



MANUAL DE DIAGNÓSTICO DE *Brucella ovis*

Versión 1.0/2015

DIRECCION GENERAL DE LABORATORIOS Y CONTROL
TECNICO

DIRECCION NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD
AGROALIMENTARIA

 **senasa**
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD
Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

 **Ministerio de
Agricultura, Ganadería y Pesca
Presidencia de la Nación**

AUTORIDADES

Ing. Agr. Diana Guillén

Presidente

M. V. Luis Carné

Vicepresidente

Dr. J.L. Ferro

Director Nacional de Sanidad Animal

Lic. Verónica Torres Leedham

Directora General de Laboratorio y Control Técnico

Dr. Jorge Rodríguez Toledo

Director de Laboratorio Animal

OBJETIVO

El presente Manual está dirigido a los Laboratorios veterinarios que realicen el diagnóstico serológico de la Brucelosis ovina. Contiene los requisitos técnicos necesarios para realizar las pruebas con carácter oficial.

Las mencionadas técnicas son internacionalmente reconocidas y recomendadas por la ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE) y EL SENASA.

Versión 1.0/2015.

Elaborado por:

Miguel Trezeguet, M.V., MSc

Ana M. Nicola, M.V., MSc

Sebastián Elena. M.V., MSc

Cristina Franco, Vet.

Nicolás Venditti, Vet.

INDICE

1. Introducción	6
1.1 Etiología	6
1.2 Epidemiología	6
1.3 Patogenia	7
1.4 Manifestaciones clínicas	8
2. Diagnóstico de Laboratorio	9
2.1 Medidas Generales	9
2.2 Aseguramiento de calidad	11
2.3 Control de calidad de insumos	12
2.4 Equipos	13
2.5 Registro de entrada de muestras	13
2.6 Características y condiciones de las muestras	13
2.6.1 Condiciones de recepción de las muestras	13
2.6.2 Condiciones de rechazo de las muestras	14
3. Diagnóstico de <i>Brucella ovis</i>	14
3.1 Identificación del Agente	14
3.2 Pruebas serológicas	14
3.3 Inmunodifusión en gel de agar	15
3.4 Fijación de complemento	18
4. Elisa indirecto	42
4.1 Equipos	43
4.2 Materiales	43
4.3 Guía de problemas y soluciones	45
5. Referencias	46

ABREVIATURAS

- **Ag:** Antígeno
- **C':** Complemento de cobayo
- **DILAB:** Dirección de Laboratorios y Control Técnico
- **ELISA:** Enzimoimmunoensayo
- **FC:** Fijación de Complemento
- **IDGA:** Inmunodifusión en gel de agar
- **IELISA:** Enzimoimmunoensayo Indirecto
- **LPS:** Lipopolisacárido
- **M:** Molar
- **OIE:** Organización Mundial de Sanidad animal
- **PA:** Poder anticomplementario
- **RENSPA:** Registro Nacional Productor agropecuario
- **UI/ml:** Unidades Internacionales por mililitro
- **UFC:** Unidad Internacional fijadora del complemento
- **UC:** Unidad de complemento
- **UH:** Unidad de hemolisina
- **SH:** Sistema hemolítico
- **TV:** Tampón veronal calcio- magnesio

1. INTRODUCCION

La *Brucella ovis* es el agente causal de la “Epididimitis Ovina”; esta es una enfermedad infecciosa transmisible que afecta únicamente a ovinos. No es considerada una zoonosis.

En los machos se caracteriza por epididimitis e infertilidad.

La patogenicidad en la oveja es discutida, causa infertilidad, fundamentalmente en hembras de primer servicio, abortos tardíos y mortalidad neonatal.

1.1. Etiología

- Género: *Brucella*
- Especie: *Brucella ovis*

Es un cocobacilo Gram-negativo; inmóvil; no hemolítico; no esporulado; sin cápsula; microaerófilo (debe cultivarse en ambiente con 10% de CO₂ para su aislamiento); catalasa positivo; intracelular facultativo.

B. ovis, así como las otras integrantes del género, resiste la decoloración por ácidos débiles, en la tinción de Ziehl-Neelsen modificada por Stamp, se observan cocobacilos rojos en fondo azul. El resultado debe ser siempre confirmado por el cultivo bacteriológico.

B. ovis presenta inmunogenicidad cruzada con *B. canis*, ambas especies son las únicas integrantes del género *Brucella* que son morfológicamente de forma rugosa (cepas rugosas).

1.2. Epidemiología

La epididimitis de los carneros producida por *B. ovis* ha sido diagnosticada prácticamente en todos los países donde se crían ovinos.

Tanto machos como hembras pueden infectarse, pudiendo transformarse en portadores; pero, en la epidemiología de la enfermedad, el macho es quien adquiere un papel predominante debido a su capacidad de difundir la enfermedad a otras majadas; siendo la puerta de entrada de la infección al establecimiento libre, la introducción de animales enfermos.

Es una enfermedad de carácter venéreo, el material de elección para la transmisión el semen, siendo la vía más importante la encarnada. Un macho infectado lo transmite a una hembra sana que actúa como vector mecánico, transmitiendo la enfermedad a los machos que la cubren.

Los carneros vasectomizados o retajos también pueden infectarse participando en la transmisión de la enfermedad.

La *B. ovis* se acantona en las vesículas seminales, epidídimos y también se elimina por la orina. Los contagios se producen con mayor frecuencia entre la pubertad y los 15 a 18 meses de edad.

La prevalencia en machos reactivos serológicos positivos y con manifestaciones clínicas de epididimitis, aumenta con la edad. En los machos jóvenes *B. ovis* es de menor importancia que otras bacterias (*Actinobacillus seminis* y *Histophilus ovis*) como agente etiológico de epididimitis.

El agente se elimina por semen, secreciones vaginales, leche y orina, de forma intermitente. También, se ha comprobado, que la bacteria puede recuperarse de secreciones uterinas de ovejas hasta 10 días después del aborto.

Aunque se ha descrito como vías de entradas al organismo animal por mucosas nasal, ocular y oral, estas parecen no tener la importancia que tiene la enfermedad provocada por otras especies del género *Brucella* que afecta a otras especies domésticas.

1.3. Patogenia

Las vías más frecuentes de penetración de la bacteria es a través de las mucosas peneana, rectal o vaginal, donde puede permanecer por algún tiempo, para después migrar a los linfonódulos regionales. En estos se multiplica y va siendo liberada al torrente sanguíneo a medida que las células infectadas son destruidas. Esta constante eliminación de bacterias estimula el sistema inmune, que produce inmunoglobulinas G, cuya presencia es de importancia en el diagnóstico.

Al final del segundo mes de infección se produce una bacteriemia y el agente se localiza preferentemente en el área genital. En el 90 % de los casos se ubica en la cola del epidídimo, donde provoca una reacción de edema intersticial e inflamación en los tejidos adyacentes a la capa basal del epitelio. Produce edema con llegada de polimorfonucleares y macrófagos, hiperplasia y degeneración vacuolar de epitelio tubular, con ruptura y extravasación del material seminal al intersticio, con la consecuente formación de un granuloma espermático.

Durante estas primeras etapas hay un ligero aumento de tamaño y consistencia de la cola del epidídimo, que es prácticamente impalpable, pero en este momento ya existe serología positiva y alteraciones seminales.

Las mayores lesiones no son debidas al agente, sino que son debidas al granuloma espermático. Estas alteraciones se desarrollan durante un periodo de meses, tiempo durante el cual se encuentran gran cantidad de microorganismos en el eyaculado. El granuloma espermático resultante semeja a un absceso y la cola puede estar agrandada de tamaño 4 ó 5 veces por la reacción fibrosa. Si el material seminal pasa a la cavidad vaginal causa una severa inflamación con fuertes adherencias.

No se produce orquitis primaria, sino que la degeneración testicular es secundaria al estasis en los túbulos seminíferos, que a menudo lleva a calcificación. El órgano afectado es estéril. La *Brucella ovis* también puede provocar seminovesiculitis.

En las ovejas la patogenicidad es baja, pudiendo darse placentitis a nivel trofoblástico,

llevando a isquemia y necrosis de los cotiledones, dando como consecuencia el aborto.

1.4. Manifestaciones clínicas

No existen manifestaciones clínicas generales. Solamente 1/3 de los carneros enfermos presentan lesiones palpables.

Los casos agudos, son difíciles de detectar clínicamente, se ve en animales jóvenes con edema y aumento del tamaño del escroto, fiebre, depresión y anorexia, a los 3 a 5 días baja la inflamación pero las colas del epidídimo continúan agrandadas.

En los casos crónicos la manifestación clínica característica de la enfermedad es una inflamación en la cola del epidídimo, que puede extenderse al cuerpo y cabeza del órgano, los epidídimos se palpan aumentados de tamaño, indurados y con menor elasticidad. En la mayoría de los casos las lesiones son unilaterales, pero pueden observarse ambos testículos afectados.

En casos avanzados puede detectarse orquitis con aumento de tamaño o atrofia testicular y degeneración del testículo afectado, así como adherencias de las tunicas que lo envuelven.

La fertilidad puede variar desde normal a nula dependiendo del grado de la lesión.

En el espermograma se observan gran número de leucocitos, anomalías secundarias (cabezas sueltas y defectos de cola) y células en bote, que son células epiteliales que sufren necrosis; baja concentración espermática y motilidad de masa disminuida. También puede evidenciarse la presencia de microorganismos (no siempre).

En las hembras puede observarse vaginitis y cervicitis post-servicio.

También se observa aborto e infertilidad, especialmente en las borregas de primera cría. El aborto ocurre en el último tercio de la gestación y el porcentaje es reducido. Luego del aborto puede observarse retención de placenta y lesiones de la placenta fetal, que consisten en placas amarillo-grisáceas en los espacios intercotiledonarios.

La infertilidad es temporaria, comportándose normalmente en la próxima época de servicios. También provoca nacimientos de corderos débiles que mueren al poco tiempo de nacidos.

2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

2.1 Medidas generales de bioseguridad y seguridad en el laboratorio

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

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

Cada laboratorio debe desarrollar o adoptar un manual con procedimientos de bioseguridad que identifique los riesgos que se encontrarán o puedan producirse, y que especifique las prácticas y procedimientos destinados a minimizar o eliminar las exposiciones a estos riesgos.

Se debe alertar al personal acerca de los riesgos especiales y se les debe exigir que lea y cumpla las prácticas y procedimientos requeridos.

El acceso al laboratorio debe ser limitado o restringido. El laboratorio debe ser diseñado para que su limpieza sea sencilla y contar con una pileta para el lavado de manos. Las superficies de las mesas de trabajo deben ser impermeables al agua y ser resistentes al calor moderado y a solventes orgánicos, ácidos, álcalis y productos químicos utilizados para descontaminar la superficie de trabajo y los equipos.

Los muebles de laboratorio deben tener la capacidad de soportar cargas y usos previstos. Los espacios entre las mesas de trabajo, gabinetes y equipos deben ser accesibles para su limpieza.

Si el laboratorio tiene ventanas que se abren hacia el exterior, deben estar provistas de mosquiteros.

Se deben usar ambos, batas o uniformes de laboratorio de protección adecuados durante la permanencia en el mismo. Se debe retirar y dejar esta ropa de protección en el laboratorio antes de dirigirse a otras áreas (por ejemplo, cafetería, biblioteca, oficinas administrativas). Se debe usar además calzado cerrado y cabello recogido.

Se deben usar guantes cuando las manos entren en contacto con materiales infecciosos, superficies o equipos contaminados. Puede ser apropiado el uso de dos pares de guantes. Los guantes se retiran al terminar el trabajo o se descartan y se hace cambio de guantes cuando estos entraron en contacto directo con el material

infeccioso o cuando está comprometida la integridad del guante. Los guantes descartables **no se lavan, no se vuelven a usar ni se utilizan para tocar superficies “limpias” (teclados, teléfonos, entre otras), y no se deben usar fuera del laboratorio.**

Las personas deben lavarse las manos frecuentemente durante el trabajo en el laboratorio, luego de manipular materiales potencialmente viables, luego de quitarse los guantes y antes de retirarse del laboratorio

No está permitido comer, beber, fumar, usar lentes de contacto, maquillarse o almacenar alimentos para consumo personal en áreas de trabajo. Se debe utilizar protección ocular para los procedimientos en los que se puedan producir salpicaduras de material infeccioso u otros materiales peligrosos.

La iluminación debe ser adecuada para todas las actividades, evitando los reflejos y el brillo que puedan molestar la visión.

Está prohibido pipetear con la boca; se debe utilizar dispositivos mecánicos y aplicar procedimientos para el manejo seguro de objetos cortantes o punzantes.

Todos los procedimientos se llevan a cabo con precaución a fin de minimizar la creación de salpicaduras o aerosoles.

Las superficies de trabajo se descontaminan antes y después de finalizar las tareas y ante todo derrame de material viable.

Todos los cultivos, *stocks* y otros desechos debidamente segregados se descontaminan antes de ser desechados mediante un método de descontaminación aprobado, como por ejemplo, mediante autoclave. Los materiales que se deben descontaminar fuera del laboratorio inmediato son colocados en un recipiente duradero, estanco y cerrado para su transporte desde el laboratorio. Los materiales que se deben descontaminar fuera del laboratorio inmediato se embalan de conformidad con las normas locales, estatales y federales aplicables antes de retirarlos del establecimiento de acuerdo a las indicaciones de la Ley 24051 de Residuos Peligrosos.

Agente: Brucella (B. abortus, B. canis, B. melitensis, B. suis y B. ovis).

El género *Brucella* clasificado por el “Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la OMS”, en el **Grupo de riesgo 3 (riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo)** agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales

graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

La brucelosis sigue siendo la infección bacteriana de laboratorio más comúnmente reportada. Tanto *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis* como *B. suis* pueden provocar la enfermedad en personal de laboratorio atribuidos a la exposición directa o accidental a material infeccioso

Hasta la fecha, no se han reportado casos humanos, provocados por *B. ovis* y es considerada como no zoonótica. Sin embargo, en las zonas donde coexiste infección de *B. melitensis* con *B. ovis*, se requiere especial cuidado al manipular muestras, que serán transportados al laboratorio en recipientes para sustancias infecciosas (6.2)

Riesgos de laboratorio: El agente puede estar en sangre, en el fluido cerebroespinal, en el semen y, a veces, en la orina. La mayoría de los casos de laboratorio se han producido en instalaciones de investigación y producción y, se debieron a la exposición a las cepas de *Brucella* patógenas para el hombre, cultivados en grandes cantidades. También se han producido casos en el ámbito del laboratorio clínico por aspirar cultivos bacteriológicos. En estos casos, generalmente, ha habido contacto directo de la piel con los cultivos o con especímenes clínicos infecciosos de animales (por ejemplo, sangre, descargas uterinas).

Los aerosoles generados durante los procedimientos de laboratorio, el pipeteo, las inoculaciones parenterales accidentales y los aerosoles hacia los ojos, nariz y boca también han provocado infecciones.

Precauciones: Para toda la manipulación de cultivos de *Brucella* spp. y para estudios experimentales con animales, se debe trabajar con equipos de contención y en instalaciones del Nivel de Bioseguridad 3.

2.2. Aseguramiento de calidad en el Laboratorio

Los laboratorios deberán cumplimentar la reglamentación vigente de acuerdo a las BPL (SENASA), Norma ISO/IEC 17025, OIE *Quality Standard and guidelines for veterinary Laboratories: Infectious diseases* (2008)

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

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

Los procedimientos se pueden monitorear mediante el control interno, con la utilización diaria de sueros con títulos conocidos y el control externo con interlaboratorios con un laboratorio de referencia. El control permanente de la calidad de los resultados, junto a las buenas prácticas de laboratorio que incluyen la utilización de técnicas evaluadas, personal capacitado y operaciones estandarizadas, garantizan el diagnóstico.

2.3. Control de calidad de insumos

Todos los insumos y reactivos que se utilizan en el laboratorio deben estar establecidos 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.

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

El agua empleada en el laboratorio de diagnóstico 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 mega Homs/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 mega Homs/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 mega Homs/cm (mínimo) y el mismo límite de silicatos y metales pesados que los tipos anteriores.

Los reactivos biológicos que se emplean en las técnicas, deben utilizarse de acuerdo a las especificaciones del Manual de Procedimientos Operativos, respetando las indicaciones para la conservación, almacenamiento y titulación.

Los reactivos y kits diagnósticos que se utilizarán y comercializarán en el país, para diagnóstico oficial deberán ser debidamente registrados y aprobados ante el SENASA.

2.4. Equipos

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

2.5. Registro de entrada de muestras

Los laboratorios deben contar con un registro de entrada de muestras, en el que conste como mínimo la siguiente información:

- Fecha de recepción de muestras.
- Cantidad de muestras.
- Especie.
- Fecha de extracción de muestras.
- Procedencia: establecimiento, número de RENSPA.
- Localidad: departamento, partido, provincia.
- Remitente: veterinario acreditado, nombre y número de registro, otorgado por la Dirección Nacional de Sanidad Animal (DNSA) SENASA.
- Motivo del envío: saneamiento, traslado, importación, exportación y otros.
- Fecha de emisión de los resultados.

2.6. Características y condiciones de las muestras

2.6.1. Condiciones de "recepción" de las muestras:

- Sangre entera o suero refrigerados.
- Suero congelado.
- Tubos con identificación clara, de preferencia sobre cinta de papel o similar adherida al tubo; con marcación firme e indeleble en el cuerpo del tubo.

2.6.2. Condiciones de "rechazo" o demora del procesamiento de las muestras:

- Falta de planillas protocolo o planillas incompletas.
- Sangre entera congelada.

- Sangre entera o suero, contaminados.
- Sueros hemolizados.
- Tubos no identificados.

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

Los informes que elabore el Laboratorio deberán ser precisos para poder desarrollar adecuadamente las acciones de saneamiento.

3. Diagnóstico de *Brucella ovis*

3.1 Identificación del agente:

Lesiones clínicas (epididimitis y orqui-epididimitis) en carneros puede ser indicativo de la existencia de la infección, pero se requieren exámenes de laboratorio para confirmar la enfermedad. La confirmación de laboratorio puede basarse en métodos directos o indirectos. El diagnóstico directo se realiza mediante el aislamiento bacteriológico de *B. ovis* de muestras de semen o tejidos de carneros, o secreciones vaginales, la leche y los tejidos de ovejas, en medios selectivos adecuados. *Brucella ovis* es similar a las otras *Brucella* spp. en su morfología, propiedades de tinción y las características culturales, excepto que da reacciones negativas a las pruebas de oxidasa y ureasa. Los métodos moleculares se han desarrollado para la identificación complementaria basado en secuencias genómicas específicas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede proporcionar medios adicionales de detección. Sin embargo, se prefiere el diagnóstico indirecto basado en pruebas serológicas para el diagnóstico de rutina.

3.2 Pruebas serológicas:

La prueba de Fijación del Complemento (FC), la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y ensayos inmunoenzimáticos indirectos (I-ELISA) usando antígenos de superficie solubles obtenidos de la cepa *B. ovis* REO 198, se deben utilizar para el diagnóstico. La sensibilidad de la pruebas de IDGA y I-ELISA son similares y pueden ser más elevada que el FC. Una combinación en paralelo de la prueba IDGA y I-ELISA parece dar los mejores resultados en términos de sensibilidad, pero con respecto a la sencillez y el costo, la prueba IDGA es la prueba más factible para el diagnóstico de *B. ovis* en laboratorios no especializados. Sin embargo, debido a la falta de métodos normalizados reconocidos a nivel internacional para la IDGA y I-ELISA, la prueba prescrita para el comercio internacional sigue siendo la FC.

Antígenos HS para su uso en pruebas serológicas deben ser preparados a partir de *Brucella ovis* cepa REO 198 es CO₂ y suero independiente.

El Suero Estándar Internacional anti-*Brucella ovis* (1985) es la referencia utilizada para comparar y estandarizar el resto de los patrones secundarios. Este estándar de referencia está disponible para los laboratorios de referencia nacionales y debe utilizarse para establecer los estándares secundarios o nacionales frente a los cuales puedan prepararse los estándares de trabajo que se utilizarán en el laboratorio de diagnóstico de forma sistemática en el día a día.

3.3. Inmunodifusión en gel de agar

Materiales:

- Micropipetas de 10-100µl.
- Placas de Petri (100mm de diámetro) / porta objetos
- Recipientes varios.
- Puntas de pipetas (*tips*).

Equipos:

- Centrífuga.
- Heladera.
- Freezer.
- Vortex.
- Sacabocado perforador de agar.
- Bomba de vacío.
- Cámara húmeda.
- Caja de lectura con fondo oscuro.

Reactivos:

- Antígeno HS preparado a partir de *Brucella ovis* cepa Reo 198 aprobado por SENASA. Conservar el Antígeno en el freezer a $-20 \pm 5^\circ \text{C}$, en envase de vidrio, No de poliestireno. **No se debe conservar en la heladera.**
- Suero control positivo.

Drogas y Soluciones:

- Agar Noble o agarosa.
- Cloruro sódico.
- Ácido Bórico.
- Cloruro Potásico.

- Agua destilada.

Preparación de tampón borato (preparado con ácido bórico [12,4 g]; cloruro potásico [14,5 g] y agua destilada [1.600 ml]; ajustado a pH 8,3 con una solución de NaOH (0.2 M), y llevado hasta 2.000 ml de volumen final con agua destilada).

Para preparar el agar se disuelve 1g de agarosa (o agar Noble), 10 g de NaCl en 100 ml de tampón borato hirviendo mientras se agita continuamente. Se cubren los portaobjetos o placas de petri colocados sobre una superficie plana, con la cantidad necesaria del agar fundido para formar un lecho de 2,5 mm de espesor (aproximadamente 3,5 ml para los portaobjetos estándar y 13-14 ml en placas de Petri de 100 mm)

Después de que el agar se haya solidificado (15–20 minutos) en una superficie nivelada, se recomienda dejar al menos una hora en heladera para asegurar que el agar este bien firme cuando se perfora, se recortan los pocillos utilizando un sacabocado para agar. Los pocillos deberán ser de 3 mm de diámetro y estar separados 3 mm entre ellos, y estar dispuestos según un patrón hexagonal alrededor de un pocillo central que también tendrá 3 mm de diámetro.

Ejecución del ensayo:

Descongelar y mezclar bien los sueros y el antígeno utilizando preferentemente vortex o invirtiendo el tubo (o envase) varias veces.

Con micropipeta cargar los pocillos 2, 4 y 6 en forma individual con los sueros a procesar y en los pocillos 1, 3 y 5 el suero control positivo. Por último cargar en el pocillo central el antígeno. (Fig. 1)

Los pocillos serán llenados completamente teniendo la precaución de no desbordar, ni dejar burbujas. A su vez ningún pocillo debe quedar sin cargar. Revisar bien las rosetas y descartar aquellas donde, por una mala perforación, el agar esté rajado y haya comunicación entre los pocillos.

Incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente 22 ± 4 °C, 48 horas.

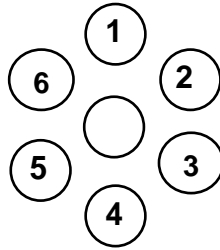
Realizar una primera lectura a las 24 hs y la lectura definitiva a las 48 hs.

Fig. 1 Diagrama de siembra de sueros y antígeno

Suero problemas: Pocillos 2, 4 y 6

Sueros controles: Pocillos 1, 3 y 5

Antígeno: Pocillo central



Lectura e interpretación de resultados:

La lectura se efectúa bajo haz de luz suave indirecta sobre un fondo oscuro revelando las bandas de precipitación.

Antes de una lectura definitiva, si se observan líneas inespecíficas, se recomienda lavar las placas de agar durante una (1) hora en una solución en agua de citrato sódico al 5% para limpiar las líneas de precipitación inespecíficas.

Las reacciones se clasifican en:

POSITIVAS:

Cuando se aprecia una banda o línea de precipitación definida entre el pocillo central (Ag) y los orificios de los sueros problemas, mostrando una identidad total o parcial con la del suero control positivo.

También pueden aparecer líneas de precipitado que no den una identidad total y que pueden corresponder a componentes antigénicos minoritarios de los extractos HS (en las infecciones debidas a otras especies del género *Brucella* también pueden generarse con frecuencia anticuerpos frente a estos componentes). Estas reacciones también deben considerarse positivas.

NEGATIVAS:

Cuando no se aprecia ninguna banda de precipitación entre el orificio central (Ag) y los orificios de los sueros problema.

Criterios de aceptación del resultado

De no observar la presencia de la banda de precipitación de los controles positivo, la prueba será considerada como no válida y deberá ser repetida.

3.4 Fijación de complemento

Materiales:

- Material de vidrio de volúmenes varios.
- Pipetas de : 1 ml, 2 ml, 5 ml y 10 ml.
- Gradillas.
- Parafilm para cubrir placas.
- Puntas de pipetas (Tips).
- Tubos de centrifuga cónicos.
- Tubos de Khan.
- Placas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en U.

Equipos:

- Estufa $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Termo de nitrógeno líquido o freezer ($- 70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$).
- Baño termostático $60-63^{\circ}\text{C}$.
- Agitador de placas.
- Espectrofotómetro (540nm).
- Micropipetas automáticas monocanales y multicanales de rango 10 μl a 200 μl .
- Termómetros certificados.
- Peachímetro.
- Balanza.

Reactivos:

- Suspensión de glóbulos rojos 2% (GR 2%).
- Hemolisina producida en conejo (H).
- Complemento de cobayo (C).
- Antígeno de *Brucella ovis* (Cepa Reo 198) (Ag).

Sueros:

- Suero control positivo.
- Suero control negativo.
- Sueros problemas a analizar.

Soluciones (Anexo I):

- Tampón veronal calcio magnesio 5X (TV 5X).
- Tampón veronal calcio magnesio 1X , pH 7,3-7,4. (TV 1X).

EJECUCION DE LA PRUEBA (Microtécnica):

Utilizar microplacas de 96 pocillos fondo en U. Presentar la microplaca de manera que las letras indiquen columnas (diluciones del suero) y los números indiquen las filas (sueros a analizar). De esta manera, en cada placa se incluyen 12 muestras de suero para análisis y a cada muestra se le realizan 8 diluciones en base 2 (1:2 a 1:256).

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

- a) Tampón Veronal 1X.
- b) Sueros inactivados a $60 - 63^\circ\text{C}$
- c) Solución de complemento de cobayo en TV 1X que contenga 2 UC/ml.
- d) Solución de antígeno en TV 1X a la dilución de trabajo.
- e) Sistema hemolítico obtenido por la mezcla de volúmenes iguales de una solución de hemolisina en TV 1X que contenga 2 UH/ml y de una suspensión de eritrocitos de carnero en TV 1X al 2%.

Inactivación de los sueros

Las muestras de suero se inactivan en baño termostático para eliminar el complemento natural contenido en las mismas.

La temperatura del baño se controlará mediante la introducción de un termómetro certificado durante todo el tiempo de exposición de las muestras al agua.

Los sueros se inactivan por 30 minutos en baño termostático a $60^\circ\text{C} - 63^\circ\text{C}$ (en caso de que los sueros sean anticomplementarios, se recomienda realizar otro ciclo de inactivación de 30 minutos).

Las muestras podrán ser sumergidas en el baño termostático de la siguiente forma:

- En tubos de khan tapados herméticamente, contenidos en gradillas, debidamente identificados.

La inactivación de las muestras podrá realizarse un día antes del análisis. En este caso, una vez retiradas del baño termostático se dejarán a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos para luego conservar en heladera. Si el análisis se realizaría después de las 24 hs, las muestras ya inactivadas se conservarán a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$.

Controles utilizados

Sueros controles:

▪ Control positivo

- Pre-diluir el suero control positivo 1/12,5 con TV 1X, inactivar, alicuotar y conservar a -20 ± 5 ° C.
- Dispensar 25 µl/pocillo de TV 1X en la **fila 1** de la placa control desde **1G** hasta la **1A**.
- Dispensar en el pocillo **H1**, 50 µl del suero control positivo diluido previamente 1/12,5 con TV 1X, tomar 25 µl de suero del pocillo **H1** y pasarlo al pocillo **G1**, homogeneizar bien los dos componentes, luego pasar 25 µl al siguiente pocillo **F1**, y repetir la misma secuencia hasta el pocillo **A1**.
Tabla 1

▪ Control negativo

Se realiza una dilución en base 1:2 de la siguiente manera:

- Dispensar 25 µl/pocillo de TV 1X en la **fila 2** de la placa control desde **2H** hasta la **2A**,
- Dispensar en el pocillo **H2**, 25µl del suero control negativo, homogeneizar bien, tomar 25 µl del pocillo **H2** y pasarlo al pocillo **G2**, homogeneizar bien los dos componentes, luego pasar 25 µl al siguiente pocillo **F2**, y repetir la misma secuencia hasta el pocillo **A2**. **Tabla 1**

▪ Control de la ausencia de poder anticomplementario del antígeno

- Dispensar por duplicado (**H3** y **G3**) en la microplaca de los controles
- 25 µl/pocillo de la solución de antígeno
- 25 µl/pocillo de TV 1X
- 25 µl/pocillo de C

▪ Controles del sistema hemolítico

Sin complemento: Dispensar 75 µl de TV 1X por duplicado (**H4** y **G4**) en la placa de controles.

Con complemento: Se dispensa en **H5**

- 50 µl/pocillo de TV 1X
- 25 µl/pocillo de C

Tabla 1: Placa de controles

	H	G	F	M	D	C	B	A
	1:12,5	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
Dilución suero control positivo	50 µl Suero POS	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV
								1
Dilución suero control negativo	25 µl Suero puro NEG	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV
								2
Control de ausencia de ant. delAg	25µl TV 25µl Ag 25µl C'	25µl TV 25µl Ag 25µl C'						3
Control del SH sin C'	75µl TV	75µl TV						4
Control de SH con C'	50µl TV 25µl C'	50µl TV 25µl C'						5

Dilución de las muestras de sueros problemas

En otra placa,

- Dispensar en cada pocillo 25 µl de TV 1X, de acuerdo a la cantidad de sueros a procesar.
- Dispensar 25 µl de suero en el pocillo **H1**, homogeneizar bien los dos componentes con pipetas monocanal o multicanal, luego pasar 25 µl del pocillo **H1** al **G1**, homogeneizar y pasar 25 µl al pocillo **F1**, luego repetir la misma secuencia hasta el pocillo **A1**.
- La secuencia de operaciones se detalla en la **Tabla 2**. Las diluciones se realizarán con pipetas monocanal o multicanal. La homogenización de los dos componentes de cada dilución se mezclan mediante el pipeteo por cinco veces consecutivas como mínimo.

Preparación de la solución de antígeno y complemento y su distribución en la microplaca de los sueros controles positivo y negativo y en los sueros a analizar.

- Se preparan las soluciones de C y Ag según la dilución de trabajo establecida como óptima. (Ver **Anexo II**)
- Una vez diluidos los sueros con la TV 1X, dispensar la solución de antígeno a razón de 25 µl / pocillo, **en todos los pocillos excepto en la columna H de la dilución 1:2 que actuarán como controles de poder anticomplementario (AC) de cada suero.**
- A continuación dispensar 25 µl/pocillo de la solución de C en todos los pocillos de la microplaca. **Tabla 3.**

Primera incubación en caliente

- Cubrir y agitar las microplacas en agitador de placas durante 2 – 4 minutos
- Incubar las microplacas en estufa a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.

Tabla 2: Distribución de las muestras problemas a analizar en una microplaca de 96 pocillos fondo en U (12 sueros x 8 diluciones)

	Г	Ⓔ	π	π	⓪	Ⓒ	Ⓜ	⤵	
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	25µl
25µl suero 1 25 µl TV	25 µl	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	1
25µl suero 2 25 µl TV		25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	2
25µl suero 3 25 µl TV		25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	3
25µl suero 4 25 µl TV		25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	4
25µl suero 5 25 µl TV		25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	5
25µl suero 6 25 µl TV		25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	6
25µl suero 7 25 µl TV		25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	7
25µl suero 8 25 µl TV		25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	8
25µl suero 9 25 µl TV		25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	9
25µl suero 10 25 µl TV		25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	10
25µl suero 11 25 µl TV		25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	11
25µl suero 12 25 µl TV		25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	25µl TV	12

En la columna H con la dilución 1:2 se evalúa la actividad anticomplementaria de cada suero a analizar. En lugar del antígeno se debe completar el volumen final con 25 µl solución TV 1X.

Agregado del sistema hemolítico

- Finalizada la primera incubación, dispensar el sistema hemolítico a razón de 25 µl en todos los pocillos de las placas. **Tabla 3**

Segunda incubación en caliente (ídem anterior)

Centrifugación/reposo de la microplaca

- Finalizada la segunda incubación, centrifugar las microplacas a 2000 rpm durante 5 minutos o bien dejar en reposo en heladera durante una hora antes de su lectura.

Tabla 3: Distribución final de los reactivos por pocillo de la placa

	И	Θ	Π	ϙ	Ϙ	ϙ	Ϛ	ϛ	
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	
	25µl suero 1 50 µl TV 25µl C'	25µl TV 25µl Ag 25µl C'	25µl TV 25µl Ag 25µl C'	25µl TV 25µl Ag 25µl C'	25µl TV 25µl Ag 25µl C'	25µl TV 25µl Ag 25µl C'	25µl TV 25µl Ag 25µl C'	25µl TV 25µl Ag 25µl C'	1
1ºincubación									
	25µl SH	25µl SH	25µl SH	25µl SH	25µl SH	25µl SH	25µl SH	25µl SH	
2ºincubación									

Cálculos y expresión de los resultados

El grado de fijación del complemento se manifiesta por la presencia o ausencia de hemólisis del sistema hemolítico. Se expresa en forma de UIFC (unidades internacionales fijadoras del complemento) según el título o dilución de la muestra (1:4, 1:8, etc) seguido de 1, 2, 3 o 4 cruces según el grado de fijación de complemento en dicha dilución.

El título menor que se cuantifica es 1:4 + (16,6 UIFC) y el rango de trabajo está comprendido entre 1:4 + y 1:256 +++++ (16,6 a 1702,7 UIFC).

El poder anticomplementario de los sueros se controla en la columna H, dilución 1:2.

La presencia de al menos un 25% de sedimento de eritrocitos (+) en la fila H (dilución 1:2) indica que el suero problema puede tener poder anticomplementario. En tal caso se informa el resultado "PA", y se solicitará una nueva extracción de suero para repetición del ensayo.

El resultado de la reacción será "positivo" o "negativo". En el primer caso la reacción positiva se cuantificará mediante la determinación del título y su grado de hemólisis o fijación del complemento.

Reacción positiva:

- Sedimentación en grado variable de los eritrocitos en el fondo del pocillo.

- El sobrenadante estará afectado por un cierto tinte rojizo en función de la hemólisis que se haya producido.

++++	0% de hemólisis o 100% fijación del complemento (completa) Sobrenadante translúcido, en el fondo de la placa un botón de depósito de eritrocitos
+++	25% de hemólisis o 75% de fijación del complemento Sobrenadante rojizo en un 25% de intensidad; en el fondo un depósito claro de eritrocitos
++	50% de hemólisis o 50% de fijación del complemento Sobrenadante rojizo en un 50% de intensidad; en el fondo un depósito tenue de eritrocitos
+	75% de hemólisis o 25% de fijación del complemento. Sobrenadante rojizo en un 75% de intensidad; en el fondo un depósito muy tenue de eritrocitos

Reacción negativa: 100% de hemólisis con ausencia de depósito de eritrocitos.

Interpretación de los resultados

Existe un sistema de unidades basado en el Estándar Internacional para el Suero anti-*Brucella ovis* (Estándar Internacional 1985). Este suero contiene 1000 UIFC/ml. Si este suero se analiza con un método determinado y da, por ejemplo, un título de 100, entonces el factor para un suero desconocido analizado mediante ese método se puede hallar a partir de la fórmula: $1.000/100 \times \text{título del suero problema} = \text{número de UIFC}$ (unidades internacionales de FC) de anticuerpo en el suero problema por ml. Los resultados deben expresarse siempre en UIFC, calculados con relación a aquellos obtenidos en una titulación en paralelo con un suero patrón nacional, que a su vez ha sido estandarizado con el suero Estándar Internacional.

Se considerara la muestra positiva cualquier valor ≥ 50 UIFC/ml (1/8 ++++).

Para la expresión de los resultados se puede utilizar la formula con el suero patrón antes mencionada o emplear una tabla establecida (Tabla 4) basada en el presente manual en el Procedimiento IZS TE B2. 1.6 SOP 004 del Centro Internacional de Referencia OIE para Brucelosis *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell "Abruzzo e del Molise G. Caporale*. Teramo. Italia

Dilución	% de fijación del C	UIFC
1:4	+	16,6
	++	20
	+++	23,2
	++++	26,6
1:8	+	33,2
	++	40
	+++	46,4
	++++	53,2
1:16	+	66,4
	++	80
	+++	92,8
	++++	106,4
1:32	+	132,8
	++	160
	+++	185,6
	++++	212,8
1:64	+	265,6
	++	320
	+++	371,2
	++++	425,6
1:128	+	531,2
	++	640
	+++	742,4
	++++	851,2
1:256	+	1062,4
	++	1280
	+++	1484,8
	++++	1702,4

Tabla 4. Interpretación de los resultados expresada en UIFC

Lectura de los controles

El ensayo es satisfactorio si los controles han dado los resultados esperados:

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

En el caso que los controles no se encuentren dentro de los límites aceptables, el ensayo será considerado como no válido y la prueba deberá ser repetida.

3.4.1. ANEXO I

Preparación de soluciones

Tampón Veronal Calcio magnesio (TV)

Solución madre (5X)

NaCl	83 g
Na 5-5 dietil barbiturato	10,19 g
Ácido clorhídrico 1 N (*)	34,58 ml
Solución concentrada de Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺	5 ml
Agua destilada c.s.p.	2000 ml

- En un matraz aforado de 2000 ml, disolver el NaCl y el barbiturato de sodio en 500 ml de agua destilada.
- Agregar el ácido clorhídrico 1N.
- Agregar 5 ml de la solución concentrada de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺, la cual se prepara de la siguiente manera:

CaCl ₂ .2 H ₂ O	4,4 g
Mg Cl ₂ .6 H ₂ O	20,3 g
Agua destilada	100 ml

- Completar el volumen hasta 2000 ml con agua destilada y mezclar.

Solución de trabajo 1X (pH 7,3 -7,4)

Realizar una dilución 1:5 con agua destilada de la solución madre 5X.

Conservar en heladera 5 ± 3°C

Tiempo de validez: 5 días.

3.4.2. ANEXO II

Metodología para la preparación estandarización de la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2%

Materiales:

- Cámara de Neubauer.
- Material de vidrio de volúmenes varios.
- Pipetas de: 1 ml, 2 ml, 5 ml y 10 ml.
- Gradillas.
- Tips.
- Tubos de centrifuga graduado.
- Micropipetas de 10 – 200 µl.

Equipos

- Se utilizan los mismos equipos descritos en 3.4 (ensayo de FC).

Soluciones

- Tampón veronal 1X pH 7,3-7,4.
- Glóbulos rojos de carnero (adquiridos comercialmente)

Drogas

- Cloruro de Sodio.
- 5-5 dietilbarbiturato de sodio.
- Cloruro de Magnesio.
- Cloruro de Calcio.
- Ácido Clorhídrico.
- Citrato de Sodio.

Preparación de los Glóbulos rojos

a) Lavado de glóbulos rojos:

- Filtrar la sangre a través de una gasa y depositar en un tubo cónico de centrifuga graduado en 10 ml.
- Centrifugar la sangre aproximadamente a 2000 rpm durante 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante, tratando de arrastrar los leucocitos que forman una capa amarillenta en la parte superior de la columna de hematíes.
- Suspender los eritrocitos en TV 1X en una proporción 1 volumen de GR + 5 volúmenes de TV 1X, homogeneizar cuidadosamente.
- Centrifugar aproximadamente a 2000 rpm durante 5 minutos y luego eliminar el sobrenadante con una pipeta.

- Repetir la suspensión de los eritrocitos y la centrifugación dos veces más. Luego de la última centrifugación descartar el sobrenadante.

b) Estandarización de glóbulos rojos al 2%:

El método para la estandarización de la suspensión de glóbulos rojos se puede realizar por medio de dos técnicas:

- Método espectrofotométrico.
- Método en cámara de Neubauer.

Método espectrofotométrico:

Preparar la concentración de GR al 2%(0,2 ml GR + 9,80 ml de TV 1X).

Tubo 1: blanco de lectura para el espectrofotómetro. Agregar en un tubo:

5,6 ml de agua destilada + 0,4 ml de TV 1X.

- Dispensar 2,5 ml en cada cubeta del espectrofotómetro (dependerá del modelo de espectrofotómetro utilizado).

Tubo 2: Para determinar la lisis 100% de los GR

Realizar una dilución 1:15, con agua destilada: 0,2 ml de glóbulos rojos al 2% + 2,8 ml de agua destilada.

- Una vez lisados los eritrocitos, se lee la densidad óptica (DO) a 540nm contra el blanco.
- La DO esperada es de **0.330 ± 0.05** (Esto deberá ser determinado según el modelo de espectrofotómetro utilizado en el laboratorio).

Método en cámara de Neubauer:

- Determinar el volumen de la columna de glóbulos y calcular la cantidad de solución TV 1 X necesaria para hacer una suspensión al 2%aproximadamente (0,2 ml GR + 9,80 de TV).
- Realizar el recuento de glóbulos rojos en la cámara.
- La suspensión deberá tener $5,4 \times 10^8$ GR/ml.

3.4.3. ANEXO III

Determinación de la dilución de trabajo óptima del complemento y hemolisina

Se realiza previamente al ensayo.

Se busca determinar en conjunto el valor de sensibilización de la hemolisina para los GR de carnero expresado como UH (Unidades Hemolíticas) y la concentración de uso del complemento en la reacción de fijación del complemento expresado como UC (unidad complemento).

Reactivos y Soluciones

- Suspensión de glóbulos rojos al 2%.
- Hemolisina: se conservará según instrucción del fabricante. Se titulará cada lote recibido, previa dilución 1:100 con agua destilada (dilución "madre"), que se conservará a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su uso, en cantidades suficientes para un día de trabajo.
- Complemento de cobayo: conservado a (-70°C) o en nitrógenos líquido a (-186°C).
- Tampón veronal calcio 1X.
- Tampón veronal 5X.

Condiciones de realización

Trabajar a temperatura de laboratorio $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$.

Las incubaciones del ensayo se realizarán en estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

- La titulación simultánea del complemento y la hemolisina se debe realizar cada vez que un nuevo lote de complemento, hemolisina y/o glóbulos rojos son producidos.
- El control de 2 Unidades de C debe ser realizado cada día antes del ensayo usando GR 2%.
- El complemento que sea objeto de titulación debe descongelarse a temperatura de laboratorio. Una vez descongelado se mantendrá en refrigeración y solo se sacará de la heladera en el momento de su utilización. Si se prevee que se va a utilizar más de un vial se mezclan y se titula el pool. Tras su uso diario se guardará a una temperatura de (-70°C) o en nitrógeno líquido a (-186°C .)

Preparación de las diluciones

Dilución del complemento:

- Preparar una dilución 1:10 de complemento en TV 1X (130µl de complemento + 1170 µl de TV 1X) y conservar en una caja con hielo durante la titulación.

Realizar las siguientes diluciones de complemento a partir de la dilución 1:10 (**Tabla 5**) y conservar en caja con hielo durante la titulación

Tabla 5. Diluciones del complemento

Dilución	Complemento 1/10	TV 1X
1/30	200 µl	400 µl
1/40	100 µl	300 µl
1/50	100 µl	400 µl
1/60	100 µl	500 µl
1/70	100 µl	600 µl
1/80	100 µl	700 µl
1/100	100 µl	900 µl
1/120	50 µl	550 µl
1/140	50 µl	650 µl
1/160	50 µl	750 µl
1/240	50 µl	1150 µl
1/280	50 µl	1350 µl

- **Dilución de hemolisina:**
 - Hemolisina 1:100 en TV 1X
 - 10 µl de hemolisina
 - 990 µl de TV 1X
 - Hemolisina 1:500 en TV 1X
 - 500 µl de (hemolisina 1:100)
 - 2000 µl de TV 1X

A partir de la dilución de **hemolisina 1:500** preparar en tubos las siguientes diluciones (**Tabla 6**)

Tabla 6. Dilución de hemolisina

Tubo	Dilución	Hemolisina 1/500	TV 1X
1	1/1000	500 µl	500 µl
2	1/1500	500 µl	1000 µl
3	1/2000	250 µl	1000 µl
4	1/4000	125 µl	1500 µl
5	1/6000	250 µl	2500 µl
6	1/ 8000	250 µl	3500 µl
7	1/10000	250 µl	4500 µl

▪ **Preparación del sistema hemolítico**

- Preparar y enumerar un set de 7 tubos, uno por cada dilución de hemolisina.
- Agregar en cada tubo 500 µl de hemolisina de cada dilución.
- Agregar 500 µl de glóbulos rojos estandarizados al 2 % en todos los tubos que contienen las diluciones de hemolisina.
- Incubar en estufa a 37° ±2 °C durante 15 minutos.

Titulación cruzada en microplaca del complemento y la hemolisina (Tabla 9)

a) Distribución de TV 1X

- Desde la **fila A** hasta la **fila G** de la microplaca agregue 50 µl/pocillo de TV 1X.

b) Distribución del Complemento

- Agregue 25 µl/pocillo de cada dilución del complemento en todos los pocillos de la microplaca excepto en la fila H como se muestra en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Distribución de las diluciones del complemento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1/30	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280
B	1/30	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280
C	1/30	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280
D	1/30	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280
E	1/30	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280
F	1/30	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280
G	1/30	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280
H												

c) Distribución del Sistema Hemolítico

- Finalizada la incubación de las diluciones del sistema hemolítico distribuir 25 µl/pocillo del sistema hemolítico en la misma microplaca según el esquema indicado en la tabla 8

Tabla 8. Distribución de las diluciones de la hemolisina

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
B	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
C	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
D	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000
E	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000
F	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000
G	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
H	CSH c/C 1000	CSH s/C 1000	CI GR									

Tabla 9

Complemento

			30		40	50	60	70	80	100	120	140	160	240	280
Hemolisina			1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1000		A													
1500		B													
2000		C													
4000		D													
6000		E													
8000		F													
10000		G													
		H	CSH c/C 1000		CSH s/C 1000	CI GR									

d) Distribución de los controles

- Control del sistema hemolítico con complemento (CSH c/C)
 - Dispensar en el pocillo H1:
 - 50 µl de TV 1X
 - 25 µl de complemento dilución 1:30
 - 25 µl del sistema hemolítico 1:1000
- Control del sistema hemolítico sin complemento (CSH s/C)
 - Agregar en el pocillo H2:
 - 75 µl de TV 1X
 - 25 µl del sistema hemolítico 1:1000
 -

- Control de integridad de glóbulos rojos (CI GR)
 - Agregar en el pocillo H3:
 - 75 µl de TV 1X
 - 25 µl de glóbulos rojos al 2 %

e) Incubación: *Ídem explicación de la técnica de complemento (3.4).*

f) Centrifugación/reposo de la placa: *Ídem explicación de la técnica de complemento (3.4).*

Expresión de resultados: *Ídem explicación de la técnica de complemento (3.4).*

Lectura de controles. *Ídem explicación de la técnica de complemento (3.4).*

Lectura de la titulación

- **Título del complemento:** Es la mayor dilución del complemento donde se observa un 100 % de hemólisis con la mayor dilución de la hemolisina. Esto representa 1 unidad de complemento (UC), pero para la ejecución del ensayo se usará 2 unidades de complemento (2UC)
- **Título de la hemolisina:** Es la mayor dilución de hemolisina donde se observa un 100 % de hemólisis con la mayor dilución del complemento. Esto representa 1 unidad de hemolisina (UH), pero para el ensayo principal se usará 2 unidades de hemolisina (2UH).

Cálculo de la dilución de trabajo (DDT)

Supongamos que UC = 1/120(según el desarrollo en el presente procedimiento).

$$\text{DDT } 2 \times \text{UC} = 2 \times 1/120 = 1/60$$

Para calcular la dilución de trabajo de la hemolisina se procede de la misma manera: Supongamos que UH = 1/2000

$$\text{DDT } 2 \times \text{UH} = 2 \times 1/2000 = 1/:1000$$

Control de 2 Unidades de complemento (2 U)

Una vez obtenida la dilución de trabajo se realizará el control de 2 UC y 2 UH, también se chequeará las diluciones de complemento 1/50 y 1/70 y para la hemolisina la dilución 1/1000 y 1/2000; esto nos permitirá seleccionar la dilución óptima de trabajo.

La prueba se efectuará por duplicado utilizando 4 pocillos por cada dilución de complemento.

a) Preparación de sistema hemolítico:

- Preparar dos tubos con 1000 μ l de las diluciones de hemolisina 1/1000 y 1/2000
- Agregar a los tubos 1000 μ l de glóbulos rojos estandarizado al 2%
- Agitar e incubar en estufa a 37° C \pm 2 °C 15 minutos.

b) Preparación del complemento:

- Preparar 3 diluciones de complemento (1/50, 1/60, 1/70)

c) Distribución en la microplaca

- Dispensar 25 μ l/pocillo de TV 1X en las columnas según el esquema indicado en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Distribución de TV

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		25 μ l	25 μ l	25 μ l		25 μ l	25 μ l	25 μ l		25 μ l	25 μ l	25 μ l
B		25 μ l	25 μ l	25 μ l		25 μ l	25 μ l	25 μ l		25 μ l	25 μ l	25 μ l
C		25 μ l	25 μ l	25 μ l		25 μ l	25 μ l	25 μ l		25 μ l	25 μ l	25 μ l
D		25 μ l	25 μ l	25 μ l		25 μ l	25 μ l	25 μ l		25 μ l	25 μ l	25 μ l

- En la misma placa dispensar 50 μ l/pocillo de complemento de la diluciones 1/50, 1/60 y 1/70 en las columna 1, 5 y 9 respectivamente como se indica en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Distribución del complemento

	1 1/50	2	3	4	5 1/60	6	7	8	9 1/70	10	11	12
A	50µl				50µl				50µl			
B	50µl				50µl				50µl			
C	50µl				50µl				50µl			
D	50µl				50µl				50µl			

- Con la pipeta multicanal pasar 25 µl /pocillo de la columna 1 a la columna 2. La homogenización de los dos componentes de cada dilución se realizará mezclando mediante la acción de pipetear durante 5 veces. Recoger 25 µl/pocillo de la columna 2 y pasar a la columna 3, volver a homogeneizar, recoger 25 µl/pocillo y pasar a la columna 4, homogeneizar y recoger 25 µl/pocillo y descartar.
Repita la misma operación con las diluciones que se encuentran en la columna 5 a 8 y 9 a 12
- Las diluciones del complemento quedarán dispuestas en la microplaca como muestra la **Tabla 12**

Tabla 12. Diluciones del complemento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25µl 2UC	25µl 1UC	25µl 0,5 UC	25µl 0,25 UC	25µl 2UC	25µl 1UC	25µl 0,5 UC	25µl 0,25 UC	25µl 2UC	25µl 1UC	25µl 0,5 UC	25µl 0,25 UC
B	25µl 2UC	25µl 1UC	25µl 0,5 UC	25µl 0,25 UC	25µl 2UC	25µl 1UC	25µl 0,5 UC	25µl 0,25 UC	25µl 2UC	25µl 1UC	25µl 0,5 UC	25µl 0,25 UC
C	25µl 2UC	25µl 1UC	25µl 0,5 UC	25µl 0,25 UC	25µl 2UC	25µl 1UC	25µl 0,5 UC	25µl 0,25 UC	25µl 2UC	25µl 1UC	25µl 0,5 UC	25µl 0,25 UC
D	25µl 2UC	25µl 1UC	25µl 0,5 UC	25µl 0,25 UC	25µl 2UC	25µl 1UC	25µl 0,5 UC	25µl 0,25 UC	25µl 2UC	25µl 1UC	25µl 0,5 UC	25µl 0,25 UC

- Dispensar 50 µl de TV 1X en todos los pocillos.
 - Agregar 25 µl/pocillo de SH 1/1000 (previamente incubado 15 min a 37° ± 2 °C) en la fila A y B y 25 µl /pocillo de SH 1/2000 en la fila C y D.
- d) Incubación: *Ídem explicación de la técnica de complemento (3.4)*
- e) Centrifugación/reposo de la placa: *Ídem explicación de la técnica de complemento (3.4)*

Lectura y elección de la dilución de trabajo

La dilución del complemento y hemolisina que se aceptará deberá dar como resultado

	Resultado Esperado
En la primera y segunda dilución (2 UC y 1UC)	100% de hemólisis
En la tercera dilución (0,5 UC)	50 % de hemolisis
En la cuarta dilución (0,25 UC)	0 % de hemolisis

3.5.4. ANEXO IV

Titulación del Antígeno

La titulación tiene como objeto determinar la dilución de trabajo óptima del antígeno que debe emplearse en la cuantificación de anticuerpos para el serodiagnóstico de brucelosis. Este procedimiento se aplicará para cada lote de antígeno que vaya a emplearse como reactivo en dicho ensayo.

Esta reacción requiere de un título mínimo para que la misma se lleve a cabo, es decir, se debe garantizar una concentración mínima de antígeno que reaccione con los anticuerpos y sea capaz de fijar el complemento. Para garantizar esta concentración se realizará esta titulación de antígeno.

Realización

1. Dilución e inactivación de los sueros controles positivos y negativos.
Inactivar por 30 minutos en baño maría (60°C– 63°C). Una vez inactivado realizar las siguientes diluciones del suero positivo con TV 1X: 1/150, 1/175, 1/200, 1/225, 1/250.
2. Se prepara en tubos las siguientes diluciones del antígeno *Brucella ovis* con TV 1X: 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 y 1/640.

Tabla 13. Distribución de los sueros controles y del antígeno

Antígeno

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sueros		1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640				
A C++	1/150												
B C++	1/175												
C C++	1/200												
D C++	1/225												
E C++	1/250												
F C-	Neg.												
G													
H													

- Dispensar 25 µl de cada dilución del suero control positivo en el pocillo correspondiente según la tabla 1 (fila A a E), desde la columna 1 a la 8.
- Dispensar 25 µl del suero control negativo desde la fila F1 hasta F8.
- Distribuir 25 µl de la dilución de trabajo de complemento en los pocillos que contiene las diluciones de trabajo de suero control positivo y suero negativo.
- Agregar 25 µl de la dilución correspondiente de antígeno según la tabla 1.

Primera incubación en caliente

- Cubrir y agitar las microplacas en agitador de placas durante 2 – 4 minutos.
- Incubar las microplacas a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.

Agregado del sistema hemolítico

- Finalizada la primera incubación, dispensar el sistema hemolítico a razón de 25 μl en todos los pocillos de la placa.

Segunda incubación en caliente

- Cubrir y agitar las microplacas en agitador de placas durante 2 – 4 minutos
- Incubar las microplacas a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.

Centrifugación/reposo de la microplaca

- Finalizada la incubación, centrifugar las microplacas a 2000 rpm durante 5 minutos o bien dejar en reposo durante una hora antes de su lectura en heladera.

Lectura de la titulación

El nuevo lote de antígeno debe presentar un título en el cual el suero control positivo arroja un resultado de ++ en 1:200 y negativo en 1:250, título que corresponde a 1000 UIFC/ml de suero.

El suero negativo debe arrojar resultado negativo (100% de hemólisis).

3.4.6. ANEXO V

Preparación de la escala visual para la interpretación de los resultados

En un tubo de ensayo se coloca 1 ml de la suspensión de glóbulos rojos al 2% + 9ml de TV 1X.

En otro tubo de ensayo colocar 1ml de la suspensión de glóbulos rojos al 2% + 7ml de agua destilada, agitar para provocar la completa hemólisis de los GR. (solución de hemoglobina), y agregarle 2ml de TV (5x) para mantener la presión osmótica.

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

De esta manera mezclándolas en distintas proporciones podremos obtener la imagen que corresponde a los distintos grados de hemólisis, luego de centrifugar durante 5 minutos a 1000 rpm (**Tabla 14**).

Tabla 14.

PORCENTAJE DE HEMÓLISIS											
REACTIVOS EN μ l	0%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
Solución de hemoglobina	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Suspensión de glóbulos rojos	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0

4. Enzimoimmunoensayo Indirecto (I ELISA)

Se realizará siguiendo el protocolo de los kits comerciales validados y aprobados para el diagnóstico oficial de la brucelosis ovina con el valor de corte establecido por SENASA.

El enzimoimmunoensayo (ELISA) es un método empleado habitualmente para la detección y/o cuantificación de sustancias, generalmente proteínas, que se encuentran en concentraciones muy bajas. El método combina la especificidad de unión de los anticuerpos con la amplificación de "señal" que brindan las reacciones catalizadas por enzimas. En la práctica clínica es la técnica inmunológica más empleada. Se utiliza para cuantificar, entre otras cosas, hormonas, marcadores tumorales, para determinar la presencia de antígenos microbianos y para la determinación cualitativa o cuantitativa de anticuerpos totales o frente a algún antígeno en particular.

ELISA Indirecto. Consta de las siguientes etapas: •

1. Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio (generalmente en los kits comerciales la placa ya está preparada con el antígeno pegado a la misma)
2. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
3. Adición de los controles y sueros problemas, en la dilución indicada en el protocolo, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte.
4. Incubación
5. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado. •Es importante que la placa no se seque, lo que podría incrementar la actividad inespecífica del ensayo.
6. Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos.
7. Incubación
8. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado. •
9. Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora.
10. Frenado

11. Lectura colorimétrica del producto final coloreado.

4.1 Equipos:

- Heladera con temperatura controlada (5 ± 3 °C)
- Freezer con temperatura controlada (-20 ± 5 °C)
- Vortex
- Centrífuga
- Timer
- Fotómetro de placas automático con filtros (405 nm, 414 nm, 450nm)
- Agitador orbital de placas
- Peachímetro (rango de 0 a $14 \pm 0,01$ pH).
- Lavador de placas

4.2 Materiales:

- Micropipetas monocanal de volumen variable (0,5 a 10 μ l, 5 a 50 μ l, 50 a 200 μ l y 200 a 1000 μ l).
- Micropipetas multicanal de volumen variable (5 a 50 μ l y 50 a 250 μ l).
- Dispensadores automáticos.
- Timer o reloj de laboratorio.
- Propipetas.
- Selladores de placas de acetato o parafilm.
- Cubetas plásticas para pipetas multicanales.
- Microtubos o microplacas (para realizar las diluciones previas de los sueros).
- Criotubos de polipropileno para el almacenamiento de los sueros.
- Gradillas.
- Material de vidrio (probetas, pipetas, erlenmeyers, etc. de distintos volúmenes).
- Toallas o papel absorbente.

Modelo de Distribución de los sueros controles y muestras problemas en la placa de 96 pocillos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	C++	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37	41
B	C++	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37	41
C	C+	2										
D	C+	2										
E	C-	3										
F	C-	3										
G	Cc	4										44
H	Cc	4										44

A continuación se citan algunas precauciones a tener en cuenta para ejecutar la técnica de Elisa:

- Seguir expresamente las instrucciones del kit para la preparación de todos los reactivos
- Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización.
- No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes lotes o kits.
- Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
- No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
- Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra y reactivo a analizar.
- Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo.
- Utilizar agua desionizada o destilada para la preparación/dilución de los reactivos que se empleen en el ensayo.
- Corroborar que el lector de placas posee el filtro con el cual se debe leer la placa y seguir las instrucciones de uso del equipo
- Se recomienda trabajar las muestras por duplicado, para verificar la repetibilidad del operador.

4.3 Guía de problemas y soluciones

Señal	Posible causa	Solución
Color irregular	<ol style="list-style-type: none"> 1. Error de pipeteo 2. Falta de mezcla de reactivos 3. Falta de lavados 	Práctica Mejorar técnica Precaución
No hay color	<ol style="list-style-type: none"> 1. Se omitió el sustrato 2. Errónea concent. Sustrato 3. Sustrato con pH erróneo 4. Conjugado muy diluido 5. Se omitió el conjugado 	Revisar Revisar Controlar pH Revisar Revisar
Color parejo en toda la placa	<ol style="list-style-type: none"> 1. Conjugado muy concentrado 2. Falla en el lavado 3. Sustrato contaminado 	Controlar Mejorar técnica Revisar
Elevado color de fondo "background"	<ol style="list-style-type: none"> 1. Reacción inespecífica 2. Material de vidrio sucio 3. Agua de mala calidad 4. Poco detergente (Tween 20) 5. Tampones contaminados 	Cambiar solución de lavado Mejorar lavado Controlar calidad Revisar Preparar soluciones nuevas
Desarrollo de color muy rápido	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sustrato muy concentrado 2. Conjugado muy concentrado 3. Solución sustrato con pH erróneo 4. Concent. Cromógeno errónea 	Revisar Controlar dilución Controlar Revisar
Desarrollo de color muy lento	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sustrato muy diluido 2. Conjugado muy diluido 3. Solución sustrato con pH erróneo 4. Concentración Cromógeno errónea 5. Concent de Tween errónea 	Revisar Revisar dilución Revisar Revisar Revisar
Efecto borde	<ol style="list-style-type: none"> 1. Incubación despareja 2. Resecación por aire 3. Tampón de lavado residual 	Utilizar estufa Mantener la placa cubierta Eliminarlo

5. REFERENCIAS

- Alton, G.G.; Jones, L.M; Angus, R.D.; Verger, J.M. 1988. Serological methods. Techniques for the Brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, pp. 157-167.
 - Blasco J.M. (1990). *Brucella ovis*. In: Animal Brucellosis, Nielsen K. & Duncan J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 351–378.
 - GALL D., NIELSEN K., VIGLIOCCO A., SMITH P., PEREZ B., ROJAS X. & ROBLES C. (2003). Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Rumin. Res.*, **48**, 173–179.
 - *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise G. Caporale*. Procedimiento IZS TE B2. 1.6 SOP 004 del Centro Internacional de Referencia OIE para Teramo. Italia
 - Nielsen K., Gall D., Kelly W., Vigliocco A, Henning D and Garcia M. (1996). Immunoassay Development. Application to Enzyme Immunoassay for the diagnosis of Brucellosis. ISBN 0662-24163-0. Agriculture and AgriFoodCanada.
 - Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. 2009. Capítulo 2.7.9. Séptima Edición. Volumen 2
- SENASA, Manual de diagnóstico serológico para Brucelosis Bovina. 2009
- VIGLIOCCO A.M., SILVA PAULO P.S., MESTRE J., BRIONES G.C., DRAGHI G., TOSSI M. & NIELSEN K. (1997). Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.*, **54**, 357–368.