

CAPÍTULO 2.4.3.

BRUCELOSIS BOVINA

RESUMEN

La brucelosis bovina suele estar causada por Brucella abortus, menos frecuentemente por B. melitensis y en ocasiones por B. suis. La infección está muy extendida por el mundo, aunque algunos países del norte y del centro de Europa, así como Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda se consideran libres de este agente etiológico.

La enfermedad se caracteriza clínicamente por uno o más de los siguientes signos: aborto, retención de placenta, orquitis, epididimitis y, en ocasiones muy infrecuentes, artritis, con excreción de los microorganismos en las secreciones uterinas y en la leche. El diagnóstico se basa en el aislamiento de Brucella a partir de los abortos, de las secreciones de la ubre y de los tejidos tomados en el examen postmortem. Se puede realizar un diagnóstico preliminar determinando la respuesta específica celular o humoral frente a los antígenos de Brucella.

Brucella abortus, B. melitensis y B. suis son muy patógenos para el hombre y por lo tanto, todos los tejidos infectados, como los cultivos y el material potencialmente contaminado, deben manipularse en condiciones apropiadas de contención.

Identificación del agente: *La evidencia preliminar de Brucella la proporciona la observación de la morfología de Brucella mediante la tinción de microorganismos ácido alcohol resistentes en material abortado o secreción vaginal, sobre todo si está respaldada por pruebas serológicas. La reacción en cadena de la polimerasa constituye otro medio de detección. Cuando sea posible, se debe aislar Brucella spp. en medios normales o selectivos cultivando secreciones uterinas, los fetos abortados, las secreciones de las ubres o los tejidos escogidos, como ganglios linfáticos u órganos reproductores masculinos o femeninos. Las especies y biovariedades deben identificarse mediante fagolisis y según criterios de cultivo, bioquímicos y serológicos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede constituir un método tanto complementario como de biotipificación basado en secuencias específicas del genoma.*

Pruebas serológicas y de alergias cutáneas: *Las pruebas con el antígeno tamponado de Brucella, es decir, la prueba con rosa de bengala y la prueba de aglutinación tamponada en placa, así como la fijación del complemento, el enzimoimmunoanálisis (ELISA) o el ensayo de polarización de la fluorescencia, son pruebas adecuadas tanto para analizar rebaños como animales individuales. Sin embargo, ninguna prueba serológica es adecuada por sí misma para todas y cada una de las situaciones epidemiológicas. Por tanto, la reactividad de las muestras que son positivas en las pruebas de análisis debe evaluarse utilizando una estrategia confirmativa y/o complementaria establecida. La prueba de ELISA indirecto o la del anillo de leche, realizadas con muestras de leche de tanque colectivo, son eficaces para analizar y controlar la brucelosis en las vacas lecheras, pero la prueba del anillo de leche es menos fiable en los grandes rebaños. Otra prueba inmunológica es la prueba cutánea de la brucelina, que puede utilizarse como prueba de detección o confirmativa en los rebaños cuando aparecen casos serológicamente positivos en ausencia de factores evidentes de riesgo en rebaños no vacunados.*

Requisitos para las vacunas y el material biológico de diagnóstico: *La cepa 19 de Brucella abortus continúa siendo la vacuna de referencia con la que se comparan otras vacunas. Debe prepararse a partir de cultivos de inóculo de EE.UU. con virulencia e inmunogenicidad residual suficientes para proteger a los ratones frente a la exposición a una cepa virulenta de B. abortus. Además, cada lote debe cumplir las exigencias mínimas de viabilidad, fase lisa y UFC (unidades formadoras de colonias) designadas por dosis. La vacuna con la cepa RB51 de Brucella abortus se*

produjo a partir de una cepa mutante rugosa de laboratorio, derivada de la cepa lisa 2308 de *B. abortus*. Se ha convertido en la vacuna oficial para la prevención de la brucelosis en el ganado bovino en ciertos países. Las preparaciones de brucelina para la prueba intradérmica deben estar libres de lipopolisacárido liso y no deben producir reacciones inflamatorias inespecíficas ni interferir con pruebas serológicas. Los antígenos para el diagnóstico deben prepararse a partir de cepas lisas de *B. abortus*, las cepas 1119-3 o 99, y bien cumplir un estándar mínimo de pureza, sensibilidad y especificidad.

A. INTRODUCCIÓN

En el ganado bovino, la brucelosis suele estar causada por biovariedades de *Brucella abortus*. En algunos países, en concreto en el sur de Europa y en el oeste de Asia, donde el ganado bovino se cría junto a ovejas o cabras, la infección también puede estar causada por *B. melitensis* (38, 87). En ocasiones, *B. suis* puede causar una infección crónica de la glándula mamaria en el ganado bovino, pero no se ha descrito que origine abortos ni se transmita a otros animales (24). En las hembras no gestantes la enfermedad suele ser asintomática. Después de la infección por *B. abortus* o por *B. melitensis*, las hembras adultas gestantes desarrollan una placentitis que, por lo general, provoca el aborto entre el quinto y el noveno mes de gestación. Incluso en ausencia de aborto se produce una gran excreción de microorganismos a través de la placenta, los líquidos fetales y las secreciones vaginales. Las glándulas mamarias y los ganglios linfáticos regionales también pueden infectarse y pueden aparecer microorganismos en la leche. Las gestaciones posteriores llegan, por lo general, a término, pero la infección uterina y la mamaria se repiten con un número reducido de microorganismos en los productos del parto y en la leche. En las infecciones agudas, el microorganismo está presente en la mayoría de los ganglios linfáticos. Los machos adultos pueden desarrollar orquitis, y la brucelosis puede causar la esterilidad en ambos sexos. Los higromas, normalmente en articulaciones de las extremidades, son un signo frecuente de brucelosis en algunos países tropicales y podrían ser el único indicio obvio de infección; el líquido del higroma suele infectarse con *Brucella*.

La brucelosis se ha descrito también en el camello de una joroba (*Camelus dromedarius*) y en el de dos jorobas (*C. bactrianus*), así como en los siguientes camélidos de Sudamérica: la llama (*Lama glama*), la alpaca (*Lama pacos*), el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*) como consecuencia de contactos con rumiantes grandes y pequeños infectados con *B. abortus* o *B. melitensis*. Además, se ha observado en el búfalo doméstico (*Bubalus bubalus*), el bisonte americano y europeo (*Bison bison*, *Bison bonasus*), el yak (*Bos grunniens*), el alce o wapiti (*Cervus elaphus*), así como en el búfalo africano (*Syncerus caffer*) y en varias especies de antílopes africanos. Los signos clínicos de la brucelosis en estos animales son similares a los del ganado bovino.

En el manual de bioseguridad para los laboratorios elaborado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se clasifica a los microorganismos del género *Brucella* en el Grupo de Riesgo III. La brucelosis se transmite fácilmente al hombre y causa una enfermedad febril aguda, la fiebre ondulante, que puede convertirse en una forma más crónica y producir complicaciones graves que afectan al sistema musculoesquelético y cardiovascular, y al sistema nervioso central. Deben tomarse precauciones para prevenir la infección humana. A menudo la infección se debe a una exposición profesional y se contrae por vía oral, respiratoria o conjuntival, pero el riesgo mayor para la población general es la ingestión de productos lácteos contaminados en las zonas en las que la enfermedad es endémica. Los veterinarios y los ganaderos que manejan animales infectados, fetos abortados o placentas, están expuestos a este riesgo laboral. La brucelosis es una de las enfermedades que con mayor facilidad se contraen en el laboratorio, y se deben observar precauciones de seguridad muy estrictas al manipular cultivos y muestras intensamente infectadas, como lo son los productos del aborto. Existen recomendaciones específicas que han de seguirse con el material infectado por *Brucella* (para más detalles, véanse las referencias 1, 39, 94 y el capítulo 1.1.2. Bioprotección y seguridad humana en los laboratorios veterinarios de microbiología y en las instalaciones de los animales). La manipulación de los cultivos vivos o del material animal contaminado en el laboratorio es peligrosa y debe realizarse en un nivel de contención 3 o superior, como se indica en el capítulo 1.1.2, para reducir la exposición ocupacional. Es esencial que se utilice un nivel de contención 3 en los lugares en los que se realicen cultivos de *Brucella* a gran escala (por ejemplo, para la producción de antígeno o de vacunas).

La evidencia genética e inmunológica indica que todos los miembros del género *Brucella* están estrechamente relacionados. Sin embargo, teniendo en cuenta que existen diferencias relevantes entre las principales variantes en cuanto a la preferencia por el hospedador y a la epidemiología, así como evidencias moleculares de variaciones genómicas, el Comité Internacional de Sistemática de Procariontes, Subcomité de Taxonomía de *Brucella*, adoptó en 2005 una decisión firme sobre la vuelta a las posiciones anteriores a 1986 en lo relativo a la taxonomía de *Brucella*; la consecuencia de ese posicionamiento es la reaprobación de las seis especies tipo de *Brucella* con sus biovariedades reconocidas. Los nombres clásicos relacionadas con las seis especies tipo de *Brucella* están publicados en las Listas Autorizadas de Nombres de Bacterias de 1980, y las cepas típicas

designadas aparecen asociadas a esos nombres válidos publicados: *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis* (<http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>). Las tres primeras se subdividen en biovariedades por sus características de cultivo y serológicas (véanse las Tablas 1 y 2). En la última década se han aislado cepas de *Brucella* de mamíferos marinos que no pueden adscribirse a ninguna de las anteriores especies reconocidas. Hay estudios en curso destinados a establecer su posición correcta en la taxonomía de ese género y se ha propuesto que podrían clasificarse en dos nuevas especies, *B. ceti* y *B. pinnipedialis* (26). Recientemente se ha aislado una nueva cepa, denominada *Brucella microti*, en el topillo campesino (*Microtus arvalis*) en Europa Central (76, 77). Por último, *Brucella* muestra una estrecha relación genética con patógenos y simbiontes de plantas de los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium*, así como con patógenos animales (*Bartonella*) y con bacterias oportunistas o del suelo (*Ochrobactrum*).

Tabla 1. Caracteres diferenciales de especies del género *Brucella*

Especies	Morfología de la colonia ^p	Requisitos de suero	Lisis por fagos ^a				Oxidasa	Actividad ureasa	Hospedador preferido	
			Tb		Wb	Iz ₁				R/C
			RTD ^c	RTDc10 ⁴ RTD	RTD	RTD				RTD
<i>B. abortus</i>	S	- ^d	+	+	+	+	-	+ ^e	+ ^f	Vacas y otros bóvidos
										Biovariedad 1: cerdo
										Biovariedad 2: cerdo, liebre
<i>B. suis</i>	S	-	-	+	+ ^g	+ ^g	-	+	+ ^h	Biovariedad 3: cerdo
										Biovariedad 4: reno
										Biovariedad 5: roedores salvajes
<i>B. melitensis</i>	S	-	-	-	- ⁱ	+	-	+	+ ^j	Ovejas y cabras
<i>B. neotomae</i>	S	-	- ^k	+	+	+	-	-	+ ^h	Rata lanuda del desierto ^l
<i>B. ovis</i>	R	+	-	-	-	-	+	-	-	Carneros
<i>B. canis</i>	R	-	-	-	-	-	+	+	+ ^h	Perros
<i>B. ceti</i>	S		+ ^m		+ ⁿ	+ ^o	-	+	+	Cetáceos
<i>B. pinnipedialis</i>	S		+ ^m		+ ⁿ	+ ^o	-	+	+	Pinípedos
<i>B. microti</i>	S	-	-	+	+	+	-	+	+	Topillo campesino

Tomado de las ref. 1 y 39.

- a Fagos: Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1(Iz₁) y R/C
- b Fase normal de presentación: S: lisa, R: rugosa
- c RTD: dilución problema sistemática
- d *B. abortus* biovariedad 2 requiere generalmente suero para crecer en aislamiento primario
- e Algunas cepas africanas de *B. abortus* biovariedad 3 son negativas
- f Velocidad intermedia, excepto la cepa 544 y algunas cepas de campo que son negativas
- g Algunas cepas de *B. suis* biovariedad 2 no son lisadas por el fago Wb o Iz₁ o solo lo son parcialmente
- h Velocidad rápida
- i Algunas cepas se lisan por el fago Wb
- j Velocidad lenta, excepto algunas cepas que son rápidas
- k Placas pequeñas
- l *Neotoma lepida*
- m Algunas cepas son lisadas por Tb
- n La mayoría de cepas son lisadas por Wb
- o La mayoría de cepas son lisadas por Iz

Tabla 2. Caracteres diferenciales de las biovariedades de especies de *Brucella*

Especies	Biovariedad	Requisito de CO ₂	Producción de H ₂ S	Crecimiento con colorantes ^a		Aglutinación con sueros monoespecíficos		
				Tionina	Fucsina básica	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+ ^b	+	-	+	+	-	-
	2	+ ^b	+	-	-	+	-	-
	3	+ ^b	+	+	+	+	-	-
	4	+ ^b	+	-	+ ^c	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
	9	+ o -	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	- ^d	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	- ^e	+	+	-
	5	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. neotomae</i>	-	-	+	- ^f	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	-	+	-	+	- ^e	-	-	+
<i>B. canis</i>	-	-	-	+	- ^e	-	-	+
<i>B. ceti</i>	-	-	-	+	+	+	- ^e	-
<i>B. pinnipedialis</i>	-	+	-	+	+	+	- ^e	-
<i>B. microti</i>	-	-	-	+	+	-	+	-

Tomado de las ref. 1 y 39.

- a Concentración del colorante en medio de dextrosa con suero: 20 µg/ml
- b Normalmente positivo en aislamiento primario
- c Se han aislado algunas cepas sensibles a la fucsina básica
- d Se han aislado algunas cepas resistentes a la fucsina básica
- e Negativo en la mayoría de las cepas
- f Crecimiento a una concentración de 10 µg/ml de tionina

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Todos los abortos del ganado bovino en fases tardías de la gestación, a partir del quinto mes, deben tratarse como sospechosos de brucelosis y deben estudiarse. El cuadro clínico no es patognomónico, aunque el historial del rebaño puede servir de ayuda. El diagnóstico inequívoco de una infección por *Brucella* solo puede hacerse mediante el aislamiento y la identificación de *Brucella*, pero en situaciones en las que no es posible el análisis bacteriológico, el diagnóstico puede basarse en los métodos serológicos. No existe una prueba única que permita la identificación de *Brucella*. Normalmente se necesita una combinación de las características de crecimiento y métodos serológicos, bacteriológicos y/o moleculares.

1. Identificación del agente (1, 17, 18, 39)

a) Métodos de tinción

El género *Brucella* está formado por cocobacilos o bacilos cortos que miden 0,6–1,5 µm de largo por 0,5–0,7 µm de ancho. Normalmente aparecen aislados, y con menos frecuencia en pares o en grupos pequeños. La morfología de los microorganismos del género *Brucella* es bastante constante, aunque en cultivos viejos se pueden observar formas pleomórficas. *Brucella* no es una bacteria móvil. No forma esporas ni flagelos, ni fimbrias ni cápsulas verdaderas. Los microorganismos del género *Brucella* son gramnegativos y no suelen mostrar tinción bipolar. No son verdaderamente bacterias ácido-alcohol resistentes, pero resisten a la decoloración por ácidos débiles y se tiñen de rojo mediante el método de Ziehl–Neelsen modificado por Stamp. Este método constituye el procedimiento normal para el examen de frotis de órganos o de líquidos biológicos fijados previamente con calor o con etanol, y por este método *Brucella* se tiñe de rojo sobre un fondo azul. También puede utilizarse una técnica basada en anticuerpos conjugados a un fluorocromo o marcados con peroxidasa (72). La presencia de microorganismos intracelulares con morfología de *Brucella*, débilmente resistentes a ácidos, o inmunoespecíficamente teñidos, constituye un indicio preliminar de brucelosis. Sin embargo, estos métodos presentan una baja sensibilidad en la leche y en productos lácteos, donde los microorganismos del género *Brucella* se presentan a menudo en escaso número, y donde la presencia de glóbulos de grasa a menudo impide una interpretación correcta. En la interpretación de los resultados positivos por el método de Stamp hay que proceder con prudencia, puesto que otros microorganismos que también causan aborto, como *Chlamydophila abortus* (antes *Chlamydia psittaci*) o *Coxiella burnetii* son difíciles de diferenciar de *Brucella*. Los resultados, tanto positivos como negativos, deben confirmarse por cultivo.

Para poner de manifiesto el agente en diversas muestras biológicas, también se pueden utilizar métodos basados en sondas de ADN o en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (9).

b) Cultivo

i) Medios basales

El aislamiento y cultivo directo de *Brucella* se realizan normalmente en un medio sólido. En general, este representa el método más satisfactorio porque permite aislar y reconocer claramente las colonias que se desarrollan. Los medios sólidos también limitan el establecimiento de los mutantes no lisos y el desarrollo excesivo de contaminantes. Sin embargo, para muestras voluminosas o con fines de enriquecimiento puede recomendarse el empleo de medios líquidos. Existe una gran variedad de medios basales deshidratados a nivel comercial, como la base de medio para *Brucella*, o el agar triptosa (o tripticasa)-soja (TSA). Es necesario añadir un 2–5% de suero bovino o equino para el cultivo de algunas cepas, como la biovariedad 2 de *B. abortus*, y muchos laboratorios lo añaden sistemáticamente al medio basal con resultados excelentes, como en el caso del agar sangre (Oxoid) o agar Columbia (BioMérieux). También pueden utilizarse otros medios satisfactorios, como el agar de suero-dextrosa (SDA) o el agar de glicerol dextrosa (1). El medio SDA es normalmente el de elección para la observación de la morfología de las colonias. Para el aislamiento de *Brucella* de la sangre o de la leche, y de otros líquidos del cuerpo, donde se aconseja un cultivo de enriquecimiento, se recomienda un medio bifásico no selectivo conocido como medio de Castañeda. Este medio se emplea porque las brucelas tienden a disociarse en medio líquido y esto interfiere con la biotipificación llevada a cabo mediante las técnicas bacteriológicas convencionales.

ii) Medios selectivos

Todos los medios base indicados anteriormente se pueden utilizar para la preparación de medios selectivos, añadiendo los antibióticos apropiados para evitar el crecimiento de organismos distintos de *Brucella*. El medio selectivo más difundido es el de Farrell (25), que se prepara añadiendo seis antibióticos a un medio base. Se añaden las siguientes cantidades por cada litro de agar: sulfato de polimixina B (5.000 unidades = 5 mg); bacitracina (25.000 unidades = 25 mg); natamicina (50 mg); ácido nalidíxico (5 mg); nistatina (100.000 unidades) y vancomicina (20 mg).

Se ha comercializado un suplemento de antibióticos liofilizado (Oxoid). Sin embargo, a las concentraciones utilizadas en el medio de Farrell, el ácido nalidíxico y la bacitracina pueden tener efectos inhibidores sobre algunas cepas de *B. abortus* y *B. melitensis* (49). Por ello, la sensibilidad del cultivo aumenta cuando se utilizan simultáneamente el medio de Farrell como el medio de Thayer-Martin modificado. En esencia, el medio de Thayer-Martin modificado se puede preparar con medio base GC (38 g/litro; Biolife Laboratories, Milán, Italia) suplementado con hemoglobina (10 g/litro; Difco) y metanosulfonato de colistina (7,5 mg/litro), vancomicina (3 mg/litro), nitrofurantoína (10 mg/litro), nistatina (100.000 Unidades Internacionales [UI]/litro = 17,7 mg) y anfotericina B (2,5 mg/litro) (todos los productos de Sigma Chemical, St Louis, EE. UU.) (49). A diferencia de otras biovariedades de *B. abortus*, el crecimiento de *B. melitensis* no es dependiente de la presencia de una atmósfera con un 5–10% de CO₂ (Tabla 2).

Como el número de microorganismos de *Brucella* en la leche, en el calostro y en algunas muestras tisulares es probablemente menor que en material de abortos, se recomienda un enriquecimiento. En el caso de la leche, los resultados también mejoran mediante centrifugación y cultivo de la crema y el precipitado, pero deben aplicarse estrictas medidas de seguridad para evitar aerosoles. El enriquecimiento se puede realizar en medio líquido formado por caldo de suero-dextrosa, con caldo de triptosa o caldo de (tripticasa)-soja (TSA) o con caldo para *Brucella* suplementado con una mezcla de antibióticos que lleve al menos anfotericina B (1 µg/ml) y vancomicina (20 µg/ml) (concentraciones finales). El medio de enriquecimiento debe incubarse a 37°C en aire suplementado con un 5–10% (v/v) de CO₂ hasta 6 semanas, realizando subcultivos semanales a un medio sólido selectivo. Si se prefiere, se puede utilizar un sistema bifásico con un medio selectivo líquido y sólido en el mismo frasco (técnica de Castañeda) para reducir el subcultivo. Para el aislamiento de *Brucella* de la leche a veces se recomienda un medio selectivo bifásico formado por el medio base de Castañeda al que se añaden los siguientes antibióticos en la fase líquida (las cantidades que se indican son por litro de medio): sulfato de polimixina B (6.000 unidades = 6 mh); bacitracina (25.000 unidades = 25 mg); natamicina (50 mg); ácido nalidíxico (5 mg); anfotericina B (1 mg); vancomicina (20 mg) y D-cicloserina (100 mg).

Todos los medios de cultivo deben someterse a un control de calidad y deben permitir el cultivo de cepas de *Brucella* de pequeños inóculos o cepas exigentes, como *B. abortus* biovariedad 2.

En medios sólidos adecuados, pueden observarse colonias visibles de *Brucella* después de 2–3 días de incubación. A los 4 días de incubación, las colonias de *Brucella* son redondas, de 1-2 mm de diámetro, con los bordes lisos. Son translúcidas y de color miel pálido a la luz del día en medio transparente. Vistas desde arriba son convexas y de color blanco perla. Posteriormente, las colonias crecen y se oscurecen ligeramente.

Los cultivos en fase lisa (S) de *Brucella* presentan tendencia a sufrir variaciones durante el crecimiento, especialmente en el caso de los subcultivos, y aparecen formas rugosas (R). Las colonias son entonces mucho menos transparentes, presentan una superficie mate más granular y el color varía de blanco mate a marrón con luz reflejada o transmitida. La comprobación de esta transición se realiza fácilmente por tinción con cristal violeta: las colonias rugosas se tiñen de rojo/violeta y las lisas no captan colorante o bien se tiñen de color amarillo claro. Si las colonias son lisas deben comprobarse con un antisuero anti-*B. abortus* en fase lisa, o preferiblemente con antisueros mono-específicos contra los antígenos de superficie A y M. En cuanto a las colonias rugosas, deben comprobarse con antisuero contra el antígeno R de *Brucella*. Por lo general, los cambios de morfología de las colonias se asocian a cambios en la virulencia, en las propiedades serológicas y/o en la sensibilidad a los fagos. La morfología típica de las colonias y un resultado positivo en la prueba de aglutinación con un antisuero anti *Brucella* proporcionan una identificación provisional de la cepa como *Brucella*. La identificación posterior completa se realiza mejor en un laboratorio de referencia.

iii) Toma y cultivo de muestras

Para el diagnóstico de la brucelosis animal mediante cultivo, la elección de las muestras depende en general de los signos clínicos observados. Las muestras más adecuadas incluyen fetos abortados (contenido gástrico, bazo y pulmones), membranas fetales, secreciones vaginales (hisopos), leche, semen y líquidos de las artritis o de los higromas. Los tejidos preferidos para cultivo de las canales animales son los del sistema retículoendotelial (ganglios linfáticos de la cabeza, mamarios y genitales, y el bazo), el útero inmediatamente antes o después del parto, y las ubres. Suele aparecer crecimiento pasados 3 a 4 días, pero los cultivos no deben considerarse negativos hasta que hayan pasado 8 a 10 días.

Tejidos: Las muestras se toman asépticamente con instrumentos estériles. Las muestras de tejido se preparan retirando el material irrelevante (como la grasa), cortándolas en pequeños trozos y macerándolas con un digestor ("Stomacher") o en un homogeneizador de tejidos con una pequeña cantidad de solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS), antes de inocularlas en medios sólidos.

Secreciones vaginales: Una fuente excelente para recoger *Brucella* es un hisopo vaginal tomado después del aborto o del parto, y es menos arriesgado para el personal que el material del aborto. El hisopo se siembra directamente en medios sólidos.

Leche: Las muestras de leche deben recogerse de forma limpia después de lavar y secar toda la ubre y desinfectar los pezones. Es esencial que las muestras contengan leche de todos los cuarterones, y se deben tomar 10–20 ml de cada pezón. Los primeros chorros se desechan y la muestra se recoge directamente en un recipiente estéril. Se ha de tener cuidado para evitar el contacto entre la leche y las manos del ordeñador. La leche se centrifuga en condiciones que eviten el riesgo de contaminación del personal por aerosol, y la crema y la parte depositada se esparcen en medio selectivo sólido, por separado o mezclados. Si hay brucelas en la leche completa, su número suele ser muy bajo y es improbable el aislamiento a partir de tales muestras.

Derivados lácteos: Los productos lácteos, como los quesos, deben cultivarse en los medios descritos arriba. Como es probable que estos materiales contengan un número pequeño de microorganismos, se recomiendan cultivos de enriquecimiento. Se necesita que las muestras estén homogenizadas cuidadosamente antes del cultivo, después de haberlas sometido a un triturador de tejidos, a un digestor (“Stomacher”) o a una batidora eléctrica con un volumen adecuado de PBS estéril. Deben cultivarse las capas superficiales (corteza y partes adyacentes) y el interior del producto. Como las brucelas crecen, sobreviven y desaparecen rápidamente, su distribución por las diferentes partes del producto varía en función de las condiciones físico-químicas locales relacionadas con la tecnología específica del proceso.

Después de la toma, todas las muestras deben enfriarse rápidamente y transportarse al laboratorio lo antes posible. A su llegada al laboratorio, la leche y las muestras de tejidos deben congelarse si no van a cultivarse de inmediato.

El empleo de animales de laboratorio debe evitarse a menos que sean absolutamente necesarios, aunque a veces constituyen el único medio para detectar la presencia de *Brucella*, sobre todo cuando las muestras están muy contaminadas o es probable que contengan un número bajo de microorganismos del género *Brucella*. La inoculación en los animales puede ser subcutánea o a través de la piel afeitada de cobayas o, preferiblemente, intravenosa o intraperitoneal en ratones. Este trabajo debe realizarse en condiciones adecuadas de bioseguridad como se indica en el Capítulo 1.1.2. Los bazos de los ratones se cultivan durante 7 días después de la inoculación y, en el caso de los cobayas, se somete una muestra de suero a pruebas específicas a las 3 y 6 semanas de la inoculación, y a continuación se cultivan los bazos.

c) Identificación y tipificación

Cualquier colonia con una morfología similar a la de *Brucella* debe analizarse por la tinción de Gram (o por la de Stamp). Como en las fases no lisas se alteran las propiedades serológicas, tintoriales y de sensibilidad a los fagos, la morfología colonial resulta esencial para las pruebas de tipificación que se describen más abajo. Los métodos recomendados para observar la morfología de las colonias son el método de Henry mediante luz reflejada oblicua, la prueba de la acriflavina descrita por Braun & Bonestell, o el método de White & Wilson de tinción de colonias con cristal violeta (1).

La identificación de *Brucella* se puede realizar mediante una combinación de las siguientes pruebas: morfología celular mediante la tinción de Gram o de Stamp, morfología de las colonias, propiedades de crecimiento, pruebas de ureasa, oxidasa y catalasa, y la prueba de la aglutinación en porta con un suero policlonal anti-*Brucella*. La identificación de especies y de biovariedades requiere pruebas elaboradas (como la lisis por fagos y la aglutinación con sueros monoespecíficos anti-A, anti-M o anti-R), cuya realización se lleva a cabo en laboratorios de referencia con experiencia en estos métodos. La utilización simultánea de varios fagos, como Tbilissi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar (Iz) y R/C, representa un sistema de tipificación fágica que, con suficiente experiencia, permite identificar las especies lisas y las rugosas de *Brucella*. No obstante, algunas propiedades, como el requerimiento de CO₂ para crecer, la producción de H₂S (detectada mediante papeles con acetato de plomo) y el crecimiento en presencia de fucsina básica y tionina a concentraciones finales de 20 µg/ml, se detectan mediante pruebas sistemáticas que pueden realizarse en laboratorios no especializados moderadamente equipados (véanse las Tablas 1 y 2).

Cuando se envían cepas de *Brucella* a un laboratorio de referencia para su tipificación, es esencial seleccionar las cepas lisas. Los cultivos se liofilizan y se cierran en ampollas dentro de tubos con tapón de rosca o se subcultivan en un agar inclinado con los nutrientes adecuados en tubos con tapón de rosca. Las cepas también pueden enviarse suspendidas en medios de transporte (como el medio Amies), aunque este puede proporcionar la oportunidad de que se establezcan mutantes rugosas.

- i) *Brucella* está considerada entre las bacterias más peligrosas con las que se trabaja en cuanto a riesgo de infecciones contraídas en el laboratorio. Para transportar cultivos de *Brucella*, los tapones de los recipientes deben estar bien enroscados y sellados con cintas de PVC. Los recipientes deben envolverse con papel adsorbente o con algodón, sellarse en bolsas de polietileno y empaquetarse en un contenedor rígido de acuerdo con las exigencias de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA) para el envío de muestras peligrosas (36). Estas regulaciones se resumen en el Capítulo 1.1.1. Recogida y envío de muestras de diagnóstico, y deben respetarse. Como los cultivos de *Brucella* son infecciosos, se designan como UN2814 y se debe realizar una Declaración de Muestras

Peligrosas. También existen restricciones para enviar muestras sospechosas de brucelosis y se deben tener en cuenta las regulaciones de la IATA antes de su envío (36). También deben seguirse otras directrices nacionales e internacionales (95).

- ii) Antes de enviar cultivos o muestras de diagnóstico para cultivo, se debe de contactar con el laboratorio receptor para determinar si se necesita algún permiso especial y si el laboratorio tiene la capacidad de realizar las pruebas solicitadas. Si las muestras traspasan fronteras nacionales, probablemente se necesitará un permiso de importación que debe obtenerse antes de despachar la muestra (capítulo 1.1.2).

d) Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos

La PCR, incluido el formato en tiempo real, constituye otro medio de detección e identificación de *Brucella* sp. (9, 11–13, 29, 35, 65). Pese al alto grado de homología del ADN dentro del género *Brucella*, se han desarrollado varios métodos moleculares que permiten, hasta cierto punto, la diferenciación entre especies de *Brucella* y algunas de sus biovariedades, como la PCR, el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción ampliados mediante PCR (RFLP) y la transferencia Southern (para una revisión, ver las referencias 9 y 51). Se ha desarrollado también una electroforesis en gel de campo pulsante que permite la diferenciación entre varias especies de *Brucella* (37, 50). Mediante el empleo de la PCR puede biotipificarse *Brucella* y pueden diferenciarse las cepas vacunales, pero la PCR se ha validado poco para el diagnóstico primario.

La primera prueba de PCR múltiple específica de especie para la diferenciación de *Brucella* fue descrita por Bricker & Halling (12). La prueba, denominada PCR AMOS, se basaba en el polimorfismo resultante de la localización, específica de especie, de la secuencia de inserción IS711 en el cromosoma de *Brucella* e incluía cinco cebadores oligonucleótidos que podían identificar sin diferenciar las biovariedades 1, 2 y 4 de *B. abortus*, pero no podían identificar las biovariedades 3, 5, 6 y 9 de *B. abortus*. Con el tiempo se han introducido modificaciones de la prueba para mejorar el rendimiento, y se han incorporado otros cebadores específicos de cepa para la identificación de las cepas vacunales de *B. abortus*, y de otras biovariedades y especies (11, 13, 22, 23, 65).

Se ha propuesto una nueva prueba de PCR múltiple (*Bruce-ladder*) para la identificación rápida y en un solo paso de *Brucella* (29). La principal ventaja de esta prueba respecto a las PCR descritas previamente es que permite identificar y diferenciar en un solo paso la mayoría de especies de *Brucella*, así como las cepas vacunales *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev.1. Contrariamente a lo que ocurre con otras PCR, *Bruce-ladder* permite detectar también ADN de *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* y *B. ceti*. Además, mediante esta nueva PCR múltiple se pueden detectar las biovariedades 3, 5, 6, 7, 9 de *B. abortus* y las biovariedades 2, 3, 4, 5 de *B. suis*. El único pequeño inconveniente de *Bruce-ladder* es que algunas cepas de *B. canis* pueden identificarse erróneamente como *B. suis* (46). Además, esta prueba no permite identificar positivamente las nuevas especies de *B. microti*.

- **Procedimiento de la prueba (PCR múltiple *Bruce-ladder*)**

- i) Preparación del ADN de *Brucella*

Preparación de las bacterias tomadas de placas de agar: con un asa estéril de inoculación, se transfieren bacterias de una colonia a 200 µl de solución salina. Se extrae el ADN bacteriano hirviendo durante 10 minutos y, después de la centrifugación (a 12.000 g durante 20 segundos), se utiliza 1,0 µl del sobrenadante como ADN molde para la amplificación mediante PCR (entre 0,1 y 0,05 µg/µl de ADN, aproximadamente).

- ii) Preparación de la mezcla de la PCR *Bruce-ladder* (por cada reacción, con un volumen final de 25 µl)

Reactivos	Concentración final	Volumen
Tampón de PCR 10×	1×	2,5 µl
dNTPs (2 mM)	400 µM de cada	5,0 µl
Mg ²⁺ (50 mM)	3,0 mM	1,5 µl
Cóctel de ocho pares de cebadores para <i>Bruce-ladder</i> (12,5 µM)	6,25 pmol de cada	7,6 µl
H ₂ O (de grado PCR)	–	7,1 µl
ADN polimerasa*	1,5 U	0,3 µl

*Dado que esta prueba es una PCR múltiple con ocho pares de cebadores en la misma reacción en tubo, los resultados se optimizan cuando se utiliza ADN polimerasa de alta calidad (por ejemplo, la Immolase DNA polymerase [Bioline], la Titanium *Taq* DNA polymerase [Clontech], o la PFU DNA polymerase [Biotools B&M Labs.]). **NOTA:** se debe incluir siempre un control negativo sin ADN y un control positivo con ADN de *B. suis*

Se añade 1,0 µl de ADN molde

iii) Amplificación mediante PCR

Desnaturalización inicial a 95°C durante 7 minutos

35 segundos de desnaturalización del molde a 95°C

45 segundos de hibridación del cebador a 64°C

3 minutos de extensión del cebador a 72°C

} durante un total de 25 ciclos

Extensión final a 72°C durante 6 minutos

iv) Detección de producto amplificado e interpretación de los resultados

Se analizan los productos de la PCR (7 µl) mediante electroforesis (120 V durante 1 hora) en gel de agarosa al 1,5% en tampón TBE (89 mM de Tris/HCl, 89 mM de ácido bórico, 2,0 mM de ácido etilendiaminotetraacético [EDTA], pH 8,0). Se utiliza la escala de ADN 1kb plus como marcador del tamaño molecular. Se visualizan las bandas con luz UV tras teñir con bromuro de etidio. Para la interpretación de los resultados, véase la referencia 29.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la prueba de PCR múltiple *Bruce-ladder*

Cebador ^a	Secuencia (5'-3')	Amplicón seis (pb)	Dianas en el ADN	Origen de las diferencias genéticas
BMEI0998f	ATC-CTA-TTG-CCC-CGA-TAA-GG	1682	Glicosiltransferasa, gen <i>wboA</i>	Inserción de IS711 en BMEI0998 en: <i>B. abortus</i> RB51, y deleción de 15.079 pb en BMEI0993-BMEI1012 en: <i>B. ovis</i>
BMEI0997r	GCT-TCG-CAT.-TTT-CAC-TGT-AGC			
BMEI0535f	GCG-CAT.-TCT-TCG-GTT-ATG-AA	450 (1320 ^b)	Antígeno inmunodominante, gen <i>bp26</i>	Inserción de IS711 en BMEI0535-BMEI0536 en: cepas de <i>Brucella</i> aisladas de mamíferos marinos
BMEI0536r	CGC-AGG-CGA-AAA-CAG-CTA-TAA			
BMEI10843f	TTT-ACA-CAG-GCA-ATC-CAG-CA	1071	Proteína de membrana externa, gen <i>omp31</i>	deleción de 25.061 bp en BMEI1826-BMEI10850 en: <i>B. abortus</i>
BMEI10844r	GCG-TCC-AGT-TGT-TGT-TGA-TG			
BMEI1436f	ACG-CAG-ACG-ACC-TTC-GGT-AT	794	Polisacárido deacetilasa	deleción de 976 pb en BMEI1435 en: <i>B. canis</i>
BMEI1435r	TTT-ATC-CAT.-CGC-CCT-GTC-AC			
BMEI10428f	GCC-GCT-ATT-ATG-TGG-ACT-GG	587	Catabolismo del eritritol, gen <i>eryC</i> (D-eritrolosa-1-fosfato deshidrogenasa)	deleción de 702 pb en BMEI10427-BMEI10428 en: <i>B. abortus</i> S19
BMEI10428R	AAT-GAC-TTC-ACG-GTC-GTT-CG			
BR0953f	GGA-ACA-CTA-CGC-CAC-CTT-GT	272	Proteína ABC transportadora de unión	deleción de 2653 pb en BR0951-BR0955 en: <i>B. melitensis</i> y <i>B. abortus</i>
BR0953r	GAT-GGA-GCA-AAC-GCT-GAA-G			
BMEI0752f	CAG-GCA-AAC-CCT-CAG-AAG-C	218	Proteína ribosómica S12, gen <i>rpsL</i>	mutación puntual en BMEI0752 en: <i>B. melitensis</i> Rev.1
BMEI0752r	GAT-GTG-GTA-ACG-CAC-ACC-AA			
BMEI10987f	CGC-AGA-CAG-TGA-CCA-TCA-AA	152	Regulador transcripcional de la familia CRP	deleción de 2.203 pb en BMEI10986-BMEI10988 en: <i>B. neotomas</i>
BMEI10987r	GTA-TTC-AGC-CCC-CGT-TAC-CT			

^aLas denominaciones se basan en las secuencias del genoma de *B. melitensis* (BME) o *B. suis*. f: directa; r: inversa.

^bDebido a una inserción de ADN en el gen *bp26*, el tamaño del amplicón en las cepas de *Brucella* aisladas de mamíferos marinos es de 1.320 pb

Existen otras pruebas, como la PCR/RFLP *omp25*, 2a y 2b (14, 15) que pueden utilizarse para identificar especies de *Brucella*.

Recientemente se han descrito otros procedimientos que permiten la identificación de todas las especies de *Brucella*, basados en la discriminación por polimorfismo de nucleótido único (SNP) mediante la extensión de cebador o PCR en tiempo real (32, 79). Estas pruebas son rápidas, sencillas e inequívocas y, al basarse en un análisis filogenético robusto, resuelven algunos de los problemas observados con la *Bruce-ladder*, como la identificación errónea de cepas de *B. canis*.

Recientemente se han descrito otros métodos que pueden añadir información epidemiológica útil. Estos son un esquema de secuenciación multilocus (92) y varios esquemas de tipificación basados en la utilización de análisis de repeticiones en tándem de un número variable de locus múltiples (MLVA) (10, 11, 42, 93).

Dependiendo de los marcadores concretos escogidos, estos métodos permiten diferenciar las cepas a nivel de especie o incluso subclasificarlas pudiendo llegar a obtener información epidemiológica útil a nivel de subespecie.

e) Identificación de cepas vacunales

La identificación de las cepas vacunales *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* cepa Rev.1, se basa en pruebas adicionales.

La cepa S19 de *Brucella abortus* presenta las propiedades normales de una biovariedad 1 de *B. abortus*, pero no requiere CO₂ para crecer, ni crece en presencia de bencilpenicilina (3 µg/ml = 5 UI/ml), azul tionina (2 µg/ml) ni i-eritritol (1 mg/ml) (todas ellas concentraciones finales), y presenta una elevada utilización de L-glutamato (1). En algunos casos la cepa 19 crecerá en presencia de i-eritritol pero sin usarlo.

La cepa Rev. 1 de *Brucella melitensis* tiene las propiedades normales de una biovariedad 1 de *B. melitensis*, pero crece más lentamente en medios ordinarios, no crece en presencia de fucsina básica, ni con tionina (1 µg/ml) ni bencilpenicilina (3 µg/ml) (concentraciones finales), pero sí en presencia de estreptomina a 2,5 o 5 µg/ml (5 UI/ml) (17, 20, 18, 21).

La cepa RB51 de *Brucella abortus* se identifica por las siguientes características: morfología rugosa y crecimiento en presencia de rifampicina (250 µg por ml de medio).

Las cepas vacunales S19, Rev.1 y RB51 también se pueden identificar utilizando las PCR específicas (13, 29, 75, 86, 88).

2. Pruebas serológicas

No existe ninguna prueba serológica que sea adecuada en todas las situaciones epidemiológicas; todas tienen limitaciones, sobre todo cuando se trata de detectar la enfermedad en animales aislados (31, 64). Se deben tener en cuenta todos los factores que influyen en la relevancia del método analítico y en los resultados de la prueba para una interpretación o aplicación diagnóstica concreta. En unidades epidemiológicas en las que se practique la vacunación con *Brucella* lisa, pueden esperarse falsos positivos en animales vacunados, porque los anticuerpos presentan reacción cruzada con la infección por la cepa natural. Los métodos serológicos que se describen en este capítulo son métodos estandarizados y validados, con características de realización adecuadas para ser consideradas pruebas obligadas o alternativas para el comercio internacional. Esto no impide el uso de pruebas modificadas o similares ni la utilización de reactivos biológicos diferentes. Sin embargo, los métodos y reactivos descritos en este capítulo suponen un estándar de comparación en cuanto al rendimiento diagnóstico esperado.

Debe resaltarse que la prueba de la seroaglutinación en tubo (SAT) se considera en general inadecuada a efectos del comercio internacional. La prueba de la fijación del complemento (FC) es más específica que la SAT para el diagnóstico, y además posee un sistema estandarizado de unidades. Las características de rendimiento diagnóstico de algunos enzimoanálisis (ELISA) y la prueba de la polarización de fluorescencia (FPA) son similares o superiores a la CF y, como son técnicamente más fáciles de realizar y más robustas, pueden ser preferibles a otras (60, 97). Se ha comparado el rendimiento de varias de estas pruebas.

Para el control de la brucelosis en un país o región, son adecuadas para el análisis las pruebas con antígeno tamponado de *Brucella*, es decir, la prueba con rosa de bengala (RBT) y la prueba de aglutinación tamponada en placa (BPAT), así como el ELISA y la FPA. Las reacciones positivas deben volverse a comprobar utilizando una estrategia confirmativa adecuada y/o complementaria.

En otras especies, como por ejemplo en búfalos (*Bubalus bubalus*), bisonte americano y europeo (*Bison bison*, *Bison bonasus*), yak (*Bos grunniens*), elk/wapiti (*Cervus elaphus*) y camellos (*Camelus bactrianus* y *C. dromedarius*), y camélidos sudamericanos, la infección por *Brucella* sp. sigue un curso similar que en el ganado bovino. Para estos animales pueden utilizarse los mismos procedimientos serológicos (56), pero cada uno debe ser validado para la especie de animal estudiada (27, 28).

• Sueros de referencia

Los estándares de referencia de la OIE son aquellos con los que se comparan y calibran todos los demás estándares. Estos estándares de referencia están a disposición de los laboratorios nacionales de referencia y deben utilizarse para establecer estándares secundarios o nacionales frente a los que pueden prepararse otros de trabajo para ser utilizados en el diagnóstico diario sistemático de laboratorio.

Estos sueros se han desarrollado y designado por la OIE como Sueros Internacionales Estándar¹. Su empleo favorece la armonización internacional de las pruebas de diagnóstico y la estandarización de antígenos (97):

- Para la RBT y la FC, se utiliza el Suero Estándar Internacional (OIEISS, anteriormente denominado Segundo Suero anti *Brucella abortus* Internacional de la OMS). Este suero es de origen bovino y contiene 1000 ICFTU (unidades internacionales de la prueba de fijación del complemento).
- Además, se dispone de tres sueros estándar de la OIE para ELISA. También son de origen bovino y contienen un estándar fuertemente positivo (OIEELISA_{SP}SS), uno débilmente positivo (OIEELISA_{WP}SS) y uno negativo (OIEELISA_NSS). Deben revisarse las condiciones de estandarización de la FPA con estos Estándares.

- **Producción de células**

La cepa 99 de *Brucella abortus* (Weybridge) (S99) (véase la nota 1 al pie para la dirección) o la cepa 1119-3 (USDA) (S1119-3) de *B. abortus*² deben utilizarse siempre para la producción de antígeno para el diagnóstico. Es importante destacar que el antígeno preparado con una de estas cepas de *B. abortus* también se utiliza en las pruebas de detección de la infección por *B. melitensis* o *B. suis*. Las cepas deben ser completamente lisas y no autoaglutinables en solución salina con un 0,1% (p/v) de acriflavina. Tienen que ser cultivos puros y cumplir las propiedades de las cepas de *B. abortus* biovariedad 1 que no necesitan CO₂. Los cultivos de inóculo original deben propagarse para producir un lote de inóculo que debe cumplir las propiedades de estas cepas, y deben conservarse por liofilización o por congelación en nitrógeno líquido.

Para la producción de antígeno, el cultivo del inóculo se utiliza para sembrar varios tubos de agar inclinado con medio de infusión de patata que se incuban a 37°C durante 48 horas. Los medios sólidos SDA y TSA, a los cuales se puede añadir un 5% de suero equino o suero de ternero neonato y un 0,1% de extracto de levadura, son satisfactorios con tal de que se utilice un inóculo adecuado, como se ha recomendado anteriormente. Se comprueba la pureza del crecimiento, se resuspende la cepa en PBS estéril, pH 6,4, y se utiliza para sembrar capas de frascos Roux con medio sólido de infusión de patata o con glicerol-dextrosa. Estos se incuban luego a 37°C durante 72 horas con la superficie inoculada hacia abajo. La pureza del crecimiento se comprueba en cada frasco mediante la tinción de Gram, y los microorganismos se recogen añadiendo a cada frasco 50 – 60 ml de solución salina con fenol (con un 0,5% de fenol en una solución de cloruro sódico al 0,85%). Los frascos se agitan suavemente, se decanta la suspensión, y los microorganismos se inactivan por calentamiento a 80°C durante 90 minutos. Después de una prueba de viabilidad, el antígeno se conserva a 4°C.

Como alternativa, las células se pueden producir en medio líquido o por cultivo continuo en un fermentador (34), en un medio que contenga (por litro de agua destilada) D-glucosa (30 g), peptona de grado elevado (30 g), extracto de levadura (Difco) (10 g), fosfato de sodio (9 g) y ortofosfato monosódico (3,3 g). El pH inicial es 6,6 pero tiende a subir a 7,2 – 7,4 durante el crecimiento. Debe comprobarse la capacidad de los lotes de peptona y de extracto de levadura para producir un buen crecimiento sin formación de células anormales o disociadas. Durante el crecimiento se puede necesitar una aireación y agitación vigorosas y el ajuste del pH a 7,2 – 7,4 mediante la adición de HCl 0,1 M. El inóculo de siembra se prepara como se ha descrito anteriormente. El cultivo se incuba a 37 °C durante 48 horas. El cultivo continuo puede mantenerse más tiempo, pero se necesita más experiencia. Deben realizarse controles durante el proceso del crecimiento tanto en medios sólidos como líquidos para garantizar la pureza, un recuento de los microorganismos viables que sea suficiente y comprobar que no hay disociación a formas rugosas. Debe comprobarse que las células que vayan a ser utilizadas en la preparación de todos los antígenos sean puras y lisas en la fase de recogida.

El cultivo se recoge mediante centrifugación para precipitar los microorganismos, que se resuspenden en solución salina con fenol. Los microorganismos se inactivan por calentamiento a 80°C durante 90 minutos y se guardan a 4°C. Deben formar suspensiones estables en solución salina fisiológica sin evidencia alguna de autoaglutinación. Con las suspensiones se debe realizar una prueba de viabilidad sin que se evidencie crecimiento alguno después de una incubación de 10 días a 37°C. El volumen de las células concentradas (PCV) en las suspensiones inactivadas puede determinarse centrifugando volúmenes de 1 ml en tubos Wintrobe a 3.000 **g** durante 75 minutos.

a) Pruebas de antígeno tamponado de *Brucella* (Prueba prescrita para el comercio internacional)

- **Prueba del rosa de bengala**

1 Se pueden obtener en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la brucelosis de la Veterinary Laboratories Agency (VLA) Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, Reino Unido.

2 Se pueden obtener en los Laboratorios de los Servicios Veterinarios Nacionales (NVSL) del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA), 1800 Dayton Road, Ames, Iowa 50010, EE.UU.

Esta es una prueba sencilla de aglutinación puntual que utiliza antígeno coloreado con rosa de bengala y tamponado a pH bajo, normalmente 3,65 + 0,05 (52).

- **Producción de antígeno**

El antígeno para la RBT se prepara depositando células muertas de las cepas de *B. abortus* S99 o S1119-3, recogidas por centrifugación a 23.000 **g** durante 10 minutos a 4°C, y resuspendiéndolas uniformemente en una solución salina fenicada estéril (0,5%) a razón de 1 g por cada 22,5 ml. (Nota: si se utiliza carboximetilcelulosa sódica como agente sedimentador durante la preparación del concentrado celular, los residuos insolubles deben eliminarse antes de la tinción filtrando la suspensión por un prefiltro AMF-CUNO Zeta-plus [Tipo CPR 01A]). A cada 35 ml de esta suspensión se añade 1 ml de rosa de bengala al 1% (p/v) (CI N° 45440) en agua destilada estéril, y la mezcla se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se filtra a través de una gasa estéril y se centrifuga a 10.000 **g** para depositar las células teñidas, que a continuación se resuspenden uniformemente a razón de 1 g de células por 7 ml de diluyente (21,1 g de hidróxido de sodio disueltos en 353 ml de solución salina fenicada estéril más 95 ml de ácido láctico, que se ajusta a 1.056 ml con solución salina fenicada estéril). El color de esta suspensión debe ser un rosa intenso y el sobrenadante de una muestra centrifugada debe carecer de colorante; el pH debe ser 3,65 + 0,05. Después de la filtración a través de una gasa, la suspensión se filtra dos veces a través de un prefiltro de fibra de vidrio Sartorius N° 13430, se ajusta a un PCV de aproximadamente el 8%, dependiendo de la estandarización final frente a un suero calibrado contra el OIEISS, y se guarda a 4 °C en la oscuridad. El antígeno debe almacenarse siguiendo las recomendaciones de los fabricantes, pero normalmente no debe congelarse.

Cuando se utiliza en la prueba estándar, el antígeno para la RBT debe dar una reacción positiva clara con dilución 1/45 del OIEISS diluido en solución salina con fenol al 0,5%, pero no a una dilución de 1/55. También se aconseja comparar la reactividad de los lotes de los antígenos nuevos con los estandarizados previamente utilizando un juego de sueros definidos.

- **Procedimiento de la prueba**

- i) Se colocan las muestras de suero y el antígeno a temperatura ambiente (22 ± 4°C). Debe sacarse de la nevera solo el antígeno necesario para las pruebas del día.
- ii) Se colocan 25–30 µl de cada muestra de suero en una baldosa blanca, placa esmaltada o de plástico, o en una placa para hemaglutinación de la OMS.
- iii) Se agita bien el frasco de antígeno, pero suavemente, y se coloca el mismo volumen de antígeno próximo a cada gota de suero.
- iv) Inmediatamente después de añadir la última gota de antígeno en la placa, se mezclan cuidadosamente el suero y el antígeno (usando un porta limpio o una varilla de plástico para cada prueba) hasta producir una zona circular u oval de aproximadamente 2 cm de diámetro.
- v) La mezcla se agita suavemente durante 4 minutos a temperatura ambiente en un agitador circular o tridimensional (si la zona de reacción es oval o circular, respectivamente)
- vi) Se comprueba la aglutinación, justo a los 4 minutos. Cualquier reacción visible se considera positiva. Debe analizarse un suero control que dé una reacción positiva mínima antes de comenzar las pruebas de cada día para comprobar la sensibilidad de las condiciones de la prueba.

La RBT es muy sensible. Sin embargo, como toda prueba serológica, a veces puede originar una reacción positiva debido a vacunación con S19 o a reacciones serológicas positivas falsas (FPSR). Por tanto, las reacciones positivas deben confirmarse con estrategias confirmativas y/o complementarias (que incluyan tanto la realización de otras pruebas como la investigación epidemiológica). En ocasiones muy infrecuentes se producen falsos negativos, sobre todo debido a los fenómenos de prozona, y en ocasiones se pueden detectar diluyendo la muestra de suero o volviendo a analizarla después de 4–6 semanas. Sin embargo, la RBT parece adecuada como prueba para detectar rebaños infectados o para garantizar la ausencia de infección en rebaños libres de brucelosis.

- **Prueba de aglutinación tamponada en placa**

- **Producción de antígeno**

El antígeno para la BPAT se prepara a partir de la cepa S1119-3 de *B. abortus* siguiendo el procedimiento descrito por Angus & Barton (2).

Se requieren dos soluciones de colorante: verde brillante (2 g/100 ml) y cristal violeta (1 g/100 ml) de calidad garantizada disueltos en agua destilada. Una vez preparadas, las dos soluciones se almacenan por separado durante 24 horas, y luego se mezclan en volúmenes iguales en una botella opaca y se guardan en una nevera durante no menos de 6 meses antes de uso. La mezcla de colorantes solo puede utilizarse entre 6 y 12 meses después de su preparación inicial.

El diluyente tamponado se prepara disolviendo lentamente hidróxido de sodio (150 g) en 3 – 4 litros de solución salina estéril con fenol. A esta solución se añade ácido láctico (675 ml) y el volumen final se ajusta a 6 litros añadiendo solución salina estéril con fenol. El pH de la solución debe estar comprendido entre 3,63 y 3,67.

Las células concentradas de *B. abortus* S1119-3 se diluyen a una concentración de 250 g/litro en solución salina con fenol; se añaden 6 ml de colorante por litro de suspensión celular, y la mezcla se agita antes de ser filtrada por algodón absorbente estéril. Las células se centrifugan a 10.000 **g** a 4°C y las células concentradas se resuspenden a continuación a una concentración de 50 g/100 ml en diluyente tamponado (como se ha descrito anteriormente). La mezcla se agita vigorosamente durante 2 horas y después se diluye añadiendo 300 ml de diluyente tamponado por cada 100 ml de células resuspendidas (es decir, a una concentración final de 50 g de células concentradas/400 ml de diluyente tamponado). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 20 – 24 horas antes de que la concentración celular se ajuste al 11% (p/v) con diluyente tamponado. Esta suspensión se agita durante toda la noche antes de ser analizada. Pendiente de las pruebas de control final de calidad, el antígeno se guarda a 4°C hasta su utilización. El antígeno tiene un periodo de validez de 1 año y no se debe congelar.

El pH del antígeno tamponado en placa debe ser de $3,70 \pm 0,03$, y el pH de una mezcla de suero/antígeno a una proporción de 8:3 debe ser de $4,02 \pm 0,04$. La suspensión al 11% de células teñidas debe ser azul-verdosa. Cada lote de antígeno tamponado en placa debe comprobarse con al menos 10 sueros de reactividad débil, y los resultados deben compararse con uno o más lotes previos de antígeno. Si es posible, los lotes de antígeno deben compararse con el antígeno estándar preparado por el NVSL, USDA (ver nota 2 a pie de página para la dirección). Sin embargo, no se dispone de ningún procedimiento establecido de estandarización internacional para uso con el OIEISS.

• **Procedimiento de la prueba**

- i) Se colocan las muestras de suero y el antígeno a temperatura ambiente ($22 \pm 4^\circ\text{C}$); Debe sacarse de la nevera solo el antígeno necesario para las pruebas del día.
- ii) Se agita bien la muestra. Se colocan 80 μl de cada muestra de suero en una placa de vidrio marcada con cuadros de 4×4 cm.
- iii) Se agita bien la botella de antígeno, pero con suavidad, y se colocan 30 μl de antígeno cerca de cada gota de suero.
- iv) Inmediatamente después de añadir la última gota de antígeno a la placa, se mezclan completamente el suero y el antígeno (utilizando un vaso limpio o una varilla de plástico para cada prueba) hasta producir una zona circular de unos 3 cm de diámetro.
- v) Después de la mezcla inicial, la placa se mueve tres veces para asegurar la dispersión homogénea de los reactivos y se incuba 4 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- vi) Se extrae la placa y se mueve como antes, y se vuelve a incubar otros 4 minutos.
- vii) Se lee de inmediato la aglutinación una vez transcurridos 8 minutos. Cualquier reacción visible se considera positiva. Debe analizarse un suero control que dé una reacción positiva mínima antes de comenzar las pruebas de cada día para comprobar la sensibilidad de las condiciones de la prueba.

Como la RBT, esta prueba es muy sensible, especialmente para la detección de anticuerpos inducidos por la vacuna, y las muestras positivas deben volverse a analizar con pruebas confirmativas y/o complementarias. Pueden producirse falsos negativos, debidos por lo general a fenómenos de prozona, la cual puede eliminarse diluyendo el suero o volviendo a analizarlo después de cierto tiempo.

b) Prueba de la fijación del complemento (prueba prescrita para el comercio internacional)

La FC está ampliamente aplicada y aceptada como prueba confirmativa pese a la complejidad de su ejecución y a la necesidad de unas buenas instalaciones y de personal formado para titular y mantener los reactivos adecuadamente. Existen muchas variaciones de la FC, pero esta prueba se suele realizar de forma más cómoda en formato de microtitulación. Para la incubación de suero, antígeno y complemento, se puede utilizar la fijación en caliente o en frío: 37°C durante 30 minutos o 4°C durante 14 – 18 horas. Varios factores influyen en la elección del método: la actividad anticomplementaria de muestras de suero de baja calidad es más evidente con la fijación en frío, mientras que a 37°C aumenta la frecuencia e intensidad de las prozonas, y se deben probar varias diluciones para cada muestra.

Se han propuesto varios métodos para la FC en los que se utilizan diferentes concentraciones de eritrocitos de oveja (SRBC) frescos o conservados (normalmente se recomienda una suspensión al 2, 2,5 o 3%). Los SRBC están sensibilizados con un volumen igual de suero de conejo anti-SRBC diluido hasta contener varias veces (en general de dos a cinco) la concentración mínima necesaria para producir un 100% de lisis de SRBC en presencia de una solución titulada de complemento de cobaya. El último se titula independientemente (en presencia o ausencia de antígeno, según el método) para determinar la cantidad

de complemento necesaria para producir el 50% o el 100% de lisis de los SRBC sensibilizados por unidad de volumen de una suspensión estándar; estas se definen como la unidad hemolítica de complemento al 50% o al 100%/ dosis hemolítica mínima (C'H o MHD₅₀ o C'H o MHD₁₀₀), respectivamente. Se suele recomendar titular el complemento antes de cada serie de pruebas, siendo preferible un micrométodo para la determinación óptima de C'H₅₀. Normalmente se utilizan en la prueba 1,25 – 2 C'H₁₀₀ o 5–6 C'H₅₀.

El diluyente estándar para la FC es una solución salina tamponada con barbital (veronal). Se prepara con comprimidos comerciales; como alternativa, se puede preparar a partir de una solución madre de cloruro sódico (42,5 g), ácido barbitúrico (2,875 g), dietil barbiturato sódico (1,875 g), sulfato magnésico (1,018 g) y cloruro cálcico (0,147 g) en 1 litro de agua destilada, y se diluye antes de utilizarla añadiendo cuatro volúmenes de una solución de gelatina al 0,04%.

- **Producción de antígeno**

Existen numerosas variaciones de la prueba, pero sea cual sea el procedimiento debe emplearse un antígeno preparado a partir de una cepa lisa aprobada de *B. abortus*, como la S99 o la S1119-3, y que esté estandarizado frente al OIEISS. El antígeno para la FC puede prepararse mediante procedimientos especiales (1, 34), o bien deben utilizarse células enteras diluyendo la suspensión madre de modo que el PCV de la suspensión de antígeno concentrado para la FC sea aproximadamente del 2% antes de la estandarización frente al OIEISS. El antígeno debe estandarizarse para dar una fijación del 50% a una dilución 1/200 del OIEISS y debe mostrar también una fijación completa a diluciones más bajas de suero, porque una concentración demasiado baja (o demasiado alta) de antígeno puede no producir un 100% de fijación a diluciones de suero más bajas. Cuando son adecuadas dos diluciones de antígeno, debe escogerse la suspensión de antígeno más concentrada para evitar el fenómeno de prozona.

El aspecto del antígeno a una dilución de 1/10 debe ser el de una suspensión blanca, uniforme y densa, sin agregación visible ni formación de depósito después de incubar a 37°C durante 18 horas. No debe producir efectos anticomplementarios a la concentración de trabajo utilizada para la prueba. El antígeno se guarda a 4 °C y no debe congelarse.

- **Procedimiento de la prueba (ejemplo)**

Los sueros problema sin diluir y los estándares de trabajo adecuados se inactivan durante 30 minutos en un baño de agua a 60°C ± 2°C. Si previamente se han diluido a la mitad con una solución salina tamponada con veronal, se pueden inactivar a 58°C ± 2°C durante 50 minutos. En general, solo se analiza sistemáticamente una dilución del suero (generalmente a 1/4 o 1/5, dependiendo del procedimiento de CF escogido), pero se recomiendan diluciones seriadas a efectos de detectar la existencia de prozona.

Con el empleo de placas de microtitulación estándar de 96 pocillos de fondo redondeado (en U), la técnica se suele realizar del siguiente modo:

- i) En el pocillo de la primera, segunda y tercera filas, se colocan 25 µl de suero problema inactivado diluido. La primera fila es un control anticomplementario para cada suero. Se añaden a los pocillos de la primera fila 25 µl de tampón de FC (controles anticomplementarios) para compensar la falta de antígeno. A todos los otros pocillos se añaden 25 µl de tampón de FC excepto a los de la segunda fila. A continuación se hacen diluciones seriadas a la mitad transfiriendo volúmenes de 25 µl de suero de la tercera fila en adelante. Se descartan 25 µl de la mezcla resultante en la última fila.
- ii) A cada pocillo, excepto en la primera fila, se añaden 25 µl de antígeno, diluido a la concentración de trabajo.
- iii) Se añaden a cada pocillo volúmenes de 25 µl de complemento diluido hasta el número de unidades exigido.
- iv) Se establecen controles con diluyente solo, complemento + diluyente, antígeno + complemento + diluyente, que contengan en cada caso 75 µl de volumen total. En cada serie de pruebas debe analizarse un suero control que dé una reacción positiva mínima para comprobar la sensibilidad en las condiciones de la prueba.
- v) Las placas se incuban a 37°C durante 30 minutos o durante toda la noche a 4°C y se añade a cada pocillo un volumen de SRBC sensibilizados (25 o 50 µl dependiendo de la técnica). Las placas se reincuban a 37 °C durante 30 minutos.
- vi) Los resultados se leen después de centrifugar las placas a 1.000 **g** durante 10 minutos a 4°C o de dejarlas en reposo a 4°C durante 2–3 horas para permitir que sedimenten las células no lisadas. El grado de hemólisis se compara con los estándares que correspondan a una lisis del 0, 25, 50, 75 y 100% de lisis. La ausencia de actividad anticomplementaria se comprueba en la primera fila para cada suero.
- vii) Estandarización de los resultados de la CF:

Existe un sistema de unidades basado en el OIEISS. Este suero contiene 1000 UIFC (unidades internacionales de la prueba de fijación de complemento) por ml. Si este suero se analiza mediante un método determinado y origina un título de, por ejemplo, 200 (50% de hemólisis), entonces el factor de un suero problema analizado por el mismo método se deduce de la fórmula: $1000 \times 1/200 \times \text{título del suero problema} = \text{número de UIFC de anticuerpos en el suero problema por ml}$. El OIEISS contiene IgG específica; los sueros estándar nacionales también deben depender de este isotipo para su actividad específica de fijación de complemento. Surgen dificultades en la estandarización porque diferentes técnicas favorecen selectivamente la CF mediante diferentes isotipos de las inmunoglobulinas. Se recomienda que cualquier país que use la CF a escala nacional acuerde un método concreto entre los diversos laboratorios que realizan la prueba, para obtener el mismo nivel de sensibilidad. Para facilitar la comparación entre países, los resultados deben expresarse siempre en UIFC, calculadas en relación con las obtenidas en una titulación paralela con un suero estándar, que a su vez se puede calibrar frente al OIEISS.

viii) *Interpretación de los resultados*: Los sueros con un título equivalente a 20 UIFC/ml o más, se consideran positivos.

Este procedimiento es un ejemplo y se pueden escoger otros volúmenes y cantidades de reactivos con tal de que la prueba se calibre frente al OIEISS como se ha descrito anteriormente, y que los resultados se expresen en UIFC /ml.

La prueba de la CF suele ser muy específica. Sin embargo, como todas las pruebas serológicas, a veces da resultados positivos debido a vacunación con S19 o como consecuencia de la FPSR. En consecuencia, las reacciones positivas deben investigarse mediante estrategias confirmativas y/o complementarias. Las hembras que se han vacunado con *B. abortus* S19 entre los 3 y 6 meses se consideran generalmente positivas si los sueros dan una fijación positiva con un título de 30 o más UIFC/ml cuando los animales se diagnostican a una edad de 18 meses o superior.

c) **Enzimoimmunoanálisis (pruebas prescritas para el comercio internacional)**

- **ELISA indirecto**

Se han descrito muchas variaciones de ELISA indirecto (I-ELISA) utilizando diferentes preparaciones antigénicas, diversos conjugados de antiglobulinas con enzimas, y varios sustratos/cromógenos. Se dispone de varios I-ELISA comerciales en los que se utiliza célula entera, lipopolisacárido liso (sLPS) o el O-polisacárido (OPS) como antígenos que han sido validados en extensos ensayos de campo, y se utilizan mucho. A efectos de una armonización internacional, los laboratorios nacionales de referencia deben utilizar los tres Sueros Estándar de la OIE para ELISA con el fin de comprobar o calibrar el método de la prueba en cuestión.

La prueba debe calibrarse de modo que la densidad óptica (DO) del Suero Estándar de la OIE para ELISA fuertemente positivo represente un punto de la parte lineal de una curva típica de dosis-respuesta, justo por debajo de la meseta. El Suero Estándar débilmente positivo de la OIE para ELISA debe dar siempre una reacción positiva que esté situada en la parte lineal de la misma curva dosis-respuesta, justo por encima del umbral positivo/negativo. El suero negativo y el control de tampón deben originar reacciones que estén siempre por debajo del umbral positivo/negativo (96). Por último, debe establecerse el punto de corte de la prueba con técnicas adecuadas de validación (ver Capítulo 1.1.4. Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas).

El I-ELISA que utiliza sLPS u OPS como antígenos es muy sensible para la detección de anticuerpos anti *Brucella*, pero no permite resolver por completo el problema de diferenciación respecto a anticuerpos originados por la vacunación con S19.

El problema con las FPSR podría resolverse en parte llevando a cabo un I-ELISA utilizando LPS rugoso (rLPS) o antígenos del citosol. La mayor parte de las FPSR son resultado de la reacción cruzada con la porción del polisacárido OPS de la molécula sLPS; sin embargo, son menos frecuentes las reacciones cruzadas entre las regiones centrales del PLS (63, 64).

Para el I-ELISA de detección sistemática, deben utilizarse preparaciones ricas en sLPS u OPS como antígeno óptimo. Hay varios protocolos para preparar un antígeno adecuado.

En función de la disponibilidad y de las necesidades de rendimiento, se pueden emplear antiglobulinas mono o policlonales o proteína A/G conjugadas con enzimas. Un MAb específico para la cadena pesada de la IgG₁ bovina puede mejorar la especificidad aún a costa de perder sensibilidad, mientras que una proteína A o AG conjugada con enzimas puede proporcionar un reactivo útil para las pruebas con diferentes especies de mamíferos (55, 63).

El método analítico que se describe a continuación es un ejemplo que ha sido validado internacionalmente y utilizado por todo el mundo en proyectos de cooperación técnica e investigación científica con financiación internacional.

El tampón para antigenar es el carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, formado por bicarbonato de sodio (2,93 g) y carbonato de sodio (1,59 g) en 1 litro de agua (la azida sódica [0,20 g/litro] es opcional). El tampón de dilución del conjugado y de los sueros problema es PBS 0,01 M, pH 7,2, que contiene ortofosfato bisódico (1,4 g), fosfato monopotásico (0,20 g), cloruro sódico (8,50 g) y Tween 20 al 0,05% disuelto en 1 litro de agua destilada (PBST). Este tampón también se usa como tampón de lavado.

El conjugado utilizado en este ejemplo es un MAb específico para la cadena pesada de la IgG₁ conjugado a peroxidasa de rábano (HRPO). La solución base de sustrato es peróxido de hidrógeno al 3%. La solución base de cromógeno es 0,16 M de 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) en agua destilada. El tampón del sustrato es tampón citrato, pH 4,5, compuesto por citrato trisódico hidratado (7,6 g) y ácido cítrico (4,6 g) disueltos en 1 litro de agua destilada. La solución para detener la reacción enzimática es dodecil sulfato sodio (SDS) al 4%.

- **Producción de antígeno (ejemplo)**

El sLPS de *B. abortus* S1119-3 o S99 se extrae calentando 5 g de peso seco (o 50 g de peso húmedo) de células suspendidas a 66°C en 170 ml de agua destilada y añadiendo 190 ml de fenol al 90% (v/v) a 66°C. La mezcla se agita continuamente a 66 °C durante 15 minutos, se enfría y se centrifuga a 10.000 **g** durante 15 minutos a 4°C. El fenol parduzco de la capa inferior se extrae con una cánula larga y los restos celulares grandes pueden eliminarse por filtración (utilizando un filtro de papel Whatman N° 1) si es necesario.

El sLPS se precipita añadiendo 500 ml de metanol frío que contenga 5 ml de metanol saturado con acetato de sodio. Después de 2 horas de incubación a 4 °C, el precipitado se recoge por centrifugación a 10.000 **g** durante 10 minutos. El precipitado se agita con 80 ml de agua destilada durante 18 horas y se centrifuga a 10.000 **g** durante 10 minutos. La solución de sobrenadante se mantiene a 4°C. El precipitado se resuspende en 80 ml de agua destilada y se agita otras 2 horas a 4°C. El sobrenadante se recoge mediante centrifugación como antes y se mezcla con el sobrenadante recogido previamente.

A continuación, se añaden 8 g de ácido tricloroacético a los 160 ml del LPS crudo. Después de agitar durante 10 minutos, el precipitado se elimina por centrifugación y la solución traslúcida que constituye el sobrenadante se dializa frente a agua destilada (dos cambios de al menos 4000 ml cada uno) y luego se liofiliza.

El LPS liofilizado se pesa y se reconstituye a 1 mg/ml en tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6, y se sonica en un baño de hielo aplicando unos 6 vatios tres veces durante 1 minuto cada vez. A continuación, el LPS se liofiliza en fracciones de 1 ml y se guarda a temperatura ambiente.

- **Procedimiento de la prueba (ejemplo)**

- i) El sLPS liofilizado se reconstituye hasta 1 ml de agua destilada y se diluye a 1/1000 con tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6 (o a una dilución predeterminada por titulación frente al Suero Estándar de la OIE para ELISA). Para antigenar las microplacas, se añaden a todos los pocillos 100 µl de la solución de sLPS, se cubren las placas y se incuban durante 18 horas a 4°C. Después de la incubación, las placas se pueden usar o mantener selladas y congeladas a -20°C hasta un año. Las placas congeladas se descongelan antes de su uso sometiéndolas durante 30 – 45 minutos a 37°C.
- ii) El antígeno no unido se elimina lavando todos los pocillos de la microplaca cuatro veces con PBST. A los pocillos especificados se añaden 100 µl de suero diluido a 1/50 a 1/200 con PBST, pH 6,3, que contiene 7,5 mM de EDTA y 7,5 mM de ácido etiléntrico tetracético (EGTA) (PBST/EDTA), y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- iii) Se añaden a las placas los sueros problema y se analizan por separado o de dos en dos. Los controles, calibrados con Sueros Estándar de la OIE para ELISA, se disponen en pocillos duplicados e incluyen un suero control fuertemente positivo, otro débilmente positivo, un suero control negativo y un control del tampón.
- iv) El suero no unido se elimina lavando cuatro veces con PBST (no debe usarse PBS que contenga EDTA/EGTA con HRPO, ya que inactiva el enzima). A cada pocillo se añaden 100 µl de conjugado (MAb M23) específico para un epítipo de la cadena pesada de la IgG₁ bovina conjugado con HRPO y diluido en PBST (predeterminado por titulación) y las placas se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- v) El conjugado no unido se elimina con cuatro lavados. A cada pocillo se añaden 100 µl de sustrato/cromógeno (1,0 mM de H₂O₂ [100 µl/20 ml de tampón citrato] y 4 mM de ABTS [500 µl/ 20 ml de tampón citrato]), las placas se agitan durante 10 minutos y el color que aparece se valora en un

espectrofotómetro a 414 o 405 nm. Si se desea, se pueden añadir directamente a todos los pocillos 100 µl de SDS al 4% como agente de parada de la reacción.

- vi) Los pocillos control que contienen el suero fuertemente positivo se considera que son un 100% positivos y todos los datos se calculan a partir de estas lecturas de absorbancia (entre 1,000 y 1,800) empleando la ecuación:

Porcentaje de positividad (%P) = absorbancia (muestra problema)/absorbancia (control fuertemente positivo) × 100.

Con fines de estandarización y de investigación se encuentran disponibles el antígeno sLPS, pequeñas cantidades del MAb específico para la cadena pesada del la IgG₁ bovina, programas para la generación de datos empleando espectrofotómetros particulares y un protocolo estandarizado para la prueba I-ELISA³.

Utilizando este u otro I-ELISA similar calibrado contra los Sueros Estándar de la OIE para ELISA descritos anteriormente, la sensibilidad diagnóstica debe ser igual o superior a la de las pruebas BBAT (RBT/BPAT) en el análisis del ganado bovino infectado. Sin embargo, como todas las pruebas serológicas, puede dar resultados positivos debido a vacunación con S19 o como consecuencia de la FPSR. Las reacciones positivas deben estudiarse utilizando estrategias confirmativas y/o complementarias adecuadas, igual que para la FC.

- **ELISA de competición**

Se ha observado que el ELISA de competición (C-ELISA) en el que se emplea un MAb específico para uno de los epítomos del OPS de *Brucella* tiene mayor especificidad pero menor sensibilidad que el I-ELISA (47, 55, 60, 80, 89). Esto se lleva a cabo escogiendo un MAb que tenga mayor afinidad que el anticuerpo que presenta reacción cruzada. No obstante, se ha comprobado que el C-ELISA elimina algunas, aunque no todas, las reacciones (FPSR) debidas a bacterias con reacción cruzada (55, 57). El C-ELISA es también capaz de eliminar la mayoría de las reacciones debidas a los anticuerpos residuales que se producen como respuesta a la vacunación con S19. La elección del MAb y su singular especificidad y afinidad influirán de forma clara en el rendimiento diagnóstico de la prueba. Como en cualquier prueba basada en el MAb, para determinar su aceptación internacional y su utilización generalizadas también se debe tener en cuenta la disponibilidad general del MAb o del hibridoma.

Se han descrito algunas variaciones de C-ELISA, como antígenos preparados a partir de otras cepas lisas de *Brucella*. El C-ELISA también está disponible comercialmente. Algunos protocolos son menos sensibles que otros, y por tanto los resultados obtenidos mediante pruebas distintas no siempre son comparables. Con vistas a una unificación internacional, los laboratorios nacionales de referencia deben utilizar los tres Sueros Estándar de la OIE para el ELISA a fin de comprobar o calibrar el método analítico en cuestión.

La prueba debe calibrarse de tal modo que la densidad óptica del Suero Estándar de la OIE fuertemente positivo represente un punto en la parte lineal de una curva típica de dosis-respuesta justo por encima de la meseta (es decir, próximo a la máxima inhibición). El Suero Estándar de la OIE débilmente positivo para ELISA debe dar una reacción que caiga en la parte lineal de la misma curva de dosis-respuesta justo por encima del umbral positivo/negativo (es decir, inhibición moderada). El suero negativo y el control de tampón/MAb deben dar reacciones siempre menores que el umbral positivo/negativo (es decir, inhibición mínima). Además, el punto de corte debe establecerse en la población problema con técnicas de validación adecuadas (Capítulo 1.1.4. Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas).

El método analítico que se describe a continuación es un ejemplo de prueba que se ha validado internacionalmente y utilizado con a nivel mundial en proyectos de cooperación técnica y colaboración científica con financiación internacional.

Los sistemas de tampón son los mismos que los descritos para la prueba I-ELISA.

- **Producción de antígeno (ejemplo)**

El sLPS de la cepa S1119-3 de *B. abortus* se prepara y se utiliza como para el I-ELISA.

- **Procedimiento de la prueba**

- i) El sLPS liofilizado se reconstituye hasta 1 ml de agua destilada y se diluye a 1/1000 con tampón carbonato 0,05 M a pH 9,6. Para antigenizar las microplacas, se añaden a todos los pocillos 100 µl de la solución de LPS, se cubren las placas y se incuban durante 18 horas a 4°C. Después de la incubación, las placas se pueden usar o mantener selladas y congeladas a -20°C hasta 1 año. Las placas congeladas se descongelan antes de su uso sometiéndolas durante 30 – 45 minutos a 37°C.

3 Se puede obtener en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la Brucelosis, en el Animal Diseases Research Institute, 3851 Fallowfield Road, Nepean, Ontario K2H 8P9, Canadá.

- ii) El antígeno no unido se elimina lavando todos los pocillos cuatro veces con PBST. A cada pocillo se añaden 50 µl de MAb (M84 en este caso) adecuadamente diluido en PBST/EDTA e inmediatamente otros 50 µl de suero diluido a 1/10 en PBST/EDTA. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación, por lo menos durante los 3 minutos iniciales.
- iii) Se añaden a las placas los sueros problema y se analizan por separado o de dos en dos. Los controles, calibrados con Sueros Estándar de la OIE para ELISA, se disponen en pocillos duplicados e incluyen un suero control fuertemente positivo, otro débilmente positivo, un suero control negativo y un control del tampón.
- iv) El suero no unido y los MAb se eliminan lavando la placa de microtitulación cuatro veces con PBST. A cada pocillo se añaden 100 µl de suero comercial de cabra anti IgG de ratón (cadena H y L) conjugado con HRPO y diluido en PBST (predeterminado por titulación) y las placas se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- v) El conjugado no unido se elimina con cuatro lavados. A cada pocillo se añaden 100 µl de sustrato/cromógeno (1,0 mM de H₂O₂ y 4 mM de ABTS), se agitan las placas durante 10 minutos y el color desarrollado se evalúa con un espectrofotómetro a 414 o 405 nm. Si se desea, se pueden añadir directamente a todos los pocillos 100 µl de SDS al 4% como agente de parada de la reacción.
- vi) Los pocillos control que contienen el suero fuertemente positivo se considera que dan un 0% de inhibición y todos los datos se calculan a partir de estas lecturas de absorbancia (entre 1.000 y 1.800) empleando la siguiente ecuación:
$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = 100 - (\text{absorbancia [muestra problema]} / \text{absorbancia [control de tampón]} \times 100).$$

Con fines de estandarización y de investigación se encuentran disponibles el antígeno sLPS, pequeñas cantidades del MAb, programas para la generación de datos empleando espectrofotómetros particulares y un protocolo estandarizado para la prueba C-ELISA (ver dirección en nota 3 a pie de página).

Mediante este protocolo descrito para C-ELISA, u otro similar calibrado frente a los Sueros Estándar de la OIE para ELISA, la sensibilidad diagnóstica podría ser equivalente a las pruebas BBAT y el I-ELISA en pruebas con ganado bovino infectado (59, 60, 62). Sin embargo, como todas las pruebas serológicas, puede dar resultados positivos debido a vacunación con S19 o como consecuencia de la FPSR. Las reacciones positivas deben estudiarse utilizando estrategias confirmativas y/o complementarias adecuadas, igual que para la FC.

d) Prueba de polarización de la fluorescencia (prueba prescrita para el comercio internacional)

La FPA es una técnica sencilla para determinar la interacción antígeno/anticuerpo y puede realizarse en instalaciones de laboratorio o en el campo. Es una prueba homogénea que no requiere la separación de los compuestos analizados y que, por tanto, es muy rápida.

El mecanismo de la prueba se basa en la rotación aleatoria de las moléculas en solución. El tamaño molecular es el factor que más influye en la velocidad de rotación, con una relación de proporcionalidad inversa. Así, una molécula pequeña gira más deprisa que una grande. Si una molécula se marca con un fluorocromo, se puede determinar el tiempo de rotación por un ángulo de 68,5 °C midiendo la intensidad de la luz polarizada en planos verticales y horizontales. Una molécula grande emite más luz en un único plano (más polarizada) que una pequeña que gira más deprisa y emite luz más despolarizada.

En la mayoría de las FPA, se marca con un fluorocromo un antígeno de pequeño peso molecular, inferior a 50 kD, y se añade al suero u otro líquido problema en el que tenga que detectarse la presencia de anticuerpos. Si hay anticuerpos, la unión con el antígeno marcado provocará un descenso en su velocidad rotacional que puede medirse.

Para el diagnóstico de la brucelosis, se emplea como antígeno un fragmento de bajo peso molecular (de 22 kD de media) del OPS del sLPS de la cepa 1119-3 de *B. abortus* y se marca con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Este antígeno se añade a suero diluido o a sangre completa y 2 minutos (en el caso del suero) o 15 segundos (en el caso de la sangre) después de añadir el antígeno se obtiene una medida del contenido de anticuerpos mediante un analizador de la polarización de la fluorescencia (58, 62).

La FPA se puede realizar en tubos de vidrio o en formato de placa de 96 pocillos. El suero bovino se diluye a 1/10 en el caso de la prueba en placa o a 1/100 en el caso de la prueba en tubo; si se emplea sangre tratada con EDTA, la dilución para la prueba en tubo es de 1/50, y de 1/5 para la prueba en placa (la sangre tratada con heparina aumenta la variabilidad de la prueba). El diluyente utilizado es Tris 0,01 M (1,21 g) que contiene 0,15 M de cloruro sódico (8,5 g), 0,05% de Igepal CA630 (500 µl) (antes denominado NP40) y 10 mM de EDTA (3,73 g) por litro de agua destilada, pH 7,2 (tampón Tris). Después de mezclar, se obtiene una lectura inicial para determinar la dispersión de la luz con un analizador de polarización de fluorescencia (FPM). Se añade un antígeno titulado marcado adecuadamente (que por lo general origine una intensidad de 250.000 – 300.000), se mezcla y se obtiene con el FPM una segunda lectura a los 2 minutos en el caso

del suero y a los 15 segundos en el caso de la sangre. Una lectura superior al nivel del umbral establecido (en miliunidades de polarización, mP) indica una reacción positiva. Un nivel umbral típico es 90–100 mP, aunque la prueba debe calibrarse localmente contra un Suero Estándar de Referencia Internacional (los valores esperados no están confirmados). Deben incluirse controles de suero fuertemente positivo, débilmente positivo, y negativo, así como un suero de animal vacunado con S19.

- **Producción de antígeno (ejemplo)**

El OPS se prepara a partir de 5 g de peso seco (o 50 g de peso húmedo) de *B. abortus* S1119-3 añadiendo 400 ml de ácido acético al 2% (v/v), esterilizando en autoclave la suspensión durante 15 minutos a 121°C y eliminando los restos celulares mediante centrifugación a 10.000 **g** durante 10 minutos a 4°C. A continuación, la solución de sobrenadante se trata con 20 g de ácido tricloroacético para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos. El precipitado se elimina de nuevo mediante centrifugación a 10.000 **g** durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se dializa frente a un mínimo de 100 volúmenes de agua destilada y se liofiliza.

Se disuelven 3 mg de OPS en 0,6 ml de hidróxido de sodio 0,1 M (4 g NaOH/litro) y se incuban a 37 °C durante 1 hora. Después se añaden 0,3 ml de isómero 1 de FICT a una concentración de 100 mg/ml en dimetilsulfóxido y se incuban otra vez durante 1 hora a 37°C. El OPS conjugado se aplica a una columna de 1 × 10 cm de DEAE (dietilaminoetil) Sephadex A 25 equilibrada con tampón fosfato 0,01 M, pH 7,4. La primera fracción (después de 10 – 15 ml de elución con tampón) es verde fuerte, y después se cambia el tampón a fosfato 0,1 M, pH 7,4. Esto da lugar a la elución de 10 – 15 ml de tampón seguidos de 25 – 40 ml de material verde fluorescente. Este último material es el antígeno utilizado en la FPA. La preparación de antígeno se puede aumentar proporcionalmente.

La cantidad de antígeno utilizada por prueba se determina diluyendo el material antes obtenido hasta lograr una intensidad de fluorescencia de 250.000 – 300.000 utilizando el FPM.

El antígeno se guarda como un líquido durante varios años a 4°C en un frasco opaco o se puede liofilizar en frascos opacos.

Se puede disponer de pequeñas cantidades de antígeno marcado para la investigación y estandarización de procedimientos operativos relacionados con la obtención de antígeno y la realización de la FPA (para conocer la dirección, véase la nota 3 a pie de página).

- **Procedimiento de la prueba**

- i) Se añade 1 ml de tampón Tris a tubos de vidrio de borosilicato de 10 × 75 mm y después 10 µl de suero o 20 µl de sangre tratada con EDTA. Para el formato de 96 pocillos, se añaden 20 µl de suero a 180 µl de tampón. Es importante mezclar bien. Se obtiene una lectura en el FPM para determinar la dispersión de la luz.
- ii) Se añade al tubo un volumen de antígeno que corresponda a una intensidad total de fluorescencia de 250-300 × 10³ y se mezcla bien. Este volumen puede variar de un lote a otro, pero en general es de unos 10 µl. Se obtiene una segunda lectura en el FPM después de una incubación a temperatura ambiente de 2 minutos para suero y de 15 segundos para sangre tratada con EDTA.
- iii) Una lectura superior al umbral predeterminado indica una reacción positiva.
- iv) En cada lote de pruebas se incluye lo siguiente: un suero estándar fuertemente positivo, uno débilmente positivo y uno de trabajo negativo (calibrados contra los Sueros Estándar de la OIE para ELISA).

La sensibilidad y la especificidad diagnóstica de la FPA en la brucelosis bovina son casi idénticas a las de C-ELISA. La especificidad diagnóstica en ganado bovino recientemente vacunado con la cepa S19 supera el 99% (58). Sin embargo se desconoce en la actualidad la especificidad de la FPA en condiciones de FPSR. Como en otras pruebas serológicas, las reacciones positivas deben estudiarse mediante estrategias adecuadas confirmativas y/o complementarias. La FPA debe estandarizarse de modo que los sueros fuertemente positivos y débilmente positivos de la OIE den siempre resultados positivos. Además, en la población problema debe establecerse el punto de corte con técnicas de validación adecuadas (Capítulo 1.1.4. Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas).

3. Otras pruebas

a) Prueba cutánea de la brucelina

Una prueba inmunológica alternativa es la prueba cutánea de la brucelina, que puede utilizarse para el diagnóstico en rebaños no vacunados siempre que se utilice una preparación antigénica purificada (libre de LPS) y estandarizada (como la brucelina INRA).

La prueba cutánea de la brucelina tiene una especificidad muy elevada, de modo que los animales sin vacunar que son serológicamente negativos y reaccionan positivamente en la prueba de la brucelina deben considerarse animales infectados (70, 73). Además, los resultados de esta prueba pueden ayudar a interpretar reacciones serológicas que se consideran como FPSR debidas a una infección por bacterias que presentan una reacción cruzada, especialmente en áreas libres de brucelosis (20, 70, 73).

No todos los animales infectados reaccionan, por lo que esta no es recomendable como prueba única a efectos del comercio internacional.

Es esencial utilizar una preparación estandarizada y definida de brucelina que no contenga antígeno sLPS, ya que este puede producir reacciones inflamatorias inespecíficas o interferir con pruebas serológicas posteriores. Una preparación de ese tipo es la brucelina INRA preparada a partir de una cepa rugosa de *B. melitensis* que está comercializada⁴.

- **Procedimiento de la prueba**

- i) Se inyecta por vía intradérmica 0,1 ml de brucelina en el pliegue caudal, en la piel del flanco, o en la de un lado del cuello.
- ii) La prueba se lee después de 48–72 horas.
- iii) El grosor de la piel en el sitio de la inyección se mide con un calibrador Vernier antes de la inyección y en el momento de volver a examinar al animal.
- iv) Una reacción positiva fuerte se reconoce fácilmente porque es una hinchazón local con induración. No obstante, las reacciones dudosas requieren una interpretación cuidadosa. Un engrosamiento de la piel de 1,5 – 2 mm debe considerarse como una reacción positiva.

Aunque la prueba intradérmica de la brucelina es una de las más específicas de la brucelosis (en animales no vacunados) el diagnóstico no puede basarse solamente en reacciones intradérmicas positivas en unos cuantos animales del rebaño, sino en una prueba serológica fiable. La inoculación intradérmica de la brucelina puede originar una anergia temporal de la respuesta inmunitaria celular. Por tanto, en general se recomienda un intervalo de 6 semanas entre dos pruebas realizadas en el mismo animal.

b) Prueba de aglutinación del suero

Aunque no se considera una prueba obligada ni alternativa, la SAT se ha utilizado con eficacia durante muchos años en programas de vigilancia y control de la brucelosis bovina. Su especificidad mejora notablemente si se añade EDTA al antígeno (30, 45, 61).

El antígeno es una suspensión bacteriana en solución salina fenolada (NaCl al 0,85% [p/v] y fenol al 0,5% [v/v]). No debe usarse formaldehído. Los antígenos pueden presentarse en forma concentrada siempre que el factor de dilución a utilizar se indique en la etiqueta del frasco. Para reducir los falsos positivos se puede añadir EDTA a la suspensión antigénica a una concentración final en la prueba de 5 mM. En consecuencia, el pH de 7,2 debe reajustarse en la suspensión de antígeno.

El OIEISS contiene 1000 UI de aglutinación. El antígeno debe prepararse sin referencia a la concentración celular, pero su sensibilidad debe estandarizarse con relación al OIEISS de modo que el antígeno produzca el 50% de aglutinación con una dilución sérica final de 1/600 a 1/1000, o el 75% con una dilución sérica final de 1/500 a 1/750. También se aconseja comparar la reactividad de los lotes de los antígenos nuevos con los estandarizados previamente, utilizando un juego de sueros definidos.

La prueba se realiza en tubo o en microplaca. La mezcla de antígeno con las diluciones de suero debe incubarse 16 – 24 horas a 37 °C. Si la prueba se realiza en microplaca, el tiempo de incubación puede acortarse a 6 horas. Para cada suero debe prepararse un mínimo de tres diluciones para evitar respuestas negativas debidas a los fenómenos de prozona. La dilución de sueros sospechosos debe llevarse a cabo de modo que la lectura de la reacción al límite de la positividad se haga en un tubo medio (o pocillo en el método de microplaca).

Interpretación de los resultados: El grado de aglutinación de *Brucella* en un suero debe expresarse en UI por ml. Un suero con 30 UI o más, se considera positivo.

c) Pruebas basadas en el hapteno nativo y en la proteína del citosol

4 Brucellergène OCB®, Synbiotics Europe, 2 rue Alexander Fleming, 69007 Lyon, Francia.

Las pruebas basadas en el hapteno nativo⁵ son muy específicas en contextos de vacunación con S19, y se han utilizado con éxito en un programa de erradicación junto con la RBT como prueba de detección sistemática (3). La sensibilidad óptima (cercana a la de la CF pero inferior a la de la RBT y la del I-ELISA basado en la sLPS) se obtiene en un sistema de inmunodifusión radial inversa (RID) en el que el suero difunde hacia un gel hipertónico que contiene el polisacárido (21, 40). No obstante, el procedimiento de la doble difusión en gel también resulta útil (43, 44). Los terneros vacunados subcutáneamente con la dosis estándar de la cepa S19 a los 3–5 meses de edad son negativos a los 2 meses de la vacunación, y el ganado adulto vacunado subcutáneamente 4–5 meses antes con dosis reducida de la cepa S19 no da reacciones positivas a menos que resulten infectados y excreten la vacuna en la leche (40). La vacunación conjuntival (tanto en animales de corta edad como en adultos) reduce el tiempo de obtención de una respuesta negativa en las pruebas con hapteno nativo. Una característica notable de la prueba RID es que un resultado positivo se correlaciona con la excreción de *Brucella*, como se ha demostrado en ganado bovino infectado experimentalmente y en ganado bovino con infección natural sometido a tratamiento antibiótico (39). Se ha demostrado que las pruebas con precipitina o proteínas del citosol de *Brucella* también eliminan, en la mayoría de los casos, las reacciones FPSR causadas por *Yersinia enterocolitica* O:9 y las FPSR de origen desconocido (55).

d) Pruebas en la leche

Un medio eficaz de examinar los rebaños de vacas lecheras es analizar la leche de los tanques colectivos. Hay que recordar que en la última fase de la gestación, las vacas gestantes se secan y su leche no está incluida en la muestra del tanque colectivo. Por el contrario, será más probable que estos animales, en el caso de que estén infectados, den resultados positivos en las pruebas de diagnóstico serológico. Por tanto, inmediatamente después del parto debe volver a analizarse la leche del tanque colectivo. De estos tanques se puede obtener leche de forma más barata y frecuente que las muestras de sangre, y habitualmente están disponibles en las centrales lecheras. Cuando se obtiene un resultado positivo, deben realizarse análisis de sangre en todas las vacas que aportan leche. La prueba I-ELISA en leche es sensible y específica, y resulta particularmente útil para analizar grandes rebaños. La prueba del anillo de leche (MRT) es una alternativa adecuada cuando no se dispone de ELISA.

- **I-ELISA en leche**

Como ocurre en el caso del I-ELISA para suero, se utilizan numerosas variaciones del I-ELISA para leche. Se han comercializado varios I-ELISA que se han validado en grandes ensayos de campo y que se utilizan mucho. A efectos de una armonización internacional, los laboratorios nacionales de referencia deben utilizar los tres Sueros Estándar de la OIE para ELISA para comprobar o calibrar el método analítico en estudio. El I-ELISA debe estandarizarse de modo que el estándar fuertemente positivo de la OIE para ELISA diluido a 1/125 en suero negativo y diluido después a 1/10 en leche negativa dé siempre resultados positivos. Las muestras de leche de tanque colectivo se analizan generalmente a diluciones mucho más bajas que el suero, es decir, de 1/2 a 1/10 en tampón de dilución, y el resto de la prueba es similar a lo descrito para el suero. La prueba C-ELISA no debe utilizarse con leche completa pero puede usarse con muestras de suero lácteo.

- **Prueba del anillo de leche**

En los animales lactantes, la prueba del anillo de leche o MRT (siglas en inglés para 'milk ring test') puede utilizarse para el diagnóstico de la brucelosis en rebaños. En rebaños grandes (>100 terneros lactantes) la sensibilidad de la prueba tiene menos fiabilidad. La MRT puede ajustarse para compensar el factor de dilución de las muestras de leche de tanque colectivo procedentes de rebaños grandes. Las muestras se ajustan de acuerdo con la siguiente fórmula: con un tamaño del rebaño <150 animales se usa 1 ml de leche de tanque colectivo, de 150 – 450 animales, se usa una muestra de leche de 2 ml, y de 451 – 700 animales, se usa una muestra de leche de 3 ml. Pueden obtenerse falsos positivos en ganado bovino vacunados 4 meses antes de la prueba, en muestras de leche anormal (como el calostro) o en casos de mamitis. Por tanto, no se recomienda la utilización de esta prueba en explotaciones muy pequeñas, donde estos problemas presentan un mayor impacto en los resultados de la prueba.

- **Producción de antígeno**

El antígeno para MRT se prepara a partir de suspensiones concentradas de bacterias muertas de *B. abortus* S99 o S1119-3, cultivadas como se ha descrito con anterioridad. Se centrifugan, por ejemplo a 23.000 g, durante 10 minutos a 4°C y se resuspenden en una solución del colorante hematoxilina. Se emplean varios métodos satisfactorios; un ejemplo es el siguiente: se añaden 100 ml de hematoxilina al 4% (p/v) (CI N° 75290), disuelta en etanol al 95%, a una solución de sulfato amónico aluminico (5 g) en 100 ml de agua destilada y 48 ml de glicerol. A la solución se añaden 2 ml de yodato sódico al 10% (p/v) recién preparado. Después de 30 minutos de reposo a temperatura ambiente, la solución de color púrpura oscuro se añade a 940 ml de sulfato amónico aluminico al 10% (p/v) en agua destilada. El pH de la mezcla se

⁵ El procedimiento detallado se puede conseguir en el Laboratorio para la Brucelosis del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria/Gobierno de Aragón, Avenida Montañana 930, 50059 Zaragoza, España.

ajusta a 3,1 y la solución se deja envejecer manteniéndola a temperatura ambiente en la oscuridad durante 45 – 90 días.

La solución de colorante se agita antes de utilizarla y se filtra a través de una gasa. Las células concentradas se suspenden en la solución de colorante a razón de 1 g por cada 30 ml de colorante y se mantienen a temperatura ambiente durante 48 horas (en vez de esto, algunos laboratorios prefieren calentar a 80 °C durante 10 minutos). Las células teñidas se concentran por centrifugación y se lavan tres veces con una solución de cloruro sódico (6,4 g), ácido láctico al 85% (1,5 ml) e hidróxido de sodio al 10% (4,4 ml) en 1,6 litros de agua destilada, a pH final de 3,0. Las células lavadas se resuspenden a razón de 1 g en 27 ml de un diluyente que consiste en solución salina con fenol al 0,5%, ajustada a pH 4,0 por adición de ácido cítrico 0,1 M (aproximadamente 2,5 ml) y ortofosfato monosódico 0,5 M (aproximadamente 1 ml), y se mantiene a 4 °C durante 24 horas. La mezcla se filtra a través de una gasa, se comprueba el pH, y se determina el PCV ajustándolo aproximadamente al 4%.

La sensibilidad del lote nuevo debe compararse con la de un lote previamente estandarizado utilizando un juego de muestras de varios grados de reacción preparado diluyendo un suero positivo en leche. El antígeno debe estandarizarse frente al OIEISS de modo que una dilución a 1/500 sea positiva y una dilución a 1/1000 sea negativa. El antígeno debe almacenarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero generalmente debe guardarse a 4 °C.

El pH del antígeno debe estar entre 3,3 y 3,7 y su color debe ser azul oscuro. Se permite la existencia de un poco de colorante libre en el sobrenadante de una muestra centrifugada. Cuando se diluye en leche de un animal sin brucelosis, el antígeno debe producir una coloración uniforme de la capa de leche sin formar depósitos ni coloración en la capa cremosa.

• Procedimiento de la prueba

La prueba se lleva a cabo con las muestras del tanque colectivo de leche. Si es necesario, las muestras se pueden pretratar con un conservante (formalina al 0,1% o bronopol al 0,02%) durante 2 – 3 días a 4 °C antes de su utilización.

- i) Las muestras de leche y el antígeno se deben conservar a temperatura ambiente ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$). Debe sacarse de la nevera solo el antígeno necesario para las pruebas del día.
- ii) Se agita suavemente la botella de antígeno.
- iii) La prueba se lleva a cabo añadiendo 30–50 μl de antígeno en un volumen de 1–2 ml de leche completa (el volumen de leche puede aumentarse en el caso de las muestras de rebaños más grandes - véase más arriba la "prueba del anillo de leche").
- iv) La altura de la columna de leche en el tubo debe ser como mínimo de 25 mm. Las muestras de leche no deben haber sido congeladas, calentadas, sometidas a agitación violenta ni guardadas durante más de 72 horas.
- v) Normalmente, las mezclas de leche y antígeno se incuban a 37°C durante 1 hora junto con los estándares de trabajo positivos y negativos. Sin embargo, la incubación durante la noche a 4 °C aumenta la sensibilidad de la prueba y permite una interpretación más fácil.
- vi) Una reacción fuertemente positiva viene indicada por la formación de un anillo azul oscuro por encima de la columna blanca de leche. Cualquier capa azul en la interfase de leche y de crema debe considerarse como positiva y podría ser significativa, especialmente en el caso de rebaños grandes.
- vii) La prueba se considera negativa si el color de la leche, en la parte inferior, supera al de la capa cremosa.
- viii) Cuando se ajusta la MRT para aplicarla en rebaños de gran tamaño (utilizándose 2 o 3 ml de leche), se añaden 0,1 ml de una mezcla de nata negativa al tubo de ensayo y a continuación 30–50 μl del antígeno de la prueba del anillo. Después de mezclar, la prueba se incuba y se lee de la misma forma que para la MRT no ajustada. La mezcla de nata negativa se recoge mediante la separación de la leche compuesta por varias muestras y sin pasteurizar correspondiente a un rebaño de 25 o más vacas que sean negativas a la brucelosis.

e) Prueba del interferón gamma

A medida que disminuye la prevalencia de la brucelosis, aumenta la importancia de la precisión de las pruebas serológicas. Los falsos positivos conllevan estudios de trazabilidad y epidemiológicos que son caros y requieren mucho tiempo para su aplicación. De ahí que las pruebas que eliminen la FPSR serán cada vez más útiles. En general, la prueba del interferón gamma implica la estimulación de los linfocitos en sangre completa con un antígeno adecuado; en este caso, se ha demostrado que la brucelina da buenos resultados, y luego se mide la producción de interferón gamma resultante mediante un ELISA de captura

(41, 90, 91). Esta prueba podría ser útil en la discriminación de la FPSR pero se necesitan antígenos más específicos y el protocolo se tiene que estandarizar.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL BIOLÓGICO DE DIAGNÓSTICO

Como se ha mencionado anteriormente, la brucelosis es una de las infecciones de laboratorio más fáciles de contraer y deben tomarse estrictas medidas de seguridad. La manipulación en los laboratorios de cultivos vivos de *Brucella*, incluidas las cepas vacunales, es peligrosa y debe realizarse bajo un nivel 3 de contención o mayor, tal como se señala en el capítulo 1.1.2, a fin de minimizar la exposición durante el trabajo.

C1. Brucelina

La brucelina INRA es un extracto libre de LPS de la cepa B115 de *B. melitensis* en fase rugosa. Esta preparación no provoca la formación de anticuerpos reactivos en la BBAT, la CF ni el ELISA.

1. Manejo de inóculos

a) Características del inóculo

La producción de brucelina INRA se basa en un sistema de lotes de siembra como el descrito para los antígenos y las vacunas. El inóculo original de la cepa B115 de *B. melitensis* para producción de brucelina⁶ debe propagarse para producir un lote de siembra que debe conservarse mediante liofilización o congelación a temperatura de nitrógeno líquido. Debe presentar las propiedades de un cultivo puro de una cepa rugosa de *B. melitensis* y no producir LPS liso de *Brucella*. Debe producir cantidades razonables de una mezcla de antígenos proteicos reactivos frente a antiseros contra cepas rugosas y lisas de *Brucella*.

b) Método de cultivo (1)

La cepa B115 de *Brucella melitensis* crece mejor en el medio líquido descrito con anterioridad para el cultivo en fermentador. Puede crecer en fermentador por el método continuo o discontinuo, o en matraces colocados en un agitador. Debe comprobarse su pureza en cada recogida aislada, y los microorganismos deben encontrarse en la fase rugosa.

c) Validación como reactivo para el diagnóstico *in-vivo*

Estudios de laboratorio y de campo realizados en Francia, han confirmado que la brucelina INRA es segura, no tóxica y de acción específica. La preparación contiene un 50 – 75% de proteínas, principalmente de bajo peso molecular, y un 15 – 30% de carbohidratos. No contiene antígenos LPS. La brucelina INRA no provoca repuestas inflamatorias en animales no sensibilizados, y no es por sí misma un agente sensibilizante. No provoca anticuerpos reactivos en las pruebas serológicas estándar para brucelosis. Más del 90% de los pequeños rumiantes infectados por *B. melitensis* manifiestan una hipersensibilidad retardada a la brucelina INRA en alguna fase. La preparación no es recomendable como agente de diagnóstico para animales individuales, pero puede ser útil para el análisis de rebaños. Se suministra a los pequeños rumiantes en dosis de 100 µg por vía intradérmica que induce una reacción local de hipersensibilidad retardada que es visible a las 48 – 72 horas en animales sensibilizados. Tanto los animales vacunados como los infectados dan reacciones positivas (70, 73).

2. Método de producción (1)

Las células de la cepa B115 de *Brucella melitensis* se inactivan después del cultivo elevando la temperatura a 70°C durante 90 minutos, después se enfrían a 4°C, y se recogen por centrifugación a 9.000 *g* durante 15 minutos a 4°C. Las células se lavan con agua destilada estéril y fría y se deshidratan precipitándolas con tres volúmenes de acetona a –20 °C, y luego se dejan reposar a –20 °C durante 24 – 48 horas. Después de lavados repetidos con acetona fría y de un lavado final con dietil éter, las células se secan sobre cloruro de calcio y se mantienen a 4 °C. Las células secas se someten a una prueba de viabilidad. Se resuspenden en cloruro sódico estéril al 2,5% hasta una concentración final del 5% (p/v) y se agitan durante 3 días a 4 °C. Las células bacterianas se eliminan mediante centrifugación como se ha descrito con anterioridad, y el sobrenadante se concentra a un cuarto de su volumen mediante ultrafiltración con una membrana Diaflo PM10 (Amicon) y se precipita añadiendo tres volúmenes de etanol frío. La mezcla se mantiene a 4 °C durante 24 horas y el

6 Se puede obtener en el *Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie*, 37380 Nouzilly, Francia.

precipitado se recupera mediante centrifugación, se vuelve a disolver en agua destilada y se dializa para eliminar el etanol. Después de centrifugar a 105.000 **g** durante 6 horas a 4°C, el sobrenadante, que es la brucelina sin estandarizar, se determinan mediante análisis sus proteínas y carbohidratos. Puede liofilizarse en su totalidad o después de distribuirla en sus envases.

3. Control durante el proceso

Debe comprobarse la esterilidad del extracto crudo de brucelina después de su extracción con acetona para comprobar la inactivación de las células de *Brucella*, y una vez más al final del proceso, a fin de comprobar una posible contaminación. Deben determinarse el pH y la concentración de proteína, y realizarse pruebas de identidad en la totalidad del material obtenido antes de proceder al llenado de los envases.

4. Control del lote

a) Esterilidad

La esterilidad de las preparaciones de alérgenos debe comprobarse como se describe en el capítulo 1.1.9 Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en materiales biológicos.

b) Inocuidad

Las muestras de brucelina de los recipientes finales deben someterse a la prueba estándar de esterilidad. Las preparaciones de brucelina también deben someterse a pruebas de toxicidad anómala. Se inyectan intraperitonealmente dosis equivalentes a 20 dosis de ganado bovino (2 ml) en un par de cobayas normales que no se hayan expuesto con anterioridad a *Brucella* ni a sus antígenos. También se inyectan por vía subcutánea cinco ratones normales con 0,5 ml de la brucelina a examinar. Los animales se observan durante 7 días, y no debe haber reacción local ni generalizada a la inyección.

La capacidad dermonecrótica se examina mediante la inoculación intradérmica de 0,1 ml del producto en cuestión en el flanco previamente afeitado y desinfectado de tres cobayas albinos normales que no se hayan expuesto con anterioridad a *Brucella* ni a sus antígenos. No debe observarse reacción cutánea alguna. La ausencia de sensibilización alérgica o serológica se comprueba mediante la inoculación intradérmica de tres cobayas albinos normales, tres veces cada 5 días, con 0,1 ml de una dilución a 1/10 de la preparación que se está evaluando. Se suministra una cuarta inyección similar 15 días después a los mismos tres animales y a un lote control de tres cobayas del mismo peso que no se hayan inyectado previamente. Los animales no deben convertirse en seropositivos cuando se examinan 24 horas después de la última inyección en las pruebas estándar de brucelosis (RBT, FC) ni deben desarrollar respuestas de hipersensibilidad retardada.

c) Potencia

La potencia de las preparaciones de brucelina se determina mediante la inyección intradérmica de dosis graduales de brucelina en cobayas que se han sensibilizado con inoculación subcutánea de 0,5 ml de brucelina de referencia⁷ con adyuvante completo de Freund de 1 a 6 meses antes (la utilización de una cepa viva de *Brucella*, como la Rev1, es posible siempre que produzca el mismo nivel de sensibilización). Se determina y mide la reacción eritematosa a las 24 horas y se calcula el título por comparación con una brucelina de referencia⁸. Este método solo es válido para comparar preparaciones de brucelina obtenidas por el mismo protocolo que el alérgeno sensibilizante. Se ha descrito la estandarización inicial de un lote de alérgeno y la sensibilización y titulación en rumiantes (1).

d) Duración de la sensibilidad

La duración de la sensibilidad es dudosa. El grado de hipersensibilidad a la brucelina en los animales varía entre individuos de forma considerable. Los animales que se encuentran en la primera fase de la infección, o con infecciones crónicas, pueden no manifestar hipersensibilidad a la inyección intradérmica.

e) Estabilidad

La preparación liofilizada mantiene íntegramente su actividad durante varios años. La preparación comercial líquida debe mantener su potencia durante todo el periodo de validez recomendado.

7 El INRA-PII (F-37380 Nouzilly, France) ha producido una brucelina nacional francesa de referencia que se puede conseguir en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la Brucelosis, AFSSA, 23 avenue du Général-de-Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, Francia.

8 El procedimiento estadístico se puede obtener en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la Brucelosis, AFSSA, 23 avenue du Général-de-Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, Francia.

f) Conservantes

Cuando la preparación está liofilizada no se recomienda utilizar conservantes. En la forma líquida, se puede utilizar mertiolato de sodio como conservante (como máximo, 0,1 mg/ml). Si la preparación está liofilizada no debe reconstituirse hasta inmediatamente antes de su uso.

g) Precauciones (riesgos)

La brucelina no es tóxica. Sin embargo, puede provocar reacciones graves de hipersensibilidad en individuos sensibilizados que se exponen accidentalmente a ella. Debe tenerse cuidado en evitar la inyección accidental o la contaminación de las mucosas. El equipo de inyección utilizado y los recipientes deben descontaminarse cuidadosamente o eliminarse por incineración en contenedores adecuados de desechado.

5. Pruebas en el producto final

a) Inocuidad

La prueba de la esterilidad se debe llevar a cabo por el método recomendado. Las pruebas de inocuidad *in-vivo* son las descritas para el control de los lotes (véase el apartado C1.4.b.). Estas pruebas realizadas en el lote pueden omitirse si se realiza la prueba completa en los lotes finales de llenado.

b) Potencia

Se realiza por inyección de una única dosis en cobayas según el procedimiento descrito en el apartado C1.4.c.

C2. Vacunas

Vacuna con la cepa 19 de *Brucella abortus*

La vacuna más ampliamente utilizada para prevenir la brucelosis en el ganado bovino es la vacuna S19 de *B. abortus*, que continúa siendo la vacuna de referencia con la que se compara el resto de las vacunas. Se utiliza como una vacuna viva que por lo general se administra a terneras de entre 3 y 6 meses de edad en forma de una dosis única subcutánea de $5 - 8 \times 10^{10}$ microorganismos viables. Se puede administrar al ganado adulto una dosis reducida de 3×10^8 a 3×10^9 microorganismos, pero algunos animales generan títulos duraderos de anticuerpos y pueden abortar y excretar la cepa vacunal por la leche (81). Como alternativa, se puede administrar a ganado de cualquier edad en una o dos dosis de 5×10^9 microorganismos viables por vía conjuntival; esto produce protección sin una respuesta duradera de anticuerpos y reduce los riesgos de aborto y de la excreción en la leche cuando se vacuna ganado bovino adulto.

La vacuna con *B. abortus* S19 induce una buena inmunidad frente a desafíos moderados por microorganismos virulentos. La vacuna debe prepararse a partir de inóculos derivados del USDA (la dirección se indica en la nota 2 a pie de página) y en cada lote debe comprobarse la pureza (ausencia de microorganismos extraños), la viabilidad (bacterias vivas por dosis) y la homogeneidad (determinación de la fase de disociación). La virulencia residual y la inmunogenicidad de los lotes de inóculo para la producción de vacuna S19 deben comprobarse regularmente en ratones.

Los procedimientos de control para esta vacuna se indican más adelante.

Vacuna con la cepa RB51 de *Brucella abortus*

Desde 1996 la cepa RB51 de *B. abortus* es la vacuna oficial en muchos países para la prevención de la brucelosis en el ganado bovino (78). Sin embargo, la eficacia de la cepa RB51 en comparación con la protección inducida por la S19 en el ganado bovino, es motivo de controversia (53, 52, 81, 82, 84). Cada país utiliza métodos ligeramente diferentes de administrar la vacuna. En EE.UU. los terneros se vacunan por vía subcutánea entre los 4 y 12 meses con $1 - 3,4 \times 10^{10}$ microorganismos viables de la cepa RB51. La vacunación del ganado de más de 12 meses solo se lleva a cabo bajo autorización de organizaciones estatales o federales de Sanidad Animal y la dosis recomendada es de $1 - 3 \times 10^9$ microorganismos viables de la cepa RB51 (66, 83). En otros países se recomienda la vacunación de terneros (4 -12 meses) con dosis de $1 - 3,4 \times 10^{10}$, y la revacunación desde los 12 meses en adelante con una dosis similar para inducir un efecto de recuerdo y aumentar la inmunidad (74, 78).

Se ha observado que dosis completas de RB51, administradas por vía intravenosa a ganado bovino, inducen placentitis graves e infecciones placentarias en la mayor parte del ganado vacunado (68), y que se produce excreción con la leche en una parte importante de los animales vacunados. La experiencia de campo también indica que puede inducir aborto en algunos casos si se aplica a vacas gestantes. Debido a estas observaciones, debe evitarse la vacunación de las vacas gestantes. Una forma de reducir los efectos secundarios de la RB51 es reducir la dosis. Al reducir la dosis de la vacuna (1 x 10⁹ unidades formadoras de colonia [UFC]) en vacas que se encuentran al final de la gestación, no se observan abortos ni lesiones por placentitis en el ganado vacunado por vía subcutánea (69), pero la cepa vacunal puede excretarse en un porcentaje importante de los animales vacunados (81). Sin embargo, esta dosis reducida no protege contra *B. abortus* cuando se utiliza en terneros (66), mientras que sí protege cuando se utiliza en ganado adulto (67).

Debe destacarse que la RB51, así como la S19, pueden infectar al hombre y causar fiebre ondulante si no se trata (88, 94). Se han realizado pocos estudios con la RB51 en humanos, pero parece que el riesgo de padecer fiebre ondulante después de la exposición es bajo (4, 83, 88). El diagnóstico de la infección por RB51 requiere pruebas especiales que no están disponibles en la mayoría de los hospitales. Debería informarse a los facultativos que toman decisiones respecto al tratamiento profiláctico por una exposición accidental a la RB51 que la cepa de esta vacuna es muy resistente a la rifampicina, uno de los antibióticos de elección para el tratamiento de la brucelosis en los seres humanos.

Los procedimientos de control para esta vacuna se indican más adelante.

Vacuna con la cepa Rev.1 de *Brucella melitensis*

Es frecuente aislar *B. melitensis* en ganado bovino en países con una elevada prevalencia de esta infección en pequeños rumiantes (87). Ha habido cierto debate sobre la eficacia de la protección de la S19 contra la infección por *B. melitensis* en ganado bovino y se ha establecido la hipótesis de que la Rev.1 debe ser una vacuna más eficaz en estas condiciones. No obstante, hay muy poca información relacionada con este tema (39, 85). También se dispone de muy pocas evidencias de que la S19 sea capaz de controlar *B. melitensis* a nivel de campo (38). No se han realizado pruebas que muestren la eficacia de Rev.1 en la infección del ganado bovino por *B. melitensis*. Además, la seguridad de esta vacuna es prácticamente desconocida en este ganado. Hasta que se realicen estudios sobre la seguridad y la eficacia de Rev.1 contra *B. melitensis* en el ganado bovino en diferentes condiciones fisiológicas y en situaciones estrictamente controladas, esta vacuna no debe recomendarse para esta especie.

1. Manejo de inóculos

a) Características del inóculo

El inóculo primario de *B. abortus* S19 para producir vacunas debe obtenerse del USDA (la dirección se indica en la nota 2 a pie de página) y utilizarse para producir un lote de inóculos conservado por liofilización o por congelación a temperatura de nitrógeno líquido. Las propiedades de este lote de inóculos deben ser las de un cultivo puro de *B. abortus* biovariedad 1 no dependiente de CO₂, que sea sensible a la bencilpenicilina, azul de tionina e i-eritritol a las concentraciones recomendadas, y que tenga una patogenicidad mínima en cobayas.

El inóculo primario de *B. abortus* RB51 para la producción de vacuna está comercializado⁹. Estas empresas tienen derechos legales sobre la vacuna.

b) Método de cultivo

Brucella abortus S19 para la producción de vacuna se cultiva en un medio libre de suero y de otros productos de origen animal, en unas condiciones similares a las descritas anteriormente para *B. abortus* S99 o S1119-3 (1).

Para la cepa RB51 de *Brucella abortus* se siguen métodos similares de cultivo.

c) Validación como vacuna

Muchos estudios independientes han confirmado el valor de la cepa S19 como vacuna que protege al ganado bovino de la brucelosis. El microorganismo se comporta como una cepa atenuada cuando se administra a ganado sexualmente inmaduro. En casos raros puede producir una infección localizada en el tracto genital. Con animales adultos, es probable que se produzca una respuesta persistente de anticuerpos

9 Colorado Serum Company, 4950 York Street, P.O. Box 16428, Denver, Colorado 80216-0428, EE.UU.; o Veterinary Technologies Corporation, 1872 Pratt Drive, Suite 1100B, Blacksburg, Virginia 24060, EE.UU.

durante 6 meses o más en una proporción notable del ganado vacunado por vía subcutánea con la dosis estándar. Parte del ganado que es vacunado antes de llegar a la edad adulta puede desarrollar más tarde artropatía, en concreto en las articulaciones femorotibiales (8, 19). La vacuna es segura para la mayoría de los animales si se administra a terneros de entre 3 y 6 meses de edad. Puede utilizarse también en animales adultos con dosis reducida. Produce una inmunidad duradera para un desafío moderado con cepas virulentas de *B. abortus*, pero su duración exacta se desconoce. La duración de la protección frente a *B. melitensis* tampoco se conoce. La cepa vacunal es estable y su reversión a la forma virulenta es extremadamente infrecuente. Cuando se administra involuntariamente a animales gestantes se ha asociado a la aparición de cepas que utilizan i-eritritol. El microorganismo se comporta como una cepa atenuada en ratones, e incluso grandes inóculos son rápidamente eliminados de los tejidos.

Los informes tanto de estudios de desafío experimental como de campo siguen en debate en cuanto a la utilidad de la cepa RB51 de *B. abortus* para proteger al ganado bovino de la brucellosis (véase arriba). El microorganismo se atenúa en terneros pero no siempre en el ganado adulto. La cepa RB51 de *Brucella abortus* contiene un OPS expresado mínimamente y en animales vacunados no se observa seroconversión ni en la RBT ni en la FC. Además, también se ha observado que la RB51 no induce anticuerpos detectables, mediante los procedimientos de análisis actuales, frente al antígeno OPS (83). Sin embargo, la presencia de epítomos centrales comunes a las preparaciones antigénicas de sLPS y de OPS no permite diferenciar entre la respuesta a la RB51 y la respuesta a las cepas S, sea cual sea el I-ELISA utilizado (48). RB51 produce inmunidad contra un desafío moderado con cepas virulentas, pero la duración precisa de dicha inmunidad se desconoce. La vacuna es estable y no revierte de fase *in-vivo* ni *in-vitro*. El microorganismo se comporta como una cepa atenuada en varios tipos de animales, como en ratones, y desaparece rápidamente de los tejidos.

Las vacunas de cepas S19 y RB51 tienen cierta virulencia para el hombre, y pueden tener lugar infecciones si se produce la inoculación accidental de las mismas. Se debe tener cuidado en su preparación y manejo, y se debe incluir un aviso de riesgo en la etiqueta de los recipientes finales. En cualquier caso, las inoculaciones accidentales deben tratarse con los antibióticos adecuados (véase el apartado C2.4.g).

2. Método de producción

Para la producción de la vacuna S19 se pueden utilizar los procedimientos descritos anteriormente, excepto que las células se recogen en PBS, pH 6,3, y se depositan por centrifugación o añadiendo carboximetilcelulosa sódica a una concentración final de 1,5 g/litro. El producto obtenido de un fermentador o las células agrupadas de un lote de cultivos en frascos de Roux que se hayan inoculado al mismo tiempo y con el mismo lote de inóculo constituye una cosecha individual. Se puede juntar más de una cosecha para formar la masa final, que se utilizará para llenar los recipientes definitivos de un lote de vacuna. Antes de mezclarlas, en cada cosecha se ha de comprobar la pureza, la concentración celular, la disociación y la identidad. Deben realizarse las mismas pruebas en el producto final, que debe tener un número de microorganismos viables comprendido entre 8 y 24×10^9 UFC /ml. Los ajustes de concentración se llevan a cabo añadiendo PBS a la vacuna presentada en forma líquida, o un estabilizador a la forma liofilizada. Si se emplea un estabilizador debe tenerse en cuenta la pérdida de viabilidad en la liofilización, y no debe superar el 50%. El producto final desecado no debe someterse a temperaturas superiores a 35°C durante el secado, y el contenido en humedad residual debe ser del 1 – 2%. Los envases deben cerrarse al vacío o en nitrógeno seco inmediatamente después del secado, y han de mantenerse a 4°C .

El proceso de producción para la cepa RB51 de *B. abortus* es muy similar al utilizado para la cepa S19.

3. Control durante el proceso

Debe comprobarse la pureza y la fase lisa de la vacuna preparada con la cepa S19 de *Brucella abortus* durante la preparación de las cosechas individuales. La concentración celular del producto final también debe comprobarse. Esto se puede realizar mediante medición de la opacidad, pero debe llevarse a cabo un recuento de los microorganismos viables en los lotes de llenado final. También debe comprobarse su identidad mediante pruebas de aglutinación con antisuero contra el antígeno A de *Brucella*. La concentración de microorganismos viables en los recipientes finales no debe ser inferior a 50×10^9 por cada dosis estándar subcutánea (5×10^9 para la dosis conjuntival) después de la liofilización, si esta va a realizarse, y al menos el 95% de las células deben estar en la fase lisa.

Debe comprobarse la pureza y la fase lisa de la vacuna preparada con la cepa RB51 de *Brucella abortus* durante la preparación de las cosechas individuales. La concentración celular del producto final también debe comprobarse. En los lotes finales de llenado debe realizarse un recuento de los microorganismos viables. Su concentración en los recipientes finales debe ser de $1 - 3,4 \times 10^{10}$ UFC de RB51 por dosis (dosis de 2 ml aplicadas por vía subcutánea) y el 100% de las células deben estar en fase rugosa. Todas las colonias deben ser negativas en las pruebas de transferencia puntual con MAbs específicos del antígeno OPS.

4. Control del lote

a) Esterilidad

En el Capítulo 1.1.9 se detallan las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación de los materiales biológicos.

b) Inocuidad

La vacuna S19 es *per se* un producto virulento, aunque debe mantenerse con mínima virulencia para que sea eficaz (véase el apartado C2.4.c.). Sin embargo, no se realiza sistemáticamente una prueba de inocuidad. Si se desea, puede realizarse en ganado bovino cuando se inicia un nuevo proceso de fabricación o cuando se espera alguna modificación de la inocuidad de la vacuna. Este control debe realizarse como sigue: en la prueba se utilizan 12 terneras de 4 – 6 meses. Se inyectan seis hembras jóvenes con uno o tres volúmenes de la dosis recomendada. Cada lote de seis hembras jóvenes se mantiene separado. Los animales se observan durante 21 días. No deben producirse lesiones locales ni sistémicas significativas. Si para una dosis y una vía de administración dadas la prueba da buenos resultados para un lote representativo de la vacuna, no tiene que repetirse con lotes de inóculo o de vacuna preparados con el mismo inóculo original y con el mismo proceso de fabricación. Puede realizarse una prueba de inocuidad con la vacuna S19 también en cobayas. A grupos de 10 animales como mínimo se inyectan por vía intramuscular dosis de vacuna diluida en PBS, pH 7,2, que contengan 5×10^9 microorganismos viables. Estos animales no deben presentar efectos adversos evidentes y no debe haber mortalidad.

Si esta prueba de inocuidad ha dado buenos resultados con un lote de inóculo representativo o un lote de la vacuna que se está estudiando, no tiene que repetirse con otros lotes de inóculo ni de vacuna preparados con el mismo inóculo original y con el mismo proceso de fabricación.

Normalmente, no se realizan pruebas de inocuidad con la vacuna de la cepa RB51 de *B. abortus*. Si se desea, se pueden inyectar intraperitonealmente ratones Balb/c hembras de 8 – 10 semanas con 1×10^8 UFC y cultivarse los bazos a las 6 semanas post-inoculación. Los bazos deben estar libres de RB51 y los ratones no deben presentar anticuerpos anti-OPS.

c) Potencia

• Vacuna S19

Una vacuna S19 es eficaz si posee las características de la cepa original S19, es decir, si es satisfactoria respecto a su identidad, fase lisa, inmunogenicidad y virulencia residual (7). También debe comprobarse el número de microorganismos viables de los lotes.

• Identidad

La vacuna S19 reconstituida no debe contener microorganismos exógenos. La bacteria *B. abortus* presente en la vacuna se identifica por pruebas morfológicas, serológicas y bioquímicas adecuadas, y por cultivo: *B. abortus* S19 tiene las propiedades normales de una cepa de *B. abortus* biovariedad 1 pero no requiere CO₂ para crecer, ni crece en presencia de bencilpenicilina (3 µg/ml = 5 UI/ml), azul de tionina (2 µg/ml) ni i-eritritol (1 mg/ml) (concentraciones finales).

• Fase lisa (determinación de la fase de disociación)

La vacuna S19 reconstituida en agua destilada se siembra en estría en seis placas con medio sólido (agar suero-dextrosa o agar tripticasa-soja (TSA) con un 5% [v/v] de suero o un 0,1% [p/v] de extracto de levadura) de modo que las colonias estén juntas en algunas zonas mientras que en otras estén semiseparadas, y en otras, separadas. Las pequeñas diferencias son más obvias en las colonias adyacentes que en las que están muy separadas. Las placas se incuban a 37°C durante 5 días y se examinan mediante luz reflejada oblicua (método de Henry) antes y después de la tinción (tres placas) con cristal violeta (método de tinción de White & Wilson)

Aspecto de las colonias antes de la tinción: Las colonias de tipo S son redondas, brillantes y de color azul a verde-azulado. Las colonias R tienen un aspecto seco, granular y son de color blanco amarillento. Las colonias mucoides (M) son transparentes y grisáceas y pueden distinguirse por su consistencia pegajosa cuando se las toca con un asa de siembra. Las colonias intermedias (I) son las más difíciles de clasificar y tienen un aspecto intermedio entre las formas S y R: son ligeramente opacas y más granulares que las colonias S.

Aspecto de las colonias después de teñir con cristal violeta: Las colonias S no captan el colorante. Las colonias disociadas (I, M o R) se tiñen en varios tonos de rojizo a púrpura y su superficie puede

presentar grietas radiales. A veces se observa un film superficial teñido que se despega de una colonia disociada y aparece adyacente a ella.

La fase de la colonia puede confirmarse mediante la prueba de aglutinación con acriflavina (1). Las colonias S permanecen en suspensión, mientras que las R aglutinan rápidamente y, si son mucoides, forman hebras. Las colonias intermedias pueden quedar en suspensión o formar una aglutinación muy fina.

- **Determinación de bacterias vivas**

Se siembran al menos cinco placas de agar triptosa, de agar suero-dextrosa o de cualquier otro medio sólido adecuado con 0,1 ml de diluciones apropiadas de la vacuna, que se extienden con un asa de vidrio, metal o plástico. Se lleva a cabo un recuento de las UFC por unidad de volumen de la vacuna.

- **Virulencia residual (tiempo de persistencia al 50% o tiempo de recuperación al 50%) (7, 21, 33, 71)**

- i) Se preparan suspensiones adecuadas del lote de siembra o de vacuna de cepa S19 de *B. abortus* que se vaya a analizar (vacuna problema) y del cultivo original de inóculo de S19 (como cepa de referencia). Para esto, se recoge un cultivo de 24 – 48 horas de cada cepa en solución salina estéril tamponada (BSS: NaCl 8,5 g; KH_2PO_4 1.0 g; K_2HPO_4 2,0 g; 1000 ml de agua destilada; pH 6,8) y se ajusta la suspensión con BSS a 10^9 UFC /ml con un espectrofotómetro (OD = 0,170 cuando se lee a 600 nm). El número exacto de UFC /ml se determina después mediante la siembra en placa de las diluciones decimales sobre un medio adecuado (se recomienda agar sangre o TSA).
- ii) Se inyectan subcutáneamente 0,1 ml (10^8 UFC /ratón) de la suspensión de la vacuna problema en cada una de 32 hembras de ratón CD1 de entre 5 y 6 semanas. Simultáneamente, se realiza una inoculación similar en otros 32 ratones con la suspensión que contiene la cepa de referencia S19. La cepa S19 original de siembra, cuya inmunogenicidad y virulencia residual sean satisfactorias, se puede obtener del USDA (la dirección se indica en la nota 2 a pie de página).
- iii) A las 3, 6, 9 y 12 semanas, se sacrifican los ratones por dislocación cervical, en grupos de ocho elegidos al azar.
- iv) Se extraen los bazo y se homogeneizan aséptica e individualmente en 1 ml de BSS estéril con un desintegrador de vidrio (o con un Stomacher en bolsas estériles adecuadas).
- v) Se extiende en cada caso la suspensión del bazo entero *sobre* varias placas con un medio apropiado de cultivo y estas se incuban en condiciones estándar para *Brucella* durante 5 – 7 días (límite inferior de detección: 1 bacteria por bazo). Un animal se considera infectado cuando se aísla al menos 1 UFC del bazo.
- vi) Se calcula el tiempo de persistencia al 50% o el tiempo de recuperación al 50% (RT_{50}) por el método estadístico SAS[®], desarrollado específicamente para calcular el RT_{50} (para obtener el archivo SAS[®] específico, ver la dirección en la nota 5 a pie de página). Para ello, se determina el número de ratones curados (de los que no se haya aislado ninguna colonia del bazo) en cada momento de sacrificio (ocho ratones cada vez) y se calcula el porcentaje de ratones curados acumulados a lo largo del tiempo, por el método de Reed y Muench (descrito en la ref. 5). La función de distribución de este porcentaje describe una curva sigmoidea que debe linealizarse para calcular los valores RT_{50} , mediante el procedimiento computarizado PROBIT del paquete estadístico SAS[®].
- vii) Se compara estadísticamente el paralelismo (corte y pendiente) existente entre las líneas de distribución obtenidas para la cepa problema y para la cepa S19 de referencia, utilizando el SAS[®] diseñado para este fin. Se pueden comparar estadísticamente dos valores RT_{50} solo cuando derivan de líneas de distribución paralelas. Si no existe paralelismo, la virulencia residual de la cepa problema se considera inadecuada y debe rechazarse a efectos de la producción de vacuna.
- viii) Si se confirma el paralelismo, se comparan estadísticamente los valores RT_{50} obtenidos para la cepa problema y de referencia S19 utilizando el SAS[®] diseñado para este fin. Para ser aceptable para la producción de vacunas, el RT_{50} obtenido con la cepa problema no debe diferir significativamente del obtenido con la cepa de referencia S19 (el RT_{50} y los límites de confianza son normalmente $7,0 \pm 1,3$ semanas).

Las bases del procedimiento estadístico para el cálculo anterior de la virulencia residual se han descrito recientemente con detalle (5-7). Como alternativa, los cálculos estadísticos descritos en los pasos vi) a viii) se pueden evitar con un programa específico de fácil empleo, HTML-JAVA (Rev2), recientemente desarrollado y disponible sin coste alguno en la dirección: <http://www.afssa.fr/interne/Rev2.html> (71).

Si la prueba se realiza con buenos resultados en un lote representativo de inóculo o de vacuna problema, no tiene que repetirse sistemáticamente con otros lotes de vacuna preparados del mismo lote de inóculo y mediante el mismo proceso de producción.

- **Inmunogenicidad en ratones (5, 6)**

En esta prueba se utilizan tres grupos de seis ratones CD1 hembras, de 5 –7 semanas, que se eligen al azar.

- i) Se preparan y ajustan espectrofotométricamente las suspensiones de vacuna como se ha indicado anteriormente.
- ii) Se inyecta por vía subcutánea una suspensión de la vacuna en estudio (vacuna problema) que contenga 10^5 UFC (en un volumen de 0,1 ml/ratón) a cada uno de los seis ratones del primer grupo.
- iii) Se inyecta por vía subcutánea una suspensión de la vacuna de referencia S19 que contenga 10^5 UFC de bacterias vivas a cada uno de los seis ratones del segundo grupo. El tercer grupo sirve como grupo control sin vacunar y se inocula por vía subcutánea con 0,1 ml de BSS.
- iv) El número exacto de UFC inoculado se comprueba después por siembra en placa de diluciones decimales sobre un medio adecuado (se recomienda agar sangre o TSA).
- v) Un total de 30 días después de la vacunación (e inmediatamente después de 16 horas de ayuno) todos los ratones se someten a una inoculación intraperitoneal de desafío con una suspensión (0,1 ml/ratón) que contenga 2×10^5 UFC de la cepa 544 de *B. abortus* (dependiente de CO_2), preparada, ajustada y comprobada retrospectivamente como antes.
- vi) Se sacrifican los ratones 15 días más tarde por dislocación cervical.
- vii) Cada bazo se corta asépticamente, se le elimina la grasa, y se pesa y homogeniza. Como alternativa, los bazos pueden congelarse y mantenerse a $-20^\circ C$ de 24 horas a 7 semanas.
- viii) Cada bazo se homogeniza asépticamente con un desintegrador de vidrio (o con un Stomacher en bolsas estériles adecuadas) en nueve veces su peso de BSS, pH 6,8, y de cada homogenado se preparan tres diluciones decimales seriadas (1/10, 1/100 y 1/1000) en el mismo diluyente. Por cuadruplicado, se extienden 0,2 ml en placas con medio sólido y se incuban dos placas a $37^\circ C$ durante 5 días en atmósfera con un 10% de CO_2 (permite el crecimiento de la cepa vacunal y la de desafío) y otras dos placas en atmósfera normal (se inhibe el crecimiento de la cepa de desafío *B. abortus* 544, que es dependiente de CO_2).
- ix) Se cuentan las colonias de *Brucella* en las diluciones correspondientes a placas que contengan menos de 300 UFC. Cuando no se observan colonias en la placa de la dilución 1/10, se considera que el bazo está infectado con cinco bacterias. Este número de bacterias *Brucella* por bazo se anota como X y se expresa como Y, después de realizar la siguiente transformación: $Y = \log (X/\log X)$. A continuación, se calculan la media y la desviación estándar, que son la respuesta de cada grupo de seis ratones.
- x) Las condiciones de la prueba control son adecuadas cuando: i) la respuesta de los ratones no vacunados (media de Y) es por lo menos de 4,5; ii) la respuesta de los ratones vacunados con la vacuna S19 de referencia es menor de 2,5; y iii) la desviación estándar calculada en cada lote de seis ratones es inferior a 0,8.
- xi) Se realizan comparaciones estadísticas (se recomienda la prueba de diferencias menos significativas [LSD]) de los valores de inmunogenicidad obtenidos en los ratones vacunados con la cepa S19, que se analiza respecto a los obtenidos en los ratones vacunados con la vacuna de referencia y el grupo control no vacunado. La vacuna problema es apta si el valor de inmunogenicidad obtenido en ratones vacunados con esta vacuna es notablemente inferior al obtenido en los controles sin vacunar y si, además, no difiere significativamente del obtenido en ratones vacunados con la vacuna de referencia. (Para información detallada sobre este procedimiento, véase la nota 5 a pie de página con la dirección de contacto).

Si esta prueba se ha realizado con buenos resultados en un lote representativo de la vacuna problema, no tiene que repetirse sistemáticamente con otros lotes de vacuna preparados a partir del mismo lote de inóculo y mediante el mismo proceso de producción.

- **Vacuna RB51**

Como la dosificación (UFC) del inóculo primario se correlacionó con la protección como parte de la autorización de la RB51 para el ganado bovino en EE.UU., las pruebas de potencia *in vivo* no se aplican de forma sistemática para las series de vacunas con RB51. En EE.UU. se han aprobado y utilizado los recuentos de placas de microorganismos viables como método para medir la potencia (este enfoque es idéntico al utilizado en las pruebas de potencia para la vacuna con S19 en EE.UU.). Se ha propuesto una prueba con ratones Balb/c hembras utilizando 1×10^4 microorganismos de la cepa 2308 de *B. abortus* como cepa de desafío, pero la correlación de la prueba con la protección de la vacuna en el ganado bovino no

está completamente determinada. En EE.UU. se ha aprobado y utilizado la determinación en placa de microorganismos viables (82). Se ha discutido con bastante detalle sobre las vacunas rugosas para la brucellosis (53).

d) Duración de la inmunidad

Se considera que la vacunación de los terneros con una dosis completa de vacuna S19 confiere inmunidad duradera, y no se recomiendan dosis posteriores. No obstante, no se dispone de pruebas de ello y en las zonas endémicas podría ser aconsejable una revacunación.

La duración de la inmunidad inducida por la vacuna RB51 en ganado bovino se desconoce, sea cual sea la dosis aplicada y la edad de vacunación.

e) Estabilidad

La vacuna S19 de *B. abortus* preparada a partir de inóculos primarios de origen adecuado muestra unas características estables siempre que se cumplan los requisitos descritos anteriormente sobre el control durante el proceso y de los lotes, y no tiene tendencia a revertir a la virulenta. La vacuna liofilizada muestra una pérdida gradual de microorganismos viables, pero debe conservar su potencia hasta el final del período de validez recomendado. Normalmente, este fenómeno se permite si se garantiza que el recuento de microorganismos viables inmediatamente después de la liofilización supera claramente el mínimo exigido. El mantenimiento de la cadena de frío durante la distribución de la vacuna asegura su viabilidad.

La cepa RB51 de *B. abortus* no muestra tendencia a revertir a la fase lisa virulenta después de muchos pases *in vitro* o *in vivo*. Esto probablemente se debe al tipo y ubicación de las mutaciones halladas en esta cepa. La cepa RB51 de *Brucella abortus*, entre otras mutaciones desconocidas, tiene su gen *wboA* perturbado por un elemento IS711 que impide la síntesis de OPS. A pesar de ello, se ha observado que esta cepa acumula pequeñas cantidades de OPS tipo M citoplasmático (16).

f) Conservantes

No deben utilizarse conservantes antibióticos en vacunas vivas S19 ni en las preparadas con la cepa RB51 de *B. abortus*. Para la preparación de la vacuna liofilizada, se recomienda un estabilizador que contenga un 2,5% de digesto de caseína, como Tryptone (Oxoid), sacarosa al 5% y glutamato sódico al 1%, disuelto en agua destilada y esterilizado por filtración.

g) Precauciones (riesgos)

Aunque son cepas atenuadas, *Brucella abortus* S19 y RB51 siguen siendo capaces de causar enfermedad en el hombre. Según esto, los cultivos celulares y las suspensiones deben manejarse en condiciones apropiadas de contención para bioseguridad. La reconstitución y el posterior manejo de las vacunas ya reconstituidas deben hacerse con cuidado para evitar una inyección accidental o la contaminación de los ojos o la piel. Los residuos de vacuna y el equipo de inoculación deben descontaminarse con un desinfectante adecuado (de tipo fenólico, iodóforo o aldehído) a la concentración adecuada. En caso de exposición accidental debe buscarse atención médica. La eficacia del tratamiento antibiótico de las infecciones causadas por S19 y RB51 en seres humanos todavía no está del todo clara. Si tiene lugar una contaminación por S19, puede recomendarse un tratamiento combinado con doxiciclina más rifampicina. En el caso de una contaminación con RB51 (una cepa resistente a la rifampicina), el tratamiento con rifampicina debe evitarse y debe utilizarse una pauta de doxiciclina más estreptomomicina, excepto en mujeres embarazadas, que deberán tratarse con trimetoprim y sulfa-metoxazol.

5. Pruebas en el producto final

a) Inocuidad

Véase el apartado C2.4.b. Si esta prueba de inocuidad ha dado buenos resultados con un lote de inóculo representativo o un lote de la vacuna problema, no tiene que repetirse con otros lotes de inóculo o de vacuna preparados con el mismo inóculo original y con el mismo proceso de fabricación.

b) Potencia

En el producto final liofilizado también puede determinarse la potencia. El procedimiento es el mismo que el descrito anteriormente en el apartado C2.4.c. Si esta prueba de potencia ha dado buenos resultados con un lote de inóculo representativo o un lote de la vacuna problema, no tiene que repetirse con otros lotes de inóculo o de vacuna preparados con el mismo inóculo original y con el mismo proceso de fabricación.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D. & VERGER J.M. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
2. ANGUS R.D. & BARTON C.E. (1984). The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. *Dev. Biol. Stand.*, **56**, 349–356.
3. ASARTA A. (1989). Erradicación de la brucellosis en el ganado bovino de Navarra. *In: Actas del XII Congreso Nacional de Microbiología*. Sociedad Española de Microbiología (ed.), SEM, Pamplona, 371–371.
4. ASHFORD D.A., DI PIETRA J., LINGAPPA J., WOODS C., NOLL H., NEVILLE B., WEYANT R., BRAGG S.L., SPIEGEL R.A., TAPPERRRO J. & PERKINS B.A. (2004). Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, **22**, 3435–3439.
5. BONET-MAURY P., JUDE A. & SERVANT P. (1954). La mesure statistique de la virulence et l'immunité. Application á l'étude de la virulence du bacille typhique et á la mesure du pouvoir immunisant des vaccins antityphoidiques. *Rev. d'Immun. Th. Antimic.*, **18**, 21–49.
6. BOSSERAY N. (1992). Le vaccin Rev.1: dérive des caractères d'immunogénicité et de virulence indépendante des marqueurs classiques. *In: Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries*, Plommet M., ed. Pudoc Scientific, Wageningen, The Netherlands, 182–186.
7. BOSSERAY N. (1993). Control methods and thresholds of acceptability for anti-*Brucella* vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, **79**, 121–128.
8. BRACEWELL C.D. & CORBEL M.J. (1980). An association between arthritis and persistent serological reactions to *B. abortus* in cattle from apparently brucellosis-free herds. *Vet. Rec.*, **106**, 99.
9. BRICKER B.J. (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis, *Vet. Microbiol.*, **90**, 435–446.
10. BRICKER B.J., EWALT D.R. & HALLING S.M. (2003). *Brucella* 'HOOF-Prints' strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol.*, 11 June, **3**, 15.
11. BRICKER B.J., EWALT D.R., OLSEN S.C. & JENSEN A.E. (2003). Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 374–378.
12. BRICKER B.J. & HALLING S.M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2660–2666.
13. BRICKER B.J. & HALLING S.M. (1995). Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 1640–1642.
14. CLOECKAERT A., GRAYON M. & GREPINET O. (2002). Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the rpsL gene, *Vaccine*, **7**, 19–20.
15. CLOECKAERT A., VERGER J.M., GRAYON M., PAQUET J.Y., GARIN-BASTUJI B., FOSTER G. & GODFROID J. (2001). Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect.*, **3**, 29–38.
16. CLOECKAERT A., ZYGMUNT M. & GUILLOTEAU L. (2002). *Brucella abortus* vaccine strain RB51 produces low levels of M-lik O-antigen. *Vaccine*, **20**, 1820–1822.
17. CORBEL M.J., BRACEWELL C.D., THOMAS E.L. & GILL K.P.W. (1979). Techniques in the identification of *Brucella* species. *In: Identification Methods for Microbiologists*, Second Edition. Skinner F.A. & Lovelock D.W., eds. Academic Press, London, UK and New York, USA, 86–89.
18. CORBEL M.J. & HENDRY D.M.F.D. (1983). Methods for the identification of *Brucella*. Booklet 2085. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Lion House, Alnwick, Northumberland, UK.
19. CORBEL M.J., STUART F.A., BREWER R.A., JEFFREY M. & BRADLEY R. (1989). Arthropathy associated with *Brucella abortus* Strain 19 vaccination in cattle. 1. Examination of field cases. *Br. Vet. J.*, **145**, 337.
20. DE MASSIS F., GIOVANNINI A., DI EMIDIO B., RONCHI G.F., TITTARELLI M., DI VENTURA M., NANNINI D. & CAPORALE V. (2005). Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *Vet. Ital.*, **41** (4), 291–299.

21. DIAZ R., GARATEA P., JONES L.M. & MORIYON I. (1979). Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 37–41.
22. EWALT D.R. & BRICKER B.J. (2000). Validation of the abbreviated AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 3085–3086.
23. EWALT D.R. & BRICKER B.J. (2003). Identification and differentiation of *Brucella abortus* field and vaccine strains by BaSS-PCR. *In: Methods in Molecular Biology, Volume 216: PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols*, Saches K. & Frey J., eds. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 97–108.
24. EWALT D.R., PAYEUR J.B., RHYAN J.C. & GEER P.L. (1997). *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 417–420.
25. FARRELL I.D. (1974). The development of new selective medium for the Isolation of *Brucella abortus* from Contaminated Sources. *Res. Vet. Sci.*, **16**, 280–286.
26. FOSTER G., OSTERMAN B.S., GODFROID J., JACQUES I. & CLOECKAERT A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 2688–2693.
27. GALL D., NIELSEN K., FORBES L., COOK W., LECLAIR D., BALSEVICIUS S., KELLY L., SMITH P. & MALLORY M. (2001). Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. *J. Wildl. Dis.*, **37**, 110–118.
28. GALL D., NIELSEN K., FORBES L., DAVIS D., ELZER P., OLSEN S., BALSEVICIUS S., KELLY L., SMITH P., TAN S. & JOLY D. (2000). Validation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological tests for detection of serum antibody to *Brucella abortus* in bison. *J. Wildl. Dis.*, **36**, 469–476.
29. GARCIA-YOLDI D., MARIN C.M., De MIGUEL P.M., MUNOZ P.M., VIZMANOS J.L. & LOPEZ-GONI I. (2006) Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin. Chem.*, **52**, 779–781.
30. GARIN B., TRAP D. & GAUMONT R. (1985). Assessment of the EDTA seroagglutination test for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Rec.*, **117**, 444–445.
31. GODFROID J., SAEGERMAN C., WELLEMANS V., WALRAVENS K., LETESSON J.J., TIBOR A., McMILLAN A., SPENCER S., SANAA M., BAKKER D., POUILLON R. & GARIN-BASTUJI B. (2002). How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Vet. Microbiol.*, **90**, 461–477.
32. GOPAUL K.K., KOYLASS M.S., SMITH C.J. & WHATMORE A.M. (2008). Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiology*, **8**, 86.
33. GRILLO M.J., BOSSERAY N. & BLASCO J.M. (2000). *In vitro* markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial *Brucella melitensis* Rev.1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. *Biologicals*, **28**, 119–127.
34. HENDRY D.M.F.D., CORBEL M.J., BELL R.A. & STACK J.A. (1985). *Brucella* antigen production and standardisation. Booklet 2499. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Lion House, Alnwick, Northumberland, UK.
35. HINIĆ V., BRODARD I., THOMANN A., CVETNIĆ Z., FREY J. & ABRIL C. (2008). Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J. Microbiol. Methods*, **75**, 375–378.
36. INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION (2006). Dangerous Goods Regulations, 44th Edition. International Air Transport Association, 800 Place Victoria, P.O. Box 113; Montreal, Quebec H4Z 1M1, Canada, 815 pp.
37. JENSEN A.E., CHEVILLE N.F., THOEN C.O., MACMILLAN A.P. & MILLER W.G (1999). Genomic fingerprinting and development of a dendrogram for *Brucella* spp. isolated from seals, porpoises, and dolphins. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 152–157.
38. JIMENEZ de BAGUES M.P., MARIN C. & BLASCO J.M. (1991). Effect of antibiotic therapy and strain 19 vaccination on the spread of *Brucella melitensis* within an infected dairy herd. *Prev. Vet. Med.*, **11**, 17–24.

39. JOINT FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON BRUCELLOSIS (1986). Technical Report Series 740, Sixth Report. WHO, Geneva, Switzerland.
40. JONES L.M., BERMAN D.T., MORENO E., DEYOE B.L., GILSDORF M.J., HUBER J.D. & NICOLETTI P.L. (1980). Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, **12**, 753–760.
41. KITTELBERGER R., REICHEL M., JOYCE M. & STAAK C. (1997). Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9:III. Specificity of the *in vitro* antigen-specific gamma interferon test for bovine brucellosis diagnosis in experimentally *Yersinia enterocolitica* O:9 infected cattle. *Vet. Microbiol.*, **57**, 361–371.
42. LE FLÈCHE P., JACQUES I., GRAYON M., AL DAHOUK S., BOUCHON P., DENOEUDE F., NÖCKLER K., NEUBAUER H., GUILLOTEAU L.A. & VERGNAUD G. (2006). Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.*, **6**, 9.
43. LÓPEZ-GOÑI I., GARCÍA-YOLDI D., MARÍN C.M., DE MIGUEL M.J., MUÑOZ P.M., JACQUES I., GRAYON M., CLOECKAERT A., FERREIRA A.C., CARDOSO R., CORRÊA DE SÁ M.I., WALRAVENS K., ALBERT D. & GARIN-BASTUJI B. (2008). Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species and of the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 3484–3487.
44. LORD V.R. & CHERWONOGRODZKY J.W. (1992). Evaluation of polysaccharide, lipopolysaccharide, and beta-glucan antigens in gel immunodiffusion tests for brucellosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **53**, 389–391.
45. LORD V.R., ROLO M.R. & CHERWONOGRODZKY J.W. (1989). Evaluation of humoral immunity to *Brucella* sp in cattle by use of an agar-gel immunodiffusion test containing a polysaccharide antigen. *Am. J. Vet. Res.*, **50**, 1813–1816.
46. MACMILLAN A.P. & COCKREM D.S. (1985). Reduction of non-specific reactions to the *Brucella abortus* serum agglutination test by the addition of EDTA. *Res. Vet. Sci.*, **38**, 288–291.
47. MACMILLAN A.P., GREISER-WILKE I., MOENNIG V. & MATHIAS L.A. (1990). A competition enzyme immunoassay for brucellosis diagnosis. *Dtsch Tierarztl. Wochenschr.*, **97**, 83–85.
48. MAINAR-JAIME R.C., MARÍN C.M., DE MIGUEL M.J., MUÑOZ P.M. & BLASCO J.M. (2008). Experiences on the use of RB51 vaccine in Spain. Proceedings of the Brucellosis 2008 International Conference, Royal Holloway College, University of London, UK, 10–13 September 2008, p. 40.
49. MARIN C.M., ALABART J.L. & BLASCO J.M. (1996). Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 426–428.
50. MICHAUX-CHARACHON S., BOURG G., JUMAS-BILAK E., GUIGUE-TALET P., ALLARDET-SERVENT A., O'CALLAHAN D. & RAMUZ M. (1997). Genome structure and phylogeny in genus *Brucella*. *J. Bacteriol.*, **179**, 3244–3249.
51. MORENO E., CLOECKAERT A. & MORIYON I. (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.*, **90**, 209–227.
52. MORGAN W.J.B., MACKINNON D.J., LAWSON J.R. & CULLEN G.A. (1969). The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet. Rec.*, **85**, 636–641.
53. MORIYON I. (2002). Rough vaccines in animal brucellosis. *In*: Proceedings of the CIHEAM Advanced Seminar – Human and Animal Brucellosis, Pamplona, Spain, 16–20 September 2002.
54. MORIYON I., GRILLO M.J., MONREAL D., GONZALEZ D., MARIN C.M., LOPEZ-GONI I., MAINAR-JAIME R.C., MORENO E. & BLASCO J.M. (2004). Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.*, **35**, 1–38.
55. MUNOZ P., MARIN C., MONREAL D., GONZALES D., GARIN-BASTUJI B., DIAZ R., MAINAR-JAIME R., MORIYON I. & BLASCO J. (2005). Efficacy of several serological tests and antigens for the diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 141–151.
56. NICOLETTI P. (1992). An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Trop. Anim. Health Prod.*, **24**, 40–44.
57. NIELSEN K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, **90**, 447–459.

58. NIELSEN K., GALL D., JOLLEY M., LEISHMAN G., BALSEVICIUS S., SMITH P., NICOLETTI P. & THOMAS F. (1996). A homogenous fluorescence polarisation assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J. Immunol. Methods*, **195**, 161–168.
59. NIELSEN K., KELLY L., GALL D., BALSEVICIUS S., BOSSE J., NICOLETTI P. & KELLY W. (1996). Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Prev. Vet. Med.*, **26**, 17–32.
60. NIELSEN K., KELLY L., GALL D., NICOLETTI P. & KELLY W. (1995). Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **46**, 285–291.
61. NIELSEN K., SAMAGH B.S., SPECKMANN G. & STEMSHORN B. (1979). The bovine immune response to *Brucella abortus*. II. Elimination of some sporadic serological reactions by chelation of divalent cations. *Can. J. Comp. Med.*, **43**, 420–425.
62. NIELSEN K., SMITH P., YU W., NICOLETTI P., ELZER P., ROBLES C., BERMUDEZ R., RENTERIA T., MORENO F., RUIZ A., MASSENGILL C., MUENKS Q., JURGERSEN G., TOLLERSRUD T., SAMARTINO L., CONDE S., FORBES L., PEREZ B., ROJAS X. & MINOS A. (2005). Towards a single screening test for brucellosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 1027–1038.
63. NIELSEN K., SMITH P., YU W., NICOLETTI P., ELZER P., VIGLIOCCO A., SILVA P., BERMUDEZ R., RENTERIA T., MORENO F., RUIZ A., MASSENGILL C., MUENKS Q., KENNY K., TOLLERSRUD T., SAMARTINO L., CONDE S., DRAGHI DE BENITEZ G., GALL D., PEREZ B. & ROJAS X. (2004). Enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis: chimeric protein A-protein G as a common enzyme labelled detection reagent for sera of different animal species *Vet. Microbiol.*, **101**, 123–129.
64. NIELSEN K., SMITH P., YU W., NICOLETTI P., JURGERSEN G., STACK J. & GODFROID J. (2006). Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* sp. and *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **109**, 69–78.
65. OCAMPO-SOSA A.A., AGÜERO-BALBÍN J. & GARCÍA-LOBO J.M. (2005). Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet. Microbiol.*, **110**, 41–51.
66. OLSEN S.C. (2000). Immune responses and efficacy after administration of commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. *Vet. Therapeutics*, **3**, 183–191.
67. OLSEN S.C. (2002). Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* Strain RB51. *Res. Vet. Sci.*, **59**, 135–140.
68. PALMER M., CHEVILLE N & JENSEN A (1996). Experimental infection of pregnant cattle with vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: Pathologic, bacteriologic and serologic findings. *Vet. Pathol.*, **33**, 682–691.
69. PALMER M.V., OLSEN S.C. & CHEVILLE N.F. (1997). Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 472–477.
70. POUILLOT R., GARIN-BASTUJI B., GERBIER G., COCHE Y., CAU C., DUFOUR B. & MOUTOU F. (1997). The brucellin skin test as a tool to differentiate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Vet. Res.*, **28**, 365–374.
71. POUILLOT R., GRILLO M.J., ALABART J.L., GARIN-BASTUJI B. & BLASCO J.M. (2004). Statistical procedures for calculating the residual virulence of *Brucella abortus* strain 19 (S19) and *Brucella melitensis* strain Rev.1 vaccines in mice: theoretical basis and practical applications. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **22** (3), 1051–1063.
72. ROOP II, R.M., PRESTON-MOORE D., BAGCHI T. & SCHURIG G.G. (1987). Rapid Identification of smooth *Brucella* species with a monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 2090–2093.
73. SAERGERMAN C., VO T.-K.O., DE WAELE L., GILSON D., BASTIN A., DUBRAY G., FLANAGAN P., LIMET J.N., LETESSON J.J. & GODFROID J. (1999). Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. *Vet. Rec.*, **145**, 214–218.
74. SAMARTINO L.E, FORT M., GREGORET R. & SCHURIG G.G. (2000) Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, **45**, 193–199.
75. SANGARI F.J., GARCIA-LOBO J.M. & AGUERO J. (1994). The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **121**, 337–342.

76. SCHOLZ H.C., HUBALEK Z., NESVADBOVA J., TOMASO H., VERGNAUD G., LE FLÈCHE P., WHATMORE A.M., AL DAHOUK S., KRÜGER M., LODRI C. & PFEFFER M. (2008). Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerg. Infect. Dis.*, **14** (8), 1316–1317.
77. SCHOLZ H.C., HUBALEK Z., SEDLACEK I., VERGNAUD G., TOMASO H., AL DAHOUK S., MELZER F., KÄMPFER P., NEUBAUER H., CLOECKAERT A., MAQUART M., ZYGMUNT M.S., WHATMORE A.M., FALSEN E., BAHN P., GÖLLNER C., PFEFFER M., HUBER B., BUSSE H-J. & NÖCKLER K. (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58** (2), 375–382.
78. SCHURIG G.G., SRIRANGANATHAN N. & CORBEL M.J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future, *Veterinary microbiology*, **90**, 479–496.
79. SCOTT J.C., KOYLASS M.S., STUBBERFIELD M.R. & WHATMORE A.M. (2007). Multiplex assay based on single-nucleotide polymorphisms for rapid identification of *Brucella* isolates at the species level. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73** (22), 7331–7337.
80. STACK J.A., PERRETT L.L., BREW S.D., MACMILLAN A.P. (1999). C-ELISA for bovine brucellosis suitable for testing poor quality samples. *Vet. Record*, **145**, 735–736.
81. STEVENS M.G., HENNAGER S.G., OLSEN S.C. & CHEVILLE N.F. (1994). Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1065–1066.
82. STEVENS M.G., OLSEN S.C., PUGH G.W. & BREES D. (1995). Comparison of immune responses and resistance to brucellosis in mice vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *Infect. Immun.*, **63**, 264–270.
83. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICES (APHIS) (2003). Availability of an Environmental Assessment for Licensing of *Brucella abortus* Vaccine, Strain RB-51, Live Culture. *Federal Register*, 18 Feb 2003, **68** (32), 7761.
84. UZAL F., SAMARTINO L., SCHURIG G., CARRASCO A., NIELSEN K., CABRERA R. & TADDEO H. (2000). Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle. *Vet. Res. Comm.*, **24**, 143–151.
85. VAN DRIMMELEN G. & HORWELL F. (1964). Preliminary findings with the use of *Brucella melitensis* strain Rev 1 as a vaccine against brucellosis in cattle. *OIE Bull.*, **62**, 987.
86. VEMULAPALLI R., MCQUISTON J.R., SCHURIG G.G., SRIRANGANATHAN N., HALLING S.M. & BOYLE S.M. (1999). Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 760–764.
87. VERGER J.M. (1985). *B. melitensis* infection in cattle. In: *Brucella melitensis*, Plommet & Verger, eds. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht-Boston-Lancaster. 197–203.
88. VILLARROEL M., GRELL M. & SAENZ. R. (2000). Reporte de primer caso humano de aislamiento y tipificación de *Brucella abortus* RB51. *Arch. Med. Vet.*, **32**, 89–91.
89. WEYNANTS V., GILSON D., CLOECKAERT A., TIBOR A., DENOEL P.A., GODFROID F., LIMET J.N. & LETESSON J.J. (1997). Characterization of smooth-lipopolysaccharide and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, **65**, 1939–1943.
90. WEYNANTS V., GODFROID J., LIMBOURG B., SAEGERMAN C. & LETESSON J. (1995). Specific bovine brucellosis diagnosis based on in vitro specific gamma interferon production. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 706–712.
91. WEYNANTS V., WALRAVENS K., DIDEMBURGH C., FLANAGAN P., GODFROID J. & LETESSON J. (1998). Quantitative assessment by flow cytometry of T-lymphocytes producing antigen-specific gamma interferon in *Brucella* immune cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **66**, 309–320.
92. WHATMORE A.M., PERRETT L.L. & MACMILLAN A.P. (2007). Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiology*, **7**, 34.
93. WHATMORE A.M. SHANKSTER S.J., PERRETT L.L., MURPHY T.J., BREW S.D., THIRLWALL R.E. CUTLER S.J. & MACMILLAN A.P. (2006). Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.*, **44** (6), 1982–1993.
94. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2004). WHO Laboratory Biosafety Manual, Third Edition. WHO, Geneva, Switzerland.

95. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2005). Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances., WHO, Geneva, Switzerland,
http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2005_22r%20.pdf
96. WRIGHT P.F., NILSSON E., VAN ROOIJ E.M.A., LELENTA M. & JEGGO M.H. (1993). Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12**, 435–450.
97. WRIGHT P.F., TOUNKARA K., LELENTA M. & JEGGO M.H. (1997). International reference Standards: antibody standards for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Rev. Sci. Tech.*, **3**, 824–832.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la brucelosis bovina (en la Tabla del final de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE, www.oie.int, puede consultarse la lista actualizada).