

## I. DISPOSICIÓN XERAIS

### MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, E MEDIO RURAL E MARIÑO

**13174** Orde ARM/2166/2009, do 29 de xullo, pola que se modifica o anexo 2 do Real decreto 2611/1996, do 20 de decembro, polo que se regulan os programas nacionais de erradicación de enfermidades dos animais.

O Real decreto 2611/1996, do 20 de decembro, polo que se regulan os programas nacionais de erradicación de enfermidades dos animais, establece no seu anexo 2 os métodos de diagnóstico da brucelose bovina, en aplicación do previsto no anexo C da Directiva 64/432/CEE, do Consello, do 26 de xuño de 1964, relativa a problemas de policía sanitaria en materia de intercambios intracomunitarios de animais das especies bovina e porcina, e na Decisión 2004/226/CE, da Comisión, do 4 de marzo de 2004, pola que se autorizan probas para a detección de anticorpos da brucelose bovina no ámbito da Directiva 64/432/CEE, do Consello.

Tras a inclusión do ensaio de fluorescencia polarizada como nova proba de diagnóstico engadida ás prescritas para o comercio internacional no capítulo 2.4.3 (brucelose bovina) do Manual das probas de diagnóstico e das vacinas para os animais terrestres, sexta edición, de 2008, da Organización Mundial de Sanidade Animal (OIE), e en función do ditame científico da Comisión Técnica de Saúde e Benestar dos Animais da Autoridade Europea de Seguranza Alimentaria (EFSA), aprobouse a Decisión 2008/984/CE, da Comisión, do 10 de decembro de 2008, pola que se modifican, no que respecta ás probas de diagnóstico da brucelose bovina, o anexo C da Directiva 64/432/CEE, do Consello, e a Decisión 2004/226/CE.

Sen prexuízo da plena e directa aplicabilidade da dita decisión, razóns de seguranza xurídica fan preciso modificar o anexo 2 do Real decreto 2611/1996, do 20 de decembro, para adecuar o seu contido ao da mencionada decisión.

Na elaboración desta norma foron consultadas as comunidades autónomas e as entidades representativas dos sectores afectados.

Esta orde dítase ao abeiro do previsto na disposición derradeira primeira do Real decreto 2611/1996, do 20 de decembro, polo que se faculta o ministro de Agricultura, Pesca e Alimentación, actual ministra de Medio Ambiente, e Medio Rural e Mariño, para modificar os seus anexos.

Na súa virtude, dispoño:

**Artigo único.** *Modificación do anexo 2 do Real decreto 2611/1996, do 20 de decembro, polo que se regulan os programas nacionais de erradicación de enfermidades dos animais.*

O anexo 2 do Real decreto 2611/1996, do 20 de decembro, polo que se regulan os programas nacionais de erradicación de enfermidades dos animais, substitúese polo seguinte:

#### «ANEXO 2

##### Diagnóstico de brucelose bovina

1. Identificación do axente.—A demostración, mediante tintura inmuno específica ou acidorresistente modificada, da presenza de organismos con morfoloxía de brucela en material procedente de abortos, fluxo vaxinal ou leite implica unha presunción de brucelose, especialmente se se corrobora con probas serolóxicas. Os métodos de reacción en cadea da polimerasa ofrecen métodos de detección adicionais.

Na medida do posible, as bacterias do xénero brucela débense illar con medios simples ou selectivos, por cultivo a partir de fluxos uterinos, fetos abortados, secrecións mamarias ou tecidos seleccionados, como ganglios linfáticos e órganos reprodutores masculinos e femininos.

Unha vez illadas as bacterias, débense identificar a especie e a biovariedade mediante lise por fagos ou probas do metabolismo oxidativo e criterios de cultivo, bioquímicos e serolóxicos. A reacción en cadea da polimerasa pode ofrecer un método complementario e biotipolóxico baseado en secuencias xenómicas específicas.

As técnicas e os medios utilizados, a súa normalización, así como a interpretación dos resultados débense axustar ao disposto no capítulo 2.4.3 (brucelose bovina), 2.7.2 (brucelose caprina e ovina) e 2.8.5 (brucelose porcina) do Manual das probas de diagnóstico e das vacinas para os animais terrestres da OIE, sexta edición, de 2008.

## 2. Probas inmunolóxicas.

### 2.1 Estándares.

2.1.1 Para a preparación de todos os antíxenos utilizados nas probas do rosa de Bengala, de seroaglutinación, de fixación do complemento e do anel de leite utilizaranse as cepas Weybridge 99 ou USDA 1119-3 da biovariedade 1 de *Brucella abortus*.

2.1.2 Para as probas do rosa de Bengala, de seroaglutinación, de fixación do complemento e do anel de leite utilizarase o soro estándar de referencia internacional da OIE, anteriormente denominado segundo soro anti-*Brucella abortus* internacional da OMS (ISAbS).

2.1.3 Os soros estándar de referencia para as enzimoimunoanálises de adsorción (ELISA) serán os seguintes:

- O soro estándar de referencia internacional da OIE.
- O soro estándar debilmente positivo da OIE para ELISA.
- O soro estándar fortemente positivo da OIE para ELISA.
- O soro estándar negativo da OIE para ELISA.

2.1.4 Os soros estándar de referencia para os ensaios de fluorescencia polarizada serán os seguintes:

- O soro estándar debilmente positivo da OIE para ELISA.
- O soro estándar fortemente positivo da OIE para ELISA.
- O soro estándar negativo da OIE para ELISA.

2.1.5 Os soros estándar mencionados nos puntos 2.1.3 e 2.1.4 pódense obter no laboratorio comunitario de referencia para a brucelose ou na Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, Reino Unido.

2.1.6 O soro estándar de referencia internacional da OIE e os soros estándar debilmente positivo, fortemente positivo e negativo da OIE para ELISA son estándares primarios internacionais a partir dos cales se deben establecer soros estándar nacionais secundarios de referencia (no sucesivo, estándares de traballo) para cada proba mencionada no punto 2.1.1.

2.2 Enzimoimunoanálises de adsorción (ELISA) ou outras análises de saturación para a detección da brucelose bovina en soro ou leite.

2.2.1 Material e reactivos.—A técnica empregada e a interpretación dos resultados deberanse ter validado de conformidade cos principios establecidos no capítulo 1.1.4 do Manual das probas de diagnóstico e das vacinas para os animais terrestres da OIE, sexta edición, de 2008, e incluírán polo menos estudos de laboratorio e de diagnóstico.

#### 2.2.2 Normalización da proba.

2.2.2.1 Normalización do procedemento de proba para mostras individuais de soro:

a) Unha predilución ao 1/150 (1) de soro estándar de referencia internacional da OIE, unha predilución ao 1/2 de soro estándar debilmente positivo da OIE para ELISA ou unha

predilución ao 1/16 de soro estándar fortemente positivo da OIE para ELISA nun soro negativo (ou nunha mestura de soros negativos) deberán dar unha reacción positiva;

b) Unha predilución ao 1/600 de soro estándar de referencia internacional da OIE, unha predilución ao 1/8 de soro estándar debilmente positivo da OIE para ELISA ou unha predilución ao 1/64 de soro estándar fortemente positivo da OIE para ELISA nun soro negativo (ou nunha mestura de soros negativos) deberán dar unha reacción negativa;

c) O soro estándar negativo da OIE para ELISA deberá dar sempre unha reacción negativa.

2.2.2.2 Normalización do procedemento de proba para mostras mesturadas de soro:

a) Unha predilución ao 1/150 de soro estándar de referencia internacional da OIE, unha predilución ao 1/2 de soro estándar debilmente positivo da OIE para ELISA ou unha predilución ao 1/16 de soro estándar fortemente positivo da OIE para ELISA nun soro negativo (ou nunha mestura de soros negativos) e diluídas de novo en soros negativos polo número de mostras que compoñen a mestura deberán dar unha reacción positiva;

b) O soro estándar negativo da OIE para ELISA deberá dar sempre unha reacción negativa;

c) A proba deberá ser adecuada para detectar indicios de infección nun único animal do grupo de animais cuxas mostras de soro se mesturaron.

2.2.2.3 Normalización do procedemento de proba para mostras mesturadas de leite ou de lactosoro:

a) Unha predilución ao 1/1 000 de soro estándar de referencia internacional da OIE, unha predilución ao 1/16 de soro estándar debilmente positivo da OIE para ELISA ou unha predilución ao 1/125 de soro estándar fortemente positivo da OIE para ELISA nun soro negativo (ou nunha mestura de soros negativos) e diluídas de novo ao 1/10 en leite negativo deberán dar unha reacción positiva;

b) O soro estándar negativo da OIE para ELISA diluído ao 1/10 en leite negativo deberá dar sempre unha reacción negativa;

c) A proba deberá ser adecuada para detectar indicios de infección nun único animal do grupo de animais cuxas mostras de leite ou de lactosoro se mesturasen.

2.2.3 Condicións para a utilización das probas ELISA no diagnóstico da brucelose bovina.

2.2.3.1 Nas condicións de calibración para as probas ELISA indicadas nos puntos 2.2.2.1 e 2.2.2.2 sobre as mostras de soro, a sensibilidade de diagnóstico desas probas deberá ser igual ou superior á da proba do rosa de Bengala ou á da proba de fixación do complemento, tendo en conta a situación epidemiolóxica en que se realicen.

2.2.3.2 Nas condicións de calibración para as probas ELISA indicadas no punto 2.2.2.3 sobre mostras mesturadas de leite, a sensibilidade de diagnóstico desas probas deberá ser igual ou superior á da proba do anel de leite, tendo en conta non só a situación epidemiolóxica, senón tamén os sistemas de cría de gando medios e previsiblemente extremos.

2.2.3.3 Se as probas ELISA se empregan para a certificación de conformidade co artigo 6.1 do Real decreto 1716/2000, do 13 de outubro, ou para o establecemento e mantemento do estatuto dun rabaño de conformidade co punto 11 da parte II do anexo I do dito real decreto, a mestura das mostras de soro deberase realizar de forma que os resultados das probas se poidan vincular sen ningún xénero de dúbida aos distintos animais cuxas mostras se mesturaron. Toda proba de confirmación se deberá efectuar con mostras de soro tomadas de animais por separado.

2.2.3.4 As probas ELISA poderanse utilizar cunha mostra de leite recollida nunha explotación que teña polo menos un 30% de vacas leiteiras en fase de produción de leite. Se se emprega ese método, deberanse aplicar medidas para que as mostras examinadas se poidan vincular sen ningún xénero de dúbida aos distintos animais de que procede o

leite. Toda proba de confirmación se deberá efectuar con mostras de soro tomadas de animais por separado.

### 2.3. Proba de fixación do complemento (FdC).

2.3.1 O antíxeno consiste nunha suspensión bacteriana en solución salina de fenol [NaCl ao 0,85% (m/v) e fenol ao 0,5% (v/v)] ou nunha solución amortecedora de veronal. Os antíxenos poderanse presentar en forma concentrada, sempre que na etiqueta do frasco se indique o factor de dilución que se debe utilizar. O antíxeno almacenarase a 4 °C e non se conxelará.

2.3.2 Os soros inactivaranse da maneira seguinte:

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

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

2.3.3 Co obxecto de provocar a reacción xenuína no procedemento da proba, utilizarase unha dose de complemento superior á mínima necesaria para lograr unha hemólise completa.

2.3.4 Ao realizar a proba de fixación do complemento, efectuaranse, cada vez, os controis seguintes:

- Control do efecto anticomplementario do soro.
- Control do antíxeno.
- Control dos eritrocitos sensibilizados.
- Control do complemento.
- Control da sensibilidade, mediante un soro positivo, ao principio da reacción.
- Control da especificidade da reacción, mediante un soro negativo.

2.3.5 Cálculo dos resultados.—O soro estándar de referencia internacional da OIE (OIEISS) contén 1 000 unidades internacionais de proba FdC por mililitro. Se este soro se somete a proba cun método concreto, o resultado exprésase mediante un título (dilución directa máis alta do soro estándar de referencia internacional da OIE que permita obter unha hemólise do 50%, TOIEISS). O resultado da proba co soro problema indicado como título (TSORO PROBLEMA) exprésase en unidades internacionais de proba FdC por mililitro. O factor de conversión (F) necesario para pasar do título dun soro problema descoñecido (TSORO PROBLEMA) examinado polo dito método á súa expresión en unidades internacionais de proba FdC poderase determinar coa fórmula seguinte:

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

e o contido de unidades internacionais de proba FdC por mililitro de soro problema (UIPFdCSORO PROBLEMA) poderase determinar coa fórmula seguinte:

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

2.3.6 Interpretación dos resultados.—Considerarase positivo un soro que conteña 20 ou máis unidades internacionais de proba FdC por mililitro.

### 2.4. Proba do anel de leite.

2.4.1 O antíxeno consiste nunha suspensión bacteriana en solución salina de fenol [NaCl ao 0,85% (m/v) e fenol ao 0,5% (v/v)] marcada con hematoxilina. O antíxeno almacenarase a 4 °C e non se conxelará.

2.4.2 A sensibilidade do antíxeno deberá estar normalizada con relación ao soro estándar de referencia internacional da OIE, de forma que o antíxeno dea unha reacción positiva cunha dilución ao 1/500 dese soro estándar en leite negativo, mentres que cunha dilución ao 1/1 000 a reacción deberá ser negativa.

2.4.3 A proba do anel farase con mostras que representen o contido de cada leiteira ou depósito a granel da explotación.

2.4.4 As mostras de leite non se terán conxelado, quentado nin axitado fortemente.

2.4.5 A reacción provocarase cun dos métodos seguintes:

Nunha columna de leite de polo menos 25 mm de altura e un volume de leite de 1 ml ao cal se terán engadido 0,03 ml ou 0,05 ml dun dos antíxenos estándar marcados.

Nunha columna de leite de polo menos 25 mm de altura e un volume de leite de 2 ml ao cal se terán engadido 0,05 ml dun dos antíxenos estándar marcados.

Nun volume de leite de 8 ml ao cal se terán engadido 0,08 ml dun dos antíxenos estándar marcados.

2.4.6 A mestura de leite e antíxenos deberase incubar a 37 °C durante 60 minutos, xunto con estándares de traballo positivos e negativos. Posteriormente, unha incubación de entre 16 e 24 horas a 4 °C aumentará a sensibilidade da proba.

2.4.7 Interpretación dos resultados:

- a) Reacción negativa: leite coloreado, nata incolora.
- b) Reacción positiva: leite e nata de idéntica coloración, ou leite incoloro e nata coloreada.

2.5 Proba do antíxeno de brucela amortecido (proba do rosa de Bengala).

2.5.1 O antíxeno consiste nunha suspensión bacteriana en diluente de antíxeno de brucela amortecido a un pH de  $3,65 \pm 0,05$ , marcado co corante rosa de Bengala. O antíxeno subministrárase listo para o seu uso, almacenárase a 4 °C e non se conxelará.

2.5.2 O antíxeno preparárase sen ter en conta a concentración celular, pero a súa sensibilidade deberá estar normalizada con relación ao soro estándar de referencia internacional da OIE de forma que o antíxeno dea unha reacción positiva cunha dilución de soro ao 1/45 e unha reacción negativa cunha dilución ao 1/55.

2.5.3 A proba do rosa de Bengala realízase da maneira seguinte:

a) Mestúranse 20-30  $\mu$ l de soro co mesmo volume de antíxeno nunha placa branca de porcelana ou de esmalte para obter unha zona dun diámetro aproximado de 2 cm, axítase suavemente a mostra durante 4 minutos a temperatura ambiente e a continuación obsérvase con boa iluminación se se produciu aglutinación.

b) Poderase utilizar un método automatizado, pero deberá ser polo menos tan sensible e exacto como o método manual.

2.5.4 Interpretación dos resultados.—Toda reacción visible se deberá considerar positiva, a menos que haxa un exceso de sequidade arredor dos bordos. En cada serie de probas inclúense estándares de traballo positivos e negativos.

2.6 Proba de seroaglutinación.

2.6.1 O antíxeno consistirá nunha suspensión bacteriana nunha solución salina de fenol [NaCl ao 0,85% (m/v) e fenol ao 0,5% (v/v)].

Non se utilizará formaldehído.

Os antíxenos poderanse presentar en forma concentrada, sempre que na etiqueta do frasco se indique o factor de dilución que se deberá utilizar.

Poderase engadir EDTA á suspensión de antíxeno ata alcanzar unha dilución final de proba de 5 mM para reducir o nivel de falsos positivos na proba de seroaglutinación. Posteriormente, reaxustárase o pH de 7,2 na suspensión de antíxeno.

2.6.2 O soro estándar de referencia internacional da OIE contén 1 000 unidades internacionais de aglutinación.

2.6.3 O antíxeno preparárase sen ter en conta a concentración celular, pero a súa sensibilidade deberase normalizar con relación ao soro estándar de referencia internacional da OIE de forma que o antíxeno produza unha aglutinación do 50% cunha dilución final do soro do 1/600 ao 1/1 000, ou unha aglutinación do 75% cunha dilución final do soro do 1/500 ao 1/750.

Tamén pode ser recomendable comparar a reactividade entre lotes de antíxeno novos e previamente normalizados utilizando un grupo de soros definidos.

2.6.4 A proba realízase en tubos ou en microplacas. A mestura de antíxeno e dilucións de soro incubárase durante 16 a 24 horas a 37 °C.

Prepararanse polo menos tres dilucións para cada soro. As dilucións de soro sospeitoso realizaranse de forma que a lectura da reacción ao límite de positividade se faga no tubo intermedio (ou na covaña intermedia no caso do método con microplaca).

2.6.5 Interpretación dos resultados.—O grao de aglutinación de brucela nun soro expresarase en UI/ml. Considerarase positivo un soro que conteña 30 ou máis UI/ml.

### 2.7 Ensaio de fluorescencia polarizada.

2.7.1 O ensaio de fluorescencia polarizada poderase efectuar nun tubo de cristal ou nunha placa de 96 covañas. A técnica utilizada, a súa normalización e a interpretación dos resultados deberán ser conformes co especificado no capítulo 2.4.3 (brucelose bovina) do Manual das probas de diagnóstico e das vacinas para os animais terrestres da OIE, sexta edición, de 2008.

2.7.2 Normalización da proba.—O ensaio de fluorescencia polarizada normalizarase de tal maneira:

a) Que o soro estándar fortemente positivo da OIE para ELISA e o soro estándar debilmente positivo da OIE para ELISA dean constantemente resultados positivos.

b) Que unha predilución ao 1/8 de soro estándar debilmente positivo da OIE para ELISA ou unha predilución ao 1/64 de soro estándar fortemente positivo da OIE para ELISA nun soro negativo (ou nunha mestura de soros negativos) dean sempre unha reacción negativa.

c) Que o soro estándar negativo da OIE para ELISA dea sempre unha reacción negativa.

En cada batería de probas incluírase soro estándar de traballo fortemente positivo, debilmente positivo e negativo (calibracións respecto aos soros estándar da OIE para ELISA).

### 3. Probas complementarias.

#### 3.1 Proba cutánea da brucelose.

##### 3.1.1 Condicións para o uso da proba cutánea da brucelose.

a) A proba cutánea da brucelose non se utilizará con fins de certificación para o comercio intracomunitario.

b) A proba cutánea da brucelose é unha das máis específicas para a detección da presenza de brucelose en animais non vacinados; non obstante, o diagnóstico non se deberá realizar unicamente a partir de reaccións intradérmicas positivas.

c) Consideraranse infectados ou sospeitosos de o estar os animais da especie bovina que desen un resultado negativo nunha das probas serolóxicas definidas neste anexo e que reaccionen positivamente á proba cutánea da brucelose.

d) Os animais da especie bovina que desen un resultado positivo nunha das probas serolóxicas definidas neste anexo poderanse someter a unha proba cutánea da brucelose para corroborar a interpretación dos resultados das probas serolóxicas, especialmente cando non se poida excluír unha reacción cruzada con anticorpos doutras bacterias no caso dos rabaños indemnes de brucelose ou oficialmente indemnes de brucelose.

3.1.2 A proba realizarase mediante un preparado alérxeno da brucelose normalizado e definido que non conteña o antígeno lipopolisacárido liso, dado que este último pode provocar reaccións inflamatorias inespecíficas ou interferir con probas serolóxicas posteriores. As condicións de produción de brucelina serán conformes co disposto na sección C1 do capítulo 2.4.3 do Manual das probas de diagnóstico e das vacinas para os animais terrestres da OIE, sexta edición, de 2008.

##### 3.1.3 Procedemento da proba.

3.1.3.1 Inxectarase por vía intradérmica un volume de 0,1 ml de alérxeno da brucelose no dobrez caudal, na pel das illargas ou nun lado do pescozo.

3.1.3.2 A proba lerase unha vez transcorridas entre 48 e 72 horas.

3.1.3.3 Antes da inxección e no momento da lectura, medirase cun pé de rei o grosor da pel no lugar da inxección.

3.1.3.4 Interpretación dos resultados.—As reaccións fortes recoñécense facilmente pola inflamación e a induración locais. Considerarase que a reacción á proba cutánea da brucelose é positiva se se produce un aumento do grosor da pel de entre 1,5 e 2 mm.

### 3.2 Enzimoinmunoanálise de adsorción competitiva (ELISAc).

3.2.1 Condicións para o uso da ELISAc.—A ELISAc non se utilizará con fins de certificación para o comercio intracomunitario.

Os animais da especie bovina que desen un resultado positivo nunha das probas serolóxicas definidas neste anexo poderanse someter a unha ELISAc para corroborar a interpretación dos resultados desoutra proba serolóxica, especialmente cando non se poida excluír unha reacción cruzada con anticorpos doutras bacterias no caso dos rabaños indemnes de brucelose ou oficialmente indemnes de brucelose ou para eliminar as reaccións causadas por anticorpos residuais producidos en resposta á vacinación con B19.

3.2.2 Procedemento da proba.—A proba efectuarase segundo o prescrito na sección B(2) do capítulo 2.4.3 do Manual das probas de diagnóstico e das vacinas para os animais terrestres da OIE, sexta edición, de 2008.

### 4. Laboratorio nacional de referencia.

4.1 O Laboratorio Central de Sanidade Animal (Laboratorio de Sanidade e Produción Animal) situado en Santa Fe (Granada), Camino del Jau s/n, 18320, é o designado como Laboratorio Nacional de Referencia para a brucelose en animais.

4.2 Tarefas e responsabilidades.—As tarefas e responsabilidade do Laboratorio Nacional de Referencia, sen prexuízo do disposto nos artigos 9, 11 e 14 e na disposición transitoria cuarta deste real decreto, e no artigo 29 da Lei 8/2003, do 24 de abril, son as seguintes:

- a) A aprobación dos resultados dos estudos de validación que demostren a fiabilidade do método de proba utilizado en España.
- b) A determinación do número máximo de mostras que se deben mesturar nas baterías de ELISA utilizadas.
- c) A calibración dos estándares de traballo recollidos no punto 2.1.6.
- d) Os controis de calidade de todos os lotes de antíxenos e de baterías de ELISA utilizados en España.
- e) A aplicación das recomendacións do laboratorio comunitario de referencia para a brucelose e a cooperación con ese laboratorio comunitario.

(1) Para os efectos deste anexo, as dilucións para preparar os reactivos líquidos expresaranse cunha fracción, por exemplo 1/150, que indica unha dilución de 1 en 150.»

### **Disposición derradeira única.** *Entrada en vigor.*

Esta orde entrará en vigor o día seguinte ao da súa publicación no «Boletín Oficial del Estado».

Madrid, 29 de xullo de 2009.—A ministra de Medio Ambiente, e Medio Rural e Mariño, Elena Espinosa Mangana.