



MANUAL DE PROCEDIMIENTO

Diagnóstico serológico de brucellosis

(B. abortus, B. melitensis, B. suis)

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa)

Edición 2025



senasa



El **Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria** es un organismo descentralizado, responsable de ejecutar las políticas nacionales en materia de sanidad y calidad animal, vegetal y de la inocuidad de los alimentos de su competencia, así como de verificar el cumplimiento de la normativa vigente en la materia.

Equipos de trabajo

Coordinación de Bacteriología

Dirección de Laboratorio Animal

Dirección General de Laboratorios y Control Técnico

Coordinación General de Comunicación Institucional

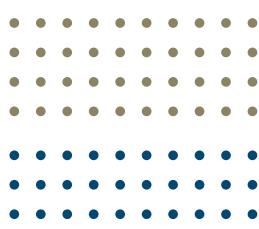
Edición 2025



Índice

| | |
|--|----|
| Introducción | 6 |
| Objetivos | 6 |
| Abreviaturas y definiciones | 6 |
| Medidas generales de bioseguridad y seguridad en el laboratorio | 7 |
| Principios de bioseguridad | 7 |
| Prácticas operativas seguras y hábitos personales | 8 |
| Limpieza y desinfección del laboratorio | 10 |
| Eliminación de residuos peligrosos (patológicos/químicos) | 10 |
| Aseguramiento de la calidad en el laboratorio | 10 |
| Control de calidad de insumos | 11 |
| Equipos | 13 |
| Sobre la enfermedad | 13 |
| Descripción de la enfermedad | 14 |
| Infección por Brucella en ganado bovino | 14 |
| Infección por Brucella en ovejas y cabras | 15 |
| Infección por Brucella en cerdos | 15 |
| Infección por Brucella en otras especies: domésticas, salvajes en cautiverio o en libertad | 16 |
| Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad | 17 |
| Técnicas de diagnóstico | 18 |
| Pruebas serológicas | 18 |
| Procedimientos de trabajo para el diagnóstico de brucelosis en el laboratorio de red | 20 |





| | |
|--|----|
| Registro de entrada de muestras | 20 |
| Características y condiciones de las muestras | 21 |
| Condiciones de recepción de las muestras | 21 |
| Condiciones de rechazo o demora del procesamiento de las muestras | 21 |
| Informes de resultados | 22 |
| Pruebas screening con antígeno tamponado en placa (BPAT y RBT) para la detección de anticuerpos contra <i>Brucella spp</i> | 23 |
| Desarrollo | 23 |
| Ejecución del ensayo de BPAT | 23 |
| Ejecución del ensayo de Rosa de Bengala | 24 |
| Lectura e interpretación de resultados de las pruebas de screening con antígeno tamponado en placa | 25 |
| Informes de resultados | 25 |
| Pruebas de seroaglutinación lenta en tubo (SAT/2-ME) | 26 |
| Desarrollo | 26 |
| Ejecución del ensayo | 27 |
| Incubación | 28 |
| Lectura e interpretación de resultados | 28 |
| Informes de resultados | 30 |
| Preparación de soluciones para las pruebas de SAT/2-ME | 31 |
| Prueba del anillo en leche (PAL o MRT) solo para bovinos | 31 |
| Desarrollo | 32 |
| Toma de la muestra | 33 |
| Ejecución del ensayo | 33 |
| Lectura | 33 |
| Modificación de la prueba para tanques muy grandes | 34 |
| Enzimoinmunoensayo indirecto (I ELISA) (para suero o leche) | 34 |
| Etapas | 35 |
| Desarrollo | 36 |

| | |
|---|----|
| ELISA por competición / bloqueo | 38 |
| Desarrollo | 38 |
| Ensayo de polarización fluorescente para la detección de anticuerpos contra brucella en suero | 41 |
| Desarrollo | 42 |
| Ejecución del ensayo | 42 |
| Lectura e interpretación | 43 |
| Fijación de complemento | 44 |
| Desarrollo | 44 |
| Manejo y conservación de las muestras | 45 |
| Condiciones del ensayo | 46 |
| Ejecución | 46 |
| Lectura de resultados | 48 |
| Anexos | 52 |
| Bibliografía | 68 |





Introducción

El presente manual está dirigido a profesionales que se desempeñan en la Red de Nacional de Laboratorios del Senasa (Redlab) respecto a las técnicas relacionadas con el diagnóstico serológico de brucelosis. Estas técnicas son internacionalmente reconocidas y recomendadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) y el Senasa.

Objetivos

- Colaborar con el mejor desempeño y competencia de los laboratorios que realizan el diagnóstico serológico de la brucelosis en diferentes especies animales inscriptos en la Redlab.
- Proporcionar a la Redlab un instrumento que facilite el desarrollo adecuado, sistematizado y estandarizado de los procedimientos técnicos que se realizan en los laboratorios.
- Contribuir a la aplicación de las medidas de bioseguridad y controles de calidad que deben cumplirse cuando se desarrolle un procedimiento técnico.
- Contar con un instrumento que sirva de guía para la evaluación y monitoreo de las actividades del laboratorio.

Abreviaturas y definiciones

- **Ag:** Antígeno
- **Biovariedad:** bv
- **BPAT (Buffered plate antigen test):** Aglutinación con antígeno bufferado en placa
- **CELISA:** Enzimoinmunoensayo competitivo
- **C':** Complemento de cobayo
- **DGLYCT:** Dirección General de Laboratorios y Control Técnico
- **DLA:** Dirección de Laboratorio Animal
- **DNSA:** Dirección Nacional de Sanidad Animal
- **DT:** Dilución de Trabajo
- **ELISA:** Enzimoinmunoensayo
- **FCT:** Fijación de Complemento Test
- **FPA:** Ensayo de Polarización Fluorescente
- **GR:** Glóbulos Rojos
- **IELISA:** Enzimoinmunoensayo Indirecto
- **IgG:** Inmunoglobulina G
- **IgM:** Inmunoglobulina M
- **LPS:** Lipopolisacárido
- **2-ME:** 2- Mercaptoethanol
- **M:** Molar
- **mP:** milipolarización





- **MRT (PAL):** Prueba de anillo en leche
- **OMSA:** Organización Mundial de Sanidad Animal
- **PAC:** Poder anticomplementario
- **RBT:** Rosa de Bengala Test
- **Renspa:** Registro Nacional de Productores Agropecuarios
- **SAT:** Seroaglutinación lenta en tubo
- **SB:** Solución Buffer
- **Senasa:** Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
- **SH:** Sistema Hemolítico
- **UI/ml:** Unidades Internacionales por mililitro
- **UIFCT/ml:** Unidad Internacional fijadora del complemento Test por mililitro
- **UA:** Unidad de Antígeno
- **UC:** Unidad de Complemento
- **UH:** Unidad de Hemolisina



Medidas generales de bioseguridad y seguridad en el laboratorio

Se entiende por bioseguridad: La disciplina que trata el manejo seguro y la contención de microorganismos infecciosos y materiales biológicos peligrosos. La práctica del manejo seguro de microorganismos patógenos y sus toxinas en el laboratorio biológico se realiza a través de la aplicación de los principios de contención y la evaluación de riesgos.

Principios de bioseguridad

El término “**contención**” se utiliza para describir métodos seguros para manejar materiales infecciosos en el medio ambiente del laboratorio, donde son manipulados o conservados. El objetivo de la contención es reducir o eliminar la exposición de quienes trabajan en laboratorios u otras personas, y del medio ambiente externo a agentes potencialmente peligrosos.

Contención primaria: la protección del personal y del medio ambiente inmediato del laboratorio de la exposición a agentes infecciosos es provista tanto mediante buenas técnicas microbiológicas como a través del uso de Equipos de Protección Personal (EPP) de seguridad adecuados. La aplicación de vacunas al personal cuando corresponda puede brindar un mayor nivel de protección del personal.

Contención secundaria: la protección del medioambiente externo al laboratorio de la exposición a materiales infecciosos se logra a través de una combinación del diseño de la instalación y prácticas operativas.

Por lo tanto, los elementos de contención incluyen prácticas y técnicas de laboratorio, equipos de seguridad y el diseño de la instalación. La evaluación del riesgo del trabajo a realizar con un agente específico determinará la combinación apropiada de estos elementos.

Prácticas y técnicas de laboratorio: el elemento más importante de la contención es el cumplimiento estricto de las prácticas y técnicas microbiológicas





estándares. Las personas que trabajan con agentes infecciosos o materiales potencialmente infectados deben conocer los riesgos potenciales, y también deben estar capacitados y ser expertos en las prácticas y técnicas requeridas para manipular dichos materiales en forma segura.

Cada laboratorio está obligado a desarrollar o adoptar un manual de operaciones o de bioseguridad que identifique los riesgos que se encontrarán o puedan producirse, y que especifique las prácticas y procedimientos destinados a minimizar o eliminar las exposiciones a estos riesgos. Se debe alertar al personal acerca de los riesgos especiales y se le debe exigir que lea y cumpla las prácticas y procedimientos requeridos. El personal capacitado y bien informado acerca de las técnicas de laboratorio adecuadas, procedimientos de seguridad y riesgos asociados a la manipulación de agentes infecciosos debe ser el responsable de la conducción de los trabajos con cualquier agente o material infeccioso. Esta persona tiene la obligación de consultar a profesionales especializados en bioseguridad u otros profesionales de la salud y seguridad respecto de la evaluación del riesgo.

Cuando las prácticas de laboratorio estándares no son suficientes para controlar los riesgos asociados a un agente o a un procedimiento de laboratorio particular, quizás sea necesario aplicar medidas adicionales. El director del laboratorio es responsable de seleccionar prácticas de seguridad adicionales, que deben guardar relación con los riesgos relacionados con el agente o procedimiento.

El director o la persona a cargo del laboratorio es responsable de brindar u organizar la capacitación adecuada del personal.

Prácticas operativas seguras y hábitos personales

- Limitar o restringir el acceso al laboratorio.
- Diseñar el laboratorio para que su limpieza sea sencilla. Las superficies de las mesas de trabajo deben ser impermeables al agua y ser resistentes al calor moderado y a solventes orgánicos, ácidos, álcalis y productos químicos utilizados para descontaminar la superficie de trabajo y los equipos.
- Seleccionar muebles de laboratorio con capacidad de soportar cargas y usos previstos. Los espacios entre las mesas de trabajo, gabinetes y equipos deben ser accesibles para su limpieza.
- Cada laboratorio debe contener una pileta para el lavado de manos.
- Adecuar la iluminación para todas las actividades, evitando los reflejos y el brillo que pueda molestar la visión.





- Proveer mosquiteros para las ventanas del laboratorio que se abren hacia el exterior (en lo posible deberían ser fijas).
- Usar ambos, delantales, batas o uniformes de laboratorio de protección adecuados durante la permanencia en el mismo. Retirar y dejar esta ropa de protección en el laboratorio antes de dirigirse a otras áreas (por ejemplo, cafetería, biblioteca, oficinas administrativas); además, usar calzado cerrado y cabello recogido.
- Es obligatorio el uso de guantes cuando es probable que las manos entren en contacto con materiales infecciosos, superficies o equipos contaminados (puede ser apropiado el uso de dos pares de guantes). Descartar los guantes cuando están contaminados y retirarlos cuando se completa el trabajo con los materiales infecciosos o cuando está comprometida la integridad del guante. Los guantes descartables no se lavan, no se vuelven a usar, ni se utilizan para tocar superficies “limpias” (teclados, teléfonos, picaportes, entre otros), y no se deben usar fuera del laboratorio.
- No está permitido comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto, maquillarse o almacenar alimentos para uso humano en áreas de trabajo.
- Utilizar protección ocular para los procedimientos en los que se puedan producir salpicaduras de microorganismos u otros materiales peligrosos. Las personas que usan lentes de contacto en laboratorios deben también utilizar antiparras o un protector facial.
- Lavarse las manos luego de manipular materiales viables, luego de quitarse los guantes y antes de retirarse del laboratorio. (Ver Anexo I).
- Almacenar los alimentos fuera del área de trabajo en gabinetes o refrigeradores designados y utilizados con este único fin.
- Está prohibido pipetear con la boca: utilizar dispositivos de pipeteo mecánicos. Aplicar políticas para el manejo seguro de objetos cortantes o punzantes.
- Llevar a cabo todos los procedimientos con precaución a fin de minimizar la creación de salpicaduras o aerosoles.
- Descontaminar las superficies de trabajo como mínimo una vez por día, luego de finalizar las tareas y ante todo derrame de material viable.
- Descontaminar todos los cultivos, stocks y otros desechos reglamentados antes de ser desechados mediante un método aprobado, como por ejemplo, mediante autoclave. Los materiales que se deben descontaminar fuera del laboratorio inmediato son colocados en un recipiente duradero, estanco y cerrado para su transporte desde el laboratorio. Los materiales que se deben descontaminar fuera del laboratorio inmediato se embalan de conformidad con las normas locales, estatales



y federales aplicables antes de retirarlos del establecimiento de acuerdo a las indicaciones de la Ley 24.051 de Residuos Peligrosos.

- El laboratorio debe tener las hojas de seguridad¹ de cada sustancia química que utiliza en formato impreso y capacitar al personal sobre las mismas.

Limpieza y desinfección del laboratorio

Todo laboratorio debe tener un programa con métodos de limpieza y desinfección bien definidos para disminuir los riesgos de contaminación con materiales peligrosos acorde a las características del lugar y volumen de trabajo.

La limpieza de los laboratorios incluye a los equipos, mesas de trabajo, heladeras, freezer, aberturas, etc. Dentro de la limpieza se debe incluir el control de insectos y roedores.

Eliminación de residuos peligrosos (patológicos/químicos)

El laboratorio debe elaborar un procedimiento de la manipulación, clasificación y descarte de los residuos peligrosos ya que pueden causar daño, directa o indirectamente a seres vivos o contaminar el suelo, el agua, la atmósfera o el ambiente en general.

Se consideran residuos patológicos/químicos al material biológico de diversos orígenes que puede no tener características infecciosas pero sí de toxicidad. Un residuo se considera tóxico cuando es capaz de, a determinadas dosis, provocar una acción química o químico-física que cause daño en la salud, luego de estar en contacto con la piel o las mucosas o de haber penetrado en el organismo por cualquier vía.

Los residuos serán acumulados en recipientes colocados convenientemente y en cantidad suficiente en el lugar de generación de los mismos.

Los mismos se podrán tratar mediante los siguientes métodos: incineración, enterramiento por relleno de seguridad, esterilización por autoclave, ya sea por el mismo laboratorio o por empresas dedicadas a ese fin. Se ajustará a la normativa establecida por la jurisdicción donde se encuentra el laboratorio.

Aseguramiento de la calidad en el laboratorio

Se debe cumplimentar la reglamentación vigente de acuerdo a las BPL (buenas prácticas de laboratorio), requisitos particulares del Senasa y la Norma ISO/IEC 17025 (última versión vigente) según la categoría del laboratorio.

¹Es un documento que indica las particularidades y propiedades de una determinada sustancia para su uso más adecuado (en inglés, Material Safety Data Sheet o MSDS). El principal objetivo de esta hoja es proteger la integridad física del operador durante la manipulación de la sustancia. Esta hoja o ficha contiene las instrucciones detalladas para su manejo y persigue reducir los riesgos laborales y medioambientales.



Para que los resultados del diagnóstico sean uniformes, confiables y tratables, deben efectuarse siguiendo técnicas estandarizadas, con operadores capacitados en la realización e interpretación de los resultados, utilizando equipos y reactivos controlados.

Los procedimientos de laboratorio están sujetos a múltiples causas de error que deben ser detectados para poder aplicar correcciones o acciones correctivas.

Los procedimientos se pueden monitorear mediante controles internos con la utilización diaria de sueros controles internos con títulos conocidos; mientras que el control externo –que se refiere al realizado por un laboratorio de referencia– se puede hacer mediante auditorías que revisen los métodos analíticos, la organización del trabajo del laboratorio y los procedimientos de control de calidad internos implementados.

Respecto a la participación en ensayos interlaboratorios, los mismos deben ser provenientes de organismos reconocidos y programas de ensayos de aptitud. Se deben mantener documentados los resultados y, en caso de obtener resultados no satisfactorios, implementar las acciones correctivas pertinentes para su seguimiento y cierre.

Del mismo modo podrán utilizarse otras herramientas a los fines de garantizar el desempeño adecuado y asegurar la calidad de los resultados de ensayo, como la confección de gráficos de control².

El control permanente de la calidad de los resultados junto con las buenas prácticas de laboratorio que incluye la utilización de técnicas evaluadas, personal capacitado y operaciones estandarizadas, garantiza el resultado confiable del diagnóstico.

Control de calidad de insumos

Todos los insumos y reactivos que se utilizan en el laboratorio deben ser establecidos con fórmulas y procedimientos detallados en manuales disponibles en el área de trabajo.

La composición, el tipo de envase, la identificación y el lugar de almacenamiento deben ser los indicados en los manuales. No introducir cambios que no estén registrados y autorizados por el responsable del laboratorio.

Todos los insumos y materiales de referencia deben cumplir con las especificaciones registradas.

² Diagrama que sirve para examinar si un proceso se encuentra en una condición estable, o para asegurar que se mantenga en esa condición.



Los reactivos biológicos que se emplean en las técnicas de ensayo deben utilizarse de acuerdo a las especificaciones del manual de procedimientos operativos correspondiente, respetando las indicaciones para la conservación, almacenamiento y titulación.

Los reactivos para el diagnóstico de brucellosis que se comercializan en la República Argentina, deben cumplir la normativa vigente del Senasa y aprobar el control de calidad de cada lote o serie indicado en la estampilla correspondiente. **Se debe llevar un registro de cada lote de antígeno/kit que se utiliza con la fecha de uso.**

En los laboratorios se requiere usar agua con mínimo de impurezas. Los requisitos de calidad o pureza se encuentran establecidos sobre la base de diferentes normas o criterios, dependiendo de las instituciones u organismos internacionales que establecen las referencias. Entre éstas se encuentran la *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *British Standards Institution* (BSI) y la *International Organization for Standardization* (ISO). Actualmente están definidos los diferentes niveles de pureza del agua en función de los parámetros físico-químicos, tales como conductividad eléctrica, resistividad, contenido de carbono, oxígeno o sílice.

Clasificación del agua de acuerdo a su característica fisicoquímica.

Especificaciones según ISO 3696

| Parámetros Fisicoquímicos | Grado 1 | Grado 2 | Grado 3 |
|---|---------|---------|-----------|
| Conductividad eléctrica valor máximo a 25 °C, $\mu\text{S}/\text{cm}$ | 0,1 | 1 | 5 |
| Resistividad, $\text{M}\Omega$ | 10 | 1 | 0,25 |
| Absorbancia (UA a 254 nm) | 0,001 | 0,01 | -- |
| Sílice Total valor máximo mg/l | 0,01 | 0,02 | 1 |
| pH | -- | -- | 5,0 a 7,5 |

Clasificación de los tipos de agua según NC-ISO 3696: 2004

Grado 1- Exenta básicamente de contaminantes constituidos por iones disueltos o coloidales y materias orgánicas. Es apropiada para los requisitos de análisis más exigentes, incluyendo la cromatografía líquida de alta definición. Se puede preparar por un tratamiento adicional del agua de grado 2 (por ejemplo osmosis inversa o desionización seguida de filtrado a través de una membrana con tamaño de poro de 0,2 μm para separar las partículas, o por redestilación en un aparato de sílice fundido).

Grado 2- Con muy pocos contaminantes inorgánicos, orgánicos o coloidales. Es apropiada para análisis delicados, incluyendo la espectrometría de absorción atómica (EAA) y la determinación de componentes en cantidades mínimas. Se puede preparar por destilación múltiple o por desionización u osmosis inversa seguida de destilación.





Grado 3- Apropriada para la mayoría de los trabajos de química en laboratorios por vía húmeda y la preparación de soluciones de reactivos. Se puede preparar mediante una sola destilación, por desionización o por osmosis inversa. Salvo indicación en contrario, se puede utilizar para el trabajo normal de análisis.

Equipos

El laboratorio debe tener inventario del equipamiento y un programa de control y mantenimiento de los equipos que emplea en el laboratorio.

El equipamiento que afecte la calidad de los resultados de ensayo, debe mantenerse controlado, estipulando dentro de un programa los intervalos de control, calibración /verificación y mantenimiento de los mismos.

Sobre la enfermedad³

Brucelosis es el nombre genérico que se aplica a las infecciones, humanas o animales causadas por distintas especies del género *Brucella*, principalmente *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*.

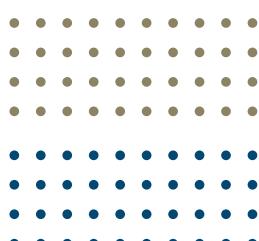
La infección del ganado ovino por *B. ovis* se describe por separado en el Capítulo 3.7.7 Epididimitis ovina (*Brucella ovis*) del manual de la OMSA.

Agente: **Brucella (B. abortus, B. melitensis, B. suis)**

El género *Brucella* forma parte de la familia *Brucellaceae*, que a su vez forma parte del orden Rhizobiales, en la clase alphaproteobacteria. Presenta una estrecha relación genética con ciertos agentes patógenos de las plantas y simbiontes de los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium*, así como con agentes patógenos de animales (*Bartonella*) y bacterias oportunistas o del suelo (*Ochrobactrum*).

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 al tipo de hospedador y a la epidemiología, así como evidencias moleculares de variaciones genómicas, el Comité Internacional de Sistemática de Procariotas, Subcomité de Taxonomía de *Brucella*, adoptó en 2005 una decisión firme sobre el retorno a las posiciones anteriores a 1986 en lo relativo a la taxonomía de *Brucella*; la consecuencia de ese posicionamiento es la reprobación de las seis especies de *Brucella* con sus biovariedades reconocidas. Los nombres clásicos relacionados con las seis especies de *Brucella* están publicados en las Listas Autorizadas de Nombres de Bacterias de 1980, y las cepas típicas designadas aparecen asociadas a esos nombres publicados y validados: *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*. Las

³Fuente: Capítulo 3.1.4.- Manual Organización Mundial de Sanidad Animal -OMSA)- versión 2022.



tres primeras se subdividen en biovariedades por sus características de cultivo y serológicas. En la última década se han aislado cepas de *Brucella* de mamíferos marinos que no pueden adscribirse a ninguna de las especies ya reconocidas. Hay estudios en curso destinados a establecer su posición en la taxonomía de este género y se ha propuesto que podrían clasificarse en dos nuevas especies, *B. ceti* y *B. pinnipedialis*. Recientemente se ha aislado una nueva cepa, denominada *Brucella microti*, en el topillo campesino (*Microtus arvalis*) y en zorros y suelo de Europa Central (Scholz et al., 2008). También se han descrito por primera vez ciertas cepas aisladas de infecciones humanas de implantes mamarios y de pulmón, aunque todavía no está claro cuál es el reservorio natural de las mismas. Si bien solo se han descrito dos cepas de cada nuevo tipo, formalmente se han publicado como décima y onceava especies de *Brucella*, *B. inopinata* y *B. papionis*, respectivamente (Scholz et al., 2010; Whatmore et al., 2014). Por último, las cepas aisladas de roedores, zorros y ranas se han caracterizado como cepas atípicas de *Brucella* claramente diferenciables de las especies descritas actualmente, pero todavía no se han aprobado como nuevas especies de *Brucella*.

Descripción de la enfermedad

Infección por Brucella en ganado bovino

La infección por *Brucella* en el ganado bovino suele estar causada por biovariedades (bv.) de *Brucella abortus*. En algunos países, sobre todo del sur de Europa, África y Asia occidental, en los que el ganado bovino se cría en estrecha relación con ganado ovino o caprino, la infección también puede deberse a *B. melitensis* (Verger, 1985). En ocasiones, *B. suis* puede causar una infección crónica de la glándula mamaria del ganado bovino, pero no se ha observado que cause aborto ni que se transmita a otros animales. La infección por *Brucella* en ganado bovino se transmite a nivel mundial, pero varios países del norte y centro de Europa, así como Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda se consideran libres tanto de *B. abortus* como de *B. melitensis*. Esta enfermedad suele ser asintomática en animales de corta edad y en hembras no gestantes. Tras la infección por *B. abortus* o *B. melitensis*, las hembras adultas gestantes presentan placentitis, que suele dar lugar a aborto entre el quinto y el noveno mes de gestación. Incluso en ausencia de aborto, en la placenta, los líquidos fetales y las secreciones vaginales producen una profusa excreción del microorganismo. La glándula mamaria y los ganglios linfáticos relacionados también pueden resultar infectados, y es posible que se excreten microorganismos con la leche. Las siguientes gestaciones suelen llegar a término, pero la infección uterina y mamaria reaparece, con cantidades bajas de microorganismos tanto en los productos del parto como en la leche. En las infecciones agudas, el microorganismo se encuentra presente en la mayoría de ganglios linfáticos principales del organismo. Los bovinos machos adultos pueden presentar orquitis/epididimitis y la brucellosis puede ser una causa de infertilidad en ambos sexos. Los higromas, que suelen afectar a las articulaciones de las extremidades, son un signo frecuente en caso de brucellosis en algunos países tropicales y pueden ser el único indicador manifiesto de infección; el líquido de los higromas suele estar infectado por *Brucella*.





Infección por Brucella en ovejas y cabras

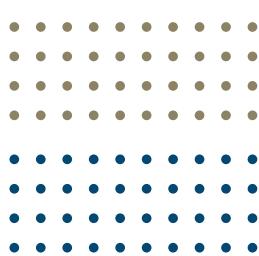
La infección por *Brucella* en ovejas y cabras (excepto la infección por *B. ovis*) está causada principalmente por las biovariedades de *B. melitensis*. En ovejas y cabras se han observado infecciones esporádicas causadas por *B. abortus* o *B. suis*, pero estos casos son extremadamente infrecuentes. La infección por *Brucella* en ovejas y cabras es endémica en la región del Mediterráneo, pero se dan casos en todo el mundo. América del Norte (excepto México) se considera libre del agente, del mismo modo que el norte y el centro de Europa, el sudeste asiático, Australia y Nueva Zelanda.

Patológica y epidemiológicamente, la infección por *B. melitensis* en ovejas y cabras es muy similar a la infección por *B. abortus* en ganado bovino. En la mayoría de los casos, las vías principales de transmisión de *Brucella* son la placenta, los líquidos fetales y las secreciones vaginales expulsadas por las ovejas y cabras infectadas, ya sea al abortar o al parir a término. La expulsión de *Brucella* también es frecuente en las secreciones de la ubre y en el semen, y puede aislarse *Brucella* de distintos tejidos, como los ganglios linfáticos de la cabeza, el bazo y los órganos asociados a la reproducción (útero, epidídimos y testículos), así como de lesiones artríticas (Alton et al., 1988).

Infección por Brucella en cerdos

La infección por *Brucella* en cerdos está causada principalmente por las biovariedades 1, 2 o 3 de *B. suis*. En cerdos también se han observado infecciones esporádicas por *B. abortus* o *B. melitensis*, pero estos casos son muy infrecuentes. La enfermedad tiene lugar en muchos países en los que se crían cerdos. En general, la prevalencia es baja, pero en algunas regiones, como América del Sur o el sudeste asiático, la prevalencia puede ser mucho más alta. En algunos países, la brucellosis porcina puede ser un problema grave, aunque actualmente no reconocido. Se ha observado infección por la bv 1 de *Brucella suis* en jabalíes de algunos estados del sur de EE.UU., así como de Queensland (Australia) y de otros países de Oceanía. En estos países, se han documentado varias infecciones humanas en personas que practicaban la caza y manipulaban material obtenido de jabalíes. En general, la enfermedad se transmite por la ingesta de alimento contaminado por productos del parto o de un aborto, o bien por secreciones uterinas. Los cerdos se comen de inmediato los fetos abortados y las membranas fetales. La transmisión durante la cópula también es frecuente, y la excreción de *B suis* en el semen tiene implicaciones para el personal que lleva a cabo la inseminación artificial. En los cerdos, como en los rumiantes, tras la bacteriemia inicial, *B. suis* coloniza las células del tracto reproductor de ambos sexos. En las hembras, resultan invadidas la placenta y los fetos, mientras que en los machos la invasión tiene lugar en uno o más de los siguientes tejidos: testículos, próstata, epidídimos, vesículas seminales o glándulas bulbouretrales. En los machos, las lesiones, que suelen ser unilaterales, empiezan con una hiperplasia que puede avanzar a absceso; la fase final se caracteriza por esclerosis y atrofia. Pueden aparecer artritis en varias articulaciones, y a veces tiene lugar una espondilitis. En las cerdas, el signo más frecuente de brucellosis es el aborto en cualquier momento de la gestación, aunque es más habitual entre los días 50 y 110. La secreción vaginal no suele ser evidente y, en los rebaños infec-





tados de forma crónica, el signo clínico más relevante es la infertilidad, no el aborto. En los machos, la brucelosis tiene más probabilidades de ser persistente, y ocasiona lesiones en el tracto genital que a menudo dan lugar a una interferencia con la actividad sexual, que puede ser temporal o irreversible. El verraco puede excretar *Brucella* con el semen sin ninguna anomalía aparente en los órganos sexuales ni interferencia con la actividad sexual. En ambos sexos puede aparecer una tumefacción articular y de las vainas de los tendones, cojera y, en ocasiones, parálisis posterior. Un porcentaje considerable tanto de cerdos como de cerdas se recupera de la infección, a menudo en un plazo máximo de 6 meses, pero muchos quedan infectados de por vida (Olsen et al., 2012). La infección causada por la bv 2 de *B. suis* difiere de la causada por la bv 1 y la bv 3 en cuanto a la gama de hospedadores, la distribución y la patogenicidad. Históricamente, la distribución geográfica de la bv 2 de *B. suis* ha sido un amplio territorio situado entre Escandinavia y los Balcanes. La prevalencia en jabalíes parece ser alta en toda Europa continental (EFSA, 2009). En los brotes de Europa, los jabalíes intervienen como fuente de transmisión de la bv 2 a cerdos criados en el exterior, y se consideran el principal reservorio salvaje de esta infección (EFSA, 2009). La bv 2 de *Brucella suis* causa lesiones miliares, sobre todo en tejidos reproductivos, que a menudo se vuelven purulentas. Hasta la fecha, la bv 2 se ha documentado en muy pocos casos como causa de brucelosis humana. No obstante, sí se han observado infecciones por la bv2 en cazadores con inmunocompromiso que hayan estado excesivamente expuestos debido a prácticas como el destripado y despellejado de jabalíes o liebres. Asimismo, en ganado bovino y ovino de Europa expuesto a jabalíes infectados, se han observado casos, aunque muy infrecuentes, de infección por la bv 2 de *B. suis* sin signos clínicos.

Infección por Brucella en otras especies: domésticas, salvajes en cautiverio o en libertad

Se ha observado infección por *B. abortus* y *B. melitensis* en el dromedario (*Camelus dromedarius*) y en el camello (*C. bactrianus*), así como en camélidos de América del Sur: la llama (*Lama glama*), la alpaca (*Lama pacos*), el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugne vicugne*), y se ha relacionado con el contacto con rumiantes grandes y pequeños infectados por *B. abortus* y *B. melitensis*. Asimismo, se ha observado brucelosis en el búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*), el bisonte americano y el europeo (*Bison bison* y *B. bonasus*, respectivamente), el yak (*Bos grunniens*), el elk/wapiti (*Cervus elaphus*), el búfalo africano (*Syncerus caffer*) y varias especies de antílopes de África. Los signos clínicos de brucelosis en estos animales son similares a los que se observan en el ganado bovino, ovino y caprino.

La infección por *Brucella melitensis* en rumiantes salvajes puede tener lugar cuando estas especies se encuentran en estrecho contacto con ovejas y cabras de zonas enzoóticas. Los signos de la brucelosis en estos animales son similares a los que se observan en bovinos, ovinos y caprinos, pero en varias especies de rumiantes salvajes (como el rebeco [*Rupicapra rupicapra*], el íbex alpino [*Capra ibex*] y la cabra ibérica [*Capra pyrenaica*] salvaje) se ha observado artritis purulenta o calcificada y orquitis, así como uveítis y problemas neurológicos. Estas especies se consideran portadores terminales, que no pueden transmitir la enfermedad, la cual suele desaparecer de forma natural en cuanto la infección por *Brucella* se ha erradicado del ganado doméstico, a no ser que tengan lugar efectos antropogénicos.



Existen dos tipos distintos de situación epidemiológica respecto a la infección por *B. suis* en otras especies no porcinas. En el primer caso, la infección por *B. suis* tiene lugar en animales que no son el hospedador natural de la infección concreta mediante la ingesta de materiales contaminados o por cohabitación con hospedadores naturales infectados. Por ejemplo, zorros y lobos del ártico pueden contraer la bv 4 de *B. suis* del reno; los perros y los roedores, como ratas o ratones, pueden contraer otras biovariedades de *B. suis* por cohabitación con hospedadores infectados; y el ganado bovino y los caballos pueden resultar infectados por cohabitación o interacción con porcinos infectados. Las bacterias infectantes pertenecen siempre a las biovariedades definidas de especies hospedadoras naturales. En el segundo caso, los hospedadores naturales de *B. suis* o microorganismos similares a *B. suis* son especies salvajes. Un ejemplo es la denominada brucellosis murina de la Comunidad de Estados Independientes (CIS) y los países bálticos, donde pequeños roedores resultan infectados por la bv 5 de *B. suis*. Una situación similar se ha observado en Australia, donde, a partir de roedores, se han aislado cepas parecidas a *B. suis* pero con características distintas; finalmente se ha considerado que son distintas de *B. suis* en función del perfil genético.

Además del jabalí, la liebre común europea (*Lepus europaeus*) también se considera reservorio de la bv 2 de *B. suis* y se ha observado que interviene como posible fuente de transmisión al ganado doméstico. En la liebre común europea, la enfermedad se caracteriza por la formación de nódulos de tamaños variables comprendidos entre el de una semilla de mijo y el de una cereza o incluso mayor; a menudo se vuelven purulentos. Estos nódulos pueden desarrollarse en casi cualquier lugar, a veces en el tejido subcutáneo o intramuscular, en el bazo, el hígado o los pulmones y en los órganos reproductivos de ambos sexos. La condición corporal de la liebre puede quedar sorprendentemente intacta. Otras especies también pueden resultar infectadas por cohabitación con cerdos, jabalíes o liebres infectados por la bv 2 de *B. suis*. El desripado o despellejado de jabalíes en explotaciones bovinas podría ser una vía de transmisión al ganado bovino. La bv 4 de *Brucella suis* causa una zoonosis grave en renos salvajes o domesticados (*Rangifer tarandus* y sus distintas subespecies) en toda la región del Ártico, incluidos Siberia, Canadá y Alaska. *Rangifer tarandus* es muy susceptible a la infección por *B. suis*, que causa fiebre, abatimiento y distintos signos locales, como aborto, retención de placenta, metritis, a veces con secreciones sanguinolentas, mastitis, bursitis y orquitis. La transmisión al ser humano puede tener lugar por contacto directo o por el consumo de leche cruda u otros productos cocidos de manera insuficiente procedentes del reno, especialmente la médula ósea.

Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad

Ciertas especies de *Brucella*, sobre todo *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* –y probablemente en menor medida *B. canis*– son fácilmente transmisibles al ser humano, en el que causan un proceso febril (fiebre ondulante) que puede avanzar a una forma más crónica y también producir complicaciones graves que afecten a los sistemas músculo esquelético, cardiovascular y al sistema nervioso central. Deben aplicarse medidas de precaución para prevenir la infección humana. La infección se contrae básicamente por vía oral, respiratoria o conjuntival, pero la ingesta de productos lácteos crudos constituye el principal riesgo para el



público general en los lugares en los que la enfermedad es endémica. Existe un riesgo ocupacional en veterinarios, trabajadores de mataderos y ganaderos que manipulen animales/canales infectados y fetos abortados o placas. La brucellosis también es una de las infecciones de laboratorio más fáciles de contraer, y todas las manipulaciones de laboratorio relacionadas con cultivos vivos o material que pueda estar infectado o contaminado deben realizarse a un nivel de bioseguridad y contención adecuado, que se determinará a partir de un análisis del riesgo biológico. Se han realizado recomendaciones específicas relativas a las precauciones en materia de bioseguridad que deben aplicarse con los materiales infectados por *Brucella* (se ofrece más información en Alton *et al.*, 1988; Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucellosis, 1986; OMS, 1953; OMS, 2004).

Todos los abortos en el ganado deben considerarse como casos sospechosos de brucellosis y deberían investigarse. El cuadro clínico no es patognomónico, aunque la historia del rebaño puede servir de ayuda. El diagnóstico inequívoco de infecciones por *Brucella* solo puede hacerse por aislamiento e identificación de *Brucella*, pero en situaciones en las que no es posible el análisis bacteriológico, el diagnóstico puede basarse en métodos serológicos.

Técnicas de diagnóstico

Pruebas serológicas

No existe una prueba única que permita la identificación de *Brucella*. Normalmente se necesita una combinación de los métodos serológicos y bacteriológicos.

Ninguna prueba serológica aislada es adecuada en todas y cada una de las situaciones epidemiológicas, presentando limitaciones en el análisis de animales individuales. Se deben considerar todos los factores que influyen en la relevancia del método de prueba y de sus resultados para una aplicación o interpretación diagnóstica específica. Los métodos serológicos que se describen en este manual son métodos estandarizados y validados, con características de realización adecuadas para ser consideradas pruebas obligadas o alternativas en el comercio internacional. Esto no impide el uso de pruebas modificadas o similares o la utilización de reactivos diferentes. Sin embargo, los métodos y reactivos descritos en este manual suponen un estándar de comparación respecto a la realización esperada del diagnóstico.

Debe resaltarse que la prueba de seroaglutinación lenta en tubo (SAT) se considera inadecuada a efectos del comercio internacional. La prueba de fijación de complemento (FCT) es más específica que la SAT para el diagnóstico y además posee un sistema estandarizado de unidades.

Para el control de la brucellosis a nivel nacional o local, 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 enzimoinmunoensayo (ELISA) y el ensayo de polarización fluorescente (FPA). Las reacciones positivas deben volverse a analizar utilizando una estrategia confirmatoria adecuada.





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

Tabla 1

Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de infección por *Brucella abortus*, *melitensis* o *suis* (Manual OMSA, 2022).

| Método | Propósito | | | | | |
|--|---|---|---|---|--|---|
| | Demostrar ausencia de infección en la población | Demostrar ausencia de infección en animales individuales ^a | Contribuir a las políticas de erradicación ^b | Confirmar casos clínicos sospechosos ^c | Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia en el rebaño / manada | Determinar el estado inmunitario en animales individuales o en poblaciones tras la vacunación |
| Identificación del agente | | | | | | |
| Métodos de tinción | - | - | - | + | - | - |
| Cultivo | - | - | - | +++ | - | - |
| PCR ^d | - | - | - | +/- | - | - |
| Detección de la respuesta inmune | | | | | | |
| BBAT (RBT o BPAT) | +++ | ++ | +++ | + | +++ | - |
| FPA | ++ | ++ | + | ++ | ++ | - |
| CFT | ++ | ++ | +++ | ++ | +++ | - |
| I-ELISA | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | - |
| C-ELISA | ++ | + | + | + | ++ | - |
| BST | ++ | - | + | +++ | ++ | - |
| SAT | ++ | + | + | - | + | - |
| Pruebas basadas en el NH y proteínas del citosol ^e | - | - | + | ++ | - | - |
| Prueba en leche de tanque ^f I- ELISA en leche o prueba de anillo en leche | +++ | - | +++ | + | +++ | - |

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método adecuado; + = puede utilizarse en ciertas situaciones, pero el costo, la fiabilidad u otros factores limitan su aplicación; - = no adecuado para esta finalidad.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; BBAT = pruebas con antígeno tamponado de *Brucella* (es decir, RBT [rosa de bengala] y BPAT [prueba de aglutinación en placa tamponada]); CFT = fijación de complemento; I- o C-ELISA = enzimoinmunoanálisis indirecto de competición; FPA = prueba de polarización de la fluorescencia; BST = prueba de la brucelina; SAT = prueba de aglutinación en suero; NH = hapteno nativo.



a Solo aplicable a rebaños / manadas, países o zonas libres de la infección por Brucella.

b Para aumentar la eficiencia de las políticas de erradicación en rebaños/ manadas, se recomienda combinar pruebas para aumentar la sensibilidad en cuanto al diagnóstico, es decir, al menos dos pruebas serológicas, como BBAT o FPA y CFT o I- ELISA. La sensibilidad aumenta aún más si se aplica simultáneamente serológica y BST.

c En zonas de prevalencia baja o casi libres, el valor predictivo de los resultados positivos en las pruebas serológicas puede ser muy bajo. En tales situaciones, para confirmar casos clínicos suele ser necesario identificar el agente causal.

En rebaños/manadas infectados, un resultado positivo en cualquier prueba serológica puede considerarse una confirmación de un caso clínico. Todo animal que dé positivo en cualquier prueba debe considerarse infectado, incluso en ausencia de signos clínicos.

En zonas de prevalencia baja o casi libres, los resultados positivos aislados pueden confirmarse mediante cultivo (o PCR) o BST.

En países o zonas libres, los animales sospechosos son los que dan positivo tanto en una prueba serológica de cribado como en una confirmativa (pruebas en serie) y pueden confirmarse mediante cultivo (o PCR) y/o BST.

d Es posible que se obtenga falsos positivos.

e En las zonas en las que se practica la vacunación subcutánea con S19 o Rev. 1, esta prueba puede ayudar a diferenciar entre los anticuerpos generados a partir de la vacunación y los generadores a partir de la infección.

f Solo ganado lechero.

Procedimientos de trabajo para el diagnóstico de brucelosis en el laboratorio de red

Registro de entrada de muestras

Todo laboratorio debe contar con un instructivo o procedimiento de recepción, manejo y rechazo de muestras.

Es responsabilidad del veterinario acreditado que envía las muestras asegurarse la correcta identificación, embalaje y documentación que acompaña a las mismas.

Los laboratorios deben contar con un registro de entrada de muestras (en papel o *software con back-up*), en el que figure como mínimo la siguiente información:

- Fecha de recepción de muestras.
- Cantidad de muestras.
- Especie.



- Fecha de extracción de muestras.
- Procedencia: establecimiento, número de Renspa.
- Localidad: departamento, partido, provincia.
- Remitente: veterinario acreditado, nombre y número de registro, otorgado por la Dirección Nacional de Sanidad Animal (DNSA), Senasa.
- Motivo del envío:
 - DOES (Determinación Obligatoria del Estatus Sanitario).
 - MuVe (Muestreo de Vigilancia Epidemiológica para mantenimiento del estatus).
 - SAN (Saneamiento de rodeo bajo plan), CSM (Certificado de seronegatividad para el Movimiento).
 - Control interno (según requerimiento de veterinario acreditado).
 - Remuestreo, otros.

Características y condiciones de las muestras

Condiciones de recepción de las muestras:

- Sangre entera o suero refrigerados
- Suero congelado
- Leche para PAL refrigerada (no congelada)
- Leche para IELISA refrigerada/congelada
- Tubos con identificación clara, de preferencia sobre cinta de papel o similar adherida al tubo; otra opción es la marcación firme e indeleble en el cuerpo del tubo
- Planillas/protocolo completas de toma de muestras (Anexo II, Resolución Senasa 67/2019)

Condiciones de rechazo o demora del procesamiento de las muestras:

- Falta de planillas/protocolo o planillas incompletas de toma de muestras (Anexo II, Resolución Senasa 67/2019)
- Falta de la firma del veterinario acreditado en la planilla de extracción, responsable de la toma de muestra
- Sangre entera congelada
- Leche para PAL congelada, contaminada
- Sangre entera o suero, contaminados
- Sueros hemolizados
- Tubos no identificados
- Volumen insuficiente

Los laboratorios reconocidos y autorizados deben ser exigentes con la calidad de las muestras a procesar, como así también con la planilla de toma de muestra firmada por el veterinario acreditado actuante que debe acompañar a las muestras.



Informes de resultados

Los informes que elabore el laboratorio deben ser precisos para poder desarrollar adecuadamente las acciones de saneamiento (Ver modelo Anexo I del presente manual).

En el informe de resultados debe constar:

- Logo del laboratorio/Dirección/Tel./e-mail/ Número de identificación del laboratorio
- N.º de protocolo interno
- Fecha de extracción de muestras
- Fecha de recepción de muestras
- Fecha de informe o emisión de resultados
- Cantidad de muestras
- Especie
- Procedencia: establecimiento, número de Renspa
- Localidad: Departamento, partido, provincia
- Remitente: Veterinario acreditado, nombre y número de registro, otorgado por la Dirección Nacional de Sanidad Animal (DNSA), Senasa
- Motivo del envío: DOES (Determinación Obligatoria del Estatus Sanitario), MuVe (Muestreo de Vigilancia Epidemiológica para mantenimiento del estatus), SAN (Saneamiento de rodeo bajo plan), CSM (Certificado de seronegatividad para el movimiento), control interno (según requerimiento de veterinario acreditado), remuestreo
- Columnas con la información del tubo / caravanas / edad / fecha de vacunación / pruebas utilizadas / resultados con los valores obtenidos (SAT-2ME, ELISA, FCT, FPA), valor de corte e interpretación cuando corresponda
- Información de los antígenos / kits utilizados
- Firma del director técnico del laboratorio
- Observaciones
- Paginación x de y
- Que conste en todas las páginas N.º del protocolo y N.º de Renspa

Animales para examinar: Hembras vacunadas mayores de 18 meses y animales no vacunados mayores de 6 meses.

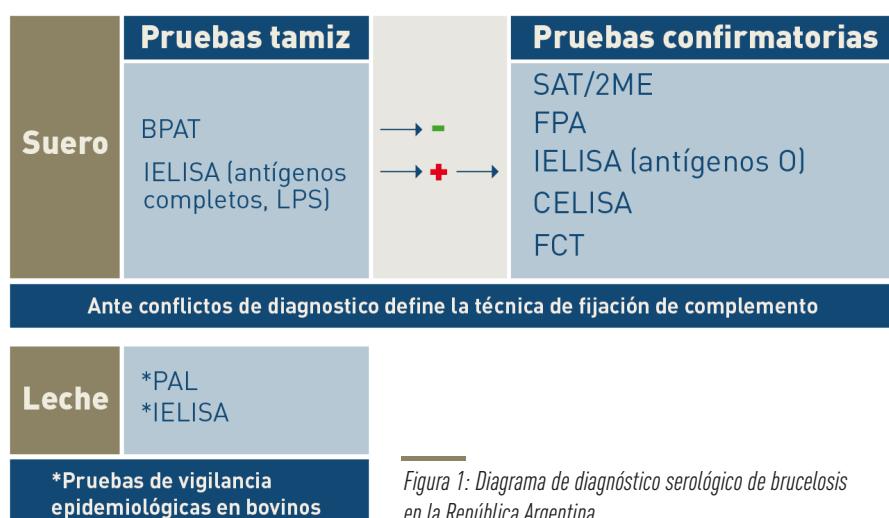


Figura 1: Diagrama de diagnóstico serológico de brucelosis en la República Argentina.



Pruebas screening con antígeno tamponado en placa (BPAT y RBT) para la detección de anticuerpos contra Brucella spp

Son pruebas tamiz de aglutinación en placa. Se fundamentan en la inhibición de las aglutininas inespecíficas a bajo pH. Detectan anticuerpos IgG y algunos IgM específicos.

Desarrollo

Materiales:

- Micropipetas de 10-100 μ L.
- Gradillas.
- Caja de lectura o aglutinoscopio (aproximadamente de 45 cm de largo x 35 cm de ancho x 15 cm de profundidad) con tapa, provista de una placa de vidrio marcada con cuadrados de aproximadamente 4 cm de lado, que se apoya cerca de la parte superior de la caja de manera que pueda quitarse y ponerse fácilmente.
- La caja debe estar iluminada de modo que la luz incida oblicuamente y por debajo (cubiertas parcialmente), de la mezcla de suero y antígeno. El interior de la caja debe pintarse de negro opaco.
- Debe colocarse dentro del aglutinoscopio una pequeña cámara húmeda para evitar la evaporación de las muestras.
- Mezcladores de acero o plástico.

Equipos:

- Heladera con temperatura controlada (5 ± 3 °C).
- Freezer con temperatura controlada (-20 ± 5 °C).
- Vórtex.
- Centrífuga.
- Timer.

Reactivos:

- Antígeno BPAT con volumen celular aprox. de 11%.
- Antígeno Rosa de Bengala, volumen celular aprox. de 8%.
- Conservar el Antígeno en la heladera a 5 ± 3 °C. **No se debe congelar, lo cual lo inutiliza**, ya que se modifica la sensibilidad.
- Suero control interno positivo.
- Suero control interno negativo.
- Cada laboratorio debe preparar sus sueros controles internos de trabajo **positivo** y **negativo**, codificarlos, utilizarlos cada día de trabajo y registrarlos.

Ejecución del ensayo de BPAT

- Descongelar y mezclar bien los sueros utilizando vórtex.
- Llevar las muestras de suero y antígeno a temperatura ambiente (22 ± 4 °C) como mínimo unos 45-60 minutos previos a la realización del ensayo.
- Garantizar la homogeneización del antígeno, agitando suavemente por inversión durante no menos 10 minutos (No usar vórtex).
- Colocar sobre el aglutinoscopio (con cámara húmeda), la placa de vidrio (limpia y seca), se recomienda pasar papel absorbente embebido en alcohol 70% de ambos lados de la misma.





- Con micropipeta automática apoyada sobre la placa de vidrio, se depositan 80 μl de suero, previo mezclado con vórtex. Utilizar un tip o punta de pipeta para cada suero.
- Con micropipeta descargar 30 μl de antígeno próximo a la gota del suero, con la precaución de no tocar el suero para no contaminar con el tip el frasco de antígeno.
- Mezclar bien, con mezclador de acero o plástico, el suero con el antígeno abarcando una superficie circular aproximada de **3 cm de diámetro**.
- Se retira la placa de vidrio y se imprimen 3 movimientos en forma rotativa hasta homogeneizar la mezcla.
- Se coloca la placa sobre el aglutinoscopio **con cámara húmeda** y se tapa, permaneciendo la luz apagada.
- Se efectúa una nueva rotación, pasados 4 minutos.

A los 8 minutos, rotando de nuevo la placa y con la luz encendida, se procede a la lectura.

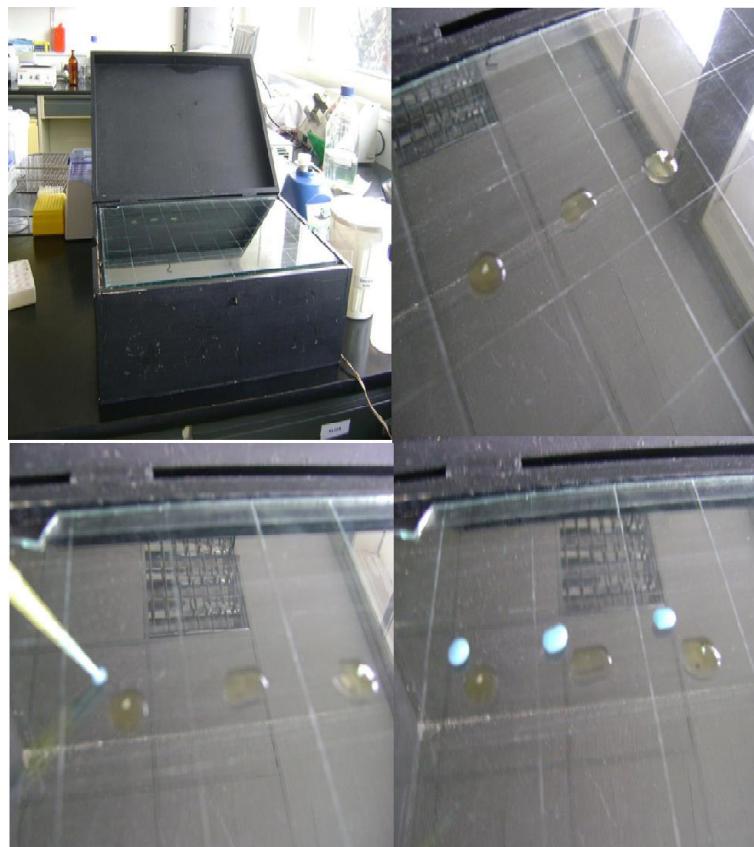


Figura 2: Aglutinoscopio.

Ejecución del ensayo de Rosa de Bengala

- Colocar la placa de vidrio sobre el aglutinoscopio, como se indicó en la prueba de BPAT.
- Con micropipeta automática apoyada sobre la placa de vidrio, se depositan 30 μl de suero. Utilizar un tip para cada suero.
- Con micropipeta descargar 30 μl de antígeno próximo a la gota de suero.
- Se mezcla bien, con mezclador de acero o plástico, el suero con el antígeno, abarcando una superficie circular de aproximadamente **2 cm de diámetro**.





- Se retira la placa de vidrio y se imprimen movimientos en forma rotativa durante 4 minutos a razón de 10 a 12 movimientos por minuto. Esto se puede hacer en forma manual o con rotadores diseñados especialmente.
- Finalizados los 4 minutos y rotando la placa sobre la caja de lectura o aglutinoscopio con la luz encendida, se procede a la lectura sobre fondo blanco. En el caso de muestras de **suecos caprinos y ovinos**, la OMSA recomienda utilizar la prueba de Rosa de Bengala modificado (RBTm), el cual consiste en **mezclar 75 µl de suero y 25 µl de antígeno**. Lectura a los 4 minutos, como se detalla en la explicación anterior.

Lectura e interpretación de resultados de las pruebas de screening con antígeno tamponado en placa

Las reacciones se clasifican en:

POSITIVAS: Cuando se forman grumos, aun siendo finos (no confundir con aglutinaciones inespecíficas producidos por impurezas, hemólisis, etc.). Estas muestras deben someterse a las pruebas confirmatorias de SAT / 2-ME, FPA, ELISA o FCT.

NEGATIVAS: Cuando la mezcla suero-antígeno es de turbidez homogénea y sin grumos. Estas muestras se informan como negativas y no se realizan las pruebas complementarias.

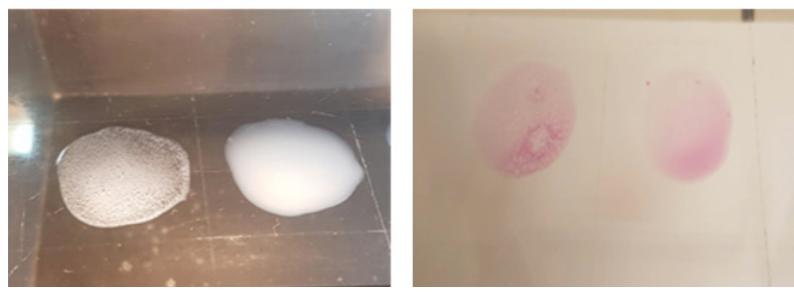


Figura 3: Lectura BPAT/RBT

Informes de resultados

Se aceptan las siguientes expresiones de resultados en las planillas:

| Positivo | Negativo |
|----------|----------|
| + | - |
| POS | NEG |
| P | N |





Criterios de aceptación del resultado

En paralelo a las muestras problema se dispensan **los sueros controles internos negativos y positivos**. Para aceptar los resultados, ambos controles deben arrojar la lectura correspondiente. Si los controles no arrojan la lectura esperada, se deben revisar las posibles causas, calidad de los sueros controles, antígeno, calibración de pipetas, etc.

Pruebas de seroaglutinación lenta en tubo (SAT/2-ME)

Las pruebas de seroaglutinación detectan la presencia de los anticuerpos IgM e IgG. Los anticuerpos IgM aglutinan más intensamente que los IgG ya que, al ser las moléculas pentavalentes, poseen un mayor número de sitios de unión. El título de un suero se determina por la inversa de la dilución más alta que causa un determinado grado de aglutinación y se expresa en unidades que corresponden al recíproco de esa dilución.

La prueba de 2-mercaptopropano (2-ME) es una prueba selectiva que detecta solamente la presencia de IgG, se basa en que los anticuerpos IgM, con configuración de pentámero, se degradan en cinco subunidades semejantes por la reducción de enlaces disulfuro, debido a la acción de ciertos compuestos que contienen el radical tiol, tales como el 2-mercaptopropano. Estas subunidades conservan sus características de antigenicidad, pero pierden la actividad de anticuerpo plurivalente y se comportan como univalentes. Aun cuando las subunidades están integradas por dos cadenas pesadas y dos livianas, al combinarse con el antígeno no originan complejos suficientemente grandes como para aglutinar, probablemente como consecuencia de algún impedimento estérico. Las moléculas de IgG, en cambio, no sufren un efecto obvio que altere su actividad para dar reacciones objetivas como la aglutinación.

La prueba se usa, por lo tanto, como evidencia presuntiva de la presencia de anticuerpos de la clase IgG.

Desarrollo

Materiales:

- Micropipetas de 10-100 µl.
- Gradillas.
- Caja de lectura o aglutinoscopio (aproximadamente de 45 cm de largo x 35 cm de ancho x 15 cm de profundidad) con tapa. La caja debe estar iluminada de modo que la luz incida oblicuamente y por debajo (cubiertas parcialmente). El interior de la caja debe pintarse de negro opaco.
- Tubos de serología: tipo Wasserman de 13 por 100 mm o tubos de Khan de vidrio.
- Probetas (100 ml y 1000 ml).
- Pipetas 1, 2, 5 y 10ml.
- Recipientes de vidrio de volúmenes variados.
- Propipetas.
- Dispensador automático o pipetas graduadas de 1-10 ml.





Equipos:

- Heladera con temperatura controlada (5 ± 3 °C).
- Freezer con temperatura controlada (-20 ± 5 °C).
- Estufa con temperatura controlada (37 ± 2 °C).
- Balanza.
- Vórtex.
- Centrífuga.
- Timer.
- Termómetro calibrado.

Reactivos:

1. Antígeno SAT, volumen celular aprox.4.5%.⁴
2. Suero control interno positivo.
3. Suero control interno negativo.

Cada laboratorio debe preparar sus sueros controles internos de trabajo **positivo** (determinar el título) y **negativo**, codificarlos, utilizarlos cada día de trabajo y registrarlos.

Drogas y soluciones⁵:

- Cloruro de sodio p.a.
- Fenol p.a.
- 2-mercaptoethanol p.a.
- Solución salina al 0,85 %.
- Solución salina fenolada al 0,5 %.

Ejecución del ensayo

Ambas pruebas (SAT y 2-ME) se realizan simultáneamente procediendo de la siguiente manera:

- Descongelar y mezclar bien los sueros utilizando vórtex.
- Llevar las muestras de suero y de antígeno a temperatura ambiente 22 ± 4 °C al menos una hora antes de la ejecución del ensayo.
- Garantizar la homogeneización del antígeno, agitando suavemente por inversión durante no menos de 10 minutos (no usar vórtex).
- Por cada muestra de suero problema positivo a BPAT, colocar en una gradilla 1 hilera de 8 tubos de 13 x 100 mm o tubos de Khan. Identificar la gradilla con el número de protocolo.
- Identificar el primer tubo de cada hilera con el número correspondiente al suero problema. En los primeros 4 tubos se realiza la prueba de SAT; se deja un espacio libre y en los 4 tubos siguientes de la misma hilera, se realiza la prueba de 2-ME.
- Por cada muestra de suero debidamente identificada, se utilizan tubos en los cuales se dispensa con micropipeta 80 µl de suero en el fondo del primer tubo, 40 µl se distribuyen en el segundo tubo, 20 µl en el tercero y 10 µl en el cuarto.
- Repetir el procedimiento descripto para depositar las mismas cantidades de suero en los tubos de 2-ME.

⁴ Conservar el antígeno en la heladera a 5 ± 3 °C. No se debe congelar porque esto lo inutiliza al modificar la sensibilidad.

⁵ Tener copia impresa de la hoja de seguridad de cada droga.



- Incluir un suero control interno **positivo** (título conocido) y **negativo**, además de un control de soluciones y antígeno sin suero.
- Con un dispensador automático o con micropipeta de 1 ml, agregar 1 ml de solución de 2-ME (0,1 M) en cada tubo de este grupo y mezclar muy bien agitando la gradilla.
- Con un dispensador automático o con micropipeta de 1 ml, agregar 1 ml de solución salina fenolada al 0,5 % a cada uno de los tubos del grupo de SAT.
- Dejar las gradillas con las mezclas durante 45 a 60 minutos a temperatura ambiente 22 ± 4 °C y, posteriormente, dispensar a cada tubo 1 ml de antígeno de SAT diluido al 2 % (0,09 % de brucelas) en solución salina 0,85 %.
- Mezclar bien agitando la gradilla y llevar a estufa.



Consideraciones generales:

- Las muestras que resulten positivas a BPAT o RBT deben confirmarse por las técnicas de SAT y 2-mercaptoethanol, ELISA, FPA o FCT.
- La existencia de hemólisis excluye el empleo del método de tubo y placa. La presencia de hemólisis en las muestras de suero interfiere en la prueba de aglutinación en tubo, no solo porque la coloración puede enmascarar la reacción de aglutinación, sino porque se forma un precipitado como resultado de la acción del fenol que contiene la solución de antígeno sobre la hemoglobina libre. Es muy difícil distinguir esta falsa reacción de la aglutinación específica de la unión antígeno-anticuerpo.

Incubación

La incubación se realiza a 37 ± 2 °C durante 40-48 horas y tiene por objeto obtener en el tiempo más corto posible el máximo de aglutinación.

Se recomienda tomar y registrar las temperaturas máximas y mínimas de la estufa durante el transcurso de las 40-48 horas de la incubación, para verificar la estabilidad de la estufa.

Lectura e interpretación de resultados

Una vez finalizada la incubación de las muestras, se realiza la lectura de las pruebas contra el fondo negro opaco de la caja de lectura o aglutinoscopio, iluminada desde atrás con una fuerte luz que atraviese los tubos.

La aglutinación del complejo antígeno-anticuerpo bajo la forma de grumos y su depósito en el fondo del tubo por gravedad determina la clarificación de la columna de líquido en el tubo; después de una leve agitación del tubo, se mantienen los grumos firmes.

La aglutinación es el resultado directo de la unión específica de los anticuerpos presentes en el suero, con las Brucellas inactivadas contenidas en el antígeno. Las determinaciones se deben basar tanto en la claridad/turbidez de las





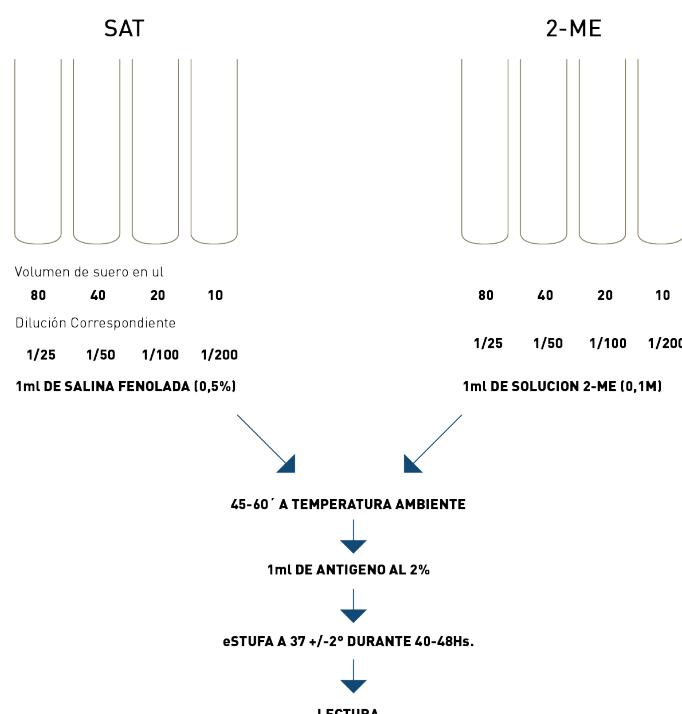
mezclas como en el grado de aglutinación y la firmeza de los grumos al agitar suavemente el tubo.

El título se determina por la inversa de la dilución más alta donde se observa aglutinación en el tubo, en el que se presenta una disminución evidente de la turbidez y los grumos firmes se mantienen a pesar de una agitación leve. Si esto ocurre, por ejemplo, en los 3 primeros tubos solamente, el título del suero (recíproco de la dilución) es de 100 UI / ml de aglutinación en SAT o en 2-ME. El grado de aglutinación en cada una de las distintas diluciones puede clasificarse como **completo (+)**, **incompleto (I)** o **negativo (-)**.

- **Aglutinación completa** es aquella en que el líquido de la mezcla suero-antígeno aparece límpido, translúcido y la agitación suave no rompe los grumos.
- **Aglutinación incompleta** es la que muestra la mezcla suero-antígeno parcialmente turbia y una suave agitación no rompe los grumos.
- **Negativa** es aquella en que la mezcla suero-antígeno no evidencia aglutinación, la columna líquida aparece turbia y una suave agitación no revela grumos.

Fenómeno de zona

En ciertas ocasiones, puede ocurrir que se encuentre aglutinación en las diluciones más altas, pero no en las diluciones más bajas. Esta inhibición de la aglutinación en las diluciones bajas es llamada “fenómeno de zona” y está asociado a un exceso en la concentración de anticuerpos en el suero en las diluciones más bajas, lo que provoca una aglutinación no visible por estar fuera de la zona de equivalencia de la unión antígeno-anticuerpo.



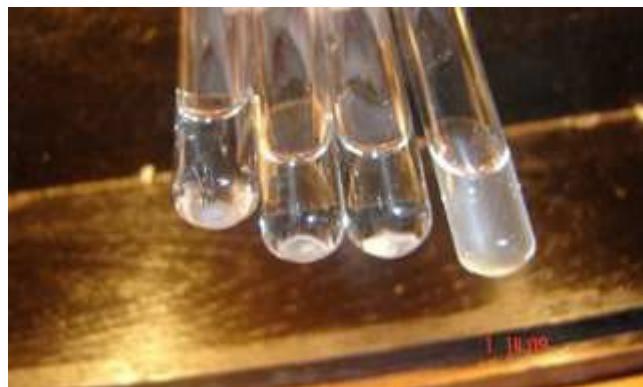


Figura 4: Esquema Prueba simultánea de SAT y 2-ME.

Informes de resultados

Ejemplo:

| Negativo | |
|----------|--|
| - | |
| Neg | |
| I 25 | |
| 25 | |
| 1/25 | |

I: Incompleto

Tabla 2

Interpretación de los resultados para hembras bovinas mayores de 18 meses de edad vacunadas con *Brucella abortus* cepa 19 entre los 3 a 8 meses de edad

| BPAT | SAT | 2-ME | INTERPRETACIÓN |
|------|---------|--------|----------------|
| - | NH * | NH | NEGATIVO |
| + | ≤ 50 | - | NEGATIVO |
| + | I 100 | - | SOSPECHOSO |
| + | 100 | - | SOSPECHOSO |
| + | I 200 | - | SOSPECHOSO |
| + | 200 | - | POSITIVO |
| + | 25 a 50 | I 25 | NEGATIVO |
| + | ≤ 25 | ≤ 25 | NEGATIVO |
| + | ≥ 150 | ≥ I 50 | POSITIVO |

* NH: No se hace

**Tabla 3**

Interpretación de los resultados para animales no vacunados (bovinos y otras especies) mayores de 6 meses de edad

| BPAT | SAT | 2-ME | INTERPRETACIÓN |
|------|------|------|----------------|
| - | NH | NH | NEGATIVO |
| + | 25 | - | NEGATIVO |
| + | 150 | - | SOSPECHOSO |
| + | 50 | - | SOSPECHOSO |
| + | 100 | - | SOSPECHOSO |
| + | 100 | - | POSITIVO |
| + | 200 | - | POSITIVO |
| + | ≥ 25 | ≥ 25 | POSITIVO |

Preparación de soluciones para las pruebas de SAT/2-ME

Solución salina 0,14 M

- Cloruro de sodio 8,5 g
- Agua destilada 1000 ml

Solución salina fenolada

Solución salina 0,14 M con la adición de 0,5 % de fenol. Conservar a temperatura ambiente por un plazo de 30 días. **Se recomienda preparar el volumen necesario de trabajo diario o semanal.**

Solución 2-ME 0,1 M

- 2-Mercaptoethanol 7,8 ml
- Solución salina 0,14 M. 992,2 ml

Importante: no utilizar solución salina fenolada

El 2-mercaptoethanol es sensible a la luz y al calor y se deteriora rápidamente por exposición al aire. **Se debe conservar en frasco color ámbar herméticamente cerrado a temperatura ambiente (22 ± 4 °C).**

Leer detenidamente la hoja de seguridad. Evitar la inhalación, manipularlo en lo posible con máscara de gases o en cabina de extracción. **Nunca pipetejar con la boca.**

La solución de 2-mercaptoethanol ya preparada se puede conservar por una semana a temperatura ambiente (22 ± 4 °C). **Se recomienda preparar el volumen necesario de trabajo diario o semanal.**

- Solución de antígeno SAT (wright) al 2 %
- Solución salina 0,14 M (no utilizar solución salina fenolada) 98 ml
- Antígeno SAT (wright) (4,5 %) 2 ml



La solución de antígeno al 2 % se puede conservar por una semana en heladera (5 ± 3 °C). Descartar toda aquella solución que presente turbidez o signos de contaminación.

Prueba del anillo en leche (PAL o MRT) solo para bovinos

La prueba se diseñó para detectar la presencia de anticuerpos en leche de bovinos. Estos anticuerpos reaccionan con el antígeno coloreado con hematoxilina formando un complejo antígeno anticuerpo que queda adherido a la superficie de los glóbulos grasos y asciende con ellos a la superficie, de esta manera forma una capa o anillo de crema de color púrpura azulada, de intensidad variable según el grado de la reacción. Paralelamente, desaparece parcial o totalmente la tinción de la columna de leche. Si la muestra no contiene anticuerpos específicos, el antígeno no se fijará a los glóbulos grasos y permanecerá uniformemente distribuido, coloreando la columna de leche, mientras que la capa de crema forma un anillo de color blanco natural.

Esta prueba se usa especialmente como diagnóstico presuntivo para detectar rebaños infectados. También se emplea en la vigilancia epidemiológica en áreas de control de la brucellosis.

El porcentaje de grasa de la muestra influye en la prueba, ya que la formación del anillo de crema en la superficie dependerá del tenor graso.

Los animales de rebaños positivos a la prueba de anillo en leche deben ser examinados por las pruebas serológicas para identificar aquellos infectados.

Desarrollo

Materiales:

- Tubos de serología: tipo Wassermann de 13 mm por 100 mm, o tubos de Khan de vidrio claro y completamente limpio.
- Pipetas 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml.
- Micropipetas de 10 a 100 μ l y 1 ml.
- Gradillas.
- Timer.

Equipos:

- Heladera con temperatura controlada (5 ± 3 °C).
- Estufa con temperatura controlada (37 ± 2 °C).
- Termómetro calibrado.

Reactivos:

- Antígeno PAL con volumen celular aprox.4 %.
- Conservar el antígeno en la heladera a 5 ± 3 °C. No se debe congelar, lo cual lo inutiliza, ya que se modifica la sensibilidad.
- Muestras de leche refrigerada (no congelada).
- Solución de formalina 1 %.
- Muestras de leche controles positivo y negativo.



Ejecución del ensayo

Las muestras de leche se deben mantener en refrigeración a una temperatura de 5 ± 3 °C hasta que hayan transcurrido no menos de 24 horas desde su recolección (preferiblemente, 48 a 72 horas). No deben haber sido congeladas, calentadas, sometidas a agitación violenta ni conservadas durante más de 72 horas.

- Llevar las muestras de leche y antígeno a temperatura ambiente (22 ± 4 °C) como mínimo unos 45-60 minutos previos a la realización del ensayo. Mezclar cada muestra invirtiendo varias veces el recipiente (tubo o frasco).
- Garantizar la homogeneización del antígeno, agitando suavemente por inversión durante no menos 10 minutos (no usar vórtex).
- Colocar 1 ml de la muestra en un tubo de vidrio 13 x 100 mm o tubo de Khan. La altura de la columna de leche en el tubo debe ser como mínimo de 25 mm.
- Agregar 30 µl de antígeno a cada tubo. Mezclar bien invirtiendo el tubo varias veces, sin que se llegue a formar espuma. No debe quedar antígeno sobre las paredes.
- Incubar en estufa a 37 ± 2 °C, durante una hora.

Lectura

- Anillo de crema, blanco; columna de leche, azul.
- + Anillo de crema y columna de crema, del mismo color, o casi igual.
- ++ Anillo de crema de color más pronunciado que la columna de leche.
- +++ Anillo de crema, azul oscuro; la columna de leche tiene aún un poco de color.
- ++++ Anillo de crema, azul oscuro; la columna de leche es blanca.

Cualquier grado de + debe interpretarse como **positivo**.

Observaciones

- El exceso o la escasez de crema dificultan la interpretación de la prueba. También, la agitación vigorosa dificulta su realización.
- El calentamiento de la leche interfiere con los resultados; por lo tanto, la prueba no se puede efectuar con leches pasteurizadas.
- Cuando la prueba se efectúa el mismo día en que se ha recolectando la leche, se pueden obtener algunos resultados falsos positivos o dudosos.
- La leche de calostro puede dar resultados falsos positivos.
- La leche de vacas con mastitis también puede dar falsos positivos o impedir la interpretación de la prueba debido al descoloramiento del antígeno.
- La leche de vacas próximas a secarse puede dar resultados dudosos o falsos positivos.
- Hay vacas infectadas con *Brucella* que no eliminan anticuerpos por la leche. Estas vacas son positivas en las pruebas de sangre y negativas en la prueba del anillo.





Modificación de la prueba para tanques muy grandes

Para hacer más sensible la prueba, aumentar la cantidad de leche manteniendo constante la cantidad del antígeno (30 µl).

Cuando se ajusta la PAL para aplicarla a rebaños de gran tamaño (2 o 3 ml de leche), se añaden 0,1 ml de una mezcla de crema negativa no pasteurizada al tubo de ensayo y, a continuación, 30 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 PAL no ajustada. La mezcla de crema 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 brucelosis.

| | |
|-----------------|---------------|
| < 150 vacas | 1 ml de leche |
| 150 – 450 vacas | 2 ml de leche |
| 451- 700 vacas | 3 ml de leche |

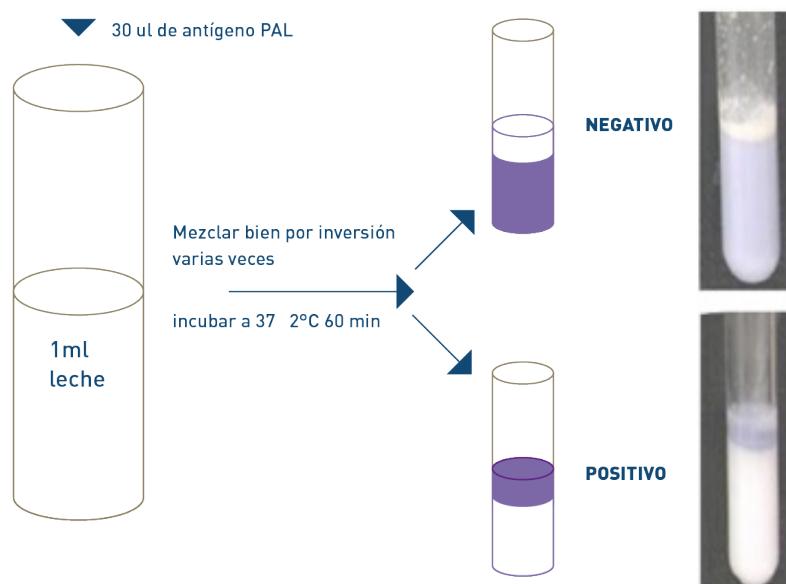


Figura 5: Prueba de vigilancia epidemiológica para muestras de pool de leche.

Enzimoinmunoensayo indirecto (I ELISA) (para suero o leche)

Se realiza siguiendo el protocolo de los kits comerciales validados y aprobados para el diagnóstico oficial de la brucelosis en la República Argentina con el valor de corte establecido por el Senasa.

El enzimoinmunoensayo (ELISA) es un método empleado habitualmente para la detección o cuantificación de sustancias, generalmente proteínas, que se encuentran en concentraciones muy bajas. El método combina la especificidad de unión de los anticuerpos con la amplificación de “señal” que brindan las reacciones catalizadas por enzimas. En la práctica clínica es la técnica inmunológica más empleada. Se utiliza para cuantificar, entre otras cosas,





hormonas, marcadores tumorales, para determinar la presencia de antígenos microbianos y para la determinación cualitativa o cuantitativa de anticuerpos totales o frente a algún antígeno en particular.

Etapas

Previo al inicio de la ejecución del ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura del laboratorio.

1. Adición en cada pocillo de los controles y sueros/leche problemas en la dilución indicada en el protocolo, de tal forma que si hay presencia de anticuerpos, estos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte.
2. Incubación.
3. Lavado para eliminar los anticuerpos que no se hayan pegado al antígeno o uniones inespecíficas. Es importante que la placa no se seque, lo que podría incrementar la actividad inespecífica del ensayo.
4. Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima (generalmente anti IgG de especie), los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos.
5. Incubación.
6. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados (conjugado) que no hayan reaccionado.
7. Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora.
8. Adición de la solución de frenado.
9. Lectura colorimétrica de la placa.

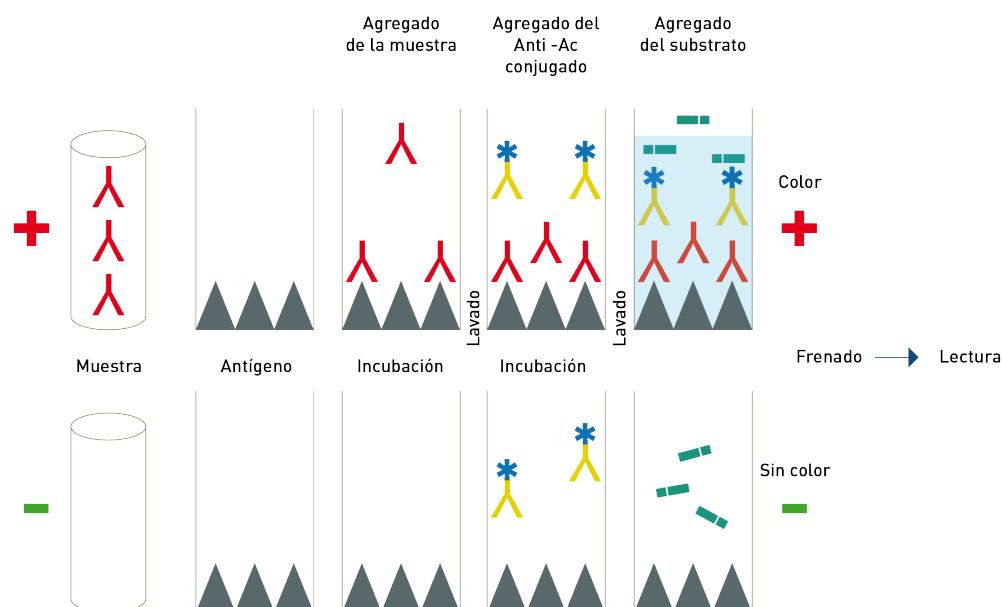


Figura 6: Esquema ELISA indirecto.

Desarrollo

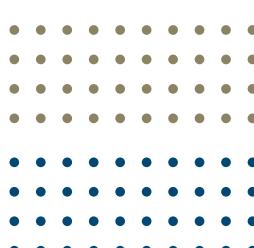
Materiales y equipamiento:

- Lector de placas automático con filtros (405 nm, 414 nm, 450 nm).
- Computadora.
- Agitador orbital de placas.
- Lavador manual o automático de placas.
- Heladera (5 ± 3 °C) y freezer (-20 ± 5 °C).
- Estufa de incubación (37 ± 2 °C).
- Vortex.
- Sistema purificador de agua (mínima calidad de agua requerida: destilada o desionizada).
- Micropipetas monocanal de volumen variable (0,5 – 10 µl, 5 - 50 µl, 50 -200 µl, 200 - 1000 µl).
- Micropipetas multicanal de volumen variable (5 - 50 µl, 30 -300 µl).
- Propipetas.
- Dispensadores automáticos.
- Timer.
- Selladores de placas de acetato o parafilm.
- Cubetas plásticas para pipetas multicanales.
- Microtubos (para realizar las diluciones previas de los sueros), tubos o placas fondo en U.
- Criotubos de polipropileno para el almacenamiento de los sueros.
- Gradillas.
- Material de vidrio (probetas, pipetas, erlenmeyers, etc., de distintos volúmenes).
- Toallas o papel absorbente.

Reactivos:

Están incluidos en los kits comerciales autorizados por el Senasa y contienen:

- Buffer de lavado
- Buffer de dilución
- Conjugado
- Sustrato cromógeno
- Solución de frenado
- Sueros controles
- Placas o tiras de 8 pocillos con el Ag pegado



Precauciones para tener en cuenta al ejecutar la técnica de Elisa:

- Seguir expresamente las instrucciones del kit para la preparación de todos los reactivos.
- Ambientar los reactivos del kit a temperatura ambiente por lo menos una hora antes de su utilización.
- No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes lotes o kits.
- Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
- No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
- Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra y reactivo.
- Utilizar agua desionizada o destilada para la preparación / dilución de los reactivos que se empleen en el ensayo.
- Corroborar que el lector de placas posee el filtro con el cual se debe leer la placa y seguir las instrucciones de uso del equipo.
- Se recomienda trabajar las muestras por duplicado, para verificar la repetibilidad del operador.
- Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
- El sustrato es extremadamente sensible a la luz y a las contaminaciones, por lo que, se recomienda retirar del frasco únicamente el volumen que se vaya a utilizar y nunca devolver el sustrato sobrante al frasco original.
- La solución de frenado es un ácido fuerte. En caso de contacto con la piel lavar inmediatamente con abundante agua.

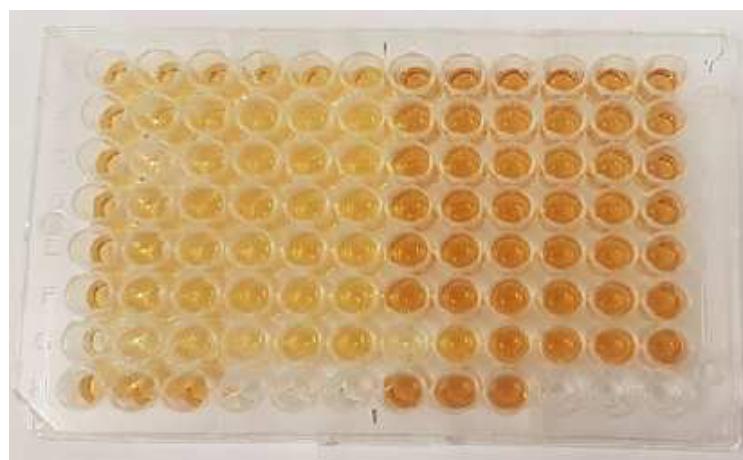


Figura 7: Placa de Elisa.





ELISA por competición / bloqueo

La técnica consiste en la adsorción del antígeno lipopolisacárido liso (LPS-l) de *Brucella* sobre una matriz sólida (microplaca de 96 pocillos). A continuación, se añade la dilución de los sueros y el anticuerpo monoclonal, específico para un epitope de la cadena O del LPS-l. Se mezclan los dos junto con el antígeno adherido y se dejan incubar. Después de la incubación, se lava la microplaca y a continuación se añade el conjugado de anticuerpo antimonomoclonal conjugado con enzima. Es importante mencionar que el anticuerpo del conjugado ha sido previamente adsorbido con suero normal (no infectado) de bovino, equino y humano para reducir las reacciones inespecíficas entre especies. La etapa final de la prueba es la adición de la solución substrato/cromógeno. Después de un periodo de tiempo fijo, se frena la reacción y se mide fotométricamente. Entre cada uno de los pasos del ensayo la placa debe ser lavada debidamente.



En la ausencia de anticuerpos anti *Brucella* en los sueros problemas (sueros negativos), el anticuerpo monoclonal se liga con el epitope de la cadena O del LPS-l, lo cual es indicado en la prueba por el desarrollo de color. En el caso que el suero problema contenga anticuerpos anti *Brucella* (suero positivo), estos compiten con el anticuerpo monoclonal por sitios del epitope e inhiben el enlace del anticuerpo monoclonal con la porción de cadena O del LPS-l, manifestándose por la ausencia de color en el ensayo. Los sueros con anticuerpos posvacunales por *B. abortus* cepa 19 compiten en menor grado con el anticuerpo monoclonal porque su afinidad, especificidad y concentración es baja, lo que usualmente resulta en una reacción negativa (excepto los animales vacunados en los tres meses anteriores al sangrado).

Diversos CELISA/bloqueo comerciales se encuentran disponibles en el mercado. En el caso del Elisa de bloqueo, sobre las placas con el LPS de *Brucella abortus* pegado, se depositan las muestras de suero, las cuales en el caso de contener anticuerpos específicos se unirán al antígeno. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade el anticuerpo monoclonal específico del LPS (epítope C) conjugado con una enzima. En el caso de que las muestras contengan anticuerpos frente a LPS, estos no permitirán la unión del conjugado, mientras que, si las muestras no contienen este tipo de anticuerpos, el conjugado se unirá libremente al antígeno de la placa.

Tras sucesivos lavados para eliminar el material no unido, podremos revelar las reacciones acontecidas en la placa mediante la adición del sustrato adecuado, el cual desarrollará una reacción colorimétrica en presencia de la enzima (es decir en presencia del monoclonal conjugado con enzima). De este modo la aparición de una reacción coloreada, indicará que la muestra evaluada no contiene anticuerpos específicos del LPS de *Brucella spp.* y la ausencia de color indicará que la muestra es positiva y contiene dichos anticuerpos.

Desarrollo

Materiales y equipamiento, reactivos, cuidados y precauciones, manejo y conservación de las muestras: Idem Elisa indirecto.



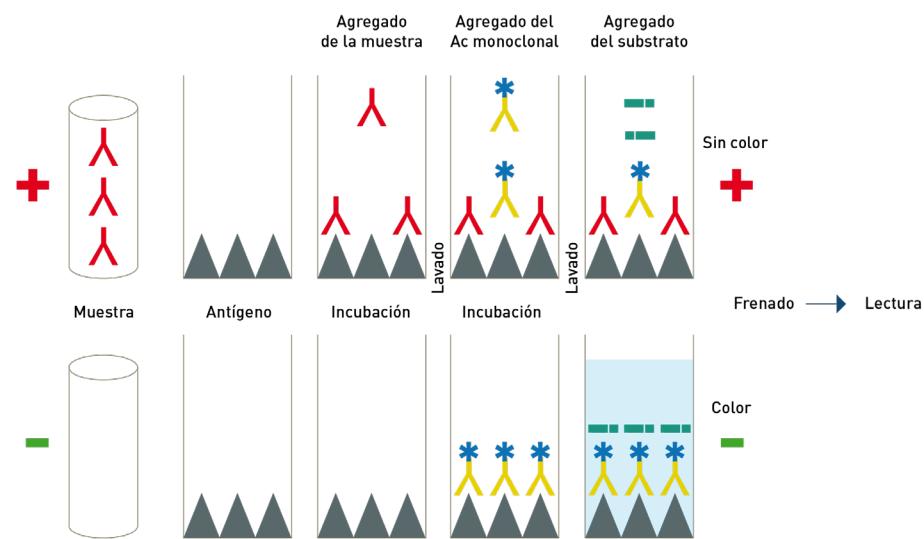


Figura 8: CELISA.

Tabla 4

Guía de problemas y soluciones en la técnica de ELISA

| Señal | Possible causa | Solución |
|-------------------------------------|--|---|
| Color irregular | 1. Error de pipeteo 2. Falta de mezcla de reactivos 3. Falta de lavados | Práctica Mejorar técnica Precaución |
| No hay color | 1. Se omitió el substrato 2. Concentración substrato errónea 3. Conjugado muy diluido 4. Se omitió el conjugado | Revisar Revisar Revisar Revisar |
| Color parejo en toda la placa | 1. Conjugado muy concentrado 2. Falla en el lavado 3. Substrato contaminado | Controlar Mejorar técnica Revisar |
| Elevado color de fondo "background" | 1. Reacción inespecífica 2. Material de vidrio sucio 3. Agua de mala calidad | Cambiar solución de lavado Mejorar lavado Controlar calidad |
| Desarrollo de color muy rápido | 1. Substrato muy concentrado 2. Conjugado muy concentrado | Revisar Controlar dilución |
| Desarrollo de color muy lento | 1. Substrato muy diluido 2. Conjugado muy diluido 3. Concentración cromógeno errónea | Revisar Revisar dilución Revisar |
| Efecto borde | 1. Incubación despareja 2. Resecación por aire 3. Tampón de lavado residual | Utilizar estufa Mantener la placa cubierta Eliminarlo |



| | | | | | | | | | | | | |
|--|---|----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
|  DIRECCIÓN DE LABORATORIOS Y CONTROL TÉCNICO | | Protocolo ELISA brucelosis | | | | | | | | | | |
| <p>Fecha: _____</p> <p>Temperatura ambiente: _____</p> <p>Analista: _____</p> <p>Marca del kit: _____</p> <p>Tipo de Elisa:</p> <ul style="list-style-type: none"><input type="checkbox"/> Competencia<input type="checkbox"/> Indirecto<input type="checkbox"/> Bloqueo<input type="checkbox"/> Otros <p>Matriz:</p> <ul style="list-style-type: none"><input type="checkbox"/> Suero<input type="checkbox"/> Leche<input type="checkbox"/> Otros <p>Número de lote: _____</p> <p>Vencimiento: _____</p> <p>Fecha apertura kit: _____</p> <p>N.º placa: _____</p> <p>Muestras: _____</p> <p>Protocolo N.º: _____</p> | | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |
| <p style="text-align: right;">Firma operador</p> | | | | | | | | | | | | |

Figura 9: Modelo de protocolo de Trabajo ELISA.



Ensayo de polarización fluorescente para la detección de anticuerpos contra *Brucella* en suero

El ensayo de polarización fluorescente (FPA) para la detección de anticuerpos contra *Brucella* tiene la capacidad de ser una prueba multiespecies, lo que permite el diagnóstico presuntivo en bovinos, porcinos, caprinos, ovinos, ciervos y bisontes.

Este ensayo, validado para bovinos, tiene la capacidad de distinguir animales infectados con *Brucella* de los animales vacunados con *B. abortus* cepa 19 a partir de los 3 meses posvacunación aproximadamente, y de los animales con reacción cruzada con bacterias gramnegativas en más del 90% de los casos.

A diferencia de los enzimoinimunoensayos, el FPA es un ensayo homogéneo que no requiere la necesidad de varias etapas de lavado. Los reactivos son agregados secuencialmente en solución y el tiempo total de la prueba no excede los 5 minutos para cada muestra. En resumen, la prueba involucra la adición de una determinada cantidad de suero a una solución tampón de dilución en un tubo de vidrio. A continuación, la muestra es equilibrada por aproximadamente cinco minutos, posteriormente se realiza una primera lectura en el analizador fluorescente para obtener una lectura blanco de referencia (autofluorescente).

A continuación, el antígeno conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) es agregado a la solución y luego la muestra es equilibrada nuevamente por un mínimo de dos minutos para permitir que el antígeno y el anticuerpo interactúen. La muestra es leída nuevamente en el polarizador. Si anticuerpos específicos contra *Brucella* están presente (suero positivo), el resultado será un valor alto de unidades de mili polarización (mP). En ausencia de anticuerpos anti *Brucella* (suero negativo), el resultado es un valor bajo en mP.

El valor de corte para distintas especies animales para la República Argentina se ha determinado en:

Bovinos:

- Animales negativos: < 94 mP.
- Animales sospechosos: Los valores entre 94 mP y 104 mP.
- Animales positivos: valores igual o mayor a 105 mP.

Caprinos y porcinos:

- Animales negativos: < 85 mP.
- Animales positivos: valores igual o mayor a 85 mP.

Ovinos (para el diagnóstico de *B. melitensis*, **no para *B. ovis*):**

- Animales negativos: < 80 mP.
- Animales sospechosos: Los valores entre 80 mP y 90 mP.
- Animales positivos: valores igual o mayor a 91 mP.

*Se modifica el valor de corte en la especie ovina (para el diagnóstico de *B. melitensis*, no para *B. ovis*) con una sensibilidad del 97 % y una especificidad del 95 %. Programa GraphPad Prism.*





Desarrollo

Materiales y equipamiento:

- Lector de polarización fluorescente.
- Vórtex.
- Micropipetas monocanal de volumen variable (0,1– 10 μ l, 20 –200 μ l, 200–1000 μ l).
- Heladera (5 ± 3 °C) y freezer (-20 ± 5 °C).
- Tubos de vidrio: Tubos de borosilicato de 10 x 75 mm.
- Material de vidrio.
- Termómetro de temperatura ambiental.
- Computadora e impresora.

Reactivos:

Están incluidos en los kits comerciales autorizados por el Senasa e incluyen:

- Buffer de dilución.
- Sueros controles positivo y negativo.
- Antígeno marcado con isotiocionato de fluoresceína.

Ejecución del ensayo

Preparación de los reactivos

Se deben seguir las instrucciones del prospecto que acompaña al kit comercial.

Preparación del equipamiento/instrumentos

El usuario debe leer el manual de instrucciones y familiarizarse con los controles de los instrumentos, calibración y la solución de los problemas de todos los equipos previos a la ejecución del ensayo.

Preparación de la prueba

En el día de la prueba preparar y analizar los sueros controles, siguiendo con lo especificado en los puntos indicados a continuación. Si el valor de mP de los sueros controles no se ajusta dentro de los límites especificados, el ensayo debe ser rechazado.

Dejar a temperatura ambiente los reactivos, sueros controles y problemas por lo menos dos (2) horas antes de su uso. Se debe controlar y registrar en la planilla de trabajo la temperatura ambiente al momento del ensayo.

Encender el equipo y seguir las instrucciones de uso:

- Para bovinos dispensar 990 μ l de la solución tampón de dilución de sueros en los tubos de vidrio de borosilicato (10x 75mm).
- Dispensar 10 μ l de suero bovino (dilución 1/100) a analizar dentro de los tubos y mezclar bien con vórtex evitando la formación de espuma.
- Para porcinos y caprinos dispensar 960 μ l de la solución tampón de dilución de sueros en los tubos de vidrio de borosilicato (10x 75mm).
- Dispensar 40 μ l de suero porcino o caprino (dilución 1/25) a analizar dentro de los tubos y mezclar bien con vórtex.
- Para ovinos (*B. melitensis*) dispensar 975 μ l de la solución tampón de dilución de sueros.
- Dispensar 25 μ l de suero ovino (dilución 1/40).





- Esperar como mínimo cinco minutos a que la solución suero-Buffer se estabilice.
- Continuado el período de equilibración, realizar la lectura blanco de las muestras.
- Dispensar 10 μ l de antígeno conjugado con FITC determinado en cada tubo y mezclar bien con vórtex.

Es importante evitar la formación de espuma en la muestra.

En caso de que el suero se vea contaminado con partículas en suspensión, dejar el suero equilibrarse por lo menos 10 minutos para asegurarse que estas partículas hayan sedimentado o centrifugado el mismo. Las partículas inespecíficas pueden interferir con la lectura de la muestra dado que la misma se basa en el peso molecular de las partículas en suspensión.

- Dejar que la muestra y el antígeno se equilibren por lo menos por dos minutos.
- Leer las muestras exactamente en el mismo orden que fueron blanqueadas.

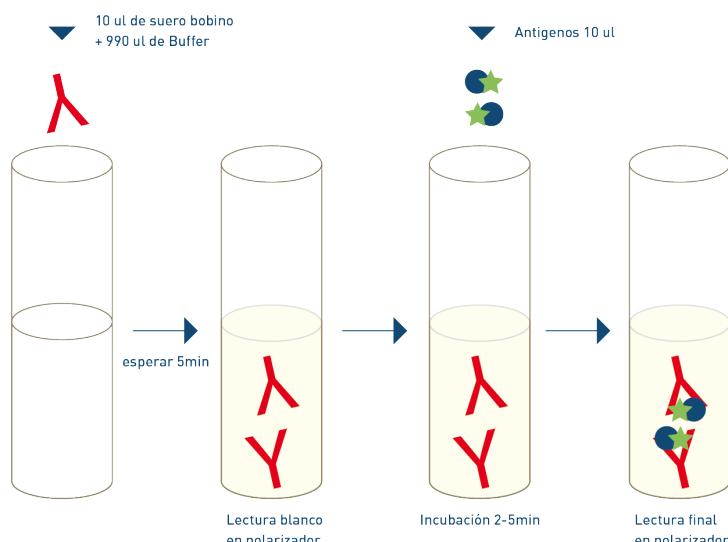


Figura 10: Esquema ensayo de polarización fluorescente.

Lectura e interpretación

Los sueros controles del ensayo deben estar dentro de los límites especificados por el fabricante del kit utilizado según el control de calidad desarrollados durante la estandarización, optimización e implementación del ensayo.

Los resultados de los sueros controles y problemas son expresados en unidades de mili polarización (mP) de la actividad del suero contra el antígeno.

Se debe controlar y registrar en la planilla de trabajo la temperatura ambiente al momento del ensayo.

Aceptación de los controles

Si los valores de mP de los sueros controles están fuera de los límites especificados, la prueba será rechazada y los controles y las muestras deben ser repetidas.





Fijación de complemento

La fijación del complemento (FCT) es la prueba de referencia internacional para el diagnóstico serológico de la brucellosis bovina, ovina y caprina.

La prueba permite la detección y cuantificación relativa de los anticuerpos específicos antibrucellosos “capaces de fijar” el complemento (IgG1 y algunas IgM específicas), cuya presencia en determinados niveles posee una gran correlación con el estado de “Animal infectado”.

La FCT es una prueba confirmatoria ampliamente usada y aceptada pese a la complejidad de su realización y a la necesidad de buenas instalaciones y personal entrenado para titular y mantener los reactivos adecuadamente.

La técnica se desarrolla en dos etapas: **en la primera**, el antígeno y el suero problema (cuyo complemento se destruyó previamente por calentamiento a baño maría) se incuba en presencia de complemento de cobayo. Después de dejar reaccionar la mezcla de reactivos, se mide **en la segunda etapa** la cantidad de complemento libre (que indica la ausencia o presencia de anticuerpos antibrucelares en suero y su cantidad) mediante la incorporación de un “sistema indicador” o “sistema hemolítico” formado por eritrocitos de carneros recubiertos de anticuerpos de conejo (hemolisina) como complejo antígeno-anticuerpo alternativo.

La presencia de anticuerpos en el suero problema induce la formación de inmunocomplejos en la primera etapa de la reacción que determina la activación del sistema complemento y el agotamiento de sus factores. En la segunda etapa de la reacción no existe complemento libre que pueda activarse ante la presencia del “sistema hemolítico”. El resultado es la ausencia de hemólisis (resultado positivo). Alternativamente, la lisis de los eritrocitos (hemólisis) es indicadora de la existencia de complemento libre en la segunda etapa de la reacción, que no se agotó en la primera por no haberse formado inmunocomplejos ante la ausencia de anticuerpos antibrucelares (resultado negativo).

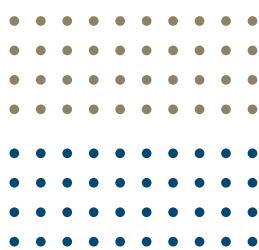
Se han propuesto varios métodos para FCT que utilizan diferentes concentraciones de eritrocitos de oveja (GR) frescos o conservados (normalmente se recomienda una suspensión al 2 %, 2,5 % o al 3 %). Los GR están sensibilizados con un volumen igual de suero anti-GR de conejo diluido (hemolisina) hasta contener varias veces (en general de dos a cinco veces) la concentración mínima necesaria para producir un 100 % de lisis de los GR en presencia de soluciones titulada de complemento de cobayo.

Desarrollo

Materiales:

- Tubos de ensayo.
- Material de vidrio de volúmenes varios.
- Gradillas.
- Film para cubrir placas.
- Puntas de pipetas (tips).
- Placas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en U.
- Cubetas o reservorios de plástico para reactivos.





Equipos:

- Pipetas monocanales con rangos de 2 μ l a 20 μ l, 20 μ l a 200 μ l y 500 μ l a 5000 μ l.
- Pipetas multicanales de rango 20 μ l a 200 μ l.
- Centrífuga.
- Centrífuga de placas.
- Estufa con temperatura controlada (37 ± 2 °C).
- Heladera con temperatura controlada (5 ± 3 °C).
- Freezer con temperatura controlada (-20 ± 5 °C).
- Agitador de microplacas.
- Vórtex.
- Baño térmico.
- Espectrofotómetro.

Reactivos:

- Solución buffer: Ver Anexo FCT I Solución GR 2%: ver Anexo FCT II Titulación Hemolisina: Ver Anexo FCT III Sistema hemolítico Anexo FCT IV
- Titulación Complemento: Ver Anexo FCT V Titulación Antígeno: Ver Anexo FCT VI

Sueros controles:

- Suero control positivo bovino.
- Suero control negativo bovino.

Manejo y conservación de las muestras

- Conservar los sueros en heladera (5 ± 3 °C) no más de dos días, para períodos mayores, conservarlos a -20 ± 5 °C.
- Evitar repetidos ciclos de congelamiento/ descongelamiento.
- No usar sueros contaminados, que presenten precipitados o intensa hemólisis.
- Homogeneizar con el uso de vórtex los sueros antes de usarlos.

Inactivación de los sueros

Los sueros controles y las muestras de suero se inactivan 30 minutos en baño termostático a 58 ± 2 °C para eliminar el complemento natural contenido en las mismas. La temperatura del baño termostático se controla mediante la introducción de un termómetro certificado en el agua durante todo el tiempo de exposición de las muestras.

- Los sueros ovinos se inactivan por 30 minutos en baño termostático entre 60 - 63 °C (en caso de que los sueros sean anticomplementarios, se recomienda realizar otro ciclo de inactivación de 30 minutos).
- Las muestras podrán ser sumergidas en el baño termostático en tubos de ensayo tapados herméticamente, contenidos en gradillas, debidamente identificados. Volumen de suero sugerido para inactivar: 200 μ l.
- La inactivación de las muestras podrá realizarse un día antes del análisis. En este caso, una vez retiradas del baño termostático se dejan a tem-





peratura ambiente durante al menos 30 minutos para luego conservar en heladera. Si el análisis se realiza después de las 24 horas, las muestras ya inactivadas se conservan a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Condiciones del ensayo

El procedimiento se desarrolla en caliente (incubación en estufa a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y se utilizan los siguientes reactivos en volúmenes de 25 μl :

- Diluciones en base 2, a partir de 1/2 de los sueros problemas en SB.
- Solución de complemento de cobayo en SB que contenga 2 UC (100 %).
- Solución de antígeno en SB a la dilución de trabajo.
- Sistema hemolítico obtenido por la mezcla de volúmenes iguales, de una solución de suero hemolítico en SB que contenga 2UH (100 %) y de una suspensión de glóbulo rojos de carnero en SB al 2 %.

Ejecución

Dependiendo del número de muestras que se realizarán, se podrán incluir los controles en la misma placa o utilizar una placa para los sueros y otra para los controles.

Dilución de las muestras de suero

El procedimiento de dilución se realiza de forma general en placa fondo en U, mediante la utilización de volúmenes de 25 μl .

La secuencia de operaciones se detalla en la tabla 1. La homogeneización de los dos componentes de cada dilución se realiza mediante 5 aspirado/dispensado con la micropipeta.

Tabla 1

| | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 |
|-------|------------------|--|--|--|---|---|---|--|
| Suero | 25 μl | 25 μl de la dilución 1/2 | 25 μl de la dilución 1/4 | 25 μl de la dilución 1/8 | 25 μl de la dilución 1/16 | 25 μl de la dilución 1/32 | 25 μl de la dilución 1/64 | 25 μl de la dilución 1/128 |
| SB | 25 μl | 25 μl | 25 μl | 25 μl | 25 μl | 25 μl | 25 μl | 25 μl |

Sueros controles

Control positivo: El procedimiento de dilución se realiza mediante la utilización de volúmenes de 25 μl , siguiendo la secuencia de operaciones que se detalla en la tabla 2. La homogeneización de los dos componentes de cada dilución se realiza mediante 5 aspirado/dispensado con la micropipeta.

Tabla 2

| | 1/12,5 | 1/25 | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1600 |
|----------------------------|------------------|------------------|---|---|--|--|--|--|
| Suero positivo 01/05 | 25 μl | 25 μl | 25 μl de la dilución 1/25 | 25 μl de la dilución 1/50 | 25 μl de la dilución 1/100 | 25 μl de la dilución 1/200 | 25 μl de la dilución 1/400 | 25 μl de la dilución 1/800 |
| SB | - | 25 μl | 25 μl | 25 μl | 25 μl | 25 μl | 25 μl | 25 μl |



Control negativo: El suero control negativo se diluye siguiendo el mismo protocolo de los sueros problema (1/2, 1/4, 1/8 etc.).

Controles del ensayo

- Control de la ausencia de poder anticomplementario del antígeno: Se dispensa por duplicado en la placa 25 µl/pocillo de SB, 25 µl/pocillo de C y 25 µl/pocillo de antígeno.
- Control sistema hemolítico con complemento: Se dispensa por duplicado en la placa 50 µl/pocillo de SB y 25 µl/pocillo de C.
- Control sistema hemolítico sin complemento: Se dispensa por duplicado en la placa 75 µl/pocillo de SB.

Disposición de los sueros en la placa

Los controles y muestras diluidas deben quedar dispuestas en la placa fondo en U (25 µl/pocillo) según indica la tabla 3.

Tabla 3

| | 1 Control positivo | 2 Control negativo | 3 muestra | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 1/12,5 | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 1/2 |
| B | 1/25 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 |
| C | 1/50 | 1/8 | 1/8 | 1/8 | 1/8 | 1/8 | 1/8 | 1/8 | 1/8 | 1/8 | 1/8 | 1/8 |
| D | 1/100 | 1/16 | 1/16 | 1/16 | 1/16 | 1/16 | 1/16 | 1/16 | 1/16 | 1/16 | 1/16 | 1/16 |
| E | 1/200 | 1/32 | 1/32 | 1/32 | 1/32 | 1/32 | 1/32 | 1/32 | 1/32 | 1/32 | 1/32 | 1/32 |
| F | 1/400 | 1/64 | 1/64 | 1/64 | 1/64 | 1/64 | 1/64 | 1/64 | 1/64 | 1/64 | 1/64 | 1/64 |
| G | 1/800 | 1/128 | 1/128 | 1/128 | 1/128 | 1/128 | 1/128 | 1/128 | 1/128 | 1/128 | 1/128 | 1/128 |
| H | 1/1600 | 1/256 | 1/256 | 1/256 | 1/256 | 1/256 | 1/256 | 1/256 | 1/256 | 1/256 | 1/256 | 1/256 |

Preparación y dispensado de las soluciones de antígeno y complemento

- Preparar la solución de C según la dilución de trabajo establecida como óptima y dispensar 25 µl/pocillo de dicha solución en todas las muestras.
- Preparar la solución de antígeno según la dilución de trabajo establecida como óptima y dispensar 25 µl/pocillo de dicha solución en todos los pocillos salvo en la dilución 1/2 (muestras y control negativo) y 1/12,5 (control positivo) Fila A, las cuales actuarán como controles de poder anticomplementario (PAC) de cada suero.

Primer incubación en caliente

- Tapar y agitar la placa en agitador de placas durante 2-4 minutos.
- Incubar a 37 ± 2 °C durante 30 minutos.

Dispensado del sistema hemolítico

- Quince (15) minutos antes de finalizar la primera incubación, preparar e incubar a 37 ± 2 °C durante 15 minutos el sistema hemolítico según el Anexo FCT IV.



- Finalizada la primera incubación, dispensar 25 μ l/ pocillo del sistema hemolítico en todos los pocillos de las placas incluida la placa de los controles.

Segunda incubación en caliente

- Tapar y agitar las placas en agitador de placas durante 2-4 minutos.
- Incubar a 37 ± 2 °C durante 30 minutos.

Centrifugación de la placa

Finalizada la incubación, centrifugar la placa a una fuerza de 1000 RPM durante 3 minutos o bien dejarla en reposo en heladera durante una hora antes de su lectura.

Lectura de resultados

El grado de fijación del complemento se manifiesta por la presencia (negativos) o ausencia (positivos) de hemólisis del sistema hemolítico. La reacción positiva se cuantificará mediante la determinación del título y su grado de hemólisis.

Reacción positiva

- Sedimento en grado variable de los glóbulos rojos en el fondo del pocillo.
- El sobrenadante estará afectado por un cierto tinte rojizo en función de la hemólisis que se haya producido. Este grado de hemólisis debe cuantificarse y consignarse mediante un sistema de cruces.

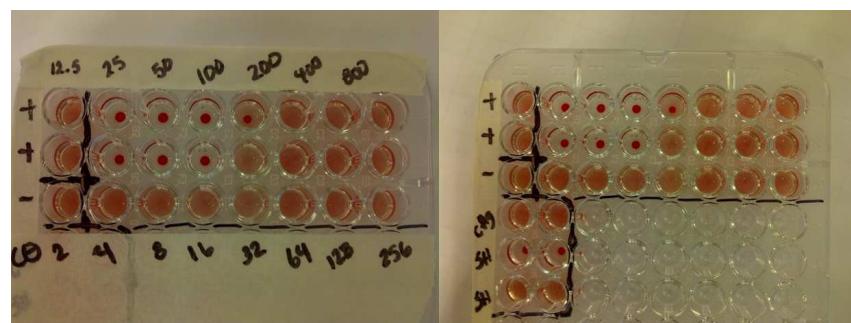


Figura 11: Placa fijación de complemento.

| | | |
|-----------------|---|--------------------|
| ++++ | Sobrenadante translúcido, en el fondo botó de depósito de GR | 0 % de hemólisis |
| +++ | Sobrenadante rojizo en un 25 % de intensidad, en el fondo un deposito claro de GR | 25 % de hemólisis |
| ++ | Sobrenadante rojizo en un 50 % de intensidad, en el fondo un deposito tenue de GR | 50 % de hemólisis |
| + | Sobrenadante rojizo en un 75 % de intensidad, en el fondo un deposito muy tenue de GR | 75 % de hemólisis |
| Negativo | Sobrenadante rojo cristalino, ausencia de depósito de GR | 100 % de hemólisis |





Determinación del título del suero

Será la inversa de la dilución más alta que siga dando algún grado de sedimentación de los GR. Este grado de fijación será informado mediante el sistema de cruces descripto y convertido a UIFCT.

- En el caso de los bovinos vacunados con *Brucella abortus* S19, para el diagnóstico de las *Brucellas lisas* (*B. abortus*), se considera un resultado positivo cualquier **valor ≥ 40 UIFCT (1/8 ++)**.
- Para animales no vacunados (bovinos, caprinos, ovinos y porcinos) se considera positivo cualquier **valor ≥ 20 UIFCT (1/4 ++)**.

Expresión de los resultados en unidades internacionales de fijación del complemento

El sistema de expresión de los resultados en UIFCT, ajustados al suero patrón internacional OIEISS (en el caso de las *Brucellas lisas*), usado a continuación, se basa en el “Procedimiento IZS TE B2. 1.6 SOP 004 del Centro Internacional de Referencia OIE para Brucellosis” (*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise G. Caporale*. Teramo. Italia) y el “Manual de Procedimiento del Laboratorio Agroalimentario” (Gobierno de Aragón. España. Tabla 4).

Tabla 4
Interpretación en UIFCT

| Dilución | % de Fijación del Complemento | 1000 UIFCT (1/200) |
|----------|-------------------------------|--------------------|
| 1:4 | + | 16,6 |
| | ++ | 20 |
| | +++ | 23,2 |
| | ++++ | 26,6 |
| 1:8 | + | 33,2 |
| | ++ | 40 |
| | +++ | 46,4 |
| | ++++ | 53,2 |
| 1:16 | + | 66,4 |
| | ++ | 80 |
| | +++ | 92,8 |
| | ++++ | 106,4 |
| 1:32 | + | 132,8 |
| | ++ | 160 |
| | +++ | 185,6 |
| | ++++ | 212,8 |
| 1:64 | + | 265,6 |
| | ++ | 320 |
| | +++ | 371,2 |
| | ++++ | 425,6 |
| 1:128 | + | 531,2 |
| | ++ | 640 |
| | +++ | 742,4 |
| | ++++ | 851,2 |
| 1:256 | + | 1062,4 |
| | ++ | 1280 |
| | +++ | 1484,8 |
| | ++++ | 1702,4 |



Controles del ensayo

La aprobación del ensayo debe realizarse si los controles han dado los resultados esperados:

| Controles | Resultado esperado |
|--|--|
| Suero control positivo | 50 % de fijación (++) en la dilución 1:200 que corresponde a 1000 UIFCT (<i>Brucellas lisas</i>) |
| Suero control negativo | 100 % de hemólisis en todos las diluciones, ausencia de fijación de complemento |
| Control de poder anticomplementario de los sueros | 100 % de hemólisis ausencia de fijación del complemento en la dilución 1:2 (sin antígeno) |
| Control de ausencia de poder anticomplementario del antígeno | 100 % hemólisis |
| Control del sistema hemolítico sin C | 0 % de hemólisis |
| Control del sistema hemolítico con C | 100 % de hemólisis |

Criterio de aceptación del análisis:

El ensayo se debe considerar APROBADO/NO APROBADO

a) APROBADO:

- Los controles de antígeno, sistema hemolítico con y sin complemento dan los resultados pre-establecidos.
- El control de suero positivo da el resultado pre-establecidos (1:200) con una variación máxima de (± 2 ++).
- El control negativo da un resultado Negativo.

b) NO APROBADO: si uno de los controles no da el resultado esperado, se repite el ensayo.

La presencia de, al menos, un 25 % de sedimento de eritrocitos (+) de la fila A (dilución 1/2) indica poder anticomplementario en la muestra. En este caso, se informa el resultado de PAC, lo que implica la solicitud de una nueva extracción de la toma de muestra.

Para facilitar la lectura e interpretación de los resultados se puede preparar una escala visual del siguiente modo:

- En un tubo se coloca 100 μ l de la suspensión de glóbulos rojos al 2 % + 900 μ l de SB 1X.
- En otro tubo colocar 100 μ l de la suspensión de glóbulos rojos al 2 % + 700 μ l de agua destilada, agitar para provocar la completa hemólisis de los GR (solución de hemoglobina), y agregarle 200 μ l de SB 5X para mantener la presión osmótica.

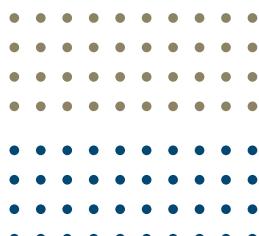


Estos dos tubos mantienen la misma relación de GR. intactos en el primer caso y de glóbulos lisados en el segundo, que el que el 0 % de hemólisis y el 100 % de hemólisis en la prueba.

De esta manera mezclándolas en distintas proporciones podremos obtener la imagen que corresponde a los distintos grados de hemólisis, luego de centrifugar durante 5 minutos a 1000 rpm.

| PORCENTAJE DE HEMÓLISIS | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Reactivos en μ l | 0 % | 10 % | 20 % | 30 % | 40 % | 50 % | 60 % | 70 % | 80 % | 90 % | 100 % |
| Solución hemolisada | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| Suspensión de glóbulos rojos | 100 | 90 | 80 | 70 | 60 | 50 | 40 | 30 | 20 | 10 | 0 |





Anexos

Anexo FCT

I: Solución Buffer (SB)

Realizar una solución de stock de calcio/magnesio como indica la tabla 1, luego conservar en refrigeración durante 6 meses o eliminar si hay turbidez producto de contaminación.

Solución de stock calcio 0,3 M y magnesio 1 M

| | |
|-------------------------|--------|
| Ca Cl ₂ . Mg | 3,7g |
| Cl ₂ . | 9,5 g |
| Agua destilada | 100 ml |

- Añadir 1ml de solución stock a 1 litro de solución salina 0,85 % (NaCl2 8,5 g/agua destilada 1 litro).
- La solución de trabajo debe tener un pH de 7,3 - 7,4.
- Luego de su uso, conservar en refrigeración por 7 días.

II: Preparación de la suspensión de GR 2 %

a) Lavado de los GR

1. Homogeneizar cuidadosamente el frasco que contiene los eritrocitos.
2. En un tubo cónico resuspender los eritrocitos en una proporción de 1 volumen de GR + 5 volúmenes de SB, luego homogeneizar cuidadosamente.
3. Centrifugar aproximadamente a 1500 rpm durante 5 minutos y luego eliminar el sobrenadante con una pipeta.
4. Repetir la resuspensión de los GR en SB, centrifugar de la misma manera anteriormente descripta y luego eliminar el sobrenadante con una pipeta.
5. Realizar la última resuspensión de los GR en SB y centrifugar aproximadamente a 1500 rpm durante 10 minutos.
6. Luego de la última centrifugación descartar el sobrenadante, el cual debe estar libre de hemólisis.
7. El método para la estandarización de la suspensión de glóbulos rojos 2 % se podrá realizar por medio de dos técnicas.
 - Método espectrofotométrico.
 - Método en cámara de Neubauer.

Método espectrofotométrico:

1. Tomar del tubo cónico 0,2 ml de GR ya lavados y diluirlo en 9,8 ml de SB (2 %).
2. Realizar un blanco de lectura en el espectrofotómetro dispensando 2,5 ml agua destilada en la celda o tubo del espectrofotómetro.
3. Determinar la lisis 100 % de los GR realizando una dilución 1/15 con agua destilada, agregando en un tubo que contiene 2,8 ml de agua destilada 0,2 ml de glóbulos rojos al 2 %.



4. Una vez lisados los eritrocitos, leer la densidad óptica (DO) a 545 nm.
5. La DO esperada debe ser de 0.330 ± 0.05 . El laboratorio debe determinar según el modelo de espectrofotómetro cual es la DO optima que indique la concentración de GR al 2 %.

Método en cámara de Neubauer:

1. Tomar del tubo cónico 0,2 ml de GR ya lavados y diluirlos en 9,8 ml de SB (2 %).
2. Realizar una dilución 1/200 y hacer el recuento de glóbulos rojos en la cámara.
3. La suspensión deberá tener $5,4 (\pm 0,2) \times 10^8$ GR / ml.

III: Titulación Hemolisina

Preparación de las soluciones “madres” de hemolisina

Se prepararán 15 diluciones de hemolisina (tabla 1). En cada tubo se dispensan los siguientes volúmenes de SB y de hemolisina. La solución se homogeneiza mediante agitación en vórtex.

Tabla 1: Preparación de las soluciones “madres” de hemolisina

| N.º de tubo | Dilución | SB (ml) | Hemolisina |
|-------------|----------|---------|------------|
| 1 | 1/50 | 4,9 | 100 µl |
| 2 | 1/100 | 2 | 2 ml T1 |
| 3 | 1/150 | 7,45 | 50 µl |
| 4 | 1/200 | 1 | 1 ml T2 |
| 5 | 1/250 | 12,5 | 50 µl |
| 6 | 1/500 | 1 | 1 ml T5 |
| 7 | 1/1000 | 6 | 2 ml T5 |
| 8 | 1/2000 | 1 | 1 ml T7 |
| 9 | 1/3000 | 2 | 1 ml T7 |
| 10 | 1/4000 | 3 | 1 ml T7 |
| 11 | 1/5000 | 4 | 1 ml T7 |
| 12 | 1/6000 | 5 | 1 ml T7 |
| 13 | 1/7000 | 3 | 0,5 ml T7 |
| 14 | 1/8000 | 3,5 | 0,5 ml T7 |
| 15 | 1/9000 | 4 | 0,5 ml T7 |





Preparación de las soluciones “hijas” de hemolisina

- En la filas B, C, D, G y H de una placa fondo en U dispensar 25 µl/pocillo de SB excepto de las columnas 10, 11 y 12 de las filas A, B, C y D (tabla 2).
- En la filas A (excepto las columnas 10, 11 y 12) y F de la placa dispensar 50 µl/pocillo de las diluciones “madres” de hemolisina preparadas en la batería de tubos de ensayo, según protocolo de la tabla 1.
- Con una pipeta multicanal recoger 25 µl por pocillo de la fila A y pasar a la fila B. La homogenización de los dos componentes de cada dilución se realiza mezclando mediante 5 golpes de aspirado y dispensado de la pipeta. Recoger 25 µl / pocillo de la fila B y pasar a la fila.
- Volver a homogenizar. Recoger 25 µl / pocillo de la fila C y pasar a la D. Homogeneizar y recoger 25 µl / pocillo y descartar.
- De la misma forma, haga diluciones de la fila F sobre las filas G y H.
- Las diluciones finales obtenidas se detallan en la tabla 3.

Tabla 2. Planilla de localización de las diluciones “madres” de hemolisina y SB

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| A | 50 µl de T1 | 50 µl de T1 | 50 µl de T1 | 50 µl de T2 | 50 µl de T2 | 50 µl de T3 | 550 µl de T3 | 50 µl de T4 | 50 µl de T4 | | | |
| B | 25 µl de SB | 25 µl de SB | 25 µl de SB | | | |
| C | 25 µl de SB | 25 µl de SB | 25 µl de SB | | | |
| D | 25 µl de SB | 25 µl de SB | 25 µl de SB | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | 50 µl de T5 | 50 µl de T5 | 50 µl de T6 | 50 µl de T7 | 50 µl de T8 | 50 µl de T9 | 50 µl de T10 | 50 µl de T11 | 50 µl de T12 | 50 µl de T13 | 50 µl de T14 | 50 µl de T15 |
| G | 25 µl de SB | 25 µl de SB | 25 µl de SB | 25 µl de SB | 25 µl de SB | 25 µl de SB |
| H | 25 µl de SB | 25 µl de SB | 25 µl de SB | 25 µl de SB | 25 µl de SB | 25 µl de SB |



Tabla 3. Diluciones finales de hemolisina

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| A | 1/50 | 1/50 | 1/50 | 1/100 | 1/100 | 1/150 | 1/150 | 1/200 | 1/200 | | | |
| B | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/200 | 1/200 | 1/300 | 1/300 | 1/400 | 1/400 | | | |
| C | 1/200 | 1/200 | 1/200 | 1/400 | 1/400 | 1/600 | 1/600 | 1/800 | 1/800 | | | |
| D | 1/400 | 1/400 | 1/400 | 1/800 | 1/800 | 1/1200 | 1/1200 | 1/1600 | 1/1600 | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | 1/250 | 1/250 | 1/500 | 1/1000 | 1/2000 | 1/3000 | 1/4000 | 1/5000 | 1/6000 | 1/7000 | 1/8000 | 1/9000 |
| G | 1/500 | 1/500 | 1/1000 | 1/2000 | 1/4000 | 1/6000 | 1/8000 | 1/10000 | 1/12000 | 1/14000 | 1/16000 | 1/18000 |
| H | 1/1000 | 1/1000 | 1/2000 | 1/4000 | 1/8000 | 1/12000 | 1/16000 | 1/20000 | 1/24000 | 1/28000 | 1/32000 | 1/36000 |

Preparación y dispensado de la suspensión de glóbulos rojos

Se prepara una suspensión de GR al 2 % según lo indicado anteriormente. En este ensayo se prepara una suspensión de 5 ml.

1. Dispensar la suspensión (25 μ l/pocillo) en los pocillos de la microplaca.
2. Cubrir y agitar la microplaca en un agitador de placas durante 30 minutos a bajas revoluciones. Esto proporciona la sensibilización de los GR (unión con los anticuerpos presentes en las diluciones de hemolisina).
3. Dispense 25 μ l/pocillo de SB en las filas A, B, C, D, F, G y H. En los pocillos de la columna 1 se dispensan adicionalmente otros 25 μ l (esta columna actúa como control del poder hemolítico de la hemolisina).

Preparación y dispensado de una solución de complemento

El objeto es preparar una solución de complemento a una concentración tal que siempre haya reactivo disponible para detectar una posible unión de Ag (GR) - Ac (hemolisina diluida).

Para complementos (comerciales) que den un título (unidad de complemento) superior a 1/90, debe prepararse una solución de 1/30. Para complementos que den títulos inferiores, la solución que se deberá preparar será de 1/10 - 1/20 (tabla 4).

Tabla 4: Dilución del complemento

| | TV | Complemento |
|------------------------------|--------|-------------|
| Solución de complemento 1/20 | 5,7 ml | 0,3 ml |
| Solución de complemento 1/30 | 5,8 ml | 0,2 ml |

1. Dispensar 25 μ l/pocillo de la solución de complemento en las filas A, B, C, D, F, G y H, excepto en los pocillos de la columna 1.
2. Cubrir y agitar la placa durante 2-4 minutos en agitador de placas.

Incubación

Incubar a 37 ± 2 ° C, durante 30 minutos.

Cálculos y expresión de resultados

El resultado de la relación de cada pocillo se evalúa por el grado de hemólisis presente en el mismo y se consigna mediante un sistema de cruces (tabla 5).

Tabla 5: Expresión de resultados

| | | |
|-----------------|---|--------------------|
| ++++ | Sobrenadante translúcido, en el fondo botón de depósito de GR | 0 % de hemólisis |
| +++ | Sobrenadante rojizo en un 25 % de intensidad, en el fondo un deposito claro de GR | 25 % de hemólisis |
| ++ | Sobrenadante rojizo en un 50 % de intensidad, en el fondo un deposito tenue de GR | 50 % de hemólisis |
| + | Sobrenadante rojizo en un 75 % de intensidad, en el fondo un deposito muy tenue de GR | 75 % de hemólisis |
| Negativo | Sobrenadante rojo cristalino, ausencia de depósito de GR | 100 % de hemólisis |

Los resultados de la lectura se emiten en la hoja de laboratorio correspondiente.

Cálculos de los resultados

- Se define la unidad de hemólisis (UH) como la dilución más alta que permite la lisis del 100 % de los eritrocitos en el pocillo.
- Sobre la hoja del laboratorio se comprueba la repetibilidad del análisis, constatando que los pocillos que contengan la misma dilución de hemólisis presentan un grado de hemólisis similar.
- Se elige la UH de la dilución en la que se obtenga 100 % de hemólisis. Si existen dudas entre dos diluciones se elegirá la dilución más baja (mayor concentración de hemolisina).
- La dilución de trabajo (DT) se establece multiplicando por 2 la UH, es decir 2 UH 100 %.



Ejemplo: Si la UH se ha establecido en 1/1000 DT= 2 x 1/1000= 1/500

- Los cálculos y las proporciones finales de reactivos se registran en hojas de trabajo.
- Se podrá realizar una dilución 1/50 o 1/100 de la hemolisina en SB conservando a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ para luego diluirla al título de trabajo. Se registra el lote, fecha y cantidad de hemolisina diluida.

IV: Sistema hemolítico

- Para la preparación del sistema hemolítico, el volumen total del sistema depende del número de placas que se deberán utilizar (1 placa= 96 pocillos fondo en U).

Ejemplo para dos placas:

2 placas x 2,4 ml = 4.8 ml = 5 ml (se prepara un volumen adicional en previsión de perdidas)

- Dispensar en un frasco 2,5 ml de GR 2 % y luego 2,5 ml de hemolisina al título de uso agitando suavemente para homogenizar las dos suspensiones e incubar a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 15 minutos.

V: Titulación complemento

Se llama complemento al suero de cobayo completo, que contiene el sistema enzimático denominado “sistema complemento”, cuya función en la técnica de fijación del complemento es la de detectar uniones específicas antígeno-anticuerpo. En el caso que en dichas uniones una de las partes sean glóbulos rojos, es capaz de lisarla, como en el caso del sistema hemolítico que se utiliza en la reacción de fijación del complemento, donde los hematíes de carnero hacen el papel de antígeno y el suero de conejo (hemolisina) de anticuerpos.

El complemento que sea objeto de titulación debe descongelarse dejándolo llevar a temperatura de laboratorio. Una vez reconstituido o descongelado se mantendrá en refrigeración y solo se sacará de la heladera en el momento de su utilización. Si se prevé que se va a utilizar más de un vial, se juntarán todos en uno y se titulará el conjunto.

Preparación de las soluciones “madres” del complemento

1. Realizar 6 diluciones “madres” del complemento, empleando para ello tubos de ensayo. Tabla 1 de este anexo.
2. En cada tubo se dispensan los siguientes volúmenes de SB y de complemento. La solución se homogeneiza perfectamente mediante un agitador.





Tabla 1. Diluciones “madre” del complemento

| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 | Tubo 6 |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| SB μ l | 725 | 850 | 975 | 1100 | 1225 | 1350 |
| C μ l | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |

Preparación de las soluciones “hijas” en placas de ensayo y dispensado del SB

1. En la filas B, C y D de una placa fondo en U, dispense 25 μ l/pocillo de SB (tabla 2).
2. En la filas A de la placa, dispense 50 μ l/pocillo de las diluciones “madres” de complemento por duplicado según protocolo descripto en tabla 1.
3. Con una pipeta multicanal, recoja 25 μ l/pocillo de la fila A y trasváselos a la fila B. La homogeneización de los dos componentes de cada dilución se propiciará mezclando mediante 5 golpes de aspirado y dispensación de la pipeta. Recoja 25 μ l/pocillo de la fila B y páselo a la fila C.
4. Vuelva a homogenizar. Recoja 25 μ l/pocillo de la fila C y páselo al D. Homogeneice y recoja 25 μ l/pocillo y descártelos (las diluciones que han quedado preparadas en la placa se detallan en la tabla 3).
5. Dispense a continuación 50 μ l/pocillo de SB en todas las filas de la placa.
6. Agite la placa durante 2-4 minutos en agitador de placas.

Tabla 2. Planilla de localización de las diluciones “madres” de complemento y SB

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| A | 50 μ l de T1 | 50 μ l de T2 | 50 μ l de T4 | 50 μ l de T2 | 50 μ l de T5 | 50 μ l de T6 | 50 μ l de T1 | 50 μ l de T2 | 50 μ l de T4 | 50 μ l de T2 | 50 μ l de T5 | 50 μ l de T6 |
| B | 25 μ l de SB |
| C | 25 μ l de SB |
| D | 25 μ l de SB |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Tabla 3. Diluciones finales del complemento

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 1/30 | 1/35 | 1/40 | 1/45 | 1/50 | 1/55 | 1/30 | 1/35 | 1/40 | 1/45 | 1/50 | 1/55 |
| B | 1/60 | 1/70 | 1/80 | 1/90 | 1/100 | 1/110 | 1/60 | 1/70 | 1/80 | 1/90 | 1/100 | 1/110 |
| C | 1/120 | 1/140 | 1/160 | 1/180 | 1/200 | 1/220 | 1/120 | 1/140 | 1/160 | 1/180 | 1/200 | 1/220 |
| D | 1/240 | 1/280 | 1/320 | 1/360 | 1/400 | 1/440 | 1/240 | 1/280 | 1/320 | 1/360 | 1/400 | 1/440 |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Cubra la placa para evitar evaporación excesiva e incube en estufa a 37 ± 2 °C durante 15 minutos.

Dispensado del sistema hemolítico

El sistema hemolítico habrá sido preparado según procedimiento descripto anteriormente.

1. Finalizada la incubación de la placa, dispense 25 µl / pocillo del SH en todos los pocillos de la placa.
2. Cubra y agite la placa durante 2-4 minutos en agitador de placas.
3. Incube en estufa a 37 ± 2 °C durante 30 minutos.

Centrifugación de la placa

Finalizada la incubación, centrifugue la placa a una fuerza de 1000 RPM durante 3 minutos.



Expresión de resultados

El resultado de la reacción de cada pocillo se evaluará por el grado de hemólisis presente en el mismo y se consignará mediante un sistema de cruces:

Tabla 4

| | | |
|-----------------|---|--------------------|
| ++++ | Sobrenadante translúcido, en el fondo botón de depósito de GR | 0 % de hemólisis |
| +++ | Sobrenadante rojizo en un 25 % de intensidad, en el fondo un deposito claro de GR | 25 % de hemólisis |
| ++ | Sobrenadante rojizo en un 50 % de intensidad, en el fondo un deposito tenue de GR | 50 % de hemólisis |
| + | Sobrenadante rojizo en un 75 % de intensidad, en el fondo un deposito muy tenue de GR | 75 % de hemólisis |
| Negativo | Sobrenadante rojo cristalino, ausencia de depósito de GR | 100 % de hemólisis |

Cálculos de los resultados

1. Se define la unidad de complemento (UC) o unidad hemolítica como la dilución más alta que permite la lisis del 100 % de los eritrocitos en el pocillo.
2. Sobre la hoja del laboratorio se comprobará la respetabilidad del análisis, constatando que los pocillos que contengan la misma dilución de complemento presentan un grado de hemólisis similar.
3. Se elige la UC con la dilución más alta que de 100 % de hemólisis.
4. La dilución de trabajo (DT) se establece multiplicando por 2 la UC.

Ejemplo: supongamos que se necesita preparar una solución de complemento para utilizar en el análisis de 2 placas según el procedimiento descripto. Ello supone un volumen total de solución de complemento de 2 placas x 2,4ml / placa = 4,8 ml = 5 ml (se prepara un volumen adicional en previsión de pérdidas).

a. Supongamos que UC = 1/100

$$DT = 2 \times UC = 2 \times 1/100 = 1/50$$

Si en 50 ml de SB se dispensa 1 ml de C puro:

En 5 ml de SB se dispensan x. x = 5/50 = 0,1 ml

b. Por tanto las proporciones serán: 0,1 ml de complemento y 4,9 ml de SB.

| | Tubo 1 (2 unidades) | Tubo 2 (1,5 unidades) | Tubo 3 (1 unidades) | Tubo 4 (0,75 unidades) | Tubo 5 (0,5 unidades) |
|--------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|
| C: 2 unidades (μl) | 400 | 300 | 200 | 150 | 100 |
| SB (μl) | 0 | 100 | 200 | 250 | 300 |



Control de dos unidades de complemento (2 UC)

Una vez obtenida la dilución de trabajo, se realizarán diluciones del complemento que contengan 2 unidades; 1,5 unidades; 1 unidad; 0,75 unidades y 0,5 unidades. Para ello trabajaremos según la siguiente secuencia (tabla 5).

Tabla 5. Diluciones del complemento

| | Tubo 1 (2 unidades) | Tubo 2 (1,5 unidades) | Tubo 3 (1 unidades) | Tubo 4 (0,75 unidades) | Tubo 5 (0,5 unidades) |
|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|
| C: 2 unidades (μ l) | 400 | 300 | 200 | 150 | 100 |
| SB (μ l) | 0 | 100 | 200 | 250 | 300 |

Se dispensarán por duplicado 25 μ l/pocillo de cada una de las diluciones en los correspondientes pocillos de una placa y luego se completan con 50 μ l de SB (tabla 6).

Tabla 6. Unidades del complemento en la placa

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----|------|-----|--------|-------|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 2U | 1,5U | 1 U | 0,75 U | 0,5 U | | | | | | | |
| B | 2U | 1,5U | 1 U | 0,75 U | 0,5 U | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

1. Cubra la placa para evitar evaporación excesiva, agite 2-4 minutos e incube en estufa a 37 ± 2 ° C durante 15 minutos.
2. Luego repita lo descripto agregando el SH

Lectura del análisis:

- Pocillo con 2 unidades: 100 % de hemólisis
- Pocillo con 1,5 unidades: 100 % de hemólisis





- Pocillo con 1 unidades: 100 % de hemólisis o traza de GR en suspensión
- Pocillo con 0,75 unidades: 0 % a 75 % de hemólisis
- Pocillo con 0,5 unidades: 0 % a 50 % de hemólisis

Control de calidad

El ensayo debe ser repetible: pocillos con diluciones iguales deben tener un grado de reacción similar. En caso contrario se repetirá el análisis.

Debe observarse cada gama de reacciones posibles desde diluciones con el 100 % (N) de hemólisis (las más bajas), hasta diluciones con el 0 % (++++) de hemólisis (las más alta). En caso contrario se repetirá el análisis.

En el control de 2 unidades de complemento deben dar los resultados pre establecidos.

El análisis debe informarse como APROBADO / NO APROBADO en el apartado de observaciones de la planilla de titulación del complemento. En caso de no aprobado, se repite el proceso.

VI: Titulación antígeno

Se utiliza el antígeno de seroaglutinación en tubo (SAT) volumen celular aproximado de 4,5 %.

Se trata de determinar lo que se denomina UA (unidad antigénica) que corresponde para cada lote de antígeno y será la dilución óptima de uso para garantizar la unión con los anticuerpos presentes en los sueros problema, en la cantidad suficiente para fijar el complemento.

El antígeno formará el complejo antígeno-anticuerpo con los anticuerpos presentes de los sueros problema y que serán capaces de fijar el complemento. Esta reacción requiere un título mínimo para que se lleve a cabo, es decir, se debe garantizar una concentración mínima de antígeno que reaccione con los anticuerpos y sea capaz de fijar el complemento.

Preparación de diluciones “madre” de antígeno

Se preparan tres diluciones previas en tubos, luego se dispensarán:

- en un tubo 500 µl de SB y 10 µl de antígeno;
- en un segundo tubo 750 µl de SB y 10 µl de antígeno;
- en un tercer tubo 1250 µl de SB y 10 µl de antígeno.

Esto da una dilución de 1/50, 1/75 y 1/125, respectivamente.





Preparación de las diluciones “hijas” de antígeno

En una placa de fondo en U se dispensan 25 µl de SB en todos los pocillos salvo en la columna 1 y los pocillos A10, A11, A12. La fila C y F no se utilizarán hasta la columna 9 (tabla 1). En la columna 1 se pondrán 50 µl de las soluciones madres del antígeno por duplicado y en los pocillos A10, A11, A12 de forma simple (tabla 1). Se diluye pasando 25 µl sucesivamente de estos pocillos a los siguientes consiguiendo diluciones al duplo del antígeno. Las diluciones se realizan de la columna 1 a la columna 9 y de los pocillos A10, A11, A12 hasta los pocillos H10, H11 y H12. Es decir, se pasan 25 µl de la columna 1 a la 2, se homogeniza y se pasan otros 25 µl a la columna 3 y así sucesivamente, y se eliminan los 25 µl que sobran en la columna 9 y lo mismo en vertical en las columnas 10, 11 y 12.

Tabla 1. Diluciones “hijas” del antígeno

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|---------|
| A | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1600 | 1/3200 | 1/6400 | 1/12800 | 1/50 | 1/75 | 1/125 |
| B | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1600 | 1/3200 | 1/6400 | 1/12800 | 1/100 | 1/150 | 1/250 |
| C | | | | | | | | | | 1/200 | 1/300 | 1/500 |
| D | 1/75 | 1/150 | 1/300 | 1/600 | 1/1200 | 1/2400 | 1/4800 | 1/9600 | 1/19200 | 1/400 | 1/600 | 1/1000 |
| E | 1/75 | 1/150 | 1/300 | 1/600 | 1/1200 | 1/2400 | 1/4800 | 1/9600 | 1/19200 | 1/800 | 1/1200 | 1/2000 |
| F | | | | | | | | | | 1/1600 | 1/2400 | 1/4000 |
| G | 1/125 | 1/250 | 1/500 | 1/1000 | 1/2000 | 1/4000 | 1/8000 | 1/16000 | 1/32000 | 1/3200 | 1/4800 | 1/8000 |
| H | 1/125 | 1/250 | 1/500 | 1/1000 | 1/2000 | 1/4000 | 1/8000 | 1/16000 | 1/32000 | 1/6400 | 1/9600 | 1/16000 |

Dispensado de sueros controles positivo y negativo

Seguidamente se dispensan 25 µl de suero control positivo en los pocillos de la fila A, B, D, E, G y H salvo en las columnas 10, 11, 12 donde se dispensan 25 µl de suero control negativo y servirá como control de hemólisis.

El suero control positivo debe ir a una dilución igual al título conocido (1/200) en la reacción de fijación del complemento.





Dispensado de una solución de complemento

Posteriormente se dispensan 25 μ l de complemento a todos los pocillos según el título obtenido previamente. Se agita la placa 2-4 minutos y se incuba durante 30 minutos a $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

Dispensado del sistema hemolítico

Tras la incubación de la placa se procede a dispensar 25 μ l de sistema hemolítico a todos los pocillos. Luego se agita la placa 2-4 minutos e incubará durante otros 30 minutos a $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

Centrifugación de la placa

Finalizada la incubación, centrifugue la placa a una fuerza de 1000 RPM durante 3 minutos.

Expresión de resultados

El resultado de la reacción de cada pocillo se evaluará por el grado de hemólisis presente en el mismo y se consignará mediante un sistema de cruces.

Tabla 2

| | | |
|-----------------|---|--------------------|
| ++++ | Sobrenadante translúcido, en el fondo botón de depósito de GR | 0 % de hemólisis |
| +++ | Sobrenadante rojizo en un 25 % de intensidad, en el fondo un depósito claro de GR | 25 % de hemólisis |
| ++ | Sobrenadante rojizo en un 50 % de intensidad, en el fondo un depósito tenue de GR | 50 % de hemólisis |
| + | Sobrenadante rojizo en un 75 % de intensidad, en el fondo un depósito muy tenue de GR | 75 % de hemólisis |
| Negativo | Sobrenadante rojo cristalino, ausencia de depósito de GR | 100 % de hemólisis |

Los resultados de la lectura se registran en la hoja de laboratorio correspondiente

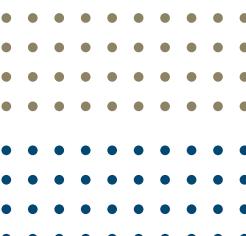




Cálculos de los resultados

1. Se define la unidad de antígeno (UA) como la dilución más alta que permite una fijación completa (0 % de hemólisis).
2. Sobre la hoja del laboratorio se comprueba la repetibilidad del análisis, constatando que los pocillos que contengan la misma dilución de antígeno presentan un grado de hemólisis similar.
3. Se elige la UA a dilución en la que se obtenga el 0 % de hemólisis. Si existen dudas entre dos diluciones se elegirá la dilución más baja (de mayor concentración de antígeno).
4. La dilución de trabajo (DT) se establece multiplicando por 2 la UA.

Ejemplo: supongamos que la UA se ha establecido 1/800:
 $DT = 2 \times UA = 2 \times 1/800 = 1/400$

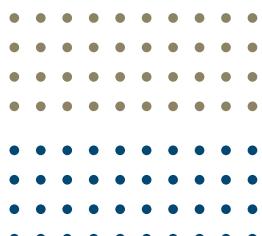




Anexo I

Modelo de planilla de emisión de resultados

PAGINA 1 DE 2



Bibliografía





Normativa vigente

Ley 24.696 de año. Por la cual se declara de interés nacional el control y erradicación de la enfermedad reconocida como Brucellosis (Brucella abortus) en las especies bovina, suina, caprina y otras en todo el Territorio Nacional. 26 de septiembre de 1996. B.O. N.º 28.492.

Norma Organización Internacional de Normalización [ISO/IEC 17025]. 2017 (España).

Resolución 957 de 2024 [Senasa]. Por la cual se aprueba el uso de los inmunógenos RB51 y Delta PGM. 15 de agosto de 2024.

Resolución 276 de 2023 [Senasa]. Por la cual se adopta el sistema de diagnóstico serológico para el Plan Nacional de Control y Erradicación de Brucellosis Bovina en la República Argentina. 14 de abril de 2023.

Resolución 77 de 2021 [Senasa]. Por la cual se sustituye el artículo 9º y 10 de la Resolución N.º 67/19 y otras modificaciones. 19 de febrero de 2021.

Resolución 67 de 2019 [Senasa]. Por la cual se aprueba el Plan Nacional De Control y Erradicación De Brucellosis Bovina en la República Argentina, de aplicación obligatoria en todo el territorio nacional, excepto en la provincia de Tierra Del Fuego, Antártida e islas del Atlántico Sur. 1.º de febrero de 2019.

Resolución 857-E de 2017 [Senasa]. Por la cual se declara como zona libre de brucellosis ovina y caprina a Brucella melitensis, a la región patagónica y se establece el Programa De Vigilancia y Prevención. 27 de diciembre de 2017.

Resolución 372-E de 2017 [Senasa]. Por la cual se aprueba el Plan Nacional de Control de Brucellosis Caprina en la República Argentina y se establecen las estrategias sanitarias básicas que deben ser aplicadas en cada zona o provincia. 14 de junio de 2017.

Resolución 98 de 2016 [Senasa]. Por la cual se resuelve la comercialización de antígenos/kits para diagnóstico de brucellosis. 18 de marzo de 2016.

Resolución 63 de 2013 [Senasa]. Por la cual se crea el Registro Nacional de Establecimientos Oficialmente Libres de Brucellosis Porcina. 28 de febrero de 2013.

Resolución 246 de 2007 [Senasa]. Por la cual se aprueban los requisitos de bioseguridad para los laboratorios que se dediquen a la elaboración de productos destinados al diagnóstico y a la prevención de la Brucellosis Animal y la Tuberculosis Animal. 04 de mayo de 2007.

Resolución 438 de 2006 [Senasa]. Por la cual se adopta el Sistema de Diagnóstico Serológico para el Programa de Control y Erradicación de la Brucellosis. 4 de agosto de 2006.





Resolución 736 de 2006 [Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos]. Por la cual se crea la Red Nacional de Laboratorios de Ensayo y Diagnóstico. 17 de noviembre de 2006.

Resolución 79 de 2003 [Senasa]. Por la cual se aprueba el procedimiento para la supervisión de la aplicación de los tratamientos de fumigación oficial. 26 de enero de 2003.

Resolución 1484 de 1993 [Senasa]. Por la cual se establecen las normas para la elaboración, fraccionamiento, distribución, expendedor para los reactivos destinados en el diagnóstico y prevención de la Brucelosis Animal. 28 de diciembre de 1993.

Bibliografía consultada

Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. and Verger, J.M. (1988). *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. INRA, Paris.

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.

Centro Panamericano de Zoonosis (1968). *Técnicas e interpretación de sero-aglutinación para el diagnóstico de la brucelosis bovina*. Nota Técnica Nº2. Ramos Mejía.

Ciocchini A.E., Rey Serantes D. A., Melli L.J., Iwashkiw J.A., Elena S., Franco C., Nicola A.M., Feldman M.F., Comerci D.J., Ugalde J.E. (2014) *A bacterial engineered glycoprotein as a novel antigenic target for diagnosis of bovine brucellosis*. Vet Microbiol. 172 (3-4):455-65.

Cortina M.E., Balzano R.E., Rey Serantes D.A., Caillava A.J., Elena S., Ferreira A.C., Nicola A.M., Ugalde J.E., Comerci D.J., Ciocchini A.E (2016). *A bacterial glycoengineered antigen for improved serodiagnosis of porcine brucellosis*. Journal of Clinical Microbiology. 54(6), 1448-1455.

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.

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.

Bagnat, Moras, Vibot, Samartino, T. De Echaide, Walsh, Diprodesa, Di Lorenzo, Nicola (2006). *Informe de la Subcomisión Técnica de la Comisión Nacional de Brucelosis*.

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).





Lucero, N., Escobar, G., Ayala, S., Hasan, D. (2008). *Manual de Procedimientos Técnicas para el Diagnóstico de Brucelosis Humana*. Servicio de Brucelosis Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”, Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur, Buenos Aires.

Nielsen K. (2002). *Diagnosis of brucellosis by serology*. Vet. Microbiol. (90,447-459).

Nielsen K., Gall D., Jolley M., Leishman G., Balsevicius S., Smith P., Nicoletti P. & Thomas F. (1996). *A homogenous fluorescence polarization assay for detection of antibody to Brucella abortus*. J. Immunol. Methods (195,161-168).

Nielsen K., Kelly L., Gall D., Balsevicius S., Bosse J., Nicoletti P. & Kelly W. (1996). *Comparison of enzymeimmunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis*. Prev. Vet. Med. (26, 17-32).

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).

Organización Mundial de la Salud (2009). *Manual técnico de referencia para la higiene de las manos*.

Senasa (2019). *Manual de diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina*. Martínez, Buenos Aires.

Senasa (2009). *Manual de diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina*. Martínez, Buenos Aires.

Senasa (1998). *Manual de diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina*. Martínez, Buenos Aires.

Silva Paulo, P.; Vigliocco, A.M., Ramondino, R., Marticorena, D., Bici, E., Brios, G., Gorchs, C., Gall, D., Nielsen, K. (2000). *Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina*. Clin. Diag. Lab. Immunol. (7, 828-831).

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).

Szyfres, B. (1983). El Diagnóstico de la brucelosis bovina en el contexto de un programa de lucha. Boletín Técnico N°2. IICA/SENASA.

Vanzini, V., Aguirre, N., Lugaresi, C.I., de Echaide, S., de Canavesio, V.G., Guglielmone, A., Marchesino, M., Nielsen, K. (1998). *Evaluation of an Indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina*. Preventive Vet. Med. (36, 211-217).

Vanzini, V., Echaide, S., (1998). *Brucelosis Enzimoinmunoensayo Indirecto para detectar anticuerpos anti-Brucella abortus en bovinos*. Versión traducida y actualizada con datos obtenidos en la EEA Rafaela.

World Health Organization (2005). *Laboratory Biosafety Manual*. Second Edition. Geneva.

World Health Organization (1986). *Joint Food And Agriculture Organization Of The United Nations/World Health Organization Expert Committee On Brucellosis*. Technical Report Series 740, Sixth Report. Geneva.





World Organisation for Animal Health (2022). *Manual of standards for diagnostic test & vaccines. Brucellosis (infection with Brucella abortus, B. melitensis and B. suis).*

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., (12, 435-450).

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).





 senasa

