

REGLAMENTO (CE) Nº 535/2002 DE LA COMISIÓN
de 21 de marzo de 2002
por el que se modifica el anexo C de la Directiva 64/432/CEE del Consejo y la Decisión 2000/330/CE

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista 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 ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye la Decisión 2001/298/CE de la Comisión ⁽²⁾, y, en particular, el segundo párrafo del apartado 1 de su artículo 16,

Considerando lo siguiente:

- (1) El 11 de octubre de 1999, el Comité científico de salud y bienestar de los animales adoptó un informe ⁽³⁾ sobre la modificación de los anexos técnicos de la Directiva 64/432/CEE para tener en cuenta los avances científicos en materia de tuberculosis, brucelosis y leucosis enzoótica bovina.
- (2) De conformidad con dicho informe, las pruebas de la brucelosis deben llevarse a cabo siguiendo las instrucciones de la tercera edición de 1996 del Manual de normas para pruebas de diagnóstico y vacunas de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE, Office International des Epizooties).
- (3) En agosto de 2001, la OIE publicó la cuarta edición de 2000 de dicho Manual, en la cual se incluyen determinadas modificaciones de la descripción de las pruebas de la brucelosis.
- (4) Por ello, es necesario modificar el anexo C de la Directiva 64/432/CEE para establecer procedimientos de realización de las pruebas destinadas al control y a los intercambios dentro de la Comunidad que reflejen en la medida de lo posible las normas de la OIE, pero que también tengan en cuenta la opinión del Comité científico y de los laboratorios nacionales de referencia de los Estados miembros que cooperan dentro de la red de

laboratorios nacionales de referencia para la brucelosis de la Unión Europea.

- (5) Debe modificarse en consecuencia la Decisión 2000/330/CE de la Comisión, de 18 de abril de 2000, por la que se autorizan pruebas para la detección de anticuerpos de la brucelosis bovina en el ámbito de la Directiva 64/432/CEE ⁽⁴⁾.
- (6) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité veterinario permanente.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El anexo C de la Directiva 64/432/CEE quedará sustituido por el anexo del presente Reglamento.

Artículo 2

La Decisión 2000/330/CE quedará modificada como sigue:

- 1) El artículo 1 se sustituirá por el texto siguiente:

«Artículo 1

Quedarán autorizadas a efectos de certificación la prueba de fijación del complemento, las pruebas del antígeno brucelar tamponado y las pruebas ELISA llevadas a cabo de conformidad con lo dispuesto en el anexo C de la Directiva 64/432/CEE.».

- 2) Se suprimirá el anexo.

Artículo 3

El presente Reglamento entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 21 de marzo de 2002.

Por la Comisión

David BYRNE

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO 121 de 29.7.1964, p. 1977/64.

⁽²⁾ DO L 102 de 12.4.2001, p. 63.

⁽³⁾ SANCO/B3/R10/1999.

⁽⁴⁾ DO L 114 de 13.5.2000, p. 37.

ANEXO

«ANEXO C

BRUCELOSIS

1. IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE

La demostración, mediante tinción inmunespecífica o ácido-resistente modificada, de la presencia de organismos con morfología de *Brucella* en material procedente de abortos, flujo vaginal o leche indica posibilidad de brucelosis, especialmente en caso de que dicha demostración se vea confirmada por resultados de pruebas serológicas.

Una vez aislados los microorganismos, deben identificarse la especie y el biovar mediante lisis por fagos o pruebas del metabolismo oxidativo y criterios de cultivo, bioquímicos y serológicos.

Las técnicas y medios utilizados, su normalización y la interpretación de los resultados deben ajustarse a lo dispuesto en los capítulos 2.3.1 (brucelosis bovina), 2.4.2 (brucelosis caprina y ovina) y 2.6.2 (brucelosis porcina) de la cuarta edición de 2000 del Manual de normas para pruebas de diagnóstico y vacunas de la OIE.

2. PRUEBAS INMUNOLÓGICAS

2.1. Patrones

2.1.1. Para la preparación de todos los antígenos utilizados en las pruebas de rosa de Bengala, de aglutinación del suero, de fijación del complemento y del anillo en leche deberá utilizarse la cepa Weybridge 99 o la cepa USDA 1119-3 del biovar 1 de *Brucella abortus*.

2.1.2. El suero patrón de referencia para las pruebas arriba mencionadas es el suero patrón de referencia internacional de la OIE, anteriormente denominado segundo suero anti-*Brucella abortus* internacional de la OMS.

2.1.3. Los sueros patrón de referencia para las pruebas ELISA son los siguientes:

- el suero patrón de referencia internacional de la OIE,
- el suero patrón ELISA débilmente positivo de la OIE,
- el suero patrón ELISA fuertemente positivo de la OIE,
- el suero patrón ELISA negativo de la OIE.

2.1.4. Los sueros patrón arriba mencionados pueden obtenerse en la Agencia de Laboratorios Veterinarios (Veterinary Laboratories Agency, VLA) de Weybridge (Reino Unido).

2.1.5. Los sueros patrón mencionados en el punto 2.1.3 son patrones primarios internacionales de los cuales deben establecerse para cada prueba en cada Estado miembro patrones nacionales secundarios de referencia (en adelante, "de trabajo").

2.2. **Pruebas de inmunoabsorción enzimática (ELISA) u otras pruebas aglutinantes 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 1.1.3 de la cuarta edición de 2000 del Manual de normas para pruebas de diagnóstico y vacunas de la OIE y deberán incluir al menos estudios de laboratorio y de diagnóstico.

2.2.2. *Normalización de la prueba*

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

- a) una pre-dilución al 1/150 ⁽¹⁾ de suero patrón de referencia internacional de la OIE, una pre-dilución al 1/2 de suero patrón ELISA débilmente positivo de la OIE o una pre-dilución al 1/16 de suero patrón ELISA fuertemente positivo de la OIE realizada en un suero negativo (o en una mezcla de sueros negativos) debe dar reacción positiva;
- b) una pre-dilución al 1/600 de suero patrón de referencia internacional de la OIE, una pre-dilución al 1/8 de suero patrón ELISA débilmente positivo de la OIE o una pre-dilución al 1/64 de suero patrón ELISA fuertemente positivo de la OIE realizada en un suero negativo (o en una mezcla de sueros negativos) debe dar reacción negativa;

⁽¹⁾ A efectos del presente anexo, las diluciones para preparar los reactivos líquidos se expresan, por ejemplo, como 1/150, lo que indica una dilución de 1 en 150.

- c) el suero patrón ELISA negativo de la OIE debe dar siempre reacción negativa.
- 2.2.2.2. Normalización del procedimiento de la prueba para muestras mezcladas de suero:
- una pre-dilución al 1/150 de suero patrón de referencia internacional de la OIE, una pre-dilución al 1/2 de suero patrón ELISA débilmente positivo de la OIE o una pre-dilución al 1/16 de suero patrón ELISA fuertemente positivo de la OIE realizada en un suero negativo (o en una mezcla de sueros negativos) y diluida de nuevo en sueros negativos por el número de muestras que componen la mezcla debe dar reacción positiva;
 - el suero patrón ELISA negativo de la OIE debe dar siempre reacción negativa;
 - la prueba debe ser capaz de detectar indicios de infección en un solo animal del grupo de animales de los que se hayan mezclado muestras de suero.
- 2.2.2.3. Normalización del procedimiento de la prueba para muestras mezcladas de leche o de lactosuero:
- una pre-dilución al 1/1 000 de suero patrón de referencia internacional de la OIE, una pre-dilución al 1/16 de suero patrón ELISA débilmente positivo de la OIE o una pre-dilución al 1/125 de suero patrón ELISA fuertemente positivo de la OIE realizada en un suero negativo (o en una mezcla de sueros negativos) y diluida de nuevo al 1/10 en leche negativa, debe dar reacción positiva;
 - el suero patrón ELISA negativo de la OIE diluido al 1/10 en leche negativa debe dar siempre reacción negativa;
 - la prueba debe ser capaz de detectar indicios de infección en un solo animal del grupo de animales de los que se hayan mezclado muestras de leche o de lactosuero.
- 2.2.3. *Condiciones para el empleo de las pruebas ELISA en el diagnóstico de la brucelosis bovina*
- 2.2.3.1. Si se emplean las condiciones de calibración arriba mencionadas para las pruebas ELISA con muestras de suero, la sensibilidad de diagnóstico de las pruebas ELISA debe ser igual o superior a la de la prueba de rosa de Bengala o a la de la prueba de fijación del complemento, teniendo en cuenta la situación epidemiológica en la que se utilicen.
- 2.2.3.2. Si se emplean las condiciones de calibración arriba mencionadas para las pruebas ELISA con muestras de leche mezcladas, la sensibilidad de diagnóstico de las pruebas ELISA debe ser igual o superior a la de la prueba del anillo en leche, teniendo en cuenta no sólo la situación epidemiológica, sino también los sistemas de cría de ganado medios y extremos que cabe esperar.
- 2.2.3.3. Si las pruebas ELISA se emplean para la certificación de conformidad con el apartado 1 del artículo 6 o para el establecimiento y mantenimiento del estatuto de un rebaño de conformidad con el punto 10 del título II del anexo A, debe llevarse a cabo una mezcla de muestras de suero de forma que los resultados de las pruebas puedan vincularse sin ningún género de dudas a los distintos animales incluidos en el conjunto. Toda prueba de confirmación debe llevarse a cabo con muestras de suero tomadas de animales por separado.
- 2.2.3.4. Las pruebas ELISA pueden utilizarse con una muestra de leche tomada de la leche recogida en una explotación con al menos un 30 % de vacas lecheras en fase de producción de leche. Si se emplea este método, deben aplicarse medidas a fin de que las muestras tomadas para su examen puedan vincularse sin ningún género de dudas a los distintos animales de los que procede la leche. Toda prueba de confirmación debe llevarse a cabo 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 solución amortiguadora de veronal. Los antígenos pueden presentarse en forma concentrada, siempre que en la etiqueta del frasco se indique el factor de dilución que debe utilizarse. El antígeno debe almacenarse a 4 °C y no debe congelarse.
- 2.3.2. Los sueros deben inactivarse de la manera siguiente:
- suero bovino: a una temperatura de 56 a 60 °C entre 30 y 50 minutos,
 - suero porcino: a 60 °C entre 30 y 50 minutos.
- 2.3.3. Con objeto de provocar la reacción genuina en el procedimiento de la prueba, se debe usar 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, deben efectuarse cada vez los controles siguientes:
- control del efecto anticomplementario del suero;
 - control del antígeno;
 - control de los hematíes sensibilizados;
 - control del complemento;
 - control de la sensibilidad al principio de la reacción, mediante un suero positivo;
 - control de la especificidad de la reacción, mediante un suero negativo.

2.3.5. Cálculo de los resultados

El suero patrón de referencia internacional de la OIE (OIEISS) contiene 1 000 unidades internacionales de prueba FdC por mililitro. Si este suero patrón se somete a prueba mediante un método dado, el resultado se expresa como título (T_{OIEISS}). El resultado de la prueba con el suero problema, indicado como título ($T_{\text{suero problema}}$), debe expresarse en unidades internacionales de prueba FdC por mililitro. El factor de conversión (F) necesario para pasar el título de un suero problema desconocido ($T_{\text{suero problema}}$), examinado mediante dicho método, a su expresión en unidades internacionales de prueba FdC puede averiguarse mediante la siguiente fórmula:

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

y el contenido de unidades internacionales de prueba FdC por mililitro de suero problema (UIPFdC_{suero problema}) mediante la siguiente:

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

2.3.6. Interpretación de los resultados

Se considera positivo un suero que contenga 20 o más unidades internacionales de prueba FdC por mililitro.

2.4. Prueba del anillo en 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 debe almacenarse a 4 °C y no debe congelarse.
- 2.4.2. La sensibilidad del antígeno debe estar normalizada en relación con el suero patrón de referencia internacional de la OIE, de forma que el antígeno dé reacción positiva con una dilución al 1/500 de este suero patrón en leche negativa, mientras que con una dilución al 1/1 000 dé reacción negativa.
- 2.4.3. La prueba del anillo debe efectuarse con muestras que representen el contenido de cada cántara o de cada cisterna de la explotación.
- 2.4.4. Las muestras de leche no deben haberse congelado, calentado ni sometido a fuerte agitación.
- 2.4.5. La reacción debe llevarse a cabo utilizando uno de los métodos siguientes:
- con una columna de leche de al menos 25 mm de altura y con un volumen de leche de 1 ml al que se hayan añadido 0,03 ml o 0,05 ml de uno de los antígenos marcados normalizados,
 - con una columna de leche de al menos 25 mm de altura y con un volumen de leche de 2 ml al que se hayan añadido 0,05 ml de uno de los antígenos marcados normalizados,
 - con un volumen de leche de 8 ml al que se hayan añadido 0,08 ml de uno de los antígenos marcados normalizados.
- 2.4.6. La mezcla de leche y antígenos debe incubarse a 37 °C durante 60 minutos, junto con patrones de trabajo negativo y positivo. La sensibilidad de la prueba aumenta si se prorroga la incubación a 4 °C durante un período de entre 16 y 24 horas.
- 2.4.7. Interpretación de los resultados:
- a) reacción negativa: leche coloreada, nata incolora;
 - b) reacción positiva:
 - leche y nata de idéntico color, o
 - leche incolora y nata coloreada.

2.5. Prueba de rosa de Bengala en placa

- 2.5.1. El antígeno consiste en una suspensión bacteriana en diluyente de antígeno de brucela tamponado a un pH de $3,65 \pm 0,05$, marcado con el colorante rosa de Bengala. El antígeno debe suministrarse listo para su uso, debe almacenarse a 4 °C y no debe congelarse.
- 2.5.2. El antígeno no se prepara en función de la concentración celular, sino que su sensibilidad debe normalizarse con relación al suero patrón de referencia internacional de la OIE de forma que el antígeno dé reacción positiva con una dilución de suero al 1/45 y reacción negativa con una dilución al 1/55.
- 2.5.3. La prueba de rosa de Bengala en placa debe realizarse de la manera siguiente:
- a) se mezclan 20-30 µl de suero con un volumen igual de antígeno en una placa blanca de porcelana o de esmalte para obtener una zona con un diámetro de 2 cm, aproximadamente. La mezcla se agita suavemente durante 4 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se observa con buena iluminación para ver si se ha producido aglutinación;
 - b) se puede utilizar un método automatizado, pero debe ser al menos tan sensible y exacto como el método manual.

2.5.4. Interpretación de los resultados

Toda reacción visible debe considerarse positiva, a menos que se observe un exceso de sequedad alrededor de los bordes.

En cada serie de pruebas deben incluirse patrones de trabajo positivos y negativos.

2.6. Prueba de aglutinación del suero

2.6.1. El antígeno consiste en una suspensión bacteriana en una solución salina de fenol [NaCl al 0,85 % (m/v) y fenol al 0,5 % (v/v)]. No debe utilizarse formaldehído.

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

Se puede 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 aglutinación del suero. Posteriormente, se debe reajustar el pH de 7,2 en la suspensión de antígeno.

2.6.2. El suero patrón de referencia internacional de la OIE contiene 1 000 unidades internacionales de aglutinación.

2.6.3. El antígeno no se prepara en función de la concentración celular, sino que su sensibilidad debe normalizarse con relación al suero patrón de referencia internacional de la OIE de forma que el antígeno produzca una aglutinación del 50 % con una dilución final del suero entre el 1/600 y el 1/1 000, o una aglutinación del 75 % con una dilución final del suero entre el 1/500 y el 1/750.

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

2.6.4. La prueba se realiza en tubos o en microplacas. La mezcla de antígeno y diluciones de suero debe incubarse durante un período de 16 a 24 horas a 37 °C.

De cada suero deben prepararse al menos tres diluciones. Las diluciones de suero sospechoso deben realizarse de forma que la lectura de la reacción al límite de positividad se realice en el tubo intermedio (o en el pocillo intermedio en el caso del método de las microplacas).

2.6.5. Interpretación de los resultados

El grado de aglutinación de *Brucella* en un suero debe expresarse en UI/ml.

Se considera positivo un suero que contenga 30 o más UI/ml.

3. PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

3.1. Prueba cutánea de la brucelosis

3.1.1. Condiciones para el empleo de esta prueba:

- a) la prueba cutánea de la brucelosis no debe emplearse para fines de certificación en el comercio intracomunitario;
- b) esta prueba es una de las más específicas para la detección de la presencia de brucelosis en animales no vacunados; no obstante, no se debe realizar el diagnóstico únicamente a partir de reacciones intradérmicas positivas;
- c) debe considerarse que están infectados los animales de la especie bovina que se hayan sometido a una de las pruebas serológicas definidas en el presente anexo con un resultado negativo y que reaccionen positivamente a la prueba cutánea de la brucelosis;
- d) los animales de la especie bovina que se hayan sometido a una de las pruebas serológicas definidas en el presente anexo con un resultado positivo pueden someterse a una prueba cutánea de la brucelosis para confirmar 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 debe llevarse a cabo mediante un preparado alergénico de la brucelosis normalizado y definido que no contenga lipopolisacárido liso antigénico, ya que éste puede provocar reacciones inflamatorias inespecíficas o interferir con pruebas serológicas posteriores.

Un preparado de tales características es la brucelina INRA, que procede de una cepa no lisa de *B. melitensis*. Sus condiciones de producción aparecen descritas detalladamente en la sección B2 del capítulo 2.4.2 de la cuarta edición de 2000 del Manual de normas para pruebas de diagnóstico y vacunas de la OIE.

3.1.3. Procedimiento de la prueba

3.1.3.1. Se inyecta 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 lee una vez transcurridas de 48 a 72 horas.

3.1.3.3. Antes de la inyección y en el momento de la lectura, se mide 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 considera que la reacción a la prueba cutánea de la brucelosis es positiva si se produce un aumento del grosor de la piel de 1,5 a 2 mm.

3.2. Prueba de inmunoabsorción enzimática de competición (ELISAc)

3.2.1. Condiciones para el empleo de esta prueba:

- a) la ELISAc no debe emplearse con fines de certificación en el comercio intracomunitario;
- b) la ELISAc ha mostrado tener mayor especificidad que, por ejemplo, la ELISA indirecta, y por consiguiente puede usarse para confirmar la interpretación de los resultados de las pruebas serológicas.

3.2.2. Procedimiento de la prueba

La prueba debe realizarse de acuerdo con la letra a) del punto 2 del capítulo 2.3.1 de la cuarta edición de 2000 del Manual de normas para pruebas de diagnóstico y vacunas de la OIE.

4. LABORATORIOS NACIONALES DE REFERENCIA

4.1. Tareas y responsabilidades

Los laboratorios nacionales de referencia realizan las tareas siguientes:

- a) aprobación de los resultados de los estudios de validación que demuestren la fiabilidad del método de prueba utilizado en el Estado miembro;
- b) determinación del número máximo de muestras que deben mezclarse en las baterías de ELISA utilizadas;
- c) calibración de los sueros patrón nacionales secundarios de referencia ("patrones de trabajo") frente al suero patrón primario internacional mencionado en el párrafo 2.1;
- d) controles de calidad de todos los lotes de antígenos y de baterías de ELISA utilizados en el Estado miembro;
- e) cooperación dentro de la red de laboratorios nacionales de referencia para la brucelosis de la Unión Europea.

4.2. Lista de laboratorios nacionales de referencia

BÉLGICA

Centre d'études et de recherches vétérinaires et agrochimiques (CERVA/CODA)
Groeselenberg 99
B-1180 Bruxelles/Brussel

DINAMARCA

Danish Veterinary Institute
Bulowsvej 27
DK-1790 Copenhagen

ALEMANIA

Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV)
Nationales Veterinärmedizinisches Referenzlabor für Brucellose
Postfach 33 00 13
D-14191 Berlín

GRECIA

Veterinary Laboratory of Larissa
Department of Microbiology
6th km of National Road Larissa-Trikala
GR-4111 10 Larissa

ESPAÑA

Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe
Camino del Jau S/N
E-18320 Santa Fe (Granada)

FRANCIA

Laboratoire national et OIE/FAO de référence pour la brucellose
Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA)
BP 67
F-94703 Maisons-Alfort Cedex

IRLANDA

Brucellosis Laboratory
Model Farm Road
Cork
Irlanda

ITALIA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise
Via Campo Boario
I-64100 Teramo

LUXEMBURGO

State Laboratory for Veterinarian Medicine
54, av. Gaston Diderich
B.P. 2081
L-1020 Luxemburgo

PAÍSES BAJOS

Centraal Instituut voor DierziekteControle
CIDC-Lelystad
Houtribweg 39
PO Box 2004
8203 AA Lelystad
Países Bajos

AUSTRIA

Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen
Robert-Koch-Gasse 17
A-2340 Mödling

PORTUGAL

Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV)
Estrada de Benfica, n.º 701
P-1549-011 Lisboa

FINLANDIA

National Veterinary and Food Research Institute
Hämeentie 57
PO Box 45
FIN-00581 Helsinki

SUECIA

National Veterinary Institute
S-751 89 Uppsala

REINO UNIDO

- 1) FAO/WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Brucellosis
Veterinary Laboratories Agency
New Haw
Addlestone
Surrey KT15 3NB
Reino Unido
 - 2) Immunodiagnosics Department
Veterinary Sciences Division
Stoney Road Stormont
Belfast BT4 3SD
Reino Unido»
-