INS
Instituto Nacional de Salud

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Centro Nacional de Productos Biológicos



BRUCELOSIS: DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y VACUNAS

MINISTERIO DE SALUD

Ministro
Dr. Alvaro Vidal Rivadeneyra

Viceministro
Econ. Carlos Rodríguez Cervantes

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Jefe
Dr. Luis Fernando Llanos Zavalaga

Subjefe
Dra. Aida Cecilia Palacios Ramirez

Centro Nacional de Salud Pública
Dra. Susana Zurita Macalupú Directora General

Centro Nacional de Alimentación y Nutrición
Dr. Napoleón Chávez Villanueva Director General

Centro Nacional de Control de Calidad
Dra. Rosa Guevara Ormeño Directora General

Centro Nacional de Productos Biológicos O.F. Ricardo Valera Sánchez Director General

Centro Nacional de Salud Ocupacional y Protección del Ambiente de Salud Dr.
Enrique P. Swayne Díaz Director General

Centro Nacional de Salud Intercultural
Dr. Carlos del Aguila Campos Director General

COMITÉ EDITOR INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Presidente
Dra. Aída Palacios Ramírez

Secretario Técnico
Dr. César Cabezas Sánchez

Miembros
O.F. Zulema Arévalo Chong
Dr. Jorge Barnaby Rodríguez
Dr. Zuño Burstein Alva
Lic. Iván Gómez-Sanchéz Prieto
Dr. Alfredo Guillén Oneeglio
Dr. César Náquira Velarde
Lic. Margarita Rodríguez Gutarra
Dr. Víctor Suárez Moreno
Dra. Frine Samalvides Cuba

Editor
Dr. Leonid Lecca García

Asistente editorial
Lic. Daniel Cárdenas Rojas

Secretaria
Srta. Rocío Solís Agurto

Diseño y Diagramación: María Elena Córdova Burgos

Dirección:
Instituto Nacional de Salud
Cápac Yupanqui 1400. Lima 11, Perú. Telf.: (0511)471-9920 Anexo 162

BRUCELOSIS: DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y VACUNAS

Elaborado:

M. V. Silvia Herrera B.
M. V. Marlene Cárdenas C.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Centro Nacional de Productos Biológicos

2003

Catalogación hecha por el Centro de Información y Documentación Científica del INS

Herrera B., Silvia ; Cárdenas C., Marlene
Diagnóstico y prevención de la brucelosis / Elaborado por Silvia Herrera B. y Marlene Cárdenas C. — Lima : Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2003.
57 p. : 21 cm.

1. BRUCELOSIS / diagnóstico 2. BRUCELOSIS / prevención y control
I. Herrera B., Silvia
II. Cárdenas C., Marlene
III. Instituto Nacional de Salud (Perú)
IV. Perú. Ministerio de Salud

ISBN 9972-857-36-0
Hecho el Depósito Legal NQ 1501132003-2535

©Ministerio de Salud, 2003
Av. Salaverry cuadra 8 s/n, Jesús María, Lima, Perú Telf.: (51-1) 431-0410

©Instituto Nacional de Salud, 2003
Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú Telf.: (51-1) 471-9920 Fax: (51-1) 471-0179 e-mail: postmaster@ins.gob.oe
Página Web: htto://www.ins.gob.oe/

Publicación aprobada con R.J. NQ 41 0-2003-J-OPD/INS

Portada: Personal del centro manipulando liofilizadora.
Se autoriza su reproducción total o parcial siempre y cuando se cite la fuente

Contenido

Presentación ---------- 6

Capítulo I: Generalidades ---------- 7

Capítulo II: Diagnóstico de la enfermedad ---------- 13

Capítulo III: Pruebas diagnósticas ---------- 18

Capítulo IV: Antígenos para el diagnóstico de la brucelosis ---------- 20

Capítulo V: Vacunas para la prevención de la brucelosis animal ---------- 34

Capítulo VI: Especificaciones de los productos ---------- 37

Capítulo VII: Bioseguridad ---------- 39

Bibliografía ---------- 43

Presentación

La presente publicación tiene por finalidad aportar en la solución de la problemática que representa la brucelosis como enfermedad zoonótica de repercusión en la salud pública y pecuaria.

En ese contexto, el Instituto Nacional de Salud, a través del Centro Nacional de Productos Biológicos, viene invirtiendo esfuerzos a fin de impulsar el desarrollo de técnicas para el diagnóstico y prevención de la brucelosis, buscando hacer frente a esta enfermedad.

Las investigaciones científicas que se van desarrollando constituyen la herramienta fundamental en la generación de nuevos conocimientos y enfoques para los programas sanitarios y por ende, todo esfuerzo que conlleve a la realización de mejoras por el bien de la salud pública y pecuaria, servirá para afrontar las necesidades y problemas nacionales.

Es importante considerar que la orientación de las medidas de control y prevención deben ser aunadas en trabajos coordinados entre el sector salud y agropecuario a fin de optimizar las tareas dirigidas al control de la enfermedad.

Esperamos que la presente publicación sea de utilidad para el personal involucrado en los programas de prevención y control de la brucelosis, a fin de afianzar los criterios de diagnóstico y prevención de esta enfermedad.

Capítulo I

GENERALIDADES

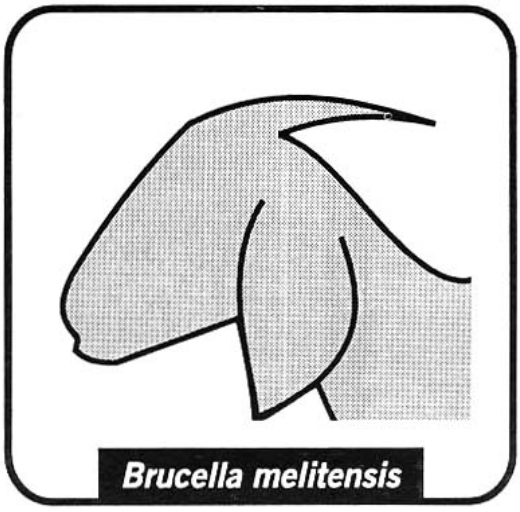
ESPECIES DEL GÉNERO *Brucella*



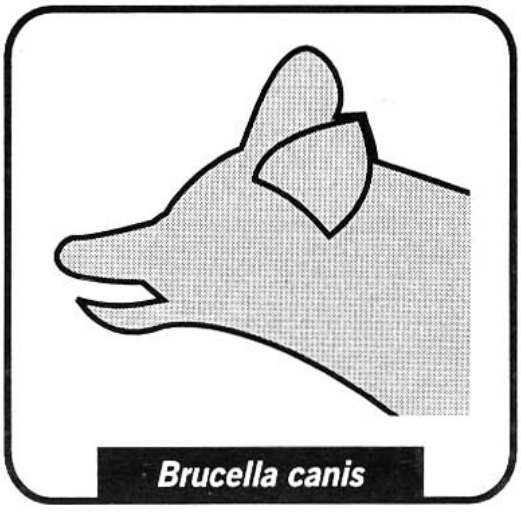
Brucella abortus



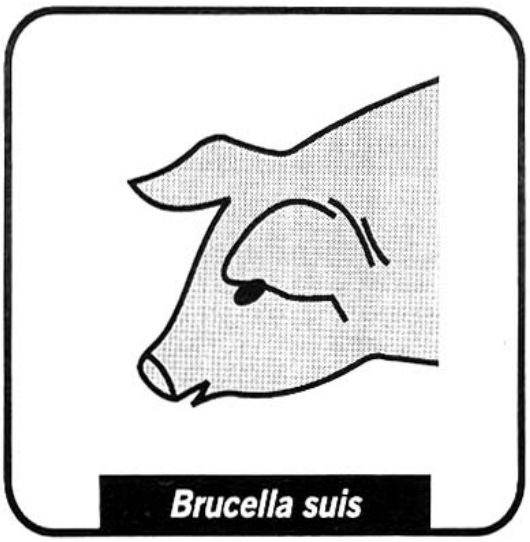
Brucella ovis



Brucella melitensis



Brucella canis



Brucella suis



Brucella neotomae

Conceptos generales

Definición

La brucelosis tambien llamada «fiebre malta» es una enfermedad zoonótica infecciosa importante. Afecta a la mayoría de especies animales de sangre caliente, el hombre es sólo un huésped accidental. Es de difusión mundial y, a pesar de haber sido erradicada en países industrializados, continúa siendo un grave problema de salud pública, así como para la producción animal y la economía de algunas regiones.

Agente etiológico

La enfermedad es causada por diferentes especies del género *Brucella,* el cual tiene las siguientes características:
Cocobacilos Gram negativos, de 0,5 a 0,7 µm de ancho por 0,6 a 1,0 µm de longitud.
No forman cápsula, esporas, ni flagelos.
No toman coloración bipolar.
No son ácido resistentes, pero pueden resistir la decoloración por ácidos débiles o álcalis.
Son aerobios e inmóviles. Algunas cepas requieren CO2 (5% -10%) para su crecimiento.
Tienen metabolismo respiratorio (oxidativo).
Son organismos intracelulares.
A la observación microscópica están solos, en parejas, formando cadenas cortas o pequeñosconglomerados.
En cultivo en medios sólidos, las colonias son visibles después del segundo al cuarto día de crecimiento. Su tamaño varía entre 0,5 y 1,0 mm. Son transparentes, con bordes enteros y superficie lisa.

Características bioquímicas del género *Brucella*

Catalasa positiva.
Hidrolizan la úrea.
Oxidasa positiva.
Reducen nitratos a nitritos (con excepción de B. *avis).*
*P*roducen hidrógeno sulfurado.
Indol negativo.
No hidrolizan la gelatina ni lisan la sangre.
Reacción negativa al rojo de metilo.
Temperatura óptima de crecimiento de 37°C.
pH óptimo de crecimiento entre 6,0 a 7,0.

Especies y características del género *Brucella*

Brucella melitensis. Crece en presencia de fucsina básica y tionina, produce trazas de H2S en medio peptonado, posee un antígeno M predominante, patógeno para caprinos y ovinos, otras especies animales y humanos. Presenta 3 biovares.

Brucella abortus. Para su cultivo y desarrollo requiere de CO2 (5,0%-10,0%). Crece en presencia de fucsina básica, pero es inhibido por la tionina. Posee por lo general un antígeno A predominante. Presenta 7 biovares. Infecta preferentemente a vacunos, produce abortos infecciosos en vacas y también infecta a otros animales y al hombre.

Brucella suis. Crece en presencia de tionina. Posee un antígeno A predominante. Infecta preferentemente a los porcinos, patógena para otras especies animales y para el hombre (excepto, el biovar 4 que afecta a renos). Presenta 4 biovares.

Brucella ovis. Requiere adición de CO2, no produce H2S. Son oxidasa negativa. No reduce nitratos a nitritos, su desarrollo es inhibido por metil violeta pero crece en presencia de fucsina básica y tionina. No presenta antígenos A y M de las *Brucellas* lisas. Presenta un antígeno de superficie rugosa (R), que presenta reacciones cruzadas con otras *Brucellas* rugosas. Infecta principalmente a los ovinos y produce epididimitis en carneros. No es

patógena para otras especies animales ni para humanos.

Brucella canis. Su crecimiento es inhibido por CO2 y por fucsina, pero no por tionina. No produce H2S. No poseen antígenos A y M. Forman sedimento mucoso en medios líquidos. Presenta antígeno de superficie (R). Infecta principalmente a canes de ambos sexos y se ha aislado en humanos.

Brucella neotomae*.* Es oxidasa negativa, produce H2S. No crece en fucsina básica, pero sí en tionina. Ha sido aislada en ratas salvajes del desierto de Utah (USA) y no es patógena para otras especies animales ni para el hombre.

Estructura antigénica

Como otras bacterias Gram negativas, la envoltura celular de los microorganismos *Brucella* está formada por una membrana interna, una membrana externa y un espacio periplásmico intermedio que contiene algunas enzimas y proteínas relacionadas con el transporte y un gel glicopeptídico denominado peptidoglicano, responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria.

La membrana externa contiene fosfolípidos distribuídos asimétricamente, proteínas y un lipopolisacárido (LPS), considerado el principal antígeno. Éste último incluye dos tipos de complejos:

- Complejo liso de lipopolisacárido (S-LPS).
- Complejo rugoso de lipopolisacárido (R-LPS).

Estos complejos lisos o rugosos se presentan de acuerdo a la clasificación revisada para las cepas lisas o rugosas del género *Brucella.*

El factor de virulencia principal es ellipopolisacárido (LPS) de la pared celular del microorganismo. Las cepas lisas que contienen S-LPS son más virulentas y resistentes a la muerte intracelular por leucocitos polimorfonucleares. Además, el género *Brucella* puede sobrevivir y multiplicarse en monocitos y macrófagos del sistema reticuloendotelial (SRE). La localización en el SRE puede explicar las manifestaciones clínicas de la infección como linfoadenopatías, hepatoesplenomegalia y las complicaciones óseas.

El LPS es el principal antígeno que participa en las pruebas ordinarias: pruebas de aglutinación y de fijación de complemento. Los LPS situados en la superficie y algunos antígenos proteínicos interviene en las pruebas diagnósticas y en la actividad protectora de las vacunas. Los haptenos NH y poli-B, relacionados con los S-LPS, se usan en la prueba de inmunodifusión radial para diferenciar los animales infectados de los inmunizados.

Se producen reacciones serológicas cruzadas entre las especies lisas de *Brucella* y *Escherichia coli* O: 116 y O: 117, *Francisella tularensis,* el grupo *Salmonella* N(0:30) de Kauffman White, *Stenetrophomonas, (Pseudomonas) maltophilia, Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolítica* 0:9. Estas reacciones cruzadas se atribuyen a la similitud de antígenos lipopolisacáridos superficiales de estas bacterias y porque la mayoría se caracterizan por mostrar títulos, pudiendo diferenciarse por pruebas complementarias.

Patogenia y cuadro clínico de la enfermedad

La susceptibilidad a la infección depende del estado inmunitario y nutricional del individuo, del tamaño y vía de penetración del inóculo y de la especie de *Brucella.*

Las formas de infección son la ingestión, el contacto directo, la inhalación y la inoculación accidental. En el hombre la fuente más probable de infección es por ingestión. La leche y sus derivados, en particular la crema y el queso fresco provenientes principalmente de caprinos infectados, representan en nuestro medio la fuente más probable de infección. En los animales la principal vía de introducción del patógeno lo representan las mucosas de la orofaringe, las vías respiratorias superiores y la conjuntiva.

En el momento de la parición se excretan grandes cantidades de microorganismos *Brucella,* el

sistema de producción pecuaria y las condiciones ambientales influyen en la propagación de la enfermedad. Al ingresar el microorganismo *Brucella* al organismo sano es fagocitado por los macrófagos. Existe una bacteriemia transitoria.

Los microorganismos del género *Brucella* al ser intracelulares facultativos pueden permanecer dentro de las células fagocíticas y estar protegidas de los mecanismos normales de defensa del hospedero. Son capaces de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del SRE y tejidos asociados.

La bacteriemia generada en el organismo infectado se refleja a través del cuadro clínico en el hombre y en los animales.

Cuadro clínico en el hombre

Brucelosis aguda: El periodo de incubación es variable entre 1 a 3 semanas. Los síntomas incluyen debilidad, cefalea y dolor muscular o articular. Es característica la sudoración copiosa, especialmente en la noche, precedida o acompañada de escalofríos. Es común la esplenomegalia y suele palparse el hígado. Se observa un aumento de temperatura vespertino. Cuando la enfermedad es prolongada, la gráfica de temperatura puede seguir un patrón ondulante, de aquí el nombre de "fiebre ondulante ".

Brucelosis crónica: La enfermedad se considera crónica cuando persiste o recurre por un periodo de 6 meses o más. Se atribuyen síntomas de influenza recurrente, acompañados de debilidad, cefalea, dolor muscular o articular y sudoración.

Complicaciones: Las más frecuentes son: tromboflebitis, epididimoorquitis, espondilitis y artritis periférica, especialmente en las caderas, rodillas y hombros.

Cuadro clínico en los animales

Siguiendo la bacteriemia generada por el ingreso del microorganismo *Brucella,* éstas tiene gran afinidad por los órganos reproductores del macho y la hembra.

Brucelosis aguda: En el caso de las hembras el signo clínico principal es el aborto en el último tercio de gestación, ello está asociado con la producción de un compuesto natural del útero: el *eritritol* (ausente en el útero de las mujeres). También se presenta retenciones de placenta, metritis e infertilidad temporal. En los machos, el signo principal es la epididimitis y la orquitis.

Las bacterias también se localizan en otros lugares, tales como las glándulas mamarias y los ganglios linfáticos supramamarios, con la consiguiente excreción del microorganismo por la leche.

Brucelosis crónica: En las hembras se presenta metritis, seguida por infertilidad; mientras que en los machos, la infertilidad es frecuente. La formación de higromas situados en las bolsas carpianas es un signo característico de brucelosis crónica en machos y hembras.

Respuesta inmune

Frente al ingreso invasivo de la bacteria el huésped genera mecanismos de defensa a través de la producción de anticuerpos IgM, IgG¡, IgG2 e IgA.

Los anticuerpos del isotipo IgM aparecen una a dos semanas luego de la infección, seguidos por el isotipo IgG. Ambos aumentan considerablemente durante las siguientes semanas, facilitando la fagocitosis y confiriendo 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.*

En la detección de anticuerpos (Inmunoglobulinas IgG e IgM) se debe considerar:

- Las IgM se forman precozmente entre los 5 y 7 días y alcanzan su pico entre los 13 y 21 días.
- Las IgG se forman simultáneamente entre los 14 y 21 días y alcanzan su máxima concentración entre los 28 y 42 días.ç
- Tanto en el hombre como en los animales la infección natural estimula la aparición simultánea o ligeramente diferida de las IgM e IgG, pero mientras las IgM declinan y tienden a desaparecer las IgG se estabilizan y persisten por largo tiempo.
- En casos crónicos de brucelosis humana y animal la clase principal de inmunoglobina presente y muchas veces la única, es la IgG
- En el hombre y animales la desaparición de la IgG significa, generalmente, la eliminación de la infección.

Fenómeno de zona

Ocurre cuando un suero no aglutina en las diluciones más bajas, mientras en las diluciones más altas ocurre una aglutinación intensa.

Este fenómeno se explica por la presencia de anticuerpos incompletos «univalentes» que, aunque se unen al antígeno, no producen la segunda fase de la reacción, es decir, la agregación. Estos anticuerpos pertenecen a la clase IgG.

El fenómeno de zona ha sido demostrado en sueros de título alto y en individuos con infecciones de larga duración.

Capítulo II

DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

Diagnóstico de la enfermedad

El diagnóstico se basa en los siguientes aspectos:

- Diagnóstico clínico.
- Diagnóstico bacteriológico.
- Diagnóstico serológico.

Diagnóstico bacteriológico

Para el diagnóstico bacteriológico se debe considerar la toma muestra del enfermo.

Toma de muestra en el hombre

El aislamiento de *Brucella* en el hombre se logra a partir de sangre circulante, cuando el paciente se encuentra en estado de bacteriemia. También se sugiere el cultivo de médula ósea, nódulos linfáticos que hayan presentado inflamación, líquido sinovial o biopsias de hígado, cuando existe sospecha de casos crónicos o cuando no se ha logrado aislar de la sangre.

Los cultivos sólo deben realizarse en laboratorios diseñados con un nivel de bioseguridad tipo II**,** por la característica infecciosa del microorganismo al pertenecer al grupo de riesgo 3.

La muestra debe ser de 5 mL a 10 mL de sangre o de 0,5 mL a 1 mL de aspirado de médula ósea y se puede usar medio bifásico Ruiz Castañeda. El procedimiento consiste en incubar la muestra a 37°C y bañar la fase sólida con la líquida dos veces por día hasta observar el desarrollo de los microorganismos en cualquiera de las dos fases. Es conveniente conservar las muestras hasta los 35 días en estufa antes de desecharlos como negativos.

Toma de muestras en animales

Para el aislamiento de *Brucella* a partir de un animal vivo, las muestras más favorables son las secreciones vagina les y la leche tomada en el momento del parto o poco después cuando el número de bacterias excretadas es máximo (10^{13}).

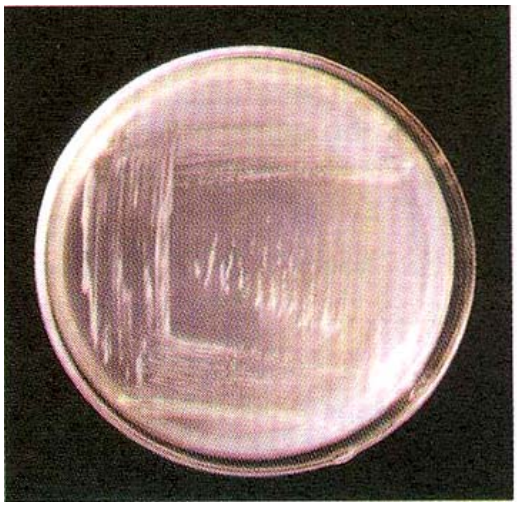
Las secreciones vaginales son tomadas con ayuda de escobillones estériles y sembradas directamente en la superficie del medio selectivo. Las muestras de leche, tomadas asépticamente, son centrifugadas a baja velocidad (3-4,000 rpm).

La nata sobrenadante y el precipitado son sembrados sobre el medio de aislamiento.

Diagnóstico bacteriológico - examen microscópico

Las *Brucellas sp.* pueden ser puestas de manifiesto sobre frotices, mediante coloraciones especiales. Este procedimiento es realizado en animales y es útil para examinar material de abortos. Los frotices de cotiledones placentarios, contenido del estómago fetal o exudado uterino son fijados mediante calor y coloreados por el método diferencial de Koster o de Ziehl-Nelseen modificado. Los microorganismos *Brucella* resisten la decoloración por ácidos débiles.

La bacterioscopía es una técnica rápida aunque no es específica y no tiene más que valor presuntivo. Está sujeta a errores por exceso y por defecto y su resultado, sea positivo o negativo, debe ser siempre confirmado por cultivo. El aislamiento
de la bacteria constituye la prueba indiscutible de una infección por *Brucella* y la tipificación de la cepa en cuestión ofrece la posibilidad de un análisis epidemiológico.



Aislamiento de *Brucella melitensis*

Diagnóstico serológico

Si bien el aislamiento representa la prueba de infección por *Brucella,* existen métodos de diagnóstico serológico que proporcionan información acertada y permiten una acción oportuna para el tratamiento y control de la enfermedad en casos de brotes epidémicos.

El diagnóstico serológico permite realizar una evaluación de la respuesta inmune del paciente frente a la enfermedad en forma rápida y sencilla. Las ventajas de su uso se resumen en los siguientes aspectos:

- Son las más usadas en el diagnóstico de la brucelosis humana y animal.
- Detectan la presencia de anticuerpos IgM, IgG_1, IgG_2 e IgA.
- Frente a una infección los anticuerpos IgM son los primeros en aparecer, seguidos de los anticuerpos IgG.
- Tener presente que los anticuerpos IgM aglutinan más intensamente que los IgG, al ser moléculas más voluminosas y poseer mayor número de sitios de reacción.
- Los anticuerpos IgM son termolábiles, mientras que los IgG son termoestables.
- Las inmunoglobulinas IgM pierden la actividad aglutinante con agentes reductores como el 2-Mercaptoetanol, mientras que las IgG no la pierden y pueden ser detectadas mediante el uso de este reactivo. El título de un suero es la más alta dilución que causa un determinado gradode aglutinación.

Para el diagnóstico serológico de la brucelosis se utilizan las siguientes pruebas diagnósticas:

- Prueba en placa.
- Prueba en placa tamponado.
- Prueba en tubo.
- Prueba rosa de bengala.
- Prueba anillo en leche.

Además de estas, existen pruebas complementarias, como la prueba 2-mercaptoetanol que, conjuntamente con la prueba en tubo, proporcionan un diagnóstico certero de infección por *Brucella* y permite realizar el seguimiento del paciente.

Las pruebas complementarias permiten resolver diferentes problemas, tales como:

- Diagnosticar correctamente el mayor número de casos, especialmente crónicos, que muchas veces permanecen ocultos o de diagnóstico incierto.
- Evitar o disminuir las reacciones inespecíficas.
- Evidenciar la presencia de anticuerpos incompletos.
- Efectuar la vigilancia epidemiológica eficaz y de mayor cobertura.

Diagnóstico clínico en el hombre

Objetivo

Diagnosticar en forma rápida y segura. El diagnóstico se basa en el cuadro clínico de la enfermedad y en la respuesta inmune del paciente.

Manifestaciones clínicas

- Fiebre, pérdida de peso, escalofríos, sudoración, cefalea, anorexia, fatiga, astenia, mialgias y artralgias, entre los síntomas más comunes.
- Los síntomas se presentan generalmente de 1 a 3 semanas posteriores a la infección, en algunos casos aparece más tarde.
- Complicaciones: osteoarticulares (30% -40% de los casos), artritis, sacroileítis, bursitis, espondilitis, hepáticas (mayormente en infecciones por *Brucella melitensisJ.)*
- Complicaciones neurológicas en <2% de los casos, siendo las meningitis aguda o crónica los síndromes más comunes.

Respuesta inmunológica

La infección por *Brucella* conduce a una respuesta humoral con la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas.
Presencia y evolución de las inmunoglobulinas:

- 1^{ra} - 2^{da} semana posinfección: Presencia de IgM.
- 2^{da} - 3^{ra} semana posinfección: Presencia de IgG.

Caracterización inmunológica del paciente

- Pacientes agudos: Presencia de IgG (detección mediante prueba rosa de bengala). Los anticuerpos IgM aglutinan intensamente y llegan a títulos de 1/400, mediante la prueba en placa o en tubo.
- Pacientes crónicos: Persistencia de IgG (detección por 2-mercaptoetanol, fijación de complemento o rosa de bengala).

Transmisión del germen al hombre

- No se transmite de un individuo a otro.
- Transmisores más comunes: cabras, ovejas, vacas y cerdos.
  Fuentes de infección: productos de aborto, placenta, fetos, sangre, orina, semen, descargas vaginales, leche, subproductos de la leche, legumbres yagua contaminada.
- Susceptibilidad: el hombre y todos los animales domésticos son susceptibles.

Diagnóstico en animales

Objetivo

Identificar al animal infectado propagador de la enfermedad. El diagnóstico se basa en la respuesta inmunológica y el aborto infeccioso.

Manifestaciones clínicas

El género *Brucella* tiene predilección por la placenta, glandula mamaria, órganos sexuales, articulaciones y bolsas sinoviales.

El síntoma principal es el aborto el cual ocurre en el último tercio de la gestación. Durante el parto aparentemente normal o aborto de un animal infectado, se liberan gran cantidad de microorganismos (013) que contaminan los pastos, el agua y el medio ambiente.

Respuesta inmunológica

Presencia y evolución de las inmunoglobulinas:

- 1^{ra} - 2da semana posinfección: Presencia de IgM
- 2da_ 3ra semana posinfección: Presencia de IgG.

Caracterización inmunológica de la enfermedad en los animales:

- Agudos: Presencia de IgG (detección mediante prueba rosa de bengala). Los anticuerpos IgM aglutinan intensamente y llegan a títulos de 1/400, mediante la prueba en placa o en tubo.
- Crónicos: Persistencia de IgG (detección por 2-mercaptoetanol, fijación de complemento o rosa de bengala).

Transmisión del germen en animales

Se transmite de un individuo a otro (animal - animal; animal - hombre).

- Material abortado infectado por *Brucella* contiene 1013 células *Brucellalg.* · Las secreciones infectadas e ingesta de alimentos contaminados representan una importante fuente de transmisión.
- Los animales se infectan naturalmente por vía conjuntival, digestiva, respiratoria, genital y por contacto.
- Las mucosas por ser 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 tercera semana, pero cuando hay mastitis intersticialla liberación de *Brucella* es permanente. Por heces y orina también se elimina *Brucella,* pero en menor número.

Capítulo III



Pruebas para el diagnóstico de la brucelosis

Prueba en placa

Prueba *in vitro,* rápida y sencilla
- Detecta anticuerpos IgM e IgG2 al igual que la prueba lenta en tubo.
- Proporciona el título de la reacción de aglutinación.
- Permite su aplicación en gran escala en las campañas de control y erradicación.

Prueba rosa de bengala (Card test o de la tarjeta)

Prueba *in vitro,* rápida y sencilla.
- Representa la prueba "screening" o tamizaje.
- Es una prueba de alta sensibilidad y especificidad debido a su pH ácido.
- Procedimiento cualitativo rápido de aglutinación macroscópica que se efectúa con una sola dilución y que detecta principalmente anticuerpos IgG_1.
- El colorante rosa bengala no ejerce ninguna acción en la actividad serológica y se puede reemplazar por otros colorantes de acridina. Su función es facilitar la observación de la reacción.

Prueba en tubo

- Prueba *in vitro* realizada en tubos.
- Es llamada también prueba lenta en tubos al necesitar 48 horas para la lectura de las reacciones de aglutinación.
- Método para corroborar los resultados de otras pruebas serológicas
- Detección de anticuerpo IgM e IgG_2.

Prueba 2 – mercaptoetanol

- Prueba selectiva que detecta solamente la presencia de IgG_2.
- Se basa en que los anticuerpos IgM se degradan debido a la acción de ciertos compuestos que contienen el radical tiol, tales como el 2-mercaptoetanol. Las moléculas de IgG_2, en cambio, no sufren un efecto que altere su actividad para las reacciones aglutinantes.
- En el hombre esta prueba se debe incorporar en el diagnóstico de rutina.
- En los animales infectados los anticuerpos IgG persisten durante más tiempo y alcanzan título más altos que las IgM.
- La prueba 2-mercaptoetanol es útil para detectar infectados crónicos humanos o animales.

Prueba de anillo en leche

- Llamada también «ring test».
- Se usa como diagnóstico presuntivo en áreas de control.
- Detecta anticuerpos aglutinantes presentes en la leche: IgM e IgA
- La sensibilidad depende del antígeno, de la relación cuantitativa antígeno/leche y del tenor de glutinas en leche.
- En la leche de cabra la unión antígeno-anticuerpo no forma un anillo por el peso y tamaño de los glóbulos grasoso

Capítulo IV

ANTÍGENOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS

ANTÍGENOS DE *Brucella*

Prueba en placa



Descripción
El antígeno es una suspensión de células de *Brucella abortus* cultivadas en fermentación, inactivadas por calor y teñidas de color azul.

Composición
El antígeno contiene 10% - 12% de células *Brucella abortus* cepa 1119-3, solución salina fenolada al 0,5% y colorantes verde brillante y cristal violeta

Indicaciones
Reactivo para el diagnóstico *in vitro* de la brucelosis humana y animal. Detecta la presencia de anticuerpos IgM e IgG_2 en el suero, mediante la técnica de aglutinación en lámina.

Conservación
Durante el almacenamiento y transporte el antígeno debe mantenerse entre 2ºC y 8ºC.

Precauciones y recomendaciones

- Agitar el frasco antes de usar.
- No exponer el antígeno al sol.
- No congelar.
- Usar material limpio para evitar la contaminación del antígeno

Procedimiento para la prueba en placa

Materiales
Aglutinoscopio, caja de lectura color negro de 45 cm de largo x 35 cm de ancho y 15 de profundidad, provista de una placa de vidrio marcada con 60 cuadrados de 3,5 cm2 en 5 filas de 12, que se sostiene cerca de la parte superior de la caja de manera que pueda quitarse y ponerse fácilmente, con luz empotrada que permite iluminar oblicuamente la mezcla de suero antígeno. La caja estará provista de una tapa de vidrio, superior de la caja de manera que pueda quitarse y ponerse fácilmente, con luz empotrada que permite iluminar oblicuamente la mezcla de suero antígeno. La caja estará provista de una tapa de vidrio.
Micropipetas o pipetas de Bang graduadas para verter 0,08 mL, 0,04 mL,0,02 mL, 0,01 mL y 0,005 mL**.**
Gotero calibrado para 0,03 mL por gota o micropipeta para 30 µL**.**
Mezcladores de alambre grueso doblado o montadientes.
Reloj.

Procedimiento
a. Los sueros y el antígeno deben estar a temperatura ambiente.
b. Con la pipeta Bang inclinada a *45*° en contacto con la placa, depositar 0,08 mL, 0,04 mL, 0,02 mL, 0,01 mL y 0,005 mL de la muestra de suero en una columna de la placa.
c. Agitar suavemente el antígeno y con el gotero en posición vertical, dejar caer una gota del antígeno sobre cada cuadrante con suero.
d. Mezclar cuidadosamente el suero y antígeno con mezcladores de alambre, en forma Circular, empezando por la dilución más alta (0,005 mL).
e. Levantar la placa y agitar con suave movimiento rotatorio.
f. Colocar la placa en el aglutinoscopio y marcar el reloj por 8 minutos.
g. Después de 4 minutos, rotar la placa en forma circular.

h. Al cabo de 8 minutos, realizar inmediatamente la lectura.

Lectura

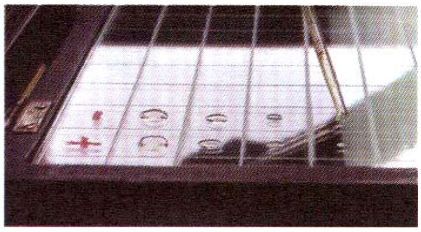
Aglutinación completa:	Formación .de grumos finos y grandes mayor al 50%.
Aglutinación incompleta:	Trazos de células aglutinadas. Aglutinación menor del 50%.
Reacción negativa:	Ausencia de aglutinación.

Interpretación de los resultados

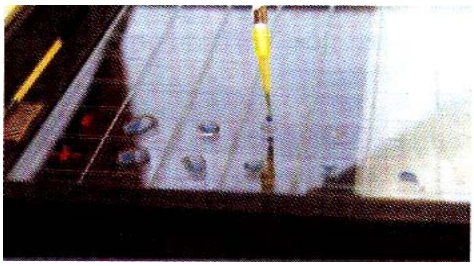
En sueros humanos se considera como título positivo una dilución 1/200. Un título de 1/100 es considerado sólo como presuntivo.

En sueros de animales vacunados se considera como positivo una dilución de 1/200. Un título de 1/100 es. considerado como sospechoso. En animales no vacunados un título en la dilución 1/100 es considerado positivo.

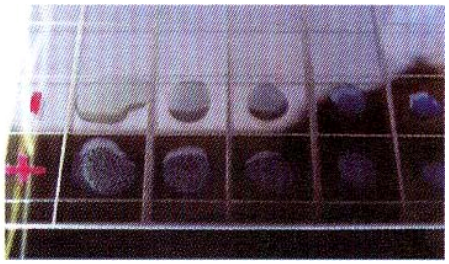
Gráfico del procedimiento de la prueba en placa



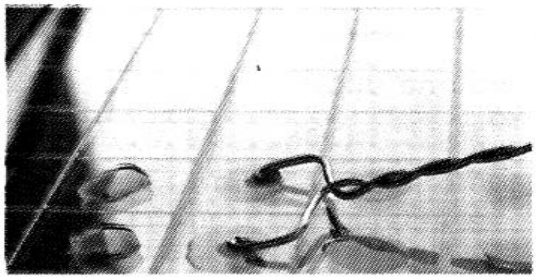
1 Colocar el suero en cada cuadrante de la placa



2 Agregar 30 µL del antígeno por suero.



3 Girar la placa y proceder a la lectura al cabo de 8 minutos



4 Mezclar suero - antígeno

Nota: Para la interpretación de la prueba en placa en el hombre, se considera título positivo 1/200

Prueba lenta en tubo

Descripción



El antígeno es una suspensión de células de *Brucella abortus* cultivadas en fermentación, inactivadas por calor.

Composición

El antígeno contiene 4,5% de células *Brucella abortus* cepa 1119-3 en solución salina fenolada al 0,5%.

Indicaciones

Reactivo para el diagnóstico *In vitro* de la brucelosis humana y animal. Detecta la presencia de anticuerpos IgM e IgG_2 en el suero, mediante la técnica de aglutinación lenta en tubo.

Conservación

Durante el almacenamiento y transporte el antígeno debe mantenerse entre 2° C y 8° C.

Precauciones y recomendaciones

Agitar el frasco antes de usar.
No exponer el antígeno al sol.
No congelar.
Usar material limpio para evitar la contaminación del antígeno.

Presentación

Frasco de 5 mL por 50 dosis.

Procedimiento para la prueba en tubo

Materiales

a. Tubos de 13 x 100 de vidrio claro y completamente limpios.
b. Gradilla para sostener los tubos.
c. Micropipeta o pipetas Sang, graduadas para verter 0,08mL, 0,04mL, 0,02mL,O,OlmL y 0,005 mL.d. Pipetas de 10 mL o dispensador automático.
d. Estufa a 37°C.
e. Material de vidrio (probetas, balones) para la dilución del antígeno.

Procedimiento

Diluir el antígeno al 1%. Ejemplo: 1 mL del antígeno + 99 mL de solución salina al 0,85%.

Diluir el fenol al 0,5% en solución salina al 0,85%. Ejemplo: 0,5 mL de fenol+ 99,5 mL de solución salina al 0,85% c Colocar en la gradilla una hileras de cinco tubos de 13 x 100 mm. d Con una pipeta Bang colocar 0,08 mL 0,04 mL, 0,02 mL 0,01 mL y 0,005 mL de suero en el fondo de cada tubo.

Agregar 2 mL de solución salina fenolada a cada tubo.
Agitar la gradilla para homogeneizar las muestras.
Incubar a 37°C por 48 horas.

Lectura

La lectura se realiza sobre un fondo negro con una luz que atraviesa los tubos. Las Determinaciones se basan en la claridad o turbidez de la mezcla y en la firmeza de los grumos al agitar suavemente los tubos.

Aglutinación Completa: El líquido de la mezcla suero - antígeno, aparece claro con una sedimentación de grumos al fondo del tubo, que al agitarlo suavemente se suspenden en el líquido.

Aglutinación Incompleta: La mezcla suero - antígeno se presenta parcialmente clara, que al agitar suavemente el tubo aparece una leve suspensión de grumos.

Aglutinación Negativa: La mezcla suero - antígeno aparece turbia, a una suave agitación no aparecen grumos.

Interpretación de los resultados

En sueros humanos se considera como título positivo una dilución 1/200. Un título de 1/100 es considerado sólo como presuntivo.

En sueros de animales vacunados se considera como positivo una dilución de 1/200. Un título de 1/100 es considerado como sospechoso. En animales no vacunados un título en la dilución 1/100 es considerado positivo.

Prueba rosa de bengala

Descripción



Prueba tamiz o de «screening» llamada también de la tarjeta o «card test». Es una suspensión de células de *Brucella abortus* cultivadas en fermentación, inactivadas por calor y teñidas de color rosa púrpura.

Composición

El antígeno rosa de bengala contiene 8% de células de *Brucella abortus* 1119-3, solución salina fenolada al 0,5% y colorante rosa de bengala.

Indicaciones

Reactivo para el diagnóstico serológico *in vitro* de la brucelosis humana y animal que se basa en la inactivación de la IgM a un pH bajo (3,65). Prueba cualitativa que detecta exclusivamente IgG [1].

Conservación

Durante el almacenamiento y transporte el antígeno debe mantenerse entre 2°C y 8°C.

Precauciones y recomendaciones

- Agitar el frasco antes de usar.
- No exponer el antígeno al sol.
- No congelar.
- Usar material limpio para evitar la contaminación del antígeno.

Presentación

Frasco de 5 mL por 160 dosis.

Procedimiento para la prueba rosa de bengala

Materiales

a. Aglutinoscopio, caja de lectura de color negro de 45 cm. de largo x 35 cm. De ancho y 15 cm. de profundidad, provisto de una placa de vidrio marcada con 60 cuadrados de 3,5 cm2 en cinco filas de 12, que se sostiene cerca de la parte superior de la caja de manera que pueda quitarse y ponerse fácilmente, con luz empotrada que permita eliminar oblicua mente la mezcla de suero antígeno. La caja estará provista de una tapa de vidrio.
b. Pipetas de 0,2 mL graduadas al milésimo o una micropipeta.
c. Gotero calibrado para 0,03 mL por gota o una micropipeta para 30 I1L con tips.
d. Mezcladores de alambre grueso o mondadientes.
e. Reloj.

Procedimiento

a. Los sueros y el antígeno deben estar a temperatura ambiente.
b. Colocar 0,03 mL de suero problema sobre uno de los cuadrados de la lámina de vidrio. .
c. Colocar una gota (0,03 mL ó 30 11l) de antígeno rosa de bengala.
d. Mezclar el suero con el antígeno utilizando mezcladores distintos para cada muestra.
e. Girar la lámina durante 4 minutos a razón de 10 a 12 rpm.

f. El resultado de la prueba se lee a los 4 minutos.

Lectura

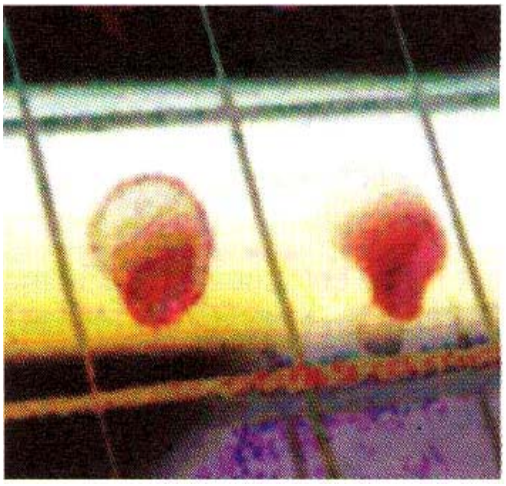
El resultado de la lectura de diagnóstico se informa como positivo o negativo.

Las reacciones positivas presentan grumos de aglutinaciones que puede ser grandes o pequeños y las negativas tienen ausencia de éstos.

Interpretación

En animales especialmente que nunca fueron vacunados, la reacción positiva es un indicador de infección muy probable.

Se recomienda la prueba de 2-mercaptoetanol como prueba confirmatoria (cuyo título positivo es considerado 1/25) o la prueba de fijación de complemento.



Reacción positiva y negativa de la prueba rosa de bengala.

Prueba anillo en leche

Descripción

Antígeno de células de *Brucella abortus* cultivadas en fermentación e inactivadas por calor. Se presenta como una suspensión de color púrpura azul oscuro.



Composición

El antígeno contiene 4,0% de células *Brucella abortus* cepa 1119-3, solución salina fenolada al 0,5% y colorante hematoxilina.

Indicaciones

Reactivo para el diagnóstico *in vitro* de la brucelosis en hatos bovinos. Detectan anticuerpos IgM e IgA presentes en la leche. Si hay presencia de anticuerpos. estos reaccionan con el antígeno coloreado formando un complejo que se adhiere a la superficie de los glóbulos de grasa de la leche y que ascienden formando un anillo de color púrpura azulado. En ausencia de anticuerpos, la leche adoptará el color del antígeno y el anillo adoptará un color blanco natural.

Conservación

- Durante el almacenamiento y transporte, el antígeno debe mantenerse entre 2°C y 8º*C.*

Precauciones y recomendaciones

- Agitar el frasco antes de usar.
- No exponer el antígeno al sol.
- No congelar.
- Usar material limpio para evitar la contaminación del antígeno.

Presentación

Frasco de 5 m L para 160 dosis.

Procedimiento de la prueba anillo en leche

Materiales

a. Tubos de 12 x 75 mm de vidrio claro y completamente limpios.
b. Gradillas de lambre para sostener los tubos.
c. Pipeta de 2 mL y 10 mL o dispensador automático.
d. Gotero calibrado para 0,03 mL por gota o micropipeta de 30 µL.
e. Puntas para micropipetas (tips)
f. Estufa a 37°C.

Toma de muestras

Materiales

a. Tubos de 12 x 75 mm de vidrio claro y completamente limpios.
b. Gradillas de alambre para sostener los tubos.
c. Pipeta de 2 mL y 10 mL o dispensador automático.
d. Gotero calibrado para 0,03 mL por gota o micropipeta de 30 IJL.
e. Puntas para micropipetas (tips)
f. Estufa a 37°C.

Toma de muestras

INDIVIDUAL : Tomar 10 mL de leche de la vaca problema.
REBAÑOS : Tomar 50 mL de cada pool de 10 vacas, identificándolas.

Es conveniente refrigerar previamente las muestras de leche por una noche antes de procesarlas.

Procedimiento

Técnica de la prueba para muestras individuales:

a. Llevar a temperatura ambiente las muestras y el antígeno.
b. Homogeneizar la muestra de leche problema.
c. Colocar 1 mL de la muestra de leche en un tubo.
d. Agregar una gota (0,03 mU del antígeno a cada tubo, mezclar bien. No debe quedar antígeno en las paredes del tubo.
e. Incubar a 37°C por una hora.

Técnica de la prueba con diluciones:

Esta prueba se utiliza para el diagnóstico cuantitativo en la leche del animal sospechoso para saber el título infectante.

a. En una fila de 10 tubos, colocar 2 mL de leche problema en el primer tubo y 1mL de leche negativa en los siguientes 9 tubos, para realizar diluciones dobles.
b. Transvasar 1 mL de leche del primer tubo al segundo y homogeneizar.
c. Posteriormente trasvasar 1 mL del segundo al tercero, homogeneizar y continuar así hasta el último tubo del que se descarta 1 mL.
d. Agregar una gota (0,03 mU del antígeno a cada tubo y mezclar. d. Incubar a 37° C por 1 hora y leer.

Técnica de la prueba para un rebaño:

Las muestras refrigeradas de cada pool de la vacas se llevan a temperatura ambiente al igual que el antígeno.

a. Homogeneizar la muestra de cada pool de leche.
b. Colocar 2 mL del pool en un tubo.
c. Agregar una gota (0,03 ml) del antígeno a cada tubo y mezclar. No debe quedar antígeno en las paredes del tubo.
d. Incubar a 37°C por una hora.

Lectura

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

Dificultades en la interpretación de la prueba

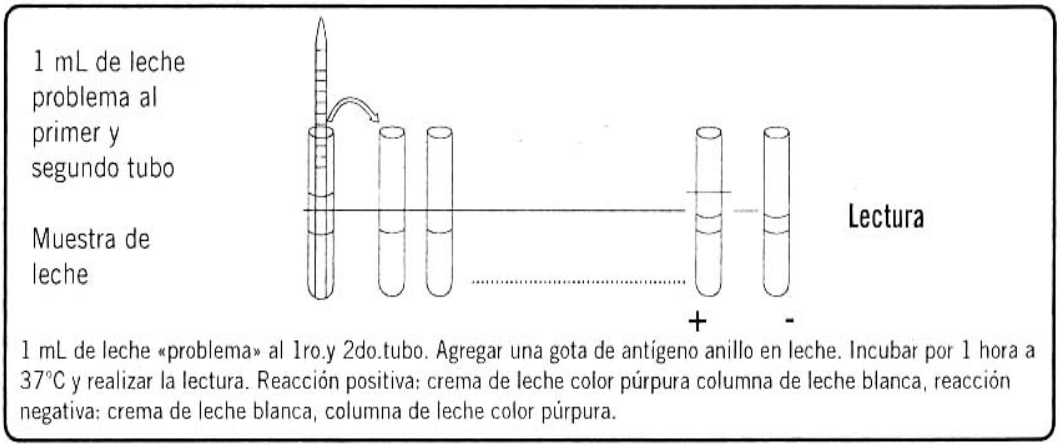
- Escasez o exceso de crema.
- Leche pasteurizada.ç
- Leche de vacas con mastitis pueden dar falsos positivos.
- No toda vaca infectada elimina anticuerpos por la leche por lo que se recomienda la prueba serológica anual al rebaño.

Interpretación

Para muestras individuales la formación del anillo fuertemente teñido por el antígeno es indicativo de infección. Si a esta muestra se le realiza la prueba con diluciones, un título en la dilución 1: 16 o superior se correlaciona generalmente con infección por *Brucella.* Se sugiere que cuando exista un título de infección en la prueba de anillo, el hato pase por una prueba serológica.

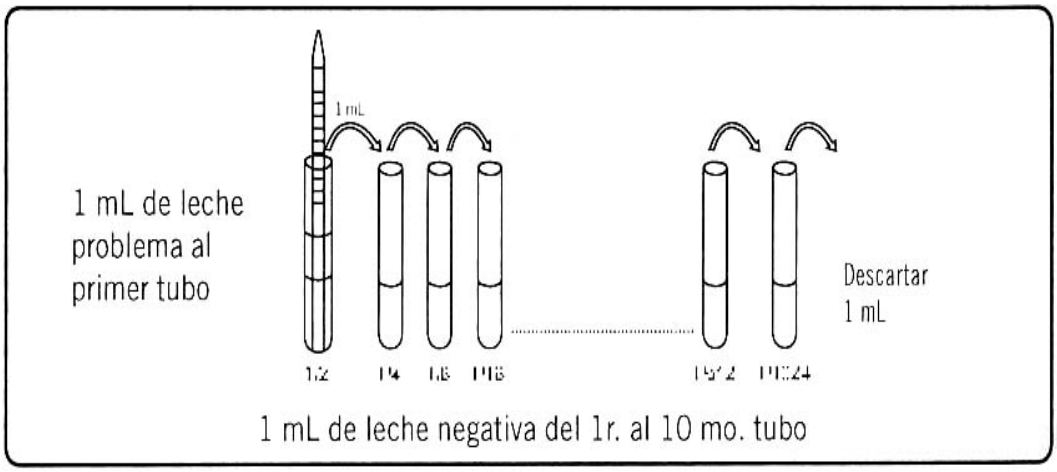
Procedimiento de la prueba anillo en leche

Prueba para muestras individuales

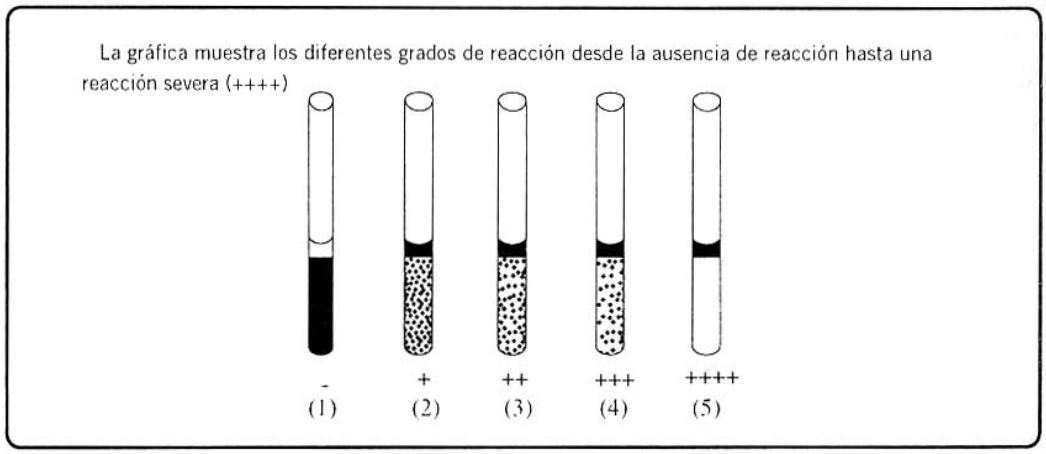


1 mL de leche «problema» al 1ro.y 2do.tubo. Agregar una gota de antígeno anillo en leche. Incubar por 1 hora a 37°C y realizar la lectura. Reacción positiva: crema de leche color púrpura columna de leche blanca, reacción negativa: crema de leche blanca, columna de leche color púrpura.

Prueba con diluciones



Interpretación de los resultados



Kit de diagnóstico de brucelosis prueba Tamiz



Detecta en forma rápida y simultánea inmunoglobulinas de la clase IgM, IgG_2 e IgG_1. que permiten diferenciar una infección por *Brucella* de una reacción inespecífica.

El kit contiene:
- Antígeno prueba en placa.
- Antígeno rosa de bengala.

Descripción
Los antígenos son suspensiones de células de *Brucella* cultivadas en fermentación e inactivadas por calor, teñidas de color azul (antígeno en placa) o rosa púrpura (antígeno rosa de bengala).

Composición
- **Antígeno prueba en placa**, contiene 10% -12% de células *Brucella abortus* cepa 1119-3, solución salina fenolada al 0,5% y colorantes verde brillante y cristal violeta.
- **Antígeno rosa de bengala**, contiene 8% de *Brucella abortus* cepa 1119-3, solución salina fenolada al 0,5% y colorante rosa de bengala.

Indicaciones
El kit contiene dos pruebas que, al realizarse en forma simultánea, detectan inmunoglobulinas de la clase IgM, IgG_2 e IgG_1 permitiendo tener un mejor conocimiento de la actividad inmune del paciente.
- **Prueba en placa**, detecta anticuerpos de tipo IgM e IgG_2, mediante la titulación del suero.

- **Prueba rosa de bengala,** prueba rápida que detecta específicamente anticuerpos de tipo IgG_1, descartándose reacciones cruzadas.

Conservación
Durante el almacenamiento y transporte el kit debe mantenerse entre 2°C y *BOC.*

Procedimiento de la prueba
La prueba en placa y rosa de bengala deben realizarse en forma simultánea, teniendo en cuenta el procedimiento de cada prueba descritas anteriormente.

Interpretación del kit

TÍTULO + PLACA	REACCIÓN ROSA BENGALA	INTERPRETACIÓN
1/25	-	Negativo
1/50	-	Negativo
1/100	-	Presuntivo(*)
1/25	+	Positivo
1/50	+	Positivo
1/100	+	Positivo

(*) Se recomienda repetir la prueba y realizar el seguimiento del paciente.

En la interpretación de los resultados, la reacción positiva en la prueba rosa de bengala es indicativo de infección por *Brucella.* La prueba en placa determina el grado de infección del paciente. Considerar qué títulos en las diluciones 1/25 y 1/50 se deben a reacciones cruzadas.

Precauciones y recomendaciones

- Agitar los antígenos antes de usar.
- No exponer al sol.
- No congelar.

Presentación

- Antígeno en placa: 4 frascos de 5 mL para 160 pruebas.
- Antígeno rosa de bengala: 1 frasco de 5 mL para 160 pruebas.

Kit de diagnóstico de brucelosis prueba complementaria



El kit contiene:
- Antígeno en tubo.
- Reactivo 2-mercaptoetanol.
- Suero control positivo.
- Suero control negativo.

Descripción
- **Antígeno en tubo,** suspensión de células de *Brucella abortus* cultivadas en fermentación e inactivadas por calor. Se presenta como una suspensión blanquecina.
- **Reactivo 2-mercaptoetanol,** reactivo a base de compuesto que contienen el radical tiol cuya acción es degradar los anticuerpos IgM, detectando únicamente anticuerpos de tipo IgG_2.

Composición

- **Antígeno en tubo,** contiene 4,5% de células *Brucella abortus* cepa 1119-3 y solución salina fenolada al 0,5%.
- **Reactivo 2-ME,** compuesto que contiene el radical tiol.

Indicaciones

El kit contiene dos pruebas, que al realizarse en forma simultánea, detectan diferentes inmunoglobulinas, teniendo un mejor conocimiento de la respuesta inmune del paciente.

- **Prueba en tubo**, antígeno para el diagnóstico *in vitro* de la brucelosis humana y animal. Detecta anticuerpos IgM e IgG_2 mediante la técnica de aglutinación seriada en tubo.
- **Prueba 2-mercaptoetanol,** prueba selectiva que detecta la presencia de anticuerpos IgG_2. Se basa en la degradación de los anticuerpos IgM debido a la acción de compuestos que contienen el radical tiol, como el 2-mercaptoetanol. Es útil para detectar infectados

crónicos en los que la prueba de aglutinación estándar puede presentar títulos bajos, dado que el suero contendrá exclusivamente anticuerpos IgG.

Conservación

Durante el almacenamiento y transporte el kit debe mantenerse entre 2°C y 8°C.

Precauciones y recomendaciones

- Agitar el antígeno antes de usar.
- Reconstituir los sueros con 2,5 mL de agua destilada estéril.
- No exponer al sol.
- No congelar.

Presentación del kit

- Antígeno en tubo, frasco de 1 mL para 25 pruebas (prueba en tubo y 2 - M E).
- Reactivo 2 -ME: frasco de 1 mL para 25 pruebas (prueba en tubo y 2 - ME).
- Suero control positivo liofilizado: frasco de 2,5 mL.
- Suero control negativo liofilizado: frasco de 2,5 mL.

Procedimientos de la prueba complementaria

Materiales

a. Tubos de 13 x 100 mm de vidrio claro y completamente limpios.
b. Gradilla de alambre para sostener los tubos.
c. Micropipeta o pipetas Sang, graduadas para verter 0,08 mL, 0,04 mL, 0,02 mL, 0,01 mL y 0,005 mL.
d. Pipetas de 10 mL o dispensador automático.
e. Estufa a 37°C.
f. Material de vidrio (probetas, balones) para la dilución del antígeno

Procedimiento

a. Diluir el antígeno al 2%. Ejemplo: 2 mL del antígeno + 98 mL de solución salina al 0,85%.
b. Diluir el 2-mercaptoetanol 0,1 molar (Mol= 78,13). Ejemplo: 0,78 mL 2-mercaptoetanol + 99, 22 mL de solución salina al 0,85%.
c. Diluir el fenol al1 % en soluciÓn salina al 0,85%. Ejemplo: 1 mL de fenol + 99 mL de solución salina al 0,85%.
d. Colocar por cada muestra dos hileras de cinco tubos de 13 x 100 (marcadas como T y M). Una hilera se destina para la prueba en tubo y la otra para prueba 2-mercaptoetanol.
e. Con una pipeta Bang colocar 0,08 mL, 0,04 mL, 0,02 mL 0,01 mL y 0,005mL de suero en el fondo de cada tubo.
f. Agregar 1 mL de solución salina fenolada a la hilera T.
g. Agregar 1 mL de solución de 2-mercaptoetanol a la hilera M.
h. Esperar 30 minutos.
i. Agregar 1 mL de la solución del antígeno a todos los tubos (hilera T y M). j. Agitar la gradilla para homogeneizar las muestras.
j. Incubar a 37°C por 48 horas

Lectura del kit

La lectura se realiza sobre un fondo negro con una luz que atraviesa los tubos. Las determinaciones se basan en la claridad o turbidez de la mezcla y en la presencia de grumos al agitar suavemente los tubos.

Aglutinación completa: el líquido de la mezcla suero - antígeno aparece claro, con una sedimentación de grumos al fondo del tubo que al agitarlo suavemente se su penden en el líquido.

Aglutinación negativa: el líquido de la mezcla suero-antígeno aparece turbia y a una suave

agitación no aparecen grumos.

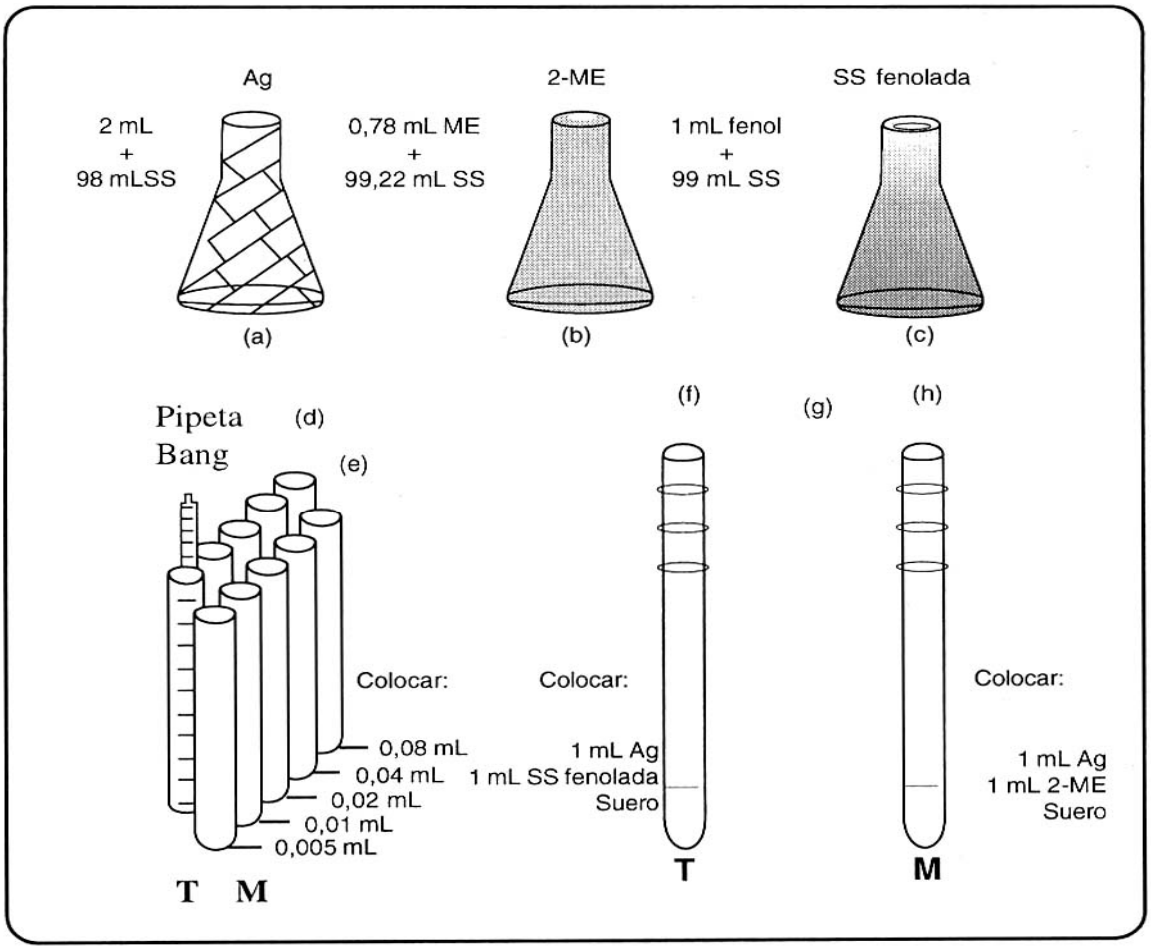
Interpretación del kit

TUBO (Títulos)	2 - ME (Títulos)	INTERPRETACIÓN
1/25	-	Negativo
1/50	-	Negativo
1/100	-	Presuntivo (*)
1/100	1/25	Positivo

(*) Se recomienda repetir la prueba y realizar el seguimiento del paciente.

En la interpretación de los resultados, la reacción positiva en la prueba 2-mercaptoetanol es indicativo de infección por *Brucella.* La prueba en tubo determina el grado de infección del paciente. Considerar, en la prueba en tubo, qué títulos en las diluciones 1/25 y 1/50 se deben a reacciones cruzadas.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA EN TUBO 2-MERCAPTOETANOL



2-ME: 2-mercaptoetanol.
SS: Solución salina.

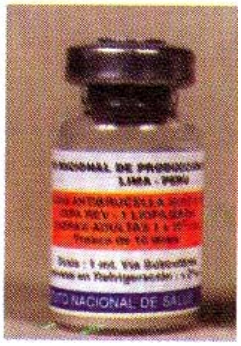
Nota: Se debe preparar primero las soluciones (Figuras a, b y c) y alistar la batería de tubos (d, e) para la realización de la prueba. Los sueros serán depositados de acuerdo a la figura (d, e) seguido de 1 mL de solución salina fenolada (SSF) para la fila de tubos T o de 1 mL de 2-ME para la fila de tubos M. Finalmente agrega 1 mL del antígeno al 2%, (figura a), a toda la batería de tubos de las filas T y M. Se realiza la lectura al cabo de 48 horas en estufa a 37°C.

Capítulo V

VACUNAS PARA LA PREVENCIÓN DE LA BRUCELOSIS ANIMAL

VACUNA *Brucella melitensis* CEPA REV -1





Descripción
La vacuna es una suspensión de gérmenes no disociados de *Brucella melitensis* cepa Rev -1 producida en fermentación. Se presenta en forma liofilizada como una pastilla blanquecina acompañada de un frasco diluyente estéril.

Composición
- Cabras jóvenes: La vacuna contiene 1-2 x 10_9 gérmenes / mL.
- Cabras adultas: La vacuna contiene 1 x 10^5 gérmenes / mL.
- Soporte de liofilización.

Indicaciones
Para inmunización de caprinos: cabras jóvenes se vacunan entre los 3 y 6 meses, en tanto que cabras adultas se vacunan a los 6 meses de edad. No se vacunan machos.

Dosis

Para cabras jóvenes y adultas: 1 mL vía subcutánea.

Precauciones y recomendaciones

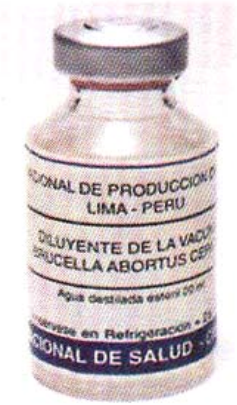
- Mantener durante el almacenamiento y transporte entre 2°C a *8*°C.
- Tener cuidado en la reconstitución de la vacuna, extraer el diluyente e introducirlo al liófilo y agitar suavemente hasta lograr una suspensión homogénea.

Presentación
Vacuna liofilizada y diluyente x 10mL x 10 dosis.

VACUNA *Brucella abortus* CEPA 19



Vacuna *Brucella abortus*
cepa 19 liofilizada.
Frasco x 4 dosis



Diluyente de la vacuna
Frasco x 10 mL

Descripción
La vacuna es una suspensión de gérmenes no disociados de *Brucel/a abortus* cepa 19 producida en fermentación. Se presenta en forma liofilizada como una pastilla blanquecina acompañada de un frasco diluyente estéril.

Composición
La vacuna contiene 10 - 12 X 109 gérmenes / mL en un medio de soporte de liofilización, Cada dosis de 5 mL contiene 60 mil millones de gérmenes.

Indicaciones
Para la inmunización de terneras de 3 a 6 meses de edad. No se vacunan machos y no requieren revacunación.

Dosis
5 m L vía subcutánea.

Precauciones y recomendaciones
- Mantener durante el almacenamiento y transporte entre 2°C a *8*°C.
- Tener cuidado en la reconstitución de la vacuna, extraer el diluyente e introducirlo al liófilo y agitar suavemente hasta lograr una suspensión homogénea.

Presentación
Vacuna liofilizada y diluyente por 4 dosis.

Capítulo VI

ESPECIFICACIONES DE LOS PRODUCTOS

Rangos de normalización de antígenos recomendados por la Organización Mundial de Salud

Antígeno	pH	Volumen celular
PLACA	6,4 -7,0	10-12%
TUBO	6,4 -7,0	4,5%
ROSA DE BENGALA	3,65 ±0,5	8,0%
ANILLO EN LECHE	4,0 - 4,3	4,0%

Rangos de normalización de vacunas recomendados por la Organización Mundial de Salud

Vacunas	Células /mL	Dosis / gérmenes
Brucella abortus cepa 19	10-12 x 10^9	60,000 millones
Brucella melitensis cepa rev 1 cabras jóvenes	1-2 x 10^9	1,000 millones
Brucella melitensis cepa Rev 1 cabras adultas (dosis reducida)	1 x 10^5	100 mil

Capítulo VII

BIOSEGURIDAD

Bioseguridad

Definición

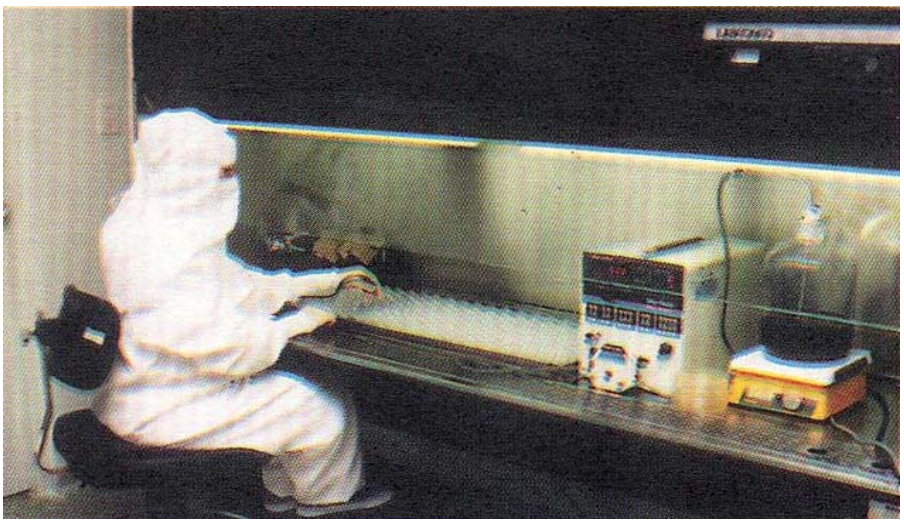
Conjunto de normas tendientes a minimizar los accidentes de trabajo.

Bioseguridad en el laboratorio

Proteger al laboratorista de agentes potencialmente patógenos (el género *Brucella* pertenece al grupo de riesgo III, produce seria infección en el hombre pero no se transmite de un individuo a otro).

Principales vías de infección - protección:

- Ingestión, importancia del uso de propipeta. La *Brucella* penetra a través de las mucosas del tracto intestinal o estomacal (si el jugo gástrico no es muy ácido).
- Contacto, importancia del uso de guantes. Los microorganismos penetran a través de heridas o abrasiones de la piel y por vía conjuntival.
- Inhalación, importancia del uso de mascarilla. Los aerosol es se producen en la mayoría de actividades del laboratorio.



Bioseguridad en el campo

- Evitar el consumo de queso fresco en áreas endémicas.
- Usar vestimenta protectora: veterinarios y técnicos.
- Precaución en la manipulación de cadáveres de animales.
- Ubres y útero constituyen el mayor riesgo. No deben ser abiertos ni derramar su contenido.
- Eliminar el material contaminado como abortos y desinfectar las superficies contaminadas.

Diseño del laboratorio

Diseño adecuado del laboratorio

- Aislamiento geográfico.
- Control de acceso.
- Separación física: áreas para reactivos inflamables.
- Evitar la recirculación de aire mediante extractores.
- Presión de aire (presión negativa).

Equipos y técnicas de seguridad eficientes

- Cabinas de seguridad: .Tipo II para el género *Brucella* (evitar turbulencias de aire).
- Filtros hepa, eficiencia 99% para partículas de 0,13 micrones de diámetro.
- Ropas protectoras: mandiles de manga larga, cuello y puños estrechos.
- Mascarillas descartables: reducen 2 logaritmos el número de microorganismos de aire inhalado: Tipo N95.
- Propipetas: evitan contaminación a mucosas.
- Guantes: evitan la penetración de microorganismos por heridas o abrasiones de la piel.
- Asas: no deben exceder los 5 cm de longitud para minimizar la vibración.

Buenas técnicas microbiológicas

- Remisión de muestras: recipiente irrompible, esterilizable, descartable y cubierto.
- Operaciones de rutina.
- Uso de desinfectantes.

Grupo de riesgo en relación con el tiempo de laboratorio

Grupo de riesgo	Lugar	Microorganismos
I Escaso riesgo individual y comunitario	Enseñanzas básicas	*Bacillus subtilis* *Escherichia coli*
II Riesgo individual y comunitario limitado	Servicios básicos de hospital de nivel primario. Laboratorio de diagnóstico y salud pública	*Salmonella typhi* Virus de la hepatitis
III Riesgo individual elevado y comunitario limitado	Laboratorio de diagnóstico especializado	*Brucella sp*
IV Elevado riesgo individual comunitario	Laboratorios que trabajan con agentes patógenos peligrosos	Virus de Marburg Fiebre aftosa, Ebola, Dengue, VIH

Desinfección de ambientes y superficies

- Luz ultravioleta: control semestral. Se recomienda 10 µw/cm en laboratorio y 20 µw/m2 en áreas contaminadas
- Hipoclorito de sodio: En general: 5g/L (5,000 ppm) - relación 1: 18 para material de autopsias. A campo abierto desinfectar con hipoclorito al 20% o con cal apagada. El material abortado puede contener hasta 1012 células de *Brucella/gr.*
- Formol: desinfectante: 50g/L (5%). Para desinfección de ambientes usar: 25 mL+15 g. Permanganato de potasio/m3.
- Alcohol: 70%
- Yodo: 0,075 gr/L (75 ppm)
- Fenol: Al 5%, bajo nivel de inactivación por sustancias orgánicas.

Descontaminación de material

- Autoclave: 121 De a 15 lbs. de presión x 15 min.

Remisión y conservación de muestras

Definiciones:

Sustancias infecciosas: Microorganismos viables: bacterias, virus, etc.
Muestras para diagnóstico: Materiales de origen humano o animal como excretas, secreciones, sangre etc.
Productos biológicos: Vacunas, componentes celulares, reactivos de diagnóstico.

Para la remisión de sustancias infecciosas y ml1estras de diagnóstico, tener en cuenta:

- Recipientes: Impermeables, con tapa.
- Transporte: Uso de recipientes secundarios.
- Recepción de muestras: Local de recepción.
- Apertura de muestras: En cámaras de seguridad.

Cadena de frío

Representa el modo adecuado de conservar un producto biológico sin que pierda sus características y propiedades antigénicas.

Recomendaciones:
- Mantener durante el almacenamiento y transporte entre 2°C y 8°C.
- Reconstituir la vacuna liofilizada en forma correcta. Extraer el diluyente e introducir al liófilo.
- Agitar suavemente hasta lograr su completa reconstitución.
- Se recomienda usar la vacuna el mismo día que se reconstituye.

Toma y remisión de muestras

- La prevalencia de la enfermedad se realiza por vigilancia serológica.
- En campañas de vacunación se tomará una muestra al azar en animales sin antecedentes de vacunación.
- En hatos pequeños muestrear por lo menos 10 animales y en hatos mayores un 10% de animales sin vacunar.
- Las muestras deben estar debidamente identificadas y antes de comenzar cualquier prueba verificar que el material se encuentre en condiciones apropiadas para trabajar.

Bibliografía

1. **Acga P, Szyfres B.** Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre ya los Animales. 2" ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 1986. p. 763-74.

2. **Alton GG, Jones LM.** Las Técnicas de Laboratorio en Brucelosis. 2" ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 1976.

3. **Blasco J, Díaz R, Moriyón 1.** Brucelosis Bovina: Tratado de Veterinaria Práctica. Zaragoza: Ed. Zaragoza; 1986.

4. **Casas R.** Diagnóstico Serológico de la Brucelosis. Buenos Aires; 1976.

5. **Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.** Reunión de Consulta de Expertos de la OPS /OMS Sobre Vacunas y Estrategias de Vacunación. Washington: Organización Panamericana de Salud; 1999.

6. **Centro Panamericano de Zoonosis.** Elaboración y Normalización de Antígenos para las Pruebas de Seroaglutinación de la Brucelosis. Nota técnica W 3. Buenos Aires: CEPANZO; 1969.

7. **Centro Panamericano de Zoonosis.** Técnicas Suplementarias Para el Diagnóstico de la Brucelosis. Nota Técnica N° 2. Buenos Aires: CEPANZO; 1970.

8. **García L**. Enfermedades de los Bovinos: Brucelosis Bovina. Buenos Aires: Ed. Hemisferio Sur; 1993.ç

9. **Ministerio de Salud.** Normas Operativas Para el Control de la Brucelosis. III Seminario Nacional de Brucelosis. Lima 19 -23 de julio de 1982. Lima: MINSA; 1982.

10. **Organización Mundial de Salud.** Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Brucelosis. Ginebra: OMS; 1986. Sexto informe.

Impreso en los talleres gráficos de:



Mariscal Castilla 220 La Perla - Callao
Telefax: 429-6803
E-mail : dimersa@terra.com.pe


INS
Instituto Nacional de Salud