίων σε υπόστρωμα που δεν περιέχει ορό (Corbel J. *et al* 1983). Περιέχει:

- Albimi Brucella broth (Gibco Laboratories)
- Αποσταγμένο - αποστειρωμένο νερό

- **Tryptone soya agar, Trypticase soy agar, Tryptic soy agar (TSA):** χρησιμοποιείται ως βασικό μέσο απομόνωσης των βακτηρίων από εμβολιακά στελέχη ή για ανάπτυξη και διατήρηση πρότυπων στελεχών στο εργαστήριο (Alton G.G. *et al* 1988). Περιέχει:

- Θρεπτικό άγαρ
- Πεπτόνη
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- Οπό βοδινού κρέατος
- Αποσταγμένο νερό
- Ορό ίππου (για την καλλιέργεια του βιότυπου 2 της *Br. abortus* και της *Br. ovis*).

- **Potato agar και Dehydrated potato agar:** χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα επιλογής για την καλλιέργεια του εμβολιακού στελέχους 19 της *Br. abortus* σε φιάλες Roux (Alton G.G. *et al* 1988). Περιέχει:

- Φιλτραρισμένη αλεσμένη πατάτα
- Βασικό θρεπτικό άγαρ
- Αποσταγμένο νερό
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- Πεπτόνη
- Οπό βοδινού κρέατος
- Γλυκερόλη
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH).

### Ειδικά θρεπτικά υποστρώματα

- **Kuzdas και Morse agar:** χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα ανάπτυξης του βακτηρίου σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από πολύ επιμολυσμένα παθολογικά υλικά (Alton G.G. *et al* 1988). Περιέχει:

- Βασικό άγαρ
- Αποσταγμένο νερό
- Cycloheximide ως μυκητοστατικό
- Bacitracin ως αντιβιοτικό έναντι Gram θετικών βακτηρίων
- Θειική Polymyxin B ως αντιβιοτικό έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων

- **Υπόστρωμα Farrell's ή Τροποποιημένο κατά Farrell SDA υπόστρωμα:** χρησιμοποιείται ως θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής για πολύ επιμολυσμένα υλικά (Corbel M.J. *et al* 1983, Alton G.G. *et al* 1988). Περιέχει:

- Serum Dextrose agar
- Bacitracin
- Cycloheximide
- Polymyxin B
- Vancomycin
- Nalidixic acid
- Nystatin

- **Υγρό υπόστρωμα Brodie και Sinton's:** στην ουσία πρόκειται για υγρό υπόστρωμα εμπλουτισμού που χρησιμοποιείται, όταν γίνεται προσπάθεια για την απομόνωση των βακτηρίων *Brucella* spp. από επιμολυσμένα υλικά. Αφού το δείγμα – υλικό εμπλουτιστεί, στη συνέχεια τοποθετείται σε στερεό υπόστρωμα (Corbel M.J. *et al* 1983). Περιέχει:

- Tryptone Soya Agar (TSA)
- Αδρανοποιημένο ορό ίππου
- Bacitracin
- Θειική Polymyxin B
- Nalidixic acid
- Vancomycin
- Nystatin
- Cycloheximide
- Amphotericin B
- D-cycloserine

- **Serum Dextrose Agar VCN-F υπόστρωμα:** είναι ένα τροποποιημένο Thayer Martin υπόστρωμα, το οποίο χρησιμοποιείται με επιτυχία για την απομόνωση του *Br. ovis* από το σπέρμα κριού. Επειδή είναι λιγότερο ανασταλτικό για άλλα βακτήρια σε σχέση με τα προηγούμενα μέσα ανάπτυξης, δεν ενδείκνυται ως υπόστρωμα επιλογής για την απομόνωση των *Brucella* spp. από έντονα επιμολυσμένα υλικά (Corbel M.J. *et al* 1983). Περιέχει:

- Serum Dextrose agar (SDA)
- VCN (Vancomycin-Colistin-Nystatin) αναστολέα
- Furadantin

- **Διφασικό υπόστρωμα Castañeda για καλλιέργεια αίματος:** ενδείκνυται, όταν γίνεται προσπάθεια απομόνωσης των βακτηρίων *Brucella* spp. από δείγματα αίματος. Χρησιμοποιούνται ειδικές φιάλες, στις οποίες τοποθετείται μια υγρή και μια στερεή φάση υποστρώματος. Η υγρή χρησιμοποιείται για εμπλουτισμό, ενώ η στερεή για την ανάπτυξη στη συνέχεια ευδιάκριτων αποικιών χωρίς να είναι απαραίτητες συνεχείς ανακαλλιέργειες. Περιέχει:

**Υγρή φάση**

- Dextrose broth
- Tri-sodium citrate
- Αποσταγμένο νερό
- Αδρανοποιημένο ορό ίππου



- Όλοι οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στο υπόστρωμα Farrell's (Bacitracin, Cycloheximide, Polymyxin B, Vancomycin, Nalidixic acid, Nystatin)

Στην περίπτωση ανθρώπινου δείγματος αίματος οι παραπάνω αντιμικροβιακοί παράγοντες μπορεί να παραλειφθούν (Corbel M.J. 1983).

#### Στερεή φάση

- Υπόστρωμα Farrell's
- Oxoid agar N<sup>o</sup> 1

Στην περίπτωση ανθρώπινου δείγματος μπορούν να παραλειφθούν οι αντιμικροβιακοί παράγοντες και το υπόστρωμα Farrell's να αντικατασταθεί από το βασικό υπόστρωμα SDA (Corbel M.J. 1983).

- **Υποστρώματα χρωστικών για την δοκιμή αναστολής ανάπτυξης:** χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των βιοτύπων των ειδών *Brucella* spp. ανάλογα με την αναστολή ή μη της ανάπτυξης στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Περιέχει

- Ένα από τα SDA, Trypticase soy agar ή Tryptose agar ως βασικό υπόστρωμα ανάλογα με το είδος που θα αναπτυχθεί
- Μία από τις χρωστικές Thionin, Basic Fuschin ή Safranin O ανάλογα με το είδος του που θα αναπτυχθεί.

### iii) Ταυτοποίηση της *Brucella* spp.

#### **Χρώση**

Τα βακτήρια *Brucella* spp είναι αρνητικά στη χρώση Gram. Επίσης, χωρίς να είναι πραγματικά οξεάντοχα, εμφανίζουν μέτρια αντίσταση στον αποχρωματισμό με ασθενή οξέα (πχ με οξικό οξύ), και για αυτό χρωματίζονται ερυθρά στη χρώση Stamp (τροποποιημένη Ziehl-Neelsen) (Alton *et al* 1988).

#### **Συγκόλληση με πολυδύναμο αντιορό *Brucella* spp.**

Όλα τα είδη εμφανίζουν συγκόλληση και εμφάνιση κροκίδων κατά την ανάμειξή τους με πολυδύναμο αντιορό *Brucella* spp. Η συγκόλληση είναι ορατή είτε με τη χρήση μεγεθυντικού φακού είτε μερικές φορές με γυμνό οφθαλμό.

#### **Συγκόλληση με ειδικούς μονοδύναμους αντιορούς *Brucella* spp.**

Χρησιμοποιούνται ειδικοί A, M και R αντιοροί *Brucella* spp. Όλα τα είδη ανάλογα με το βιότυπο, συγκολλούνται από έναν ή περισσότερους μονοδύναμους αντιορούς, και έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση όχι μόνο του είδους, αλλά και του βιότυπου.

**Πίνακας 1:** Συγκόλληση με μονοδύναμους αντιορούς *Brucella* spp. (Moyer N.P. & Holcomb L.A. 1995, Jahans K.L. *et al.* 1997). Αναφέρονται όλα τα είδη και οι βιότυποι του γένους *Brucella* spp. και η συγκόλληση με τους μονοδύναμους αντιορούς.

Είδος	Βιότυπος	Συγκόλληση με αντιορούς		
		A	M	R
<i>Br. melitensis</i>	1	-	+	-
	2	+	-	-
	3	+	+	-
<i>Br. abortus</i>	1	+	-	-
	2	+	-	-
	3	+	-	-
	4	-	+	-
	5	-	+	-
	6	+	-	-
	9	-	+	-
<i>Br. suis</i>	1	+	-	-
	2	+	-	-
	3	+	-	-
	4	+	+	-
	5	-	+	-
<i>Br. neotomae</i>		+	-	-
<i>Br. ovnis</i>		-	-	+
<i>Br. canis</i>		-	-	+
<i>Br. maris</i>	Αρκετοί ;	+	+/-	-

### Βιοχημικές δοκιμές

Για την ταυτοποίηση του είδους *Brucella* spp. απαιτείται πρόσφατη και καθαρή καλλιέργεια. Πραγματοποιείται πλήρης σειρά βιοχημικών δοκιμών που περιλαμβάνει (Alton G.G. *et al* 1975, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας 2002):

**Δοκιμή καταλάσης:** μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα προσθέτοντας συγχρόνως 1-2 σταγόνες πρόσφατου διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3%. Παρατηρείται σχηματισμός φυσαλίδων (έκλυση οξυγόνου - O<sub>2</sub>). Όλα τα είδη είναι θετικά στη δοκιμασία της καταλάσης.

**Δοκιμή οξειδάσης:** μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί ή χαρτί Whatman N<sup>o</sup> 1 και πάνω της ενσταλάσσονται 1-2 σταγόνες πρόσφατου διαλύματος tetramethyl-p-phenylenodiamine 1%. Σε χρόνο μικρότερο των 10sec η αποικία αποκτά βαθύ ιώδες χρώμα. Όλα τα είδη είναι θετικά στη δοκιμασία εκτός των *Br. ovnis* και *Br. neotomae*.

**Δοκιμή υδρόλυσης της ουρίας:** μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται σε κεκλιμένη επιφάνεια υποστρώματος Christensen, επωάζεται στους 37°C και σημειώνεται ο απαιτούμενος χρόνος (λίγα λεπτά έως 24 ώρες) για την υδρόλυση της ουρίας που εκδηλώνεται με κερασέρυθρο χρωματισμό του υποστρώματος. Όλα τα είδη είναι θετικά στη δοκιμή σε χρόνο που ποικίλλει ανάλογα με το είδος, εκτός της *Br. ovnis*.

**Δοκιμή κιτρικών:** μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται σε κεκλιμένη επιφάνεια υποστρώματος Koser's citrate medium. Μετά από επώαση για 48 ώρες στους 37°C παρατηρείται τυχόν αλλαγή του χρώματος από πράσινο σε βαθύ γαλάζιο. Όλα τα είδη είναι αρνητικά στη δοκιμή.

**Δοκιμή ινδόλης:** μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται στο υγρό υπόστρωμα ινδόλης. Μετά από επώαση για 24-48 ώρες στους 37°C ανιχνεύεται η παρουσία ινδόλης με την προσθήκη 5-10 σταγόνων αντιδραστήριου Kovacs's. Δεν εμφανίζεται κόκκινος δακτύλιος, γιατί όλα τα είδη είναι αρνητικά στη δοκιμή.

**Δοκιμή ερυθρού του μεθυλίου (methyl red):** μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται σε υγρό υπόστρωμα Clark και Lubs. Μετά από επώαση για 24-48 ώρες στους 37°C προστίθενται 5-10 σταγόνες ερυθρού του μεθυλίου. Δεν παρατηρείται ερυθρός χρωματισμός (πτώση του pH κάτω από 6), γιατί όλα τα είδη είναι αρνητικά στη δοκιμή.

**Δοκιμή Voges-Proskauer (παραγωγή ακετυλομεθυκαρβινόλης):** μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται σε υπόστρωμα Clark και Lubs. Μετά από επώαση για 24-48 ώρες στους 37°C προστίθενται σε 5 μέρη καλλιέργηματος, 3 μέρη α-ναρθηθολ 5% και 1 μέρος KOH 4%. Δεν εμφανίζεται ρόδινη χροιά εντός 30 λεπτών (θετικό αποτέλεσμα), γιατί όλα τα είδη είναι αρνητικά στη δοκιμή.

**Δοκιμή κινητικότητας:** μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται κάθετα στην επιφάνεια του υποστρώματος, σε δύο υποστρώματα κινητικότητας και μετά από επώαση για 24-48 ώρες, το ένα στους 37°C και το άλλο στους 20°C, παρατηρείται τυχόν ανάπτυξη αποικιών περιφερικά και σε μεγαλύτερη επιφάνεια από τη γραμμή ενοφθαλμισμού (θετικό αποτέλεσμα). Όλα τα είδη είναι ακίνητα, και γι' αυτό η δοκιμή είναι αρνητική.

**Δοκιμή νιτρικών (αναγωγή των νιτρικών αλάτων σε νιτρώδη):** μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται στο υπόστρωμα των νιτρικών (θρεπτικός ζωμός με νιτρικό κάλιο -KNO<sub>3</sub>- 1%) και μετά από επώαση για 24-48 ώρες στους 37°C ελέγχεται η παρουσία νιτρωδών με την προσθήκη μερικών σταγόνων θειανιλικού οξέος πρώτα και α-ναφθυλαμίνης στην συνέχεια. Το υπόστρωμα αποκτά ερυθρό χρώμα, γιατί όλα τα είδη είναι θετικά στη δοκιμή με εξαίρεση την *Br. onis*, στην οποία το χρώμα του υποστρώματος δεν αλλάζει.

**Δοκιμή παραγωγής H<sub>2</sub>S (υδροθείου):** μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται σε σωληνάρια με υπόστρωμα SDA (Serum Dextrose Agar) και τοποθετείται ταινία διηθητικού χαρτιού, εμποτισμένη με υδατικό διάλυμα οξεικού μολύβδου 10% με τέτοιο τρόπο, ώστε να βρίσκεται απέναντι από την καλλιεργημένη επιφάνεια και σε απόσταση 1cm. Η καλλιέργεια σφραγίζεται και επωάζεται στους 37°C και η ταινία ελέγχεται καθημερινά για τέσσερις μέρες για την εμφάνιση ζώνης μαύρου χρώματος. Γίνεται καθημερινή αλλαγή της ταινίας. Όλα τα είδη είναι αρνητικά στη δοκιμή, εκτός της *Br. abortus* (βιότυποι 1, 2, 3, 4, 9), της *Br. suis* (βιότυπος 1) και της *Br. neotomae*, οι οποίες παράγουν υδρόθειο.

**Δοκιμή ONPG:** μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας αραιώνεται σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, στον οποίο έχει προστεθεί δισκίο ONPG, και επωάζεται για 4 ώρες στους 37°C. Ελέγχεται για αλλαγή χρώματος (κίτρινο χρώμα σημαίνει θετική αντίδραση). Όλα τα είδη του γένους είναι αρνητικά στη δοκιμή, δεν απελευθερώνουν ο-nitro-phenol από την ο-nitrophenol-b-D-galactoside και επομένως δεν παρατηρείται αλλαγή χρώματος.

**Απαιτήση παρουσίας CO<sub>2</sub> για την ανάπτυξη:** πάντα το προς καλλιέργεια υλικό τοποθετείται και σε συνθήκες μικροαερόφιλου περιβάλλοντος, δηλαδή παρουσία CO<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 5-10%. Όλα τα είδη απαιτούν αερόβιες συνθήκες ανάπτυξης, εκτός της *Br. abortus* (βιότυποι 1, 2, 3, 4, 9) και της *Br. onis* που απαιτούν παρουσία CO<sub>2</sub>.

**Πίνακας 2:** Παρουσιάζονται συνοπτικά όλες οι βιοχημικές δοκιμές του γένους *Brucella* (Corbel M.J. *et al* 1983, Hausler W.J. JR *et al* 1985, Alton *et al* 1988, Αρσίνη Α. 1994).

Είδος	Βιότυπος	Βιοχημικές δοκιμές					
		Καταλάση	Οξειδάση	Ουρία	Κιτρικά	Ινδόλη	M-R & V-P
<i>Br. melitensis</i>	1	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-
<i>Br. abortus</i>	1	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-
	6	+	+	+	-	-	-
	9	+	+	+	-	-	-
<i>Br. suis</i>	1	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-
<i>Br. neotomae</i>		+	-	+	-	-	-
<i>Br. ovis</i>		+	-	-	-	-	-
<i>Br. canis</i>		+	+	+	-	-	-
<i>Br. maris</i>	Αρκετοί ;	+	+	+	-	-	-

**Πίνακας 3:** Βιοχημικές δοκιμές του γένους *Brucella* (Corbel M.J. *et al* 1983, Hausler W.J. JR *et al* 1985, Alton *et al* 1988, Αρσίνη Α. 1994).

Είδος	Βιότυπος	Βιοχημικές δοκιμές					
		Απαίτηση σε CO <sub>2</sub>	Παραγωγή H <sub>2</sub> S	ONPG	Νιτρικά	Κινητικότητα	
						20°C	37°C
<i>Br. melitensis</i>	1	-	-	-	+	-	-
	2	-	-	-	+	-	-
	3	-	-	-	+	-	-
<i>Br. abortus</i>	1	+	+	-	+	-	-
	2	+	+	-	+	-	-
	3	+	+	-	+	-	-
	4	+	+	-	+	-	-
	5	-	-	-	+	-	-
	6	-	-	-	+	-	-
	9	-/+	+	-	+	-	-
<i>Br. suis</i>	1	-	+	-	+	-	-
	2	-	-	-	+	-	-
	3	-	-	-	+	-	-
	4	-	-	-	+	-	-
	5	-	-	-	+	-	-

<b>Br. neotomae</b>		-	+	-	+	-	-
<b>Br. ovis</b>		+	-	-	-	-	-
<b>Br. canis</b>		-	-	-	+	-	-
<b>Br. maris</b>	Αρκετοί ;	-/+	-	-	+	-	-

### Ανάπτυξη σε υποστρώματα βασικών χρωστικών

Η προσθήκη των χρωστικών basic fuchsin, και thionin σε διάφορες συγκεντρώσεις στα βασικά θρεπτικά υποστρώματα και κυρίως στα Serum Dextrose Agar (SDA) και Trypticase Soy Agar (TSA) επιτρέπει ή όχι την ανάπτυξη των ειδών και των βιοτύπων του γένους *Brucella*, έτσι ώστε να αποτελεί μία από τις μεθόδους ταυτοποίησης του είδους. Η συγκέντρωση των χρωστικών ποικίλλει από 1:25.000 μέχρι 1:500.000 και εμφανίζεται διαφορετικό αποτέλεσμα σε κάθε μια απ' αυτές (Hausler W.J. JR *et al* 1985).

Εκτός από τις τρεις παραπάνω χρωστικές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η χρωστική safranin O σε συγκέντρωση 1:10.000 για τη διαφοροποίηση της *Br. suis* της οποίας οι περισσότεροι βιότυποι δεν αναπτύσσονται (Alton *et al* 1988).

**Πίνακας 4:** Βιοχημικές δοκιμές του γένους *Brucella*. Φαίνεται συνοπτικά η ανάπτυξη των ειδών και των βιοτύπων των *Brucella* spp. σε υπόστρωμα παρουσία χρωστικών σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Είδος	Βιότυπος	Χρωστικές					
		Basic Fuchsin		Thionin			
		II	III	I	II	III	IV
<b>Br. melitensis</b>	1	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+
<b>Br. abortus</b>	1	+	+	-	-	-	+
	2	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	+	+
	4	+	+	-	-	-	+
	5	+	+	-	+	+	+
	6	+	+	-	+	+	+
	9	+	+	-	+	+	+
<b>Br. suis</b>	1	+	-	+	+	+	+/-
	2	+	-	-	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	-
	5	+	+	+	+	+	-
<b>Br. neotomae</b>		-	-	-	+	+	+
<b>Br. ovis</b>		+	+	+	+	+	-
<b>Br. canis</b>		-	-	+	+	+	+/-
<b>Br. maris</b>	Αρκετοί ;	+	+	+	+	+	?

+ = ανάπτυξη, - = αναστολή ανάπτυξης, ? = δεν υπάρχουν στοιχεία  
 I = 1 : 25.000, II = 1 : 50.000, III = 1 : 100.000, IV = 1 : 500.000  
 (Hausler W.J. JR *et al* 1985, Alton *et al* 1988, WHO Guidance 2003)

### Λύση από φάγους

Η χρήση φάγων ειδικών έναντι των βακτηρίων *Brucella* spp. αποτελεί μία από τις μεθόδους ταυτοποίησης του είδους και του βιότυπου τους. Είναι όμως περίπλοκη και μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε εξειδικευμένα εργαστήρια. Οι φάγοι που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής: **Tb (Tbilisi phage)**, **Fi 75/13 (Firenze phage)**, **Wb (Weybridge phage)**, **BK<sub>2</sub> (Berkeley phage)**, **R/C (Rough Colony phage)**, **Iz<sub>1</sub> (Izatnagar phage)** και **Np (Nepean phage)** (Corbel M.J. *et al* 1983).

**Πίνακας 5:** Λυτική δράση διαφόρων φάγων στα είδη του γένους *Brucella*.

Phage group	Phage Strain RTD <sup>a</sup>	<i>Br. abortus</i>		<i>Br. melitensis</i>		<i>Br. suis</i>		<i>Br. neotomae</i>		<i>Br. canis</i>	<i>Br. ovis</i>	<i>Br. maris</i>
		S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R
1	Tb	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ/ΜΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ
2	Fi	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΜΛ	ΚΛ	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	Λ
3	Wb	Λ	ΚΛ	Π	ΚΛ	Λ	ΚΛ	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	Λ
4	BK <sub>2</sub>	Λ	ΚΛ	Λ/ΜΛ	ΚΛ	Λ	ΚΛ	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	Λ
5	R/C	ΚΛ	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	Λ	Λ	ΚΛ
6	Iz <sub>1</sub>	Λ	ΚΛ	Λ/ΜΛ	Π	Λ/ΜΛ	Π/ΚΛ	Λ	ΜΛ	ΚΛ	ΚΛ	Λ
7	Np	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	?

α = Routine Test Dilution, Λ= Λύση, ΚΛ = Καθόλου λύση, Π= Ποικίλλει, ΜΛ = Μερική λύση, ? = δεν υπάρχουν στοιχεία (Corbel M.J. *et al* 1983, Corbel M.J. 1998, WHO Guidance 2003).

**Μέθοδοι διαφοροποίησης της φάσης των αποικιών** (Corbel M.J. *et al* 1983, Alton *et al* 1988).

**Δοκιμή ακριφλαβίνης:** μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας εναιωρείται σε μια σταγόνα διαλύματος ουδέτερης ακριφλαβίνης 1:1.000 και παρατηρείται στο στερεοσκόπιο. Οι αποικίες Smooth φάσης δε συγκολλούνται, οι αποικίες Rough φάσης συγκολλούνται αμέσως, ενώ οι βλεννώδεις σχηματίζουν νημάτια.

**Χρώση των αποικιών με crystal violet:** στο τρυβλίο με τις αποικίες προστίθεται διάλυμα εργασίας χρώσης crystal violet με ammonium oxalate και μετά από 20sec παρατηρείται στο στερεοσκόπιο. Οι αποικίες της Smooth φάσης δε συγκρατούν το διάλυμα της χρωστικής και διατηρούν τον φυσιολογικό χρωματισμό τους με μία ιώδη στεφάνη στην βάση τους. Οι αποικίες Rough φάσης λόγω της ανώμαλης επιφάνειας τους και των ρωγμών που υπάρχουν σ' αυτή, συγκρατούν χρωστική.

**Απ' ευθείας παρατήρηση κάτω από έμμεσο φωτισμό:** χρησιμοποιείται μικροσκόπιο με φίλτρο μπλε χρώματος, στερεοσκόπιο με φως υπό γωνία και καθρέφτης που αντανακλά το φως του στερεοσκοπίου και το κατευθύνει προς την κάτω επιφάνεια του τρυβλίου που είναι τοποθετημένο στο μικροσκόπιο. Οι αποικίες Smooth φάσης φαίνονται συμπαγείς, λείες και λαμπερές έχοντας μπλε χρωματισμό. Οι Rough φαίνονται ξηρές, κοκκώδεις και κίτρινες, ενώ οι Mucoid γκρίζες με βλεννώδη σύσταση και εμφάνιση.

**Συγκόλληση με ειδικό μονοδύναμο αντιορό βρουκέλλας:** οι rough αποικίες συγκολλούνται από το μονοδύναμο R αντιορό, ενώ όλες οι άλλες όχι.

**Λύση από R φάγους:** οι R αποικίες λύνονται από τον R/C φάγο, ενώ όλες οι άλλες δε λύνονται.

**Χρήση ανοσοειδικής χρώσης:** απαιτούνται δύο ειδικοί αντιοροί, ο ένας έναντι Smooth στελεχών *Brucella* spp., ο οποίος συνδέεται με HRPX (Horse Radish

Peroxidase) και ο άλλος έναντι Rough στελεχών ο οποίος συνδέεται με FITC (Fluoresceine Iso-thiocyanate). Στη συνέχεια παρασκευάζονται επιχρίσματα από τις προς εξέταση αποικίες και αφού βαφούν με ειδικές τεχνικές, εξετάζονται σε μικροσκόπιο υπεριώδους ακτινοβολίας μήκους κύματος 490nm. Τα Smooth στελέχη φαίνονται καφέ, ενώ τα rough φαίνονται πράσινα.

**Δοκιμή θερμοσυγκόλλησης:** οι rough αποικίες στελεχών, συγκολλούνται μετά από θέρμανση στους 80-100°C για 2 ώρες, όταν εναιωρηθούν σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl) 0,15 M. Είναι μέθοδος συμπληρωματική των παραπάνω.

**Ευαισθησία σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες:** Η ικανότητα επιβίωσης των *Brucella* spp. εκτός ξενιστή είναι σχετικά μεγάλη σε σχέση με άλλα ασπορογόνα βακτήρια, ειδικά όταν βρίσκεται κάτω από ευνοϊκές συνθήκες, όπως pH>4, χαμηλή θερμοκρασία, υψηλή υγρασία και απουσία απ' ευθείας έκθεσης στο ηλιακό φώς. Παραμένουν λοιμογόνα για αρκετούς μήνες στο νερό, στα αποβληθέντα έμβρυα και στους εμβρυικούς υμένες, στα κόπρανα και στα υγρά απόβλητα, στο μαλλί, στο χορτόδεμα, στις κτιριακές εγκαταστάσεις, στα ενδύματα και υποδήματα κá (Σαρρής Κ. 2002).

#### γ. Μοριακές μέθοδοι (PCR, Real Time PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), και η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης αληθούς χρόνου (Real Time PCR) χρησιμοποιούνται κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο για την ανίχνευση του παθογόνου παράγοντα και κυρίως για την τυποποίηση διαφορετικών υπότυπων του παθογόνου. Ωστόσο, οι μοριακές αυτές τεχνικές, συνήθως έχουν χαμηλότερη διαγνωστική ευαισθησία συγκριτικά με τις μικροβιολογικές καλλιέργειες, παρά το γεγονός ότι η ειδικότητά τους προσεγγίζει το 100%. Καλύτερα αποτελέσματα προκύπτουν όταν συνδυάζονται η μικροβιολογική καλλιέργεια παράλληλα με τη μοριακή ανίχνευση του μικροοργανισμού (Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. Croat Med J.2010, 51: 296-305).

## 2. Έμμεση Διάγνωση

Η έμμεση διάγνωση της λοίμωξης τίθεται με την ανίχνευση αντισωμάτων, στον ορό του αίματος ή στο γάλα των ζώων που ήλθαν σε επαφή με βακτήρια του γένους *Brucella* με τη χρήση ορολογικών δοκιμών. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι μολύνσεις από *Br. abortus* και *Br. melitensis* προκαλούν διαφορετική νόσο με ποικίλα συμπτώματα σε κάθε ευπαθές είδος ξενιστή, προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι δεν έχουν αναπτυχθεί ειδικές ορολογικές δοκιμές για την ανίχνευση της μόλυνσης των προβάτων από *Br. melitensis*. Αντί για αυτό θεωρείται ότι οι ορολογικές δοκιμές που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της μόλυνσης στα βοοειδή από *Br. abortus* είναι εξίσου αποτελεσματικές για τη διάγνωση της μόλυνσης από *Br. melitensis* στα μικρά μηρυκαστικά. Έτσι, **οι δοκιμές RB και CF** είναι οι μόνες αναγνωρισμένες δοκιμές, τόσο από την ΕΕ όσο και από τον ΟΙΕ, για την ορολογική διάγνωση της βρουκέλλωσης σε πρόβατα, αίγες και βοοειδή (Farina 1985, Alton 1990a, MacMillan 1990a, ECD 1991; ΟΙΕ 2004a).

Άλλη αναγνωρισμένη ορολογική δοκιμή που εφαρμόζεται για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης των βοοειδών από *Br. abortus*, είναι η **έμμεση ανοσοενζυμική δοκιμή (i-ELISA)**.

#### **α. Δοκιμή του Ερυθρού της Βεγγάλης (Rose Bengal, RB)**

Η δοκιμή του Ερυθρού της Βεγγάλης [Rose Bengal Test, RBT, (δίχλωρο-τετραϊωδοφλουορκεΐνη)] αναπτύχθηκε από τους Rose και Roepke το 1957 για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης των βοοειδών. Κατατάσσεται στην κατηγορία των δοκιμών οροσυγκόλλησης, που στηρίζονται στη χρήση αντιγόνου βακτηρίων του γένους *Brucella*, ρυθμισμένου ως προς το pH (Buffered *Brucella* Antigen Test – BBAT) και κεχρωσμένου με διάλυμα 1% της χρωστικής ερυθρό της Βεγγάλης. Λόγω των χαρακτηριστικών της (γρήγορη και οικονομική), συστήνεται ως προκαταρκτική δοκιμή διαλογής (screening test), η οποία αξιοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό του επιπέδου υγείας των ποιμνίων ως προς τη βρουκέλλωση (flock screening test) και όχι για τον προσδιορισμό μολυσμένων ζώων (FAO/WHO 1986, OIE 2004).

Η δοκιμή RB παρουσιάζει μεγάλη παραλλακτικότητα στην ευαισθησία, όταν εφαρμόζεται σε ορό αίματος προβάτων. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική % περιεκτικότητα των αντιγόνων σε βακτηριακά κύτταρα, όπως επίσης και στον τρόπο βαθμονόμησής της δοκιμής. Ως εκ τούτου παρατηρείται συχνά το φαινόμενο, οροί που προέρχονται από ζώα μολυσμένα από *Br. melitensis*, να δίνουν θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή RB και αρνητικό στη δοκιμή CF.

Όσον αφορά τα πρόβατα, διαπιστώθηκε ότι η ευαισθησία της RB, βελτιώνεται σημαντικά όταν το αντιγόνο τιτλοποιηθεί έναντι ομάδας ορών αίματος, που προέρχονται από πρόβατα μολυσμένα από *Br. melitensis* (μόλυνση επιβεβαιωμένη με απομόνωση της *Br. melitensis*) και ορών που προέρχονται από πρόβατα, απαλλαγμένα από *Br. melitensis*. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι, η ευαισθησία της δοκιμής RB βελτιώνεται μετά από τροποποίηση της μεθοδολογίας της όταν η αναλογία του όγκου του εξεταζόμενου ορού προς τον όγκο του αντιγόνου μεταβάλλεται σε 3/1. Ειδικότερα, η ευαισθησία της τροποποιημένης δοκιμής RB (**modified RB, m-RB**) βελτιώνεται, όταν αντί για 25μl ορού αίματος αναμιγνύονται 75μl, με 25 μl αντιγόνου (Blasco *et al* 1994a).

Η ευαισθησία της δοκιμής RB, επηρεάζεται επίσης και από τη θερμοκρασία των αντιδραστηρίων (αντιγόνου και του ορού αίματος) κατά την στιγμή της εφαρμογής της δοκιμής. Σε περίπτωση που τα αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται σε θερμοκρασία 4°C, τότε η ευαισθησία της δοκιμής περιορίζεται. Ως εκ τούτου κατά την εκτέλεση της δοκιμής, τα αντιδραστήρια θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

**Ασφάλεια:** Όλες οι ενέργειες που περιγράφονται πρέπει να εκτελούνται σύμφωνα με τους γενικούς κανόνες ασφάλειας που ισχύουν για τα Κτηνιατρικά Εργαστήρια. Κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της δοκιμής ο χειριστής πρέπει να φορά την κατάλληλη εργαστηριακή ενδυμασία και γάντια και στη συνέχεια να διενεργείται καθαρισμός και απολύμανση των χεριών με το κατάλληλο αντισηπτικό διάλυμα.

**Συντήρηση των προς εξέταση δειγμάτων:** Οι οροί του αίματος μπορούν να συντηρηθούν χωρίς να υποστούν αλλοίωση για 72 ώρες σε θερμοκρασία 5±3°C.



Εφόσον είναι απαραίτητο να συντηρηθούν για μεγαλύτερο διάστημα, η θερμοκρασία συντήρησης είναι  $\leq -16^{\circ}\text{C}$ .

### Εργαστηριακός εξοπλισμός:

1	Πλάκες γυάλινες ή κεραμικές λευκού χρώματος χωρισμένες σε κυκλικά ή τετράγωνα τμήματα διαμέτρου τουλάχιστον 15mm
2	Μονοκάναλη πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου 5-50μl
3	Μονοκάναλη πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου 50-200μl
4	Ανακινήτης πλακών δύο ή τριών διευθύνσεων που διαθέτει τράπεζα με φωτισμό. Ο ανακινήτης είναι απαραίτητο να διαθέτει χρονοδιακόπτη 4min για τη ρύθμιση του χρόνου ανακίνησης
5	Γυάλινοι ή πλαστικοί στυλεοί για την ανάμιξη του ορού και του αντιγόνου
6	Ψυγείο εργαστηρίου
7	Φυγόκεντρος



**Εικόνα 6.** Ανακινήτης πλακών και αναλώσιμα.

### Αντιδραστήρια:

1	Αντιγόνο Rose Bengal έτοιμο για χρήση. Η θερμοκρασία συντήρησης του αντιγόνου είναι $4^{\circ}\text{C}$ και όχι $\leq 1^{\circ}\text{C}$
2	Μάρτυρας θετικού ορού βοοειδούς (22,2 μονάδες/ml), ο οποίος έχει επιλεγεί έτσι ώστε να δίνει ελαφρά θετική αντίδραση (+). Ο ορός παρασκευάζεται στο εργαστήριο με τρόπο που περιγράφεται παρακάτω
3	Μάρτυρας αρνητικού ορού βοοειδούς (18,2 μονάδες/ml), ο έχει επιλεγεί έτσι ώστε να δίνει αρνητική αντίδραση (-). Ο ορός παρασκευάζεται στο εργαστήριο με τρόπο που περιγράφεται παρακάτω
4	Αρνητικός ορός βοοειδούς που χρησιμοποιείται ως διαλύτης
5	Δείγματα αίματος προς εξέταση

**Αντιγόνο Rose Bengal:** Ως αντιγόνο για την εκτέλεση της δοκιμής χρησιμοποιείται εναιώρημα νεκρών κυττάρων του *Br. abortus* βιότυπος 1, στέλεχος 99 (Weybridge) ή 1119-3 (USDA), οι αποικίες του οποίου θα πρέπει να βρίσκονται σε λεία φάση (φάση S). Τα νεκρά βακτηριακά κύτταρα βρίσκονται σε αναλογία 8% σε φαινικόχο διάλυμα

και γαλακτικό ρυθμιστικό διάλυμα (lactate buffer) με pH  $3.65 \pm 0,05$  (Commission Regulation 2002). Το όξινο αυτό περιβάλλον είναι απαραίτητο διότι σε χαμηλό pH περιορίζονται οι μη ειδικές αντιδράσεις, επειδή μειώνεται σημαντικά η ικανότητα συγκόλλησης των μη ειδικών ανοσοσφαιρινών της κλάσης M (IgM) με το αντιγόνο. Αντίθετα, η ικανότητα συγκόλλησης των ειδικών ανοσοσφαιρινών της υποκλάσεως G<sub>1</sub> (IgG<sub>1</sub>) δεν επηρεάζεται (Corbel 1973; Allan *et al* 1976).

Όταν παραλαμβάνουμε αντιγόνο Rose Bengal θα πρέπει αυτό απαραίτητα να συνοδεύεται από πιστοποιητικό της παρασκευάστριας εταιρείας ότι ισχύουν οι προαναφερόμενες Τεχνικές Προδιαγραφές.

Απαραίτητη προϋπόθεση είναι, το αντιγόνο να έχει τιτλοποιηθεί έτσι ώστε να προκαλεί συγκόλληση του Διεθνούς ορού αναφοράς (OIE International Standard Serum-OIEISS, 2008 σε αραιώση 1/45 (22,2 ICFTU/ml), ενώ δε θα πρέπει να προκαλεί συγκόλληση σε αραιώση 1/55 (18,2 ICFTU/ml). Αυτό πρακτικά σημαίνει πως γνωρίζουμε ότι ο θετικός ορός OIEISS έχει 1000 μονάδες/ml. Αν ο συγκεκριμένος ορός αραιωθεί κατά 45 φορές με αρνητικό ορό τότε από 1000 μονάδες/ml θα αποκτήσει 22,2 μονάδες/ml ( $1000/45=22,2$ ) και θα πρέπει να δίνει θετικό αποτέλεσμα ένα σταυρό (+), δηλαδή 25% συγκόλληση, όταν εξετάζεται με τη δοκιμή Rose Bengal. Αντίθετα, αν ο ορός αυτός αραιωθεί κατά 55 φορές με αρνητικό ορό τότε από 1000 μονάδες/ml θα αποκτήσει 18,2 μονάδες/ml ( $1000/55=18,2$ ) και θα πρέπει να δίνει αρνητικό αποτέλεσμα, δηλαδή 0% συγκόλληση όταν εξετάζεται με τη δοκιμή Rose Bengal. Από τα προαναφερόμενα γίνεται αντιληπτό ότι:

α) Αν διαιρέσουμε την αρχική περιεκτικότητα ενός διαλύματος (πχ 1000 μονάδες/ml) με συγκεκριμένη αραιώση (πχ 1/45 ή 1/55) λαμβάνουμε έναν αριθμό που υποδηλώνει την περιεκτικότητα σε μονάδες του νέου-τελικού διαλύματος που προκύπτει μετά από τη συγκεκριμένη αραιώση του (πχ 22,2 μονάδες/ml ή 18,2 μονάδες/ml).

Δηλαδή: Περιεκτικότητα Αρχικού Δ/τος : αραιώση = Περιεκτικότητα Τελικού Δ/τος. Πχ 1000 μονάδες/ml:1/45= 22,22 μονάδες/ml.

β) Αντίθετα, αν διαιρέσουμε την αρχική περιεκτικότητα ενός διαλύματος (πχ 1000 μονάδες/ml) με την τελική περιεκτικότητα ενός διαλύματος που θέλουμε να προκύψει μετά από αραιώσή του (πχ από 1000 μονάδες/ml σε 22,2 μονάδες/ml ή 18,2 μονάδες/ml) βρίσκουμε την αραιώση στην οποία πρέπει να υποβληθεί ο ορός(1/45 ή 1/55).

Δηλαδή: Περιεκτικότητα Αρχικού Δ/τος : Περιεκτικότητα Τελικού Δ/τος = αραιώση. Πχ 1000 μονάδες/ml: 22,22 μονάδες/ml =1/45.

Τα προαναφερόμενα θα πρέπει να κατανοηθούν σε βάθος, ώστε να περάσουμε στο επόμενο στάδιο και να περιγράψουμε τον τρόπο με τον οποίο παρασκευάζουμε το θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα της δοκιμής Rose Bengal (Στουρνάρα Αθ., 2015).

## Παρασκευή Μαρτύρων Δόκιμης Rose Bengal

- **Παρασκευή Μάρτυρα Θετικού Ορού:** Ας προβούμε σε ένα παράδειγμα:

Έστω ότι στο εργαστήριο έχει παραληφθεί θετικός ορός βοοειδούς με 186,4 μονάδες/ml. Ο ορός αυτός θα πρέπει να αραιωθεί τόσες φορές ώστε τελικά να προκύψει ένα διάλυμα με 22,2 μονάδες/ml(+). Πόσες φορές όμως πρέπει να αραιωθεί;

Για να βρούμε την αραιώση με βάση τα προαναφερόμενα κάνουμε τους εξής υπολογισμούς:  $186,4 \text{ μονάδες/ml} : 22,2 \text{ μονάδες/ml} = 1/8,39$ .

Επομένως, θα πρέπει ο θετικός ορός με 186,4 μονάδες/ml να αραιωθεί 1/8,39 ώστε να προκύψει δ/μα με 22,2 μονάδες/ml. Ο ορός αυτός χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας δοκιμής Rose Bengal και όταν εξετάζεται με τη συγκεκριμένη δοκιμή δίνει ένα σταυρό (+).

Το επόμενο βήμα είναι να υπολογίσουμε την ποσότητα του ορού του θετικού μάρτυρα που θέλουμε να παρασκευάσουμε. Ποσότητα 5ml θεωρείται αρκετή. Χρησιμοποιούμε την απλή μέθοδο των τριών.

Ειδικότερα: Αραίωση 1/8,39 σημαίνει:

Στα 8,39 ml δ/τος το	1 ml είναι θετικός ορός με 186,4 μονάδες/ml
5,00 ml δ/τος	X

$$X = 0,595 \text{ ml} \quad 5\text{ml} - 0,595\text{ml} = 4,405\text{ml}.$$

Άρα, το τελικό δ/μα των 5ml θα παρασκευαστεί με τη προσθήκη 0,595 ml θετικού ορού (186,4 μονάδες/ml) σε 4,405ml αρνητικού ορού βοοειδούς. Το τελικό αυτό δ/μα όγκου 5ml, διανέμεται σε erpendorf (60μl/erpendorf) και συντηρείται τουλάχιστον στους -20°C.

- **Παρασκευή Μάρτυρα Αρνητικού Ορού**: Εάν στο εργαστήριο έχει παραληφθεί θετικός ορός βοοειδούς με 186,4 μονάδες/ml ο ορός αυτός θα πρέπει να αραιωθεί τόσες φορές ώστε τελικά να προκύψει ένα διάλυμα με διάλυμα 18,2 μονάδες/ml. Για να βρούμε την αρραίωση με βάση τα προαναφερόμενα κάνουμε τους εξής υπολογισμούς: 186,4 μονάδες/ml : 18,2 μονάδες/ml = 1/10,24.

Επομένως, θα πρέπει ο θετικός ορός με 186,4 μονάδες/ml θα πρέπει να αραιωθεί 1/10,24 ώστε να προκύψει δ/μα με 18,2 μονάδες/ml. Ο ορός αυτός χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας δοκιμής Rose Bengal και όταν εξετάζεται με τη συγκεκριμένη δοκιμή δίνει αρνητικό αποτέλεσμα (0% συγκόλληση).

Το επόμενο βήμα είναι να υπολογίσουμε την ποσότητα του ορού του αρνητικού μάρτυρα που θέλουμε να παρασκευάσουμε. Ποσότητα 5ml θεωρείται αρκετή. Χρησιμοποιούμε την απλή μέθοδο των τριών.

Ειδικότερα: Αραίωση 1/10,24 σημαίνει:

Στα 10,24 ml δ/τος το	1 ml είναι θετικός ορός με 186,4 μονάδες/ml
Στα 5,00 ml δ/τος	X

$$X = 0,488 \text{ ml} \quad 5\text{ml} - 0,488\text{ml} = 4,512\text{ml}.$$

Άρα, το τελικό δ/μα των 5ml θα παρασκευαστεί με την προσθήκη 0,488 ml θετικού ορού (186,4 μονάδες/ml) σε 4,512ml αρνητικού ορού βοοειδούς. Το τελικό αυτό δ/μα όγκου 5ml, διανέμεται σε erpendorf (60μl/erpendorf) και συντηρείται τουλάχιστον στους -20°C (Στουρνάρα Αθ., 2015).

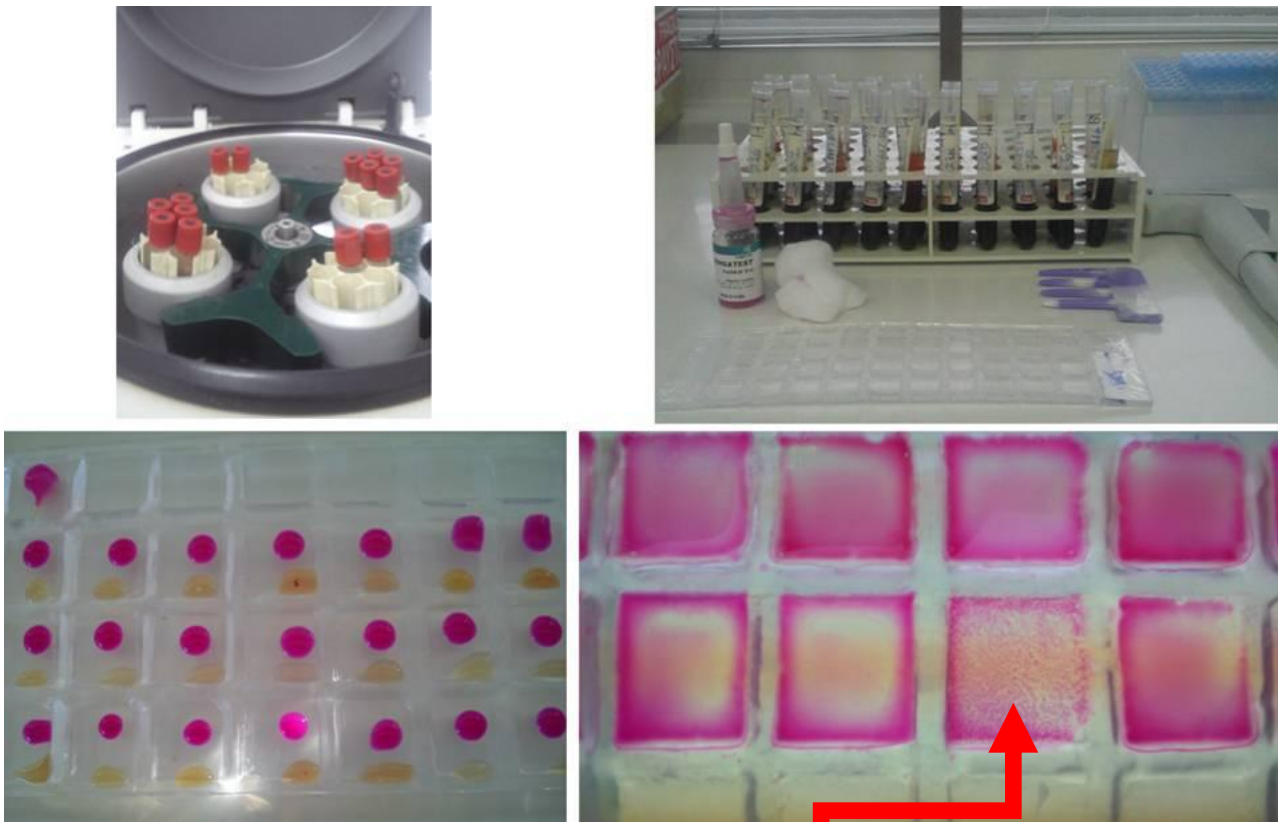
**Εφαρμογή της Δοκιμής Rose Bengal:** Με τη δοκιμή αυτή ανιχνεύεται η συγκόλληση κερωσμένου αντιγόνου ρυθμισμένου ως προς το pH με τα ειδικά αντισώματα του εξεταζόμενου ορού, εφόσον υπάρχουν.

## Διενέργεια της δοκιμής Rose Bengal για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά της *Br. abortus* σε ορό αίματος βοοειδών

Η ευαισθησία της RB, επηρεάζεται από τη θερμοκρασία των αντιδραστηρίων (αντιγόνου και του ορού αίματος) κατά την στιγμή της εφαρμογής της δοκιμής. Σε περίπτωση που τα αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται σε θερμοκρασία 4°C, τότε η ευαισθησία της δοκιμής περιορίζεται. Ως εκ τούτου πριν από την εκτέλεση της δοκιμής, τα αντιδραστήρια αλλά και τα δείγματα ορών αίματος θα πρέπει να τοποθετούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Alton *et al* 1988), τουλάχιστο για 30min.

Για να αποφευχθεί η αλλοίωση του αντιγόνου από τις συχνές αλλαγές θερμοκρασίας, χρησιμοποιείται ποσότητα αντιγόνου που να είναι επαρκής για τις εξετάσεις που θα πραγματοποιηθούν τη συγκεκριμένη μέρα. Πριν από τη χρήση το αντιγόνο ανακινείται έτσι ώστε το διάλυμα να είναι ομογενοποιημένο. Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρώνονται προκειμένου να συλλεχθεί ο ορός του αίματος. Στο κάθε τμήμα της πλάκας τοποθετούνται 30μl θετικού (22,2 μονάδες/ml) και 30μl αρνητικού ορού μάρτυρα (18,2 μονάδες/ml).

Στα τμήματα της πλάκας που έχουν οι μάρτυρες τοποθετείται μία σταγόνα αντιγόνου. Η ποσότητα του αντιγόνου που θα τοποθετηθεί δεν πρέπει να έρχεται σε επαφή με τους ορούς-μάρτυρες.



**Εικόνα 7 – 10.** Διαδικασία RBT. Στην εικόνα 10, το κελί με την κροκκίδωση είναι θετικό με 4+.

Η ποσότητα του αντιγόνου και των ορών αναμιγνύονται με τη βοήθεια πλαστικού ή γυάλινου στυλεού, έτσι ώστε να δημιουργηθεί κηλίδα διαμέτρου τουλάχιστον 15mm.

Αμέσως μετά την ανάμιξη του αντιγόνου και των ορών, η πλάκα τοποθετείται στον ανακινήτη και ανακινείται επί 4 λεπτά. Ο χρόνος της ανακίνησης πρέπει να τηρείται επακριβώς. Αναμένεται ο θετικός μάρτυρας να δώσει + ενώ ο αρνητικός –.

Στη συνέχεια και εφόσον εκτιμηθεί η αξιοπιστία και ακρίβεια της δοκιμής πραγματοποιείται η εξέταση των δειγμάτων-ορών με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που εξετάστηκαν και οι μάρτυρες.

Συμπληρώνεται Φύλλο Εργασίας Αξιολόγησης μαρτύρων και της Δοκιμής Rose Bengal με τα στοιχεία του αντιγόνου (αριθμός παρτίδας, ημερομηνία παραγωγής, ημερομηνία λήξης κά) που θα χρησιμοποιηθούν. Η συμπλήρωση των φύλλων είναι απαραίτητη προκειμένου να υπάρχει συνεχής εκτίμηση της απόδοσης των αντιδραστηρίων και εκτίμηση της ακρίβειας της δοκιμής (Στουρνάρα Αθ., 2015).

### **Διενέργεια της δοκιμής Rose Bengal για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά της *Br. melitensis* σε ορό αίματος αιγών ή προβάτων**

Η δοκιμή Rose Bengal όταν εφαρμόζεται σε ορούς αίματος που προέρχονται από πρόβατα και αίγες έχει μειωμένη ευαισθησία. Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία σε ικανοποιητικό βαθμό, χρησιμοποιούνται 75μl ορού, τα οποία αναμιγνύονται με μια σταγόνα (30μl) αντιγόνου.

Η ανάμιξη του ορού και του αντιγόνου, ο χρόνος ανακίνησης, η ανάγνωση και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων γίνονται με τον ίδιο τρόπο όπως όταν η εξέταση χρησιμοποιείται στους ορούς αίματος βοοειδών.

**Ανάγνωση αποτελεσμάτων:** Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται αμέσως μετά την ολοκλήρωση της ανακίνησης των 4 λεπτών της ώρας, με γυμνό οφθαλμό και χωρίς τη βοήθεια μεγεθυντικού φακού. Προκειμένου να διευκολυνθεί η ανάγνωση των αποτελεσμάτων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί τράπεζα η οποία να διαθέτει φωτισμό.

### **Ερμηνεία των αποτελεσμάτων**

Όταν η δοκιμή διενεργείται σε επίπεδες πλάκες, τα αποτελέσματα εκφράζονται ως **ΑΡΝΗΤΙΚΟ** ή **ΘΕΤΙΚΟ**. Αρνητικό θεωρείται το αποτέλεσμα όταν στο μίγμα του ορού και του αντιγόνου δεν παρατηρείται συγκόλληση.

**Θετικό** θεωρείται το αποτέλεσμα όταν στο μίγμα του ορού και του αντιγόνου παρατηρούνται έστω και ίχνη συγκόλλησης. Τα ίχνη συγκόλλησης εκφράζονται με σταυρούς. Ειδικότερα:

1 σταυρός (+) αντιστοιχεί σε βαθμό συγκόλλησης 25%

2 σταυροί (++) αντιστοιχούν σε βαθμό συγκόλλησης 50%

3 σταυροί (+++) αντιστοιχούν σε βαθμό συγκόλλησης 75%

4 σταυροί (++++) αντιστοιχούν σε βαθμό συγκόλλησης 100%

Προσοχή! Δεν πρέπει να λαμβάνεται υπόψη θετική αντίδραση, η οποία εμφανίζεται μετά από ανακίνηση 4 λεπτών της ώρας (Στουρνάρα Αθ., 2015).

Στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος, είναι απαραίτητο το αποτέλεσμα να επιβεβαιώνεται με άλλη ορολογική δοκιμή, η οποία και θεωρείται ως τελική.

**Καταστροφή των ορών:** Μετά την ολοκλήρωση της εξέτασης, οι οροί καταστρέφονται σε αποτεφρωτικό κλίβανο.

## β. Δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος (Complement Fixation Test, CFT)

Η δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος (CFT) περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Bordet το 1900, ο οποίος αργότερα σε συνεργασία με τον Gengou, την εφάρμοσε με σκοπό την ανίχνευση αντισωμάτων που ενεργοποιούν το συμπλήρωμα σε πολλές λοιμώξεις των ζώων, όπως φυματίωση και πανώλη (Dumas 1958, 1964, 1969). Είναι πάρα πολύ αξιόπιστη ορολογική δοκιμή για την ανίχνευση τόσο της οξείας, όσο και της χρόνιας μορφής βρουκέλλωσης. Ανιχνεύει και αυτή τα αντισώματα IgG1.

Η δοκιμή CF στηρίζεται στη δράση του συμπληρώματος (Complement-C). Το συμπλήρωμα αποτελείται από σειρά πρωτεϊνικών παραγόντων, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη χημική δομή, με συνέπεια να παρουσιάζουν το καθένα ξεχωριστές χημικές ιδιότητες. Η κύρια ιδιότητα του συμπληρώματος, είναι η ικανότητά του να συνδέεται με σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος. Ως δείκτης για τη διαπίστωση της σύνδεσης αυτής, χρησιμοποιούνται ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου, που έχουν ευαισθητοποιηθεί με ειδικό άνοσο ορό (αντισώματα κονίκλου έναντι ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου) γνωστό ως αιμολυσίνη (Haemolysin-H). Κύρια πηγή συμπληρώματος για την εκτέλεση της δοκιμής, είναι συνήθως ορός ινδικού χοιριδίου, καθότι ο ορός του περιέχει όλους τους παράγοντες του συμπληρώματος (Alton *et al* 1988; Nielsen 2002; Κοπτόπουλος 2008). Το συμπλήρωμα του υπό εξέταση ορού που προέρχεται από αίγες και πρόβατα αδρανοποιείται μετά από θέρμανση στους 60-65°C για 30-60min.

Η δοκιμή εφαρμόζεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο αναμιγνύονται ο αδρανοποιημένος υπό εξέταση ορός με το αντιγόνο και το συμπλήρωμα. Εφόσον στον ορό του αίματος του ζώου υπάρχουν αντισώματα κατά των βακτηρίων *Brucella* spp. σχηματίζεται σύμπλοκο με το αντιγόνο της δοκιμής, το οποίο και δεσμεύει το συμπλήρωμα.

Κατά το δεύτερο στάδιο, προστίθεται το αιμολυτικό σύστημα, που αποτελείται από εναιώρημα ευαισθητοποιημένων ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου. Το συμπλήρωμα που δεσμεύτηκε κατά το πρώτο στάδιο, δεν είναι διαθέσιμο προκειμένου να προκαλέσει τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και κατά συνέπεια αυτά παραμένουν ακέραια και καθιζάνουν στον πυθμένα του σωληναρίου όπου γίνεται η δοκιμή (θετικό αποτέλεσμα). Αντιθέτως, σε περίπτωση απουσίας αντισωμάτων στον υπό εξέταση ορό, το διαθέσιμο συμπλήρωμα ενεργοποιείται και δρα στην κυτταρική μεμβράνη των ευαισθητοποιημένων ερυθρών αιμοσφαιρίων του προβάτου, προκαλώντας τη λύση τους. Αποτέλεσμα της ρήξης της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, είναι η απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης και η εμφάνιση ερυθρού χρωματισμού στο διάλυμα (αρνητικό αποτέλεσμα) (Alton *et al* 1988; Nielsen 2002).

Τα αποτελέσματα της δοκιμής CF, εκφράζονται σε Διεθνείς μονάδες (ICFTU/ml). Οροί με τίτλο  $\geq 20$  ICFTU/ml θεωρούνται θετικοί (Commission Regulation, 2002, EC 535/2002 of 21 March 2002 amending Annex C to Council Directive

64/432/EEC and amending Decision 200/300/EC. Official Journal L 080 23/3/2002 p22-28). Η οριοθέτηση του τίτλου, προκειμένου να εκφράζονται τα αποτελέσματα ως θετικά ή αρνητικά επηρεάζει άμεσα την ευαισθησία και την ειδικότητα της δοκιμής. Η υιοθέτηση υψηλών τίτλων για τα θετικά δείγματα μειώνει την ευαισθησία της δοκιμής και επομένως οδηγεί σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Αντίθετα, η οριοθέτηση χαμηλών τίτλων θετικότητας μειώνει την ειδικότητα της δοκιμής και οδηγεί σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Crawford *et al*, 1990).

Στα πρόβατα και τις αίγες, τα αντισώματα που δεσμεύουν το συμπλήρωμα, ανήκουν στην κατηγορία των ανοσοσφαιρινών της κλάσης IgG<sub>1</sub>. Αντίθετα, οι ανοσοσφαιρίνες της κλάσης IgG<sub>2</sub>, δε δεσμεύουν το συμπλήρωμα και παρεμποδίζουν τη σύνδεσή του με άλλες ανοσοσφαιρίνες συμμετέχοντας με τον τρόπο αυτό στην εμφάνιση του φαινομένου της προζώνης. Όσον αφορά την ικανότητα των IgM να δεσμεύουν το συμπλήρωμα, αυτή επηρεάζεται από τη θερμοκρασία αδρανοποίησης των υπό εξέταση ορών. Όταν οι οροί αδρανοποιούνται σε θερμοκρασία 56°C η ικανότητα δέσμευσης του συμπληρώματος επηρεάζεται ελάχιστα, ενώ όταν αδρανοποιούνται στους 65°C, αυτή αναστέλλεται πλήρως.

Η δοκιμή CF παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, όπως η πολυπλοκότητά της, η μεγάλη ποικιλία των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται και που απαιτείται να τιτλοποιηθούν, το φαινόμενο της προζώνης, η αντι-συμπληρωματική δραστηριότητα που παρουσιάζουν ορισμένοι οροί απουσία αντιγόνου, η δυσκολία εφαρμογής της δοκιμής σε ορούς με αιμόλυση, όπως επίσης και η υποκειμενικότητα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Nielsen, 2002).

Παρά τα σημαντικά μειονεκτήματα, η CF έχει καθιερωθεί διεθνώς ως η κύρια δοκιμή για την επιβεβαίωση της μόλυνσης σε ζώα, στα οποία ανιχνεύονται αντισώματα κατά των βακτηρίων του γένους *Brucella* με τη δοκιμή RB. Σε συνδυασμό με τη δοκιμή RB, η CF εφαρμόζεται για τον έλεγχο μολυσμένων εκτροφών και κατά την εφαρμογή προγραμμάτων εκρίζωσης της νόσου. Ο συνδυασμός των δοκιμών RB και CF, αυξάνει μεν την ευαισθησία του διαγνωστικού σχήματος, οδηγεί όμως σε μείωση της ειδικότητας, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών ορολογικών αντιδράσεων, κυρίως σε πρόβατα οι οποίες οφείλονται σε διασταυρούμενες αντιδράσεις (Garin-Bastuji *et al*, 1998).

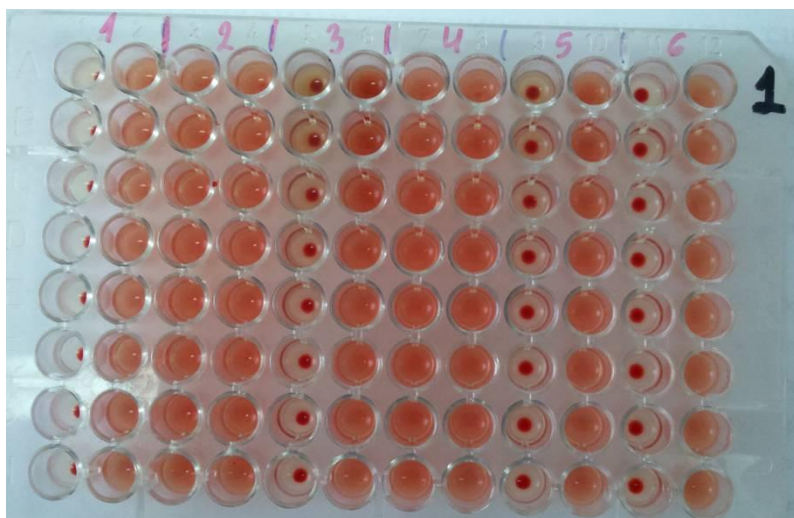
### Εργαστηριακός Εξοπλισμός

1	Επωαστικός κλίβανος ρυθμισμένος στους 37°C
2	Φυγόκεντρος για σωληνάρια και πλάκες μικροτιτλοποίησης
3	Ανακινήτης πλακών μικροτιτλοποίησης, ο οποίος τοποθετείται εντός του επωαστικού κλιβάνου
4	Υδατόλουτρο το οποίο ρυθμίζεται στους 37°C, 56°C, 58°C, 60°C κατά περίπτωση
5	Γιάλινοι σωλήνες με πυθμένα σχήματος U όγκου 50ml
6	Γιάλινοι σωλήνες κωνικοί βαθμονομημένοι, όγκου 15ml
7	Απλή πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου 5μL – 50μl
8	Απλή πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου 200μL – 1000μl
9	Πολυκάναλη πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου 5μL – 50μl
10	Ρύγχη κατάλληλα για τις αναφερόμενες πιπέτες
11	Ποτήρια ζέσεως για την αραίωση των αντιδραστηρίων
12	Απλά υάλινα σωληνάρια αιμοληψίας
13	Φορείς για την τοποθέτηση των σωληναρίων
14	Θερμόμετρο με κλίμακα από 0° C έως 100°C

15	Δοχεία για την τοποθέτηση των αντιδραστηρίων και τη λήψη από τις πιπέτες
16	Αυτοκόλλητες μεμβράνες για την κάλυψη των πλακών μικροτιτλοποίησης
17	Πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 βοθρίων με πυθμένα σχήματος <b>U</b> . Απαιτείται 1 πλάκα για 48 δείγματα όταν η μέθοδος εφαρμόζεται ως δοκιμή ανίχνευσης (screening) και 1 πλάκα για 6 δείγματα όταν η δοκιμή χρησιμοποιείται για τιτλοποίηση των αντισωμάτων
18	Πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 βοθρίων με πυθμένα σχήματος <b>U</b> για την εφαρμογή των μαρτύρων της δοκιμής Συνδεσης του Συμπληρώματος
19	Καθρέπτης ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοποίησης
20	Χρονόμετρο

### Αντιδραστήρια – Χημικές Ενώσεις

1	Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό
2	Αραιωτικό σύνδεσης του συμπληρώματος (Tampon Veronal Buffer – TV)
3	Αντιγόνο: Σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία της ΕΕ, ως αντιγόνο για την εκτέλεση της δοκιμής χρησιμοποιείται εναιώρημα της <i>Br. abortus</i> βιότυπος 1 στέλεχος 99 (Weybridge) ή 1119-3 (USDA) σε φορμολούχο φυσιολογικό ορό (φαινόλη 5%) ή σε ρυθμιστικό διάλυμα βαρβιτάλης, οι αποικίες του οποίου θα πρέπει να βρίσκονται σε λεία φάση (φάση S) (Commission Regulation, 2002)
4	<b>Συμπλήρωμα:</b> Λυοφιλοποιημένο συμπλήρωμα ινδικού χοιριδίου, το οποίο προηγουμένως έχει τιτλοποιηθεί και προετοιμαστεί σε ιδανική αραιώση για την πραγματοποίηση της δοκιμής (αραίωση εργασίας)
5	Αιμολυτικό σύστημα: το οποίο αποτελείται από: α) Αιμολυσίνη η οποία είναι αντισώματα κονίκλου κατά ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου. Η αιμολυσίνη πριν από τη χρήση πρέπει να έχει τιτλοποιηθεί και να προετοιμαστεί σε ιδανική αραιώση για την πραγματοποίηση της δοκιμής (αραίωση εργασίας) και β) Διάλυμα 3% ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου: Τα ερυθρά αιμοσφαίρια του προβάτου αραιώνονται με αραιωτικό σύνδεσης του συμπληρώματος (TV), έτσι ώστε να επιτυγχάνεται περιεκτικότητα του διαλύματος σε ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου 3%
6	Θετικός ορός ελέγχου: Ορός ζώου που περιέχει γνωστή συγκέντρωση αντισωμάτων, κατά του αντιγόνου <i>Brucella abortus</i> , <i>Br. melitensis</i> , <i>Br. suis</i>
7	Αρνητικός ορός ελέγχου: Ορός ζώου που είναι γνωστό ότι <b>δεν</b> περιέχει αντισώματα, κατά του αντιγόνου <i>Brucella abortus</i> , <i>Br. melitensis</i> , <i>Br. suis</i>



**Εικόνα 11.** Αποτελέσματα από τη CFT. Πλάκα Νο 1. Κάθε δείγμα μπαίνει σε 2 στήλες και αραιώνεται προς τα κάτω. Τα δείγματα 1, 3, 5 και 6 είναι θετικά. Τα δείγματα 2 και 4 είναι αρνητικά.



### γ. Έμμεση ανοσοενζυμική δοκιμή (indirect ELISA, i-ELISA)

Η έμμεση ανοσοενζυμική δοκιμή (indirect ELISA, i-ELISA), αναπτύχθηκε από τον Carlsson και τους συνεργάτες του το 1976, με σκοπό τη διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο. Παρουσιάζει αξιοσημείωτη ευαισθησία και ειδικότητα.

Η δοκιμή i-ELISA ανήκει στην κατηγορία των δοκιμών, στις οποίες το αντιγόνο προσροφάται συνήθως σε πλάκα πολλαπλών βοθρίων από πολυστυρένιο. Η παρουσία ανοσοσφαιρινών στο εξεταζόμενο δείγμα οδηγεί στην προσκόλλησή τους στο προσροφημένο αντιγόνο. Οι προσκολλημένες ανοσοσφαιρίνες ανιχνεύονται με τη βοήθεια κατάλληλου συζεύγματος, το οποίο αποτελείται από αντι-αντίσωμα σεσημασμένο με ένζυμο. Το τελευταίο λειτουργεί ως δείκτης, το οποίο σε συνδυασμό με χρωμογόνο υπόστρωμα εμφανίζει αντίδραση χρώματος, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία αντισωμάτων στο εξεταζόμενο.

Το είδος των αντιγόνων, που έχει χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς στην δοκιμή i-ELISA για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης προβάτων και αιγών από *Br. melitensis*, ποικίλλει. Έχουν χρησιμοποιηθεί ως αντιγόνα ολόκληρα βακτηριακά κύτταρα, ήμι-κεκαθαρμένοι S-LPS, πολυσακχαρίτες, αλλά και πρωτεΐνες. Ανάμεσα στα είδη των αντιγόνων, τα S-LPS είναι αυτά που χρησιμοποιούνται πιο συχνά, διότι αφενός θεωρούνται ως ανοσοκυρίαρχα, αφετέρου προσροφούνται σταθερά στην επιφάνεια των βοθρίων πολυστυρενίου.

Όσον αφορά την προέλευση των αντιγόνων, συνήθως χρησιμοποιούνται αντιγόνα που προέρχονται από στελέχη της *Br. abortus* ενώ, κατάλληλα για τη διάγνωση της μόλυνσης από βακτήρια *Br. melitensis*, θεωρούνται και αυτά που προέρχονται από στελέχη της *Br. melitensis*. Για την εφαρμογή της δοκιμής i-ELISA προτιμάται όμως, η χρήση ομόλογων αντιγόνων (European Union Committee 2001).

Όσον αφορά το σύζευγμα που χρησιμοποιείται στη δοκιμή i-ELISA, αυτό συνήθως παρουσιάζει ιδιαίτερη εκλεκτικότητα στην ανίχνευση κυρίως των ανοσοσφαιρινών της κλάσεως IgG και λιγότερο των αντίστοιχων της IgM. Το γεγονός αυτό, επηρεάζει την έγκαιρη ανίχνευση της μόλυνσης, λόγω της πρώιμης παραγωγής των ανοσοσφαιρινών της κλάσεως IgM, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες της IgG (Butler *et al* 1986).

Η ευαισθησία και η ειδικότητα της δοκιμής i-ELISA σε πρόβατα, μελετήθηκε από διάφορους ερευνητές. Όσον αφορά την ευαισθησία, αυτή προσδιορίστηκε στο 100% και 91,7%, όταν ως θετικοί οροί αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τα οποία ελήφθησαν από πρόβατα στα οποία η λοίμωξη είχε επιβεβαιωθεί με απομόνωση του λοιμογόνου παράγοντα. Όσον αφορά την ειδικότητα της δοκιμής i-ELISA, αυτή προσδιορίστηκε στο 100% και 97,6% όταν οι αρνητικοί οροί αναφοράς προέρχονταν από πρόβατα που χαρακτηρίστηκαν ως «ελεύθερα βρουκέλλωσης» (Nielsen *et al* 2004).

Αν και η δοκιμή i-ELISA έχει αποδειχθεί πολύτιμη για τη διάγνωση της μόλυνσης από *Br. melitensis* σε πειραματικές συνθήκες, απαιτούνται έρευνες, για να αξιολογηθεί και σε συνθήκες εκμετάλλευσης. Για να χαρακτηριστεί ως έγκυρη για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης των αιγοπροβάτων είναι απαραίτητο να τυποποιηθεί σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα.

#### **δ. Ανταγωνιστική ανοσοενζυμική δοκιμή (competitive ELISA, c-ELISA)**

Αναπτύχθηκε με σκοπό τη διάκριση των εμβολιακών αντισωμάτων από αυτά της φυσικής λοίμωξης. Ωστόσο απαιτούνται επιπλέον έρευνες, ώστε να χαρακτηριστεί ως έγκυρη για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης. (European Commission, 2001).

#### **ε. Δοκιμή πόλωσης φθορίζοντος φωτός (FPA)**

Πλεονεκτεί των ήδη εγκεκριμένων μεθόδων, λόγω της απλότητας, της ταχύτητας λήψης αποτελεσμάτων και της αντικειμενικής ερμηνείας τους (Στουρνάρα, 2008).

Οι **Ενδοδερμικές δοκιμές** και το **Milk Ring Test** δε χρησιμοποιούνται πρακτικά στη διάγνωση της *Br.melitensis*.

Σύμφωνα με τον ερευνητή κ. K. Nielsen μια σύντομη κατάταξη των εργαστηριακών μεθόδων διάγνωσης της βρουκέλλωσης στα ζώα είναι η εξής:

##### **i) Τεχνικές απ' ευθείας ανίχνευσης και ταυτοποίησης του βακτηρίου**

- Καλλιέργεια και απομόνωση του βακτηρίου
- Τεχνικές μοριακής βιολογίας (PCR)

##### **ii) Ορολογικές δοκιμές ανίχνευσης των ειδικών αντισωμάτων έναντι των βακτηρίων *Brucella spp.***

###### **-- Συγκολλητινοαντιδράσεις**

- Βραδεία οροσυγκόλληση σε σωληνάρια ή μέθοδος Wright (Serum Agglutination Test – SAT) – 2ME SAT – DTT SAT – EDTA SAT – RIV SAT (Rivanol SAT)
- Rose Bengal – BPAT
- Milk Ring Test (MRT)
- Δοκιμή της Σύνδεσης του Συμπληρώματος (Complement Fixation Test. CFT)

###### **-- Βασικές δεσμευτικές ορολογικές μέθοδοι**

- Enzyme linked Immunosorbent Assay – ELISA [Indirect ELISA (iELISA), Competitive ELISA (cELISA)]
- Ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA)
- Particle Concentration Fluorescence Immunoassay (PCFIA)
- Μέθοδος της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός (Fluorescence Polarization Assay – FPA)

##### **iii) Αντιδράσεις ανοσοκαθίζησης**

- Ανοσοδιάχυση σε άγαρ (Agar Gel Immunodiffusion test – AGID)
- Απλή ακτινωτή ανοσοδιάχυση (Single Radial Immunodiffusion test – SRID).

## **Z. Αποστολή – Παραλαβή Δειγμάτων**

### **Γενικές Αρχές για τη συλλογή και αποστολή δειγμάτων παθολογικού υλικού**

Για την απομόνωση των βακτηρίων του γένους *Brucella* χρησιμοποιούνται τα υλικά που προαναφέρθηκαν για τη μικροσκοπική εξέταση και την απομόνωση στο εργαστήριο. Τα δείγματα που θα αποσταλούν στο εργαστήριο για διάγνωση της νόσου, πρέπει να συλλέγονται με το δυνατόν πιο άσηπτο τρόπο, και να τοποθετούνται σε καθαρούς και αποστειρωμένους περιέκτες, καθώς η καλλιέργεια είναι δύσκολη και χρονοβόρα και η ανάπτυξή τους παρεμποδίζεται από την παρουσία άλλων ταχέως αναπτυσσόμενων μικροοργανισμών. Για τους ίδιους λόγους και επιπλέον για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της εργαστηριακής εξέτασης, πρέπει να αποφεύγεται η επιμόλυνση μεταξύ των δειγμάτων.

Πληροφορίες σχετικά με την αποστολή παθολογικού υλικού για βακτηριολογικές εξετάσεις απομόνωσης του βακτηρίου, θα παρέχονται από το Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Βρουκέλλωσης στη Λάρισα.

Δεδομένου ότι ο μελιταίος πυρετός αποτελεί τη συχνότερη ζωοανθρωπονόσο, συνιστάται κατά τη δειγματοληψία και ιδιαίτερα κατά τη λήψη παθολογικού υλικού, να λαμβάνονται τα συνήθη μέτρα βιοασφάλειας (κατάλληλα γάντια και ενδυμασία, μάσκα-προστατευτικά γυαλιά, φροντίδα για την αποφυγή ατυχημάτων όπως τρύπημα από βελόνες ή τραυματισμός από αιχμηρά εργαλεία).

Για πρακτικούς λόγους πριν από την **αποστολή παθολογικού υλικού (Υπόδειγμα A7)** θα πρέπει πάντα να προηγείται επικοινωνία με το αρμόδιο εργαστήριο.

Τα δείγματα πρέπει να συνοδεύονται από το Δελτίο Αποστολής Παθολογικού Υλικού που τοποθετείται σε πλαστικό φάκελο ή διαφάνεια και επισυνάπτεται στο εξωτερικό της συσκευασίας αποστολής. Στο έντυπο αυτό πρέπει να περιέχονται οι εξής πληροφορίες:

- Όνομα, επώνυμο και διεύθυνση ιδιοκτήτη του ζώου και γεωγραφική περιοχή.
- Όνομα, επώνυμο, ταχυδρομική και ηλεκτρονική διεύθυνση, αριθμοί τηλεφώνου και φαξ του αποστολέα.
- Ζητούμενες εξετάσεις.
- Είδος, φυλή, γένος, ηλικία και ταυτότητα του ζώου.
- Ημερομηνία δειγματοληψίας και αποστολής.
- Κατάλογος των δειγμάτων που αποστέλλονται. Αντίγραφο της λίστας αυτής πρέπει να περιέχεται και μέσα στο δέμα, μεταξύ της δευτερογενούς και της εξωτερικής συσκευασίας.

### **Οδηγίες δειγματοληψίας, συσκευασίας και αποστολής δειγμάτων αιμοληψίας**

1. Από κάθε εξεταζόμενο ζώο λαμβάνεται κάθε φορά ένα δείγμα αίματος, το οποίο και τοποθετείται σε φιαλίδιο χωρίς αντιπηκτικό (για συλλογή ορού και διεξαγωγή των ορολογικών εξετάσεων).
2. Το δείγμα συλλέγεται κατά το συνήθη τρόπο δειγματοληψίας με φιαλίδιο κενού ή με σύριγγα μιας χρήσης.

3. Πάνω στο αντίστοιχο φιαλίδιο του ζώου από το οποίο λήφθηκε το δείγμα αναγράφονται ευανάγνωστα και με ανεξίτηλο μαρκαδόρο ο κωδικός εκμετάλλευσης καθώς και ο κωδικός του ζώου.
4. Ο ελάχιστος όγκος του αιμοδείγματος θα πρέπει να είναι 2ml.
5. Τα προς εξέταση αιμοδείγματα αμέσως μετά την αιμοληψία θα πρέπει να συντηρούνται σε ψύξη (+4°C). Η συντήρηση των δειγμάτων με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει το πολύ μέχρι 2 ημέρες. Πέραν των 2 ημερών απαιτείται η άμεση αποστολή των αιμοδειγμάτων στο εργαστήριο για εξέταση. (Αν τα αιμοδείγματα δεν αποσταλούν στο εργαστήριο, θα πρέπει να διαχωριστεί ο ορός τους και να συντηρηθεί σε θερμοκρασία τουλάχιστον - 18°C).
6. Η αποστολή των αιμοδειγμάτων προς το εργαστήριο πρέπει να γίνεται υπό ψύξη (ισοθερμικό δοχείο που να περιέχει παγοκύστες, οι οποίες να μην έρχονται σε άμεση επαφή με τα αιμοδείγματα).
7. Τα δείγματα προωθούνται στο αρμόδιο εργαστήριο συνοδευόμενα από το Δελτίο Ορολογικού Ελέγχου για τη βρουκέλλωση των αιγών και προβάτων πλήρως συμπληρωμένο σύμφωνα με το σχετικό υπόδειγμα του Τμήματος Ζωοανθρωπονόσων.
8. Η αποστολή του Δελτίου Ορολογικού Ελέγχου (και τα τρία αντίτυπα) θα πρέπει να συνοδεύεται από το σχετικό διαβιβαστικό, (βλ. Παράρτημα). Κάθε ΔΟΕ έχει το δικό του διαβιβαστικό με τον ίδιο αριθμό πρωτοκόλλου. Τα έξοδα αποστολής των αιμοδειγμάτων τα οποία συνοδεύονται από το διαβιβαστικό αποστολής που εκδίδει η ΤΚΑ βαρύνουν του προϋπολογισμό του ΥΠΑΑΤ σύμφωνα με την εκάστοτε ΚΥΑ οικονομικών ενισχύσεων για την εξυγίανση ζωικού κεφαλαίου.

Όλα τα συνοδευτικά έγγραφα των δειγμάτων τοποθετούνται σε πλαστικό φάκελο ή διαφάνεια και επισυνάπτονται στο εξωτερικό της συσκευασίας αποστολής.



Εικόνες 12 – 16. Συσκευασία αιμοδειγμάτων για αποστολή.

## Λόγοι ακαταλληλότητας δείγματος

- Ανεπαρκής ποσότητα
- Αιμολυμένο δείγμα
- Κενό, σπασμένο ή ανοιχτό φιαλίδιο
- Ελλιπής ταυτοποίηση δείγματος
- Μη τήρηση των οδηγιών αποστολής
- Ταυτοποιημένα δείγματα που δεν ανταποκρίνονται στους κωδικούςζώου/σήμανση δείγματος που αναφέρονται στο δελτίο αποστολής.
- Ακατάλληλα φιαλίδια αιμοληψίας (πχ φιαλίδια που περιέχουν αντιπηκτικές ουσίες)

Στην περίπτωση που το Κτηνιατρικό Εργαστήριο κρίνει κάποια αιμοδείγματα ακατάλληλα, τα απορρίπτει και αποστέλλει στην κτηνιατρική αρχή προέλευσης των δειγμάτων έγγραφο με το οποίο ενημερώνει για την απόρριψη των δειγμάτων, καθώς και τους λόγους απόρριψης αυτών. Η αιμοληψία θα πρέπει να επαναλαμβάνεται από τα αντίστοιχα ζώα.

## Διαδικασία απόρριψης μετά την εργαστηριακή ανάλυση

Μετά την εργαστηριακή ανάλυση των δειγμάτων αυτά διατηρούνται υπό ψύξη σε ειδικά για το σκοπό αυτό ψυγεία για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο των 5 ημερών σε θερμοκρασία υποχρεωτικά μικρότερη ή ίση με 5°C μέχρι την τελική επεξεργασία με υγρή αποστείρωση και την απόρριψη τους.

Κατά τη διάρκεια των χειρισμών λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα μέτρα βιοασφάλειας για την προστασία του προσωπικού από την μόλυνση και την αποτροπή της επιμόλυνσης εργαστηριακών χώρων και εξοπλισμού.

Η αποστείρωση είναι η υγρή ή ξηρή θερμική επεξεργασία των επικίνδυνων αποβλήτων, ώστε αυτά να εξομοιωθούν, όσον αφορά στο μικροβιακό φορτίο τους με τα οικιακά απορρίμματα. Η αποστείρωση των υλικών γίνεται στους 121°C και σε 1,1Atm για 30 λεπτά.

## Αποτελέσματα των εργαστηριακών εξετάσεων

### A. Αιμοδείγματα από τη ZEM

Τα αιμοδείγματα στη ZEM προέρχονται από όλα τα ενήλικα αρσενικά αιγοπρόβατα (ή σε ειδικές περιπτώσεις και από τα ενήλικα θηλυκά ανεμβολίαστα αιγοπρόβατα) και υφίστανται αρχικά εξέταση με Rose Bengal (RBT).

1: Στην εκμετάλλευση με ιστορικό βρουκέλλωσης (που είχε δώσει έστω και ένα θετικό αποτέλεσμα) ή δεν είχε εμβολιαστεί, κατά το τρέχον και προηγούμενο έτος:

**1.1:** Όλα τα θετικά αποτελέσματα στη RBT σφάζονται και αποζημιώνονται.

**1.2:** Σε περίπτωση που βρεθούν θετικά τα αιμοδείγματα στη RBT σε ποσοστό μεταξύ 6% και 49%, τότε και όλοι οι υπόλοιποι αρνητικοί οροί εξετάζονται με τη CFT). Τα θετικά ζώα είτε στη RBT είτε στη CFT σφάζονται και αποζημιώνονται.

**1.3:** Τέλος, σε περίπτωση που βρεθούν θετικά τα αιμοδείγματα στη RBT σε ποσοστό ίσο ή μεγαλύτερο του 50%, δε χρειάζεται επιβεβαίωση με CFT. Όλοι οι οροί θεωρούνται θετικοί και τα ζώα σφάζονται και αποζημιώνονται.

**2:** Στην εκμετάλλευση που δεν έχει ιστορικό βρουκέλλωσης και έχει εμβολιαστεί, κατά το τρέχον και προηγούμενο έτος:

**2.1:** Τα θετικά αποτελέσματα στη RBT ελέγχονται για επιβεβαίωση με CFT. Τα θετικά αποτελέσματα στη CFT σφάζονται και αποζημιώνονται.

**2.2:** Σε περίπτωση που βρεθούν θετικά τα αιμοδείγματα στη RBT σε ποσοστό μεταξύ 6% και 49%, ισχύει ό,τι και στο σημείο **1.2**.

**2.3:** Τέλος, σε περίπτωση που βρεθούν θετικά τα αιμοδείγματα στη RBT σε ποσοστό ίσο ή μεγαλύτερο του 50%, ισχύει ό,τι και στο σημείο **1.3**.

Τρέχον ή προηγούμενο έτος	1-5% RBT(+)	6-49%RBT(+)	>50% RBT(+)
Ανεμβολίαστη εκμετάλλευση ή με θετικό κρούσμα	Σφαγή μόνο τα RBT(+)	Επιβεβαίωση με CFT. Σφαγή είτε RBT(+) είτε CFT(+)	Σφαγή όλων των ζώων που δειγματολήφθηκαν
Εμβολιασμένη εκμετάλλευση και χωρίς θετικό κρούσμα	Επιβεβαίωση με CFT. Σφαγή MONO RBT(+) και CFT(+)		

**Πίνακας 6.** Χειρισμός αιμοδειγμάτων από τη ΖΕΜ.

### **Β) Αιμοδείγματα από τη ΖΕΚ**

Τα αιμοδείγματα στη ΖΕΚ μπορεί να προέρχονται από όλα τα αιγοπρόβατα μεγαλύτερα των 6 μηνών και υφίστανται αρχικά εξέταση με Rose Bengal (RBT).

**1:** Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος και η εκμετάλλευση ανήκει σε καθεστώς M1, M2, M3, M4 ελέγχονται για επιβεβαίωση με CFT. Τα θετικά αποτελέσματα στη CFT σφάζονται και αποζημιώνονται.

**2:** Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος και η εκμετάλλευση ανήκει σε καθεστώς M+, κάθε ορός αίματος που θα δώσει θετικό αποτέλεσμα στη RBT θεωρείται ότι ανήκει σε μολυσμένο ζώο, το οποίο σφάζεται και αποζημιώνεται.

**3:** Ανεξαρτήτως υγειονομικού καθεστώτος, σε περίπτωση που βρεθούν θετικά τα αιμοδείγματα στη RBT σε ποσοστό μεταξύ 6% και 49%, τότε και όλοι οι υπόλοιποι αρνητικοί οροί εξετάζονται με CFT. Τα θετικά ζώα είτε στη RBT είτε στη CFT σφάζονται και αποζημιώνονται.

**4:** Τέλος, σε περίπτωση που βρεθούν θετικά τα αιμοδείγματα στη RBT σε ποσοστό ίσο ή μεγαλύτερο του 50% και ανεξαρτήτως υγειονομικού καθεστώτος, δε χρειάζεται επιβεβαίωση με CFT. Όλοι οι οροί κρίνονται θετικοί και τα ζώα σφάζονται και αποζημιώνονται.

	1-5% RBT(+)	6-49%RBT(+)	>50% RBT(+)
Καθεστώς M+	Σφαγή μόνο τα RBT(+)	Επιβεβαίωση με CFT. Σφαγή είτε RBT(+) είτε CFT(+)	Σφαγή όλων των ζώων που δειγματολήφθηκαν
Καθεστώς M1, M2, M3, M4	Επιβεβαίωση με CFT. Σφαγή MONO RBT(+) και CFT(+)		

**Πίνακας 7.** Χειρισμός αιμοδειγμάτων από τη ΖΕΚ.

## Διαδικασία σε περίπτωση ατυχήματος από αιμοδείγματα

Ο κίνδυνος από το χειρισμό των αιμοδειγμάτων συνίσταται στην άμεση επαφή με αμυχές του δέρματος ή σε μόλυνση διαμέσου του οφθαλμικού, ρινικού, στοματικού βλεννογόνου, (εφόσον το ζώο βρίσκεται σε φάση βακτηριαιμίας) ή του παθολογικού υλικού, της σκόνης και των ρίπων που είναι προσκολλημένα στα φιαλίδια αιμοληψίας.

Σε μια τέτοια περίπτωση απαιτείται:

1. άμεση πλύση της περιοχής με άφθονο νερό και χρήση κατάλληλου απολυμαντικού διαλύματος,
2. καθαρισμός και απολύμανση του ρουχισμού, του εξοπλισμού και των επιφανειών που τυχόν επιμολυνθήκαν,
3. αναφορά στον υπεύθυνο του εργαστηριακού τμήματος,
4. άμεση επίσκεψη σε γιατρό και
5. ορολογικές εξετάσεις σε διάστημα 2-3 εβδομάδων από την ημέρα του ατυχήματος.

## Προληπτικά μέτρα για αποφυγή ατυχημάτων

- Το προσωπικό θα πρέπει να λαμβάνει συνεχή εκπαίδευση και ενημέρωση σε θέματα που αφορούν την υγιεινή και την ασφάλεια του στους χώρους εργασίας, αλλά και την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων.
- Το προσωπικό θα πρέπει να φορά ποδιές εργαστηρίου με μακριά μανίκια.
- Το πρόσωπο, τα μάτια και το στόμα θα πρέπει να είναι καλυμμένα με ειδικές μάσκες ή γυαλιά (χειρισμός παθολογικού υλικού).
- Ο προσωπικός προστατευτικός εξοπλισμός και ρουχισμός (γυαλιά, μάσκες, ποδιές) είναι υποχρεωτικός εντός του εργαστηριακού χώρου. **ΠΡΟΣΟΧΗ:** δε θα πρέπει να αποθηκεύονται μαζί με τα κανονικά ρούχα ή να φοριούνται εκτός εργαστηριακού χώρου!
- Για τη διενέργεια εργαστηριακών χειρισμών είναι απαραίτητη η χρήση ελαστικών γαντιών μιας χρήσης, τα οποία αφαιρούνται με εκτροφή και απορρίπτονται μαζί με τα μολυσματικά απόβλητα πριν την έξοδο από το χώρο του εργαστηρίου.
- Απαγορεύεται το κάπνισμα, το ποτό, το φαγητό στους χώρους των δοκιμών.
- Αποφεύγεται η χρήση τηλεφωνικής συσκευής καθώς και οι επαφές με το στόμα, τα μάτια και το πρόσωπο κατά τη διάρκεια των δοκιμών.
- Τα χέρια θα πρέπει να πλένονται σχολαστικά με χρήση σαπουνιού ή απολυμαντικού από διανεμητή, πριν και μετά από κάθε μικροβιολογική εξέταση, καθώς και κάθε φορά που τα άτομα εξέρχονται από το χώρο του εργαστηρίου σε βρύση τύπου χειρουργείου. Για το στέγνωμα χρησιμοποιούνται χαρτοπετσέτες μίας χρήσης.
- Δεν επιτρέπεται η τοποθέτηση τροφίμων και ποτών για προσωπική χρήση εντός των ψυκτικών θαλάμων που χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων.
- Μετά το πέρας κάθε εργασίας γίνεται καθαρισμός και απολύμανση του εργαστηριακού εξοπλισμού καθώς και των επιφανειών (πάγκοι εργασίας) που χρησιμοποιήθηκε με κατάλληλο διάλυμα χλωρίνης ή αντίστοιχο απολυμαντικό.

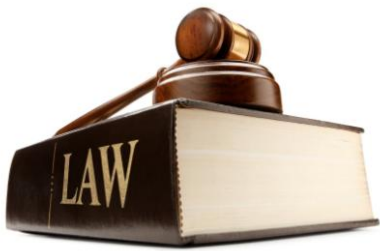
## Η. Ευρωπαϊκή και Εθνική Νομοθεσία

Η Ευρωπαϊκή και Εθνική Νομοθεσία που αφορά το πρόγραμμα ελέγχου και εκρίζωσης της βρουκέλλωσης αιγοπροβάτων, καθώς και την αντιμετώπιση των βρουκελλικών ζώων και των προϊόντων τους αναφέρεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

<b>Ευρωπαϊκή Νομοθεσία</b>	
Κανονισμός <b>853/2004</b> του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου	«Για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης» (L226/22, 29.04.2004)
Κανονισμός <b>854/2004</b> του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου	«Για τον καθορισμό ειδικών διατάξεων για την οργάνωση των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο» (L226/83, 29.04.2004)
Κανονισμός <b>21/2004</b> του Συμβουλίου	«Για τη θέσπιση συστήματος αναγνώρισης και καταγραφής των αιγοπροβάτων και για τροποποίηση του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1782 /2003 και των οδηγιών 92/102/ΕΟΚ και 64/432/ΕΟΚ» (L5, 09.01.2004)
Κανονισμός <b>1505/2006</b> της Επιτροπής	«Για την εφαρμογή του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 21/2004 του Συμβουλίου σχετικά με τους ελάχιστους ελέγχους που πρέπει να διενεργούνται για την αναγνώριση και τη καταγραφή των αιγοπροβάτων» (L280, 12.10.2006)
Απόφαση <b>90/242/ΕΟΚ</b> του Συμβουλίου	«Για τη θέσπιση χρηματοδοτικής δράσης της Κοινότητας για την εξάλειψη της βρουκέλλωσης των προβάτων και αιγών» (L140, 01.06.1990)
Εκτελεστική Απόφαση <b>2012/761/ΕΕ</b> της Επιτροπής της 30-11-2012	«Για την έγκριση ετήσιων και πολυετών προγραμμάτων για την εκρίζωση, τον έλεγχο και την επιτήρηση ορισμένων νοσημάτων των ζώων και ζωοανθρωπονόσων, τα οποία υπέβαλαν τα κράτη μέλη για το έτος 2013, καθώς και της χρηματοδοτικής συνδρομής της Ένωσης στα προγράμματα αυτά»
Οδηγία <b>91/68/ΕΟΚ</b> του Συμβουλίου	«Σχετικά με το καθεστώς υγειονομικού ελέγχου που διέπει το ενδοκοινοτικό εμπόριο αιγοπροβάτων» (L 46 της 19.02.1991)
<b>Εθνική Νομοθεσία</b>	
ΠΔ 41/2006 (ΦΕΚ Α' 44)	«Παρακολούθηση των ζωνοδόσων και των ζωνοσογόνων παραγόντων, σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 2003/99/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου»
ΠΔ 242/2005 (ΦΕΚ Α' 291)	«Υγειονομικοί όροι που πρέπει να πληρούν τα ζώντα αιγοπρόβατα, που αποτελούν αντικείμενο εμπορίου, σε συμμόρφωση με την Οδ. 91/68/ΕΟΚ του Συμβουλίου, όπως ισχύει»



ΠΔ 133/1992 (ΦΕΚ Α` 66)	«Επιβολή υγειονομικών και λοιπών μέτρων για την προστασία και εξυγίανση της κτηνοτροφίας από λοιμώδη και παρασιτικά νοσήματα των ζώων»
<b>Υπουργικές Αποφάσεις (ΥΑ και ΚΥΑ)</b>	
ΥΑ 4888/130873/ 31-12-2012 (ΦΕΚ Β` 3545)	«Πρόγραμμα ελέγχου και εκρίζωσης της βρουκέλλωσης των αιγών και προβάτων»
ΥΑ 4887/130865/ 31-12-2012 (ΦΕΚ Β` 3544)	«Πρόγραμμα ελέγχου της βρουκέλλωσης των αγελαίων βοοειδών από το βακτήριο <i>Br. melitensis</i> »
ΚΥΑ 134167/2011 (ΦΕΚ Β` 823)	«Τροποποίηση της αριθ. 263493/27.07.2004 κοινής υπουργικής απόφασης «Συμπληρωματικά μέτρα για την εφαρμογή του συστήματος αναγνώρισης και καταγραφής των εκμεταλλεύσεων αιγοπροβάτων και του ζωικού τους κεφαλαίου σε εφαρμογή του Κανονισμού (ΕΚ) 21/2004 του Συμβουλίου» (Β` 1253), σε εκτέλεση των Κανονισμών (ΕΚ) 1505/2006, 933/2008 και 759/2009 της Επιτροπής και του Κανονισμού (ΕΚ) 1560/2007 του Συμβουλίου»
ΚΥΑ 263493/2004 (ΦΕΚ Β` 1253)	«Συμπληρωματικά μέτρα για την εφαρμογή του συστήματος αναγνώρισης και καταγραφής των εκμεταλλεύσεων αιγοπροβάτων και του ζωικού τους κεφαλαίου σε εφαρμογή του Κανονισμού (ΕΚ) 21/2004 του Συμβουλίου»



**Ακολουθεί το ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**  
(Με **μπλε γράμματα** στο Παράρτημα  
επισημαίνονται διαφοροποιήσεις ανά ΠΕ λόγω του  
«Καλλικράτη» ή νομοθεσία που μπορεί να έχει αλλάξει).

## Δελτίο Εμβολιασμού κατά της Βρουκέλλωσης των Αιγοπροβάτων

Κτηνιατρική Υπηρεσία:..... Ημερομηνία: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_\_, Αρ. πρωτ.: .....

Υγειονομική κατάσταση εκμετάλλευσης του προηγούμενου έτους: Εμβολιασμένη...../ Ανεμβολίαστη...../ Θετικό(ά) κρούσμα(τα)..... (σημειώστε με ✓)

Κωδικός Αριθμός Εκμετάλλευσης: **EL** \_\_\_\_\_,

Στοιχεία κτηνοτρόφου: Όνομα..... Επίθετο..... Πατρώνυμο.....

Διεύθυνση εκμετάλλευσης: .....

Γεωγραφικές συντεταγμένες: Γεωγραφικό πλάτος .....North/ Γεωγραφικό μήκος: .....East

Τηλέφωνο οικίας: 2 \_\_\_\_\_, Κινητό τηλέφωνο: 69 \_\_\_\_\_.

Κτηνιατρική Υπηρεσία θερινής διαβίωσης εκμετάλλευσης: .....

Δημοτικό Διαμέρισμα θερινής διαβίωσης εκμετάλλευσης: .....

Είδος	Ηλικία	Θηλυκά εμβολιασμένα ζώα (από προηγούμενα έτη)	Θηλυκά ζώα που εμβολιάστηκαν σήμερα	Θηλυκά ζώα που έμειναν ανεμβολίαστα	Αρσενικά ζώα	Σύνολο Ζώων
Πρόβατα	> 6 μηνών					
	3-6 μηνών					
	< 3 μηνών					
Αίγες	> 6 μηνών					
	3-6 μηνών					
	< 3 μηνών					
<b>Σύνολο Ζώων</b>						

\* Το παρόν έγγραφο έχει αξία Υπεύθυνης Δήλωσης του κτηνοτρόφου και αποτελεί απογραφή των ζώων της εκμετάλλευσής του.

\*\* Επισυνάπτεται κατάλογος με τους αριθμούς σήμανσης των εμβολιασθέντων ζώων.

Ημερομηνία εμβολιασμού: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_\_

Το παρόν ΔΕ έχει ισχύ ΜΟΝΟ εφόσον έχουν εμβολιαστεί  $\geq 90\%$  των θηλυκών ζώων (>3μηνών) και μέχρι 30/06/201\_\_\_ ή 31/12/201\_\_\_

Ο/Η κτηνοτρόφος



Σφραγίδα

Ο/Η Προϊστάμενος/

Ο/Η κτηνίατρος που διενέργησε τον εμβολιασμό

## Κατάλογος με τα εμβολιασθέντα αιγοπρόβατα

της εκμετάλλευσης **EL** \_\_\_\_\_

Ημερομηνία εμβολιασμού: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_

α/α	Αριθμός σήμανσης (Κωδικός ζώου)	3 - 6 μηνών (Νεαρά)	Άνω των 6 μηνών (Ενήλικα)	Αίγα	Πρόβατο	α/α	Αριθμός σήμανσης (Κωδικός ζώου)	3 - 6 μηνών (Νεαρά)	Άνω των 6 μηνών (Ενήλικα)	Αίγα	Πρόβατο
1	EL					46	EL				
2	EL					47	EL				
3	EL					48	EL				
4	EL					49	EL				
5	EL					50	EL				
6	EL					51	EL				
7	EL					52	EL				
8	EL					53	EL				
9	EL					54	EL				
<b>10</b>	<b>EL</b>					<b>55</b>	<b>EL</b>				
11	EL					56	EL				
12	EL					57	EL				
13	EL					58	EL				
14	EL					59	EL				
15	EL					60	EL				
16	EL					61	EL				
17	EL					62	EL				
18	EL					63	EL				
19	EL					64	EL				
<b>20</b>	<b>EL</b>					<b>65</b>	<b>EL</b>				
21	EL					66	EL				
22	EL					67	EL				
23	EL					68	EL				
24	EL					69	EL				
25	EL					70	EL				
26	EL					71	EL				
27	EL					72	EL				
28	EL					73	EL				
29	EL					74	EL				
<b>30</b>	<b>EL</b>					<b>75</b>	<b>EL</b>				
31	EL					76	EL				
32	EL					77	EL				
33	EL					78	EL				
34	EL					79	EL				
35	EL					80	EL				
36	EL					81	EL				
37	EL					82	EL				
38	EL					83	EL				
39	EL					84	EL				
<b>40</b>	<b>EL</b>					<b>85</b>	<b>EL</b>				
41	EL					86	EL				
42	EL					87	EL				
43	EL					88	EL				
44	EL					89	EL				
<b>45</b>	<b>EL</b>					<b>90</b>	<b>EL</b>				

Συμπληρώστε με ✓ τις υπόλοιπες στήλες.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
 ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ .....  
 ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ .....  
 ΓΕΝΙΚΗ Δ/ΝΣΗ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ  
 ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
 Δ/ΝΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
 ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ/ΚΤΗΝ. ΓΡΑΦΕΙΟ .....

Υπόδειγμα Α2

....., \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_  
 Αρ. πρωτ:

Ταχ. Δ/ση :  
 ΤΚ. :  
 Πληροφορίες :  
 Τηλέφωνο :  
 Fax :  
 e-mail :

Προς: Κτηνιατρικό εργαστήριο .....  
 .....  
 Υπόψη κ./κα

### Διαβιαστικό Σημείωμα

#### ΘΕΜΑ: «Αποστολή δειγμάτων αίματος από αιγοπρόβατα»

1) Σας διαβιβάζουμε ..... (\_\_\_\_) δείγματα αίματος αιγοπροβάτων, όπως αυτά αναγράφονται στο επισυναπτόμενο Δελτίο Ορολογικού Ελέγχου για τη βρουκέλλωση αιγοπροβάτων και παρακαλούμε να εξεταστούν για βρουκέλλωση.

Τα δείγματα προέρχονται από το κοπάδι αιγοπροβάτων με κωδικό αριθμό **EL**..... του/της κτηνοτρόφου κ./κα ..... του ..... κατοίκου ..... του Δήμου ..... που αποτελείται από \_\_\_\_ αιγοπρόβατα, (\_\_\_\_ θηλυκά και \_\_\_\_ αρσενικά). Τα αιγοπρόβατα ηλικίας άνω των 6 μηνών είναι \_\_\_\_ θηλυκά και \_\_\_\_ αρσενικά.

Στην ίδια εκμετάλλευση συνυπάρχουν τα κοπάδια με **EL**....., **EL**....., **EL**.....

Γεωγραφικές συντεταγμένες του κοπαδιού: Γεωγραφικό πλάτος .....North/  
 Γεωγραφικό μήκος: .....East. Περιοχή: .....

Η αιμοληψία έγινε από τον/την επίσημο/ιδιώτη κτηνίατρο κ./κα ..... λόγω α) διατήρησης καθεστώτος M4 ή β) αλλαγής καθεστώτος ή γ) μετακίνησης αιγοπροβάτων ή δ) ελέγχου αποτελεσματικότητας REV-1 ή ε) άλλο λόγο (προσδιορίστε) .....

Η προηγούμενη αιμοληψία είχε γίνει την \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_ από τον/την επίσημο/ιδιώτη κτηνίατρο κ./κα ..... με το υπ' αρ. πρωτ. .... ΔΟΕ.

Το τελευταίο θετικό κρούσμα βρουκέλλωσης στο κοπάδι ήταν το έτος 20\_\_.

Ο/Η κτηνίατρος

**Δελτίο Ορολογικού Ελέγχου για τη Βρουκέλλωση των Αιγοπροβάτων (1/2)**Υπόδειγμα Α3<sup>α</sup>

Κτηνιατρική Υπηρεσία: ..... Ημερομηνία: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_\_, Αρ. πρωτ.: .....

Κωδικός Αριθμός Εκμετάλλευσης: **EL**\_\_\_\_\_, Συστεγάζεται με τις εκμεταλλεύσεις: **EL**\_\_\_\_\_, **EL**\_\_\_\_\_, **EL**\_\_\_\_\_.**Υγειονομική κατάσταση εκμετάλλευσης του προηγούμενου έτους στη**

<b>Ζώνη Εμβολιασμού</b>		<b>Εμβολιασμένη</b>		<b>Ανεμβολίαστη</b>		<b>Θετικό(ά) κρούσμα(τα)</b>	
<b>Ζώνη Εκρίζωσης</b>	M1	M2	M3	M4	M4 αναστολή	M+	

(σημειώστε με ✓)

Στοιχεία κτηνοτρόφου: Όνομα..... Επίθετο..... Πατρώνυμο.....

Διεύθυνση εκμετάλλευσης: .....

Γεωγραφικές συντεταγμένες: Γεωγραφικό πλάτος .....North/ Γεωγραφικό μήκος: .....East

Τηλέφωνο οικίας: 2\_\_\_\_\_, Κινητό τηλέφωνο: 69\_\_\_\_\_.

Είδος	Ηλικία	Θηλυκά ζώα	Αρσενικά ζώα	Σύνολο Ζώων
Πρόβατα	> 6 μηνών			
	3-6 μηνών			
	< 3 μηνών			
Αίγες	> 6 μηνών			
	3-6 μηνών			
	< 3 μηνών			
<b>Σύνολο Ζώων</b>				

\* Το παρόν έγγραφο έχει αξία Υπεύθυνης Δήλωσης του κτηνοτρόφου και αποτελεί απογραφή των ζώων της εκμετάλλευσής του.

Σφραγίδα

Ο/Η κτηνοτρόφος

Ο/Η Προϊστάμενος/η

Ο/Η κτηνίατρος που διενέργησε την αιμοληψία

Ημερομηνία αιμοληψίας: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_\_  
 Το παρόν ΔΟΕ έχει ισχύ ΜΟΝΟ εφόσον τα τελικά αποτελέσματα  
 είναι αρνητικά και μέχρι 30/06/201\_\_\_ ή 31/12/201\_\_\_

**Δελτίο Ορολογικού Ελέγχου για τη Βρουκέλλωση των Αιγοπροβάτων (2/2)**Υπόδειγμα Α3<sup>β</sup>

Κτηνιατρικό Εργαστήριο: .....

Ημερομηνία: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_

Αριθμός Δελτίου: .....

Αρ. πρωτ.: .....

Ημερομηνία παραλαβής δειγμάτων: ___/___/201__
Αριθμός δειγμάτων: .....   Κατάσταση δειγμάτων: .....   Αριθμός δειγμάτων με αιμόλυση: .....
Ημερομηνία εξέτασης με RBT: ..../...../201.....   Κωδικός: .....   Ημερομηνία εξέτασης με CFT: ..../...../201....   Κωδικός: .....

α/α	Σήμανση δειγματος	Κωδικός ζώου	RBT	CFT (ICFTU/ml)	Παρατηρήσεις	α/α	Σήμανση δειγματος	Κωδικός ζώου	RBT	CFT (ICFTU/ml)	Παρατηρήσεις
1		EL				26		EL			
2		EL				27		EL			
3		EL				28		EL			
4		EL				29		EL			
5		EL				30		EL			
6		EL				31		EL			
7		EL				32		EL			
8		EL				33		EL			
9		EL				34		EL			
10		EL				35		EL			
11		EL				36		EL			
12		EL				37		EL			
13		EL				38		EL			
14		EL				39		EL			
15		EL				40		EL			
16		EL				41		EL			
17		EL				42		EL			
18		EL				43		EL			
19		EL				44		EL			
20		EL				45		EL			
21		EL				46		EL			
22		EL				47		EL			
23		EL				48		EL			
24		EL				49		EL			
25		EL				50		EL			

**Αποτελέσματα:** από τα ..... δείγματα που εξετάστηκαν συνολικά, τα ..... ήταν θετικά με την RBT και τα ..... ήταν θετικά με τη CFT και ισχύουν όσα περιγράφονται στο άρθρο 17 της ΥΑ 4888/130873 (ΦΕΚ Β' 3545/31-12-2012).

Ο/Η Υπεύθυνος/η εργαστηρίου



Ο/Η ενεργήσας/σα την εξέταση



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
 ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ .....  
 ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ .....  
 ΓΕΝΙΚΗ Δ/ΝΣΗ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ  
 ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
 Δ/ΝΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
 ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ/ΚΤΗΝ. ΓΡΑΦΕΙΟ .....

Υπόδειγμα Β1

\_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_

Αρ. πρωτ:

Ταχ. Δ/ση :  
 ΤΚ. :  
 Πληροφορίες :  
 Τηλέφωνο :  
 Fax :  
 e-mail :

Προς: Κτηνιατρικό εργαστήριο .....

Υπόψη κ./κα .....

### Διαβιβαστικό Σημείωμα

#### ΘΕΜΑ: «Αποστολή δειγμάτων αίματος/ δειγμάτων γάλακτος από βοοειδή»

1) Σας διαβιβάζουμε ..... (\_\_\_\_) δειγματο  
 αίματος/ γάλακτος βοοειδών, όπως αυτά αναγράφονται στο επισυναπτόμενο Δελτίο Ορολογικού  
 Ελέγχου για τη βρουκέλλωση βοοειδών και παρακαλούμε να εξεταστούν για βρουκέλλωση.

Τα δείγματα προέρχονται από την αγέλη βοοειδών με κωδικό αριθμό EL.....  
 του/της κτηνοτρόφου κ./κα ..... του ..... του Δήμου ....., που αποτελείται από

..... βοοειδή, (\_\_\_\_ θηλυκά και \_\_\_\_ αρσενικά). Τα βοοειδή ηλικίας άνω των 12 μηνών είναι  
 \_\_\_\_ θηλυκά και \_\_\_\_ αρσενικά. Το υγειονομικό καθεστώς της αγέλης είναι Β\_\_\_\_.

Στην ίδια εκμετάλλευση συνυπάρχουν οι αγέλες με EL....., EL.....,  
 EL......

Η αγέλη δεν είναι/είναι σε πρόγραμμα εμβολιασμού με το εμβόλιο RB-51/REV-1.

Οι γεωγραφικές συντεταγμένες της αγέλης: Γεωγραφικό πλάτος .....North/  
 Γεωγραφικό μήκος: .....East. Περιοχή: .....

Η αιμοληψία/γαλακτοληψία έγινε από τον/την δημόσιο/ιδιώτη κτηνίατρο κ./κα  
 ..... λόγω α) διατήρησης καθεστώτος Β3 ή Β4 ή β) αλλαγής καθεστώτος  
 ή γ) μετακίνησης βοοειδών ή δ) ελέγχου αποτελεσματικότητας REV-1 ή ε) θετικής γαλακτοληψίας  
 ή στ) άλλο λόγο (προσδιορίστε) .....

Η προηγούμενη αιμοληψία/γαλακτοληψία είχε γίνει την \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_ από τον/την  
 δημόσιο/ιδιώτη κτηνίατρο κ./κα .....

Η αγέλη δεν έχει μολυνθεί ποτέ από βρουκέλλωση./ Το τελευταίο θετικό κρούσμα  
 βρουκέλλωσης στην αγέλη ήταν το έτος 20\_\_\_\_.

Ο/Η κτηνίατρος

**Δελτίο Ορολογικού Ελέγχου για τη Βρουκέλλωση Βοοειδών** Υπόδειγμα Β2

Σε περιοχές που εφαρμόζεται πρόγραμμα εκρίζωσης

Κτηνιατρικό Εργαστήριο: .....

Ημερομηνία: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_

Αρ. πρωτ. Διαβιβαστικού: ..... Αριθμός Δελτίου: ..... Αρ. πρωτ. Κτην Εργ: .....

Ημερομηνία παραλαβής δειγμάτων: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_

Αριθμός δειγμάτων: .....	Κατάσταση δειγμάτων: .....	Αριθμός δειγμάτων με αιμόλυση: .....
Ημερομηνία εξέτασης με RBT: .../.../201....	Κωδικός:.....	Ημερομηνία εξέτασης με CFT: .../.../201....
		Κωδικός:.....

α/α	Σήμανση δειγματος	Σήμανση βοοειδούς	Φύλο (♂♀)	RBT	CFT	Παρατηρήσεις	α/α	Σήμανση δειγματος	Σήμανση βοοειδούς	Φύλο (♂♀)	RBT	CFT	Παρατηρήσεις
1		EL					26		EL				
2		EL					27		EL				
3		EL					28		EL				
4		EL					29		EL				
5		EL					30		EL				
6		EL					31		EL				
7		EL					32		EL				
8		EL					33		EL				
9		EL					34		EL				
10		EL					35		EL				
11		EL					36		EL				
12		EL					37		EL				
13		EL					38		EL				
14		EL					39		EL				
15		EL					40		EL				
16		EL					41		EL				
17		EL					42		EL				
18		EL					43		EL				
19		EL					44		EL				
20		EL					45		EL				
21		EL					46		EL				
22		EL					47		EL				
23		EL					48		EL				
24		EL					49		EL				
25		EL					50		EL				

Ο/Η υπεύθυνος/η εργαστηρίου

Σφραγίδα

Ο/Η ενεργήσας/σα την εξέταση



**Δελτίο Ορολογικού Ελέγχου για τη Βρουκέλλωση στα αγελαία βοοειδή (1/2)**

Σε περιοχές που εφαρμόζεται πρόγραμμα εμβολιασμού με REV-1

Κτηνιατρική Υπηρεσία: .....

Ημερομηνία: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_

Αρ. πρωτ.: .....

Κωδικός Αριθμός Εκμετάλλευσης: **EL**\_\_\_\_\_

Υγειονομική κατάσταση εκμετάλλευσης του προηγούμενου έτους				
στη Ζώνη Εμβολιασμού	Εμβολιασμένη	Ανεμβολίαστη	Θετικό(ά) κρούσμα(τα)	

(σημειώστε με ✓)

Στοιχεία κτηνοτρόφου: Όνομα..... Επίθετο..... Πατρώνυμο.....

Διεύθυνση εκμετάλλευσης: .....

Γεωγραφικές συντεταγμένες: Γεωγραφικό πλάτος .....North/ Γεωγραφικό μήκος: .....East

Τηλέφωνο οικίας: 2\_\_\_\_\_ Κινητό τηλέφωνο: 69\_\_\_\_\_.

Συστεγάζεται με τις εκμεταλλεύσεις: **EL**\_\_\_\_\_, **EL**\_\_\_\_\_, **EL**\_\_\_\_\_.

Είδος	Ηλικία	Θηλυκά ζώα	Αρσενικά ζώα	Σύνολο Ζώων
Αγελαία βοοειδή	< 1 έτους			
	> 1 έτους			
Σύνολο Ζώων				

\* Το παρόν έγγραφο έχει αξία Υπεύθυνης Δήλωσης του κτηνοτρόφου και αποτελεί απογραφή των ζώων της εκμετάλλευσής του.

Ημερομηνία δειγματοληψίας: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_

Το παρόν ΔΟΕ έχει ισχύ μέχρι \_\_\_/\_\_\_/201\_\_

Ο/Η κτηνοτρόφος

Ο/Η Προϊστάμενος

Ο/Η κτηνίατρος που διενέργησε την αιμοληψία



Σφραγίδα

**Δελτίο Ορολογικού Ελέγχου για τη Βρουκέλλωση στα αγελαία βοοειδή (2/2)**

Κτηνιατρικό Εργαστήριο: .....

Ημερομηνία: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_\_

Αριθμός Δελτίου: .....

Αρ. πρωτ.: .....

Ημερομηνία παραλαβής δειγμάτων: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_\_

Αριθμός δειγμάτων: .....	Κατάσταση δειγμάτων: .....	Αριθμός δειγμάτων με αιμόλυση: .....
Ημερομηνία εξέτασης με RBT: ..../...../201....	Κωδικός:.....	Ημερομηνία εξέτασης με CFT: ..../...../201....
Κωδικός:.....		

Συστεγάζεται με τις εκμεταλλεύσεις: EL\_\_\_\_\_, EL\_\_\_\_\_, EL\_\_\_\_\_.

α/α	Σήμανση δείγματος	Σήμανση βοοειδούς	RBT	CFT (ICFTU/ml)	Παρατηρήσεις	α/α	Σήμανση δείγματος	Σήμανση βοοειδούς	RBT	CFT (ICFTU/ml)	Παρατηρήσεις
1		EL				26		EL			
2		EL				27		EL			
3		EL				28		EL			
4		EL				29		EL			
5		EL				30		EL			
6		EL				31		EL			
7		EL				32		EL			
8		EL				33		EL			
9		EL				34		EL			
10		EL				35		EL			
11		EL				36		EL			
12		EL				37		EL			
13		EL				38		EL			
14		EL				39		EL			
15		EL				40		EL			
16		EL				41		EL			
17		EL				42		EL			
18		EL				43		EL			
19		EL				44		EL			
20		EL				45		EL			
21		EL				46		EL			
22		EL				47		EL			
23		EL				48		EL			
24		EL				49		EL			
25		EL				50		EL			

Ο/Η Υπεύθυνος/η εργαστηρίου

Σφραγίδα

Ο/Η ενεργήσας/σα την εξέταση

# Δελτίο Γαλακτοληψίας για τη Βρουκέλλωση Βοοειδών

Κτηνιατρικό Εργαστήριο: .....

Ημερομηνία: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_\_

Αρ. πρωτ. Διαβιβαστικού: .....

Αριθμός Δελτίου: ..... Αρ. πρωτ. Κτην. Εργ.: .....

Ημερομηνία παραλαβής δειγμάτων: ___/___/201___	Ημερομηνία εξέτασης με ELISA: ..../...../201....	Κωδικός: .....
Αριθμός δειγμάτων: .....	Κατάσταση δειγμάτων: .....	
Αποτελέσματα εξέτασης		Θετικό
Αρνητικό		
Παρατηρήσεις .....		
.....		
.....		
.....		

Ο/Η Υπεύθυνος/η εργαστηρίου



Ο/Η ενεργήσας/σα την εξέταση

**Δελτίο Εμβολιασμού κατά της *Br. melitensis* στα αγελαία βοοειδή**

Κτηνιατρική Υπηρεσία:.....

Ημερομηνία: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_\_

Αρ. πρωτ.: .....

Κωδικός Αριθμός Εκμετάλλευσης: **EL**\_\_\_\_\_

Υγειονομική κατάσταση εκμετάλλευσης του προηγούμενου έτους: Εμβολιασμένη...../ Ανεμβολίαστη...../ Θετικό(ά) κρούσμα(τα)..... (σημειώστε με ✓)

Στοιχεία κτηνοτρόφου: Όνομα..... Επίθετο..... Πατρώνυμο.....

Διεύθυνση εκμετάλλευσης: .....

Γεωγραφικές συντεταγμένες: Γεωγραφικό πλάτος .....North/ Γεωγραφικό μήκος: .....East

Τηλέφωνο οικίας: 2\_\_\_\_\_ Κινητό τηλέφωνο: 69\_\_\_\_\_.

Κτηνιατρική Υπηρεσία θερινής διαβίωσης εκμετάλλευσης: .....

Δημοτικό Διαμέρισμα θερινής διαβίωσης εκμετάλλευσης: .....

Είδος	Ηλικία	Θηλυκά εμβολιασμένα ζώα (από προηγούμενα έτη)	Θηλυκά ζώα που εμβολιάστηκαν σήμερα	Θηλυκά ζώα που έμειναν ανεμβολίαστα	Αρσενικά ζώα	Σύνολο Ζώων
Αγελαία βοοειδή	< 1 έτους					
	> 1 έτους					
Σύνολο Ζώων						

\* Το παρόν έγγραφο έχει αξία Υπεύθυνης Δήλωσης του κτηνοτρόφου και αποτελεί απογραφή των ζώων της εκμετάλλευσής του.

\*\* Επισυνάπτεται κατάλογος με τους αριθμούς σήμανσης των εμβολιασθέντων ζώων.

Ημερομηνία εμβολιασμού: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_\_

Το παρόν ΔΕ έχει ισχύ μέχρι \_\_\_/\_\_\_/201\_\_\_

Ο/Η κτηνοτρόφος

Ο/Η Προϊστάμενος



Ο/Η κτηνίατρος που διενέργησε τον εμβολιασμό

## Κατάλογος με τα εμβολιασθέντα θηλυκά βοοειδή με Rev-1 (ή RB-51)

Αγέλη **EL** \_\_\_\_\_

Ημερομηνία εμβολιασμού: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_

α/α	Σήμανση βοοειδούς	α/α	Σήμανση βοοειδούς
1	EL	46	EL
2	EL	47	EL
3	EL	48	EL
4	EL	49	EL
5	EL	<b>50</b>	<b>EL</b>
6	EL	51	EL
7	EL	52	EL
8	EL	53	EL
9	EL	54	EL
<b>10</b>	<b>EL</b>	55	EL
11	EL	56	EL
12	EL	57	EL
13	EL	58	EL
14	EL	59	EL
15	EL	<b>60</b>	<b>EL</b>
16	EL	61	EL
17	EL	62	EL
18	EL	63	EL
19	EL	64	EL
<b>20</b>	<b>EL</b>	65	EL
21	EL	66	EL
22	EL	67	EL
23	EL	68	EL
24	EL	69	EL
25	EL	<b>70</b>	<b>EL</b>
26	EL	71	EL
27	EL	72	EL
28	EL	73	EL
29	EL	74	EL
<b>30</b>	<b>EL</b>	75	EL
31	EL	76	EL
32	EL	77	EL
33	EL	78	EL
34	EL	79	EL
35	EL	<b>80</b>	<b>EL</b>
36	EL	81	EL
37	EL	82	EL
38	EL	83	EL
39	EL	84	EL
<b>40</b>	<b>EL</b>	85	EL
41	EL	86	EL
42	EL	87	EL
43	EL	88	EL
44	EL	89	EL
45	EL	<b>90</b>	<b>EL</b>

Ο/Η κτηνίατρος που διενέργησε τον εμβολιασμό

# Δελτίο Εμβολιασμού στα βοοειδή με RB-51

Κτηνιατρική Υπηρεσία:.....

Ημερομηνία: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_

Αρ. πρωτ.: .....

Κωδικός Αριθμός Εκμετάλλευσης: **EL**\_\_\_\_\_

Υγειονομική κατάσταση εκμετάλλευσης: Β\_\_\_

Στοιχεία κτηνοτρόφου: Όνομα..... Επίθετο..... Πατρώνυμο.....

Διεύθυνση εκμετάλλευσης: .....

Γεωγραφικές συντεταγμένες: Γεωγραφικό πλάτος .....North/ Γεωγραφικό μήκος: .....East

Τηλέφωνο οικίας: 2\_\_\_\_\_ Κινητό τηλέφωνο: 69\_\_\_\_\_.

Είδος	Ηλικία	Θηλυκά εμβολιασμένα ζώα (από προηγούμενα έτη)	Θηλυκά ζώα που εμβολιάστηκαν σήμερα	Θηλυκά ζώα που έμειναν ανεμβολίαστα	Αρσενικά ζώα	Σύνολο Ζώων
Βοοειδή	< 1 έτους					
	> 1 έτους					
<b>Σύνολο Ζώων</b>						

\* Το παρόν έγγραφο έχει αξία Υπεύθυνης Δήλωσης του κτηνοτρόφου και αποτελεί απογραφή των ζώων της εκμετάλλευσής του.

\*\* Επισυνάπτεται κατάλογος με τους αριθμούς σήμανσης των εμβολιασθέντων ζώων.

Ημερομηνία εμβολιασμού: \_\_\_/\_\_\_/201\_\_

Ο/Η κτηνοτρόφος

Ο/Η Προϊστάμενος

Σφραγίδα

Ο/Η κτηνίατρος που διενέργησε τον εμβολιασμό



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
 ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ .....  
 ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ .....  
 ΓΕΝΙΚΗ Δ/ΝΣΗ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ  
 ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
 Δ/ΝΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
 ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ/ΚΤΗΝ. ΓΡΑΦΕΙΟ .....

Υπόδειγμα Β6

....., \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_  
 Αρ. πρωτ: .....

Ταχ. Δ/ση :  
 ΤΚ. :  
 Πληροφορίες :  
 Τηλέφωνο :  
 Fax :  
 e-mail :

Προς: 1. Κτηνοτρόφο κ./κα .....

Κοιν.: 2. Τυροκομείο/ Γαλακτοβιομηχανία .....

### Βεβαίωση Υγειονομικού Καθεστώτος της Αγέλης

Βεβαιώνεται ότι όπως προκύπτει από τα αρχεία της υπηρεσίας και την κλινική εικόνα των ζώων, η αγέλη βοοειδών του/της κτηνοτρόφου κ./κα ..... του ..... κατοίκου ..... με κωδικό εκμετάλλευσης EL....., η οποία αποτελείται από ..... (\_\_\_) βοοειδή, (δηλαδή \_\_\_ θηλυκά και \_\_\_ αρσενικά), ανήκει στο υγειονομικό καθεστώς **B** ..... και **T** .....

Αυτό το υγειονομικό καθεστώς σημαίνει ότι **πληρούνται/ δεν πληρούνται** οι υγειονομικές απαιτήσεις για την παραγωγή νωπού γάλακτος, όπως καθορίζονται στο κεφάλαιο I του τμήματος ΙΧ (περί νωπού γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων) του Κανονισμού (ΕΚ) 853/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29<sup>ης</sup> Απριλίου 2004 (L226/22), όπως ισχύει.

Ημερομηνία τελευταίας αιμοληψίας/γαλακτοληψίας με αρνητικά αποτελέσματα:

\_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_

Ημερομηνία τελευταίου φυματινισμού με αρνητικά αποτελέσματα: \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_

Ημερομηνία τελευταίου εμβολιασμού: \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_ Είδος εμβολίου: RB-51

Η βεβαίωση ισχύει μέχρι την επόμενη **αιμοληψία/γαλακτοληψία/φυματινισμό**, δηλαδή την \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_.

Ο/Η κτηνίατρος



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ .....  
ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ .....  
ΓΕΝΙΚΗ Δ/ΝΣΗ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ  
ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
Δ/ΝΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ/ΚΤΗΝ. ΓΡΑΦΕΙΟ .....

Υπόδειγμα Α7

....., \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_  
Αρ. πρωτ:

Ταχ. Δ/ση :  
ΤΚ. :  
Πληροφορίες :  
Τηλέφωνο :  
Fax :  
e-mail :

Προς: Κτηνιατρικό εργαστήριο Λάρισας. 6° χλμ  
Λάρισας – Τρικάλων, ΤΚ. 41110.  
Υπόψη κ./κα .....

**ΘΕΜΑ: «Αποστολή παθολογικού υλικού»**

- 1) Αποστέλλουσα Κτηνιατρική Υπηρεσία: .....
- 2) Ονοματεπώνυμο, διεύθυνση και τηλέφωνο ιδιοκτήτη: .....
- 3) Κωδικός εκμετάλλευσης: EL \_\_\_\_\_
- 4) Είδος, φύλο, ηλικία ζώου: .....
- 5) Είδος αποστελλόμενου παθολογικού υλικού: .....
- 6) Ημερομηνία λήψης παθολογικού υλικού: \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_, Ώρα: .....:.....
- 7) Ημερομηνία έναρξης της νόσου: \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_
- 8) Ημερομηνία θανάτου: \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_, Ώρα: .....:.....
- 9) Επιζωοτιολογικές πληροφορίες – ιστορικό της νόσου (υπάρχοντα ζώα, νοσούντα, θανόντα κτλ):  
.....  
.....  
.....
- 10) Υγειονομικό καθεστώς βρουκέλλωσης:
- 11) Συμπτώματα (κλινικά ευρήματα): .....
- 12) Νεκροτομικά ευρήματα: .....
- 13) Θεραπευτική αγωγή: .....
- 14) Κλινική διάγνωση: .....
- 15) Αιτούμενη εξέταση - αναζήτηση: .....
- 16) Ημερομηνία και μέσο αποστολής (πχ. ΚΤΕΛ, courier): \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_, .....

Ο/Η κτηνίατρος





**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ**  
**ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΑΝΑΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗΣ,**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ & ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ**  
**Δ/ΝΣΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΛΑΡΙΣΑΣ**  
**ΕΘΝΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗΣ**

**Υπόδειγμα 8**

Λάρισα, \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_

Αρ. πρωτ:

Ταχ. Δ/ση : 6<sup>ο</sup> km Ε.Ο.Λάρισας – Τρικάλων  
 ΤΚ. : 41110  
 Πληροφορίες : Δρ. Α. Στουρνάρα – Τσελεπιδίου  
 Τηλέφωνο : 2410-617980  
 Fax : 2410-617982  
 e-mail : [vetlab@otenet.gr](mailto:vetlab@otenet.gr)

**Προς:** ΥΠΕΠΑ. Γενική Δ/ση Βιώσιμης Ζωικής Παραγωγής & Κτηνιατρικής. Διεύθυνση Υγείας των Ζώων. Τμήμα Ζωοανθρωπονόσων  
**Κοιν.:** ΥΠΕΠΑ. Γενική Δ/ση Βιώσιμης Ζωικής Παραγωγής & Κτηνιατρικής. Δ/ση Προστασίας των Ζώων, Φαρμάκων και Κτηνιατρικών Εφοδίων. Τμήμα Κτηνιατρικών Φαρμάκων, Κατάλοιπων και Κτηνιατρικών Εφοδίων

**Θέμα:** «α) Εργαστηριακός έλεγχος 2 φιαλιδίων των παρτίδων **131365**, 2 φιαλιδίων των παρτίδων **131366** και 2 φιαλιδίων των παρτίδων **131364** με ημερομηνία λήξης **05/2014** έκαστο, εμβολίου REV-1 και  
 β) Εργαστηριακός έλεγχος 6 φιαλιδίων διαλυτών με αριθμό παρτίδας **140077** και ημερομηνία λήξης, **06/2015**.»

**A) Έλεγχος διαλύτη για το εμβόλιο REV-1. Παρτίδα διαλυτών **140077****

Όγκος: 2ml/φιαλίδιο

Αριθμός δόσεων: 50 δόσεις /φιαλ. διαλύτη

Έλεγχος στειρότητας διαλύτη: Δεν αναπτύχθηκαν αερόβιοι, αναερόβιοι, ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί, μυκοπλάσματα και μύκητες.

**Συμπέρασμα:** Οι διαλύτες με αριθμό παρτίδας **140077** διαπιστώθηκε ότι είναι στείροι και επομένως κρίνονται κατάλληλοι για την αποκατάσταση του εμβολίου REV-1 των παρτίδων **131364, 131365, 131366**.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Τα αποτελέσματα αφορούν μόνο τις συγκεκριμένες παρτίδες φιαλιδίου των διαλυτών που αναστάλθηκε στο Εργαστήριο.

**B) Έλεγχος Εμβολίου REV-1**

α/α	Παρτίδα	Έλεγχος Υγρασίας	Έλεγχος στειρότητας				
			Υγρασία	Αερόβια Βακτήρια	Αναερόβια βακτήρια	Ψυχρόφιλα βακτήρια	Μυκόπλασμα
1	<b>131365</b>	<2%	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
2	<b>131366</b>	<2%	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
3	<b>131364</b>	<2%	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό

α/α	Παρτίδα	Χαρακτηριστικά Στελέχους	Έλεγχος διάσπασης αποικιών (dissociation) με χρώση Crystal Violet	Καταμέτρηση Αποικιών
		Ανάπτυξη αποικιών <i>Brucella spp.</i> στα ειδικά υποστρώματα	Αποικίες	Αριθμός αποικιών ανά δόση εμβολίου
1	131365	Ναι	>99%	$2,7 \times 10^8$ CFT/DOSE
2	131366	Ναι	>99%	$2,5 \times 10^8$ CFT/DOSE
3	131364	Ναι	>99%	$2,3 \times 10^8$ CFT/DOSE

Μετά την αποκατάσταση και την καλλιέργεια, τα εμβολιακά στελέχη των παρτίδων 131365, 131366, 131364 αναπτύχθηκαν κανονικά χωρίς να παρουσιάσουν διάσπαση.

**Συμπέρασμα:** Τα εμβόλια REV-1 των παρτίδων 131364, 131365, 131366 είναι κατάλληλα για χρήση. Δίνεται παράταση έως τις 30/07/2014. Ο έλεγχος διενεργήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναφέρεται στο Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines (Office International Des Epizooties 2008).

Σημείωση: Τα αποτελέσματα αφορούν μόνο τη συγκεκριμένη παρτίδα εμβολίων που αποστάλθηκε στο Εργαστήριο.

Ο/Η ενεργήσας/σα την εξέταση

Ο/Η Προϊστάμενος/η της Δ/νσης του  
Εργαστηρίου

Κτηνίατρος

**ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ****Βρουκέλλωση 2015****A) ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

<b>1)</b>	<b>α/α Κατάλογου: 46</b>	<b>ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ INDIRECT ELISA ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗΣ ΣΕ ΟΡΟ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΒΟΟΕΙΔΩΝ</b>
<p>Για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά της <i>Brucella abortus</i> σε ορό γάλακτος βοοειδών με την Ανοσοενζυμική δοκιμή Indirect Elisa.</p> <p>Για συνενωμένα δείγματα γάλακτος ή ορού γάλακτος:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Η δοκιμή πρέπει να έχει βαθμονομηθεί, ώστε προαραίωση 1/1000 του ΟΙΕΙΣΣ ή προαραίωση 1/16 του ΟΙΕΕΛΙΣΑWPSS ή προαραίωση 1/125 του ΟΙΕΕΛΙΣΑΣPSS 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.</li> <li>2. Το ΟΙΕΕΛΙΣΑΝSS αραιωμένο 1/10 σε αρνητικό γάλα πρέπει να δίνει αρνητική αντίδραση.</li> <li>3. Η δοκιμή πρέπει να είναι ικανή να ανιχνεύει παρουσία μόλυνσης σε μεμονωμένο ζώο της ομάδας ζώων, της οποίας έχουν συνενωθεί τα δείγματα γάλακτος ή ορού γάλακτος.</li> <li>4. Σε κάθε συσκευασία (KIT) πρέπει να περιλαμβάνονται όλα τα απαραίτητα για την εκτέλεση της δοκιμής υλικά και σε επαρκή ποσότητα για την εκτέλεση του αριθμού των δοκιμών που προβλέπονται (Μικροπλάκες Elisa 8x12 βοθρίων με καθηλωμένο αντιγόνο, σύζευγμα, χρωμογόνο, θετικός και αρνητικός μάρτυρας σύμφωνα με τα πρότυπα που έχουν καθοριστεί από την ΕΕ, διάλυμα για την αραιώση των δειγμάτων, πλυστικό διάλυμα πλακών και διάλυμα αναστολής της αντίδρασης).</li> </ol>		
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Οι στήλες των μικροπλακών της I-Elisa πρέπει να είναι αποσπώμενες, ώστε να υπάρχει δυνατότητα εξέτασης μεμονωμένων αριθμών δειγμάτων.</li> <li>2. Το προϊόν πρέπει να έχει διάρκεια ισχύος τουλάχιστο 12 μήνες από την ημερομηνία παράδοσης.</li> </ol>		
<b>Συσκευασία</b>	kit των 10 πλακών	
<b>Ποσότητα</b>	10 kit	
<b>2)</b>	<b>α/α Κατάλογου: 47</b>	<b>Ανοσοενζυμική Δοκιμή Indirect ELISA για τη Διάγνωση της Βρουκέλλωσης σε Ορό Αίματος Βοοειδών</b>
<p>Για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του βακτηρίου <i>Brucella abortus</i> σε ορό αίματος βοοειδών με την Ανοσοενζυμική Δοκιμή Indirect Elisa.</p> <p>Για μεμονωμένα δείγματα ορού:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Η δοκιμή πρέπει να έχει βαθμονομηθεί, ώστε προαραίωση 1/150 του ΟΙΕΙΣΣ ή προαραίωση 1/2 του ΟΙΕΕΛΙΣΑWPSS ή προαραίωση 1/16 του ΟΙΕΕΛΙΣΑΣPSS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) πρέπει να δίνουν θετική αντίδραση.</li> <li>2. Η προαραίωση 1/600 του ΟΙΕΙΣΣ ή προαραίωση 1/8 του ΟΙΕΕΛΙΣΑWPSS ή προαραίωση 1/64 του ΟΙΕΕΛΙΣΑΣPSS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) πρέπει να δίνουν αρνητική αντίδραση.</li> <li>3. Ο ΟΙΕΕΛΙΣΑΝSS πρέπει να δίνει πάντα αρνητική αντίδραση.</li> <li>4. Σε κάθε συσκευασία (kit) πρέπει να περιλαμβάνονται όλα τα απαραίτητα για την εκτέλεση της δοκιμής υλικά και σε επαρκή ποσότητα για την εκτέλεση του αριθμού των δοκιμών που προβλέπονται (Μικροπλάκες Elisa 8x12 βοθρίων με καθηλωμένο αντιγόνο, σύζευγμα, χρωμογόνο, θετικός και αρνητικός μάρτυρας σύμφωνα με τα πρότυπα που έχουν καθοριστεί από την ΕΕ, διάλυμα για την αραιώση των δειγμάτων πλυστικό διάλυμα πλακών και διάλυμα αναστολής της αντίδρασης).</li> </ol>		
Οι στήλες των μικροπλακών I-Elisa πρέπει να είναι αποσπώμενες, ώστε να υπάρχει		

δυνατότητα εξέτασης μεμονωμένων αριθμών δειγμάτων.		
<b>Συσκευασία</b>	kit των 10 πλακών	
<b>Ποσότητα</b>	10 kit	
<b>3)</b>	<b>α/α Κατάλογου: 225</b>	<b>Αντιγόνο Σύνδεσης Συμπληρώματος</b>
Για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης βοοειδών, προβάτων και αιγών σε ορό αίματος με τη δοκιμή Σύνδεσης του Συμπληρώματος.		
Το αντιγόνο πρέπει να περιέχει εναιώρημα βακτηρίων <i>B. abortus</i> βιότυπος 1 στέλεχος 99 (Weybridge) ή 1119-3 (USDA) σε διάλυμα phenol-saline (NaCl 0,85%(m/v) και phenol 0,5% ή σε διάλυμα Veronal buffer.		
Το αντιγόνο πρέπει να είναι συσκευασμένο σε φιαλίδια 100ml και να αραιώνεται 1/10 ή 1/100.		
Το αντιγόνο πρέπει να έχει τιτλοποιηθεί σύμφωνα με τα πρότυπα της ΕΕ, έτσι ώστε να δίνει 50% αιμόλυση όταν αντιδρά με το Διεθνή Ορό Αναφοράς (OIE International Standard Serum-OIEISS) σε αραιώση 1/200.		
<b>Συσκευασία</b>	Φιάλη των 100ml	
<b>Ποσότητα</b>	6 φιάλες	
<b>4)</b>	<b>α/α Κατάλογου: 226</b>	<b>Αντιγόνο ROSE BENGAL</b>
Για την ορολογική διάγνωση της Βρουκέλλωσης των βοοειδών, προβάτων και αιγών με τη δοκιμή Rose Bengal.		
Το αντιγόνο πρέπει να περιέχει εναιώρημα βακτηρίων <i>B. abortus</i> βιότυπος 1 στέλεχος 99 (Weybridge) ή 1119-3 (USDA) σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 3,65±0,05 κεχρωσμένο με τη χρωστική Ερυθρό της Βεγγάλης.		
Το αντιγόνο της δοκιμής πρέπει να έχει τιτλοποιηθεί σύμφωνα με τα πρότυπα της ΕΕ, έτσι ώστε να δίνει θετική αντίδραση με τον Διεθνή ορό αναφοράς (OIE International Standard Serum-OIEISS) όταν αυτός βρίσκεται σε αραιώση 1/45 (22,2 ICFTU/ml) και αρνητική όταν βρίσκεται σε αραιώση 1/55 (18,2 ICFTU/ml).		
Το αντιγόνο πρέπει να είναι στείρο, έτοιμο προς χρήση και να έχει παρασκευασθεί πρόσφατα.		
<b>Συσκευασία</b>	φιάλες του 1lit, των 100ml ή 10ml	
<b>Ποσότητα</b>	25 lit	
<b>Χρόνος λήξης</b>	τουλάχιστον 12 μήνες από την ημερομηνία παράδοσης	
<b>5)</b>	<b>α/α Κατάλογου: 227A</b>	<b>Θετικός Ορός <i>Brucella abortus</i></b>
Για την ορολογική διάγνωση της βρουκέλλωσης βοοειδών, προβάτων και αιγών με τη δοκιμή της Σύνδεσης του Συμπληρώματος.		
Το προϊόν πρέπει να συνοδεύεται από έντυπες οδηγίες στις οποίες να αναφέρεται ο βαθμός θετικότητας που παρατηρείται σε μία προκαθορισμένη αραιώση μετά από τιτλοποίηση στη δοκιμή Σύνδεση του Συμπληρώματος, σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα.		
<b>Συσκευασία</b>	φιαλίδια του 1ml	
<b>Ποσότητα</b>	50 φιαλίδια	
<b>6)</b>	<b>α/α Κατάλογου: 338</b>	<b>Haemolytic serum (Anti-sheep hemolysin)</b>
Ορός αίματος κόνικλου που περιέχει υψηλό τίτλο αντισωμάτων ( <b>ελάχιστος τίτλος μίας αιμολυτικής μονάδας 1:5.000</b> ) κατά των ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου και χρησιμοποιείται για την παρασκευή του αιμολυτικού συστήματος στη δοκιμή της σύνδεσης του συμπληρώματος. Πρέπει να έχει τιτλοποιηθεί σύμφωνα με την τεχνική Kolmer και να αναγράφεται ο τίτλος σε IU/ml σε κάθε φιαλίδιο.		

<b>Μορφή</b>	λυόφιλη													
<b>Συσκευασία</b>	κουτί των 2 φιαλιδίων των 2,5ml έκαστο													
<b>Ποσότητα</b>	4 ΚΟΥΤΙΑ													
<b>7)</b>	α/α Κατάλογου: 345	<b>Συμπλήρωμα [COMPLEMENT]</b>												
<p>Λυοφιλοποιημένο συμπλήρωμα ινδικού χοιριδίου με τον απαραίτητο διαλύτη για ανασύσταση το οποίο χρησιμοποιείται στη μέθοδο Σύνδεσης του Συμπληρώματος για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων ορισμένων λοιμωδών νοσημάτων των ζώων πχ βρουκέλλωση, χλαμύδια κτλ.</p>														
<b>Μορφή</b>	λυόφιλη													
<b>Συσκευασία</b>	1 κουτί: 2vials x 3,5ml complement + 2 vials x 5,5ml solvent (αραιωτικό)													
<b>Ποσότητα</b>	25 ΚΟΥΤΙΑ													
<b>8)</b>	α/α Κατάλογου: 455	<b>Ανοσοενζυμική Δοκιμή Competitive ELISA για την Ανίχνευση Αντισωμάτων κατά του <i>B. abortus</i> σε Ορό Αίματος Βοοειδών, Προβάτων και Αιγών</b>												
<p>Η δοκιμή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του <i>B. abortus</i> σε ορό αίματος βοοειδών, προβάτων και αιγών.</p> <p>Σε κάθε συσκευασία (kit) πρέπει να περιλαμβάνονται όλα τα απαραίτητα υλικά για την εκτέλεση της δοκιμής και σε επαρκή ποσότητα για την εκτέλεση του αριθμού των δοκιμών που προβλέπονται (Μικροπλάκες Elisa 8x12 βοθρίων με καθηλωμένο αντιγόνο, ισχυρός θετικός μάρτυρας, ασθενής θετικός μάρτυρας, και αρνητικός μάρτυρας, ρυθμιστικό διάλυμα προαραίωσης ορών, μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για τον επίτοπο Ο-πολυσακχαρίτη του αντιγόνου S-LPS της <i>B. abortus</i> S 1119-3 σε λυόφιλη μορφή, πυκνό πλυστικό διάλυμα, σύζευγμα μονοκλωνικών αντι-αντισωμάτων ποντικίου της κλάσης IgG ειδικό για μηρυκαστικά σεσημασμένο με ενζυμο Peroxidase, διάλυμα χρωμογόνου, διάλυμα θειικού οξέως).</p> <p>Οι στήλες των μικροπλακών C-Elisa πρέπει να είναι αποσπώμενες, ώστε να υπάρχει δυνατότητα εξέτασης μεμονωμένων αριθμών δειγμάτων.</p>														
<b>Συσκευασία</b>	kit των 10 πλακών													
<b>Ποσότητα</b>	2 kit													
<b>9)</b>	α/α Κατάλογου: 515	<b>Ca-Mg veronal buffer (Χημικά)</b>												
<p>Να χρησιμοποιείται για αραίωση ορών και αντιδραστηρίων στη μέθοδο σύνδεσης συμπληρώματος και να έχει την παρακάτω σύσταση:</p>														
<b>Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος</b>														
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Ουσία</th> <th>Περιεκτικότητα g</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sodium chloride</td> <td>8,5</td> </tr> <tr> <td>Diethylmalonylurea</td> <td>0,575</td> </tr> <tr> <td>Sodium dithylmalonylurea</td> <td>0,185</td> </tr> <tr> <td>Magnesium chloride</td> <td>0,168</td> </tr> <tr> <td>Calcium chloride</td> <td>0,028</td> </tr> </tbody> </table>			Ουσία	Περιεκτικότητα g	Sodium chloride	8,5	Diethylmalonylurea	0,575	Sodium dithylmalonylurea	0,185	Magnesium chloride	0,168	Calcium chloride	0,028
Ουσία	Περιεκτικότητα g													
Sodium chloride	8,5													
Diethylmalonylurea	0,575													
Sodium dithylmalonylurea	0,185													
Magnesium chloride	0,168													
Calcium chloride	0,028													
<b>Συσκευασία</b>	Υλικό σε λυόφιλη μορφή εντός φιαλιδίων. 4 φιαλίδια/ κουτί τα οποία αποδίδουν 4 lit έτοιμου προς χρήση προϊόντος													
<b>Ποσότητα</b>	1 ΚΟΥΤΙ													
<b>10)</b>	α/α Κατάλογου: 531	<b>I-ELISA σε γάλα και σε ορό αίματος βοοειδών (κοινό)</b>												
<p>1. Η δοκιμή πρέπει να έχει βαθμονομηθεί, ώστε προαραίωση 1/1000 του ΟΙΕΙSS ή</p>														

<p>προαραίωση 1/16 του OIEELISAWPSS ή προαραίωση 1/125 του OIEELISASPSS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) και εκ νέου αραιώση 1/10 σε αρνητικό γάλα να δίνουν θετική αντίδραση.</p> <p>2. Το OIEELISANSS αραιωμένο 1/10 σε αρνητικό γάλα πρέπει να δίνει αρνητική αντίδραση.</p> <p>3. Η δοκιμή πρέπει να είναι ικανή να ανιχνεύει παρουσία μόλυνσης σε μεμονωμένο ζώο της ομάδας ζώων, της οποίας έχουν συνενωθεί τα δείγματα γάλακτος ή ορού γάλακτος.</p> <p>4. Η δοκιμή πρέπει να έχει βαθμονομηθεί, ώστε προαραίωση 1/150 του OIEISS ή προαραίωση 1/2 του OIEELISAWPSS ή προαραίωση 1/16 του OIEELISASPSS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) να δίνουν θετική αντίδραση.</p> <p>5. Η προαραίωση 1/600 του OIEISS ή προαραίωση 1/8 του OIEELISAWPSS ή προαραίωση 1/64 του OIEELISASPSS σε αρνητικό ορό (ή σε αρνητικό ορό προερχόμενο από συνένωση δειγμάτων) να δίνουν αρνητική αντίδραση.</p> <p>6. Ο OIEELISANSS πρέπει να δίνει πάντα αρνητική αντίδραση.</p> <p>7. Σε κάθε συσκευασία (kit) πρέπει να περιλαμβάνονται όλα τα απαραίτητα για την εκτέλεση της δοκιμής υλικά και σε επαρκή ποσότητα για την εκτέλεση του αριθμού των δοκιμών που προβλέπονται (Μικροπλάκες Elisa 8x12 βοθρίων με καθηλωμένο αντιγόνο, σύζευγμα, χρωμογόνο, θετικός και αρνητικός μάρτυρας σύμφωνα με τα πρότυπα που έχουν καθοριστεί από την ΕΕ, διάλυμα για την αραιώση των δειγμάτων πλυστικό διάλυμα πλακών και διάλυμα αναστολής της αντίδρασης).</p> <p>8. Οι στήλες των μικροπλακών I-Elisa πρέπει να είναι αποσπώμενες, ώστε να υπάρχει δυνατότητα εξέτασης μεμονωμένων αριθμών δειγμάτων.</p>		
<b>Συσκευασία</b>	kit των 10 πλακών	
<b>Ποσότητα</b>	2 kit	
<b>11)</b>	α/α Κατάλογου: (Δεν υπάρχει)	<b>Μονοί Ασκοί Συλλογής Αίματος</b>
<p>Ασκός συλλογής αίματος για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης βοοειδών, προβάτων και αιγών σε ορό αίματος με τη δοκιμή Σύνδεσης του Συμπληρώματος.</p> <p>Το σύστημα συλλογής αίματος πρέπει να διατίθεται με ειδικό σύστημα λήψεως δειγμάτων αίματος εν κενό σε κλειστό κύκλωμα. Ο τρόπος δειγματοληψίας να μην προκαλεί καμιάς μορφής αιμόλυση στα ληφθέντα δείγματα και να φέρει κάλυμμα εξασφαλίζοντας την πρώτη χρήση του. Πρέπει να φέρει α) 63ml αντιπηκτικό CPDA-1, χωρητικότητας 400-450ml και ενσωματωμένο σύστημα προστασίας από πιθανά τρυπήματα της βελόνης και από πιθανό κίνδυνο μόλυνσης για το βοηθητικό προσωπικό, β) να παρέχει πλήρη ασφάλεια και να μην ασφαλίσει πριν από την αιμοληψία και με κανένα χειρισμό. Μετά την ασφάλιση της βελόνης το σύστημα δε θα επιτρέπει την αποκάλυψη της, γ) το ενσωματωμένο δειγματοληπτικό σύστημα να διαθέτει κάλυμμα εξασφαλίζοντας την πρώτη χρήση του, δ) το πλαστικό των ασκών να είναι από διαυγές και άχρωμο πλαστικό PVC, ε) οι ασκοί να είναι συσκευασμένοι ανά ένας, χωρίς να είναι διπλωμένοι με τρόπο που να αποφεύγεται η στρέβλωση του αυλού αιμοληψίας και των συνδετικών σωληνώσεων, σε πλαστικοποιημένο φύλλο διαφανές με δυνατότητα αντίληψης του περιεχομένου και κατόπιν σε χαρτοκιβώτιο.</p> <p>Όλες οι απαραίτητες πληροφορίες, όπως αριθμός παρτίδας, ημερομηνία παραγωγής, ημερομηνία λήξης, περιεχόμενο αντιπηκτικό, θερμοκρασία αποθήκευσης, είδος του ασκού κτλ να αναγράφονται πάνω στην πλαστική θήκη καθώς και στην εξωτερική επιφάνεια της συσκευασίας (χαρτοκιβώτιο).</p>		
<b>Ποσότητα</b>	20 ασκοί	

Ο τόπος παράδοσης για όλα τα αντιδραστήρια είναι στο Εργαστήριο Αναφοράς Βρουκέλλωσης (Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας) και η παράδοση είναι άμεση. Ο χρόνος λήξης είναι τουλάχιστον 12 μήνες από την ημερομηνία παράδοσης.

Τα προϊόντα πρέπει να συνοδεύονται από Πιστοποιητικό Ελέγχου Ποιότητας (Certificate of quality control) για κάθε παρτίδα προϊόντος που αποστέλλεται στο εργαστήριο, ειδάλλως δε θα πραγματοποιείται η παραλαβή για τις παρτίδες που δε συνοδεύονται από τα αντίστοιχα πιστοποιητικά. Επίσης, πρέπει να συνοδεύονται από έντυπες οδηγίες τουλάχιστο σε μία από τις διεθνώς αναγνωρισμένες γλώσσες στις οποίες να αναφέρεται η ημερομηνία παρασκευής και λήξης τους.

Οι προαναφερόμενες τεχνικές προδιαγραφές ορίσθηκαν με βάση τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 535/2002 της Επιτροπής της 21 Μαρτίου για την τροποποίηση του παραρτήματος Γ της οδηγίας 64/432 ΕΟΚ του Συμβουλίου και την τροποποίηση της απόφασης 2000/330/ΕΚ. Κατά συνέπεια είναι απαραίτητο να πληρούνται οι τεχνικές προδιαγραφές οι οποίες αναφέρονται, προκειμένου να εξασφαλισθεί η εγκυρότητα και αξιοπιστία της δοκιμής.

## **B) ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΓΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

<b>1)</b>	<b>α/α Κατάλογου: A2</b>	<b>AGAR GRANULATED</b>												
Στερεοποιητική ουσία υψηλής καθαρότητας και πηκτικής ικανότητας που χρησιμοποιείται για την παρασκευή θρεπτικών στερεών υποστρωμάτων.														
<b>Μορφή</b>	κοκκώδες													
<b>Συσκευασία</b>	1.000g													
<b>Ποσότητα</b>	1 συσκευασία													
<b>Χρόνος λήξης</b>	Τουλάχιστον 4 χρόνια από την ημερομηνία παραλαβής													
<b>2)</b>	<b>α/α Κατάλογου: A14</b>	<b>BLOOD AGAR BASE No II</b>												
Υλικό που χρησιμοποιείται στην απομόνωση και διαφοροποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών.														
<b>Μορφή</b>	σκόνη ή κοκκώδης σύσταση													
<b>Συσκευασία</b>	τεμάχιο των 500g													
<b>Ποσότητα</b>	1 συσκευασία													
<b>Χρόνος λήξης</b>	3-4 χρόνια από την ημερομηνία παραλαβής													
<b>Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος</b>														
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Ουσία</th> <th style="text-align: left;">Περιεκτικότητα g/lit</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Proteose peptone</td> <td>15,0</td> </tr> <tr> <td>Liver digest</td> <td>2,5</td> </tr> <tr> <td>Yeast extract</td> <td>5,0</td> </tr> <tr> <td>Sodium chloride</td> <td>5,0</td> </tr> <tr> <td>Agar</td> <td>12,0</td> </tr> </tbody> </table>			Ουσία	Περιεκτικότητα g/lit	Proteose peptone	15,0	Liver digest	2,5	Yeast extract	5,0	Sodium chloride	5,0	Agar	12,0
Ουσία	Περιεκτικότητα g/lit													
Proteose peptone	15,0													
Liver digest	2,5													
Yeast extract	5,0													
Sodium chloride	5,0													
Agar	12,0													
<b>3)</b>	<b>α/α Κατάλογου: A24</b>	<b>BRUCELLA MEDIUM BASE</b>												
Θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια <i>Brucella</i> spp.														
<b>Μορφή</b>	σκόνη ή κοκκώδης σύσταση													
<b>Συσκευασία</b>	500g													
<b>Ποσότητα</b>	2 συσκευασίες													
<b>Χρόνος λήξης</b>	τουλάχιστον 2 χρόνια από την ημερομηνία παραλαβής													

**Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος**

Ουσία	Περιεκτικότητα g/lt
Peptone	10,0
Lab-Lemco	5,0
Glucose	10,0
Sodium chloride	5,0
Agar	15,0

pH 7,4±0,2

**4) α/α Κατάλογου: A79 MACCONKEY AGAR**

Υπόστρωμα εκλεκτικό για την απομόνωση κολοβακτηριοειδών, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.

**Μορφή** σκόνη ή κοκκώδης σύσταση**Συσκευασία** 1 συσκευασία**Ποσότητα** 500g**Χρόνος λήξης** τουλάχιστον 2 χρόνια από την ημερομηνία παραλαβής**Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος**

Ουσία	Περιεκτικότητα g/lt
Peptone from casein	17,00
Peptone from meat	3,00
Sodium chloride	5,00
Lactose	10,00
Bile salt mixture	1,50
Neutral red	0,03
Crystal violet	0,001
Agar-agar	13,50

pH 7,1±0,2

**5) α/α Κατάλογου: A89 MEAT EXTRACT (BEEF EXTRACT), desiccated**

Εμπλουτιστικός παράγοντας στην παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων. Αντικαθιστά το εκχύλισμα κρέατος εμπλουτίζοντας με άζωτο, βιταμίνες, αμινοξέα και οργανικά συστατικά τα θρεπτικά υποστρώματα.

**Μορφή** σκόνη**Συσκευασία** 1 συσκευασία**Ποσότητα** 500g**Χρόνος λήξης** τουλάχιστον 3 χρόνια από την ημερομηνία παραλαβής**Τυπική ανάλυση%**

Ουσία	Περιεκτικότητα
Total nitrogen (TN)	13,9
Amino nitrogen (AN)	2

**6) α/α Κατάλογου: A90 METHYL RED VOGUES PROSKAUER BROTH**

**Παρατηρήσεις:** Το πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου να περιλαμβάνει κατ' ελάχιστον τα φυσικά χαρακτηριστικά του προϊόντος και την επίδοσή του με τουλάχιστον 2 θετικά και 2 αρνητικά στελέχη μικροοργανισμών, κατά προτίμηση σε μεικτές καλλιέργειες (θετικών και αρνητικών μικροοργανισμών μαρτύρων) και σε μονοκαλλιέργεια.



<b>Μορφή</b>	σκόνη
<b>Συσκευασία</b>	500g
<b>Ποσότητα</b>	2 συσκευασίες
<b>Χρόνος λήξης</b>	3-4 χρόνια από την ημερομηνία παραλαβής

**Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος**

Ουσία	Περιεκτικότητα g/lit
Peptone	7,00
Dextrose	5,00
Dipotassium Hydrogen phosphate (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5,00
Lactose	10,00

pH 6,9±0,2 στους 25°C

<b>7)</b>	α/α Κατάλογου: <b>A96</b>	<b>Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis medium (MSRV)</b>
-----------	---------------------------	---

Ημίρρευστο εμπλουτιστικό υπόστρωμα για απομόνωση των *Salmonella* spp.

**Παρατηρήσεις:** Το πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου να περιλαμβάνει κατ' ελάχιστον τα φυσικά χαρακτηριστικά του προϊόντος και την επίδοσή του σε θετικά και αρνητικά στελέχη μικροοργανισμών μαρτύρων.

<b>Μορφή</b>	σκόνη προς ανασύσταση
<b>Συσκευασία</b>	500g
<b>Ποσότητα</b>	1 συσκευασία
<b>Χρόνος λήξης</b>	κατ' ελάχιστο 18 μήνες από την ημερομηνία παραλαβής

**Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος**

Ουσία	Περιεκτικότητα g/lit
Tryprouse	4,59
Casein hydrolysate	4,59
Sodium chloride	7,34
Potassium dihydrogen phosphate	1,47
Magnesium chloride anhydrous	10,93
Malachite green	0,037
Agar-agar	2,7

<b>8)</b>	α/α Κατάλογου: <b>A98</b>	<b>MOTILITY AGAR</b>
-----------	---------------------------	----------------------

Υπόστρωμα για την ταυτοποίηση του *Listeria monocytogenes*.

<b>Μορφή</b>	σκόνη
<b>Συσκευασία</b>	500g
<b>Ποσότητα</b>	1 συσκευασία
<b>Χρόνος λήξης</b>	τουλάχιστον 1 χρόνο από την ημερομηνία παραλαβής

**Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος**

Ουσία	Περιεκτικότητα g/lit
Casein peptone	20
Meat peptone	6,1
Agar	3,5

pH 7,3±0,2 στους 25°C

<b>9)</b>	α/α Κατάλογου: <b>A109</b>	<b>NUTRIENT AGAR [granulated]</b>
-----------	----------------------------	-----------------------------------

Υλικό γενικής χρήσης	
<b>Μορφή</b>	κοκκώδης σύσταση
<b>Συσκευασία</b>	500g
<b>Ποσότητα</b>	1 συσκευασία
<b>Χρόνος λήξης</b>	κατ' ελάχιστο 2-3 χρόνια από την ημερομηνία παραλαβής
<b>Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος</b>	
<b>Ουσία</b>	<b>Περιεκτικότητα g/lt</b>
Meat extract	<u>3,0</u>
Peptone from meat	<u>5,0</u>
Agar	12
pH: 7,0±0,2 στους 25°C	
<b>10)</b>	<b>α/α Κατάλογου: A122 PEPTONE WATER (Buffered) [granulated]</b>
Προεμπλουτιστικό μη εκλεκτικό αραιωτικό υπόστρωμα για απομόνωση παθογόνων εντεροβακτηριοειδών και ειδικότερα των <i>Salmonella spp</i> , σύμφωνα με το ISO 6579 (2002).	
<b>Μορφή</b>	κοκκώδης σύσταση
<b>Συσκευασία</b>	500g
<b>Ποσότητα</b>	2 συσκευασίες
<b>Χρόνος λήξης</b>	κατ' ελάχιστο 2-3 χρόνια από την ημερομηνία παραλαβής
<b>Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος</b>	
<b>Ουσία</b>	<b>Περιεκτικότητα g/lt</b>
Enzymatic digest of casein (Peptone)	10,0
Sodium chloride (NaCl)	5,0
Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O)	9,0
Potassium dihydrogen phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,5
pH: 7,0±0,2 στους 25°C. Αποστείρωση στους 121°C για 15min	
<b>11)</b>	<b>α/α Κατάλογου: A144 SIMMONS CITRATE AGAR</b>
Υπόστρωμα κατάλληλο για τη διαφοροποίηση των εντεροβακτηριοειδών, με βάση τη χρησιμοποίηση των κιτρικών ως μοναδική πηγή άνθρακα.	
<b>Μορφή</b>	σκόνη
<b>Συσκευασία</b>	500g
<b>Ποσότητα</b>	2 συσκευασίες
<b>Χρόνος λήξης</b>	3-4 χρόνια από την ημερομηνία παραλαβής
<b>Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος</b>	
<b>Ουσία</b>	<b>Περιεκτικότητα g/lt</b>
Ammonium Dihydrogen Phosphate	1.0
Dipotassium Phosphate	1.0
Sodium Chloride	5.0
Sodium Citrate	2.0
Magnesium Sulfate	0.2
Agar	15.0
Bromothymol Blue	0.08

pH: 7,0±0,2 στους 25°C

**12) α/α Κατάλογου: A159 TRIPLE SUGAR IRON AGAR**

Στερεό υπόστρωμα για έλεγχο ζύμωσης σακχάρων & παραγωγής υδρόθειου των εντεροβακτηριοειδών.

**Παρατηρήσεις:** η σύνθεση, το pH και η θερμοκρασία επώασης ορίζονται από το ISO 6579:2002 και το Κοινοτικό Εργαστήριο Αναφοράς.

Το πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου να περιλαμβάνει κατ' ελάχιστον τα φυσικά χαρακτηριστικά του προϊόντος και την επίδοσή του με τουλάχιστον 2 θετικά και 2 αρνητικά στελέχη μικροοργανισμών.

**Μορφή** κοκκώδης σύσταση

**Συσκευασία** 500g

**Ποσότητα** 1 συσκευασία

**Χρόνος λήξης** κατ' ελάχιστο 18 μήνες από την ημερομηνία παραλαβής

**Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος**

Ουσία	Περιεκτικότητα g/l
Meat extract	3,0
Yeast extract	3,0
Peptone	20,0
Sodium chloride (NaCl)	5,0
Lactose	10,0
Sucrose	10,0
Glucose	1,0
Iron(III) citrate	0,3
Sodium thiosulfate	0,3
Phenol-red	0,024
Agar	12,5

pH 7,4±0,2 στους 25°C

**13) α/α Κατάλογου: A160 TRIPLE SUGAR IRON AGAR**

Κατάλληλο για την ανάπτυξη διάφορων μικροοργανισμών (για την ανάπτυξη των στελεχών των μικροβίων στο Star Protocol).

**Μορφή** σκόνη ή κοκκώδης

**Συσκευασία** 500g

**Ποσότητα** 1 συσκευασία

**Χρόνος λήξης** τουλάχιστον 2 χρόνια από την ημερομηνία παραλαβής

**Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος**

Ουσία	Περιεκτικότητα g/l
Peptone from casein	15,00
Peptone from soymeal	5,00
Sodium chloride	5,00
Agar – agar	15,00

pH 7,3 στους 25°C

**14) α/α Κατάλογου: A167 TRYPTONE WATER**

Ζυμός για την ανίχνευση ινδόλης των θετικών μικροβίων.

Μορφή	σκόνη προς ανασύσταση
Συσκευασία	500g
Ποσότητα	2 συσκευασίες
Χρόνος λήξης	κατ' ελάχιστο 18 μήνες από την ημερομηνία παραλαβής

#### Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος

Ουσία	Περιεκτικότητα g/lt
Peptone from casein	10,00
Sodium chloride	5,00

pH 7,5±0,2

<b>15)</b>	α/α Κατάλογου: <b>A172</b>	<b>UREA AGAR</b>
------------	----------------------------	------------------

Υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των μικροοργανισμών που μεταβολίζουν την ουρία (προτεινόμενο από τον Christensen).

Μορφή	κοκκώδης σύσταση
Συσκευασία	500g
Ποσότητα	2 συσκευασίες
Χρόνος λήξης	Τρία (3) χρόνια από την ημερομηνία παραλαβής

#### Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος

Ουσία	Περιεκτικότητα g/lt
Peptone from meat	1,0
D(+)-glucose	1,0
sodium chloride	5,0
potassium dihydrogen phosphate	2,0
phenol red	0,012
agar-agar	12,0

pH 6,8±0,2 στους 25°C

<b>16)</b>	α/α Κατάλογου: <b>A179</b>	<b>Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD agar) [granulated]</b>
------------	----------------------------	---

Υλικό που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των Salmonella spp. σύμφωνα με το ISO 6579-2002.

Μορφή	κοκκώδης σύσταση
Συσκευασία	500g
Ποσότητα	1 συσκευασία
Χρόνος λήξης	κατ' ελάχιστο 18 μήνες από την ημερομηνία παραλαβής

#### Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος

Ουσία	Περιεκτικότητα g/lt
Yeast extract	3,0
Sodium chloride (NaCl)	5,0
Xylose	3,75
Lactose	7,5
Sucrose	7,5
L-Lysine (hydrochloride)	5,0
Sodium thiosulfate	6,8
Iron (III) ammonium citrate	0,8
Phenol red	0,08
Sodium deoxycholate	1,0

pH 7.4±0.2 στους 25°C		Agar	14,5
<b>17)</b>	<b>α/α Κατάλογου: A184</b>	<b>Brucella selective supplement</b>	
Λυοφιλοποιημένο εκλεκτικό συμπλήρωμα το οποίο προστίθεται στο υπόστρωμα Brucella medium base για την απομόνωση βακτηρίων του γένους Brucella spp.			
<b>Μορφή</b>	σκόνη προς ανασύσταση		
<b>Συσκευασία</b>	Συσκευασία των 10 φιαλιδίων. 1 φιαλίδιο ικανό να παρασκευάσει έκαστο το ανώτερο 500ml υποστρώματος		
<b>Ποσότητα</b>	2 συσκευασίες		
<b>Χρόνος λήξης</b>	20 μήνες από την ημερομηνία παραλαβής		
<b>Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος</b>			
		<b>Ουσία</b>	<b>Περιεκτικότητα /vial</b>
		Polymyxin B (as SO <sub>4</sub> )	2.500 IU
		Nystatin	50.000 IU
		Bacitracin	12.500 IU
		Cycloheximide	50,00mg
		Nalidixic acid	2,5mg
		Vancomycin (as HCL)	10,00mg
<b>18)</b>	<b>α/α Κατάλογου: A244</b>	<b>ΟΡΟΣ ΙΠΠΟΥ (HORSE SERUM)</b>	
Ορός ίππου κατάλληλος για κυτταροκαλλιέργειες. -Να είναι αποστειρωμένος με διήθηση. -Να είναι ελεγμένος για ιούς και μυκόπλασμα. -Να συνοδεύεται από πιστοποιητικό ανάλυσης και να είναι αναγνωρισμένος (approved) από την ΕΕ.			
<b>Συσκευασία</b>	1 φιαλίδιο των 500ml		
<b>Ποσότητα</b>	1 συσκευασία		
<b>Χρόνος λήξης</b>	τουλάχιστον 12 μήνες από την ημερομηνία παραλαβής		
<b>19)</b>	<b>α/α Κατάλογου: (Δεν υπάρχει)</b>	<b>UREA BROTH</b>	
Υλικό για τον εκλεκτικό εμπλουτισμό μικροοργανισμών.			
<b>Μορφή</b>	σκόνη η κοκκώδης η σύσταση		
<b>Συσκευασία</b>	500g		
<b>Ποσότητα</b>	1 συσκευασία		
<b>Χρόνος λήξης</b>	2-3 χρόνια από την ημερομηνία παραλαβής		
<b>Τυπική σύνθεση τελικού προϊόντος</b>			
		<b>Ουσία</b>	<b>Περιεκτικότητα g/lit</b>
		Yeast extract	0,1
		Potassium dihydrogen phosphate	9,1-9,5
		Disodium hydrogen phosphate	9,5
		Urea	20
		Phenol red	0,01

**Πίνακας 6.** Παράδειγμα αναλώσιμων που απαιτούνται και εκτίμησης κόστους, σε εθνικό επίπεδο

α/α	α/α κατάλογου	Αντιδραστήρια και υποστρώματα για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης	Συσκευασία	Ποσότητα	Τιμή Μονάδας	Τιμή χωρίς ΦΠΑ	Τιμή με ΦΠΑ
1	47	I-ELISA σε ορό αίματος βοοειδών	kit των 10 πλακών	10	575,00	5.750,00	7.072,50
2	225	Αντιγόνο Σύνδεσης Συμπληρώματος	φιαλίδιο των 100 ml	6	120,00	720,00	885,60
3	226	Αντιγόνο Rose Bengal	φιαλίδιο των 100ml	250	130,00	32.500,00	39.975,00
4	227A	Θετικός ορός Brucella	φιαλίδιο του 1ml	50	25,00	1.250,00	1.537,50
5	338	Αιμολυσίνη Σύνδεσης Συμπληρώματος	2 φιαλίδια των 2,5 ml	4	220,00	880,00	1.082,40
6	345	Συμπλήρωμα Σύνδεσης Συμπληρώματος	2 φιαλίδια των 3,5 ml	25	200,00	5.000,00	6.150,00
7	455	Competitive Elisa (C-ELISA) σε ορό αίματος βοοειδών, προβάτων και αιγών	kit των 10 πλακών	2	1.100,00	2.200,00	2.706,00
8	531	I-ELISA σε γάλα και ορό αίματος βοοειδών (κοινό)	kit των 10 πλακών	5	500,00	2.500,00	3.075,00
9	Νέο	Ασκοί Αιμοληψίας	Τεμάχιο	20	4,50	90,00	110,70
11	A2	Agar - Agar	1.000g	1	317,07	317,07	390,00
12	A14	BLOOD AGAR	500g	1	44,72	44,72	55,00
13	A24	Brucella Medium Base	500g	2	138,21	276,42	340,00
14	A79	MC	500g	1	40,65	40,65	50,00
15	A89	Meat extract	500g	1	203,25	203,25	250,00
16	A90	Methyl Red Vogues Proskauer Broth	500g	2	56,91	113,82	140,00
17	A96	MSRV (Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis medium)	500g	1	56,91	56,91	70,00
18	A98	Motiliti agar	500g	1	186,99	186,99	230,00
19	A109	Nutrient agar granulated	500g	1	130,08	130,08	160,00
20	A122	Peptone Water(Buffered) granulated	500g	2	73,17	146,34	180,00
21	A144	Simmons Citrate agar	500g	2	44,72	89,44	110,01
22	A159	Triple Sugar Iron Agar	500g	1	81,30	81,30	100,00
23	A160	TSA	500g	1	300,81	300,81	370,00
24	A167	Tryptone Water	500g	2	48,78	97,56	120,00
25	A172	Urea agar	500g	2	52,85	105,70	130,01
26	A179	XLD	500g	1	105,69	105,69	130,00
27	A184	Brucella selective supplement	των 10 φιαλιδίων	2	101,63	203,26	250,01
28	A244	Horse Serum	500ml	1	130,08	130,08	160,00
29	Νέο	Urea Broth	500g	1	130,08	130,08	160,00
			<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>398</b>		<b>53.650,18 €</b>	<b>65.989,72 €</b>

## Διευθύνσεις και στοιχεία των κτηνιατρικών εργαστηρίων που συμμετέχουν στο πρόγραμμα

α/α	Κτηνιατρικά Εργαστήρια	Τοπικά Κτηνιατρικά Εργαστήρια (RVLs*)	Υπεύθυνος κτηνίατρος	Τηλέφωνα	Fax	email
1	Λάρισας (NRL)**	6ο χλμ Λάρισας - Τρικάλων, ΤΚ.41110	Στουρνάρα - Τσελεπίδου Αθανασία	2410-617980 2410-617981	2410-617982	<a href="mailto:vetlab@otenet.gr">vetlab@otenet.gr</a>
2	Αθήνας	Νεαπόλεως 25, ΤΚ.15310 Αγ. Παρασκευή	Κυρμά Άννα	210-6010903 εσωτ. 128	210-6399477	<a href="mailto:brucellalab@gmail.com">brucellalab@gmail.com</a>
3	Θεσσαλονίκης	26ης Οκτωβρίου 80, ΤΚ.54627 Θεσσαλονίκη	Παπαποστόλου Κατερίνα	2310-566044	2310-552023	<a href="mailto:brucellakith@gmail.com">brucellakith@gmail.com</a>
			Λογάρος Δημήτρης	2310-566042		
4	Ηράκλειου	Λιμένας Ηρακλείου, Προβλήτα 3, ΤΘ.1902, ΤΚ.71110 Ηράκλειο	Φούσκης Ιωάννης	2810-280869	2810-341743	<a href="mailto:vetlabher@ath.forthnet.gr">vetlabher@ath.forthnet.gr</a>
			Μπάσινας Δημήτρης			
5	Ιωαννίνων	Χρ. Κατσάρη 2, ΤΚ.45444 Ιωάννινα	Πανάγιου Αθηνά	26510-27396	26510-33541	<a href="mailto:keioan1@otenet.gr">keioan1@otenet.gr</a>
6	Καβάλας	Αμυδαλεώνας, ΤΚ.64012 Καβάλα	Μαντούδης Δημήτρης	2510-391865 εσωτ. 103	2510-391865	<a href="mailto:ktekav@yahoo.gr">ktekav@yahoo.gr</a>
7	Κομοτηνής	7ο χλμ Κομοτηνής - Ξάνθης, ΤΚ.69100 Κομοτηνή	Κατσαούνης Γεώργιος	25310-36796	25310-36796	<a href="mailto:ktekomot@yahoo.gr">ktekomot@yahoo.gr</a>
8	Τρίπολης	Πέλαγος Αρκαδίας, ΤΚ.22100 Τρίπολη	Σιάνα Παναγιώτα	2710-226849	2710-232909	<a href="mailto:arcadialab@tri.forthnet.gr">arcadialab@tri.forthnet.gr</a>
			Ζαρουχλιώτη Αγγελική	2710-232909		

\*Regional Veterinary Laboratories

\*\*National Reference Laboratory (Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς).

## Γεωγραφική αρμοδιότητα Κτηνιατρικών Εργαστηρίων

α/α	Κτηνιατρικά Εργαστήρια	Διαπίστευση	Αρμοδιότητα (Περιφέρειες)
1	Λάρισας (NRL)	ΕΣΥΔ 834	Θεσσαλίας
2	Αθήνας	ΕΣΥΔ 695	Αττικής, Νότιου Αιγαίου, Βόρειου Αιγαίου, Στερεάς Ελλάδας, ΠΕ Αιτωλοακαρνανίας, ΠΕ Ζακύνθου, ΠΕ Κεφαλληνίας
3	Θεσσαλονίκης	----	Δυτικής Μακεδονίας, Κεντρικής Μακεδονίας
4	Ηράκλειου	----	Κρήτης
5	Ιωαννίνων	ΕΣΥΔ 488-2	Ηπείρου, ΠΕ Κέρκυρας, ΠΕ Λευκάδας
6	Καβάλας	----	Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης
7	Κομοτηνής	----	Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης
8	Τρίπολης	----	Πελοποννήσου, ΠΕ Αχαΐας, ΠΕ Ηλείας

Υλικά/Προϊόντα υποβαλλόμενα σε δοκιμή	Τύποι δοκιμών/ Μετρούμενες ιδιότητες	Εφαρμοζόμενες μέθοδοι/ Χρησιμοποιούμενες τεχνικές
Ορός αίματος οικόσιτων ή άγριων μηρυκαστικών, ιπποειδών, χοίρων, καμηλοειδών, σαρκοφάγων ζώων και ανθρώπων	1. Ανίχνευση αντισωμάτων κατά των βακτηρίων του γένους <b>Brucella spp.</b>	Δοκιμή Rose Bengal (RB) σύμφωνα με τον Κανονισμό της Επιτροπής αρ. 535/2002 που τροποποιεί το Παράρτημα C της Οδηγίας 64/432/EEC και την Απόφαση 2004/226/EC, όπως ισχύουν.
	2. Ανίχνευση αντισωμάτων κατά των βακτηρίων του γένους <b>Brucella spp.</b>	Δοκιμή της Σύνδεσης του Συμπληρώματος (ΣΣ – CFT) σύμφωνα με τον Κανονισμό της Επιτροπής αρ. 535/2002 που τροποποιεί το Παράρτημα C της Οδηγίας 64/432/EEC και την Απόφαση 2004/226/EC, όπως ισχύουν.





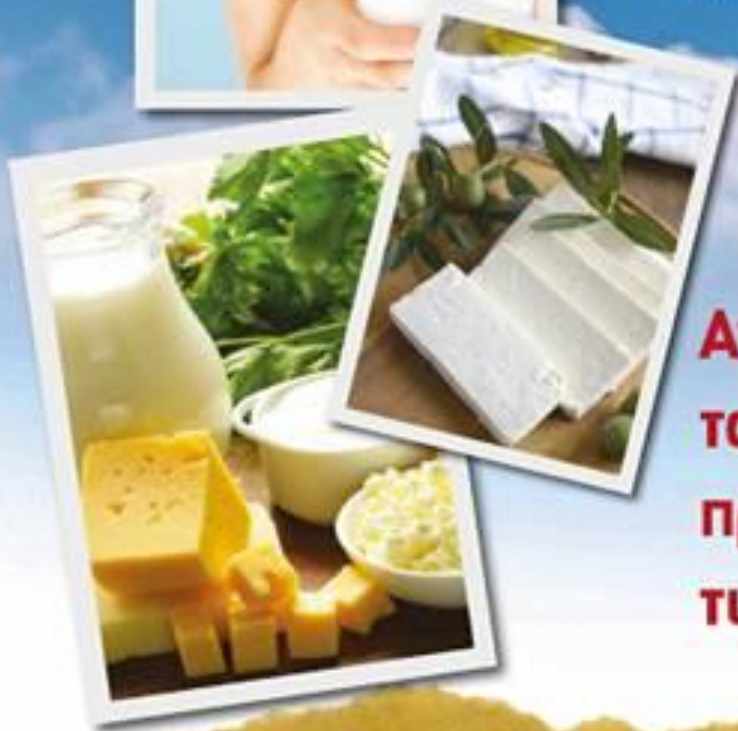
# Προστασία από τον μελιταίο πυρετό

Ο μελιταίος πυρετός είναι εμπύρετο νόσημα που προκαλεί σημαντική ταλαιπωρία



## ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗ

- πυρετός
- νυχτερινές εφιδρώσεις
- εύκολη κόπωση
- πόνοι στις αρθρώσεις
- θετικά εργαστηριακά αποτελέσματα



**Αγαπάμε  
τα γαλακτοκομικά,  
προσέχουμε  
τι καταναλώνουμε!**



**Παστεριωμένο ή καλά βρασμένο γάλα**



**Τυρί απο εγκεκριμένο τυροκομείο**



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων



# Προστασία του κτηνοτρόφου από τον μελιταίο πυρετό



## ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗ

- πυρετός
- νυκτερινές επιδρώσεις
- εύκολη κόπωση
- πόνοι στις αρθρώσεις
- θετικά εργαστηριακά αποτελέσματα



**Προσέχουμε τα ζώα μας !  
Προστατεύουμε την υγεία μας!**



- Εμβολιασμός και αιμοδοψία αιγοπροβάτων/βοοειδών
- Απομόνωση νεοεισερχόμενων ζώων
- Καταστροφή πηλακούντων και νεκρών εμβρύων
- Ενημέρωση των Κτηνιατρικών Αρχών σε περίπτωση αποβολών

[www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)



- Άβραστο γάλα και μη ελεγμένο τυρί
- Επαφή με γυμνά χέρια των νεκρών εμβρύων, των πηλακούντων και τις γεννητικής οδού των ζώων
- Παράνομες μετακινήσεις και αγοραπωλησίες
- Συζητήσεις με ζώα από μη ελεγμένες εκμεταλλεύσεις

[www.keelpno.gr](http://www.keelpno.gr)

## Συμβουλές για τους καταναλωτές



Καταναλώνουμε **MONO** τυριά από εγκεκριμένο τυροκομείο!

Καταναλώνουμε **MONO** παστεριωμένο γάλα!



## 7+1 χρήσιμες συμβουλές για τους κτηνοτρόφους

- 1) Αποφυγή παράνομων μετακινήσεων των ζώων.
- 2) Απομόνωση των νεοεισερχόμενων ζώων, τουλάχιστον για ένα μήνα.
- 3) Αποφυγή ανταλλαγών αρσενικών ζώων που δεν έχουν εξεταστεί, για επιβάσεις.
- 4) Χρήση γαντιών σε χειρισμούς κατά τον τοκετό των ζώων.
- 5) Καταστροφή των υλικών αποβολής (πλακούντες, νεκρά έμβρυα κτλ).
- 6) Καθαρισμός και απολύμανση των χώρων και των εργαλείων που έρχονται σε επαφή με τα υλικά αποβολών.
- 7) Ξεχωριστός χώρος για τους τοκετούς και τη γαλουχία των αμνοερίφων.

Συνεργασία με τις Κτηνιατρικές Αρχές για την ορθή εφαρμογή των προγραμμάτων (διερεύνηση αποβολών, εμβολιασμοί και αιμοληψίες από τα ζώα) σε ετήσια βάση.

Σχετική Νομοθεσία: ΥΑ 4888/130873 (ΦΕΚ Β' 3545/31-12-2012), ΥΑ 4887/130865 (ΦΕΚ Β' 3544/31-12-2012), ΥΑ 258734 (ΦΕΚ Β' 1216/17-07-2007) κ.ά.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης  
και Τροφίμων  
Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικής  
Διεύθυνση Υγείας των Ζώων



## ΜΕΛΙΤΑΙΟΣ ΠΥΡΕΤΟΣ

(*Βρουκέλλωση*)

*Πώς να προστατευτούμε εμείς και τα ζώα μας...*



[www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)

### Τι είναι;

Η βρουκέλλωση είναι ένα εμπύρετο νόσημα στον άνθρωπο που προκαλεί νυχτερινή εφίδρωση, εύκολη κόπωση, πόνους στις αρθρώσεις κ.ά. Η τελική διάγνωση γίνεται με εργαστηριακές εξετάσεις.

Μεταδίδεται από τα ζώα και εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα στις χώρες της Μεσογείου.

**Αποτελεί νόσημα υποχρεωτικής δήλωσης!**

### Ποια ζώα αφορά;

- ✓ αίγες και πρόβατα
- ✓ βοοειδή κ.ά

Η διασφάλιση της Δημόσιας Υγείας προϋποθέτει την εκρίζωση της νόσου από το ζωικό πληθυσμό!

### Γιατί είναι σημαντική;

- ✓ Επειδή μπορεί να μεταδοθεί από τα ζώα στον άνθρωπο.
- ✓ Στη χώρα μας αποτελεί μία από τις συχνότερα εμφανιζόμενες ζωοανθρωπονόσους τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο.
- ✓ Στα θηλυκά ζώα προκαλεί αποβολές και μείωση της γαλακτοπαραγωγής με σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις στον κτηνοτρόφο και την εθνική οικονομία.

### Πώς μεταδίδεται;

*Εφόσον στην εκτροφή υπάρχουν μολυσμένα ζώα...*

- με την επαφή με γάλα και σωματικά υγρά προερχόμενα από αυτά,
- με την κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος,
- με την κατανάλωση τυριών οικιακής παραγωγής από μη παστεριωμένο γάλα ή που δεν έχουν ωριμάσει για τον απαιτούμενο χρόνο.

### Ποιοι μπορούν να προσβληθούν;

- κτηνοτρόφοι, κτηνίατροι, κρεοπώλες, εργαστηριακοί, εργάτες σφαγείων, ...
- απλοί πολίτες που καταναλώνουν γαλακτοκομικά προϊόντα και τουρίστες.

### Υπάρχει θεραπεία στον άνθρωπο;

- + Ναι, με μακροχρόνιο σχήμα αντιβιοτικών!

### Υπάρχει θεραπεία στα ζώα;

- + Όχι, στα θετικά παραγωγικά ζώα απαγορεύεται η εφαρμογή οποιασδήποτε θεραπείας και οδηγούνται σε άμεση σφαγή!

### Τι μέτρα εφαρμόζονται στα παραγωγικά ζώα (αιγοπρόβατα και βοοειδή) στην Ελλάδα;

Στα αιγοπρόβατα εφαρμόζεται πρόγραμμα ελέγχου και εκρίζωσης της νόσου, το οποίο περιλαμβάνει εμβολιασμούς, αιμοληψίες και σφαγή των θετικών ζώων, ανάλογα με την περιοχή.



Στα βοοειδή εφαρμόζεται κυρίως πρόγραμμα εκρίζωσης της νόσου με αιμοληψίες, γαλακτοληψίες και σφαγή των θετικών ζώων.

Περισσότερες πληροφορίες υπάρχουν στα αντίστοιχα εγχειρίδια στο [www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)



## Βιβλιογραφία

### Ξενογλώσσα

- 1) Brucellosis Rose Bengal Test Standard Operating Procedure, EU Reference Laboratory for Brucellosis, 21 May 2010.
- 2) Elberg SS (ed): A guide to the diagnosis, treatment and prevention of human brucellosis. World Health Organization (WHO), Geneva, 1981 (WHO REPORT VPH/81.31)
- 3) Techniques for the brucellosis laboratory, GG Alton, LM Jones, RD Angus JM Verger, Institut National De la Reserche Agronomique, Paris, 1998
- 4) Manual of diagnostic tests and vaccines, OIE 6th ed. 2008
- 5) Οδηγία του Κοινοτικού Εργαστηρίου Αναφοράς Βρουκέλλωσης (ANSES- Maisons-Alfort France 21/4/2010).
- 6) OIE, Terrestrial Manual 2009. Chapter 2.7.2. “**Caprine and ovine Brucellosis (excluding B. ovis)**”.  
[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.07.02\\_CAPRINE\\_OVINE\\_BRUC.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.02_CAPRINE_OVINE_BRUC.pdf) , προσπέλαση 04/11/2012.
- 7) A.K. Ibrahim, Abeer, A. AbdelAll and A.S. Amin, Long-Term Diagnostic Studies for Detection of Brucella spp. in Milk Samples, Global Veterinaria 8 (1): 54-61, 2012.
- 8) Fernando Padilla Poester, Klaus Nielsen, Luis Ernesto Samartino and Wei Ling Yu, Diagnosis of Brucellosis, The Open Veterinary Science Journal, 2010, 4, 46-60.
- 9) Menachem Banai Control of Brucella melitensis National Brucellosis Reference Laboratory, OIE Brucellosis Reference Laboratory.
- 10) F. Neto and Yolanda Vaz. Conjunctival Rev-1 vaccination of adult sheep and goats in trás-os-montes. Portugal, Epidémiol et santé anim., 2002, 42, 99-107.
- 11) CNEVA, round table on the use o REV-1 vaccine in small ruminants 1995, Alford France.  
Menachem Banai Control of *Brucella melitensis* National Brucellosis Reference Laboratory, OIE Brucellosis Reference Laboratory.
- 12) Working Document on Eradication of Bovine, Sheep and Goats Brucellosis in the EU accepted by the “Bovine” and “Sheep and Goats” Brucellosis subgroups of the Task Force on monitoring animal disease eradication. SANCO/6095/2009
- 13) FAO/WHO (1986) Expert Committee on Brucellosis, sixth Report, 740.

### Ελληνική

- 1) «**Η βρουκέλλωση των μικρών μηρυκαστικών – Σύγχρονες απόψεις και τάσεις**». Πρακτικά ημερίδας στην Αθήνα της 14<sup>ης</sup> Μαρτίου 2002. Οργάνωση: Ελληνική Κτηνιατρική Εταιρεία και Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικής του ΥΠΑΑΤ.
- 2) Κατσιούνης Θ., Μπουρτζή – Χατζοπούλου Ε., Σαρρής Κ., Παπαδόπουλος Ο. (1988). Αναζήτηση βρουκελλών σε γάλα ορολογικά ελεγμένων αγελάδων. ΔΕΚΕ. 1988, Τ.39, τ.1.
- 3) Κατσιώλης Αριστομένης. *Εγχειρίδιο Οδηγιών Εφαρμογής του Προγράμματος Ελέγχου & Εκρίζωσης της Βρουκέλλωσης των Αιγών και των Προβάτων*. ΥΠΑΑΤ. 4<sup>η</sup> έκδοση. 2013.  
[http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Aigoprobata/egxeiridio\\_broukelosi\\_021213.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Aigoprobata/egxeiridio_broukelosi_021213.pdf)
- 4) Κατσιώλης Αριστομένης. *Εγχειρίδιο Οδηγιών Εκτέλεσης και Εφαρμογής των 2 Προγραμμάτων για την Αντιμετώπιση της Βρουκέλλωσης των Βοοειδών*. ΥΠΑΑΤ. 1<sup>η</sup> έκδοση. 2014.  
[http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/booeidi/egxeiridio\\_broukelosi\\_booeidi0714.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/booeidi/egxeiridio_broukelosi_booeidi0714.pdf)
- 5) Κατσιώλης Αριστομένης. *Βρουκέλλωση (Μελιταίος πυρετός)*. ΥΠΑΑΤ. 2<sup>η</sup> έκδοση. 2014.  
[http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Aigoprobata/meliteos\\_piretos291214\\_new.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Aigoprobata/meliteos_piretos291214_new.pdf)
- 3) **Κατσιώλης Αριστομένης**. Διπλωματική εργασία με θέμα: «*Ανάπτυξη PCR μεθόδου για την ανίχνευση Brucella spp. σε γάλα αιγοπροβάτων και βοοειδών*». Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στη Σχολή Επιστημών Υγείας, στο Τμήμα Ιατρικής με τίτλο «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία & Περιβαλλοντική Υγιεινή» Λάρισα 2009.
- 4) **Κωνσταντινίδης Π. Αθανάσιος**. Διδακτορική διατριβή με θέμα: «*Αξιολόγηση της ορολογικής μεθόδου φθορίζουσας πόλωσης του φωτός (fluorescence polarization assay- fra) στη διάγνωση της βρουκέλλωσης του ανθρώπου*». Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα 2007.
- 5) **Στουρνάρα-Τσελεπίδου Αθανασία**. Διδακτορική διατριβή με θέμα: «*Συμβολή στη μελέτη της ανοσολογικής απάντησης ενήλικων και ανήλικων προβάτων και αιγών με κλασικές και νεότερες ορολογικές δοκιμές μετά από οφθαλμικό εμβολιασμό με εμβόλιο REV-1*». Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ, 2008.
- 6) **Τζανή Μυρσίνη, Κατσιώλης Αριστομένης**. «*Πρόγραμμα ελέγχου και εκρίζωσης της βρουκέλλωσης των αιγών και των προβάτων*». Άρθρο στο Ενημερωτικό Δελτίο του ΚΕΕΛΠΝΟ. Τεύχος Απριλίου 2012, Αρ. 14/Έτος 2ο. σελ. 22.

Ηλεκτρονική: [www.minagric.gr](http://www.minagric.gr) , [www.eof.gr](http://www.eof.gr) , [www.esyd.gr](http://www.esyd.gr) , [www.keelpno.gr](http://www.keelpno.gr) ,  
[www.et.gr](http://www.et.gr) , [www.oie.int](http://www.oie.int) , [www.eur-lex.europa.eu](http://www.eur-lex.europa.eu) ,

## Συντμήσεις

**ΑΛΥΜ:** Απόφαση Λήψης Υγειονομικών Μέτρων  
**ΑΠΘ:** Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης  
**ΓΔΚ:** Γενική Διεύθυνση Βιώσιμης Ζωικής Παραγωγής & Κτηνιατρικής του ΥΠΑΠΕ  
**ΔΑΟΚ:** Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής (της ΠΕ)  
**ΔΕ:** Δελτίο Εμβολιασμού  
**ΔΚ:** Διεύθυνση Κτηνιατρικής (της Περιφέρειας)  
**ΔΜΕ:** Δελτίο Μηνιαίας Εποπτείας  
**ΔΟΕ:** Δελτίο Ορολογικού Ελέγχου  
**ΔΥΖ:** Διεύθυνση Υγείας των Ζώων του ΥΠΑΠΕ  
**ΕΕ:** Ευρωπαϊκή Ένωση  
**ΕΕΑΒ:** Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Βρουκέλλωσης στη Λάρισα  
**ΕΟΦ:** Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων  
**ΖΕΚ:** Ζώνη Εκρίζωσης  
**ΖΕΜ:** Ζώνη Εμβολιασμού  
**ΔΚΚΑ:** Διεύθυνση Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών  
**ΔΚΚΘ:** Διεύθυνση Κτηνιατρικού Κέντρου Θεσσαλονίκης  
**ΚΥΑ:** Κοινή Υπουργική Απόφαση  
**ΜΒ:** Μοριακό Βάρος  
**ΠΔ:** Προεδρικό Διάταγμα  
**ΠΕ:** Περιφερειακή Ενότητα  
**ΤΖΥΖ:** Τμήμα Ζωοανθρωπονόσων της Διεύθυνσης Υγείας των Ζώων του ΥΠΑΠΕ  
**ΤΚΑ:** Τοπική Κτηνιατρική Αρχή, όπως προβλέπεται από το σχέδιο «Καλλικράτης».  
**ΥΑ:** Υπουργική Απόφαση  
**ΥΠΑΠΕ:** Υπουργείο Παραγωγικής Ανασυγκρότησης, Περιβάλλοντος & Ενέργειας  
**CFIT:** Complement Fixation Test  
**CFU:** Colony Forming Units  
**Da:** Dalton  
**OIE:** Office International des Epizooties (World Organisation for Animal Health)  
**RBT:** Rose Bengal Test

## Εικόνες

Η εικόνα στο εξώφυλλο και η εικόνα 6 είναι από το αρχείο της κτηνιάτρου Κυρμά Άννας, από το Εργαστήριο Βρουκελλώσεων στο ΚΚΙΑ (2012).

Η εικόνα 1 σχεδιάστηκε από τους κτηνιάτρους Δηλαβέρη Δημήτριο και Κατσιώλη Αριστομένη (2012).

Η εικόνα 2 είναι από το αρχείο του κτηνιάτρου Κατσιώλη Αριστομένη (2013).

Οι εικόνες 7 – 9 είναι από το αρχείο της κτηνιάτρου Ζαρουχλιώτη Αγγελικής, από το Εργαστήριο Βρουκελλώσεων στην Τρίπολη (2014).

Οι εικόνες 10 – 11 είναι από το αρχείο της κτηνιάτρου Στουρνάρα Αθανασίας, από το Εργαστήριο Βρουκελλώσεων στη Λάρισα (2015).

Οι εικόνες 12-16 είναι από το αρχείο του κτηνιάτρου Λάμπρη Βασιλείου, από το Τμήμα Κτηνιατρικής Λευκάδας (2015).