

## I. DISPOSICIONS GENERALS

### MINISTERI DE MEDI AMBIENT, I MEDI RURAL I MARÍ

**13174** *Ordre ARM/2166/2009, de 29 de juliol, per la qual es modifica l'annex 2 del Reial decret 2611/1996, de 20 de desembre, pel qual es regulen els programes nacionals d'eradicació de malalties dels animals.*

El Reial decret 2611/1996, de 20 de desembre, pel qual es regulen els programes nacionals d'eradicació de malalties dels animals, a l'annex 2 estableix els mètodes de diagnòstic de la brucel·losi bovina, en aplicació del que preveu l'annex C de la Directiva 64/432/CEE, del Consell, de 26 de juny de 1964, relativa a problemes de policia sanitària en matèria d'intercanvis intracomunitaris d'animals de les espècies bovina i porcina, i de la Decisió 2004/226/CE, de la Comissió, de 4 de març de 2004, per la qual s'autoritzen proves per a la detecció d'anticossos de la brucel·losi bovina en l'àmbit de la Directiva 64/432/CEE del Consell.

Després de la inclusió de l'assaig de fluorescència polaritzada com a nova prova de diagnòstic afegida a les prescrites per al comerç internacional en el capítol 2.4.3 (brucel·losi bovina) del Manual de les proves de diagnòstic i de les vacunes per als animals terrestres, sisena edició, de 2008, de l'Organització Mundial de Sanitat Animal (OIE), i en funció del dictamen científic de la Comissió Tècnica de Salut i Benestar dels Animals de l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA), s'ha aprovat la Decisió 2008/984/CE, de la Comissió, de 10 de desembre de 2008, per la qual es modifiquen, pel que fa a les proves de diagnòstic de la brucel·losi bovina, l'annex C de la Directiva 64/432/CEE del Consell i la Decisió 2004/226/CE.

Sense perjudici de la plena i directa aplicabilitat de la Decisió esmentada, raons de seguretat jurídica fan necessari modificar l'annex 2 del Reial decret 2611/1996, de 20 de desembre, amb vista a adequar-ne el contingut al d'aquesta Decisió.

En l'elaboració d'aquesta norma han estat consultades les comunitats autònomes i les entitats representatives dels sectors afectats.

Aquesta Ordre es dicta a l'empara del que preveu la disposició final primera del Reial decret 2611/1996, de 20 de desembre, pel qual es faculta el ministre d'Agricultura, Pesca i Alimentació, actual ministra de Medi Ambient, i Medi Rural i Marí, per modificar-ne els annexos.

En virtut d'això, dispenso:

**Article únic.** *Modificació de l'annex 2 del Reial decret 2611/1996, de 20 de desembre, pel qual es regulen els programes nacionals d'eradicació de malalties dels animals.*

L'annex 2 del Reial decret 2611/1996, de 20 de desembre, pel qual es regulen els programes nacionals d'eradicació de malalties dels animals, se substitueix pel següent:

#### «ANNEX 2

##### Diagnòstic de brucel·losi bovina

1. Identificació de l'agent.—La demostració, mitjançant tinció immuno específica o acidoresistent modificada, de la presència d'organismes amb morfologia de brucel·la en material procedent d'avortaments, flux vaginal o llet implica una presumpció de brucel·losi, especialment si es corrobora amb proves serològiques. Els mètodes de reacció en cadena de la polimerasa ofereixen mètodes de detecció addicionals.

En la mesura que sigui possible, els bacteris del gènere brucel·la s'han d'aïllar amb mitjans simples o selectius, per mitjà de cultiu a partir de fluïxos uterins, fetus avortats,

secrecions mamàries o teixits seleccionats, com ara ganglis limfàtics i òrgans reproductors masculins i femenins.

Una vegada aïllats els bacteris, se n'ha d'identificar l'espècie i la biovarietat mitjançant lisi per bacteriòfag o proves del metabolisme oxidatiu i criteris de cultiu, bioquímics i serològics. La reacció en cadena de la polimerasa pot oferir un mètode complementari i biotipològic basat en seqüències genòmiques específiques.

Les tècniques i els mitjans utilitzats, la seva normalització, així com la interpretació dels resultats s'han d'ajustar al que disposa el capítol 2.4.3 (brucel·losi bovina), 2.7.2 (brucel·losi cabruna i ovina) i 2.8.5 (brucel·losi porcina) del Manual de les proves de diagnòstic i de les vacunes per als animals terrestres de l'OIE, sisena edició, de 2008.

## 2. Proves immunològiques.

### 2.1 Estàndards.

2.1.1 Per a la preparació de tots els antígens utilitzats en les proves del rosa de Bengala, de seroaglutinació, de fixació del complement i de l'anell de llet s'han de fer servir les soques Weybridge 99 o USDA 1119-3 de la biovarietat 1 de *Brucella abortus*.

2.1.2 Per a les proves del rosa de Bengala, de seroaglutinació, de fixació del complement i de l'anell de llet s'ha d'utilitzar el sèrum estàndard de referència internacional de l'OIE, abans denominat segon sèrum anti-*Brucella abortus* internacional de l'OMS (ISAbS).

2.1.3 Els sèrums estàndard de referència per als enzimoimmunoanàlisis d'adsorció (ELISA) són els següents:

El sèrum estàndard de referència internacional de l'OIE.

El sèrum estàndard dèbilment positiu de l'OIE per a ELISA.

El sèrum estàndard fortament positiu de l'OIE per a ELISA.

El sèrum estàndard negatiu de l'OIE per a ELISA.

2.1.4 Els sèrums estàndard de referència per als assajos de fluorescència polaritzada són els següents:

El sèrum estàndard dèbilment positiu de l'OIE per a ELISA.

El sèrum estàndard fortament positiu de l'OIE per a ELISA.

El sèrum estàndard negatiu de l'OIE per a ELISA.

2.1.5 Els sèrums estàndard esmentats en els punts 2.1.3 i 2.1.4 es poden obtenir en el laboratori comunitari de referència per a la brucel·losi o la Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, Regne Unit.

2.1.6 El sèrum estàndard de referència internacional de l'OIE i els sèrums estàndard dèbilment positiu, fortament positiu i negatiu de l'OIE per a ELISA són estàndards primaris internacionals a partir dels quals s'han d'establir sèrums estàndard nacionals secundaris de referència (d'ara endavant, estàndards de treball) per a cada prova esmentada en el punt 2.1.1.

2.2 Enzimoimmunoanàlisis d'adsorció (ELISA) o altres anàlisis de saturació per a la detecció de la brucel·losi bovina en sèrum o llet.

2.2.1 Material i reactius.—La tècnica utilitzada i la interpretació dels resultats s'han d'haver validat de conformitat amb els principis que estableix el capítol 1.1.4 del Manual de les proves de diagnòstic i de les vacunes per als animals terrestres de l'OIE, sisena edició, de 2008, i han d'incloure almenys estudis de laboratori i de diagnòstic.

#### 2.2.2 Normalització de la prova.

2.2.2.1 Normalització del procediment de prova per a mostres individuals de sèrum:

a) Una predilució a l'1/150 (1) de sèrum estàndard de referència internacional de l'OIE, una predilució a l'1/2 de sèrum estàndard dèbilment positiu de l'OIE per a ELISA o una predilució a l'1/16 de sèrum estàndard fortament positiu de l'OIE per a ELISA en un sèrum negatiu (o en una mescla de sèrums negatius) han de donar una reacció positiva;

b) Una predilució a l'1/600 de sèrum estàndard de referència internacional de l'OIE, una predilució a l'1/8 de sèrum estàndard dèbilment positiu de l'OIE per a ELISA o una predilució a l'1/64 de sèrum estàndard fortament positiu de l'OIE per a ELISA en un sèrum negatiu (o en una mescla de sèrums negatius) han de donar una reacció negativa;

c) El sèrum estàndard negatiu de l'OIE per a ELISA ha de donar sempre una reacció negativa.

2.2.2.2 Normalització del procediment de prova per a mostres barrejades de sèrum:

a) Una predilució a l'1/150 de sèrum estàndard de referència internacional de l'OIE, una predilució a l'1/2 de sèrum estàndard dèbilment positiu de l'OIE per a ELISA o una predilució a l'1/16 de sèrum estàndard fortament positiu de l'OIE per a ELISA en un sèrum negatiu (o en una barreja de sèrums negatius) i diluïdes de nou en sèrums negatius pel nombre de mostres que componen la barreja han de donar una reacció positiva;

b) El sèrum estàndard negatiu de l'OIE per a ELISA ha de donar sempre una reacció negativa;

c) La prova ha de ser adequada per detectar indicis d'infecció en un sol animal del grup d'animals les mostres de sèrum dels quals s'han barrejat.

2.2.2.3 Normalització del procediment de prova per a mostres barrejades de llet o de lactosèrum:

a) Una predilució a l'1/1.000 de sèrum estàndard de referència internacional de l'OIE, una predilució a l'1/16 de sèrum estàndard dèbilment positiu de l'OIE per a ELISA o una predilució a l'1/125 de sèrum estàndard fortament positiu de l'OIE per a ELISA en un sèrum negatiu (o en una barreja de sèrums negatius) i diluïdes de nou a l'1/10 en llet negativa han de donar una reacció positiva;

b) El sèrum estàndard negatiu de l'OIE per a ELISA diluït a l'1/10 en llet negativa ha de donar sempre una reacció negativa;

c) La prova ha de ser adequada per detectar indicis d'infecció en un sol animal del grup d'animals les mostres de llet o de lactosèrum dels quals s'hagin barrejat.

2.2.3 Condicions per a la utilització de les proves ELISA en el diagnòstic de la brucel·losi bovina.

2.2.3.1 En les condicions de calibratge per a les proves ELISA indicades en els punts 2.2.2.1 i 2.2.2.2 sobre les mostres de sèrum, la sensibilitat de diagnòstic de les proves esmentades ha de ser igual o superior a la de la prova del rosa de Bengala o a la de la prova de fixació del complement, tenint en compte la situació epidemiològica en què es portin a terme.

2.2.3.2 En les condicions de calibratge per a les proves ELISA indicades en el punt 2.2.2.3, sobre mostres barrejades de llet, la sensibilitat de diagnòstic d'aquestes proves ha de ser igual o superior a la de la prova de l'anell de llet, tenint en compte no solament la situació epidemiològica, sinó també els sistemes de cria de bestiar mitjans i previsiblement extrems.

2.2.3.3 Si les proves ELISA es fan servir per a la certificació de conformitat amb l'article 6.1 del Reial decret 1716/2000, de 13 d'octubre, o per a l'establiment i manteniment de l'estatut d'un ramat de conformitat amb el punt 11 de la part II de l'annex I de l'esmentat Reial decret, la barreja de les mostres de sèrum s'ha de realitzar de manera que els resultats de les proves es puguin vincular sense cap dubte als diferents animals les mostres dels quals s'hagin barrejat. Tota prova de confirmació s'ha d'efectuar amb mostres de sèrum preses d'animals per separat.

2.2.3.4 Les proves ELISA es poden utilitzar amb una mostra de la llet recollida en una explotació que tingui almenys un 30% de vaques lleteres en fase de producció de llet. Si s'utilitza aquest mètode, s'han d'aplicar mesures perquè les mostres examinades es puguin vincular sense cap dubte als diferents animals dels quals procedeix la llet. Tota prova de confirmació s'ha d'efectuar amb mostres de sèrum preses d'animals per separat.

2.3. Prova de fixació del complement (FdC).

2.3.1 L'antigen consisteix en una suspensió bacteriana en solució salina de fenol [NaCl al 0,85% (m/v) i fenol al 0,5% (v/v)] o en una solució amortidora de veronal. Els antigens es poden presentar en forma concentrada, sempre que a l'etiqueta del flascó s'indiqui el factor de dilució que s'ha d'utilitzar. L'antigen s'ha d'emmagatzemar a 4°C i no s'ha de congelar.

2.3.2 Els sèrums s'han d'inactivar de la manera següent:

Sèrum boví: 56 a 60°C durant 30 a 50 minuts.

Sèrum porcí: 60°C durant 30 a 50 minuts.

2.3.3 Amb l'objecte de provocar la reacció genuïna en el procediment de la prova, s'ha d'utilitzar una dosi de complement superior a la mínima necessària per aconseguir una hemòlisi completa.

2.3.4 Quan es realitzi la prova de fixació del complement, s'han d'efectuar, cada vegada, els controls següents:

- Control de l'efecte anticomplementari del sèrum.
- Control de l'antigen.
- Control dels eritròcits sensibilitzats.
- Control del complement.
- Control de la sensibilitat, mitjançant un sèrum positiu, al principi de la reacció.
- Control de l'especificitat de la reacció, mitjançant un sèrum negatiu.

2.3.5 Càlcul dels resultats.—El sèrum estàndard de referència internacional de l'OIE (OIEISS) conté 1.000 unitats internacionals de prova FdC per mil·lilitre. Si aquest sèrum se sotmet a prova amb un mètode concret, el resultat s'ha d'expressar mitjançant un títol (dilució directa més alta del sèrum estàndard de referència internacional de l'OIE que permeti obtenir una hemòlisi del 50%, TOIEISS). El resultat de la prova amb el sèrum problema indicat com a títol (TSÈRUM PROBLEMA) s'ha d'expressar en unitats internacionals de prova FdC per mil·lilitre. El factor de conversió (F) necessari per passar del títol d'un sèrum problema desconegut (TSÈRUM PROBLEMA) examinat pel mètode esmentat a la seva expressió en unitats internacionals de prova FdC es pot determinar amb la fórmula següent:

$$F = 1.000 \times 1/\text{TOIEISS}$$

i el contingut d'unitats internacionals de prova FdC per mil·lilitre de sèrum problema ( $\text{UIPFdC}_{\text{SÈRUM PROBLEMA}}$ ) es pot determinar amb la fórmula següent:

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

2.3.6 Interpretació dels resultats.—Es considera positiu un sèrum que contingui 20 o més unitats internacionals de prova FdC per mil·lilitre.

2.4 Prova de l'anell de llet.

2.4.1 L'antigen consisteix en una suspensió bacteriana en solució salina de fenol [NaCl al 0,85% (m/v) i fenol al 0,5% (v/v)] marcada amb hematoxilina. L'antigen s'ha d'emmagatzemar a 4°C i no s'ha de congelar.

2.4.2 La sensibilitat de l'antigen ha d'estar normalitzada en relació amb el sèrum estàndard de referència internacional de l'OIE, de manera que l'antigen doni una reacció positiva amb una dilució a l'1/500 de l'esmentat sèrum estàndard en llet negativa, mentre que amb una dilució a l'1/1.000 la reacció ha de ser negativa.

2.4.3 La prova de l'anell s'ha de fer amb mostres que representin el contingut de cada lletera o dipòsit a granel de l'explotació.

2.4.4 Les mostres de llet no s'han d'haver congelat, escalfat ni agitat fortament.

2.4.5 La reacció s'ha de provocar amb un dels mètodes següents:

En una columna de llet d'almenys 25 mm d'altura i un volum de llet d'1 ml al qual s'hi han afegit 0,03 ml o 0,05 ml d'un dels antigens estàndard marcats.

En una columna de llet d'almenys 25 mm d'altura i un volum de llet de 2 ml al qual s'hi han afegit 0,05 ml d'un dels antígens estàndard marcats.

En un volum de llet de 8 ml al qual s'hi han afegit 0,08 ml d'un dels antígens estàndard marcats.

2.4.6 La barreja de llet i antígens s'ha de covar a 37°C durant 60 minuts, juntament amb estàndards de treball positius i negatius. Posteriorment, una incubació d'entre 16 i 24 hores a 4°C ha d'augmentar la sensibilitat de la prova.

2.4.7 Interpretació dels resultats:

- a) Reacció negativa: llet acolorida, nata incolora.
- b) Reacció positiva: llet i nata de la mateixa coloració, o llet incolora i nata acolorida.

2.5 Prova de l'antigen de brucel·la esmorteït (prova del rosa de Bengala).

2.5.1 L'antigen consisteix en una suspensió bacteriana en diluent d'antigen de brucel·la esmorteït a un pH de  $3,65 \pm 0,05$ , marcat amb el colorant rosa de Bengala. L'antigen s'ha de subministrar llest per al seu ús, s'ha d'emmagatzemar a 4°C i no s'ha de congelar.

2.5.2 L'antigen s'ha de preparar sense tenir en compte la concentració cel·lular, però la seva sensibilitat ha d'estar normalitzada en relació amb el sèrum estàndard de referència internacional de l'OIE de manera que l'antigen doni una reacció positiva amb una dilució de sèrum a l'1/45 i una reacció negativa amb una dilució a l'1/55.

2.5.3 La prova del rosa de Bengala s'ha de realitzar de la manera següent:

a) S'han de barrejar 20-30 µl de sèrum amb el mateix volum d'antigen en una placa blanca de porcellana o d'esmalt per obtenir una zona d'un diàmetre aproximat de 2 cm; s'agita suaument la mostra durant 4 minuts a temperatura ambient i a continuació s'observa amb bona il·luminació si s'ha produït aglutinació.

b) Es pot fer servir un mètode automatitzat, però ha de ser almenys tan sensible i exacte com el mètode manual.

2.5.4 Interpretació dels resultats.—Tota reacció visible s'ha de considerar positiva, llevat que hagi un excés de sequedat al voltant de les vores. En cada sèrie de proves s'han d'incloure estàndards de treball positius i negatius.

2.6 Prova de seroaglutinació.

2.6.1 L'antigen consisteix en una suspensió bacteriana en una solució salina de fenol [NaCl al 0,85% (m/v) i fenol al 0,5% (v/v)].

No s'ha de fer servir formaldehid.

Els antígens es poden presentar en forma concentrada, sempre que a l'etiqueta del flascó s'indiqui el factor de dilució que s'ha d'utilitzar.

Es pot afegir EDTA a la suspensió d'antigen fins a assolir una dilució final de prova de 5 mm per reduir el nivell de falsos positius en la prova de seroaglutinació. Posteriorment, s'ha de reajustar el pH de 7,2 en la suspensió d'antigen.

2.6.2 El sèrum estàndard de referència internacional de l'OIE conté 1.000 unitats internacionals d'aglutinació.

2.6.3 L'antigen s'ha de preparar sense tenir en compte la concentració cel·lular, però la seva sensibilitat s'ha de normalitzar amb relació al sèrum estàndard de referència internacional de l'OIE, de manera que l'antigen produeixi una aglutinació del 50% amb una dilució final del sèrum de l'1/600 a l'1/1.000, o una aglutinació del 75% amb una dilució final del sèrum de l'1/500 a l'1/750.

També pot ser recomanable comparar la reactivitat entre lots d'antigen nous i prèviament normalitzats fent servir un grup de sèrums definits.

2.6.4 La prova s'ha de fer en tubs o en microplaques. La barreja d'antigen i dilucions de sèrum s'ha d'incubar durant 16 a 24 hores a 37°C.

S'han de preparar almenys tres dilucions per a cada sèrum. Les dilucions de sèrum sospitós s'han de realitzar de manera que la lectura de la reacció al límit de positivitat es faci en el tub intermedi (o en el pouet intermedi en el cas del mètode amb microplaca).



2.6.5 Interpretació dels resultats.—El grau d'aglutinació de brucel·la en un sèrum s'expressa en UI/ml. Es considera positiu un sèrum que contingui 30 o més UI/ml.

2.7 Assaig de fluorescència polaritzada.

2.7.1 L'assaig de fluorescència polaritzada es pot efectuar en un tub de cristall o una placa de 96 pouets. La tècnica utilitzada, la seva normalització i la interpretació dels resultats han de ser conformes al que especifica el capítol 2.4.3 (brucel·losi bovina) del Manual de les proves de diagnòstic i de les vacunes per als animals terrestres de l'OIE, sisena edició, de 2008.

2.7.2 Normalització de la prova.—L'assaig de fluorescència polaritzada s'ha de normalitzar de tal manera que:

- a) El sèrum estàndard fortament positiu de l'OIE per a ELISA i el sèrum estàndard dèbilment positiu de l'OIE per a ELISA donin constantment resultats positius.
- b) Una predilució a l'1/8 de sèrum estàndard dèbilment positiu de l'OIE per a ELISA o una predilució a l'1/64 de sèrum estàndard fortament positiu de l'OIE per a ELISA en un sèrum negatiu (o en una barreja de sèrums negatius) donin sempre una reacció negativa.
- c) El sèrum estàndard negatiu de l'OIE per a ELISA doni sempre una reacció negativa.

En cada bateria de proves s'hi ha d'incloure sèrum estàndard de treball fortament positiu, dèbilment positiu i negatiu (calibrats respecte als sèrums estàndard de l'OIE per a ELISA).

3. Proves complementàries.

3.1 Prova cutània de la brucel·losi.

3.1.1 Condicions per a l'ús de la prova cutània de la brucel·losi.

a) La prova cutània de la brucel·losi no s'ha de fer servir amb fins de certificació per al comerç intracomunitari.

b) La prova cutània de la brucel·losi és una de les més específiques per a la detecció de la presència de brucel·losi en animals no vacunats; no obstant això, el diagnòstic no s'ha de fer únicament a partir de reaccions intradèrmiques positives.

c) Es consideren infectats o sospitosos d'estar-ho els animals de l'espècie bovina que hagin donat un resultat negatiu en una de les proves serològiques definides en el present annex i que reaccionin positivament a la prova cutània de la brucel·losi.

d) Els animals de l'espècie bovina que hagin donat un resultat positiu en una de les proves serològiques definides en aquest annex es poden sotmetre a una prova cutània de la brucel·losi per corroborar la interpretació dels resultats de les proves serològiques, especialment quan no es pugui excloure una reacció encreuada amb anticossos d'altres bacteris en el cas dels ramats indemnes de brucel·losi o oficialment indemnes de brucel·losi.

3.1.2 La prova s'ha de fer mitjançant un preparat al·lergen de la brucel·losi normalitzat i definit que no contingui l'antigen lipopolisacàrid llis, atès que aquest últim pot provocar reaccions inflamatòries inespecífiques o interferir amb proves serològiques posteriors. Les condicions de producció de brucel·lina són conformes amb el que disposa la secció C1 del capítol 2.4.3 del Manual de les proves de diagnòstic i de les vacunes per als animals terrestres de l'OIE, sisena edició, de 2008.

3.1.3 Procediment de la prova.

3.1.3.1 S'ha d'injectar per via intradèrmica un volum de 0,1 ml d'al·lergen de la brucel·losi en el plec cabal, a la pell de la illada o en un costat del coll.

3.1.3.2 La prova s'ha de llegir una vegada transcorregudes entre 48 i 72 hores.

3.1.3.3 Abans de la injecció i en el moment de la lectura, s'ha de mesurar amb un peu de rei el gruix de la pell al lloc de la injecció.

3.1.3.4 Interpretació dels resultats.—Les reaccions fortes s'han de reconèixer fàcilment per la inflamació i la induració locals. Es considera que la reacció a la prova cutània de la brucel·losi és positiva si es produeix un augment del gruix de la pell d'entre 1,5 i 2 mm.

3.2 Enzimoimmunoanàlisi d'adsorció competitiu (ELISAc).

3.2.1 Condicions per a l'ús de l'ELISAc.—L'ELISAc no s'ha de fer servir amb fins de certificació per al comerç intracomunitari.

Els animals de l'espècie bovina que hagin donat un resultat positiu en una de les proves serològiques definides en aquest annex es poden sotmetre a un ELISAc per corroborar la interpretació dels resultats d'aquesta altra prova serològica, especialment quan no es pugui excloure una reacció encreuada amb anticossos d'altres bacteris en el cas dels ramats indemnes de brucel·losi o oficialment indemnes de brucel·losi o per eliminar les reaccions causades per anticossos residuals produïts en resposta a la vacunació amb B19.

3.2.2 Procediment de la prova.—La prova s'ha d'efectuar segons el que prescriu en la secció B(2) del capítol 2.4.3 del Manual de les proves de diagnòstic i de les vacunes per als animals terrestres de l'OIE, sisena edició, de 2008.

4. Laboratori nacional de referència.

4.1 El Laboratori Central de Sanitat Animal (Laboratori de Sanitat i Producció Animal) ubicat a Santa Fe (Granada), Camí del Jau, s/n, 18320, és el designat com a Laboratori Nacional de Referència per a la brucel·losi en animals.

4.2 Tasques i responsabilitats.—Les tasques i responsabilitat del Laboratori Nacional de Referència, sense perjudici del que disposen els articles 9, 11 i 14 i la disposició transitòria quarta, del present Reial decret, i l'article 29 de la Llei 8/2003, de 24 d'abril, són les següents:

- a) L'aprovació dels resultats dels estudis de validació que demostrin la fiabilitat del mètode de prova utilitzat a Espanya.
- b) La determinació del nombre màxim de mostres que s'han de barrejar en les bateries d'ELISA utilitzades.
- c) El calibratge dels estàndards de treball que preveu el punt 2.1.6.
- d) els controls de qualitat de tots els lots d'antígens i de bateries de ELISA utilitzats a Espanya.
- e) L'aplicació de les recomanacions del laboratori comunitari de referència per a la brucel·losi i la cooperació amb l'esmentat laboratori comunitari.

(1) Als efectes d'aquest annex, les dilucions per preparar els reactius líquids s'expressen amb una fracció, per exemple 1/150, que indica una dilució d'1 en 150.»

**Disposició final única.** *Entrada en vigor.*

Aquesta Ordre entra en vigor l'endemà de la publicació en el «Butlletí Oficial de l'Estat».

Madrid, 29 de juliol de 2009.—La ministra de Medi Ambient, i Medi Rural i Marí, Elena Espinosa Mangana.