

# WHO Global Salm Surv



WHO Global  
Salm-Surv  
*Building Global Capacity for the  
Surveillance and Detection of Foodborne  
and other infectious Enteric Diseases*  
[www.who.int/salmsurv](http://www.who.int/salmsurv)

## Manual de Procedimientos

### Técnicas para el Diagnóstico de Brucelosis Humana

2008

## **AUTORES**

Nidia E. Lucero

Gabriela I. Escobar

Sandra M. Ayala

Deborah B. Hasan

**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**

INDICE	Página
Capítulo I- Introducción _____	4
La enfermedad en el hombre _____	4
La enfermedad de los animales _____	5
Etiopatogenia de la brucelosis humana _____	6
Sintomatología clínica _____	6
Clasificación de los casos _____	7
Capítulo II-Diagnóstico serológico _____	8
Diagnóstico de brucelosis causada por <i>S-Brucella</i> _____	8
Técnica de aglutinación en placa (Huddleson) _____	10
Técnica de aglutinación con antígeno tamponado (BPA) _____	13
Técnica del Rosa de Bengala (RB) _____	16
Técnica de aglutinación en tubo (Wright) y 2-mercaptoetanol _____	19
Técnica de fijación de complemento _____	25
Técnica de CELISA _____	37
Técnica de polarización de la fluorescencia (FPA) _____	45
Diagnóstico de brucelosis causada por <i>R-Brucella</i> _____	49
Técnica de microaglutinación _____	49
Técnica de IELISA _____	52
Control de calidad del diagnóstico, insumos y reactivos _____	59
Registro de los datos _____	61
Capítulo III-Diagnóstico bacteriológico _____	62
Aislamiento _____	62
Medios de cultivo _____	63
Identificación _____	65
Flujograma para diferenciar <i>Brucella</i> de gram negativos _____	66
Tipificación _____	68
Mantenimiento de los cultivos _____	70
Capítulo III- Bioseguridad _____	73
Referencias _____	75

## INTRODUCCION

La brucelosis también conocida como fiebre de Malta, fiebre ondulante o del Mediterráneo, es una enfermedad zoonótica conocida desde hace más de cien años. Afecta a la mayoría de las especies animales de sangre caliente, el hombre es sólo un huésped accidental. Es de difusión mundial y aunque ha sido erradicada en países industrializados continúa siendo aún hoy, un grave problema para la Salud Pública, la producción animal y las economías de algunas regiones (11). En América Latina, los países con mayor prevalencia son Argentina, México y Perú (12, 13).

Los esfuerzos que realizan algunos países para controlar la infección suelen ser de escasa efectividad debido a que es muy contagiosa, de epidemiología compleja y no siempre se cuenta con recursos suficientes para asegurar la continuidad en los programas de control.

En las últimas décadas, el aumento de las urbanizaciones y la explotación animal poco planificada favoreció el desarrollo de la infección.

El agente causal es el género *Brucella*, llamado así en honor de David Bruce, quien en 1887 aisló el microorganismo del bazo de un soldado, en la isla de Malta. Posteriormente se demostró el carácter zoonótico de la brucelosis al comprobar que los soldados se enfermaban por consumir leche de cabras infectadas.

El género *Brucella* comprende 6 especies terrestres y dos marinas cada una de las cuales ha demostrado una marcada predilección por su reservorio aunque pueden darse infecciones cruzadas. *Brucella abortus*, afecta preferentemente bovinos; *B. melitensis*, caprinos y ovinos; *B. suis*, porcinos, liebres y renos; *B. canis*, perros; *B. ovis*, ovinos; *B. neotomae*, ratas; *B. pinnipediae*, focas, *B. cetaceae*, delfines (8, 37). Las dos últimas aisladas de mamíferos marinos fueron descritas en 1994 y alertan sobre la posibilidad de que nuevas especies puedan emerger y adaptarse a los cambios sociales y a las modernas prácticas de producción de alimentos.

Los animales silvestres pueden adquirir la infección y constituyen un riesgo para el hombre y los animales domésticos.

### **La enfermedad en el hombre**

El hombre se contagia por consumo de alimentos, contacto directo o indirecto con animales infectados o por accidentes de laboratorio. *B. melitensis* y *B. suis* son altamente patógenas, *B. abortus* y *B. canis* son moderadamente patógenas, mientras que *B. ovis* y *B. neotomae* parecen no afectarlo (31). La incidencia de la enfermedad en el hombre está en relación directa con la infección en los animales domésticos. Hay un marcado aumento de casos coincidente con la

época del año en que paren ovejas, cabras y cerdos. El período de riesgo es mayor con las vacas, por ser más larga la duración de la lactancia.

El género *Brucella* penetra en el organismo por vía digestiva, respiratoria, cutánea y conjuntival. Las tres últimas son las formas de infección más frecuentes en veterinarios, trabajadores rurales, operarios de frigoríficos, de mataderos o personal de laboratorios. En estos casos las tareas de mayor riesgo son las relacionadas con la asistencia en los partos, la faena de animales y la limpieza de los utensilios, máquinas y vertederos donde se procesan. Se han descrito infecciones en áreas administrativas de plantas donde faenan animales, atribuidas a la contaminación del aire.

Por vía digestiva, *Brucella* penetra a través de las membranas del tracto intestinal, aunque cuando la acidez del jugo gástrico es baja, puede atravesar las mucosas del estómago. El riesgo al consumir leche cruda está relacionado con el estado del animal ya que la mayor cantidad de gérmenes se liberan al comienzo de la lactancia. El consumo de derivados lácteos contaminados como quesos cremosos, manteca y helados es la forma más común de transmisión. Los quesos duros, el yogur y los productos lácteos ácidos son menos riesgosos debido a la fermentación láctica.

La brucelosis puede ser adquirida por transfusión sanguínea cuando la sangre pertenece a un dador asintomático con bacteriemia. Ha sido comprobada por esa vía y también por trasplante de médula. Aunque esta forma de infección no ha sido muy estudiada, significa un gran riesgo para el receptor sobre todo en áreas endémicas.

En el hospital, los pacientes constituyen un riesgo mínimo, sin embargo las muestras de sangre, secreciones y tejidos pueden ser peligrosos para el personal. Es necesario utilizar equipos de protección personal y seguir de manera estricta las normas de bioseguridad recomendadas.

### **La enfermedad en los animales**

En los animales, el género *Brucella* se localiza inicialmente en los ganglios cercanos a la puerta de entrada y luego de multiplicarse, invade el resto del organismo con una bacteriemia que puede durar meses y aún años. Interacciona con las células del sistema monocito-macrófago y logra sobrevivir produciendo enzimas antioxidantes, sintetizando proteínas, liberando nucleótidos o utilizando componentes de su membrana externa, que le confieren resistencia a la degradación enzimática. El género *Brucella* tiene predilección por placenta, glándula mamaria, órganos sexuales, articulaciones y bolsas sinoviales. El síntoma principal es el aborto, durante el cual se liberan gran cantidad de microorganismos, al igual que en el parto aparentemente natural, contaminando pastos, agua y el medio ambiente. De esta forma se completa el ciclo

infeccioso, asegurando la contaminación de otros animales y la persistencia del germen en la naturaleza.

Los animales se infectan naturalmente por vía conjuntival, digestiva, respiratoria, genital y por contacto. Las mucosas por ser barreras fácilmente franqueables, constituyen la principal puerta de entrada.

Las vacas infectadas, luego de la parición, eliminan gérmenes en el calostro y la leche hasta la tercer semana, pero cuando hay mastitis intersticial la liberación de *Brucella* es permanente. Por heces y orina también se eliminan brucelas pero en menor número.

### **Etiopatogenia de la brucelosis humana**

La susceptibilidad a la infección depende del estado inmunitario y nutricional individual, del tamaño y vía de penetración del inóculo y de la especie de *Brucella*. El factor de virulencia principal, sería el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular del microorganismo. Las cepas lisas que contienen S-LPS son más virulentas y más resistentes a la muerte intracelular por leucocitos polimorfonucleares (PMNL). Además, el género *Brucella* puede sobrevivir y multiplicarse en monocitos y macrófagos del sistema retículo endotelial (SRE). La localización en el SRE puede explicar las manifestaciones clínicas de la infección como linfadenopatías, hepatoesplenomegalia y las complicaciones óseas (5, 30). Los anticuerpos del isotipo IgM, aparecen en la 1-2 semanas luego de la infección, seguidos por el isotipo IgG. Ambos aumentan considerablemente durante las siguientes semanas y parecen opsonizar a los microorganismos, facilitan la fagocitosis y confieren resistencia a las reinfecciones. No obstante, la recuperación de la infección depende de un mecanismo mediado por células. Los linfocitos T específicos activados, segregan citoquinas que activan a los macrófagos y estimulan su poder bactericida intracelular. El paciente infectado muestra hipersensibilidad cutánea de tipo retardada a varios antígenos de *Brucella*.

### **Sintomatología clínica**

Los síntomas más característicos son fiebre, pérdida de peso, escalofríos, sudores, cefaleas, anorexia, fatiga, astenia, mialgias y artralgias (4, 42). Aunque a veces la enfermedad puede cursar en forma subclínica. Los síntomas se presentan generalmente a las 2-3 semanas posteriores a la infección pero en algunos casos pueden aparecer más tarde. Ocasionalmente, predominan los síntomas comprometidos con un órgano en particular y en ese caso la enfermedad se considera localizada o con complicaciones.

Las complicaciones osteoarticulares, ocurren en el 30- 40 % de los casos e incluyen artritis,

sacroileítis, bursitis y espondilitis. La tomografía computada, más sensible que la radiografía, es especialmente útil en el diagnóstico de espondilitis (34). La espondilitis por *Brucella* afecta generalmente vértebras lumbares, mientras que la tuberculosa produce abscesos paraespinales. Las complicaciones hepáticas se observan con frecuencia en infecciones por *B. melitensis*, aunque los valores de las pruebas funcionales hepáticas sean sólo levemente anormales. Algunas veces, los valores de las transaminasas están aumentados y hacen sospechar de alguna hepatitis de origen viral (7). Los abscesos hepáticos y las lesiones supurativas crónicas se asocian con la infección por *B. suis*.

Las complicaciones neurológicas ocurren en <2% de los casos y la meningitis aguda o crónica es el síndrome más común. En esos casos el líquido céfalo-raquídeo (LCR) presenta elevada la concentración de proteínas, reducida la concentración de glucosa y pleocitosis linfocítica. El germen se aísla muy raramente de LCR, aunque el nivel de anticuerpos es alto lo mismo que en el suero.

Otras complicaciones aunque poco frecuentes son las cardiovasculares, que se relacionan a los casos de muerte e incluyen miocarditis, pericarditis y aneurisma de aorta. También se han descrito complicaciones génitourinarias, gastrointestinales y pulmonares.

Cuando los síntomas persisten por más de un año, la enfermedad se define como crónica y se suele explicar por la presencia de lesiones supurativas localizadas.

### **Clasificación de los casos**

Los casos se clasifican como sospechosos cuando los síntomas clínicos y la epidemiología son compatibles con la enfermedad, como probables cuando además, una prueba serológica tamiz es positiva y confirmados cuando el informe del laboratorio, que dispone de métodos serológicos y bacteriológicos para efectuar el diagnóstico, resulta positivo (38).

## **DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO**

Los métodos serológicos se emplean como prueba indirecta de la infección ya que la bacteriología no siempre es posible y cuando se la realiza no siempre es positiva. En este tipo de diagnóstico se debe tener en cuenta que el género *Brucella* presenta una estructura antigénica compleja, que la inmunidad no es estimulada igualmente por los distintos antígenos y que las respuestas varían con el estado de la infección.

Un resultado positivo puede indicar infección activa, anticuerpos que persisten después de la recuperación, contacto accidental con el germen no necesariamente seguida de enfermedad o exposición a un microorganismo que presente reacción cruzada con *Brucella*. Es por eso que mientras el aislamiento bacteriológico tiene una sola interpretación, los resultados serológicos deben estudiarse en conjunto con los datos clínicos y epidemiológicos.

Las células lisas de *Brucella* presentan en la membrana externa un lipopolisacárido (LPS) que la cubre casi totalmente y estimula la respuesta de anticuerpos. Además, se encuentran proteínas (OMP) y un polisacárido llamado hapteno nativo, polisacárido B o componente uno, de acuerdo al método de extracción. En el citoplasma se han identificado proteínas de significación diagnóstica, que están presentes en fracciones solubles de cepas lisas y rugosas. Las pruebas serológicas se pueden realizar con antígenos de células enteras, S-LPS, extractos celulares o proteínas purificadas.

Los métodos clásicos para el diagnóstico de infecciones debidas a *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* emplean antígenos de células enteras de *B. abortus* en fase lisa, que detectan anticuerpos anti S-LPS. Pueden presentarse casos de reacción cruzada con algunas bacterias de importancia clínica como *Francisella tularensis*, *E.coli* O 157:H7, *Vibrio colera*, *Salmonella* grupo N y *Pseudomona maltophilia* (17).

Las técnicas clásicas: aglutinación con antígeno tamponado (BPA), Rosa de Bengala (RB), Tubo (Wright), 2- mercapto-etanol (2ME), y Fijación de Complemento (FC) continúan siendo útiles en el diagnóstico. Es importante usar antígenos estandarizados para asegurar la uniformidad de los resultados.

La prueba de aglutinación rápida en placa (Huddleson) se encuentra en desuso y en la actualidad ha sido reemplazada por BPA o RB. Estas últimas por su bajo pH, privilegian la aglutinación de las inmunoglobulinas tipo IgG reduciendo las reacciones inespecíficas. BPA es ligeramente más sensible que RB y se recomienda para el estudio de brucelosis en sangre a transfundir.

La prueba de Wright detecta isotipos IgM, IgG e IgA en el suero, es de baja especificidad y no es recomendable en casos crónicos. La prueba de 2ME se realiza conjuntamente con la prueba de Wright, utilizando el reactivo que es tóxico, para reducir las IgM presentes en el suero. La FC es una prueba sensible y específica, detecta anticuerpos de tipo IgG que predominan en casos



crónicos pero tiene el inconveniente de ser muy laboriosa y poco apropiada para casos agudos.

Con frecuencia en pacientes con brucelosis, se observan recaídas que se relacionan con un tratamiento inapropiado de antibióticos, virulencia de la cepa o respuesta inmunológica deficiente. Algunos investigadores han informado la aparición de un segundo pico de IgG e IgA, como indicadores de recaídas (6, 33).

También se ha observado que a menudo muchos meses después del tratamiento se detectan niveles de anticuerpos bajos, en pacientes que presentaron una evolución clínica satisfactoria. La significación de este hecho es difícil de establecer ya que no se puede definir con certeza el tiempo de la eliminación intracelular de *Brucella* y tampoco existe un criterio seguro de cura de la enfermedad.

La continuidad del título de anticuerpos en el suero después del tratamiento, se debe principalmente a isotipos IgG e IgA en la mayoría de los pacientes, independientemente del cuadro clínico (16). La persistencia de IgG por si misma, no parece ser indicador de infección crónica, aunque algunos autores señalan que lo es, si el paciente no presentaba altos títulos al comienzo de la enfermedad. En conclusión, en el diagnóstico es necesario tener en cuenta los datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio.

Las modernas pruebas de unión primaria tienen la ventaja de su alta sensibilidad y especificidad, detectan anticuerpos incompletos, comunes en los pacientes crónicos y reducen la reacción cruzada con otros gérmenes gram negativos. CELISA es una ELISA de competición que utiliza un anticuerpo monoclonal específico para una porción de la cadena "O" del S-LPS de *Brucella*, que compite con los anticuerpos del suero por el antígeno fijo en el soporte sólido. Ha demostrado tener una sensibilidad del 98.3% y una especificidad de 99.7%, detecta casos agudos y crónicos.

La prueba de análisis de la polarización de la fluorescencia (FPA), tiene la ventaja de realizarse en tubos de vidrio de 12x75mm, que se pueden volver a usar luego de su lavado, se realiza en pocos minutos, tiene una sensibilidad del 96.1% y una especificidad del 97.9% y al igual que CELISA detecta casos agudos y crónicos, pero tiene el inconveniente de dar error con sueros con alto contenido de lípidos. Requiere de un polarímetro para su lectura, mientras CELISA puede utilizar cualquier lector de uso habitual en los laboratorios clínicos.

Cuando la sospecha es de infección por *Brucella canis* el diagnóstico se realiza utilizando antígenos preparados con la cepa *B. canis* M. Nosotros hacemos la prueba de microaglutinación (RSAT) como tamiz y una ELISA indirecta para confirmar los casos, esta última utilizando una proteína recombinante como conjugado.

### **Técnica de aglutinación en placa (Huddleson) (PAT)**

## **Fundamento**

Es una prueba sencilla descrita en 1928 por Huddleson, que aún se emplea como tamiz en algunos países de América Latina aunque está en desuso fuera del continente.

Esta sujeta a errores operacionales y puede presentar un fenómeno de zona en las diluciones más bajas de sueros con título alto, en sueros contaminados o cuando se emplean antígenos no normatizados.

## **Especificaciones**

A pesar de ser una prueba tamiz es cuantitativa aunque el punto de corte no ha sido consensuado.

## **Muestra requerida**

Suero límpido, no hemolizado

Conservar los sueros congelados a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$

## **Reactivos**

Antígeno de Placa, que cumpla con las especificaciones del USDA, volumen celular 11%, pH 6.7  $\pm 0.3$

Suero control positivo

Suero control negativo

## **Materiales**

Aglutinoscopio (caja de lectura de 45cm de largo x 35 cm de ancho x 15 cm de profundidad), con interior pintado de negro opaco, con una luz que ilumine de manera oblicua la placa y tapa de vidrio.

Mezclador

Placa de vidrio marcada con cuadrados de 4x4 cm

Gradillas

Micropipetas 10-100 $\mu\text{l}$

Micropipeta 5-40 $\mu\text{l}$

## **Equipos**

Refrigeradora; Freezer; Estufa; Centrífuga; Timer; Vortex,

## **Drogas y soluciones**

Alcohol 70%

Hipoclorito de sodio al 0.1%

### **Precauciones generales**

- Almacenar el antígeno a 5°C +/-2°C. Si se congela queda inutilizado.
- Para realizar la prueba tanto el antígeno como el suero deben estar a temperatura ambiente (22+/- 4°C).
- Antes de usar el antígeno, rotar suavemente el frasco para homogeneizar la suspensión.
- Verificar la fecha de vencimiento del antígeno antes de realizar la prueba.
- La placa de vidrio debe estar limpia, libre de detergentes y seca.
- Homogeneizar los sueros antes de realizar el ensayo
- Utilizar un suero control positivo y un suero control negativo.

### **Medidas de bioseguridad**

- Al ingresar al laboratorio de serología vestir equipo de protección personal (Bata, calzado cerrado, cabello recogido) de acuerdo a las recomendaciones del Manual de Bioseguridad de la OMS, 2005.
- Al manipular muestras de sangre utilizar guantes y seguir las instrucciones de la Resolución 228/93 del Ministerio de Salud.
- Descartar los tips en solución de hipoclorito de sodio al 2% de preparación diaria.
- Descartar las muestras de acuerdo a las indicaciones de la Ley 24051 de Residuos Peligrosos.
- Limpiar el área de trabajo al finalizar la tarea con hipoclorito de sodio al 0.1% de preparación diaria.
- Quitarse los guantes y lavarse las manos al terminar el trabajo.
- Quitarse la bata al dejar el laboratorio.

### **Técnica**

- Colocar 80, 40, 20 y 10 µl del suero control positivo en cada uno de los cuadrados de la primer columna de la placa de vidrio. Colocar 80, 40, 20 y 10 µl del suero control negativo en los cuadrados de la segunda columna de la placa de vidrio.
- Colocar 80, 40, 20 y 10 µl del suero problema en la tercer columna de la placa de vidrio.
- Colocar 30 µl de antígeno cerca de cada suero.
- Mezclar suero y antígeno con mezclador comenzando por la dilución mayor.

- La mezcla debe formar círculos del siguiente diámetro:

<u>Dilución</u>	<u>Diámetro</u>
1:25	27mm
1:50	24mm
1:100	21mm
1:200	18mm

- Rotar suavemente la placa de vidrio, colocarla en el aglutinoscopio y taparla.
- A los cuatro minutos rotar nuevamente la placa y continuar la incubación.
- A los 8 minutos encender la luz y efectuar la lectura inclinando ligeramente la placa.

### **Lectura e interpretación de los resultados**

- Positivo: El ensayo se clasifica como positivo cuando aparece cualquier aglutinación, aunque sea fina.
- Negativo: La ausencia de aglutinación se interpreta como negativo.
- Incompleta: La aglutinación es incompleta cuando se observa de manera parcial
- El título de la prueba es la última dilución con resultado positivo o incompleto.
- Si el resultado es positivo o incompleto es necesario realizar una prueba confirmatoria.

### **Criterio de aceptación del resultado**

Leer el resultado de los sueros controles. Si son los esperados, se leen los de las muestras. En caso de discrepancias repetir el ensayo cambiando el lote de antígeno.

### **Referencias**

- Alton, G.G, Jones, L.M., Angus, R.D. & Verger, J.M. (1988). Bacteriological and serological methods. In *Techniques for the brucellosis Laboratory*, pp.13-136. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique.
- Diaz, R. & Moriyon, I. (1989). Laboratory techniques in the diagnosis of human brucellosis. In: *Brucellosis: clinical and laboratory aspect*, pp. 73-84. Ed. E. J. Young & M.J. Corbel. CRC, Boca Raton, Fl.
- Lucero, N. E. & Bolpe, E. (1998). Buffered plate antigen test as a screening test for the diagnosis of human brucellosis. *J.Clin. Microbiol.* 36, 1425-1427.
- Lucero, N.E. & Siñeriz, F. (2005). The Argentine experience in enhancing biosafety through good laboratory practices. *Asian Biotech and Develop Rev* 8, 99-120.
- Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Jacob, N.R. (2007) The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis. *Am J Infect Dis* 3(1):27-35.

### **Técnica de aglutinación con antígeno tamponado (BPA)**

## **Fundamento**

Es una prueba tamiz, rápida, práctica y económica que reduce las aglutinaciones inespecíficas y es ligeramente más sensible que la prueba de Rosa de Bengala. El bajo pH del antígeno favorece la aglutinación de los anticuerpos del isotipo IgG. Por su simpleza se puede realizar en los laboratorios de hospitales ya que no requiere equipos costosos.

## **Especificaciones**

Es cualitativa y se interpreta como positiva o negativa.

## **Muestra requerida**

Suero límpido, no hemolizado

Conservar los sueros congelados a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$

## **Reactivos**

Antígeno de BPA, que cumpla con las especificaciones del USDA, volumen celular 11%, pH 3.65  $\pm 0.02$

Suero control positivo

Suero control negativo

## **Materiales**

Aglutinoscopio (caja de lectura de 45cm de largo x 35 cm de ancho x 15 cm de profundidad), con fondo pintado de negro y con tapa de vidrio.

Mezclador

Placa de vidrio marcada con cuadrados de 4x4 cm

Gradillas

Micropipetas 10-100 $\mu\text{l}$

## **Equipos**

Refrigeradora; Freezer; Estufa; Centrífuga; Timer; Vortex.

## **Drogas y soluciones**

Alcohol 70%

Hipoclorito de sodio al 0.1%

### **Precauciones generales**

- Almacenar el antígeno entre  $5^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Si se congela queda inutilizado.
- Para realizar la prueba tanto el antígeno como el suero deben estar a temperatura ambiente ( $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ ).
- Antes de usar el antígeno, rotar suavemente el frasco para homogeneizar la suspensión.
- Verificar la fecha de vencimiento del antígeno antes de realizar la prueba.
- La placa de vidrio debe estar limpia, libre de detergentes y seca.
- Homogeneizar los sueros antes de realizar el ensayo
- Utilizar un suero control positivo y un suero control negativo.

### **Medidas de bioseguridad**

- Al ingresar al laboratorio de serología vestir equipo de protección personal (Bata, calzado cerrado, cabello recogido) de acuerdo a las recomendaciones del Manual de Bioseguridad de la OMS, 2005.
- Al manipular muestras de sangre utilizar guantes y seguir las instrucciones de la Resolución 228/93 del Ministerio de Salud.
- Descartar los tips en solución de hipoclorito de sodio al 2% de preparación diaria.
- Descartar las muestras de acuerdo a las indicaciones de la Ley 24051 de Residuos Peligrosos.
- Limpiar el área de trabajo al finalizar la tarea con hipoclorito de sodio al 0.1% de preparación diaria.
- Quitarse los guantes y lavarse las manos al terminar el trabajo.
- Quitarse la bata al dejar el laboratorio.

### **Técnica**

- Colocar 80  $\mu\text{l}$  del suero control positivo en uno de los cuadrados de la placa de vidrio.
- Colocar 80  $\mu\text{l}$  del suero control negativo en otro cuadrado de la placa de vidrio.
- Colocar 80  $\mu\text{l}$  de suero problema en el tercer cuadrado de la placa de vidrio.
- Colocar 30  $\mu\text{l}$  de antígeno cerca del suero.
- Mezclar suero y antígeno con palillo o mezclador.
- La mezcla debe tener una forma de 27x25mm
- Rotar suavemente la placa de vidrio, colocarla en el aglutinoscopio y tapanla.
- A los cuatro minutos rotar nuevamente la placa y continuar la incubación.

- A los 8 minutos encender la luz y efectuar la lectura inclinando ligeramente la placa.

### **Lectura e interpretación de los resultados**

- Positivo: El ensayo se clasifica como positivo cuando aparece cualquier aglutinación, aunque sea fina. Si el resultado es positivo realizar una prueba confirmatoria.
- Negativo: La ausencia de aglutinación se interpreta como negativo.

### **Criterio de aceptación del resultado**

Realizar el ensayo a los sueros controles antes que a las muestras. Los resultados deben ser los esperados, positivos o negativos. En caso de discrepancias repetir el ensayo cambiando el lote de antígeno.

### **Referencias**

- Alton, G.G, Jones, L.M., Angus, R.D. & Verger, J.M. (1988). Bacteriological and serological methods. In *Techniques for the brucellosis Laboratory*, pp.13-136. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique.
- Diaz, R. & Moriyon, I. (1989). Laboratory techniques in the diagnosis of human brucellosis. In: *Brucellosis: clinical and laboratory aspect*, pp. 73-84. Ed. E. J. Young & M.J. Corbel. CRC, Boca Raton, Fl.
- Lucero, N. E. & Bolpe, E. (1998). Buffered plate antigen test as a screening test for the diagnosis of human brucellosis. *J.Clin. Microbiol.* 36, 1425-1427.
- Lucero, N.E. & Siñeriz, F. (2005). The Argentine experience in enhancing biosafety through good laboratory practices. *Asian Biotech and Develop Rev* 8, 99-120.
- Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Jacob, N.R. (2007) The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis. *Am J Infect Dis* 3(1):27-35.

## **Técnica de aglutinación con Rosa de Bengala (RBT)**

## **Fundamento**

Es una prueba tamiz, de gran difusión, sensible, rápida y económica. El bajo pH del antígeno favorece la aglutinación de los anticuerpos del isotipo IgG. Por su simpleza se puede realizar en los laboratorios de hospitales ya que no requiere equipos costosos.

## **Especificaciones**

Es cualitativa y se interpreta como positiva o negativa.

## **Muestra requerida**

Suero límpido, no hemolizado

Conservar los sueros congelados a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$

## **Reactivos**

Antígeno de Rosa de Bengala, que cumpla con las especificaciones del USDA, volumen celular 8%, pH  $3.65 \pm 0.5$

Suero control positivo

Suero control negativo

## **Materiales**

Aglutinoscopio (caja de lectura de 45cm de largo x 35 cm de ancho x 15 cm de profundidad), con fondo pintado de negro y con tapa de vidrio.

Mezclador

Placa de vidrio marcada con cuadrados de 4x4 cm

Gradillas

Micropipetas 10-100 $\mu\text{l}$

## **Equipos**

Refrigeradora; Freezer; Estufa; Centrifuga; Timer; Vortex.

## **Drogas y soluciones**

Alcohol 70%

Hipoclorito de sodio al 0.1%

## **Precauciones generales**



- Almacenar el antígeno a 5°C +/-2°C. Si se congela queda inutilizado.
- Para realizar la prueba tanto el antígeno como el suero deben estar a temperatura ambiente (22+/- 4°C).
- Antes de usar el antígeno, rotar suavemente el frasco para homogeneizar la suspensión.
- Verificar la fecha de vencimiento del antígeno antes de realizar la prueba.
- La placa de vidrio debe estar limpia, libre de detergentes y seca.
- Homogeneizar los sueros antes de realizar el ensayo
- Utilizar un suero control positivo y un suero control negativo.

### **Medidas de bioseguridad**

- Al ingresar al laboratorio de serología vestir equipo de protección personal (Bata, calzado cerrado, cabello recogido) de acuerdo a las recomendaciones del Manual de Bioseguridad de la OMS, 2005.
- Al manipular muestras de sangre utilizar guantes y seguir las instrucciones de la Resolución 228/93 del Ministerio de Salud.
- Descartar los tips en solución de hipoclorito de sodio al 2% de preparación diaria.
- Descartar las muestras de acuerdo a las indicaciones de la Ley 24051 de Residuos Peligrosos.
- Limpiar el área de trabajo al finalizar la tarea con hipoclorito de sodio al 0.1% de preparación diaria.
- Quitarse los guantes y lavarse las manos al terminar el trabajo.
- Quitarse la bata al dejar el laboratorio.

### **Técnica**

- Colocar 30 µl del suero control positivo en uno de los cuadrados de la placa de vidrio.
- Colocar 30 µl del suero control negativo en otro cuadrado de la placa de vidrio.
- Colocar 30 µl del suero problema en el tercer cuadrado de la placa de vidrio.
- Colocar 30 µl de antígeno cerca de cada suero.
- Mezclar suero y antígeno con mezclador.
- La mezcla debe formar óvalos de 20x 24mm.
- Rotar suavemente la placa de vidrio, en forma manual o mecánica con una velocidad de rotación de 10-12 movimientos por minuto.
- A los cuatro minutos leer la prueba sobre fondo blanco.

### **Lectura e interpretación de los resultados**

- Positivo: El ensayo se clasifica como positivo cuando aparece cualquier aglutinación, aunque sea fina.
- Negativo: La ausencia de aglutinación se interpreta como negativo.
- Si el resultado es positivo o incompleto es necesario realizar una prueba confirmatoria.

### **Criterio de aceptación del resultado**

Leer el resultado de los sueros controles. Si son los esperados, se leen los resultados de las muestras. En caso de discrepancias repetir el ensayo cambiando el lote de antígeno.

### **Referencias**

- Alton, G.G, Jones, L.M., Angus, R.D. & Verger, J.M. (1988). Bacteriological and serological methods. In *Techniques for the brucellosis Laboratory*, pp.13-136. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique.
- Diaz, R. & Moriyon, I. (1989). Laboratory techniques in the diagnosis of human brucellosis. In: *Brucellosis: clinical and laboratory aspect*, pp. 73-84. Ed. E. J. Young & M.J. Corbel. CRC, Boca Raton, Fl.
- Lucero, N. E. & Bolpe, E. (1998). Buffered plate antigen test as a screening test for the diagnosis of human brucellosis. *J.Clin. Microbiol.* 36, 1425-1427.
- Lucero, N.E. & Siñeriz, F. (2005). The Argentine experience in enhancing biosafety through good laboratory practices. *Asian Biotech and Develop Rev* 8, 99-120.
- Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Jacob, N.R. (2007) The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis. *Am J Infect Dis* 3(1):27-35.

## **Técnica de aglutinación en tubo (Wright) y 2- mercaptoetanol (TAT-2ME)**

## **Fundamento**

Es una prueba de gran difusión en el mundo, descrita por Wright en 1897, que ha sido utilizada como prueba estándar y a menudo como única confirmatoria. El antígeno tiene el mismo pH que la prueba de Huddleson y presenta los mismos inconvenientes. Tiene la ventaja de detectar en el suero anticuerpos IgM, IgG e IgA pero es de baja especificidad.

La prueba de 2-mercaptoetanol (2ME) se realiza paralelamente con la de Wright utilizando el reactivo, que es tóxico, para eliminar los anticuerpos de tipo IgM y aumentar la especificidad. Sin embargo, el 2-mercaptoetanol también reduce la cantidad de anticuerpos IgG presentes en el suero.

## **Especificaciones**

Hay discrepancias respecto al punto de corte en la prueba de Wright, aunque algunos autores han sugerido el título 1:320 en las áreas rurales y 1:80 en zonas donde la enfermedad no es endémica. En nuestro laboratorio no compartimos este criterio.

## **Muestra requerida**

Suero límpido, no hemolizado. La presencia de hemólisis excluye el empleo de esta prueba ya que la hemoglobina precipita con el fenol enmascarando la aglutinación.

Conservar los sueros congelados a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$

## **Reactivos**

Antígeno de tubo, que cumpla con las especificaciones del USDA, volumen celular 4.5%, pH 6.7  $\pm 0.3$

Suero control positivo con alto contenido de IgM

Suero control negativo

## **Materiales**

Tubos de vidrio de 13x100mm

Gradillas

Micropipetas 10-100 $\mu\text{l}$

Micropipeta 5-40 $\mu\text{l}$

Dispensador para la dosificación en serie

Combitips Eppendorf

Erlenmeyeres

Probetas

### **Equipos**

Refrigeradora; Freezer; Estufa; Centrífuga; Timer; Vortex.

### **Drogas y soluciones**

Alcohol 70%

Hipoclorito de sodio al 0.1%

2-mercaptoetanol p.a

Cloruro de sodio p.a

Fenol p.a

Solución fisiológica al 0.85%

Solución fisiológica fenolada al 0.5%

Suspensión de antígeno de tubo al 2% en salina fisiológica

Solución de 2-ME 0.1M en salina fisiológica

### **Precauciones generales**

- Almacenar el antígeno a 5°C +/-2°C. Si se congela queda inutilizado.
- Para realizar la prueba tanto el antígeno como el suero deben estar a temperatura ambiente (22+/- 4°C).
- Antes de preparar la dilución del antígeno, rotar suavemente el frasco para homogeneizar la suspensión.
- Verificar la fecha de vencimiento del antígeno antes de realizar la dilución.
- Almacenar el 2-mercaptoetanol a temperatura ambiente y en recipiente perfectamente cerrado
- La placa de vidrio debe estar limpia, libre de detergentes y seca.
- Homogeneizar los sueros antes de realizar el ensayo
- Utilizar un suero control positivo y un suero control negativo.

### **Medidas de bioseguridad y seguridad**

- Al ingresar al laboratorio de serología vestir equipo de protección personal (Bata, calzado cerrado, cabello recogido) de acuerdo a las recomendaciones del Manual de Bioseguridad de la OMS, 2005.
- Al manipular muestras de sangre utilizar guantes y seguir las instrucciones de la Resolución 228/93 del Ministerio de Salud.
- Descartar los tips en solución de hipoclorito de sodio al 2% de preparación diaria.
- Descartar las muestras de acuerdo a las indicaciones de la Ley 24051 de Residuos Peligrosos.
- Manipular el 2-mercaptoetanol de acuerdo a las instrucciones del manual de seguridad
- Manipular el fenol de acuerdo a las instrucciones del manual de seguridad
- Limpiar el área de trabajo al finalizar la tarea con hipoclorito de sodio al 0.1% de preparación diaria.
- Quitarse los guantes y lavarse las manos al terminar el trabajo.
- Quitarse la bata al dejar el laboratorio.

### **Técnica**

- Disponer en una gradilla dos filas de 5 tubos por cada muestra
- Marcar el primer tubo de cada fila con una “T” y “M” respectivamente.
- Colocar en las primeras dos filas 80,40, 20, 10 y 5 µl del suero control positivo.
- Colocar en las siguientes dos filas 80, 40, 20,10 y 5µl del suero control negativo.
- Colocar en las filas que siguen 80, 40, 20, 10 y 5µl de los sueros problema.
- Agregar a las filas marcadas “T”, 1 ml de solución fisiológica fenolada
- Agregar a las filas marcadas “M”, 1 ml de solución de 2-ME 0.1M
- Mezclar y dejar reposar entre 15min y 60min.
- Preparar un tubo marcado “T” con 1ml de solución fisiológica fenolada
- Preparar un tubo marcado “M”, con 1 ml de solución de 2ME 0.1M
- Agregar 1 ml de antígeno al 2% a todos los tubos
- Mezclar e incubar en estufa a 36°C +/-1°C durante 44-48h.
- Leer la prueba a trasluz contra fondo oscuro en el siguiente orden:
- Tubos control del poder aglutinante del antígeno con y sin 2ME.
- Control positivo con y sin 2ME
- Control negativo con y sin 2ME
- Si se aceptan los controles, leer los sueros problema de igual manera.

## Lectura e interpretación de los resultados

- Positivo: El ensayo se clasifica como positivo cuando la columna del tubo aparece límpida y la aglutinación en el fondo del tubo
- Negativo: La ausencia de aglutinación se interpreta como negativo.
- Incompleta: La aglutinación es incompleta cuando la columna esta turbia pero en el fondo del tubo hay aglutinación
- El título de la prueba es la última dilución con resultado positivo o incompleto.

El resultado se expresa como 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400

Si el título del suero es  $> 1:400$  efectuar diluciones para obtener el título final

## Técnica para determinar el título final

- Colocar en la gradilla 2 filas de 10 o más tubos cada una, por cada muestra.
- Marcar el primer tubo de cada fila con una "T" y "M" respectivamente.
- Colocar en el primer tubo de la fila "T", 160  $\mu$ l del suero control positivo y 2 ml de solución salina fenolada. Colocar 1 ml de solución salina fenolada al resto de los tubos.
- Pasar 1ml desde el primer tubo al siguiente y así sucesivamente descartando el último ml.
- Colocar en el primer tubo de la fila "M", 160  $\mu$ l del suero control positivo y 2 ml de solución de 2ME Colocar 1ml de solución de 2ME al resto de los tubos.
- Pasar 1ml del primer tubo al siguiente y así sucesivamente descartando el último ml.
- Proceder de la misma manera con el suero control negativo y con el resto de los sueros problema.
- Mezclar y dejar reposar entre 15min y 1 h.
- Preparar un tubo marcado "T" con 1ml de solución fisiológica fenolada
- Preparar un tubo marcado "M", con 1 ml de solución de 2ME 0.1M
- Agregar 1 ml de antígeno al 2% a todos los tubos
- Mezclar nuevamente e incubar en estufa a 36°C +/-1°C durante 44-48h.
- Leer la prueba a trasluz contra fondo oscuro en el siguiente orden:
- Tubos control del poder aglutinante del antígeno con y sin 2ME.
- Control positivo con y sin 2ME
- Control negativo con y sin 2ME
- Si el resultado de los controles es aceptable, leer los sueros problema de igual manera.

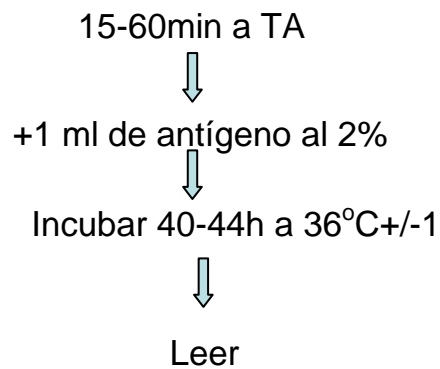
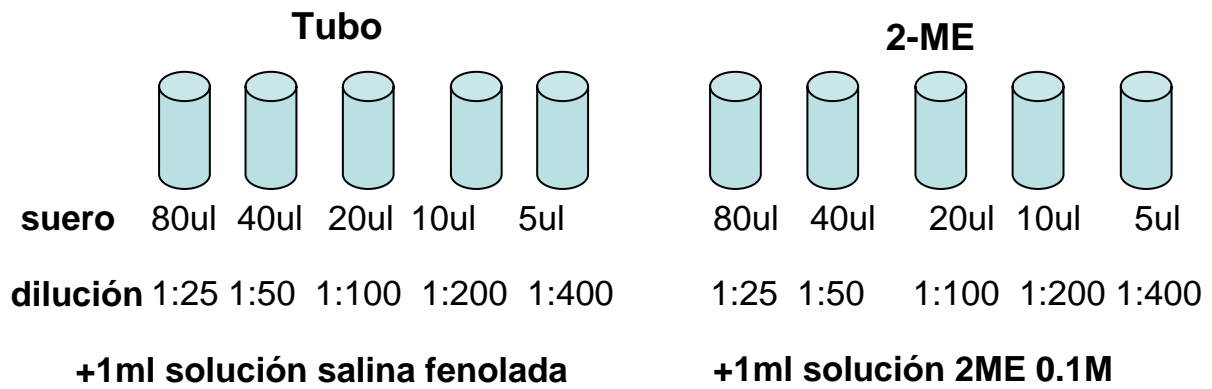
### **Criterio de aceptación del resultado**

Leer el resultado de los sueros controles. Si son los esperados, se leen las muestras. En caso de discrepancias repetir el ensayo, revisando las diluciones de los reactivos y/o cambiando el lote de antígeno.

### **Referencias**

- Alton, G.G, Jones, L.M., Angus, R.D. & Verger, J.M. (1988). Bacteriological and serological methods. In *Techniques for the brucellosis Laboratory*, pp.13-136. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique.
- Diaz, R. & Moriyon, I. (1989). Laboratory techniques in the diagnosis of human brucellosis. In: *Brucellosis: clinical and laboratory aspect*, pp. 73-84. Ed. E. J. Young & M.J. Corbel. CRC, Boca Raton, Fl.
- Lucero, N. E. & Bolpe, E. (1998). Buffered plate antigen test as a screening test for the diagnosis of human brucellosis. *J.Clin. Microbiol.* 36, 1425-1427.
- Lucero, N.E. & Siñeriz, F. (2005). The Argentine experience in enhancing biosafety through good laboratory practices. *Asian Biotech and Develop Rev* 8, 99-120.
- Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Jacob, N.R. (2007) The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis. *Am J Infect Dis* 3(1):27-35.

# Aglutinación en tubo y 2 mercaptoetanol



## Técnica de fijación del complemento



## **Fundamento**

Es una técnica aceptada como confirmatoria cuyo uso está muy difundido, requiere personal entrenado, reactivos titulados y laboratorios equipados. Existen numerosas variaciones, en la que se describe la fijación del complemento se hace en frío durante 14-18h. Se emplean glóbulos rojos de oveja al 2.8% sensibilizados con igual volumen de anticuerpos anti-glóbulos rojos de oveja preparados en conejo. La técnica se basa en la unidad hemolítica 50% que se define como la cantidad de complemento que lisa el 50% de 67 millones de glóbulos rojos de oveja, previamente sensibilizados.

## **Especificaciones**

Cuando se procesan una gran cantidad de sueros se utiliza el micrométodo, pero la titulación de los reactivos se hace en macrométodo. La técnica que se describe es en macrométodo.

## **Muestra requerida**

Suero límpido, no hemolizado. Conservar los sueros congelados a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$

## **Reactivos**

Antígeno de tubo (Wright), que cumpla con las especificaciones del USDA, volumen celular 4.5%, pH 6.7  $\pm 0.3$

Suero control de referencia positivo

Suero control de referencia negativo

## **Materiales**

Tubos de vidrio de 12x75mm

Gradillas

Micropipeta 5-40 $\mu\text{l}$

Micropipetas 20-200 $\mu\text{l}$

Micropipetas 10-100 $\mu\text{l}$

Micropipeta 100-1000 $\mu\text{l}$

Dispensador para la dosificación en serie

Combitips Eppendorf

Erlenmeyeres

Probetas

## **Equipos**

Refrigeradora; Freezer; Estufa; Centrífuga refrigerada; Timer; Vortex; Baño de agua termostatzado, espectrofotómetro.

## **Drogas y soluciones**

Alcohol 70%

Hipoclorito de sodio al 0.1%

Solución fisiológica (SF)

Solución tamponada de veronal sódico (VBS)

Glóbulos rojos de oveja (GR)

Hemolisina (H)

Complemento de cobayo (C')

Solución de Alsever

Suspensión de antígeno de tubo (Wright)

Cloruro de sodio

Barbital sódico (5-5 dietil-barbiturato de sódio)

Acido clorhídrico

Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

Dextrosa

Tri citrato de sodio.2H<sub>2</sub>O

Acido cítrico.H<sub>2</sub>O

## **Precauciones generales**

- Almacenar el antígeno a 5°C +/-2°C. Si se congela queda inutilizado.
- Para realizar la prueba tanto el antígeno como el suero deben estar a temperatura ambiente (22+/- 4°C).
- Antes de prepara la dilución del antígeno, rotar suavemente el frasco para homogeneizar la suspensión.
- Verificar la fecha de vencimiento del antígeno antes de realizar la dilución.
- Homogeneizar los sueros antes de realizar el ensayo
- Utilizar sueros controles de referencia positivo y negativo
- Verificar la fecha de vencimiento de los GR
- Verificar la titulación de todos los reactivos

## **Medidas de bioseguridad y seguridad**

- Al ingresar al laboratorio de serología vestir equipo de protección personal (Bata, calzado cerrado, cabello recogido) de acuerdo a las recomendaciones del Manual de Bioseguridad de la OMS, 2005.
- Al manipular muestras de sangre utilizar guantes y seguir las instrucciones de la Resolución 228/93 del Ministerio de Salud.
- Descartar los tips en solución de hipoclorito de sodio al 2% de preparación diaria.
- Descartar las muestras de acuerdo a las indicaciones de la Ley 24051 de Residuos Peligrosos.
- Limpiar el área de trabajo al finalizar la tarea con hipoclorito de sodio al 0.1% de preparación diaria.
- Quitarse los guantes y lavarse las manos al terminar el trabajo.
- Quitarse la bata al dejar el laboratorio.

## **Estandarización de los glóbulos rojos (GR) de oveja**

Se parte de sangre de oveja suspendida en solución de Alsever, con no menos de una semana de recolectada y conservada en refrigeración.

- Filtrar 10 ml de sangre a través de gasa cuádruple, en un tubo de centrífuga graduado
- Centrifugar a 1000 g durante 5 minutos
- Descartar el sobrenadante tratando de arrastrar la capa de leucocitos. Resuspender los GR en solución de BVS.
- Repetir los lavados cuatro veces. La última centrifugación durante 10 minutos.
- Preparar una suspensión de GR al 3 % en solución de BVS
- Hacer un recuento de los GR en cámara y ajustar la suspensión a  $6.7 \times 10^8$  GR/ml (2.8%)
- En dos cubetas del espectrofotómetro, provocar la lisis de 0.2ml de la suspensión de GR al 2.8%, con 2.8ml de agua destilada.
- Leer la densidad óptica (DO) a 540 nm, contra blanco de agua destilada y promediar las lecturas.

## **Titulación de la hemolisina**

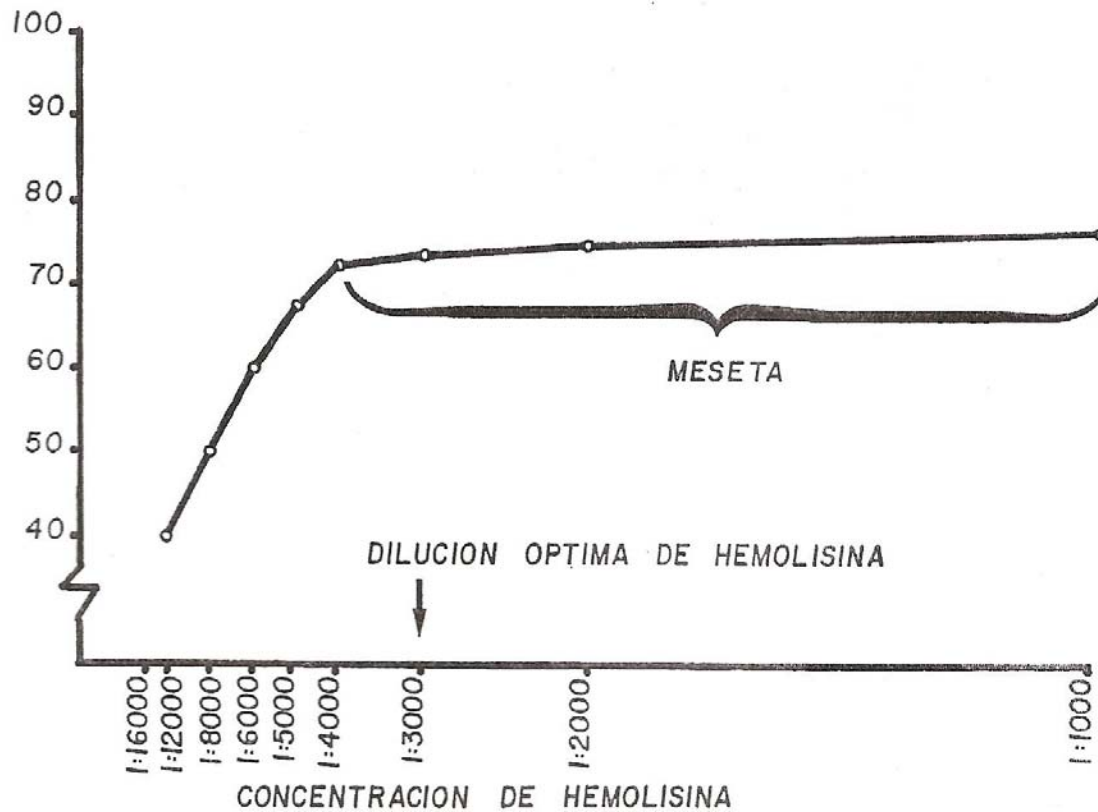
La titulación de la hemolisina se realiza usando varias diluciones en presencia de cantidades fijas de complemento. La titulación se hace cada vez que se comienza con un nuevo lote.

- Preparar una suspensión de GR al 2.8%
- Reconstituir la hemolisina liofilizada con un ml de agua destilada y llevar a 100 ml con

solución de BVS. Agregar 0.1 ml de azida sódica al 10% como conservador.

- Alicuotar y conservar en freezer.
- A partir de una dilución 1:100 preparar diluciones 1:1000; 1:2000; 1:2500; 1:3000; 1:4000; 1:5000; 1:8000 y 1: 12000.
- A un ml de cada dilución agregar un ml de GR al 2.8%, agitando suavemente. Dejar reposar los sistemas hemolíticos (SH) durante 15 minutos.
- Preparar 8 tubos con 1.2 ml de solución de BVS fría y 1.2 ml de complemento 1:400.
- Agregar a cada tubo 0.6 ml de las diluciones de SH. Mezclar.
- Incubar 30 minutos en baño termostático a  $36^{\circ}\text{C}\pm$ , agitando a los 15 minutos.
- Sumergir la gradilla en agua fría para detener la reacción.
- Centrifugar los tubos a 1000 g durante 5 minutos.
- Transferir el sobrenadante a cubetas del espectrofotómetro y leer la DO a 540 nm.
- Calcular el porcentaje de hemólisis para cada dilución de hemolisina según la fórmula:  
 $\text{DO del lisado} \times 100 / \text{DO hemólisis completa}$ .
- Graficar los % de hemólisis y las diluciones de hemolisina en papel milimetrado. La dilución óptima de hemolisina es la última a partir de la cual un incremento en la concentración no aumenta significativamente el % de hemólisis. Ya que la hemolisina se emplea en exceso, elegir para el uso la dilución inmediata inferior.

## **Titulación de la hemolisina**



### Glóbulos rojos al 2.8% sensibilizados (GRS)

- A un volumen de GR lavados y ajustados al 2.8%, agregar igual volumen de la dilución óptima de hemolisina.
- Agitar rápidamente en torbellino.
- Dejar reposar a temperatura ambiente durante 15min.

### Titulación del complemento (C')

El complemento es un complejo enzimático presente en el suero de los animales que está compuesto por lo menos de 11 proteínas diferentes. Tiene la particularidad de unirse a inmunocomplejos causando la lisis de los antígenos.

Se obtiene por extracción de sangre cardíaca de un pool de aproximadamente 20 cobayos adultos con ayuno de sólidos de 24h. Se separa el coágulo y se centrifuga el suero a 1000g durante 10 min. en centrífuga refrigerada. Luego de filtrarlo por membrana de 0.22 $\mu$  se distribuye en volúmenes de 1ml en viales estériles y se conserva a -70°C.

**Método para la titulación**

- Preparar GR al 2.8% sensibilizados
- Preparar una gradilla con 11 tubos de 13x100
- Diluir el complemento 1:40 y 1:400 en solución BVS a 6°C +/-2. Mantener refrigerado.
- Agregar los reactivos de acuerdo al cuadro siguiente:

Tubo no.	T i t u l a c i ó n							H e m ó l i s i s c o m p l e t a			Blanco
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Sol.VBS fría	1.95	1.80	1.65	1.50	1.35	1.20	1.05	1.40	1.40	1.40	2.40
C' 1:40	0	0	0	0	0	0	0	1.00	1.00	1.00	0
C' 1:400	0.45	0.60	0.75	0.90	1.05	1.20	1.35	0	0	0	0
GRS	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60

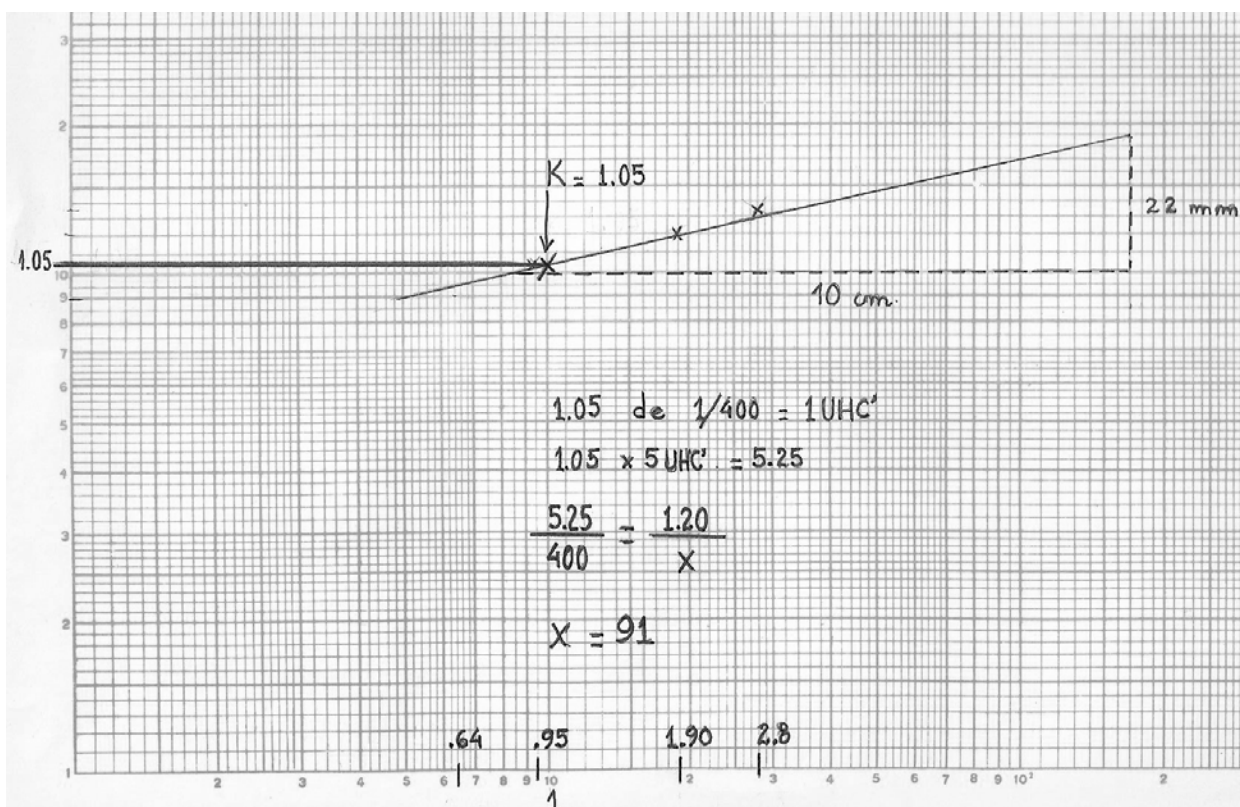
- Mezclar e incubar en baño termostatzado a 36°C +/-1, durante 30 minutos.
- Detener la reacción sumergiendo los tubos en agua fría
- Centrifugar a 1000 g durante 5 minutos
- Leer la DO del sobrenadante y determinar % de hemólisis. Tubos 8-10 tienen 100% de hemólisis.
- Llevar los valores al formulario de titulación de complemento.
- Calcular el valor Y/100-Y. Graficar este valor en función de cantidades de C', en papel logarítmico doble. Descartar los valores inferiores al 10% y superiores al 90%.

**Formulario de titulación del complemento**

Tubo no.	Volumen de C'	DO	% de hemólisis	Y/100-Y
1				
2				
3				
4				
5				
6				

- Cuando la hemólisis es 50%, el valor de  $Y/100-Y$  es 1. La cantidad de  $C'$  que corresponde a ese valor representa a una unidad hemolítica (UH).
- En la prueba se emplean 5 UH en un volumen de 0.4ml. Calcular la óptima dilución del complemento.
- La pendiente de la curva debe ser  $20 \pm 0.2$ . Una pendiente diferente indica error en la concentración o calidad de los GR.

### Gráfico de $Y/100-Y$ en función de $C'$



### Titulación del antígeno

El antígeno que se emplea es el de la prueba de aglutinación lenta en tubo (Wright). Para ser utilizado en la técnica de FC es necesario titularlo y la titulación se debe repetir cada vez que se utilice un nuevo lote. La titulación se realiza frente a un suero con alta concentración de anticuerpos.

Hacer diluciones seriadas de un suero positivo de título alto y del antígeno, de acuerdo al siguiente esquema:

- Colocar 0.2ml de cada dilución del suero en los tubos correspondientes

- Agregar 0.2ml de cada dilución del antígeno a los tubos que contienen suero y a los controles del C'
- Mezclar y dejar reposar durante 25 min.
- Agregar 0.4ml de C' a cada tubo que contiene suero y antígeno
- Agregar los volúmenes que corresponda a los controles de C'
- Agitar e incubar a 5°C+/-2 durante 15-18h
- Sacar los tubos del refrigerador y agregar 0.2ml de GRS al 2.8%
- Incubar en baño de agua a 36°C+/-1 durante 30 min.
- Centrifugar a 1000g durante 5 min. y leer la DO del sobrenadante en cubetas del espectrofotómetro
- La dilución óptima del antígeno es la mayor dilución que produce fijación con el suero.
- Conviene trazar una curva de dilución óptima entre los valores de 30% de hemólisis. Ver esquema)

### Titulación del antígeno

Diluciones Del antígeno	Diluciones del suero										Control del poder anticomplementario del antígeno		
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280			C'	C'
1/50											5UH	2.5UH	1.25UH
1/100													
1/200													
1/300													
1/400													
1/600													
1/800													
Suero sin antígeno													
Suero 1/5													
Suero 1/10													
BVS													



## Técnica de FC con cuatro diluciones

- En una gradilla colocar 6 tubos de 12x75mm por muestra de suero
- Colocar 40, 20, 10 y 5µl del suero en los 4 tubos primeros. Colocar 40 y 20µl en los tubos 5 y 6 respectivamente.
- Agregar 0.2ml de solución de BVS a los 4 tubos primeros y 0.4 ml a los tubos 5 y 6
- Mezclar
- Inactivar durante 30 min. a 56°C+/-1 en baño de agua termostatzado
- Enfriar
- Agregar 0.2ml de la dilución óptima de antígeno de reciente preparación, a los primeros 4 tubos
- Agregar 0.4ml de la dilución óptima de C´(5unidades hemolíticas), de reciente preparación, utilizando como diluyente BVS fría
- Preparar los controles del C´ de acuerdo al esquema
- Preparar el control de GRS colocando 0.8ml de solución de BVS en un tubo limpio y seco
- Agitar las gradillas para mezclar los reactivos e incubar a 5 °C+/-2 durante 18h
- Agregar a todos los tubos los tubos 0.2ml de GRS al 2.8%, incluyendo al tubo control de GRS
- Agitar la gradilla para mezclar los reactivos e incubar a 36°C+/-1 en baño de agua termostatzado durante 30min (agitar suavemente la gradilla a los 15 min.)
- Sumergir la gradilla en agua helada para interrumpir la reacción
- Centrifugar los tubos que no presenten 100% de hemólisis
- Leer los controles del C´. Si no están dentro de los valores aceptables se descarta la prueba
- Leer los controles del suero. Si presentan poder anticomplementario repetir la prueba con nueva muestra
- Leer los sueros controles de referencia positivo y negativo
- Si todos los controles son satisfactorios, se lee la prueba.
- El título del suero es la dilución más alta que presente 0-30% de hemólisis.

## Esquema de la técnica de FC con cuatro diluciones

		Diluciones del suero				Antígeno ml	BVS ml	C' 5UH ml	GRS ml
		ml							
		1:5	1:10	1:20	1:40				
1	Suero	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-	0.4	0.2
2	Control del PA del suero	0.2	0.2	-	-	-	0.2	0.4	0.2
3	Control del antígeno								
	C'5UH	-	-	-	-	0.2	0.2	0.4	0.2
	C'2.5UH	-	-	-	-	0.2	0.4	0.2	0.2
	C'1.25UH	-	-	-	-	0.2	0.5	0.1	0.2
4	Control de BVS								
	C'5UH	-	-	-	-	-	0.4	0.4	0.2
	C'2.5UH	-	-	-	-	-	0.6	0.2	0.2
	C'1.25UH	-	-	-	-	-	0.7	0.1	0.2
5	Control GRS	-	-	-	-	-	0.8		0.2

## Técnica de FC con determinación del título final

- Preparar una dilución 1:5 de cada suero colocando 200µl de suero y 800µl de BVS incluyendo los sueros controles de referencia
- Mezclar
- Inactivar durante 30 min. a 56°C+/-1 en baño de agua termostatzado
- Enfriar
- En una gradilla preparar una hilera de 10 o más tubos de 12x75 por muestra de suero
- Colocar 0.2ml de suero inactivado a los 2 primeros tubos de la muestra y a los 2 primeros tubos del control del poder anticomplementario
- Agregar 0.2ml de BVS a los tubos de la muestra a partir del segundo y a los tubos del control del poder anticomplementario también a partir del segundo
- Pasar 0.2ml de suero desde el segundo tubo de la muestra al siguiente descartando los 0.2ml del último tubo
- Pasar 0.2ml de suero desde el segundo tubo del control del poder anticomplementario al siguiente descartando los 0.2ml del último tubo
- Agregar 0.2ml de la dilución óptima de antígeno de reciente preparación, a todos los tubos de la muestra
- Agregar 0.2ml de BVS a todos los tubos del control del poder anticomplementario
- Mezclar
- Colocar a todos los tubos 0.4ml de la dilución óptima de C' (5unidades hemolíticas), de

- reciente preparación, utilizando como diluyente BVS fría
- Preparar los controles del C' de acuerdo al esquema anterior
  - Preparar el control de GRS colocando 0.8ml de solución de BVS en un tubo limpio y seco
  - Agitar las gradillas para mezclar los reactivos e incubar a 5 °C+/-2 durante 18h
  - Agregar a todos los tubos los tubos 0.2ml de GRS al 2.8%, incluyendo al tubo control de GRS
  - Agitar la gradilla para mezclar los reactivos e incubar a 36°C+/-1 en baño de agua termostatzado durante 30min (agitar suavemente la gradilla a los 15 min.)
  - Sumergir la gradilla en agua helada para interrumpir la reacción
  - Centrifugar los tubos que no presenten 100% de hemólisis
  - Leer los controles del C'. Si no están dentro de los valores aceptables se descarta la prueba
  - Leer los controles del suero. Si presentan poder anticomplementario repetir la prueba con nueva muestra
  - Leer los sueros controles de referencia positivo y negativo
  - Si todos los controles son satisfactorios, se lee la prueba.
  - El título del suero es la dilución más alta que presente 0-30% de hemólisis.

### **Criterio de aceptación del resultado**

Leer primero los controles del C', si no están dentro de los valores aceptables se descarta la prueba. Leer luego los controles del suero, si presentan poder anticomplementario repetir la prueba con nueva muestra.

Leer por último los sueros controles de referencia positivo y negativo.

La prueba se acepta si todos los controles son satisfactorios.

### **Expresión de los resultados**

Los resultados se expresan como la última dilución del suero que presento 0-30% de hemólisis.

### **Soluciones para la prueba de FC**

#### **Solución tamponada de veronal sódico (BVS) (Solución stock 5x)**

Cloruro de sodio	83.00 g
5-5 dietil-barbiturato de sodio	10.19 g
Acido clorhídrico N	34.58 ml
Solución concentrada de Ca y Mg	5.00 ml
Agua destilada c.s.p.	2000.00 ml

### **Solución concentrada de calcio y magnesio**

CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	4.4 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	20.3 g
Agua destilada c.s.p	100.00 ml

### **Solución de BVS lista para el uso**

Hacer una dilución 1:5, en agua destilada, de la solución stock. Controlar el pH que debe estar entre 7.3-7.4. Conservar en refrigeración hasta 72 h.

### **Solución de Alsever**

Dextrosa	20.50 g
Tri citrato de sodio.2H <sub>2</sub> O	8.00 g
Cloruro de sodio	4.20 g
Acido cítrico.H <sub>2</sub> O	0.55 g
Agua destilada	1000.00 ml

Esterilizar por filtración.

Tomar la sangre de oveja en condiciones de esterilidad y en igual volumen que la solución de Alsever, agitando suavemente para evitar la formación de coágulos. La sangre se conserva en refrigeración hasta seis semanas.

### **Referencias**

- Alton, G.G, Jones, L.M., Angus, R.D. & Verger, J.M. (1988). Bacteriological and serological methods. In *Techniques for the brucellosis Laboratory*, pp.13-136. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique.
- Centro Panamericano de Zoonosis/PAHO/WHO. (1981). Nota Técnica 24. Brucelosis: prueba de fijación de complemento. CEPANZO, Buenos Aires, Argentina.
- Lucero, N.E. & Siñeriz, F. (2005). The Argentine experience in enhancing biosafety through good laboratory practices. *Asian Biotech and Develop Rev* 8, 99-120.
- Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Jacob, N.R. (2007) The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis. *Am J Infect Dis* 3(1):27-35.

## CELISA (ELISA de competición)

### Fundamento

Es una prueba de unión primaria basada en el uso de un anticuerpo monoclonal (MAb) específico para una porción, específica y repetida, de un epítotope de la cadena “O” del polisacárido del S-LPS de *Brucella*. El MAb compite con los anticuerpos del suero por el antígeno que se fija al soporte sólido. Presenta menos reacciones cruzadas que las clásicas pruebas de aglutinación y se realiza en aproximadamente 2 horas. Se utiliza para detectar casos agudos y crónicos, es altamente sensible y específica y puede ser estandarizada.

### Especificaciones

Es una prueba que requiere validación y el punto de corte se ha determinado por análisis de la curva ROC, y ha resultado  $%I > 28$ , se consideran sospechosos los casos cuyo  $%I$  está entre 26 y 30.

### Muestra requerida

Suero límpido, no hemolizado.

Conservar los sueros congelados a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$

### Reactivos

Alcohol 70%

Hipoclorito de sodio al 0.1%

ABTS [2,2'-azino bis (3 etilbenzotiazolina 6 ácido sulfónico)] anhidro, p.a.

EDTA [ (ácido etilen-diamino-tetra-ácético) sal disódica], p.a.

EGTA [etilen-glicol-bis-( $\beta$  éter aminoetilo)N,N,N',N', ácido tetra-acético], p.a.

Peróxido de hidrógeno al 3%, p.a. PM 34.01

Acido cítrico anhidro, ACS, PM 192.12

Polioxietilenosorbitano monolaurato (Tween 20) p.a.

Bicarbonato de sodio anhidro, ACS, PM 84.01

Carbonato de sodio anhidro, ACS, PM 106.99

Fosfato de sodio dibásico anhidro ACS, PM 141.96

Fosfato de sodio monobásico ACS, PM 137.99

Citrato trisódico, PM 294.10, p.a.

Cloruro de sodio, p.a.

Hidróxido de sodio, (lentejas), p.a.

Agua destilada

Estándares para control de pH 4.00; 7.00 y 10.00

### **Reactivos de referencia**

- Antígeno L-SLP, proporcionado por Brucellosis Centre Expertise, ADRI, Nepean, Ontario, Canada)
- Monoclonal M84, proporcionado por Brucellosis Centre Expertise, ADRI, Nepean, Ontario, Canada)
- Suero control positivo fuerte, proporcionado por Brucellosis Centre Expertise, ADRI, Nepean, Ontario, Canada)
- Suero control positivo débil, proporcionado por Brucellosis Centre Expertise, ADRI, Nepean, Ontario, Canada.
- Suero control negativo, proporcionado por Brucellosis Centre Expertise, ADRI, Nepean, Ontario, Canada)
- Suero control positivo fuerte, patrón secundario ANLIS
- Suero control negativo, patrón secundario ANLIS
- Anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano rústico, preabsorbido con suero normal bovino, equino y humano (Jackson Lab. , West Grove, PA, USA).

### **Materiales**

Placas Nunc 2-69620 de 96 hoyos y fondo plano, no estériles

Selladores de placas

Gradillas

Micropipeta 0.5-20 $\mu$ l

Micropipeta 20-200 $\mu$ l

Micropipetas 10-100 $\mu$ l

Micropipetas 100-1000 $\mu$ l

Micropipetas multicanal 30-300 $\mu$ l

Dispensador para la dosificación en serie

Combitips Eppendorf

Timer

Cubetas plásticas para multicanales

Erlenmeyeres

Probetas

### **Equipos**

Refrigeradora; Freezer; Estufa; Centrífuga; Timer; Vortex; Agitador orbital; Reader de ELISA; Pehachímetro; Balanza analítica.

### **Precauciones generales**

- Si las soluciones no son de preparación reciente, verificar que no estén alteradas.
- No utilizar soluciones luego de su fecha de validez
- Reconstituir los liofilizados unas horas antes de utilizarlos
- Mezclar suavemente los reactivos evitando la formación de espuma
- Homogeneizar los sueros antes de realizar el ensayo
- No reutilizar las placas Nunc
- Todas las soluciones y reactivos a ser utilizados en la prueba deben estar a temperatura ambiente, para evitar las diferencias térmicas en los hoyos de la placa.

### **Medidas de bioseguridad y seguridad**

- Al ingresar al laboratorio de serología vestir equipo de protección personal (Bata, calzado cerrado, cabello recogido) de acuerdo a las recomendaciones del Manual de Bioseguridad de la OMS, 2005.
- Al manipular muestras de sangre utilizar guantes y seguir las instrucciones de la Resolución 228/93 del Ministerio de Salud.
- Descartar los tips en solución de hipoclorito de sodio al 2% de preparación diaria.
- Descartar las muestras de acuerdo a las indicaciones de la Ley 24051 de Residuos Peligrosos.
- Manipular el ABTS de acuerdo a las instrucciones del manual de seguridad química ya que se trata de una droga mutagénica
- Utilizar guantes y barbijo 3M N100 para pesar el ABTS
- Limpiar el área de trabajo al finalizar la tarea con hipoclorito de sodio al 0.1% de preparación diaria.
- Quitarse los guantes y lavarse las manos al terminar el trabajo.
- Quitarse la bata al dejar el laboratorio.

## **Preparación de reactivos**

### **Solución diluyente del antígeno**

Bicarbonato de sodio 3.8g/500ml de agua destilada

Carbonato de sodio 1.93/500ml de agua destilada

Las soluciones concentradas se conservan a 5°C +/-2

Antes del uso se mezclan volúmenes iguales de ambas soluciones y se ajusta el pH a 9.6+/-

0.1. Esta solución puede conservarse hasta una semana a 5°C +/-2

### **Solución de lavado (PBS-T)**

Fosfato dibásico de sodio anhidro 1.10g/l

Fosfato monobásico de sodio.H<sub>2</sub>O 0.32g/l

Cloruro de sodio 8.5g/l

Tween 20 0.5ml/l

Diluir los fosfatos en la mitad de agua destilada, controlar el pH que debe ser 7.2+/-0.2, y agregar el cloruro de sodio y el tween. Ajustar el volumen final y mezclar.

Se conserva a temperatura ambiente hasta una semana.

### **Solución diluyente del suero (EDTA-EGTA)**

EDTA 0.5585g/100ml de PBS-T

EGTA 0.5705 g/100ml de PBS-T

Diluir primero el EDTA que tarda unos 15 minutos en disolverse a temperatura ambiente.

Diluir luego el EGTA que tarda unos 15 minutos en disolverse a temperatura ambiente.

Mezclar volúmenes iguales de ambas soluciones pero agregando el EDTA sobre el EGTA.

Ajustar el pH a 6.3+/-0.1 con HONa 6M

Esta solución se puede conservar en refrigeradora hasta 3 meses

### **Solución de HONa 6 M**

HONa 24g/100ml de agua destilada

### **Solución diluyente del sustrato (Buffer cítrico/citrato)**

Acido cítrico.H<sub>2</sub>O 4.6g/l

Citrato tri-sódico.2H<sub>2</sub>O 7.64g/l

Agua destilada 1000ml



Ajustar el pH a 4.5+/-0.5 y conservar en refrigeradora hasta una semana.

### **Solución tampón del sustrato/cromógeno**

Buffer de cítrico/citrato de sodio 12ml

ABTS 300µl

Peróxido de hidrógeno al 3%(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 60µl

Esta solución se prepara inmediatamente antes del uso, y el volumen indicado es para una placa.

### **Preparación de la dilución de antígeno**

Reconstituir el liofilizado de acuerdo a las instrucciones

Fraccionarlo en viales criogénicos (no poliestireno) y conservarlo a -20°C+/-2

### **Preparación del anticuerpo monoclonal (MAb84)**

Reconstituir el monoclonal con agua destilada-glicerol en volúmenes iguales

Fraccionar de acuerdo a las instrucciones del proveedor

Conservar a -20°C+/-2

### **Preparación del conjugado**

Reconstituir de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Conservar a -20°C +/-2.

### **Preparación del sustrato concentrado**

Se prepara en un recipiente de vidrio oscuro.

Guardar la fracción y el resto del sustrato concentrado en refrigeradora.

### **Preparación del reactivo cromógeno**

ABTS 0.22g/10ml de agua destilada

El ABTS debe ser verde claro pero el color puede variar de acuerdo al colorante utilizado por el fabricante.

### **Técnica de CELISA**

- Preparar el antígeno diluido con solución diluyente del antígeno, a razón de 11 ml por placa.

- Con micropipeta multicanal colocar 100µl en cada hoyo de la placa. Golpear suavemente el borde para homogeneizar la distribución del antígeno en los hoyos.
- Sellar la placa con una lámina y dejar reposar en refrigeradora 18h. Al cabo de este lapso si no se utilizan se pueden conservar a -20 °C +/-2.
- Descongelar la placa a temperatura ambiente e invertirla para volcar el excedente de antígeno.
- Con la ayuda de una micropipeta multicanal se coloca en cada hoyo 200µl de solución de lavado y se descarta luego el contenido. La operación de lavado se repite 3 veces. Por último se golpea la placa invertida sobre una superficie de papel absorbente.
- Inmediatamente y evitando que la placa se seque, se agrega a cada hoyo 95µl del monoclonal MAb 84, previamente diluido de acuerdo a su titulación. De inmediato se agrega a cada hoyo 5µl de los sueros controles y problema, de acuerdo al protocolo de trabajo utilizado. Los sueros controles se colocan por duplicado.
- Se sella la placa y se coloca en un agitador orbital agitándola durante 3min. Al cabo de los cuales se incuba a temperatura ambiente a 22+/-4 °C durante 30min
- Diez a 15 min. antes que termine el tiempo de incubación se prepara la dilución del conjugado. No agitar para evitar que se forme espuma.
- Al finalizar el tiempo de incubación lavar nuevamente la placa cuatro veces como se hizo anteriormente.
- Agregar a cada hoyo 100µl de la dilución del conjugado con una micropipeta multicanal.
- Sellar la placa e incubar nuevamente a temperatura ambiente a 22+/-4 °C durante 30min.
- Diez a 15 min. antes que termine el tiempo de incubación se prepara la dilución del sustrato cromógeno que debe estar a temperatura ambiente.
- Preparar una placa nueva, sin sensibilizar y previamente lavada para utilizarla como blanco de lectura fotométrica.
- Al finalizar el tiempo de incubación lavar nuevamente la placa cuatro veces como se hizo anteriormente.
- De inmediato agregar 100µl de sustrato cromógeno a cada hoyo con micropipeta multicanal comenzando con la columna 1.
- Cronometrar el tiempo luego de colocar el sustrato cromógeno a la primera columna de la placa. Llevar la placa a un agitador orbital e incubarla 10min.

- Al cabo de ese tiempo realizar la lectura a 414 nm.
- Antes de leer la placa comprobar que no conserva marcas de los dedos las que deberán limpiarse con un papel tisú. Si quedaron burbujas se deben romper con un tip limpio.
- Leer la placa blanco en el reader y continuar luego con la placa problema.
- El tiempo del último paso es de 10min+/-3. Si el tiempo de desarrollo del color es diferente revisar todos los pasos incluyendo la preparación de las soluciones y el control del pH.

### **Lectura e interpretación de los resultados**

- Una vez obtenidos los resultados de la DO, se calcula el %I (porcentaje de inhibición) con respecto al control del conjugado (Cc) de acuerdo a la siguiente fórmula
- $\%I = 100 - (\text{Valor promedio de cada control} / \text{valor promedio de la DO del Cc}) \times 100$
- $\%I = 100 - (\text{Valor promedio de cada suero problema} / \text{Valor promedio de la DO del Cc}) \times 100$

### **Criterio de aceptación del resultado**

Los resultados se aceptan si están dentro de los parámetros esperados para cada control

- El Cc debe estar dentro del límite de control máximo y el límite de control mínimo (%I= 9 a -12)
- El %I de Cc; C++; C+ ; C- dentro de los valores indicados por el proveedor
- El %I del suero control positivo fuerte (patrón secundario ANLIS) y del suero control negativo (patrón secundario ANLIS) deben dar los resultados esperados

Si los controles no dan los resultados esperados se rechaza la placa, se revisan los reactivos y se controla nuevamente el pH de las soluciones.

### **Referencias**

- Lucero, N.E., Foglia, L., Ayala, S.M., Gall, D. & Nielsen, K. (1999). Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis. *J Cl Microbiol* **37**, 3245-3248.
- Lucero, N.E. & Siñeriz, F. (2005). The Argentine experience in enhancing biosafety through good laboratory practices. *Asian Biotech and Develop Rev* **8**, 99-120.
- Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Jacob, N.R. (2007) The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis. *Am J Infect Dis* **3(1)**:27-35.
- Nielsen, K., Gall, D., Kelly, W., Vigliocco, A., Henning, D., García, M. (1996). Immunoassay development: application to enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis. Agriculture and Agri-Food, Canada, Nepean, Ontario. ISBN 0662-24 163.0.
- Nielsen, K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol* **90**, 447-459.

## BRUCELOSIS

### C E L I S A

Fecha:  
Conjugado:  
Antígeno:  
Monoclonal:

Control positivo:  
Control negativo:  
Control sin suero:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

## **Técnica de polarización de la fluorescencia**

### **Fundamento**

El método se basa en la habilidad de las moléculas de rotar con una velocidad que depende de su tamaño. Teniendo en cuenta esta particularidad el antígeno se marca con isotiocianato de fluoresceína y luego es excitado por un plano de luz polarizada a una longitud de onda apropiada. El rango de rotación de la molécula del antígeno disminuye cuando su tamaño aumenta por la unión del anticuerpo. Este cambio puede ser medido. El ensayo se realiza en pocos minutos, requiere la dilución del suero, la adición del antígeno marcado y finalmente la lectura de la variación de la rotación provocada por la interacción antígeno anticuerpo.

### **Especificaciones**

El punto de corte ha sido establecido en 72mP considerándose positivos los valores entre 70 y 74 mP. La prueba no se puede leer si el suero presenta exceso de lípidos.

### **Muestra requerida**

Suero límpido, no hemolizado. Conservar los sueros congelados a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4$ .

### **Reactivos**

Fosfato monosódico H<sub>2</sub>O p.a

Fosfato disódico anhidro p.a

Cloruro de sodio p.a

Azida sódica p.a

Laurilsulfato de litio p.a

Alcohol 70%

Hipoclorito de sodio al 0.1%

Agua destilada

Estándares para control de pH 4.00; 7.00 y 10.00

### **Reactivos de referencia**

Antígeno "O"polisacárido (OPS) extraído de S-LPS de B. abortus biovar 1, cepa 1119-3, conjugado con FITC ( L-SLP, proporcionado por Brucellosis Centre Expertise, ADRI, Nepean, Ontario, Canada)

Suero control positivo, proporcionado por Brucellosis Centre Expertise, ADRI, Nepean, Ontario,

Canada)

Suero control negativo, proporcionado por Brucellosis Centre Expertise, ADRI, Nepean, Ontario, Canada)

Suero control positivo fuerte, patrón secundario ANLIS

Suero control negativo, patrón secundario ANLIS

### **Materiales**

Tubos de borosilicato 12x75

Gradillas

Micropipeta 10-100µl

Micropipetas 20-200µl

Timer

Erlenmeyeres

Probetas

### **Equipos**

Refrigeradora; Freezer; Estufa; Centrífuga; Timer; Vortex; Pehachímetro; Balanza analítica; Polarímetro Sentrrix 100.

### **Precauciones generales**

- No utilizar soluciones luego de su fecha de validez
- Reconstituir los liofilizados unas horas antes de utilizarlos
- Mezclar suavemente los reactivos evitando la formación de espuma
- Homogeneizar los sueros antes de realizar el ensayo

### **Medidas de bioseguridad y seguridad**

- Al ingresar al laboratorio de serología vestir equipo de protección personal (Bata, calzado cerrado, cabello recogido) de acuerdo a las recomendaciones del Manual de Bioseguridad de la OMS, 2005.
- Al manipular muestras de sangre utilizar guantes y seguir las instrucciones de la Resolución 228/93 del Ministerio de Salud.
- Descartar los tips en solución de hipoclorito de sodio al 2% de preparación diaria.
- Descartar las muestras de acuerdo a las indicaciones de la Ley 24051 de Residuos Peligrosos.

- Manipular la azida sódica de acuerdo a las instrucciones del manual de seguridad química ya que se trata de una droga mutagénica
- Limpiar el área de trabajo al finalizar la tarea con hipoclorito de sodio al 0.1% de preparación diaria.
- Quitarse los guantes y lavarse las manos al terminar el trabajo.
- Quitarse la bata al dejar el laboratorio.

### **Preparación de reactivos**

#### **Solución tampón pH 7.4**

Fosfato monobásico de sodio.H <sub>2</sub> O	0.315g
Fosfato disódico anhidro	1.1g
Cloruro de sodio	8.5g
Azida sódica	1.0g
Laurilsulfato de litio	0.5g

Ajustar el pH a 7.4+/-0.1. Esta solución puede conservarse a temperatura ambiente.

### **Técnica de FPA**

- Disponer en una gradilla con tubos de borosilicato 12x75, de acuerdo a la cantidad de muestras que se van a analizar
- Ordenar los sueros controles y problema
- Encender el equipo Sentry 100 teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante.
- Colocar 2ml de solución tampón pH 7.4 en los tubos
- Agregar 40μ de cada suero en el tubo correspondiente
- Mezclar de manera vigorosa en vortex
- Dejar reposar los tubos unos minutos
- Limpiar los tubos con papel tissu
- Leer los tubos en el equipo Sentry 100, el cual retiene la lectura y la procesa como blanco
- Agregar a cada tubo 20μ del antígeno
- Mezclar de manera vigorosa en vortex
- Incubar a temperatura ambiente durante 2 min.
- Limpiar los tubos con papel tissu
- Leer nuevamente los tubos en el equipo Sentry 100, en el mismo orden que fueron leídos anteriormente

- El equipo efectúa la lectura y automáticamente sustrae el valor del blanco.
- Aproximadamente cada 30 muestras se incluyen los sueros de referencia positivo y negativo.

### **Lectura e interpretación de los resultados**

- El ensayo se expresa en unidades de polarización (mP) que indican la presencia de anticuerpos en la muestra.
- Positivo mayor de 72mP

### **Criterio de aceptación del resultado**

Leer el resultado de los sueros controles. Si son los esperados, se leen las muestras. En caso de discrepancias repetir el ensayo, calibrando nuevamente el equipo.

### **Referencias**

- Lucero, N.E., Escobar, G.I., Ayala, S.M., Silva Paulo, P. & Nielsen, K. (2003). Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. *J Med Microbiol* 52, 883-887.
- Lucero, N.E. & Siñeriz, F. (2005). The Argentine experience in enhancing biosafety through good laboratory practices. *Asian Biotech and Develop Rev* 8, 99-120.
- Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Jacob, N.R. (2007) The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis. *Am J Infect Dis* 3(1):27-35.
- Nielsen, K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol* 90, 447-459.



## **DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS CAUSADA POR BRUCELLA CANIS**

### **Técnica de microaglutinación en portaobjeto (RSAT)**

#### **Fundamento**

Es una prueba tamiz, rápida, práctica y económica que fue descrita por Carmichael en 1987, para ser aplicada en el diagnóstico de brucelosis canina en perros. La técnica emplea un antígeno preparado con cepa *B.canis* M- de características mucoides que tiene la particularidad de ser estable. Ha sido propuesta para el diagnóstico de brucelosis causada por *B. canis* en humanos.

#### **Especificaciones**

Es cualitativa y se interpreta como positiva o negativa.

#### **Muestra requerida**

Suero límpido, no hemolizado. Conservar los sueros congelados a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$

#### **Reactivos**

Antígeno de RSAT, que cumpla con las especificaciones recomendadas por el Profesor L. Carmichael, Cornell University, Baker Institute for Animal Health, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA.

Suero control positivo de alto título

Suero control negativo

#### **Materiales**

Portaobjeto 25x75mm

Gradrillas

Micropipetas 0.5-10 $\mu\text{l}$

Micropipetas 10-100 $\mu\text{l}$

#### **Equipos**

Refrigeradora; Freezer; Estufa; Centrífuga; Timer; Vortex, Microscopio .

#### **Drogas y soluciones**

Alcohol 70%

Hipoclorito de sodio al 0.1%  
Solución fisiológica al 0.85%  
Cloruro de sodio p.a

### **Precauciones generales**

- Almacenar el antígeno a 5°C +/-2°C. Si se congela queda inutilizado.
- Para realizar la prueba tanto el antígeno como el suero deben estar a temperatura ambiente (22+/- 4°C).
- Verificar la fecha de vencimiento del antígeno antes de realizar la prueba
- Almacenar el 2-mercaptoetanol a temperatura ambiente y en recipiente perfectamente cerrado
- Los portaobjetos deben estar limpios y secos.
- Homogeneizar los sueros antes de realizar el ensayo
- Utilizar un suero control positivo y un suero control negativo.

### **Medidas de bioseguridad y seguridad**

- Al ingresar al laboratorio de serología vestir equipo de protección personal (Bata, calzado cerrado, cabello recogido) de acuerdo a las recomendaciones del Manual de Bioseguridad de la OMS, 2005.
- Al manipular muestras de sangre utilizar guantes y seguir las instrucciones de la Resolución 228/93 del Ministerio de Salud.
- Descartar los tips en solución de hipoclorito de sodio al 2% de preparación diaria.
- Descartar las muestras de acuerdo a las indicaciones de la Ley 24051 de Residuos Peligrosos.
- Manipular el 2-mercaptoetanol de acuerdo a las instrucciones del manual de seguridad
- Limpiar el área de trabajo al finalizar la tarea con hipoclorito de sodio al 0.1% de preparación diaria.
- Quitarse los guantes y lavarse las manos al terminar el trabajo.
- Quitarse la bata al dejar el laboratorio.

### **Técnica**

- En un portaobjeto mezclar 10 ul de suero con 10 ul de antígeno (previamente homogeneizado a temperatura ambiente).
- Rotar suavemente el portaobjeto con la mezcla, durante 1 minuto.
- Leer al microscopio (10x).

### **Microaglutinación con 2 mercapto-etanol (ME)**

- Mezclar 25 ul de suero con 25 ul de 2- ME 0.2M en un portaobjeto grande.
- Esperar 1 minuto.
- Agregar 50 ul de antígeno. Mezclar agitando suavemente el portaobjeto durante 2 minutos.
- Leer al microscopio (10X)

### **Lectura e interpretación de los resultados**

- Positivo: El ensayo se clasifica como positivo cuando aparece cualquier aglutinación, aunque sea fina. Si el resultado es positivo realizar una prueba confirmatoria.
- Negativo: La ausencia de aglutinación se interpreta como negativo.

### **Criterio de aceptación del resultado**

Realizar el ensayo a los sueros controles antes que a las muestras. Los resultados deben ser los esperados, positivos o negativos. En caso de discrepancias repetir el ensayo cambiando el lote de antígeno.

### **Referencias**

- Carmichael, L.L, Joubert, J.C. (1987). A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell Vet* 77, 3:12.
- Lucero, N.E., Escobar, G.I., Ayala, S.M. & Jacob, NR. (2005). Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol* 54, 457-461.
- Lucero, N.E., Escobar, G.I., Ayala, S.M. & Lopez, G. (2002). Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J Med Microbiol* 51, 656-660.
- Lucero, N.E. & Siñeriz, F. (2005). The Argentine experience in enhancing biosafety through good laboratory practices. *Asian Biotech and Develop Rev* 8, 99-120.
- Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Jacob, N.R. (2007) The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis. *Am J Infect Dis* 3(1):27-35.

## Técnica de IELISA

### Fundamento

Es una prueba de unión primaria muy sensible y específica que fue aplicada al diagnóstico de brucelosis canina en perros y demostró ser muy sensible y específica. Recientemente ha sido propuesta como prueba confirmatoria, para el diagnóstico de brucelosis humana, en casos de infección por *B. canis*.

### Especificaciones

Es una prueba que requiere validación y el punto de corte se ha determinado por análisis de la curva ROC, y ha resultado  $\%P > 27$ , se consideran sospechosos los casos cuyo  $\%P$  está entre 25 y 29.

### Muestra requerida

Suero límpido, no hemolizado.

Conservar los sueros congelados a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$

### Reactivos

Alcohol 70%

Hipoclorito de sodio al 0.1%

ABTS [2,2'-azino bis (3 etilbenzotiazolina 6 ácido sulfónico)] anhidro, p.a.

EDTA [ (ácido etilen-diamino-tetra-ácético) sal disódica], p.a.

EGTA [etilen-glicol-bis-( $\beta$  éter aminoetilo)N,N,N',N', ácido tetra-acético], p.a.

Peróxido de hidrógeno al 3%, p.a. PM 34.01

Acido cítrico anhidro, ACS, PM 192.12

Polioxietilensorbitano monolaurato (Tween 20) p.a.

Bicarbonato de sodio anhidro, ACS, PM 84.01

Carbonato de sodio anhidro, ACS, PM 106.99

Fosfato de sodio dibásico anhidro ACS, PM 141.96

Fosfato de sodio monobásico ACS, PM 137.99

Citrato trisódico, PM 294.10, p.a.

Cloruro de sodio, p.a.

Hidróxido de sodio, (lentejas), p.a.

Agua destilada

Estándares para control de pH 4.00; 7.00 y 10.00

### **Reactivos de referencia**

Antígeno obtenido de la cepa *B. canis M*- suministrada por el Profesor L. Carmichael, Cornell University, Baker Institute for Animal Health, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA, preparado en el servicio de brucelosis de la ANLIS “Dr.C.G.Malbrán”.

Suero control positivo fuerte, proporcionado por el Profesor L. Carmichael, Cornell University, Baker Institute for Animal Health, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA.

Suero control positivo fuerte, patrón secundario ANLIS

Suero control negativo, patrón secundario ANLIS

Proteína A/G conjugada con peroxidasa de rábano rústico (Pierce Lab., Rockford, IL, USA).

### **Materiales**

Placas Nunc 2-69620 de 96 hoyos y fondo plano, no estériles

Selladores de placas

Gradillas

Micropipeta 0.5-20µl

Micropipeta 20-200µl

Micropipetas 10-100µl

Micropipetas 100-1000µl

Micropipetas multicanal 30-300µl

Dispensador para la dosificación en serie

Combitips Eppendorf

Timer

Cubetas plásticas para multicanales

Erlenmeyeres

Probetas

### **Equipos**

Refrigeradora; Freezer; Estufa; Centrífuga; Timer; Vortex; Agitador orbital; Reader de ELISA; Pehachímetro; Balanza analítica.

### **Precauciones generales**

- Si las soluciones no son de preparación reciente, verificar que no estén alteradas.

- No utilizar soluciones luego de su fecha de validez
- Reconstituir los liofilizados unas horas antes de utilizarlos
- Mezclar suavemente los reactivos evitando la formación de espuma
- Homogeneizar los sueros antes de realizar el ensayo
- No reutilizar las placas Nunc
- Todas las soluciones y reactivos a ser utilizados en la prueba deben estar a temperatura ambiente, para evitar las diferencias térmicas en los hoyos de la placa.

### **Medidas de bioseguridad y seguridad**

- Al ingresar al laboratorio de serología vestir equipo de protección personal (Bata, calzado cerrado, cabello recogido) de acuerdo a las recomendaciones del Manual de Bioseguridad de la OMS, 2005.
- Al manipular muestras de sangre utilizar guantes y seguir las instrucciones de la Resolución 228/93 del Ministerio de Salud.
- Descartar los tips en solución de hipoclorito de sodio al 2% de preparación diaria.
- Descartar las muestras de acuerdo a las indicaciones de la Ley 24051 de Residuos Peligrosos.
- Manipular el ABTS de acuerdo a las instrucciones del manual de seguridad química ya que se trata de una droga mutagénica
- Utilizar guantes y barbijo 3M N100 para pesar el ABTS
- Limpiar el área de trabajo al finalizar la tarea con hipoclorito de sodio al 0.1% de preparación diaria.
- Quitarse los guantes y lavarse las manos al terminar el trabajo.
- Quitarse la bata al dejar el laboratorio.

### **Preparación de reactivos**

#### **Solución diluyente del antígeno**

Bicarbonato de sodio     3.8g/500ml de agua destilada

Carbonato de sodio     1.93/500ml de agua destilada

Las soluciones concentradas se conservan a 5°C +/-2

Antes del uso se mezclan volúmenes iguales de ambas soluciones y se ajusta el pH a 9.6+/-

0.1. Esta solución puede conservarse hasta una semana a 5°C +/-2

#### **Solución de lavado (PBS-T)**

Fosfato dibásico de sodio anhidro	1.10g/l
Fosfato monobásico de sodio.H <sub>2</sub> O	0.32g/l
Cloruro de sodio	8.5g/l
Tween 20	0.5ml/l

Diluir los fosfatos en la mitad de agua destilada , controlar el pH que debe ser 7.2+/-0.2, y agregar el cloruro de sodio y el tween. Ajustar el volumen final y mezclar.

Se conserva a temperatura ambiente hasta una semana.

#### **Solución diluyente del sustrato (Buffer cítrico/citrato)**

Acido cítrico.H <sub>2</sub> O	4.6g/l
Citrato tri-sódico.2H <sub>2</sub> O	7.64g/l
Agua destilada	1000ml

Ajustar el pH a 4.5+/-0.5 y conservar en refrigeradora hasta una semana.

#### **Solución tampón del sustrato/cromógeno**

Buffer cítrico/citrato	12ml
ABTS	300µl
Peróxido de hidrógeno al 3%(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	60µl

Esta solución se prepara inmediatamente antes del uso, y el volumen indicado es para una placa.

#### **Preparación del conjugado**

Reconstituir el liofilizado de acuerdo a las instrucciones del proveedor, diluirlo 1:1000 en PBS-T. Preparar alícuotas de 0.5ml y conservarlo en viales criogénicos (no poliestireno) a -20°C+/-2.

#### **Preparación del sustrato concentrado**

Separar en un recipiente de vidrio oscuro.

Guardar la fracción y el resto del sustrato concentrado en refrigeradora.

#### **Preparación del reactivo cromógeno**

ABTS 0.22g/10ml de agua destilada

El ABTS debe ser verde claro pero el color puede variar de acuerdo al colorante utilizado por el fabricante.

## **Técnica de IELISA**

- Preparar el antígeno diluido con solución diluyente del antígeno, a razón de 11 ml por placa.
- Con micropipeta multicanal colocar 50µl en cada hoyo de la placa. Golpear suavemente el borde para homogeneizar la distribución del antígeno en los hoyos.
- Sellar la placa con una lámina y dejar reposar a temperatura ambiente 18h. Al cabo de este lapso si no se utilizan se pueden conservar a -20 °C +/-2.
- Descongelar la placa a temperatura ambiente e invertirla para volcar el excedente de antígeno.
- Con la ayuda de una micropipeta multicanal se coloca en cada hoyo 200µl de solución de lavado y se descarta luego el contenido. La operación de lavado se repite 4 veces. Por último se golpea la placa invertida sobre una superficie de papel absorbente.
- De inmediato y evitando que la placa se seque agregar a cada hoyo 50µl de los sueros controles y problema, diluidos 1:100 en PBS-T. Los sueros controles se colocan por duplicado.
- Se sella la placa y se coloca en un agitador orbital agitándola durante 5min. Al cabo de los cuales se incuba a temperatura ambiente a 22+/-4 °C durante 60min
- Diez a 15 min. antes que termine el tiempo de incubación se prepara la dilución del conjugado. No agitar para evitar que se forme espuma.
- Al finalizar el tiempo de incubación lavar nuevamente la placa 5 veces como se hizo anteriormente.
- Agregar a cada hoyo 50µl de la dilución del conjugado (en PBS-T) con una micropipeta multicanal.
- Se sella la placa y se coloca en un agitador orbital agitándola durante 5min. Al cabo de los cuales se incuba a temperatura ambiente a 22+/-4 °C durante 60min
- Diez a 15 min. antes que termine el tiempo de incubación se prepara la dilución del sustrato cromógeno que debe estar a temperatura ambiente.
- Preparar una placa nueva, sin sensibilizar y previamente lavada para utilizarla como blanco de lectura fotométrica.
- Al finalizar el tiempo de incubación lavar nuevamente la placa 5 veces como se hizo anteriormente.



- De inmediato agregar 100µl de sustrato cromógeno a cada hoyo con micropipeta multicanal comenzando con la columna 1.
- Cronometrar el tiempo luego de colocar el sustrato cromógeno a la primera columna de la placa. Llevar la placa a un agitador orbital durante 10min.
- Al cabo de ese tiempo realizar la lectura a 414 nm.
- Antes de leer la placa comprobar que no conserva marcas de los dedos las que deberán limpiarse con un papel tisú. Si quedaron burbujas se deben romper con un tip limpio.
- Leer la placa blanco en el reader y continuar luego con la placa problema.
- La placa se lee cuando la lectura del control positivo fuerte se acerca a 1.

### **Lectura e interpretación de los resultados**

- Una vez obtenidos los resultados de la DO, se calcula el %P (porcentaje de positividad) con respecto al control del conjugado (Cc) y a la DO del C++.

### **Criterio de aceptación del resultado**

Los resultados se aceptan si están dentro de los parámetros esperados para cada control

- El Cc debe estar dentro del límite de control máximo y el límite de control mínimo
- El %P de Cc; C++; C- dentro de los valores indicados. El %P del suero control positivo fuerte, del suero control positivo (patrón secundario ANLIS) y del suero control negativo (patrón secundario ANLIS) deben dar los resultados esperados

Si los controles no dan los resultados esperados se rechaza la placa, se revisan los reactivos y se controla nuevamente el pH de las soluciones.

### **Referencias**

- Carmichael, L.L, Joubert, J.C. (1987). A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell Vet* 77, 3:12.
- Lucero, N.E., Escobar, G.I., Ayala, S.M. & Jacob, N.R. (2005). Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol* 54, 457-461.
- Lucero, N.E., Escobar, G.I., Ayala, S.M. & Lopez, G. (2002). Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J Med Microbiol* 51, 656-660.
- Lucero, N.E. & Siñeriz, F. (2005). The Argentine experience in enhancing biosafety through good laboratory practices. *Asian Biotech and Develop Rev* 8, 99-120.
- Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Jacob, N.R. (2007) The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis. *Am J Infect Dis* 3(1):27-35.

## BRUCELOSIS

### IELISA

#### *B. canis*

Fecha:

Control positivo:

Conjugado:

Control negativo:

Antígeno:

Control sin suero:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Cuadro resumen "Pruebas para el diagnóstico de brucelosis humana"**

Pruebas de tamizaje			Pruebas confirmatorias clásicas			Pruebas de unión primaria		Prueba tamiz	Prueba de unión primaria
PAT	RB	BPA	TAT	2ME	FC	CELISA	FPA	RSAT	IELISA
Antígenos de <i>S-Brucella</i> sp.								Antígenos de <i>R-Brucella</i> sp.	

## **Control de calidad del diagnóstico**

Tomar las muestras de sangre en tubos limpios y secos, debidamente rotulados y mantener a temperatura ambiente hasta la retracción del coágulo. Centrifugar a 1000g durante 5 minutos evitando la hemólisis de la sangre. Conservar el suero a  $-20^{\circ}\text{C}$  para evitar que se altere.

Para que los datos del diagnóstico sean uniformes y confiables, deben efectuarse siguiendo técnicas estandarizadas, con operadores capacitados en la realización y lectura 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 corregirlos. Aún cuando la técnica es realizada más de una vez por un mismo operador, siguiendo la misma metodología, utilizando aparatos y reactivos iguales, las medidas no son idénticas.

Los métodos serológicos en particular, están afectados por errores aleatorios y sistemáticos. Los primeros son impredecibles y su magnitud define la precisión del método, que es una medida de la repetibilidad de los errores. Los resultados de un método de alta precisión se concentran alrededor de la media con una desviación estándar muy pequeña.

Los errores sistemáticos son los generados por el operador inexperto, drogas inapropiadas, aparatos mal calibrados o reactivos no estandarizados. Se pueden detectar utilizando controles y el parámetro que los mide es la exactitud.

Se los define como la cercanía al valor verdadero que es el obtenido con un método patrón al que se le atribuye un sesgo igual a cero, luego de realizar un número importante de mediciones. La situación ideal es una prueba precisa y exacta, que indica el buen desempeño de la prueba y del laboratorio que la realiza, lo cual se puede lograr manteniendo controles externos e internos.

En el caso del diagnóstico serológico las pruebas de control de calidad implican controles que se realizan sobre los numerosos factores que pueden incidir en los resultados.

Los procedimientos se pueden monitorear mediante el control interno, con la utilización diaria de sueros con títulos conocidos y el control externo que se refiere al realizado por un laboratorio de referencia. Este último 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.

Otro método es que el laboratorio de referencia envíe muestras codificadas a los laboratorios periféricos para que las estudien conjuntamente con sus muestras de rutina.

El control permanente de la calidad de los resultados junto a las buenas prácticas de laboratorio que incluye la utilización de técnicas evaluadas, personal capacitado y operaciones estandarizadas, garantizan el diagnóstico serológico.

El laboratorio Nacional de Referencia distribuye sueros controles liofilizados y antígenos estandarizados a los integrantes de la Red.

### **Control de calidad de insumos**

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

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

Los insumos y materiales como drogas, medios de cultivo, biológicos, tubos y material de vidrio, pipetas, micropipetas, tips, cubetas para ELISA y viales de polipropileno deben cumplir con las especificaciones registradas.

El agua empleada en el laboratorio de diagnóstico de brucelosis debe ajustarse a las especificaciones recomendadas para cada uso. En general para el lavado del material de vidrio se usa agua de tipo III, purificada y con una conductividad específica máxima de 5.0 micromhs/cm, 0.2 megaomhs/cm de resistencia específica (mínima), 0.01 mg/l (como máximo) de silicatos y de metales pesados. En la preparación de soluciones para pruebas serológicas, soluciones tamponadas, medios de cultivo y colorantes se emplea agua purificada de tipo II. Admite como máximo una conductividad específica de 2.0 micromhs/cm, 0.5 megaomhs/cm (mínimo) de resistencia específica, 0.01 mg/l (máximo) de silicatos y de metales pesados.

Para preparar reactivos y soluciones de referencia, realizar pruebas de ELISA y reconstituir liofilizados se utiliza agua de tipo I. Debe tener una conductividad específica de 0.1 micromhs/cm (máximo), una resistencia específica de 10.0 megaomhs/cm (mínimo) y el mismo límite de silicatos y metales pesados que los tipos anteriores.

Los reactivos biológicos que se emplean en las técnicas, como glóbulos rojos de carnero, complemento de cobayo, suero normal equino y sueros hiperinmunes deben utilizarse de acuerdo a las especificaciones del Manual de Procedimientos Operativos, respetando las indicaciones para la conservación, almacenamiento y titulación.

### **Control de calidad de reactivos**

Los antígenos que se emplean en las pruebas serológicas convencionales son suspensiones de *Brucella abortus* biovar 1, cepa 1119-3 en fase lisa. Para garantizar la calidad del diagnóstico es necesario que sean estandarizados y aseguren la uniformidad de los resultados.

Deben cumplir con requisitos de pureza y esterilidad controlada en medios de cultivo:

Tioglicolato, Sabouraud, Caldo Dextrosado con Indicador de Andrade, SDA (suero dextrosa agar) y coloración de Gram, Koster o Zielh Neelsen.

La sensibilidad se determina con 20 sueros de título conocido (como mínimo), con valores altos, intermedios y bajos, incluyendo negativos. Se realiza comparativamente utilizando un antígeno de Referencia.

El volumen celular y el pH dependen del antígeno y es de 10-12% y 6-7 para el de placa (Huddleson), 4,5% y 6-7 para el de tubo (Wright), 8% y 3.65 +/-0.02 para el de Rosa de Bengala, 11% y 3.65 +/-0.02 para el BPA.

Los reactivos que se comercializan en el país, pasan por el control de calidad de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).

Para efectuar el diagnóstico se deben respetar las instrucciones del productor, sin modificar cantidades de suero o antígeno.

### **Control de calidad de equipos y aparatos**

El laboratorio debe tener un programa de control y mantenimiento de los aparatos y equipos que emplea en el diagnóstico. Heladeras, congeladoras de -20°C y -70 °C, incubadoras con y sin CO<sub>2</sub>, cabinas de seguridad biológica, autoclave, baño termostatzado, balanzas, agitadores magnético y orbital, espectrofotómetro, lector de ELISA, microscopios ópticos y estereoscópicos, centrífugas, incineradores eléctricos, micropipetas y pipetas repetidoras.

### **Registro de datos**

Los datos de los pacientes se anotan en libros foliados incluyendo nombre, dirección, edad, fecha de la toma de la muestra consignando si es remitida o fue tomada en la Institución. Es importante contar con un breve resumen de la historia clínica que contenga información epidemiológica de interés, especificando si el paciente ha recibido o se encuentra recibiendo tratamiento y el tiempo de evolución de los síntomas.

Como rutina se deben registrar en las planillas de los resultados, los números de la serie de reactivos y biológicos utilizados, fecha de vencimiento y todo cambio que pueda influir en los resultados.

## DIAGNOSTICO BACTERIOLÓGICO

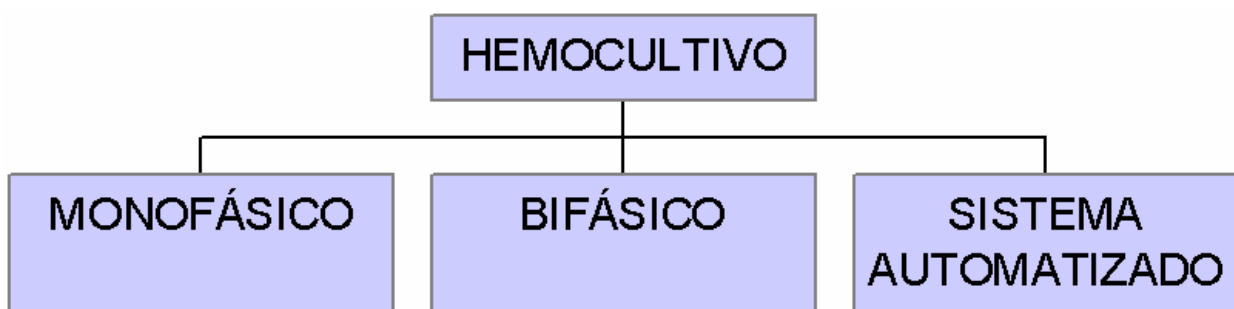
Teniendo en cuenta que el hombre actúa como indicador de la enfermedad los estudios bacteriológicos aportan importante información epidemiológica (21, 24).

### Aislamiento

Las especies del género *Brucella* tienen un reservorio preferencial definido (cuadro 1), por esa razón el diagnóstico bacteriológico adquiere importancia, ya que puede indicar la fuente de infección y la probable localización geográfica (25). Las cepas se pueden recuperar a partir de sangre, médula, líquido cefalorraquídeo, líquido articular, biopsias u otros materiales (14). La toma de la muestra se debe hacer lo antes posible para que el tratamiento con antibióticos no interfiera en el resultado. Se recomiendan tres muestras en medio de cultivo monofásico o una en medio de cultivo de equipo automatizado, en un período de 24 horas, preferentemente durante la etapa febril del paciente. Si no se dispone de facilidades para continuar con el proceso de la muestra y se traslada a otra institución, tener la precaución de acondicionarla en recipientes triples, para envío de material para diagnóstico, con las etiquetas correspondientes de acuerdo a las normas de bioseguridad internacionales.

La incubación se realiza a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$  en atmósfera con 10 % de  $\text{CO}_2$ . Cuando se emplean medios de cultivo líquidos estáticos, se requieren pasajes periódicos a medio de cultivo sólido para evitar la disociación de las colonias. También es recomendable utilizar medios de cultivo bifásicos. Generalmente los hemocultivos requieren un período de incubación prolongado, por esa razón no se descartan como negativos antes de los 30 días. Las colonias, pequeñas, translúcidas y de bordes lisos, se pueden visualizar en un medio de cultivo sólido a partir de las 48 h de incubación (2, 39, 40).

### Aislamiento de cepas de *Brucella* a partir de sangre



### Medios de cultivo

El citrato de sodio al 2.5% adicionado al medio de cultivo líquido, resulta un anticoagulante que no interfiere en el aislamiento de *Brucella* mientras que los medios de cultivo sólidos son apropiados para la observación de la morfología de las colonias.

El suero dextrosa agar (SDA) es uno de los más usados porque permite el aislamiento de la mayoría de las especies. El N-Z-amine-primatone (NZP) desarrollado en el Centro Panamericano de Zoonosis, OPS-OMS, se usa con muy buen resultado. Es muy ventajoso por su bajo costo, buen rendimiento y porque la disociación de las colonias es mínima.

De los medios de cultivo comerciales deshidratados, el Brucella Agar BBL™, se recomiendan para el crecimiento de la mayoría de las especies y con el agregado de 3-5% de suero equino se logra el crecimiento de todas.

**Cuadro 1: Especies y biovars del género *Brucella***

Especies terrestres	biovar	Patogenicidad para el Hombre	Huésped preferido		
<i>B. melitensis</i>	1	Alta	Cabras y Ovejas		
	2				
	3				
<i>B. abortus</i>	1	Moderada	Bovinos		
	2				
	3				
	4				
	5				
	6				
<i>B. suis</i>	9	Alta	Cerdos		
	1			SD	Cerdos
	2			Alta	Cerdos
	3			Moderada	Renos
	4			Alta	Roedores
5					
<i>B. ovis</i>		SD	Ovinos		
<i>B. canis</i>		Baja	Perros		
<i>B. neotomae</i>		SD	Ratas		

SD: sin datos

Si el material está contaminado se puede emplear el medio de cultivo básico adicionado de antibióticos, aunque las cepas de *Brucella* muy sensibles pueden ser inhibidas. Es recomendable sembrar el material por duplicado en el medio básico y en el medio con el suplemento de antibióticos.

Para el cultivo masivo de cepas para la preparación de antígenos o vacunas se utilizan medios sólidos en frascos Roux o medio de cultivo líquido aireado. En este último caso durante el período de incubación se debe controlar el flujo de aire, el pH, la agitación y el nivel de espuma para evitar la disociación y optimizar el rendimiento.

- **Suero dextrosa agar (SDA)**

Agar base (BBL™)	4 g
Agua destilada	100 ml

Disolver en B.M y esterilizar en autoclave a 121°C. Enfriar a 56°C+/-1 y agregar 5 ml de suero equino esterilizado por filtración que contenga dextrosa al 20% p/v.

- **Medio básico (BD)**

Brucella Agar (BBL™) preparado de acuerdo a las instrucciones del envase y esterilizado en autoclave a 121°C.

- **Medio básico con suero equino (BDS)**

A Brucella Agar (BBL™) preparado de acuerdo a las instrucciones del envase, esterilizado en autoclave y enfriado a 56°C+/-1, agregar suero equino al 3% previamente esterilizado por filtración.

- **N-Z-amine-Primatone**

N-Z-amine(Humko Sheffield)	16.25 g
Primatone (Humko Sheffield)	5.41 g
Extracto de levaduras	8.00 g
Dextrosa	24.00 g
Fosfato monosódico (PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na.H <sub>2</sub> O)	3.16g
Fosfato disódico(PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> )	1.06g
Agua destilada	1000.00ml

Disolver las peptonas en agua destilada, calentar a 80°C durante 2 h. Dejar enfriar y agregar el



resto de los componentes. Ajustar el pH a 6.4-7.0 y esterilizar por filtración. Controlar la esterilidad del medio a 36°C+/-1 durante 72 h.

▪ **Caldo para hemocultivos**

A medio básico Brucella Broth (BBL™) preparado de acuerdo a las instrucciones del envase, agregar citrato de sodio al 2.5% y esterilizar en autoclave a 121°C. Una vez enfriado a 56°C+/-1 agregar suero equino al 3 % previamente esterilizado por filtración. Distribuir esterilmente 20 ml en frascos de 50 ml, colocar tapones de goma y casquete metálico e incubar invertidos durante 72 h.

▪ **Medio de Kuzdas Morse**

A 100 ml de medio básico estéril y enfriado a 56°C+/-1 agregar 100 mg de cicloheximida, 25000 U.I de bacitracina y 6000 UI de polimixina B, esterilizadas por filtración. Previamente preparar soluciones concentradas en agua destilada de los antibióticos. La cicloheximida debe ser disuelta en 1 ml de acetona antes de completar el volumen con agua destilada.

### **Identificación**

El género *Brucella* se presenta como pequeños cocobacilos gram-negativos que eventualmente pueden estar en pares o en pequeños grupos (29). Las coloraciones (Gram, Koster, Ziehl Neelsen) y la observación de la morfología de las colonias, ayudan a excluir otros gérmenes. No se observa coloración bipolar, no presentan cápsula, no son móviles ni forman esporas. Resisten la decoloración con ácidos débiles y se tiñen de rojo con la coloración de Ziehl Neelsen modificado. Las colonias son pequeñas, de longitud que varía entre 0.6 a 1.5 micrones, de bordes lisos, traslúcidas, con formas estables, aunque cuando los cultivos son viejos, pueden aparecer formas pleomórficas. No producen indol, no licúan gelatina, no producen acetil-metil carbinol, no lisan glóbulos rojos y son negativas a la prueba de rojo de metilo.

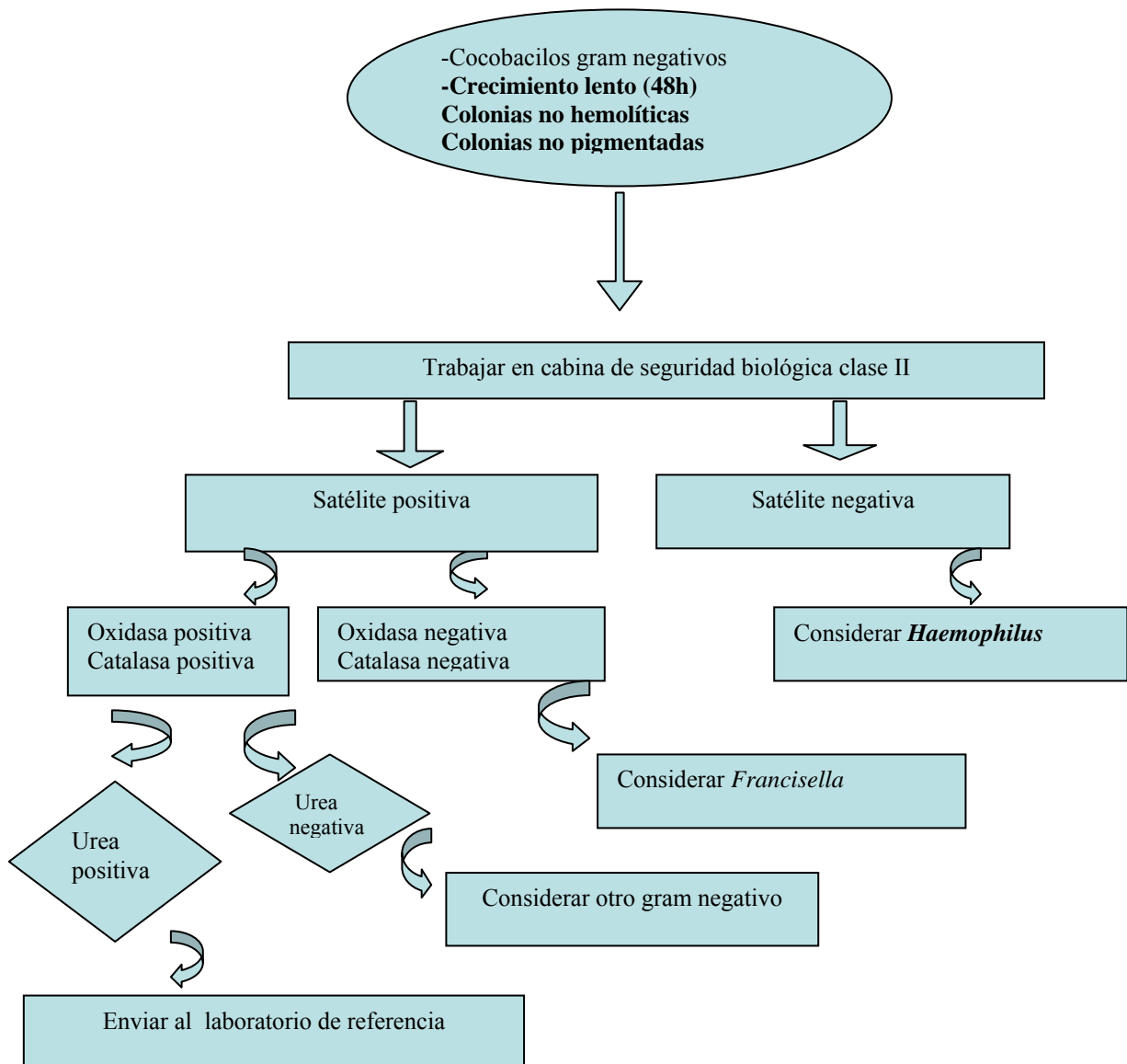
Son catalasa positivas y a excepción de *B. ovis* y *B. neotomae*, oxidasa positivas. No producen ácidos en medios con carbohidratos (excepto *B. neotomae*) y en Mc Conkey no fermentan la lactosa.

En el flujograma siguiente se indica como diferenciar el género *Brucella* de otros microorganismos con los cuales se lo puede confundir. Los más comunes son *Bordetella bronchiseptica*, *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Acinetobacter* sp., *Oligella ureolytica*, *Campilobacter fetus* y *Yersinia enterocolítica* 09, algunas de sus características diferenciales están detalladas en el cuadro 2.

Cuando se utilizan equipos comerciales para identificar microorganismos gram negativos el género *Brucella* puede ser confundido con *Psychrobacter phenylpyruvicus* en el API 20NE (sistema para identificar gérmenes no entéricos), con especies de *Psychrobacter* en el MicroScan Negative COMBO tipo 5 y con *Haemophilus influenza* biotipo IV, por el panel HNID (identificación de *Haemophilus* y *Neisseria*).

Si las colonias tienen apariencia de *Brucella*, se suspenden en una gota de solución salina normal sobre un portaobjeto, se agrega 30µl de suero policlonal anti-*Brucella* en fase lisa y se observa si hay aglutinación. Para complementar el estudio se usa suero anti-*Brucella* R.

### Flujograma para diferenciar el género *Brucella* de microorganismos similares



**Cuadro 2: Características diferenciales  
Género *Brucella* y otros gram negativos**

Pruebas	<i>Brucella</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Campilobacter fetus</i>	<i>Psychrobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Yersinia enterocolítica 09</i>
Morfología	cocobacilos	cocobacilos	forma de coma	diplococo	diplococo	forma de bastón
Movilidad a 37°C	-	+	+	-	-	-
Movilidad a 20°C	-	-	-	-	-	+
Fermentación de lactosa	-	-	-	+/(1)	+/-	-
Fermentación de glucosa	-(2)	-	-	-	+/-	+
Hemólisis en agar sangre	-	+	-	+/-	+/-	-
Catalasa	+	+	+	+/-	+	+
Oxidasa	+(3)	+	+	+	-	-
Ureasa	+(4)	+	-	+/-	+/-	+
Reducción de nitratos	+(5)	+	+	+/-	+/-	+
Utilización de citratos	-	+	-	-	-	-

1- En el género hay especies positivas y negativas 2- *B. neotomae* puede fermentar la glucosa 3- *B. ovis*, *B. neotomae* y algunas *B. abortus* son negativas

4- *B. ovis* y algunas *B. abortus* son negativas 5- *B. ovis* es negativa

## Tipificación

Cuando se sospecha que la cepa aislada puede pertenecer al género *Brucella* se la debe enviar al laboratorio Nacional de Referencia para su confirmación (36). Para confirmar el género y definir especie y biovar, deben realizarse las pruebas indicadas en el cuadro 3. Al realizarlas incluir como control cepas de referencia *B. abortus* biovar 1, 544; *B. melitensis* biovar 1, 16M; *B. suis* biovar 1, 1330. Cuando la cepa investigada pertenece a otro biovar o especie, incluir la cepa de referencia correspondiente, de acuerdo al cuadro 4. Los estudios se realizan en cultivos puros, cuando se encuentran mezcladas colonias lisas y rugosas, se deben subcultivar las colonias lisas antes de efectuar las pruebas (9,15, 35).

### ▪ Necesidad de CO<sub>2</sub>

El CO<sub>2</sub> es utilizado por *B. abortus* y *B. ovis* para disminuir el pH, bajar la tensión de O<sub>2</sub> y como nutriente para la síntesis de alanina, glicina y pirimidina. Las cepas se siembran por duplicado en BD y se incuban a 36°C±1, en atmósfera normal y enriquecida con 5-10% v/v de CO<sub>2</sub> para diferenciar las CO<sub>2</sub> dependientes. La lectura se realiza a las 48 h.

### ▪ Requerimiento de suero

*B. abortus* biovar 2 y *B. ovis* para crecer necesitan el agregado de 3-6% de suero equino o de conejo al medio de cultivo básico. Estas cepas son muy sensibles a los factores inhibidores de algunas peptonas que se encuentran en los medios de cultivo. El suero interviene neutralizando los componentes inhibidores y también como nutriente.

Para observar esta característica se siembra la cepa por duplicado en medio de cultivo básico (BD) y también por duplicado en medio de cultivo básico con suero (BDS). Un tubo sembrado en BD y otro sembrado en BDS se incuban a 36°C±1 y el resto a 36°C±1 en atmósfera adicionada de 5-10% de CO<sub>2</sub>. La lectura se realiza a las 48 h.

### ▪ Producción de anhídrido sulfuroso

Algunas cepas del género *Brucella* producen SH<sub>2</sub> a partir de aminoácidos azufrados contenidos en el medio de cultivo. Para detectarlo se preparan tiras de papel de filtro de aproximadamente 4 x 7mm embebidas en solución saturada de acetato de plomo (10% p/v), las cuales una vez secas se colocan en la boca de los tubos sin que toquen el medio de cultivo. Se cambian diariamente durante 4 días, utilizando una pinza estéril y observando el ennegrecimiento producido por el sulfuro de plomo que se compara con el de las cepas patrones.

Las tiras de papel se pueden conservar para la observación comparada pero teniendo la precaución de esterilizarlas. *B. suis* produce SH<sub>2</sub>, *B. abortus* y *B. neotomae* lo hacen moderadamente; *B. canis*, *B. melitensis* y *B. ovis* no producen SH<sub>2</sub>.

#### ▪ Prueba de ureasa

La mayoría de las cepas de *Brucella* desdoblan la urea pero *B. suis*, *B. neotomae* y *B. canis* tienen mayor actividad. Para realizar esta prueba se utiliza habitualmente el medio de Christensen pero recomendamos el método de Bauer por ser semi-cuantitativo y porque utiliza sustrato libre de sustancias promotoras de crecimiento.

#### Método de Bauer

Fosfato monosódico (PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na)	0.125 M
Rojo fenol	0.0015 %

Preparar la solución en agua destilada, ajustar el pH a 4.00 con ácido clorhídrico 1N y agregar urea al 5%. Distribuir cantidades de 1ml en tubos con tapa de rosca y preparar suspensiones con la cepa problema y las patrones de referencia. Incubar a 36°C±1 y leer la prueba a los 15, 30, 60 y 90 minutos. Se considera positiva cuando el color del indicador vira al púrpura.

#### ▪ Crecimiento en presencia de bacteriostáticos

Un criterio que se utiliza para diferenciar cepas de *Brucella* es su habilidad para crecer en medios de cultivo con bacteriostáticos, preparados en varias diluciones. También se utilizan como características diferenciales, el crecimiento en medio de cultivo con alcohol polihidroxilado y con antibióticos. Los colorantes se preparan al 0.1% en agua destilada y se esterilizan por calentamiento a 100°C durante una hora. Se conservan en frascos color ámbar y se reponen cada tres meses.

El medio básico (BD), luego de esterilizado se enfría a 56°C±1 y se agregan los colorantes en cantidad suficiente para tener las concentraciones indicadas en el cuadro 2 en la dilución final. El alcohol polihidroxilado se prepara en solución concentrada, se esteriliza por filtración y se conserva congelado -20°C±4 en alícuotas que se descongelan en el momento del uso. Los antibióticos se preparan en solución concentrada en agua destilada estéril y se pueden conservar durante una semana a 5°C±2.

En todos los casos se prepara el medio básico (BD), luego de esterilizarlo se enfría a 56°C y se agregan los colorantes, antibióticos o alcohol polihidroxilado en cantidad suficiente para tener

las concentraciones finales indicadas en el cuadro 3.

Las placas una vez preparadas se dejan secar y están listas para el uso. Se recomienda no dejarlas a  $36^{\circ}\text{C}\pm 1$  como control de esterilidad ya que se modifican las concentraciones.

- **Fagotipificación**

Se utilizan tres fagos, Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb) y RC (propagado en R-*Brucella*). Se emplean en la dilución corriente de la prueba que se define como la concentración mas baja de fago que produce lisis completa en su cepa de propagación (10).

### **Mantenimiento de los cultivos**

Para evitar las variaciones que se producen con los pasajes sucesivos en los medios de cultivo, las cepas de *Brucella* se pueden conservar a  $-70^{\circ}\text{C}\pm 4$ , en nitrógeno líquido o liofilizadas.

En todos los casos se emplea un vehículo protector de sacarosa 5%, bacto casitone 2.5%, glutamato de sodio 1% y leche descremada 15% (para consistencia del pellet).

La suspensión de cultivos puros en fase logarítmica de crecimiento se coloca en criotubos, ampollas dobles de liofilización o viales dobles para nitrógeno líquido.

Las cepas liofilizadas no deben sobrepasar los  $35^{\circ}\text{C}$  durante el proceso, tener una humedad residual de 1-3% y mantenidas a  $5^{\circ}\text{C}\pm 2$  durante el almacenamiento.

**Cuadro 3: Características diferenciales de las especies del género *Brucella***

Cepa	Crecimiento en medio con:										Aglutinación (g)			Lisis fago (h)		
	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	Tionina (a)	Fucsina básica(a)	Safranina O (b)	Pironina (a)	Verde de malaquita(c)	Penicilina (d)	Estreptomicina (e)	Ureasa (f)	A	M	R	Tb	Wb	RC
<i>B. melitensis</i> 16M**	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+/-)	(-)	
<i>B. suis</i> 1330**	(-)	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
<i>B. abortus</i> 544**	(+)	(+/-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
<i>B. melitensis</i> Rev-1***	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+/-)	(-)
<i>B. canis</i> RM 6/66**	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(++)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)

\*Todas las cepas crecen con 1mg/ml of i-erithritol agregado al medio base

(a): 20ug/ml; (b): 100ug/ml; (c): 2ug/ml; (d): 5ui/ml en medio base; (e): 2.5ug/ml

(f): método de Bauer

(g): A: suero monoespecifico anti-*B. abortus*; M: suero monoespecifico anti-*B. melitensis*; suero anti *Brucella R*

(h): dilución de rutina de la prueba(RTD)

\*\* : cepas de referencia, \*\*\*: cepa vacunal

(-): negativo; (+/-)positivo débil; (+): positivo; (++): positivo fuerte

**Cuadro 4: Cepas de referencia de las especies y biovars del género *Brucella***

<b>Especie</b>	<b>biovar</b>	<b>cepa</b>	<b>ATCC</b>	<b>NCTC</b>
<i>B. melitensis</i>	1	16M	23456	10094
	2	63/9	23457	10508
	3	Ether	23458	10509
<i>B. abortus</i>	1	544	23448	10093
	2	86/8/59	23449	10501
	3	Tulya	23450	10502
	4	292	23451	10503
	5	B3196	23452	10504
	6	870	23453	10505
<i>B. suis</i>	9	C68	23455	10507
	1	1330	23444	10316
	2	Thomsen	23445	10510
	3	686	23446	10511
	4	40	23447	11364
	5	513		
<i>B. neotomae</i>		5K33	23459	10084
<i>B. ovis</i>		63/290	25840	10512
<i>B. canis</i>		RM6/66	23365	10854



## **BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO**

El género *Brucella* es clasificado por el “Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la OMS”, en el grupo de riesgo III (26). El peligro al manipularlo es elevado para el operador, aunque escaso para la comunidad ya que no se transmite de un individuo a otro (23). En el laboratorio de brucelosis las buenas prácticas incluyen medidas de protección para el personal que manipula muestras de sangre, hemocultivos, biopsias, líquido cefalorraquídeo o material extraído de abscesos, desde donde habitualmente se intenta el aislamiento del germen (22). El riesgo principal lo constituyen los aerosoles que se generan en la mayoría de las operaciones de rutina, por eso se debe tratar de reducirlas al mínimo. El clínico debería advertir al laboratorio sobre la posibilidad de encontrar este germen aunque la enfermedad suele presentar síntomas diversos e inespecíficos y a veces no se sospecha (32).

Se trata de una enfermedad que se adquiere en el laboratorio con mucha frecuencia (27, 28) generalmente porque quien intenta identificarlo lo confunde con algún otro microorganismo y trabaja sin protección o porque sospechando su presencia no dispone de facilidades (1,3). La mayoría de los accidentes se deben a accidentes por oler los cultivos, trabajar en la mesada abierta, no usar equipo de protección personal o llevarse a la boca las manos contaminadas (18, 43).

Cuando se derrama una suspensión conteniendo *Brucella* se debe evacuar el laboratorio y proceder a su desinfección utilizando un equipo de protección personal.

El área de trabajo debe contar con equipos de seguridad personal, cabinas de seguridad biológica y un Manual de Bioseguridad donde se detallen las normas de procedimiento para ese laboratorio en particular, el uso apropiado de los desinfectantes, el mantenimiento de las instalaciones, el transporte del material biológico (20), el control de acceso a visitantes y como proceder ante una emergencia.

## **BIOTERRORISMO**

El género *Brucella* por sus características tales como: bajo costo para producirlo en gran escala, fácil de dispersar en el aire, capaz de generar una enfermedad infecciosa prolongada y con probabilidades de dejar secuelas, ha sido contemplado como potencial arma biológica (19). Se ha estimado que una dispersión empleando aerosoles, en condiciones favorables, podría causar 82.500 casos de brucelosis y 413 muertes ( 41).

Los microorganismos que pueden ser utilizados como arma biológica, han sido divididos en tres categorías (A, B y C) teniendo en cuenta su capacidad para transformarse en una amenaza para la Salud Pública y un riesgo para la seguridad nacional.

El género *Brucella* pertenece a la categoría B: gérmenes que son moderadamente transmisibles, que presentan tasa de morbilidad moderadas y baja tasa de mortalidad.

Se recomienda a los laboratorios :

- Revisar regularmente las políticas y procedimientos de seguridad.
- Controlar los accesos a refrigeradoras y congeladoras
- Mantener siempre cerradas las puertas de laboratorios y bioterios.
- Mantener bajo llave refrigeradoras y armarios que contengan cepas, material químico o radiactivo.
- Llevar un registro de los ingresos de las visitas
- Todos los paquetes que ingresen deben ser abiertos en cabinas de seguridad biológica
- Todo material que salga debe estar embalado de acuerdo a Normas Nacionales e Internacionales

## Referencias

1. Al-Aska, A.K. & Chagla, A.H. (1989). Laboratory-acquired brucellosis. *J.Hosp Infect* 14, 69-71.
2. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M. (1988). Bacteriological methods. *In: Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, 13 -61.
3. Arlett, P.R.(1996). A case of laboratory acquired brucellosis. *BMJ* 313, 1130-1132.
4. Ariza, J., Bosch, J., Gudiol, F., Liñares, J., Fernandez-Viladrich, P. & Martin, R. (1986). Relevance of in vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* to relapse rate in human brucellosis. *Antimicrob Agents Chemother* 30, 958-960.
5. Ariza J, Pujol M, Valverde J, Nolla JM, Rufi G, Viladrich PF, Corredoira JM, Gudiol F. (1993) Brucellar sacroiliitis: findings in 63 episodes and current relevance. *Clin Infect Dis* 16:761-65.
6. Ariza, J., Corredoira, J., Pallares, R., Viladrich, P.F., Rufi, G., Pujol, M. & Gudiol, F. (1995). Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *Clin Infect Dis* 20, 1241-1249.
7. Cervantes F, Bruguera M, Carbonell J, Force L, Webb S. (1982)Liver disease in brucellosis. A clinical and pathological study of 40 cases. *Postgrad Med J* 58(680):346-50.
8. Cloeckert A., Verger J.M., Grayon M., Paquet J.Y., Garin-Bastuji B., Foster G., Godfroid J. (2001). Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect.*, 3, 729-738.
9. Corbel M.J., Brinley Morgan W.J. (1984).Genus *Brucella*, Meyer and Shaw 1920, 173 AL. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg NR, Holt JG, eds). The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md., 1, 377-388.
10. Corbel M.J., Thomas E.L. (1985). Use of phage for the identification of *Brucella canis* and *Brucella ovis* cultures. *Res. Vet. Sci.*, 35, 35-40.
11. Corbel M.J. Brucellosis: epidemiology and prevalence worldwide. *In: Young EJ, Corbel MJ, eds. Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. Boca Raton, Florida: CRC, 1989, pp. 26-37.
12. Corbel M.J. Brucellosis: an overview. (1997) *Emerging Infectious Diseases* 3: 13-221.
13. Corbel, M. J. 1997. Recent advances in brucellosis. *J.Med.Microbiol.*, 46 :101-103.
14. Etemadi H., Raissadat A., Pickett M.J., Zafari Y., Vahedifar P. (1984). Isolation of *Brucella* spp. from clinical specimens. *J. Cl. Microbiol.*, 20, 586.

15. García Carrillo C., Lucero N.E. (1993). Diagnóstico bacteriológico. *In: Brucelosis Bovina* (A.I. De Diego, Hemisferio Sur eds), Buenos Aires, Argentina, 97-109.
16. Gazapo, E., González Lahoz, J., Subiza, J.L., Baquero, M., Gil, J. & de la Concha, E.G. (1989). Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: importance for diagnosis and follow up. *J Infect Dis* 159, 219-225.
17. Goicochea, C.E., Gotuzzo, E., Carrillo, C. 1996. Cholera-Brucella cross –reaction: A new potential diagnostic problem for travelers to Latin America. *J.Travel.Med.* 3(1):37-39.
18. Grammont-Cupillard, M., Berthet-Badetti, L. & Dellamonica P.(1996). Brucellosis from sniffing bacteriological cultures. *Lancet* 348, 1733-1734.
19. Greenfield R.A., Drevets, D.A., Machado, L.J., Voskuhl, G.W., Cornea, P., Bronze, M.S. (2002) Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism. *Am. J Med Sci* 323: 299-315
20. IATA. Dangerous Goods Regulations, 49<sup>th</sup> Edition, 2007.
21. Lucero N.E., Greco G., Carrete P. (1999). *Brucella melitensis* biovar 3 en Argentina? *Rev. Arg. Microbiol. Supl.* 1, 31, 58-59. [Article in Spanish]
22. Lucero, N.E. & Siñeriz, F. (2005). The Argentine experience in enhancing biosafety through good laboratory practices. *Asian Biotech and Develop Rev* 8, 99-120.
23. Lucero N.E. Bioseguridad. En: *Microbiología Biomédica*. Eds. JA Basualdo, CE Coto, RA de Torres, eds.2da. ed. Atlante, Buenos Aires, (2006), pag.1401-1419.
24. Lucero N.E., Ayala S.M., Escobar G.I., Grayon M., Jacques I. (2006). A new variant of *Brucella melitensis*. *Clin. Microbiol., Infect.*, 12, 593-596.
25. Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Jacob, N.R. (2007) *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiology and Infection*, doi: 10.1017/S0950268807008795, Published online by University Press 11 Jun 2007.
26. Manual de bioseguridad en el laboratorio. (2005). OMS, Ginebra.
27. Martin-Mazuelos, E., Nogales, M.C., Florez, C., Gomez Mateos, J.M., Lozano, F. & Sánchez, A. (1994). Outbreak of *Brucella melitensis* among microbiology laboratory workers. *J Clin Microbiol* 32: 2035-2036.
28. Noviello, S., Gallo, R., Kelly, M., Limberger, R.J., De Angelis, K., Cain, L., Wallace, B. & Dumas N. (2004). Laboratory-acquired brucellosis. *Emerg Infect Dis* 10, 1848-1850.
29. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 2004. Identification of the agent. *In: (Chapter 2.3.1 and 2.6.2)*. Office International des Epizooties, fifth ed. Paris.

30. Pappas G, Bosilkovski M, Akritidis N, Mastora M, Krteva L, Tsianos E. Brucellosis and the respiratory system. (2003) *Clin Infect Dis* 37:95-99.
31. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. (2005) *N Engl J Med* 2005; 352:2325-2336.
32. Robichaud, S., Libman, M., Behr, M. & Rubin, E. (2004). Prevention of laboratory-acquired brucellosis. *Clin Infect Dis* 38, 119-122.
33. Solera, J., Martinez-Alfaro, E., Espinoza, A., Castillejos, M.L., Geijo, P. & Rodríguez-Zapata, M. (1998). Multivariate model for predicting relapse in human brucellosis. *J Infect* 36, 85-92.
34. Solera J, Lozano E, Martinez-Alfaro E, Espinosa A, Castillejos ML, Abad L. Brucellar spondylitis: review of 35 cases and literature survey. (1999). *Clin Infect Dis* 29:1440-49.
35. Verger J.M., Grimont F., Grimont P.A.D., Grayon M. ( 1985). *Brucella* a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridisation. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35, 292-295.
36. Verger J.M., Grimont F., Grimont P.A.D., Grayon M. (1987). Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 138, 235-240.
37. Verger J.M., Grayon M., Cloeckert A., Lefèvre M., Ageron E., Grimont, F. (2000). Classification of *Brucella* strains isolated from mammals using DNA-DNA hybridisation and ribotyping. *Res. Microbiol.*, 151, 797-799.
38. World Health Organization.(1993). Diagnosis of human brucellosis. report of the MZCP training course on the establishment of a human and animal brucellosis national system. MZCP/Bruc./93.2. Heraklion, Greece.
39. Yagupsky P. (1999). Detection of *Brucellae* in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3437-3442.
40. Yagupsky P., Nechama Peled, Press J. (2001). Use of Bactec 9240 blood culture system for detection of *Brucella melitensis* in synovial fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 738-739.
41. Yagupsky P. & Baron Ellen Jo. (2005). Laboratory exposure to *Brucellae* and implications for bioterrorism. *Emerg Infect Dis* 11, 1180-1185.
42. Young EJ. An overview of human brucellosis. (1995) *Clin Infect Dis* 21: 283-290.
43. Zervos, M.J. & Bostic, G. (1997). Exposure to *Brucella* in the laboratory. *Lancet* 349, 651.

