

I. DISPOSICIONES GENERALES

MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, Y MEDIO RURAL Y MARINO

13174 Orden ARM/2166/2009, de 29 de julio, por la que se modifica el anexo 2 del Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales.

El Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales, establece en su anexo 2 los métodos de diagnóstico de la brucelosis bovina, en aplicación de lo previsto en el anexo C de la Directiva 64/432/CEE, del Consejo, de 26 de junio de 1964, relativa a problemas de policía sanitaria en materia de intercambios intracomunitarios de animales de las especies bovina y porcina, y de la Decisión 2004/226/CE, de la Comisión, de 4 de marzo de 2004, por la que se autorizan pruebas para la detección de anticuerpos de la brucelosis bovina en el ámbito de la Directiva 64/432/CEE del Consejo.

Tras la inclusión del ensayo de fluorescencia polarizada como nueva prueba de diagnóstico añadida a las prescritas para el comercio internacional en el capítulo 2.4.3 (brucelosis bovina) del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres, sexta edición, de 2008, de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), y en función del dictamen científico de la Comisión Técnica de Salud y Bienestar de los Animales de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), se ha aprobado la Decisión 2008/984/CE, de la Comisión, de 10 de diciembre de 2008, por la que se modifican, en lo que respecta a las pruebas de diagnóstico de la brucelosis bovina, el anexo C de la Directiva 64/432/CEE del Consejo y la Decisión 2004/226/CE.

Sin perjuicio de la plena y directa aplicabilidad de dicha Decisión, razones de seguridad jurídica hacen preciso modificar el anexo 2 del Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, en orden a adecuar su contenido al de la mencionada Decisión.

En la elaboración de esta norma han sido consultadas las comunidades autónomas y las entidades representativas de los sectores afectados.

Esta orden se dicta al amparo de lo previsto en la disposición final primera del Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se faculta al Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación, actual Ministra de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, para modificar los anexos del mismo.

En su virtud, dispongo:

Artículo único. *Modificación del anexo 2 del Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales.*

El anexo 2 del Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales, se sustituye por el siguiente:

«ANEXO 2

Diagnóstico de brucelosis bovina

1. Identificación del agente.—La demostración, mediante tinción inmuno-específica o acidorresistente modificada, de la presencia de organismos con morfología de brucela en material procedente de abortos, flujo vaginal o leche implica una presunción de brucelosis, especialmente si se corrobora con pruebas serológicas. Los métodos de reacción en cadena de la polimerasa ofrecen métodos de detección adicionales.

En la medida de lo posible, las bacterias del género brucela deben aislarse con medios simples o selectivos, por cultivo a partir de flujos uterinos, fetos abortados, secreciones mamarias o tejidos seleccionados, como ganglios linfáticos y órganos reproductores masculinos y femeninos.

Una vez aisladas las bacterias, deben identificarse la especie y la biovariedad mediante lisis por fagos o pruebas del metabolismo oxidativo y criterios de cultivo, bioquímicos y serológicos. La reacción en cadena de la polimerasa puede ofrecer un método complementario y biotipológico basado en secuencias genómicas específicas.

Las técnicas y los medios utilizados, su normalización, así como la interpretación de los resultados deben ajustarse a lo dispuesto en el capítulo 2.4.3 (brucelosis bovina), 2.7.2 (brucelosis caprina y ovina) y 2.8.5 (brucelosis porcina) del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE, sexta edición, de 2008.

2. Pruebas inmunológicas.

2.1 Estándares.

2.1.1 Para la preparación de todos los antígenos utilizados en las pruebas del rosa de Bengala, de seroaglutinación, de fijación del complemento y del anillo de leche se utilizarán las cepas Weybridge 99 o USDA 1119-3 de la biovariedad 1 de *Brucella abortus*.

2.1.2 Para las pruebas del rosa de Bengala, de seroaglutinación, de fijación del complemento y del anillo de leche se utilizará el suero estándar de referencia internacional de la OIE, anteriormente denominado segundo suero anti-*Brucella abortus* internacional de la OMS (ISAbS).

2.1.3 Los sueros estándar de referencia para los ensayos de inmunoenzimología de adsorción (ELISA) serán los siguientes:

- El suero estándar de referencia internacional de la OIE.
- El suero estándar débilmente positivo de la OIE para ELISA.
- El suero estándar fuertemente positivo de la OIE para ELISA.
- El suero estándar negativo de la OIE para ELISA.

2.1.4 Los sueros estándar de referencia para los ensayos de fluorescencia polarizada serán los siguientes:

- El suero estándar débilmente positivo de la OIE para ELISA.
- El suero estándar fuertemente positivo de la OIE para ELISA.
- El suero estándar negativo de la OIE para ELISA.

2.1.5 Los sueros estándar mencionados en los puntos 2.1.3 y 2.1.4 pueden obtenerse en el laboratorio comunitario de referencia para la brucelosis o la Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, Reino Unido.

2.1.6 El suero estándar de referencia internacional de la OIE y los sueros estándar débilmente positivo, fuertemente positivo y negativo de la OIE para ELISA son estándares primarios internacionales a partir de los cuales deben establecerse sueros estándar nacionales secundarios de referencia (en lo sucesivo, estándares de trabajo) para cada prueba mencionada en el punto 2.1.1.

2.2 Enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) u otros análisis de saturación para la detección de la brucelosis bovina en suero o leche.

2.2.1 Material y reactivos.—La técnica empleada y la interpretación de los resultados deberán haberse validado de conformidad con los principios establecidos en el capítulo 1.1.4 del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE, sexta edición, de 2008, e incluirán al menos estudios de laboratorio y de diagnóstico.

2.2.2 Normalización de la prueba.

2.2.2.1 Normalización del procedimiento de prueba para muestras individuales de suero:

a) Una predilución al 1/150 (1) de suero estándar de referencia internacional de la OIE, una predilución al 1/2 de suero estándar débilmente positivo de la OIE para ELISA o una predilución al 1/16 de suero estándar fuertemente positivo de la OIE para ELISA en un suero negativo (o en una mezcla de sueros negativos) deberán dar una reacción positiva;

b) Una predilución al 1/600 de suero estándar de referencia internacional de la OIE, una predilución al 1/8 de suero estándar débilmente positivo de la OIE para ELISA o una predilución al 1/64 de suero estándar fuertemente positivo de la OIE para ELISA en un suero negativo (o en una mezcla de sueros negativos) deberán dar una reacción negativa;

c) El suero estándar negativo de la OIE para ELISA deberá dar siempre una reacción negativa.

2.2.2.2 Normalización del procedimiento de prueba para muestras mezcladas de suero:

a) Una predilución al 1/150 de suero estándar de referencia internacional de la OIE, una predilución al 1/2 de suero estándar débilmente positivo de la OIE para ELISA o una predilución al 1/16 de suero estándar fuertemente positivo de la OIE para ELISA en un suero negativo (o en una mezcla de sueros negativos) y diluidas de nuevo en sueros negativos por el número de muestras que componen la mezcla deberán dar una reacción positiva;

b) El suero estándar negativo de la OIE para ELISA deberá dar siempre una reacción negativa;

c) La prueba deberá ser adecuada para detectar indicios de infección en un solo animal del grupo de animales cuyas muestras de suero se han mezclado.

2.2.2.3 Normalización del procedimiento de prueba para muestras mezcladas de leche o de lactosuero:

a) Una predilución al 1/1000 de suero estándar de referencia internacional de la OIE, una predilución al 1/16 de suero estándar débilmente positivo de la OIE para ELISA o una predilución al 1/125 de suero estándar fuertemente positivo de la OIE para ELISA en un suero negativo (o en una mezcla de sueros negativos) y diluidas de nuevo al 1/10 en leche negativa deberán dar una reacción positiva;

b) El suero estándar negativo de la OIE para ELISA diluido al 1/10 en leche negativa deberá dar siempre una reacción negativa;

c) La prueba deberá ser adecuada para detectar indicios de infección en un solo animal del grupo de animales cuyas muestras de leche o de lactosuero se hayan mezclado.

2.2.3 Condiciones para la utilización de las pruebas ELISA en el diagnóstico de la brucelosis bovina.

2.2.3.1 En las condiciones de calibración para las pruebas ELISA indicadas en los puntos 2.2.2.1 y 2.2.2.2 sobre las muestras de suero, la sensibilidad de diagnóstico de dichas pruebas deberá ser igual o superior a la de la prueba del rosa de Bengala o a la de la prueba de fijación del complemento, teniendo en cuenta la situación epidemiológica en que se realicen.

2.2.3.2 En las condiciones de calibración para las pruebas ELISA indicadas en el punto 2.2.2.3 sobre muestras mezcladas de leche, la sensibilidad de diagnóstico de dichas pruebas deberá ser igual o superior a la de la prueba del anillo de leche, teniendo en cuenta no solo la situación epidemiológica, sino también los sistemas de cría de ganado medios y previsiblemente extremos.

2.2.3.3 Si las pruebas ELISA se emplean para la certificación de conformidad con el artículo 6.1 del Real Decreto 1716/2000, de 13 de octubre, o para el establecimiento y

mantenimiento del estatuto de un rebaño de conformidad con el punto 11 de la parte II del anexo I de dicho real decreto, la mezcla de las muestras de suero deberá realizarse de forma que los resultados de las pruebas puedan vincularse sin ningún género de duda a los distintos animales cuyas muestras se hayan mezclado. Toda prueba de confirmación deberá efectuarse con muestras de suero tomadas de animales por separado.

2.2.3.4 Las pruebas ELISA podrán utilizarse con una muestra de la leche recogida en una explotación que tenga al menos un 30% de vacas lecheras en fase de producción de leche. Si se emplea ese método, deberán aplicarse medidas para que las muestras examinadas puedan vincularse sin ningún género de duda a los distintos animales de los que procede la leche. Toda prueba de confirmación deberá efectuarse con muestras de suero tomadas de animales por separado.

2.3. Prueba de fijación del complemento (FdC).

2.3.1 El antígeno consiste en una suspensión bacteriana en solución salina de fenol [NaCl al 0,85% (m/v) y fenol al 0,5% (v/v)] o en una solución amortiguadora de veronal. Los antígenos podrán presentarse en forma concentrada, siempre que en la etiqueta del frasco se indique el factor de dilución que debe utilizarse. El antígeno se almacenará a 4 °C y no se congelará.

2.3.2 Los sueros se inactivarán de la manera siguiente:

Suero bovino: 56 a 60 °C durante 30 a 50 minutos.

Suero porcino: 60 °C durante 30 a 50 minutos.

2.3.3 Con objeto de provocar la reacción genuina en el procedimiento de la prueba, se utilizará una dosis de complemento superior a la mínima necesaria para lograr una hemólisis completa.

2.3.4 Al realizar la prueba de fijación del complemento, se efectuarán, cada vez, los controles siguientes:

- Control del efecto anticomplementario del suero.
- Control del antígeno.
- Control de los eritrocitos sensibilizados.
- Control del complemento.
- Control de la sensibilidad, mediante un suero positivo, al principio de la reacción.
- Control de la especificidad de la reacción, mediante un suero negativo.

2.3.5 Cálculo de los resultados.—El suero estándar de referencia internacional de la OIE (OIEISS) contiene 1000 unidades internacionales de prueba FdC por mililitro. Si este suero se somete a prueba con un método concreto, el resultado se expresará mediante un título (dilución directa más alta del suero estándar de referencia internacional de la OIE que permita obtener una hemólisis del 50%, TOIEISS). El resultado de la prueba con el suero problema indicado como título (TSUERO PROBLEMA) se expresará en unidades internacionales de prueba FdC por mililitro. El factor de conversión (F) necesario para pasar del título de un suero problema desconocido (TSUERO PROBLEMA) examinado por dicho método a su expresión en unidades internacionales de prueba FdC podrá determinarse con la fórmula siguiente:

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

y el contenido de unidades internacionales de prueba FdC por mililitro de suero problema (UIPFdCSUERO PROBLEMA) podrá determinarse con la fórmula siguiente:

$$\text{UIPFdC}_{\text{SUERO PROBLEMA}} = F \times T_{\text{SUERO PROBLEMA}}$$

2.3.6 Interpretación de los resultados.—Se considerará positivo un suero que contenga 20 o más unidades internacionales de prueba FdC por mililitro.

2.4 Prueba del anillo de leche.

2.4.1 El antígeno consiste en una suspensión bacteriana en solución salina de fenol [NaCl al 0,85% (m/v) y fenol al 0,5% (v/v)] marcada con hematoxilina. El antígeno se almacenará a 4 °C y no se congelará.

2.4.2 La sensibilidad del antígeno deberá estar normalizada con relación al suero estándar de referencia internacional de la OIE, de forma que el antígeno dé una reacción positiva con una dilución al 1/500 de dicho suero estándar en leche negativa, mientras que con una dilución al 1/1000 la reacción deberá ser negativa.

2.4.3 La prueba del anillo se hará con muestras que representen el contenido de cada lechera o depósito a granel de la explotación.

2.4.4 Las muestras de leche no se habrán congelado, calentado ni agitado fuertemente.

2.4.5 La reacción se provocará con uno de los métodos siguientes:

En una columna de leche de al menos 25 mm de altura y un volumen de leche de 1 ml al que se habrán añadido 0,03 ml o 0,05 ml de uno de los antígenos estándar marcados.

En una columna de leche de al menos 25 mm de altura y un volumen de leche de 2 ml al que se habrán añadido 0,05 ml de uno de los antígenos estándar marcados.

En un volumen de leche de 8 ml al que se habrán añadido 0,08 ml de uno de los antígenos estándar marcados.

2.4.6 La mezcla de leche y antígenos deberá incubarse a 37 °C durante 60 minutos, junto con estándares de trabajo positivos y negativos. Posteriormente, una incubación de entre 16 y 24 horas a 4 °C aumentará la sensibilidad de la prueba.

2.4.7 Interpretación de los resultados:

- Reacción negativa: leche coloreada, nata incolora.
- Reacción positiva: leche y nata de idéntica coloración, o leche incolora y nata coloreada.

2.5 Prueba del antígeno de brucela amortiguado (prueba del rosa de Bengala).

2.5.1 El antígeno consiste en una suspensión bacteriana en diluyente de antígeno de brucela amortiguado a un pH de $3,65 \pm 0,05$, marcado con el colorante rosa de Bengala. El antígeno se suministrará listo para su uso, se almacenará a 4 °C y no se congelará.

2.5.2 El antígeno se preparará sin tener en cuenta la concentración celular, pero su sensibilidad deberá estar normalizada con relación al suero estándar de referencia internacional de la OIE de forma que el antígeno dé una reacción positiva con una dilución de suero al 1/45 y una reacción negativa con una dilución al 1/55.

2.5.3 La prueba del rosa de Bengala se realizará de la manera siguiente:

a) Se mezclan 20-30 μ l de suero con el mismo volumen de antígeno en una placa blanca de porcelana o de esmalte para obtener una zona de un diámetro aproximado de 2 cm; se agita suavemente la muestra durante 4 minutos a temperatura ambiente y a continuación se observa con buena iluminación si se ha producido aglutinación.

b) Podrá utilizarse un método automatizado, pero deberá ser al menos tan sensible y exacto como el método manual.

2.5.4 Interpretación de los resultados.—Toda reacción visible deberá considerarse positiva, a menos que haya un exceso de sequedad alrededor de los bordes. En cada serie de pruebas se incluirán estándares de trabajo positivos y negativos.

2.6 Prueba de seroaglutinación.

2.6.1 El antígeno consistirá en una suspensión bacteriana en una solución salina de fenol [NaCl al 0,85% (m/v) y fenol al 0,5% (v/v)].

No se utilizará formaldehído.

Los antígenos podrán presentarse en forma concentrada, siempre que en la etiqueta del frasco se indique el factor de dilución que deberá utilizarse.

Se podrá añadir EDTA a la suspensión de antígeno hasta alcanzar una dilución final de prueba de 5 mM para reducir el nivel de falsos positivos en la prueba de seroaglutinación. Posteriormente, se reajustará el pH de 7,2 en la suspensión de antígeno.

2.6.2 El suero estándar de referencia internacional de la OIE contiene 1000 unidades internacionales de aglutinación.

2.6.3 El antígeno se preparará sin tener en cuenta la concentración celular, pero su sensibilidad deberá normalizarse con relación al suero estándar de referencia internacional de la OIE de forma que el antígeno produzca una aglutinación del 50% con una dilución final del suero del 1/600 al 1/1000, o una aglutinación del 75% con una dilución final del suero del 1/500 al 1/750.

También puede ser recomendable comparar la reactividad entre lotes de antígeno nuevos y previamente normalizados utilizando un grupo de sueros definidos.

2.6.4 La prueba se realizará en tubos o en microplacas. La mezcla de antígeno y diluciones de suero se incubará durante 16 a 24 horas a 37 °C.

Se prepararán al menos tres diluciones para cada suero. Las diluciones de suero sospechoso se realizarán de forma que la lectura de la reacción al límite de positividad se haga en el tubo intermedio (o en el pocillo intermedio en el caso del método con microplaca).

2.6.5 Interpretación de los resultados.—El grado de aglutinación de brucela en un suero se expresará en UI/ml. Se considerará positivo un suero que contenga 30 o más UI/ml.

2.7 Ensayo de fluorescencia polarizada.

2.7.1 El ensayo de fluorescencia polarizada podrá efectuarse en un tubo de cristal o una placa de 96 pocillos. La técnica utilizada, su normalización y la interpretación de los resultados deberán ser conformes a lo especificado en el capítulo 2.4.3 (brucelosis bovina) del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE, sexta edición, de 2008.

2.7.2 Normalización de la prueba.—El ensayo de fluorescencia polarizada se normalizará de tal manera que:

- a) El suero estándar fuertemente positivo de la OIE para ELISA y el suero estándar débilmente positivo de la OIE para ELISA den constantemente resultados positivos.
- b) Una predilución al 1/8 de suero estándar débilmente positivo de la OIE para ELISA o una predilución al 1/64 de suero estándar fuertemente positivo de la OIE para ELISA en un suero negativo (o en una mezcla de sueros negativos) den siempre una reacción negativa.
- c) El suero estándar negativo de la OIE para ELISA dé siempre una reacción negativa.

En cada batería de pruebas se incluirá suero estándar de trabajo fuertemente positivo, débilmente positivo y negativo (calibrados respecto a los sueros estándar de la OIE para ELISA).

3. Pruebas complementarias.

3.1 Prueba cutánea de la brucelosis.

3.1.1 Condiciones para el uso de la prueba cutánea de la brucelosis.

a) La prueba cutánea de la brucelosis no se utilizará con fines de certificación para el comercio intracomunitario.

b) La prueba cutánea de la brucelosis es una de las más específicas para la detección de la presencia de brucelosis en animales no vacunados; no obstante, el diagnóstico no deberá realizarse únicamente a partir de reacciones intradérmicas positivas.

c) Se considerarán infectados o sospechosos de estarlo los animales de la especie bovina que hayan dado un resultado negativo en una de las pruebas serológicas definidas en el presente anexo y que reaccionen positivamente a la prueba cutánea de la brucelosis.

d) Los animales de la especie bovina que hayan dado un resultado positivo en una de las pruebas serológicas definidas en este anexo podrán someterse a una prueba cutánea de la brucelosis para corroborar la interpretación de los resultados de las pruebas serológicas, especialmente cuando no pueda excluirse una reacción cruzada con anticuerpos de otras bacterias en el caso de los rebaños indemnes de brucelosis u oficialmente indemnes de brucelosis.

3.1.2 La prueba se realizará mediante un preparado alérgeno de la brucelosis normalizado y definido que no contenga el antígeno lipopolisacárido liso, dado que este

último puede provocar reacciones inflamatorias inespecíficas o interferir con pruebas serológicas posteriores. Las condiciones de producción de brucelina serán conformes a lo dispuesto en la sección C1 del capítulo 2.4.3 del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE, sexta edición, de 2008.

3.1.3 Procedimiento de la prueba.

3.1.3.1 Se inyectará por vía intradérmica un volumen de 0,1 ml de alérgeno de la brucelosis en el pliegue caudal, en la piel de la ijada o en un lado del cuello.

3.1.3.2 La prueba se leerá una vez transcurridas entre 48 y 72 horas.

3.1.3.3 Antes de la inyección y en el momento de la lectura, se medirá con un pie de rey el grosor de la piel en el lugar de la inyección.

3.1.3.4 Interpretación de los resultados.—Las reacciones fuertes se reconocen fácilmente por la inflamación y la induración locales. Se considerará que la reacción a la prueba cutánea de la brucelosis es positiva si se produce un aumento del grosor de la piel de entre 1,5 y 2 mm.

3.2 Enzimoimmunoanálisis de adsorción competitivo (ELISAc).

3.2.1 Condiciones para el uso del ELISAc.—El ELISAc no se utilizará con fines de certificación para el comercio intracomunitario.

Los animales de la especie bovina que hayan dado un resultado positivo en una de las pruebas serológicas definidas en este anexo podrán someterse a un ELISAc para corroborar la interpretación de los resultados de esa otra prueba serológica, especialmente cuando no pueda excluirse una reacción cruzada con anticuerpos de otras bacterias en el caso de los rebaños indemnes de brucelosis u oficialmente indemnes de brucelosis o para eliminar las reacciones causadas por anticuerpos residuales producidos en respuesta a la vacunación con B19.

3.2.2 Procedimiento de la prueba.—La prueba se efectuará según lo prescrito en la sección B(2) del capítulo 2.4.3 del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE, sexta edición, de 2008.

4. Laboratorio nacional de referencia.

4.1 El Laboratorio Central de Sanidad Animal (Laboratorio de Sanidad y Producción Animal) ubicado en Santa Fe (Granada), Camino del Jau s/n, 18320, es el designado como Laboratorio Nacional de Referencia para la brucelosis en animales.

4.2 Tareas y responsabilidades.—Las tareas y responsabilidad del Laboratorio Nacional de Referencia, sin perjuicio de lo dispuesto en los artículos 9, 11 y 14 y en la disposición transitoria cuarta, del presente real decreto, y en el artículo 29 de la Ley 8/2003, de 24 de abril, son las siguientes:

a) La aprobación de los resultados de los estudios de validación que demuestren la fiabilidad del método de prueba utilizado en España.

b) La determinación del número máximo de muestras que deben mezclarse en las baterías de ELISA utilizadas.

c) La calibración de los estándares de trabajo contemplados en el punto 2.1.6.

d) los controles de calidad de todos los lotes de antígenos y de baterías de ELISA utilizados en España.

e) La aplicación de las recomendaciones del laboratorio comunitario de referencia para la brucelosis y la cooperación con dicho Laboratorio comunitario.

(1) A efectos de este anexo, las diluciones para preparar los reactivos líquidos se expresan con una fracción, por ejemplo 1/150, que indica una dilución de 1 en 150.»

Disposición final única. *Entrada en vigor.*

Esta orden entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Madrid, 29 de julio de 2009.—La Ministra de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, Elena Espinosa Mangana.