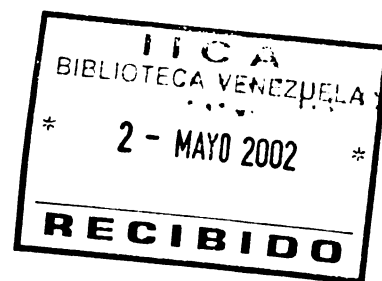


IICA
BIBLIOTECA VENEZUELA
* 2 - MAYO 2002 *
RECIBIDO



MANUAL DE TECNICAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO EN SALUD ANIMAL

Tomo I

**Asunción, Paraguay
Setiembre, 2001**

**SERVICIO NACIONAL DE SALUD ANIMAL (SENACSA)
Laboratorio del SENACSA**

**INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA (IICA)
AGENCIA DE COOPERACIÓN EN PARAGUAY
DIRECCION REGIONAL SUR**

00007233

12

P R O L O G O

El Manual de Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico en Salud Animal que con satisfacción prologamos, es producto del esfuerzo conjunto realizado por el Laboratorio del Servicio Nacional de Salud Animal (SENACSA) y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), en el marco del Acuerdo de Cooperación entre ambas instituciones.

El Paraguay, a través del SENACSA, está implementando un Plan Nacional de Salud Animal y Emergencia Sanitaria, cuyo propósito es mejorar la situación zoonosanitaria nacional fortaleciendo los programas de control y erradicación de enfermedades, para declarar al país libre de las que afectan a la ganadería nacional y que constituyen una barrera no arancelaria en el comercio internacional de productos y subproductos de origen animal.

Disponer de información completa y actualizada de las técnicas de laboratorio, facilitará un mejor diagnóstico de las enfermedades de los animales y permitirá ejecutar adecuadamente las campañas nacionales de salud animal. De esta manera se cumplirá cabalmente con las exigencias internacionales, en especial con las recomendaciones de la Oficina Internacional de Epizootias, OIE en ésta materia

Este Manual que fue preparado por los profesionales de las diferentes dependencias que componen el Laboratorio del SENACSA y contó con el apoyo técnico de la Agencia de Cooperación del IICA en el Paraguay, es un instrumento que permitirá a los técnicos del SENACSA y sector privado a desempeñar sus funciones con mayor eficacia y eficiencia, facilitando el comercio de productos y subproductos pecuarios y la inserción competitiva del país en los mercados mundiales.

Dr. Luis A. Acuña
Presidente del SENACSA

Ing. Agr. Roberto Casás
Representante del IICA en Paraguay



P R E S E N T A C I O N

El Servicio Nacional de Salud Animal, SENACSA, es una institución autónoma que tiene como objetivo organizar y ejecutar el Plan Nacional de Salud Animal mediante campañas nacionales de sanidad animal, principalmente de lucha contra las principales enfermedades tales como: Fiebre Aftosa, Brucelosis, Rabia Bovina, Tuberculosis Bovina, Anemia Infecciosa Equina, Peste Porcina Clásica y Enfermedad de Newcastle así como también la producción y control de productos biológicos destinados a la inmunización y el diagnóstico de las enfermedades en campaña.

Para cumplir con sus objetivos es de primordial importancia que el SENACSA disponga de laboratorios que realicen técnicas de diagnósticos vigentes y acordes con las establecidas por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) como un organismo oficial de referencia en materia de salud animal para el comercio internacional.

Presentamos este Manual como una herramienta de gran utilidad y un medio de consulta permanente para los técnicos del sector público y privado que desarrollan labores en el área del diagnóstico laboratorial de las enfermedades de importancia económica de la pecuaria nacional.

Es valioso destacar la labor realizada por los técnicos del SENACSA en la recopilación y ordenamiento de las técnicas descritas en el presente Manual y la abnegada dedicación de la Dra. Nelly Ortiz en la elaboración de dicho texto y un especial reconocimiento a la Lic. Gloria Gauto y Lic. Vanessa Doria por la transcripción y adecuación para el formato del texto.

Por lo extenso del Manual y una mejor comprensión, el documento se ha dividido en dos tomos: Tomo I que contiene Anemia Infecciosa Equina, Brucelosis, Enfermedad de Newcastle y Tomo II que incluye Fiebre Aftosa, Peste Porcina Clásica, Rabia Bovina y Tuberculosis Bovina.

Cabe resaltar que la elaboración y edición de este Manual contó con el apoyo técnico y financiero del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA, por lo que expresamos nuestro mayor reconocimiento y agradecimiento a la Agencia en el Paraguay.

Dra. Natalia de Vergara
Vice-Directora de Laboratorio
SENACSA

Dr. Santiago González Patiño
Director de Laboratorio
SENACSA

CONTENIDO

	Pag.
PROLOGO	
PRESENTACION	
I. ANEMIA INFECCIOSA EQUINA	
1. DIAGNOSTICO	1
1.1 Método de Inmunodifusión en Gel de Agar (AGID).....	1
1.1.1 <i>Materiales, reactivos y medios</i>	1
1.1.2 <i>Procedimiento</i>	1
1.1.3 <i>Lectura e interpretación de los resultados</i>	2
1.1.4 <i>Otras pruebas</i>	5
2. PRODUCCION DE ANTIGENO A PARTIR DE BAZO EQUINO.....	5
PARA LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION EN GEL DE AGAR	
2.1 <i>Materiales y reactivos</i>	5
2.2 <i>Procedimiento</i>	6
2.2.1 Inoculación del animal.....	6
2.2.1. Purificación del antígeno	6
2.2.2. Preparación de gamma globulina purificada.....	8
2.2.3. Titulación del antígeno.....	8
2.2.4. Control de calidad del antígeno	8
3. LITERATURA CONSULTADA.....	9
II. BRUCELOSIS	
1. DIAGNOSTICO	10
1.1 Diagnóstico Serológico.....	10
1.1.1 Prueba Lenta en Tubo o prueba de Wright.....	10
1.1.1.1 <i>Materiales y reactivos</i>	10
1.1.1.2 <i>Procedimiento</i>	10
1.1.1.3 <i>Lectura e interpretación</i>	12
1.1.2 Prueba en Placa o Prueba de Hudlesson.....	13
1.1.2.1 <i>Materiales y reactivos</i>	13
1.1.2.2 <i>Procedimiento</i>	13
1.1.2.3 <i>Lectura e interpretación</i>	14

1.1.3	Prueba del Rosa de Bengala o Prueba de la Tarjeta o Card.....	18
	Test	
	1.1.3.1 <i>Materiales y reactivos</i>	19
	1.1.3.2 <i>Procedimiento</i>	19
	1.1.3.3 <i>Lectura e interpretación</i>	19
1.1.4	Prueba del Mercaptoetanol.....	20
	1.1.4.1 <i>Materiales y reactivos</i>	20
	1.1.4.2 <i>Procedimiento</i>	20
	1.1.4.3 <i>Lectura e interpretación</i>	21
1.1.5	Prueba del Rivanol.....	22
	1.1.5.1 <i>Materiales y reactivos</i>	22
	1.1.5.2 <i>Procedimiento</i>	23
	1.1.5.3 <i>Lectura e interpretación</i>	23
1.1.6	Prueba de la Antiglobulina o de Coombs.....	24
	1.1.6.1 <i>Materiales y reactivos</i>	24
	1.1.6.2 <i>Lectura e interpretación</i>	27
1.1.7	Prueba del Anillo en la Leche (PAL) o Milk Ring Test (MRT)	28
	1.1.7.1 <i>Materiales y reactivos</i>	29
	1.1.7.2 <i>Procedimiento</i>	29
	1.1.7.3 <i>Lectura e interpretación</i>	29
1.1.8	Prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar.....	31
	1.1.8.1 <i>Materiales, reactivos y medios</i>	31
	1.1.8.2 <i>Procedimiento</i>	32
	1.1.8.3 <i>Lectura e interpretación</i>	33
1.1.9	Fijación de Complemento.....	33
	1.1.9.1 <i>Estandarización de los reactivos</i>	34
	1.1.9.2 <i>Procedimiento</i>	42
	1.1.9.3 <i>Resultado</i>	43
1.2	Diagnóstico Bacteriológico	46
1.2.1	Aislamiento.....	46
	1.2.1.1 <i>Medios básicos</i>	46
	1.2.1.2 <i>Medios selectivos</i>	46
	1.2.1.3 <i>Medios para hemocultivos</i>	46
	1.2.1.4 <i>Cultivo de muestras</i>	47
1.2.2	Identificación de las Brucelas.....	47
	1.2.2.1 <i>Características de los cultivos</i>	47
	1.2.2.2 <i>Métodos de tinción</i>	50
	1.2.2.3 <i>Necesidades de anhídrido carbónico</i>	52
	1.2.2.4 <i>Proliferación en presencia de colorantes</i>	52
	1.2.2.5 <i>Producción de ácido sulfhídrico</i>	53

	1.2.2.6 Prueba de la ureasa.....	54
	1.2.2.7 Aglutinación con sueros monoespecíficos.....	55
	1.2.2.8 Sensibilidad a fagos antibrucelares.....	56
2.	ELABORACION Y NORMALIZACION DE ANTIGENOS.....	60
2.1	Elaboración de la Suspensión Madre.....	60
2.1.1	Medios de cultivo	60
2.1.2	Mantenimiento de <i>Brucella abortus</i> cepa 1119-3.....	61
	2.1.2.1 Cultivos para semilla, siembra e incubación.....	62
2.1.3	Recolección.....	62
2.1.4	Prueba de esterilidad.....	63
2.1.5	Prueba de pureza.....	64
2.2	Elaboración del Antígeno para la Prueba en Tubos.....	64
2.2.1	Dilución de la suspensión madre.....	64
2.2.2	Normalización del antígeno.....	65
	2.2.2.1 Determinación del volumen celular.....	65
	2.2.2.2 Prueba de sensibilidad.....	65
	2.2.2.3 Examen de pureza y esterilidad.....	66
	2.2.2.4 Envase.....	66
2.3	Elaboración de Antígeno para la Prueba en Placa.....	67
2.3.1	Dilución de la suspensión madre.....	67
2.3.2	Normalización del antígeno.....	67
	2.3.2.1 Determinación del volumen celular.....	67
	2.3.2.2 Prueba de sensibilidad.....	68
	2.3.2.3 Examen de pureza y esterilidad.....	68
	2.3.2.4 Envase	68
2.4	Elaboración del Antígeno para la Prueba del Rosa de Bengala.	69
2.4.1	Dilución y coloración de la suspensión madre.....	69
2.4.2	Normalización del antígeno.....	70
	2.4.2.1 Determinación del Volumen celular.....	70
	2.4.2.2 pH del Antígeno.....	70
	2.4.2.3 Sensibilidad.....	70
	2.4.2.4 Envase	70
2.5	Preparación del Antígeno para la Prueba del Rivanol.....	71
2.5.1	Dilución de la suspensión madre y tinción.....	71
2.5.2	Normalización del antígeno.....	72
2.5.3	Prueba de sensibilidad.....	72
2.5.4	Prueba de pureza.....	73
2.5.5	Prueba de esterilidad.....	73
2.5.6	Solución de rivanol.....	73
2.6	Producción del Antígeno para la Prueba del Anillo en Leche.....	73

2.6.1	Reactivos.....	73
2.6.2	Normalización del antígeno.....	75
2.6.2.1	<i>pH del antígeno</i>	76
2.6.2.2	<i>Volumen celular</i>	76
2.6.2.3	<i>Sensibilidad</i>	76
2.6.2.4	<i>Envase</i>	76
2.7	Antígeno para la Prueba de Difusión en Gel de Agar.....	77
2.7.1	Materiales, reactivos y medios.....	77
2.7.2	Procedimiento de elaboración	77
2.7.3	Titulación.....	80
3.	CONTROL DE CALIDAD DE VACUNA	80
3.1	Vacuna <i>Brucella abortus</i> Cepa 19.....	80
3.1.1	Requerimientos mínimos.....	80
3.1.2	Técnica para el recuento viable de la vacuna <i>Brucella abortus</i> cepa 19.....	81
3.1.3	Pruebas de control.....	83
3.2	Vacuna <i>Brucella abortus</i> Cepa RB 51	84
4.	LITERATURA CONSULTADA.....	85

III. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

1.	INTRODUCCION.....	87
2.	DIAGNOSTICO.....	87
2.1	Muestras.....	87
2.2	Tratamiento de las muestras.....	88
2.3	Medio con antibióticos.....	88
2.4	Aislamiento del virus en huevos embrionados SPF.....	88
2.5	Diagnóstico diferencial.....	89
2.5.1	Diferenciación preliminar.....	89
2.5.2	Confirmación.....	89
2.6	Detección de anticuerpos en aves no vacunadas. Serología.....	90
2.7	Prueba de la Hemoaglutinación (HA)	90
2.7.1	Reactivos.....	90
2.7.2	Procedimiento.....	90
2.8	Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI)	91
2.8.1	Reactivos.....	91
2.8.2	Procedimiento	91
2.9	Índice de Patogenicidad Intracerebral (ICPI).....	92
3.	CONTROL DE VACUNAS.....	93

3.1	Retiro de Muestras.....	93
3.2	Control de Calidad.....	93
3.2.1	Prueba de Esterilidad.....	93
3.2.1.1	<i>Etapas de la Prueba.....</i>	94
3.2.2	Test de Salmonella.....	96
3.2.3	Test de micoplasmosis.....	96
3.3	Control de Título de las Vacunas.....	97
3.3.1	Consideraciones Generales.....	98
4.	LITERATURA CONSULTADA.....	102

IV. FIEBRE AFTOSA

1.	CONSIDERACIONES GENERALES.....	103
2.	DIAGNOSTICO.....	105
2.1	Antígeno Asociado a Infección Viral (VIA)	106
2.1.1	Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA)	106
2.1.1.1	<i>Materiales y reactivos.....</i>	106
2.1.1.2	<i>Procedimiento.....</i>	109
2.1.1.2.1	<i>Determinación de anticuerpos anti-VIA en sueros... de animales</i>	109
2.1.1.2.2	<i>Cuantificación de anticuerpos VIA por titulación... en IDGA</i>	109
2.1.1.3	<i>Lectura e interpretación de resultados.....</i>	109
2.1.2	Prueba de Fijación de Complemento.....	112
2.1.2.1	<i>Sistema hemolítico.....</i>	112
2.1.2.1.1	<i>Preparación de reactivos.....</i>	112
2.1.2.1.2	<i>Preparación de los glóbulos rojos.....</i>	113
2.1.2.1.3	<i>Titulación de hemolisina.....</i>	115
2.1.2.1.4	<i>Preparación del sistema hemolítico.....</i>	117
2.1.2.2	<i>Complemento.....</i>	118
2.1.2.3	<i>Preparación de antígenos.....</i>	128
2.1.3	ELISA (Ensayo Inmunoenzimático) para el diagnóstico..... de la Fiebre Aftosa - ELISA 3 ABC	131
2.1.3.1	<i>Materiales y reactivos.....</i>	131
2.1.3.2	<i>Procedimiento.....</i>	134
2.1.3.3	<i>Lectura e interpretación.....</i>	136
2.1.4	Prueba de ELISA Sandwich Indirecta.....	136
2.1.4.1	<i>Materiales y reactivos.....</i>	136
2.1.4.2	<i>Procedimiento.....</i>	137



2.1.4.3	<i>Interpretación de la lectura de tipificación de virus de.....</i>	140
	<i>Fiebre Aftosa</i>	
2.1.5	Identificación y Titulación de anticuerpos de la Fiebre Aftosa..	140
2.1.5.1	<i>Fase sólida (FS).....</i>	140
2.1.5.2	<i>Identificación de anticuerpos de la Fiebre Aftosa.....</i>	142
	<i>(Prueba de “screening”)</i>	
2.1.5.3	<i>Titulación de anticuerpos de la fiebre aftosa.....</i>	144
	<i>(Fase líquida y contacto con la fase sólida)</i>	
2.1.6	Ensayo Inmunoenzimático de Electrotransferencia (EITB).....	148
2.1.6.1	<i>Materiales y reactivos.....</i>	148
2.1.6.2	<i>Procedimiento.....</i>	149
2.1.7	Investigación de Portadores Sanos Aislamiento de Virus.....	150
	<i>Aftoso de Líquido Esofago-Faríngeo – OP</i>	
2.1.7.1	<i>Instrucciones para la toma de liquido Esófago-Faríngeo... (LEF) y procedimiento</i>	150
2.1.7.2	<i>Instrucciones para el procesamiento de muestras de..... líquido Esofago – Faríngeo (LEF)</i>	152
2.1.7.3	<i>Inoculación en cultivos celulares.....</i>	152
3.	CONTROL DE VACUNAS.....	154
3.1	Desarrollo de un ELISA para identificar y cuantificar..... anticuerpos de Fiebre Aftosa	154
3.2	Materiales y reactivos.....	155
3.3	Fase sólida.....	157
3.4	Fase líquida y contacto con la fase sólida.....	157
4.	LITERATURA CONSULTADA.....	161

V. PESTE PORCINA CLÁSICA

1.	INTRODUCCION	162
2.	DIAGNOSTICO.....	162
2.1	Método de ELISA (Inmunoensayo Ligado a Enzimas)	162
2.1.1	Materiales y reactivos.....	162
2.1.1.1	<i>Antígeno.....</i>	162
2.1.1.2	<i>Conjugado.....</i>	163
2.1.1.3	<i>Lavado.....</i>	163
2.1.1.4	<i>Almacenamiento de los reactivos. Condiciones</i>	163
2.1.2	Procedimiento.....	164
2.1.2.1	<i>Incubación de suero, antígeno y conjugado.....</i>	164
2.1.2.2	<i>Incubación con solución sustrato – cromógeno.....</i>	164

2.1.3	Lectura e interpretación de los resultados.....	164
2.2	Identificación del Agente.....	165
2.2.1	Método de inmunofluorescencia.....	165
2.2.1.1	<i>Materiales y reactivos</i>	165
2.2.1.2	<i>Procedimiento</i>	166
2.2.1.3	<i>Lectura e interpretación de los resultados</i>	166
2.	LITERATURA CONSULTADA.....	167

VI. RABIA BOVINA

1.	CONSIDERACIONES GENERALES.....	168
1.1	Muestras, envío, empaquetado.....	168
1.2	Medidas de seguridad para extracción de muestras.....	168
1.3	Desinfectantes que inactivan el virus en un minuto.....	168
2.	PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS Y REACTIVOS PARA CONTROL DE CALIDAD DE VACUNAS ANTIRRÁBICAS, DIAGNÓSTICO Y DOSAJE DE ANTICUERPOS ANTIRRÁBICOS	169
2.1	Producción de virus rábico semilla en ratones.....	169
2.1.1	Técnica.....	169
2.1.2	Controles.....	169
2.1.2.1	<i>Esterilidad</i>	169
2.1.2.2	<i>Identidad</i>	170
2.1.2.3	<i>Virulencia</i>	170
2.2	Producción de virus trabajo.....	170
2.3	Producción de reactivos.....	170
2.3.1	Solución de antibióticos.....	170
2.3.2	Diluyentes suero equino al 2%.....	170
2.3.3	Solución Salina Tamponada con Fosfatos 0.01 M (S.S.T.).....	171
2.3.4	Glicerina tamponada.....	171
2.3.5	Suspensión de Cerebro de Ratón Normal (C.R.N)	171
2.3.6	Diluyente agua – sacarosa – gelatina.....	171
2.4	Preparación de láminas testigos positivas.....	172
2.5	Láminas testigos negativas	172
3.	DIAGNOSTICO.....	172
3.1	Prueba de Inmunofluorescencia Directa.....	172
3.1.1	Procedimiento.....	172
3.1.2	Lectura e interpretación	173
3.1.3	Titulación de conjugado antirrábico.....	174



3.1.3.1	Procedimiento.....	174
3.2	Prueba Biológica.....	175
3.2.1	Procedimiento.....	175
4.	CONTROL DE CALIDAD DE VACUNA	175
4.1	Control de potencia.....	175
4.1.1	Materiales	175
4.1.2	Procedimiento.....	176
4.1.3	Interpretación de la prueba.....	176
4.2	Control de Esterilidad.....	176
4.2.1	Procedimiento.....	176
4.2.2	Interpretación	177
4.3	Control de Inocuidad.....	177
4.3.1	Procedimiento.....	177
4.3.2	Interpretación de la prueba.....	177
4.4	Otras pruebas de control.....	177
4.5	Retiro de muestras para el control.....	177
4.6	Registro de la vacuna antirrábica.....	178
4.7	Control del producto.....	178
4.8	Informes y comunicación	179
5.	PRUEBA DE NEUTRALIZACION PARA DETERMINACIÓN.....	179
	DE ANTICUERPOS CONTRA LA RABIA EN ORGANISMOS	
	VACUNADOS	
5.1	Dilución del Suero Problema frente a Virus Constante.....	179
	(Optimo 32 DL50)	
5.1.1	Procedimiento.....	179
6.	LITERATURA CONSULTADA.....	181

VII. TUBERCULOSIS BOVINA

1.	DIAGNOSTICO.....	182
1.1	Muestras.....	182
1.2	Examen microscópico.....	183
1.3	Aislamiento.....	186
1.3.1	Tratamiento de la muestra previo al cultivo.....	186
1.3.2	Cultivo.....	188
1.3.2.1	Medios de cultivo.....	188
1.3.3	Determinación de la sensibilidad de <i>M. tuberculosis</i> y de.....	192
	otras micobacterias a los quimioterápicos y antibióticos	
1.3.4	Método de las proporciones. Principio.....	193



1.3.5	Determinación de la sensibilidad del <i>M. bovis</i> a los.....	196
	quimioterápicos y antibióticos	
1.4	Identificación y clasificación de las micobacterias.....	196
1.5	Tipificación de las micobacterias. Métodos.....	199
1.5.1	Aspecto microscópico.....	199
1.5.2	Determinación de las características del cultivo.....	199
1.5.3	Prueba de fotocromogenicidad.....	204
1.5.4	Prueba de niacina.....	204
1.5.5	Prueba de nitrato reducción.....	205
1.5.6	Prueba de catalasa semicuantitativa.....	207
1.5.7	Prueba de catalasa a temperatura ambiente y a 68° C.....	207
	(prueba cualitativa)	
1.5.8	Prueba de hidrólisis de Tween.....	208
1.5.9	Prueba de toma de hierro.....	209
1.5.10	Prueba de tolerancia al cloruro de sodio.....	210
1.5.11	Prueba de arilsulfatasa.....	210
1.5.12	Prueba de reducción del telurito.....	211
1.5.13	Prueba de ureasa.....	212
1.5.14	Prueba de β - galactosidasa.....	213
1.5.15	Prueba de β -glucosidasa.....	214
2.	PREPARACION Y ESTANDARIZACION DE.....	214
	TUBERCULINA PPD	
2.1	Introducción.....	214
2.2	Procedimiento de preparación de la tuberculina PPD	216
2.2.1	Cepas.....	216
2.2.2	Métodos de conservación de las cepas.....	216
2.2.3	Cultivos semilla.....	217
2.2.4	Cultivo de producción.....	217
2.2.5	Muerte bacilar	217
2.2.6	Separación de la masa bacilar: filtración de los cultivos.....	218
2.2.7	Precipitación de las proteínas.....	218
2.2.8	Controles químicos del “concentrado”	220
2.2.8.1	<i>Contenido proteínico</i>	220
2.2.8.2	<i>Determinación de proteínas en el PPD según la.....</i>	221
	<i>prueba del Biuret modificada</i>	
2.2.8.3	<i>Determinación de Fenol en Tuberculinas</i>	222
2.2.9	Dilución del “concentrado” y filtración esterilizante.....	224
2.2.10	Control de calidad de la solución filtrada.....	224
2.2.10.1	<i>Control de esterilidad</i>	224
2.2.11	Estandarización de tuberculina PPD (derivado proteínico).....	225

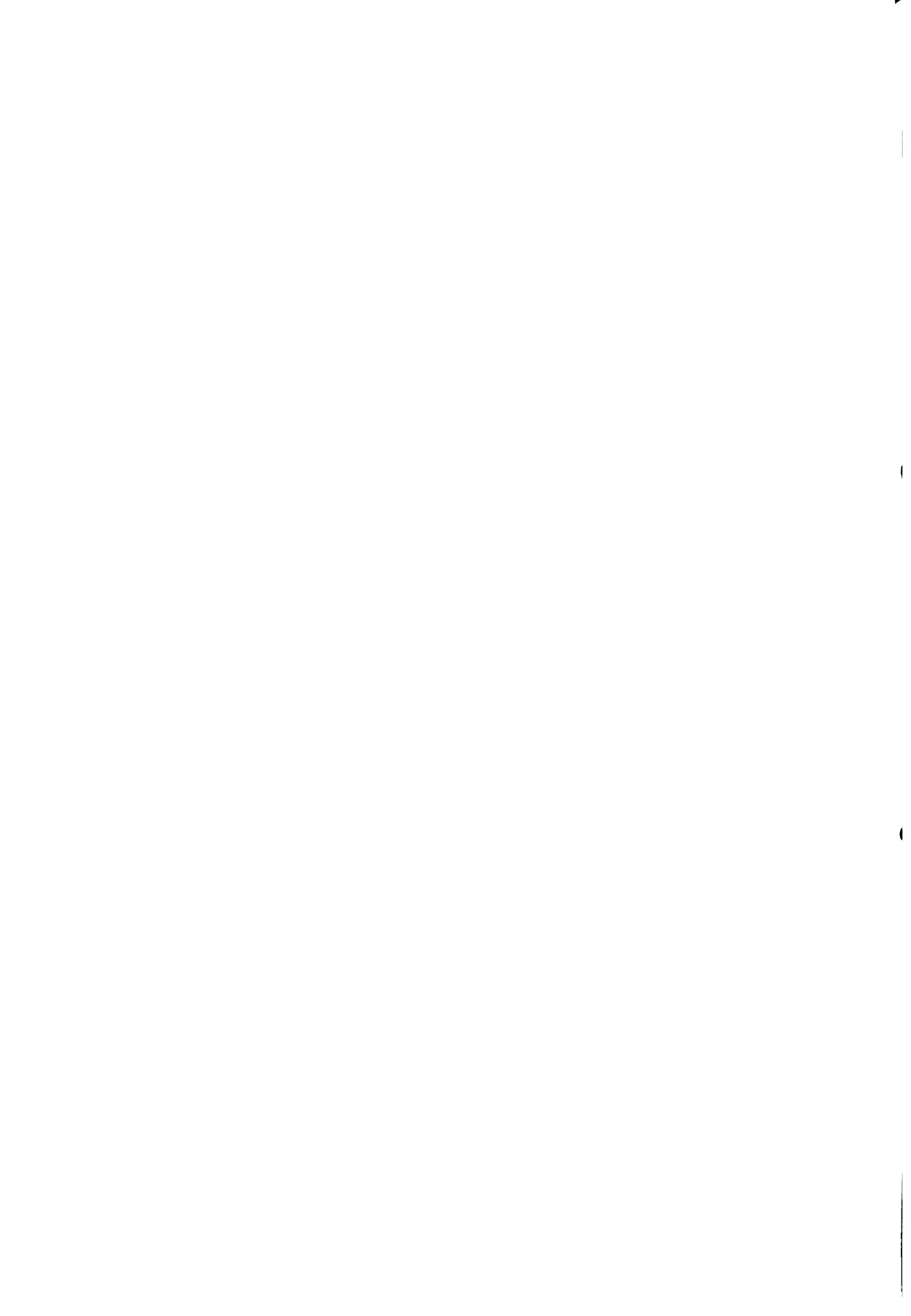
	purificado)	
	2.2.11.1 <i>Patrones internacionales para tuberculinas y especificación de la actividad biológica</i>	225
	2.2.12 Dilución de la solución filtrada.....	233
	2.2.13 Agregado de colorantes.....	234
	2.2.14 Control final de la potencia biológica.....	234
	2.2.15 Envasado.....	235
	2.2.16 Control del producto final envasado.....	235
	2.2.17 Etiquetado.....	235
	2.2.18 Conservación.....	235
	2.2.19 Tuberculina PPD de <i>M. Tuberculosis</i> para pruebas tuberculínicas en seres humanos	235
	2.2.20 Control del producto final diluido y envasado.....	236
3.	LITERATURA CONSULTADA	237

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Anemia Infecciosa Equina.....	238
Anexo 2. Brucelosis.....	239
Anexo 3. Fiebre Aftosa.....	250
Anexo 4. Tuberculosis Bovina.....	256

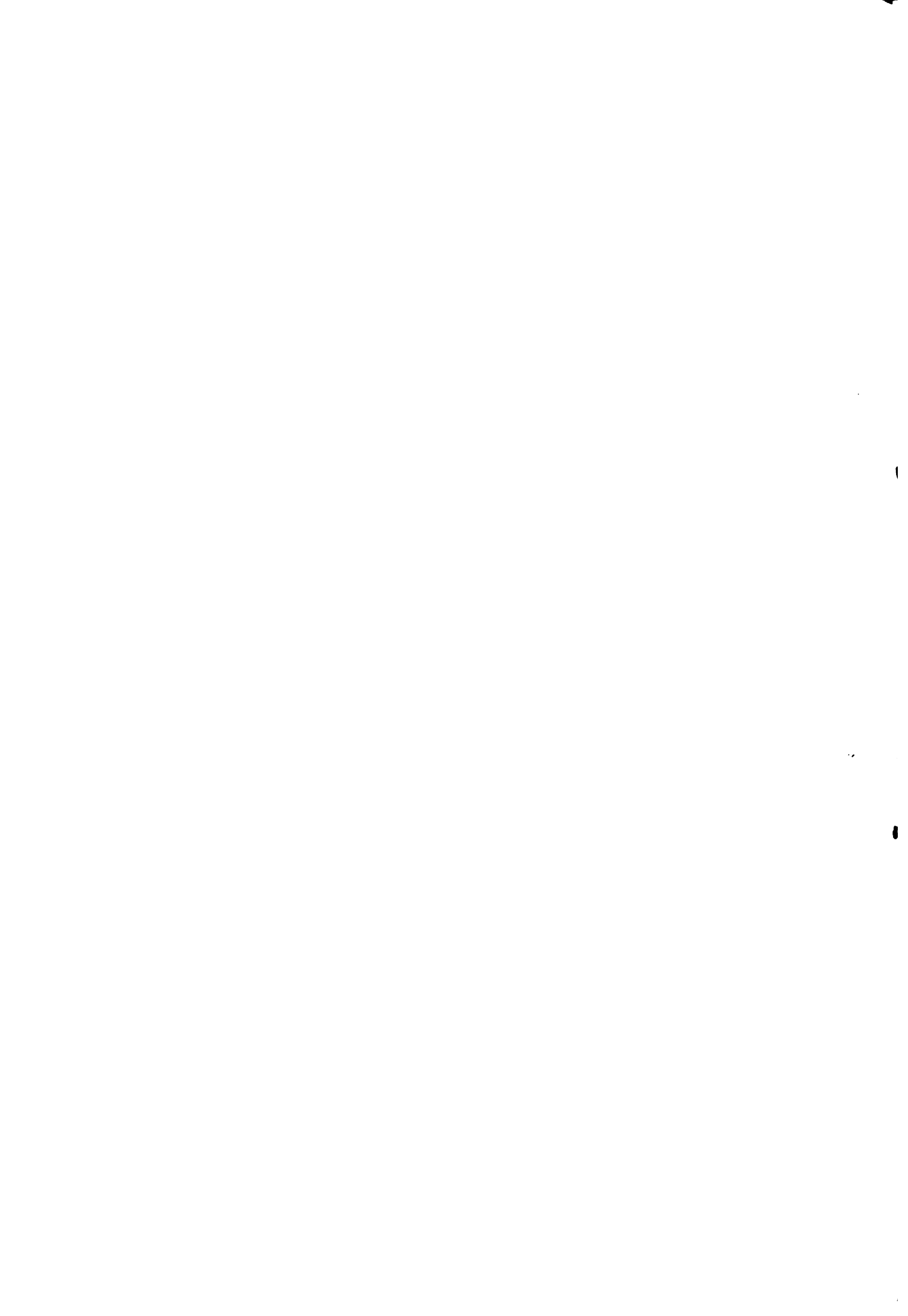
ABREVIACIONES

Ac	=	Anticuerpo
Ag	=	Antígeno
AGID	=	Inmunodifusión en gel de agar
ARN	=	Acido ribonucleico
BCIP	=	5-Bromo, 4-chloro, 3-indolyl phosphatase
BEI	=	Etilenimina binaria
BHK	=	Baby hamster kidney
CT	=	Card test
CVS	=	Virus estándar de confrontación
DLM	=	Dosis letal mínima
DO	=	Densidad óptica
ECP	=	Efecto citopatogénico
EITB	=	Electro inmuno transfer blot
ELISA	=	Enzyme linked immunosorbent assay
EPP	=	Espectativa porcentual de protección
FC	=	Fijación de complemento
HA	=	Hemoaglutinación
HI	=	Inhibición de la hemoaglutinación
IDGA	=	Inmunodifusión en gel de agar
LEF	=	Líquido esófago faríngeo
LIC	=	Límite inferior de confianza
MRT	=	Milk ring test
NBT	=	Nitro blue tetrazolium
OPD	=	Ortophenil diamine
PBS	=	Phosphate buffer soluion
SAT	=	Serum agglutination test
SP	=	Suero problema
SPF	=	Specific pathogen free
SVB	=	Solución salina tope con veronal sódico
TMM	=	Tiempo medio de muerte
TTE	=	tricloro-trifluorenato
VA	=	Valor antigénico
VFA	=	Virus fiebre aftosa
VIA	=	Antígeno asociado a la infección viral



II. BRUCELOSIS

**MANUAL DE TECNICAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO
EN SALUD ANIMAL**



II. BRUCELOSIS

Dr. Hugo Loup Reyes

1. DIAGNOSTICO

1.1 DIAGNOSTICO SEROLOGICO

1.1.1 Prueba Lenta en Tubo o Prueba de Wright

1.1.1.1 Materiales y reactivos

- **Tubos de serología:** tipo Wassermann de 13 mm x 100 mm de vidrio blanco y completamente limpios.
- **Gradillas de alambre para sostener tubos:** un tamaño conveniente es el que sirve para 15 pruebas de 4-6 tubos cada una.
- **Gradillas para acomodar muestras de sangre:** construidas de preferencia para acomodar 15 muestras por hilera. Esta coordinación entre gradillas simplifica el proceso de las pruebas.
- **Pipetas:** de 0.2 ml en graduaciones de 0.01 ml o especialmente graduadas (pipetas de Bang) para 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml, respectivamente. Si es necesario se puede utilizar una pipeta calibrada para varias pruebas, siempre que se la enjuague y se la seque entre cada prueba tanto como sea posible.
- **Dosificadores automáticos (aunque no imprescindibles):** de 2 ml de capacidad, provistos de una aguja de 2.5 a 3 pulgadas y de calibre 14-16. A falta de éstos se puede hacer la distribución de antígeno con una pipeta de 10 ml de capacidad.
- **Estufas:** para incubar a 37°C.
- **Refrigeradora:** para almacenar muestras de sangre durante las pruebas.

Antígeno

El antígeno a emplear ha sido estandarizado previamente y mantenido en concentración de 4.5% de brucelas. En la prueba se usa al 0.045%, por lo que debe diluirse 100 veces en solución salina al 0.85% que contiene 0.5% de fenol. Se recomienda hacer esta dilución 12 horas antes de su uso.

1.1.1.2 Procedimiento

En el diagnóstico de rutina de sueros bovinos se usa el siguiente sistema de diluciones: por medio de una pipeta graduada, se colocan cantidades de suero claro en

cada uno de los cuatro sueros de aglutinación, agregando luego a cada tubo para obtener diluciones de 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200, respectivamente.

Si se desea determinar el punto final de aglutinación de un suero, se debe emplear otro sistema de diluciones. Este consiste en establecer series de 10-12 tubos, agregando cantidades dobles de suero y de antígeno al primer suero en una proporción de 1/25 y a los tubos restantes cantidades simples de antígeno; la mitad de la mezcla del primer tubo se traspasa al segundo, del segundo al tercero y así sucesivamente hasta el último tubo, descartándose de éste los 2 ml de mezcla que sobran.

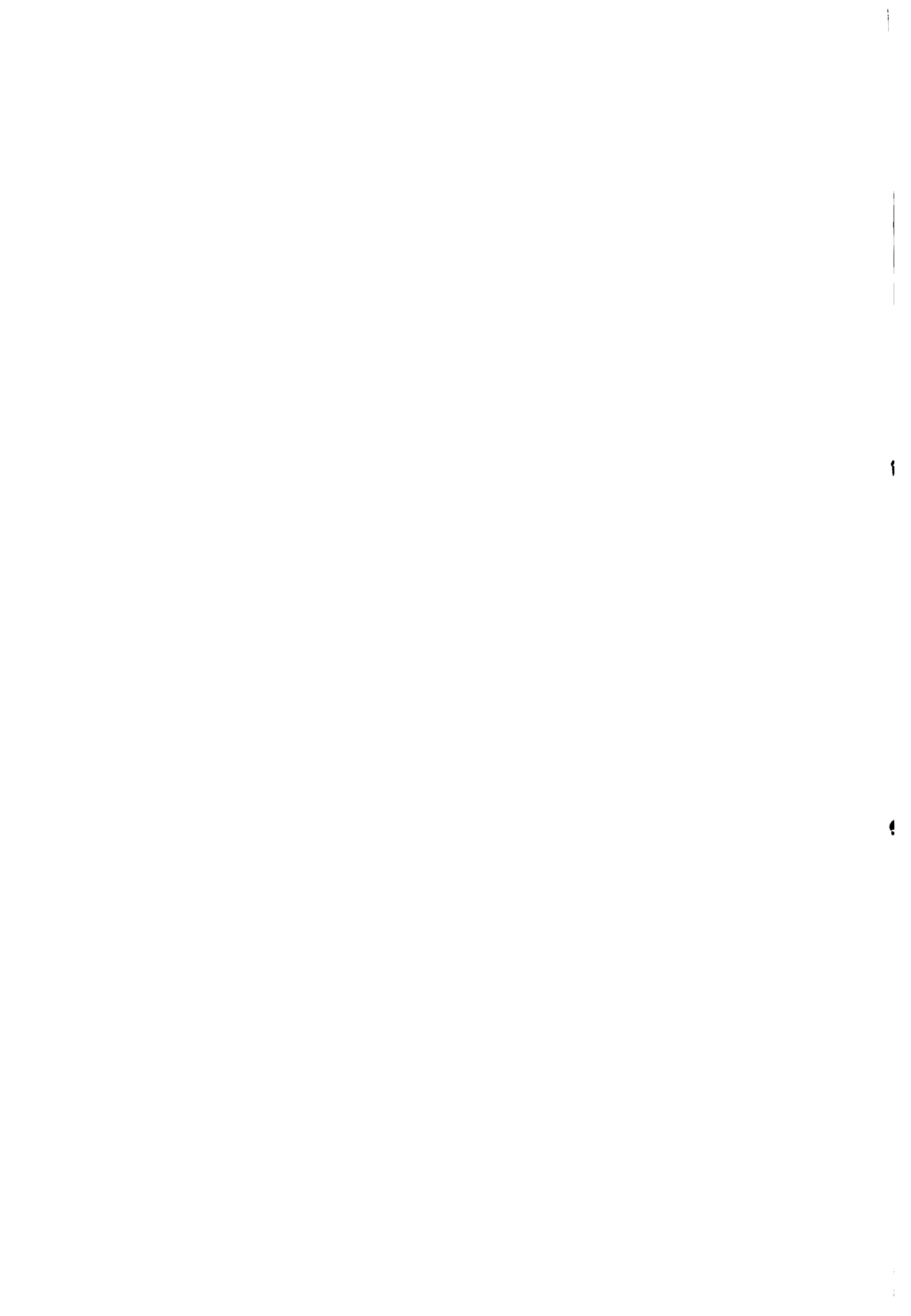
La lectura de las pruebas se hace después de 40-48 horas de incubación a 37.5°C. La aglutinación del antígeno bajo la forma de grumos y su depósito en el fondo del tubo por gravedad determina la clarificación del líquido dentro del mismo, manteniéndose los grumos firmes después de una leve agitación de éste. La aglutinación es el resultado directo de la acción específica de las aglutininas del suero, con las brucelas del antígeno.

El título final de aglutinación del suero es el dado por la dilución del último tubo en el que se presenta una clarificación evidente, manteniéndose los grumos firmes a pesar de una agitación leve. Si esto ocurre, por ejemplo, en los 3 primeros tubos solamente, el título del suero es de 1/100.

Procedimiento de rutina para diluciones

Las muestras de sangre deben ser numeradas claramente. Después de la centrifugación para separar el suero del coágulo, los tubos de sangre se colocan en orden en los soportes. Se numeran los soportes de los tubos para la prueba y el primer tubo de cada hilera, de manera que concuerden con las muestras de suero. Se extrae por succión, una cantidad de suero ligeramente mayor a la que se requiere para la prueba; se deja correr el exceso en el tubo de suero hasta que la base del menisco en la luz de la pipeta toque la línea de la graduación requerida. La pipeta se inserta en el primer tubo y se depositan 0.08 ml del suero en el fondo del mismo tubo, se retira la pipeta a lo largo de las paredes del mismo para permitir que se deposite el suero en la punta de la pipeta, 0.04 ml se distribuyen en el segundo tubo, 0.02 ml en el tercero y 0.01 ml en el cuarto. Por este método no se pueden efectuar con exactitud mayores diluciones. Se procede en igual forma con las otras muestras hasta completar la serie. No deben utilizarse pipetas cuyas puntas estén rotas.

Se distribuyen con pipeta, 2 ml de antígeno (0.045% de brucelas) en cada uno de los tubos con suero*. En esta forma las diluciones del suero corresponden a 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200, respectivamente. Los soportes con los tubos se agitan levemente para asegurar la mezcla del suero con el antígeno y se llevan a la estufa a 37.5°C. Las



muestras de sangre se llevan a la refrigeradora hasta que se haga la lectura final de todas las pruebas.

* Para esto la pipeta de 10 ml es perfectamente adecuada, pero cuando se examina un número grande de muestras es muy útil el dosificador automático para distribuir el antígeno.

Procedimiento de diluciones para obtener el título final

Cuando se desean obtener títulos finales de muestras de suero, se aplica la siguiente técnica: se preparan soportes portatubos sosteniendo filas de 10-12 tubos y se numeran debidamente para que concuerden con las muestras de sangre.

Con una pipeta de 0.16 ml (pipeta de Bang), se depositan 0.16 ml de suero claro en el primer tubo y 4 ml de antígeno para la prueba lenta. En los tubos siguientes se colocan solamente 2 ml de antígeno. Después de mezclar con la pipeta, se retiran del primer tubo 2 ml que se colocan en el segundo tubo y luego que se han mezclado nuevamente, se vuelven a tomar 2 ml de éste para el tercero, y así sucesivamente con los siguientes, descartándose los 2 ml que sobran en el último tubo. Se obtienen de esta manera las siguientes diluciones: 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, etc.

Incubación

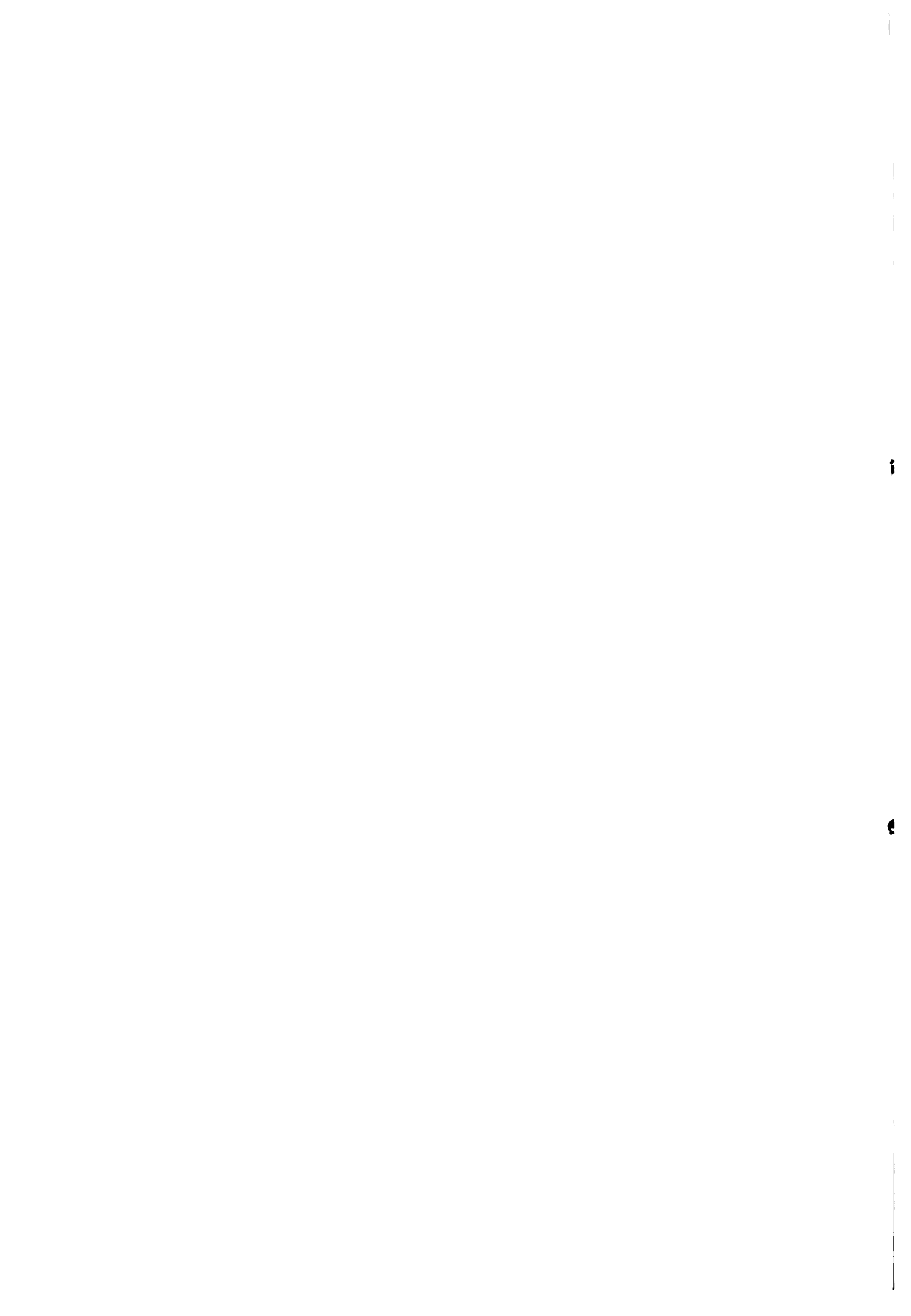
La incubación tiene por objeto obtener en el tiempo más corto posible el máximo de aglutinación. Se ha determinado que la incubación a 37.5°C durante 40-48 horas, es suficiente para obtener el máximo de aglutinación en un suero con bajo contenido de aglutininas, 1/400 o menos. Este período de incubación es suficiente para el diagnóstico de rutina.

1.1.1.3 Lectura e interpretación

La lectura debe hacerse contra un fondo negro opaco con una fuente de luz que atraviese los tubos. Las fuentes extrañas de luz se deben reducir. Las determinaciones se deben basar tanto en la claridad de las mezclas como en el grado de aglutinación del antígeno y en la firmeza de los grumos al agitar suavemente el tubo.

El grado de aglutinación en cada una de las distintas diluciones puede clasificarse como completo (+), incompleto (I) o negativo (-). Los límites de exactitud inherentes a la prueba no justifican una clasificación más detallada para el diagnóstico de rutina.

Agglutinación completa es aquella en que el líquido de la mezcla suero-antígeno aparece clara y la agitación suave no rompe los grumos.



Aglutinación incompleta es la que muestra la mezcla suero-antígeno parcialmente clara y una suave agitación no rompe los grumos.

Aglutinación negativa es aquella en que la mezcla suero-antígeno no aparece clara y una suave agitación no revela los grumos.

1.1.2 Prueba en Placa o Prueba de Hudlesson

1.1.2.1 Materiales y reactivos

- **Caja de lectura:** de unos 45 cm de largo x 35 cm de ancho x 15 cm de profundidad, provista de una caja 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 madera que pueda ponerse y quitarse fácilmente. La caja debe estar iluminada de modo que la luz incida oblicuamente y por debajo, en la mezcla de suero y antígeno. Esto se consigue utilizando un tubo de luz fluorescente o en su defecto 2 bombillas eléctricas comunes cubiertas parcialmente. El interior de la caja debe pintarse de negro opaco. La caja estará provista de una tapa de vidrio para evitar que la mezcla se evapore con demasiada rapidez.
- **Pipetas:** se usan las mismas descritas para la prueba en tubo.
- **Gotero de antígeno:** debe calibrarse de tal manera que distribuya exactamente 0.03 ml por gota. Todos los goteros deben probarse cuidadosamente antes de su uso inicial, vertiendo en posición vertical 100 gotas de antígeno en una probeta graduada de 5 ml. Un gotero apropiado debe dar 3 ml por cada 100 gotas. Una aguja de sangría, calibre 14, de 0.5 pulgadas de largo, a la que se le haya limado la punta y colocado una perilla de goma blanda, puede convertirse en un gotero excelente, siempre que se ajuste bien la punta.
- **Mezclador:** para mezclar el suero con el antígeno, se utilizan palillos o un mezclador de alambre grueso doblado en tal forma que cubra una superficie de 15 mm. El mezclador debe ser enjuagado con agua y secado entre cada prueba.
- **Antígeno:** antígeno de placa.

Para pruebas de rutina, en que interesan solamente títulos a partir de 1/50, puede utilizarse una placa de vidrio dividida en cuadros de 3 cm de lado en 7 filas de 15. Es preferible utilizar el mezclador de alambre múltiple.

1.1.2.2 Procedimiento

En la caja de lectura se enciende la luz para calentar ligeramente la placa de vidrio antes de empezar a hacer las reacciones. Tanto el suero como el antígeno debe llevarse aproximadamente a temperatura ambiente, por lo que conviene sacar de la refrigeradora el reactivo y las muestras de suero una media hora antes de iniciar las

pruebas. Con una pipeta de serología, sostenida en posición oblicua de 45° con respecto a la horizontal y tocando la placa de vidrio, se colocan 0.08, 0.04, 0.02 y 0.01 ml de la primera muestra de suero en 4 casilleros de una misma hilera de la placa. Se agita suavemente el frasco de antígeno para asegurar una suspensión homogénea y con el gotero sostenido en posición vertical, se deja caer una gota de antígeno (0.03 ml) en cada cuadrado con suero.

Empezando por el cuadrado con 0.01 ml de suero, *se mezclan bien* el suero y el antígeno con un palillo o con el mezclador de alambre por medio de movimientos circulares, abarcando las áreas siguientes:

0.08 ml	-	27 mm de diámetro
0.04 ml	-	24 mm de diámetro
0.02 ml	-	21 mm de diámetro
0.01 ml	-	18 mm de diámetro

La placa de vidrio se retira de la caja y se mueve suavemente en forma rotativa para homogeneizar bien las mezclas. Se vuelve a colocar la placa en la caja, se cubre ésta con la tapa de vidrio y se apagan las luces para impedir la evaporación excesiva. Cuando no se utilice el antígeno se lo debe guardar en la refrigeradora.

1.1.2.3 Lectura e interpretación

Las reacciones así montadas deben incubarse durante 8 minutos, antes de proceder a su lectura. La mayoría de las muestras llegan a su punto más elevado de aglutinación en ese tiempo.

Tres minutos antes de la lectura, se debe sacar la placa para darle un movimiento suave de rotación y se la vuelve a colocar en la caja; esto es muy importante. A los 8 minutos se prenden las luces, inclinando ligeramente la placa para permitir que la mezcla fluya de un lado a otro, mientras se está haciendo la lectura. Las observaciones se hacen mejor contra el fondo negro opaco de la caja. Se hacen solamente 3 clasificaciones siguientes: aglutinación completa (+), incompleta (I) y negativa (-). Las lecturas se interpretan de la misma manera que para el método de la prueba en tubo y de acuerdo con el cuadro que figura más adelante.

Cuando se desee determinar el título final del suero, por el método de placa, se puede usar el siguiente procedimiento: se agrega 1 parte de suero a 15 partes de suero bovino negativo; se hacen las mismas mezclas con el suero diluido que con el suero no diluido (0.08, 0.04, 0.02 y 0.01 ml de suero diluido más 0.03 ml de antígeno). De esta manera se obtendrán lecturas comparables con diluciones de 1/400, 1/800, 1/1600 y 1/3200 de la prueba en tubo.

Nota: En manos experimentadas, empleando la técnica estándar, la prueba en placa proporciona resultados comparables a la del tubo. Ocasionalmente se puede encontrar un suero que no reacciona en el mismo grado en la prueba en tubos o viceversa. La razón de esta variación no es bien conocida. Como el antígeno para la prueba en placa se ha ajustado a una técnica definida, cualquier desviación en el montaje de la prueba dará, naturalmente, resultados inexactos.

En el cuadro que sigue se da la interpretación de los resultados de las pruebas de seroaglutinación, tanto por el procedimiento de tubo como de placa. El cuadro es una adaptación del 4° Informe del Comité FAO/OMS de Expertos en Brucelosis:

Cuadro 1

**BOVINOS NO VACUNADOS O VACUNADOS A UNA EDAD
MAYOR DE 8 MESES**

1/25 = 25 UI/ml.	1/50 = 50 UI/ml.	1/100 = 100 UI/ml.	1/200 = 200 UI/ml.	INTERPRETACION
-	-	-	-	NEGATIVA
	-	-	-	NEGATIVA
+	-	-	-	NEGATIVA
+		-	-	SOSPECHOSA
+	+	-	-	SOSPECHOSA
+	+		-	SOSPECHOSA
+	+	+	-	POSITIVA
+	+	+		POSITIVA
+	+	+	+	POSITIVA

Cuadro 2

BOVINOS DE 30 MESES O MAS, VACUNADOS A LA EDAD DE 4 A 8 MESES

1/25 = 25 UI/ml.	1/50 = UI/ml.	1/100 = UI/ml.	1/200 = 200 UI/ml.	INTERPRETACION
-	-	-	-	NEGATIVA
	-	-	-	NEGATIVA
+	-	-	-	NEGATIVA
+		-	-	NEGATIVA
+	+	-	-	NEGATIVA
+	+		-	SOSPECHOSA
+	+	+	-	SOSPECHOSA
+	+	+		SOSPECHOSA
+	+	+	+	POSITIVA

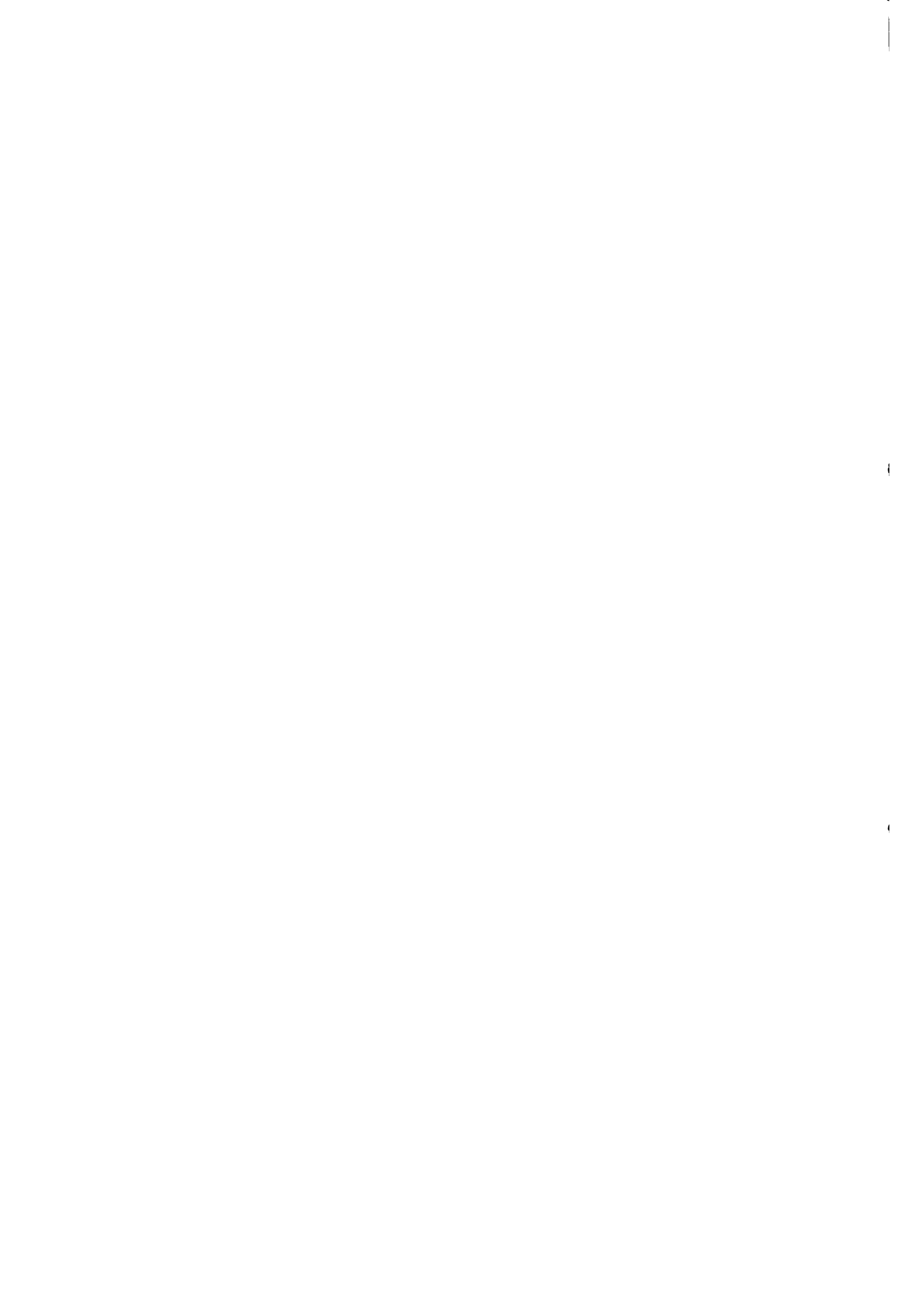
| = Aglutinación incompleta
 + = Aglutinación completa
 UI = Unidades Internacionales

Bovinos no vacunados se clasifican como 'sospechosos' a partir de una aglutinación incompleta a la dilución 1/50 y como 'positivos' a partir de una aglutinación completa a la dilución 1/100.

De acuerdo con el criterio generalmente adoptado, animales por debajo de 30 meses de edad vacunados con la vacuna cepa 19, a la edad de 4 a 8 meses, no son sometidos a la prueba de aglutinación o, si son sometidos, no se exige que den resultado negativo. Para que este criterio sea válido es necesario que cada país reglamente la elaboración y uso de la cepa 19, incluyendo la identificación oficial de los animales vacunados y su certificación.

Animales que hayan sido vacunados a una edad mayor de 8 meses deben ser examinados serológicamente, interpretándose las reacciones en este grupo de animales de la misma manera que para los animales no vacunados.

Cuando los animales tienen más de 30 meses de edad y han sido vacunados oficialmente a la edad de 4 a 8 meses, serán clasificados como 'sospechosos' a partir de una aglutinación incompleta al 1/100 y como 'positivos' a partir de una aglutinación incompleta al 1/200.



Nota: El Comité de Expertos en Brucelosis en su 4º Informe recomienda la adopción del sistema de unidades internacionales. Según esta recomendación, todas las comunicaciones en las que figuren datos referentes a las pruebas serológicas para determinar aglutininas de Brucella deben expresar los títulos en unidades internacionales por mililitro.

El suero patrón internacional anti – *Brucella abortus* (SPLAb) contiene una cantidad de material desecado equivalente a 1 000 UI/ml.

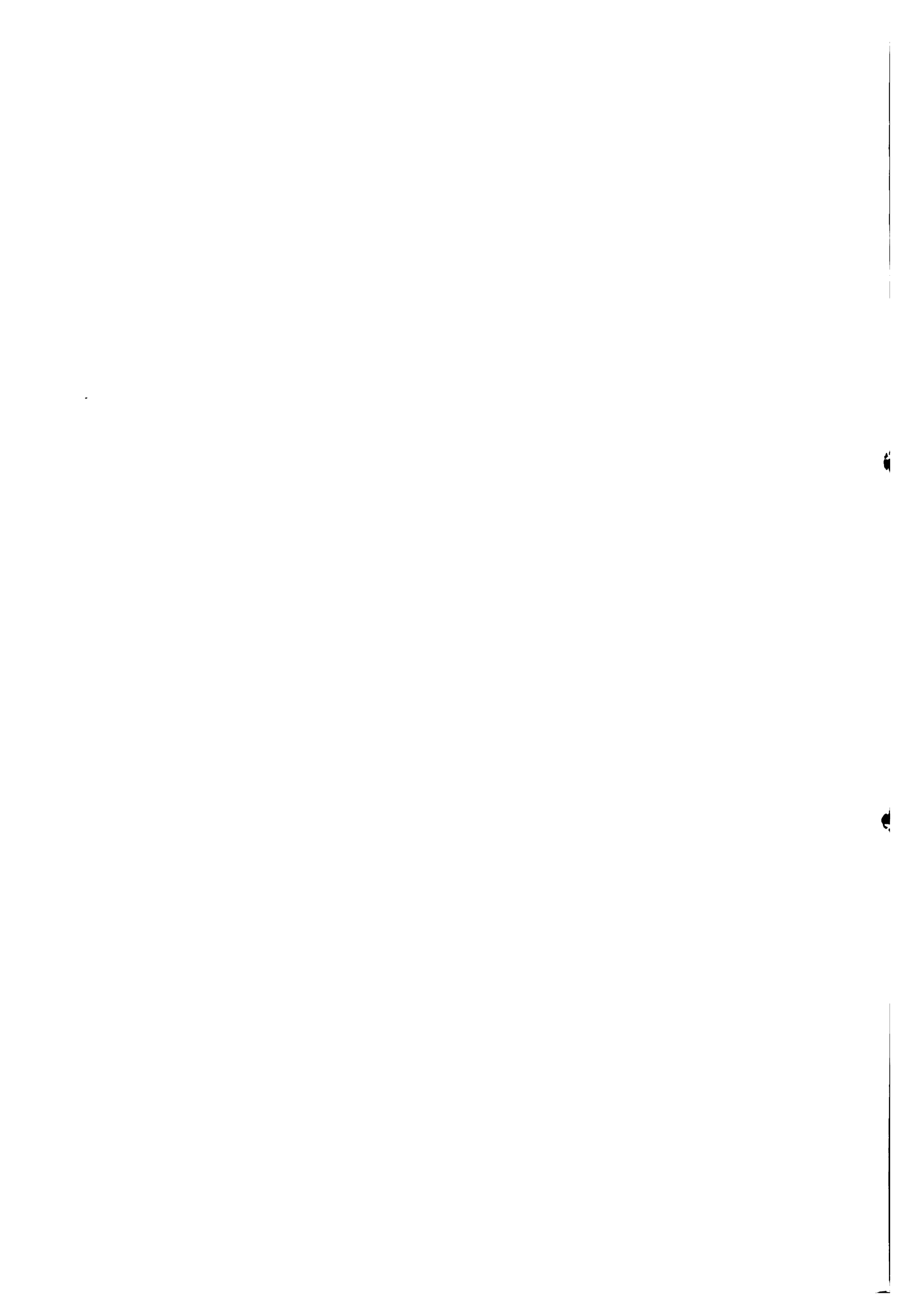
Para confirmar los resultados obtenidos, el SPLAb (o suero nacional equivalente), que contiene 1 000 UI/ml deberá ensayarse por los mismos métodos. Cuando el título a que se obtenga una aglutinación de 50% al ensayar el SPLAb por el antígeno y por el método empleados sea 1/500, los títulos 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, indicarán más o menos 40, 80, 160, 320, 640 UI/ml, respectivamente. Si el título con el SPLAb fuese 1/1 000 y la serie de diluciones utilizadas 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, etc., la aglutinación en estos títulos indicaría 25, 50, 100 y 200 IU/ml, respectivamente, como lo es en el caso de antígenos estándar y métodos de pruebas estándar que se describe en esta nota. Análogamente ocurriría con cualquier otro método.

Los títulos anteriores se refieren a la dilución final del suero en la mezcla de suero y antígeno.

Precauciones

Para que los resultados de la prueba en placa sean comparables con los de la prueba en tubo, debe hacerse *exactamente* como se ha descrito. En tal sentido, insistimos sobre los siguientes factores:

- Para la distribución del suero, sosténgase la pipeta en un ángulo de 45° sobre la línea horizontal. Se ha observado que algunos técnicos de laboratorio sostienen la pipeta en posición casi horizontal con la placa, lo que permite que el suero se adhiera a los lados de la punta de la pipeta.
- No deben utilizarse pipetas de bocas anchas o rotas.
- Las gotas del antígeno deben dejarse caer en posición vertical. Si el gotero es mantenido en ángulo, o si se hace un movimiento como para tirar la gota, podrá variar la cantidad que caiga.
- La mezcla del antígeno con el suero debe empezarse con la dilución más alta (1/200 si se utilizan 4 diluciones) y la extensión de la mezcla deberá graduarse desde un diámetro de 18 a 27 mm.
- La mezcla debe ser completa y homogénea. Cuando la mezcla no es completa, las concentraciones más altas de aglutininas pueden causar una aglutinación parcial.
- La luz de la caja de lectura debe apagarse después de que la mezcla esté terminada y la caja deberá cubrirse con su tapa de vidrio. En tiempo caluroso, el calentamiento preliminar de la placa de vidrio no es necesario. Si se deja prendida



la luz puede producirse una evaporación excesiva, lo que dificulta o imposibilita la interpretación de los resultados.

Aglutinaciones falsas

En raras ocasiones se puede encontrar un suero bovino que aglutina aparentemente en diluciones de 1/25 o 1/50 antes de la rotación de la placa para la lectura de las pruebas; al hacerse la rotación de la placa los grumos se dispersan completamente para dar una lectura negativa, y después de 1 o 2 minutos, los grumos pueden volver a aparecer. Este fenómeno debe interpretarse como una falsa aglutinación.

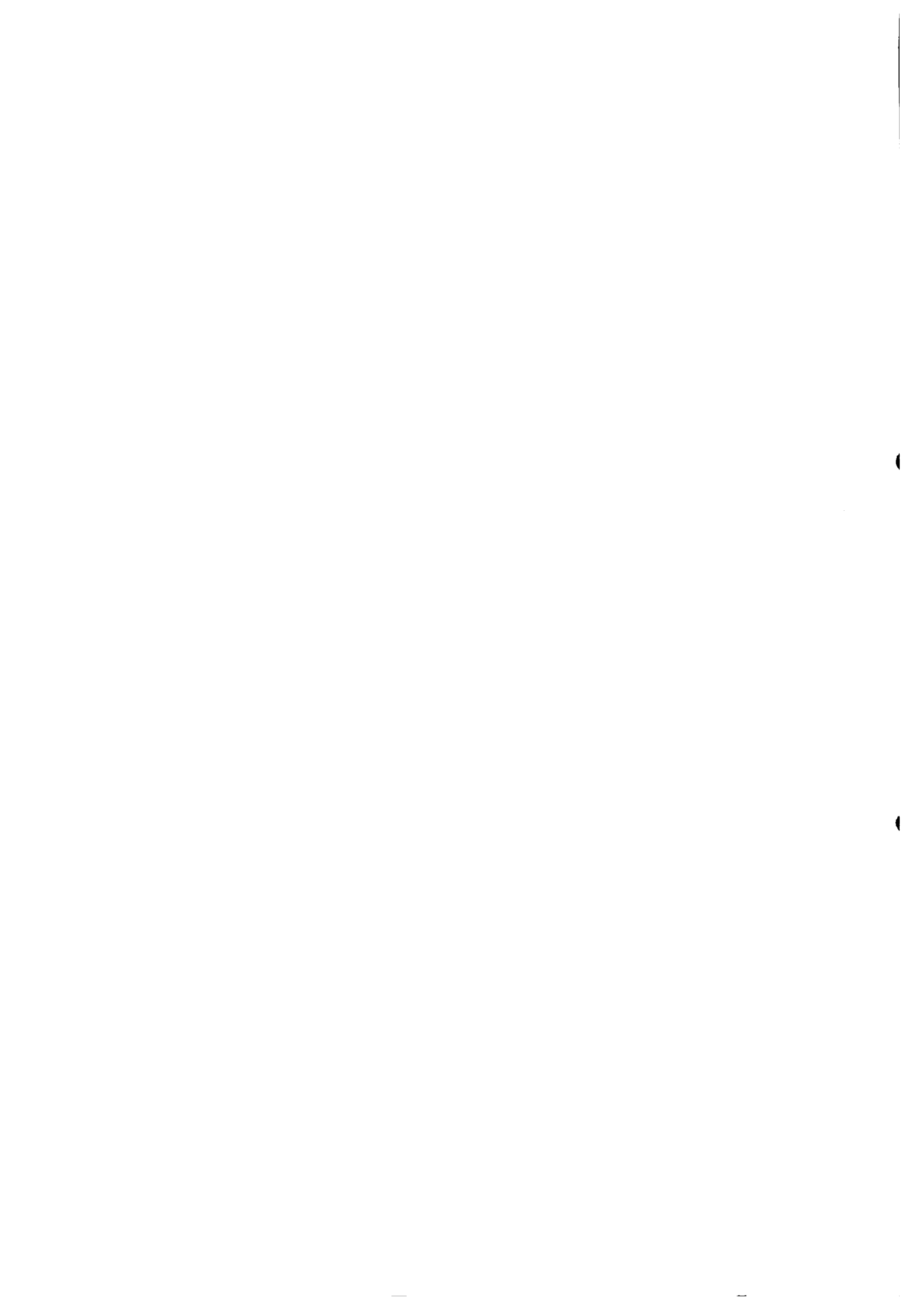
Fenómenos de zona: En ciertas ocasiones, puede ocurrir que se encuentre aglutinación en las diluciones más altas, pero no en las más bajas. Esta inhibición en las diluciones bajas es llamada 'fenómeno de zona' y el motivo exacto del mismo no se conoce. Cualquier prueba hecha por el procedimiento de rutina de diluciones que demuestre una tendencia hacia la aglutinación en 1/100 y 1/200 solamente, deberá hacerse por el procedimiento de diluciones para determinar el título final y así establecer si existe o no el fenómeno de zona.

Pruebas con muestras hemolizadas: La presencia de hemólisis en las muestras de suero interfiere en la eficiencia de la prueba de aglutinación en tubo, no sólo porque la coloración turbia puede enmascarar la reacción de aglutinación, sino porque se forma un precipitado como resultado de la acción del fenol que contiene el antígeno sobre la hemoglobina libre. Es muy difícil distinguir esta falsa precipitación de la aglutinación específica del antígeno

La existencia de hemólisis excluye el empleo del método del tubo, porque se usan cantidades relativamente abundantes de sustancias preservadoras en esta prueba. En estos casos puede utilizarse, dentro de ciertos límites, la prueba en placa, teniendo en cuenta que en ella hay menor cantidad de sustancias preservadoras. Además, el período de incubación más corto de la prueba en placa tiende a reducir el riesgo de que se forme una falsa aglutinación. Aún así, debe reconocerse mayor grado de exactitud para las pruebas con sueros claros que con aquellos que muestran evidencia de hemólisis

1.1.3 Prueba del Rosa de Bengala o Prueba de la Tarjeta o Card Test

La prueba se basa en la inhibición de algunas aglutininas inespecíficas a pH bajo. Se emplea un antígeno corpuscular de 8% de concentración celular en una solución tope a pH 3.65.



El método tuvo su origen en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. En la actualidad, existen firmas norteamericanas y europeas que lo comercializan con algunas variantes de nombres y equipos, algunos de ellos amparados por patentes internacionales.

1.1.3.1 Materiales y reactivos

- Las casas comerciales suministran equipos completos con instrucciones detalladas.
- Con algunas restricciones, la prueba se puede realizar con las láminas de vidrio y las pipetas de la prueba de aglutinación en placa.
- Antígeno rosa de bengala.

1.1.3.2 Procedimiento

En líneas generales, la prueba se realiza en la forma siguiente:

- Colocar 0.03 ml de plasma o suero problema sobre uno de los cuadrados de la lámina de vidrio (o tarjeta de cartón, lámina de plástico, etc.).
- Colocar una gota (0.03 ml) de antígeno rosa de bengala (de card test) cerca de la gota del suero.
- Mezclar bien el suero y el antígeno utilizando un agitador o mondadientes distinto para cada muestra. La superficie ocupada por la muestra debe tener un diámetro de 23-24 mm.
- Hacer girar la lámina o tarjeta durante 4 minutos a razón de 10-12 movimientos por minuto. Esto se puede hacer en forma manual o con rotadores diseñados especialmente.

1.1.3.3 Lectura e interpretación

El resultado de la prueba se lee a los 4 minutos sobre un fondo blanco. Las reacciones positivas presentan grumos de aglutinación, que pueden ser grandes o pequeños.

La prueba es cualitativa, por lo que el resultado se informa como positivo o negativo.

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

Es aconsejable utilizar la prueba como tamiz y someter los sueros que presentan algún tipo de reacción a una prueba confirmatoria como, por ejemplo, la de aglutinación lenta o la de fijación del complemento.



Precauciones

- El antígeno debe mantenerse en refrigeración a una temperatura de 4-8°C. Se debe evitar su congelación, porque queda inutilizado para la prueba.
- Tanto el antígeno como el suero deben mantenerse a temperatura ambiente por lo menos 1 hora antes de realizar la prueba.
- Los goteros deben lavarse con agua destilada al terminar la jornada de trabajo.

1.1.4 Prueba del Mercaptoetanol

La prueba se basa en la propiedad de los compuestos químicos con grupos sulfhidrilos, como el 2-mercaptoetanol, de inactivar las inmunoglobulinas IgM.

El mercaptoetanol es sensible a la luz y al calor y se deteriora rápidamente por exposición al aire. Se debe conservar en frascos ámbar herméticamente cerrados y en refrigeración.

1.1.4.1 Materiales y reactivos

- Antígeno para la prueba en tubo indicado en el ítem 1.1.1
- Solución de 2-mercaptoetanol (2-ME) 0.1 M.

Se prepara una *solución de 2-mercaptoetanol* agregando 7.80 ml de 2-mercaptoetanol a 992.20 ml de solución de cloruro de sodio al 0.85%. (No utilizar salina fenolada). Esta solución debe ser conservada en la refrigeradora y descartada luego de una semana.

Preparación del antígeno

Se utiliza el antígeno de la prueba de aglutinación en tubo diluido al 2% en solución salina fisiológica (0.09% en la prueba).

Equipo necesario

El mismo que para la prueba de aglutinación en tubos.

1.1.4.2 Procedimiento

En la práctica de rutina la prueba del 2-mercaptoetanol se realiza simultáneamente con la prueba de aglutinación lenta en tubo. Se procede de la forma siguiente:

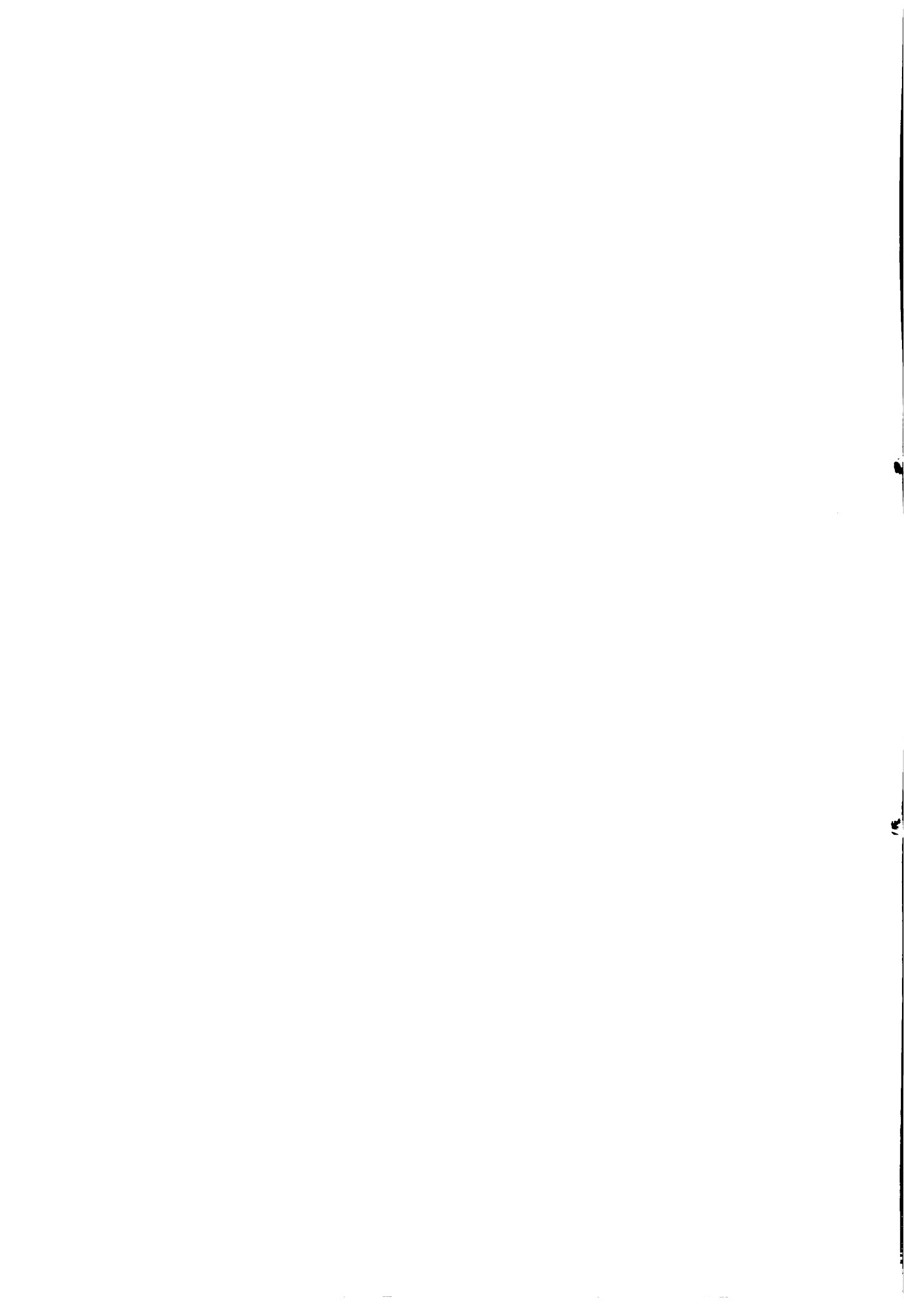
- Por cada muestra de suero problema, colocar en una gradilla 2 hileras de 5 tubos 13 x 100 mm cada una.
- Identificar el primer tubo de cada hilera con el número correspondiente al suero problema.
- Una de las hileras se destina a la prueba de mercaptoetanol y se marca con una M. La otra hilera, en la que hará la prueba en tubo, se marca con una T.
- Con una pipeta 0.2 ml (preferentemente, la pipeta especial serológica de brucelosis o de Bang) se carga el suero hasta sobrepasar un poco la graduación superior. Con una toalla de papel, limpiar el extremo de la pipeta y, manteniendo ésta en posición vertical sobre la pared del tubo que contiene la muestra, dejar gravitar el suero hasta que el fondo del menisco en el interior de la pipeta esté nivelado con la graduación tope. Insertar la pipeta hasta el fondo del primer tubo de una hilera, dejar que fluya 0.08 ml de suero y retirar la pipeta a lo largo de la superficie interior del tubo. Utilizando el mismo procedimiento, echar 0.04 ml de suero en el segundo tubo; 0.02 ml en el tercer tubo; 0.01 ml en el cuarto y 0.005 ml en el quinto tubo.

Repetir el procedimiento descrito para depositar las mismas cantidades de suero en la segunda fila.

- Pipetear las muestras sucesivas en forma similar en cada 2 hileras de tubos adecuadamente identificados.
- Incluir un suero control conocido con actividad aglutinante en la prueba de tubo 1:200 o superior y negativo en la prueba de mercaptoetanol.
- Con una jeringa automática de 2 ml, agregar 1 ml de solución de 2-mercaptoetanol 0.1M en cada tubo de las hileras M y mezclar muy bien agitando la gradilla.
- Con una jeringa automática de 2 ml agregar 1 ml de solución salina fenolada al 0.5% a cada uno de los tubos de las hileras T.
- Dejar las gradillas con las mezclas durante una hora a temperatura ambiente y agregar a cada tubo 1 ml de antígeno de tubo diluido al 2% (0.09%) en solución salina fisiológica. Mezclar bien agitando la gradilla y cada tubo por separado.

1.1.4.3 Lectura e interpretación

La prueba del mercaptoetanol se incuba, se observa y se lee de igual forma que la prueba de aglutinación en tubos. Los tubos deben ser controlados de cerca para verificar el aclaramiento. Ocasionalmente, el tubo de la dilución 1:25 puede estar ligeramente opaco, mientras que los tubos subsiguientes están claros. Esto no debe ser tomado en cuenta, considerándose la prueba como positiva.



La prueba del mercaptoetanol debe hacerse siempre en forma paralela y simultánea con la prueba de aglutinación en tubo. La diferencia entre los títulos finales de ambas pruebas se interpreta como la capacidad aglutinante del suero debida a los anticuerpos IgM presentes en el mismo.

La presencia de IgG se asocia generalmente con infección activa, por lo que toda reacción en esta prueba debe ser considerada como indicativa de infección. Los animales vacunados ocho o más meses de la realización de la prueba suelen tener solamente anticuerpos sensibles al mercaptoetanol. Los animales reaccionantes a esta prueba se deben considerar infectados aunque tengan antecedentes de vacunación, siempre que esta haya sido efectuada por lo menos ocho meses antes.

Los resultados negativos en la prueba del mercaptoetanol no son concluyentes porque en el período inicial de la enfermedad la mayoría de los anticuerpos presentes son del grupo IgM. Se ha demostrado también que algunas personas enfermas de brucelosis nunca desarrollan una cantidad de IgG suficiente para que sea detectable por las pruebas de mercaptoetanol.

Precauciones

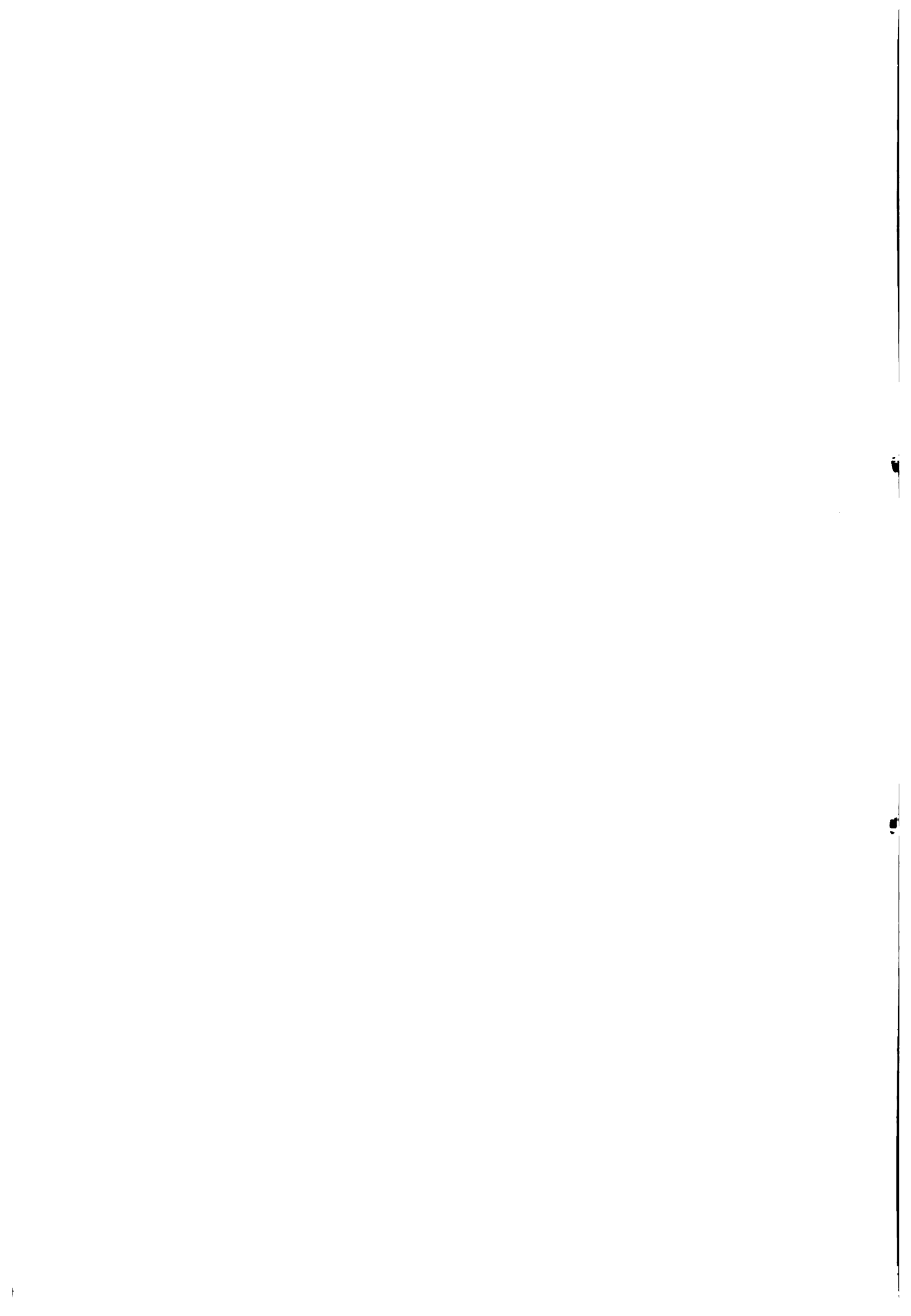
- El 2-mercaptoetanol es sensible a la luz y al calor y se deteriora rápidamente por exposición al aire. Se debe conservar en frascos color ámbar herméticamente cerrados y en refrigeración.
- En cada jornada de trabajo se debe incluir un suero seleccionado especialmente, con un alto contenido de anticuerpos IgM anti - *Brucella* y que no contenga IgG detectable por la prueba.
- En cada jornada se deben incluir también tubos de control del antígeno y se realizarán pruebas con sueros testigos positivos de título conocido y con sueros negativos.

1.1.5 Prueba del Rivanol

La prueba se basa en la precipitación de la albúmina y las macroglobulinas por la acción del lactato de 2 etoxi-6-9-diamino acridina (rivanol)

1.1.5.1 Materiales y reactivos

- Tubos de ensayo 13 x 100 o similares.
- Pipetas serológicas Bang.
- Placa de vidrio dividida en cuadros de 3.5 cm. de lado.
- Caja aglutinoscopio con fondo negro y luz indirecta.
- Palillos mondadientes o un agitador múltiple.



- Gotero calibrado para 0.03 ml/gota.
- Reloj de laboratorio.
- Centrífuga.
- Antígeno para la prueba del rivanol.
- Solución rivanol al 1%.

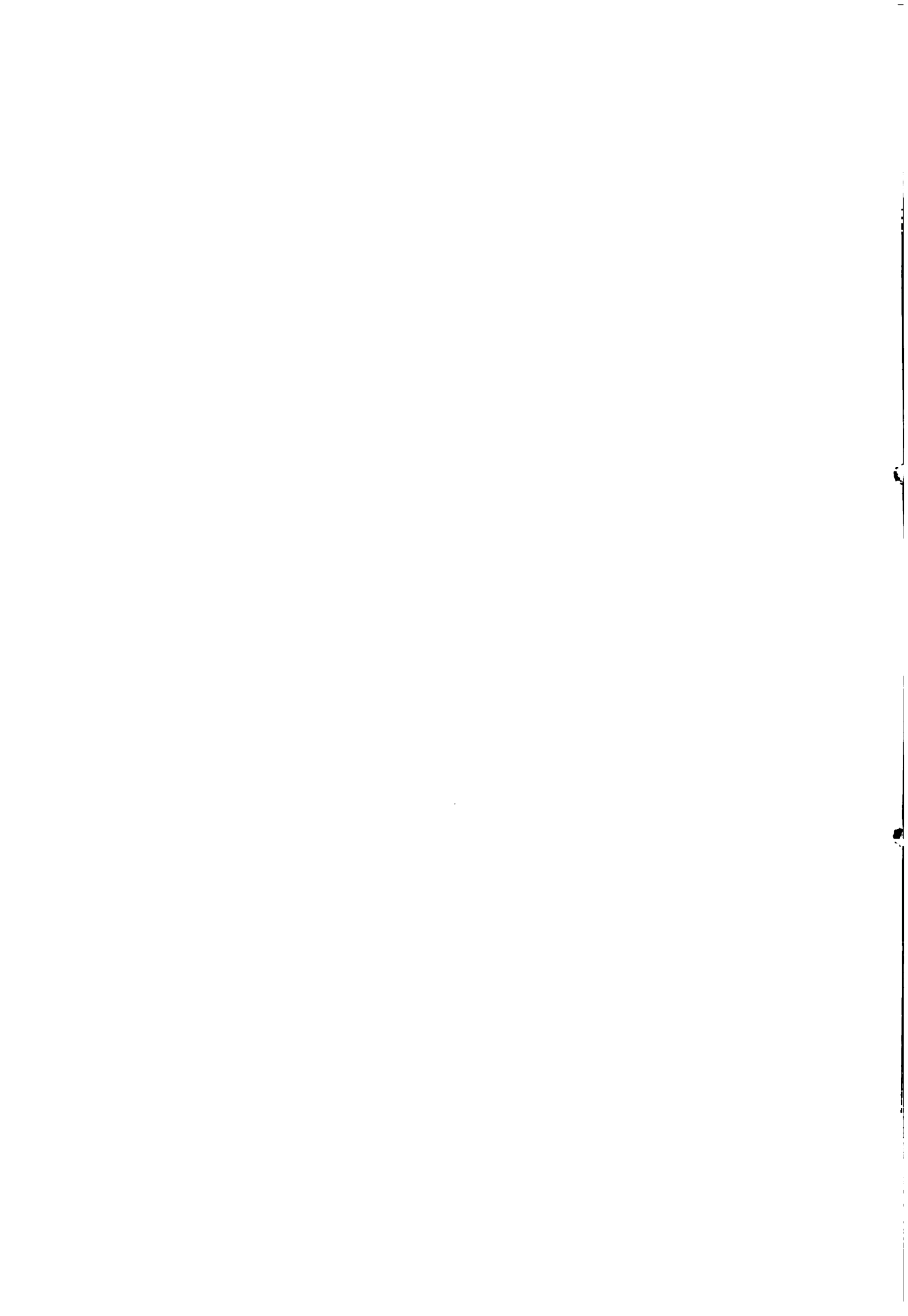
1.1.1.1 Procedimiento

- El suero problema, el antígeno y la solución de rivanol deben estar a temperatura ambiente por lo menos una hora antes de realizar la prueba.
- En un tubo pequeño (13 x 100 mm), depositar 0.4 ml del suero problema. Agregar 0.4 ml de solución rivanol y mezclar bien agitando el tubo y dejar a temperatura ambiente no menos de 10 minutos y no más de 1 hora.
- Centrifugar las mezclas de 1 000 xg (aproximadamente 2 000 rpm en un cabezal de 23 cm de radio total hasta el extremo del portatubo), durante 5–10 minutos.
- Con pipeta serológica de Bang, aspirar el líquido sobrenadante y hacer una prueba de aglutinación similar al método de Huddleson. En una placa de vidrio clara y limpia, depositar cantidades de 0.08, 0.04, 0.02 y 0.01 ml.
- Agregar una gota (0.03 ml) de antígeno rivanol a cada cantidad de líquido sobrenadante, mezclar con un palillo mondadientes o agitador múltiple, comenzando con la cantidad más pequeña (0.01 ml). Cada dilución debe ser extendida de forma que cubra la superficie indicada para la prueba estándar de aglutinación en placa (18, 21, 24 y 27 mm, respectivamente).
- Si se usa agitador metálico, enjuagarlo y secarlo bien antes de pasar a la muestra siguiente.
- Inclinar la placa imprimiéndole movimiento circular y haciéndola girar 4 veces. Preparar el reloj para que suene a los 12 minutos.
- Transcurridos 6 minutos, girar 4 veces la placa en la forma indicada en el punto anterior. A los 12 minutos rotar nuevamente la placa y efectuar la lectura con luz indirecta sobre fondo negro.

1.1.1.1 Lectura e interpretación

Para facilitar las lecturas y la comparación con los resultados en otras pruebas se acepta denominar a las diluciones obtenidas como de 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200, respectivamente.

El resultado se expresa en función de la dilución más alta en la que se observa aglutinación.



Cualquiera sea el título de reacción, se interpreta como infectado, ya que la prueba solamente detecta anticuerpos del grupo IgG en la misma forma que en la prueba del mercaptoetanol.

El rivanol puede causar cierta precipitación de inmunoglobulinas IgG, por lo cual el título final puede ser inferior al obtenido con la prueba de mercaptoetanol.

1.1.1 Prueba de la Antiglobulina o de Coombs

La prueba fue diseñada para detectar anticuerpos monovalentes o incompletos que reaccionan con el antígeno homólogo sin producir aglutinación. La prueba se basa en el uso de un suero específico antiespecie para el animal problema, por ejemplo, suero antiglobulina humana para investigar brucelosis en el hombre, antiglobulina de cerdo para estudiar la enfermedad en estos animales.

1.1.1.1 Materiales y reactivos

- Antígeno para aglutinación lenta en tubo.
- Tubos de ensayo 13 x 100.
- Suero antiglobulina, preparado generalmente en conejo, contra la especie que se debe estudiar.
- Centrifuga.

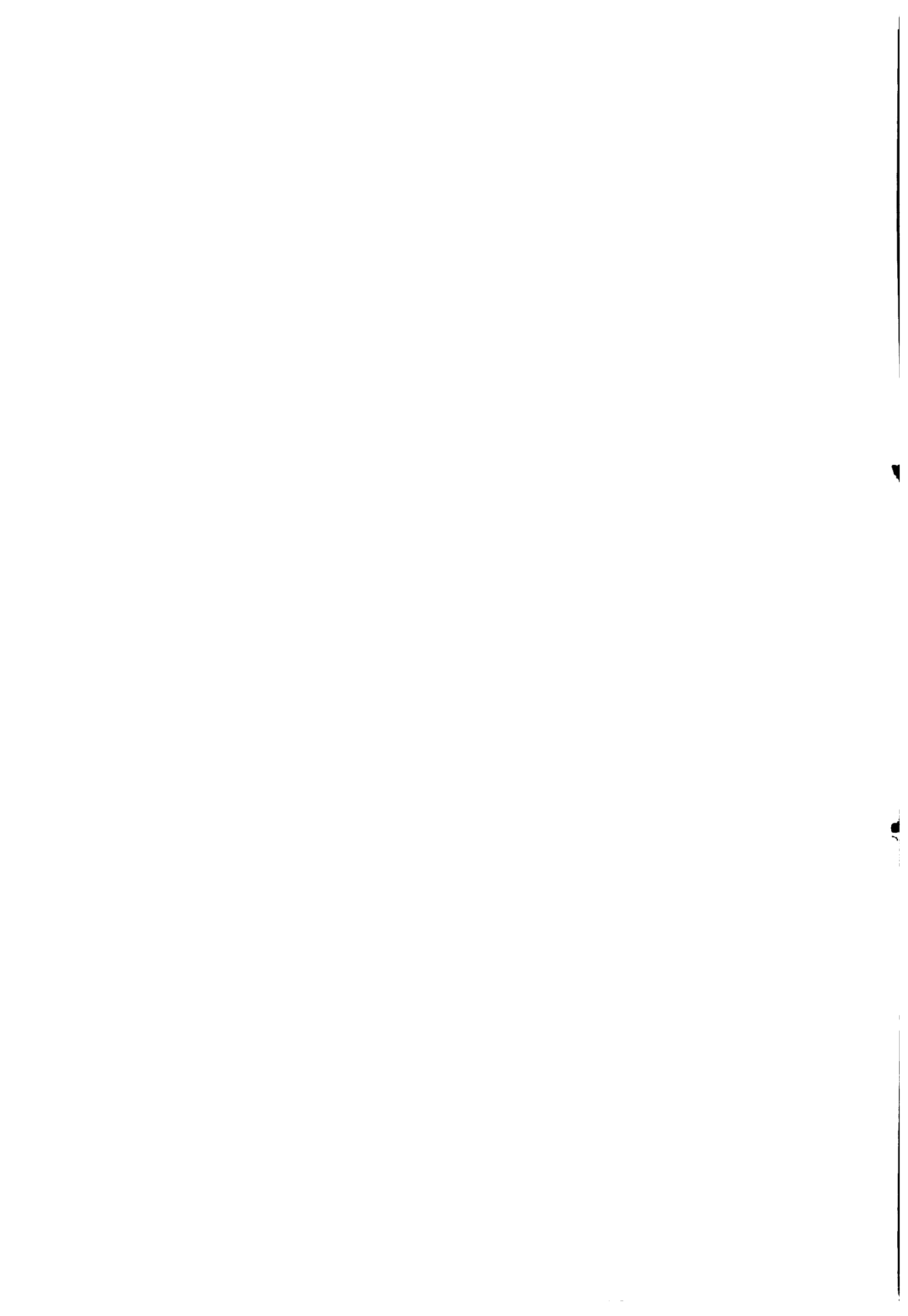
Preparación de sueros antiglobulínicos

Los sueros antiglobulínicos se preparan generalmente en conejos, aunque para la producción industrial se puede utilizar el caballo, la cabra o la oveja. En general, es preferible usar una especie animal que tenga poca relación con aquella para la cual se requiere preparar el suero antiespecie.

En la prueba de la antiglobulina o de Coombs, se puede emplear suero antisuero total o bien suero antiglobulínico. En el primer caso se inoculan conejos con el suero de la especie que se requiere: 1 ml de suero sin diluir se inyecta diariamente a cada conejo por vía intravenosa e intraperitoneal alternadas y se sangra a los 10 días después de la última inyección.

Para obtener sueros antiglobulínicos se procede de la forma siguiente:

- Preparar 200 ml de solución saturada de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.
- A 100 ml de suero normal, agregar 50 ml de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.
- Centrifugar a 2 000 xg, de preferencia en refrigeración.



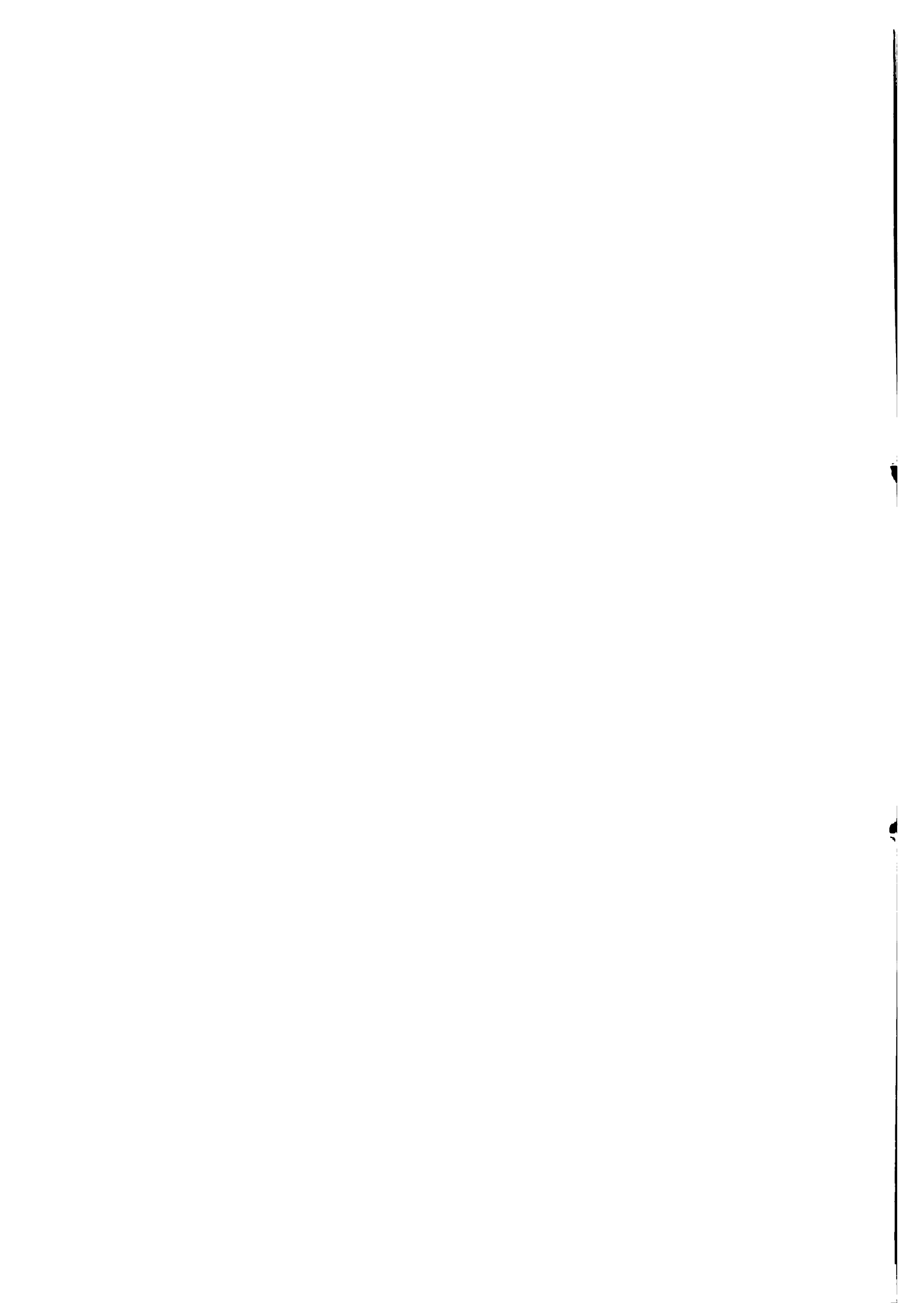
- Disolver el sedimento con 50 ml de agua destilada y agregar poco a poco y con agitación constante, 25 ml de la solución saturada de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.
- Centrifugar y repetir el punto anterior 5 veces.
- Dialisar contra solución salina fisiológica fría hasta que las pruebas de sulfato sean negativas (precipitación con cloruro de bario al 10%); seguidamente, dializar contra agua destilada fría con cambios frecuentes de ésta.
- Agregar merthiolate hasta concentración final de 1:10 000 y mantener en frío.
- Mezclar una parte de la solución de globulinas obtenida con otra parte de adyuvante de Freund. Si no se dispone de éste, preparar el adyuvante según la fórmula siguiente:
 - 4 partes de Arlachel A
 - 50 partes de aceite mineral
- Las globulinas y el adyuvante deben emulsionarse preferentemente, lo cual se comprueba porque una gota de dicha emulsión suspendida en el agua no se disemina.
- Inocular cada conejo por vía intramuscular con 1 ml de la preparación. Repetir semanalmente las inyecciones, hasta completar 4 semanas.
- Diez días después de la última inoculación, sangrar los conejos, separar el suero y titularlo.

Titulación del suero antiglobulínico

Se necesita un suero positivo de la especie animal para la que se elaboró la antiglobulina. Es preferible un suero de alto título procedente de un animal con infección activa.

Para la titulación propiamente dicha se procede en la forma siguiente:

Colocar 1 ml. de las diluciones del suero positivo anti-*Brucella* en cada tubo de las 5 hileras de acuerdo con el esquema del Cuadro 3. Agregar a cada tubo 1 ml. de antígeno de tubo diluido 1:15 en solución salina fisiológica.



Cuadro 3

TITULACION DE LA ANTIGLOBULINA EN LA PRUEBA DE COOMBS

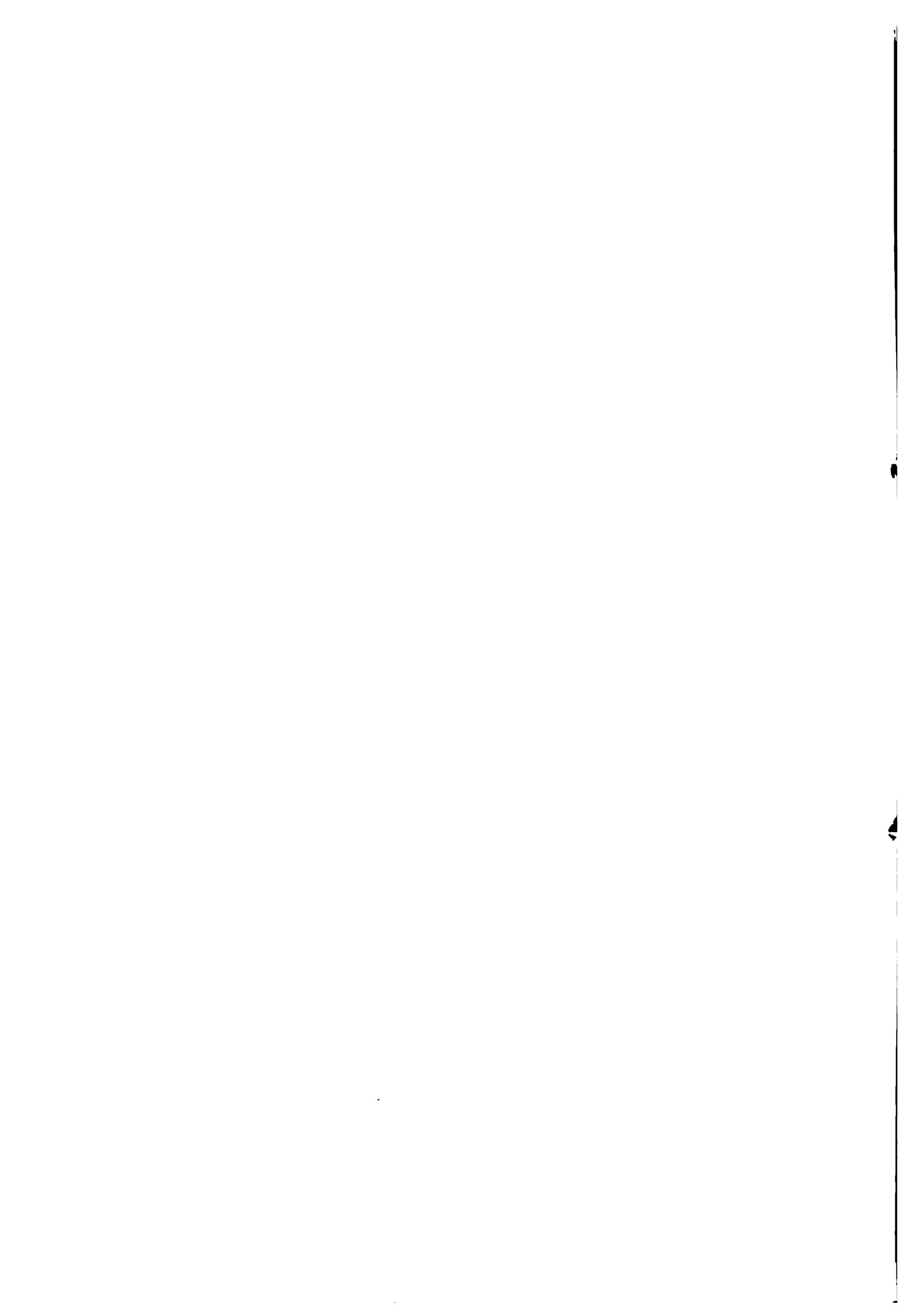
Diluciones de la antiglobulina	Diluciones del suero positivo anti- <i>Brucella</i>								
	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
1 : 50	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1 : 100	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1 : 200	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1 : 400	+		+	+	+	-	-	-	-
1 : 800	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Después de 24 horas de incubación, descartar los tubos en los que hay aglutinación. Centrifugar los negativos y lavar 4 veces los sedimentos. Agregar a cada hilera la dilución apropiada de antiglobulina e incubar los tubos durante 24 horas

Las lecturas se hacen en la misma forma que para la aglutinación lenta en tubo. El título del suero antiglobulínico es la mayor dilución del mismo que presenta aglutinación con la dilución más alta de suero anti - *Brucella*.

Técnica de la prueba de Coombs “europea”

- Preparar dos hilera de 8 o más tubos de 13 x 100.
- En el primer tubo de cada hilera, colocar 0.16 ml de suero problema y 2 ml de solución fisiológica. En los tubos restantes, poner 1 ml de solución salina al 5%.
- Con una pipeta de 2 ml mezclar bien el contenido del primer tubo y transvasar 1 ml al segundo tubo. Mezclar bien con otra pipeta de 2 ml y transvasar 1 ml al tubo siguiente. Continuar de esta forma hasta el último tubo, de cuyo contenido descartar 1 ml. Proceder en la misma forma con la segunda hilera.
- A cada tubo agregar 1 ml de antígeno para prueba en tubo a la concentración de 0.33% (o sea, la suspensión madre de antígeno para la prueba lenta diluido a 1:15 en solución salina al 5%).
- Agitar muy bien los tubos e incubar la prueba a 37°C durante 24 horas.
- Leer la prueba y anotar los resultados en igual forma que en la prueba lenta en tubo.



- Descartar los tubos que presenten aglutinación e identificar cada uno de los tubos negativos.
- Centrifugar los tubos negativos a 2 500 x g durante 20 minutos (es recomendable hacerlo en centrífuga refrigerada a 4°C) y descartar el sobrenadante.
- Colocar los tubos en un agitador vibratorio durante 5 minutos para suspender el sedimento en el residuo de sobrenadante. Agregar 2 ml de solución salina fisiológica y agitar nuevamente los tubos.
- Repetir 3 veces los lavados y después del último, suspender los sedimentos correspondientes a la primera hilera con 1 ml de antiglobulina de especie previamente titulada. Suspender los sedimentos de la segunda hilera con 1 ml de solución salina fisiológica.
- Incubar nuevamente los tubos durante 24 horas.

1.1.1.1 Lectura e interpretación

Leer la aglutinación en la misma forma que en la prueba de tubo.

La prueba de Coombs se interpreta como positiva cuando la hilera que contiene antiglobulina en diluciones más altas que la hilera sin ella. Se eliminan así las aglutinaciones causadas por la acción física de los lavados y las centrifugaciones.

La prueba es muy útil para descubrir enfermos crónicos con resultados de diagnóstico dudoso en otras pruebas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que es muy sensible y que puede ser positiva en individuos que alguna vez fueron expuestos a *Brucella*, como veterinarios y laboratoristas, que no tienen ningún signo de enfermedad.

En la mayoría de los casos, el resultado negativo en la prueba de Coombs descarta la brucelosis.

Prueba de la antiglobulina modificada por Hajdu

- Distribuir solución salina fisiológica en 5 tubos (12 x 75 mm), 0.08 ml en el primero y 0.5 ml en cada uno de los restantes (hacer un duplicado para control). Agregar al primer tubo 0.2 ml del suero problema y calentar la mezcla en baño maría a 70°C durante 10 minutos cuidando de no sobrepasar el tiempo ni la temperatura.
- Transvasar 0.5 ml de la mezcla del primer tubo al segundo y mezclar. Pasar 0.5 ml del segundo al tercer tubo y repetir el procedimiento hasta el último, del que se descartarán 0.5 ml de la mezcla.
- Agregar 0.5 ml de antígeno estándar para aglutinación lenta, cuya concentración celular se habrá ajustado a 0.30% diluyendo 1:15 la suspensión madre del antígeno de prueba lenta. (La concentración final del antígeno resulta aproximadamente 6 a 7 veces mayor que la del antígeno de la prueba estándar).



- Incubar a 37°C durante 2 horas.
- Agregar 1.5 ml de solución salina fisiológica y mezclar.
- Centrifugar a 2 500 g durante 20 minutos (2 500 g equivalen a 3 118 revoluciones por minuto en un cabezal de 23 cm. de radio). Según la máquina de que se disponga en el laboratorio, se puede ajustar la fuerza de centrifugación mediante la fórmula general:

$$g = FRC = R \times N^2 \times 0.00001118.$$

Si no fuera posible conseguir la fuerza de gravedad requerida, aumentar el tiempo de centrifugación.

- Descartar el sobrenadante y suspender el sedimento en 0.1 ml (2 o 3 gotas) de salina fisiológica. Colocar los tubos en una gradilla sobre un agitador vibratorio durante 2 a 3 minutos. Agregar 2 ml. de salina fisiológica y mezclar.
- Repetir los lavados 2 veces más, 3 en total. Estos lavados son muy importantes, ya que es necesario eliminar todo resto del suero.
- Después de la última centrifugación, resuspender el sedimento en una gota de solución salina mediante el vibrador mecánico. Agregar a una de las hileras 1 ml de suero antiglobulínico de especie (anti-humano, anti-bovino, anti-cerdo, etc., según el caso) previamente titulado. Agregar 1 ml de solución salina fisiológica a la otra hilera. Mezclar bien.
- Incubar en estufa a 37°C durante 17-20 horas Leer la aglutinación en la misma forma que en la prueba estándar en tubos.

Nota: Es aconsejable incluir cada vez un suero positivo y otro negativo.

1.1.1 Prueba del Anillo en la Leche (PAL) o Milk Ring Test (MRT)

La prueba del anillo detecta la presencia de anticuerpos en la leche. Estos anticuerpos reaccionan con el antígeno coloreado de *Brucella*; forman con él un complejo, que se adhiere a la superficie de los glóbulos de grasa de la leche y que asciende con ellos para formar una capa de crema coloreada. En ausencia de anticuerpos específicos, la capa de crema será blanca y la columna de leche estará coloreada por las células de brucelas teñidas que contiene en suspensión.

Esta prueba se emplea para diagnosticar la infección en rebaños. Su sensibilidad es tal que permite detectar la infección en la leche de una sola vaca mezclada con la de muchas vacas sanas.



1.1.1.1 Materiales y reactivos

Antígeno para la prueba del anillo en leche.

Toma de la muestra

- a) *En el campo:* Tan pronto se ha llenado el tarro y antes de que la crema suba, revolver bien el contenido y tomar unos 50 ml de leche. Agregar 1 ml de suspensión de formalina al 1% por cada 10 ml de leche. Las muestras, bien identificadas, se transportan refrigeradas hasta el laboratorio.
- a) *En las plantas pasteurizadoras o lugares de acopio:* Elegir los tanques del menor tamaño posible, cuya procedencia pueda ser identificada. Mezclar bien la leche de cada tanque para que la crema represente un término medio y tomar una muestra de unos 50 ml Agregar 1 ml de suspensión de formalina al 1% por cada 10 ml de leche.

Las muestras de leche deben mantenerse en refrigeración a una temperatura de 4-6°C hasta que hayan transcurrido no menos de 24 horas desde su recolección (preferiblemente, 48-72 horas). Una hora antes de la prueba, se llevan a temperatura ambiente tanto las muestras como el antígeno.

1.1.1.1 Procedimiento

- Mezclar cada muestra invirtiendo varias veces el recipiente (tubo o frasco).
- Colocar 1 ml de la muestra en un tubo 12 x 75 mm.
- Agregar una gota (0.03 ml) de antígeno de cada tubo. Mezclar bien invirtiendo el tubo varias veces, sin que se llegue a formar espuma. No debe quedar antígeno sobre las paredes.
- Incubar a 37°C durante 1 hora.

1.1.1.1 Lectura e interpretación

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

Precauciones

- El exceso o la escasez de crema dificulta la interpretación de la prueba.

- La agitación vigorosa, así como el uso de leche “homogeneizada” dificulta la realización de la prueba.
- El calentamiento de la leche interfiere con los resultados; por tanto, la prueba no se puede efectuar con leches pasteurizadas, a menos que se les agregue crema de leche sin pasteurizar o que se las diluya con leche fresca de vacas negativas.
- Cuando la prueba se efectúa el mismo día en que se ha recolectado la leche, se pueden obtener algunos resultados positivos falsos o dudosos.
- La leche de calostro puede dar resultados positivos falsos.
- La leche de vacas con mastitis también puede dar falsos positivos o impedir la interpretación de la prueba debido a la decoloración del antígeno.
- La leche de vacas próximas a secarse puede dar resultados dudosos o falsos positivos.
- Hay vacas infectadas con brucelas que no eliminan anticuerpos por la leche. Estas vacas son positivas en las pruebas de sangre y negativas en la prueba del anillo.
- Si la leche es mala calidad por su alto contenido bacteriano, agregar 2 gotas de una solución saturada de bicarbonato de sodio antes de añadir el antígeno.

Modificación de la prueba para tanques muy grandes

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

Para el estudio en tanques que contienen la leche de 100-200 vacas, colocar 2 ml de leche refrigerada en tubos 13 x 100 mm y agregar una gota de antígeno (0.03 ml).

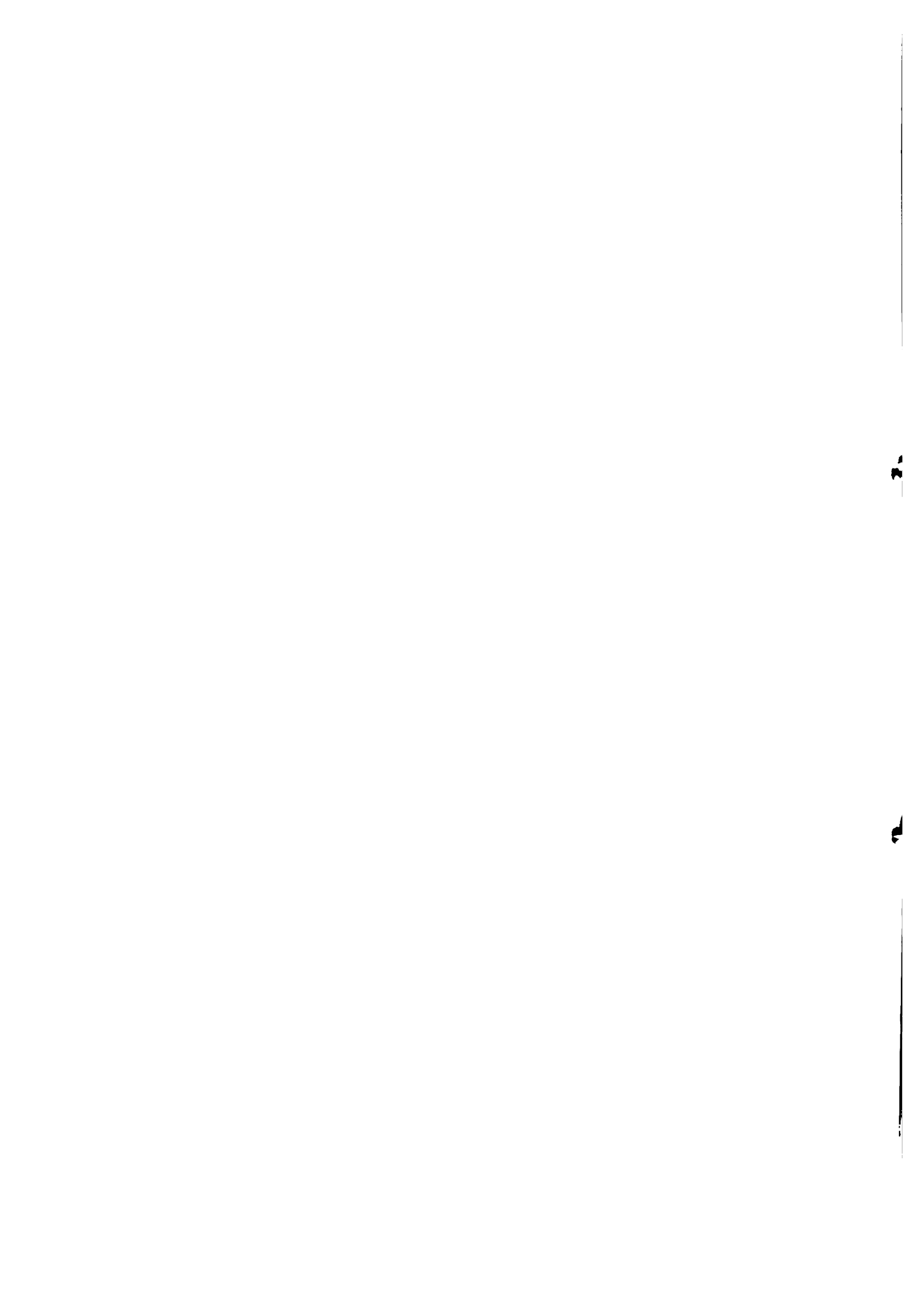
Si el tanque tiene capacidad para coleccionar la leche de 201-500 vacas, aumentar a 3 ml la cantidad de leche para la prueba y agregar una gota de antígeno del mismo volumen (0.03 ml).

Prueba del anillo en leche con diluciones

Esta prueba se utiliza para el diagnóstico en la leche de un animal.

Técnica

- Tomar leche en forma independiente de cada cuarto mamario.
- Agregar 1 ml de formalina al 1% por cada 10 ml de leche y dejar en refrigeración durante no menos de 24 horas.
- Hacer una prueba “tamiz”, para lo cual se mezclan cantidades iguales de cada cuarto. Colocar 0.5 ml de la mezcla en un tubo 12 x 75 mm, agregar 0.5 ml de



leche negativa tomada de distintas vacas y una gota (0.03 ml) de antígeno para la prueba del anillo.

- Incubar a 37°C y leer.
- Si la prueba tamiz da resultado positivo, continuar de la forma siguiente:
 - Disponer en cada una de 4 filas, 10 tubos de 12 x 75 mm.
 - Colocar 1 ml de leche negativa de vacas distintas en cada tubo.
 - En el primer tubo de cada fila, colocar 1 ml de la leche de un cuarto, mezclar bien con la leche negativa y transvasar 1 ml al tercer tubo. Continuar así hasta el último tubo de la fila, del que se descartaría 1 ml de la mezcla. Repetir el procedimiento en las filas restantes.
 - Agregar una gota (0.03 ml) de antígeno a cada tubo. Mezclar bien, incubar 1 hora a 37°C y leer.

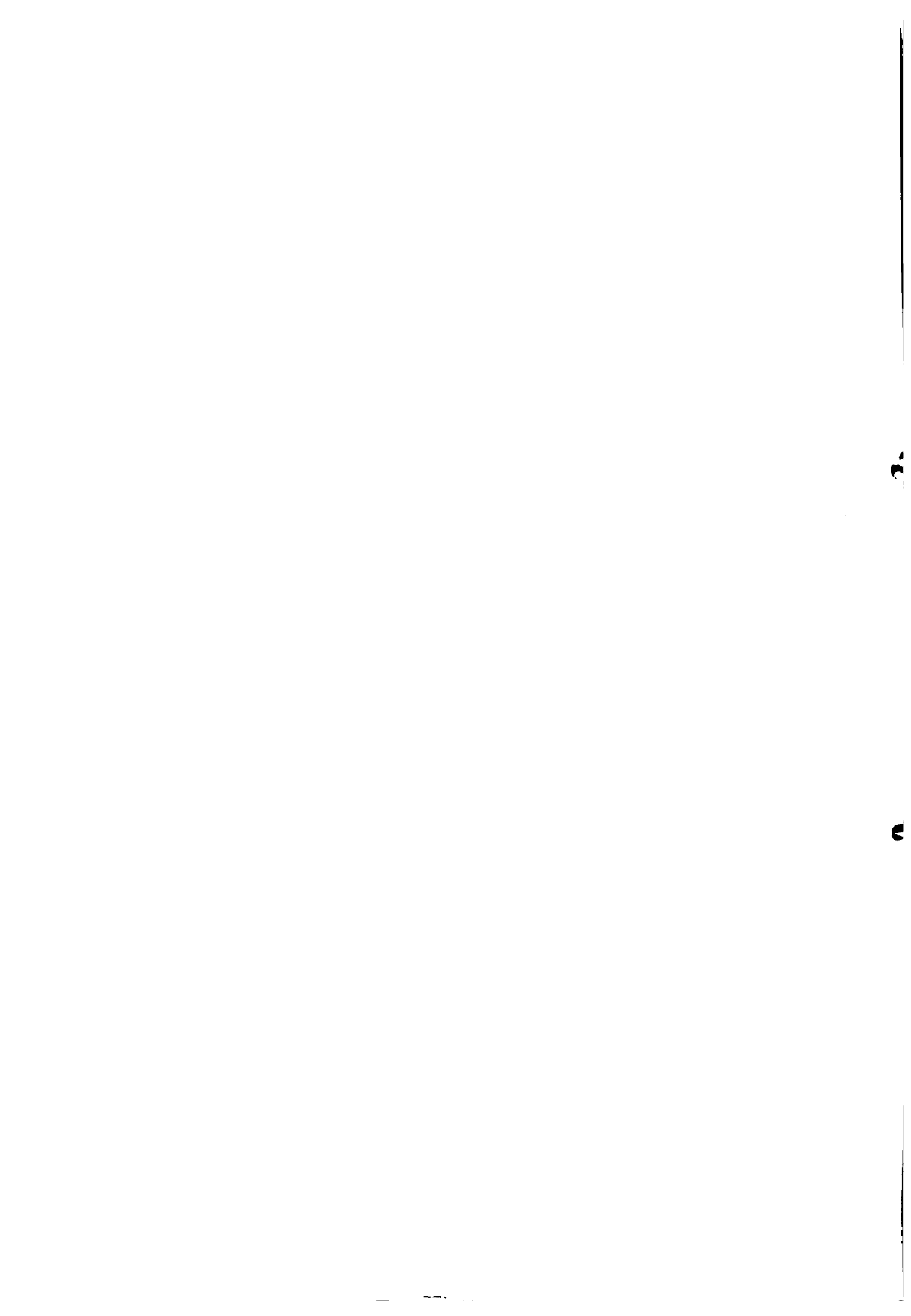
Interpretación

Un título de 1:16 o superior se correlaciona generalmente con infección por *Brucella*. Con frecuencia la infección está localizada en uno o dos cuartos y coincide con el título más alto en la prueba del anillo por cuartos.

1.1.8 Prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar

1.1.8.1 Materiales, reactivos y medios

- Tubos de 15 x 150 mm con tapa de rosca o tapones de goma o silicona
- Láminas de vidrio de 75 x 50 mm
- Pipetas serológicas de 10 ml
- Pipeta Pasteur
- Cajas de petri
- Perforador de agar
- Lupa de mano
- Agar blando al 1% que contenga 1:10 000 de merthiolate. El merthiolate se usa para prevenir la contaminación.
- El tubo que contiene 9 ml de agar blando al 1%, se calienta en baño maría (100°C) hasta que el agar se haya fundido.
- Se vierte una pequeña cantidad (2-3 gotas) sobre la lámina de 75 x 50 mm e inmediatamente se distribuye con el dedo, esparciendo el medio sobre toda la superficie para formar una base sobre la cual se depositará la capa de agar. Se deja solidificar.
- Con una pipeta de 10 ml se distribuyen 8 ml del agar blando fundido alrededor de los 4 bordes de la lámina; luego se corre lentamente la pipeta hacia el centro para



- cubrir uniformemente toda la superficie. El agar no debe salir de la lámina; en caso de que esto ocurra, se debe repetir la operación usando una lámina limpia.
- Las burbujas se eliminan con un palillo y el agar se deja solidificar a temperatura ambiente.
 - Las láminas se colocan en una caja de petri y se llevan a la refrigeradora a 4°C durante 30 minutos o más, para facilitar la solidificación de la capa de agar.
 - Con un perforador de agar especialmente diseñado se perforan simultáneamente 10 hoyos para el suero y una ranura o trinchera central para el antígeno. La ranura central tiene aproximadamente 60 mm de longitud y 4 mm de ancho. A cada lado de la ranura central y a 3 mm del borde respectivo, se ubican 5 hoyos de 6 mm cada uno, separados entre sí por 4 mm. Se retira el agar de dentro de la ranura central y de cada uno de los hoyos por medio de un palillo o una aguja hipodérmica, pinchándolo y retirándolo con un movimiento rápido.
 - Se reintegra la lámina a la caja de petri en cuyo fondo se vierten 3 ml de agua estéril para mantener la humedad.

1.1.8.2 Procedimiento

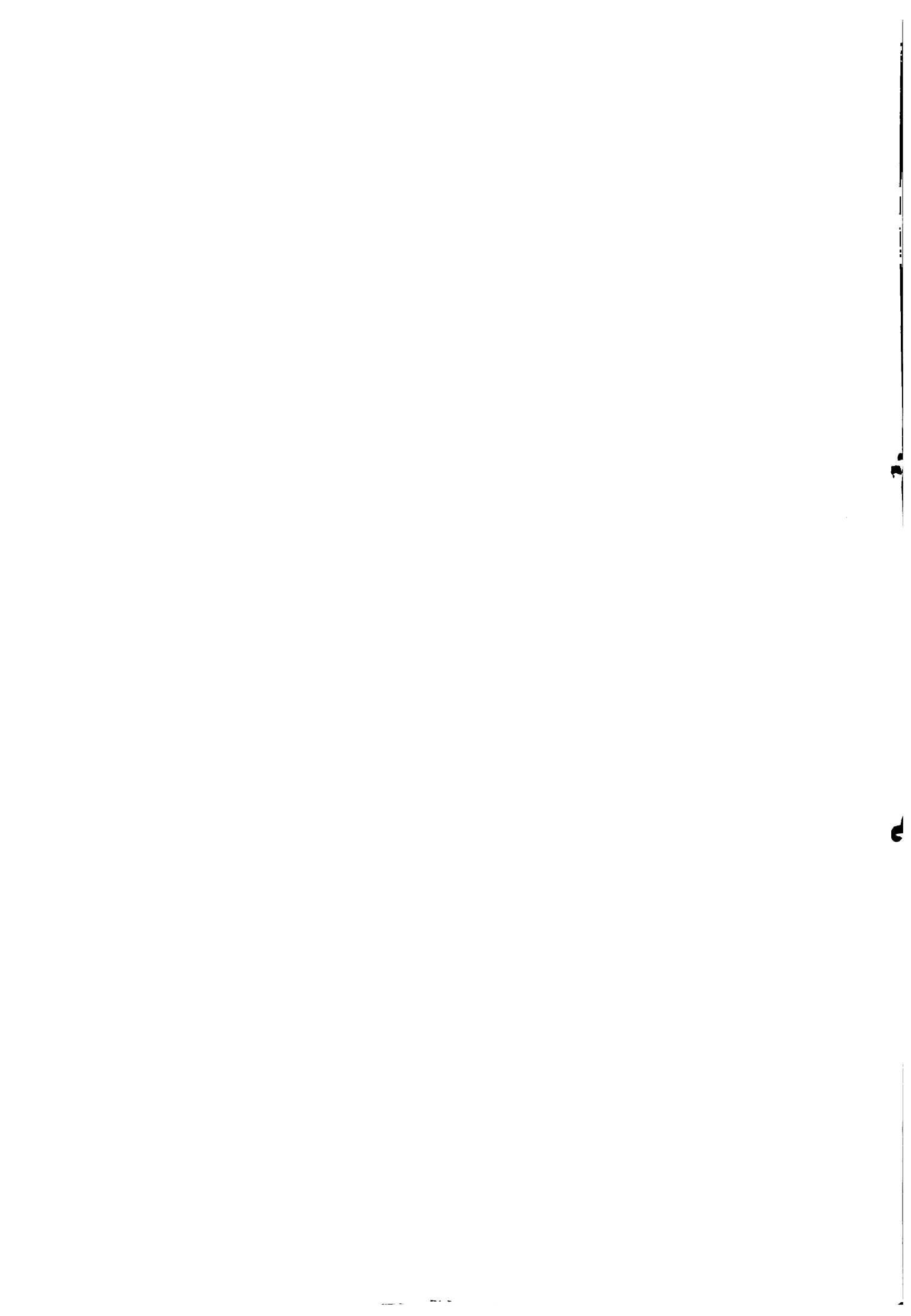
Inmediatamente después de preparada la placa de agar, se procederá a montar la prueba para evitar que la deshidratación provoque una absorción muy rápida de los reactivos.

Los sueros que se van a examinar deben estar libres de glóbulos rojos y haber sido centrifugados previamente. Pueden ser sueros ovinos, si se buscan anticuerpos de *B. ovis*, o de caninos, para anticuerpos de *B. canis*. Se debe disponer de un suero control positivo conocido.

El suero problema se deposita con una pipeta Pasteur en el fondo del primer hoyo, hasta llenarlo completamente (0.1 ml aproximadamente). Se continúa operando en igual forma con los sueros problemas siguientes, hasta el noveno hoyo. En el décimo hoyo se deposita el suero control positivo. En el caso de que se examinen menos de nueve sueros los hoyos restantes se deben llenar con solución salina. ***No se debe dejar nunca un hoyo vacío.***

En la ranura central se colocan aproximadamente 0.5 ml del antígeno, previamente reconstituido en agua destilada estéril. Se verifica que la ranura central quede completamente llena, pero sin desbordar.

Una vez que se hayan depositado el antígeno y los sueros, se debe manipular la lámina muy cuidadosa y suavemente, para evitar la salida de los reactivos o su mezcla.



Las placas se incuban a temperatura ambiente (20–25°C). Se realizan las lecturas a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

1.1.8.3 Lectura e interpretación

Durante la primera lectura, la lámina se mantiene en la caja de petri para evitar cualquier movimiento que pudiera ocasionar pérdida o mezcla de los reactivos. Las lecturas a las 48 y 72 horas se realizan después de extraer cuidadosamente la lámina.

La lectura se efectúa bajo un haz suave de luz indirecta y sobre fondo oscuro, con la ayuda de una lupa.

Los sueros que presentan bandas típicas de precipitación se clasifican como positivos y aquellos en los que no se observan bandas de precipitación se clasifican como negativos.

Los sueros con títulos altos para FC muestran usualmente la formación de bandas de precipitación a las 24 horas y los de título bajo, sólo después de transcurridas 48 o 72 horas, o bandas muy tenues a las 24 horas, que se hacen más evidentes a las 48 y 72 horas. Una incubación más larga no afecta los resultados.

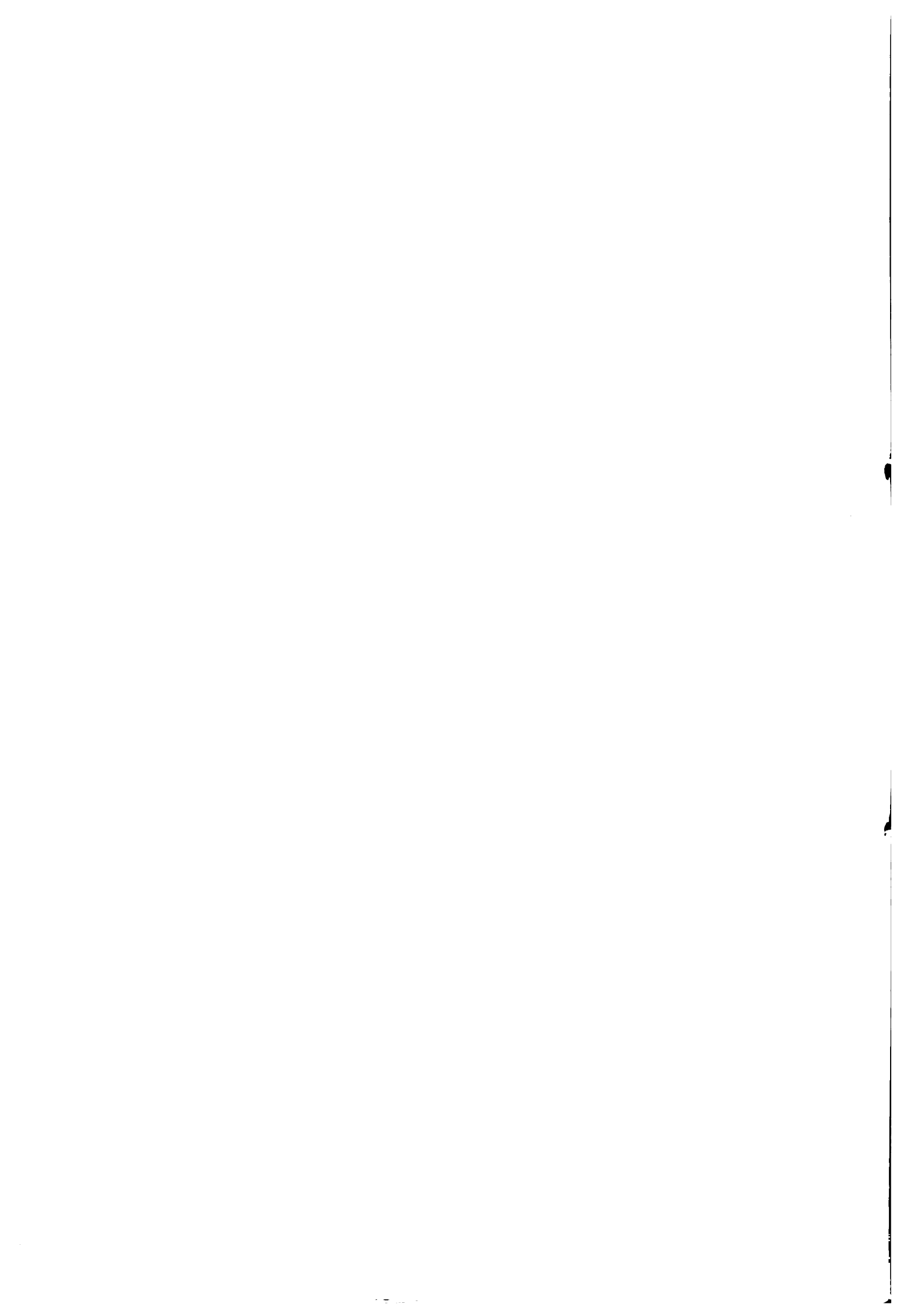
Se recomienda usar para las lecturas una lente o lupa manual a fin de detectar la posible presencia de bandas tenues o incompletas. Las bandas se presentan en la zona comprendida entre el borde de la ranura y el borde del hoyo. Las lecturas positivas (presencia de una banda típica de precipitación) se registran dibujando en una hoja de papel el diagrama de la prueba con las bandas y los correspondientes números que identifiquen los sueros examinados. También se puede teñir la lámina y conservarla en esa forma para futura referencia.

1.1.9 Fijación de Complemento

La prueba de fijación del complemento se utiliza cada vez más para el diagnóstico de la brucelosis en el hombre y en los animales.

El sistema indicador de la prueba está compuesto por hematíes de oveja, suero antihematíes de oveja preparado en conejo y suero fresco de cobayo.

El método que se presenta aquí está basado en la unidad hemolítica 50%, tomando como modelo la reacción de Maltaner descrita por Wadsworth. En esta prueba el complemento se titula según la fórmula de von Krogh, para determinar la cantidad de complemento necesaria para obtener un 50% de hemólisis.



La unidad hemolítica del sistema ($1C'H_{50} = 1$ unidad hemolítica 50% de complemento) en la cantidad de complemento necesaria para lisar el 50% de 67 millones de hematíes de oveja, adecuadamente sensibilizados con suero antihematíes de oveja preparado en conejo (hemolisina) en un volumen total de 1 ml.

El punto crítico del sistema está en la titulación correcta del complemento y de los demás reactivos que intervienen, para asegurar que las determinaciones se puedan reproducir cada día con exactitud.

Si no hay advertencia expresa en contrario, todas las diluciones se hacen en solución tope isotónica utilizando solución salina tope con veronal y ácido barbitúrico (SVB), con veronal y ácido clorhídrico (SVC) o con ácido bórico (SSB) (Anexo 2.a).

La cristalería debe ser lavada con especial esmero, cuidando de que no queden restos de detergente. A veces es necesario emplear solución sulfocrómica y enjuagar varias veces las piezas con agua destilada para restituirles su transparencia original. Para evitar que el suero y otros reactivos se sequen en la cristalería, se sumergirán en agua corriente todos los elementos utilizados (tubos, pipetas, etc) inmediatamente después de su uso.

1.1.9.1 Estandarización de los reactivos

Los reactivos del sistema hemolítico (hematíes, hemolisina y complemento) se estandarizan por el método espectrofotométrico en cubetas calibradas de 10 x 75 mm (medidas interiores) utilizando un espectrofotómetro Coleman Jr. II, modelo 6/20 con adaptador apropiado. Las pruebas diagnósticas de fijación del complemento se hacen en tubos de ensayo comunes de 10 x 75 mm. El volumen final de las reacciones es de 1 ml. Cuando se omite uno o más componentes se completan los volúmenes a 1 ml con la solución salina tope.

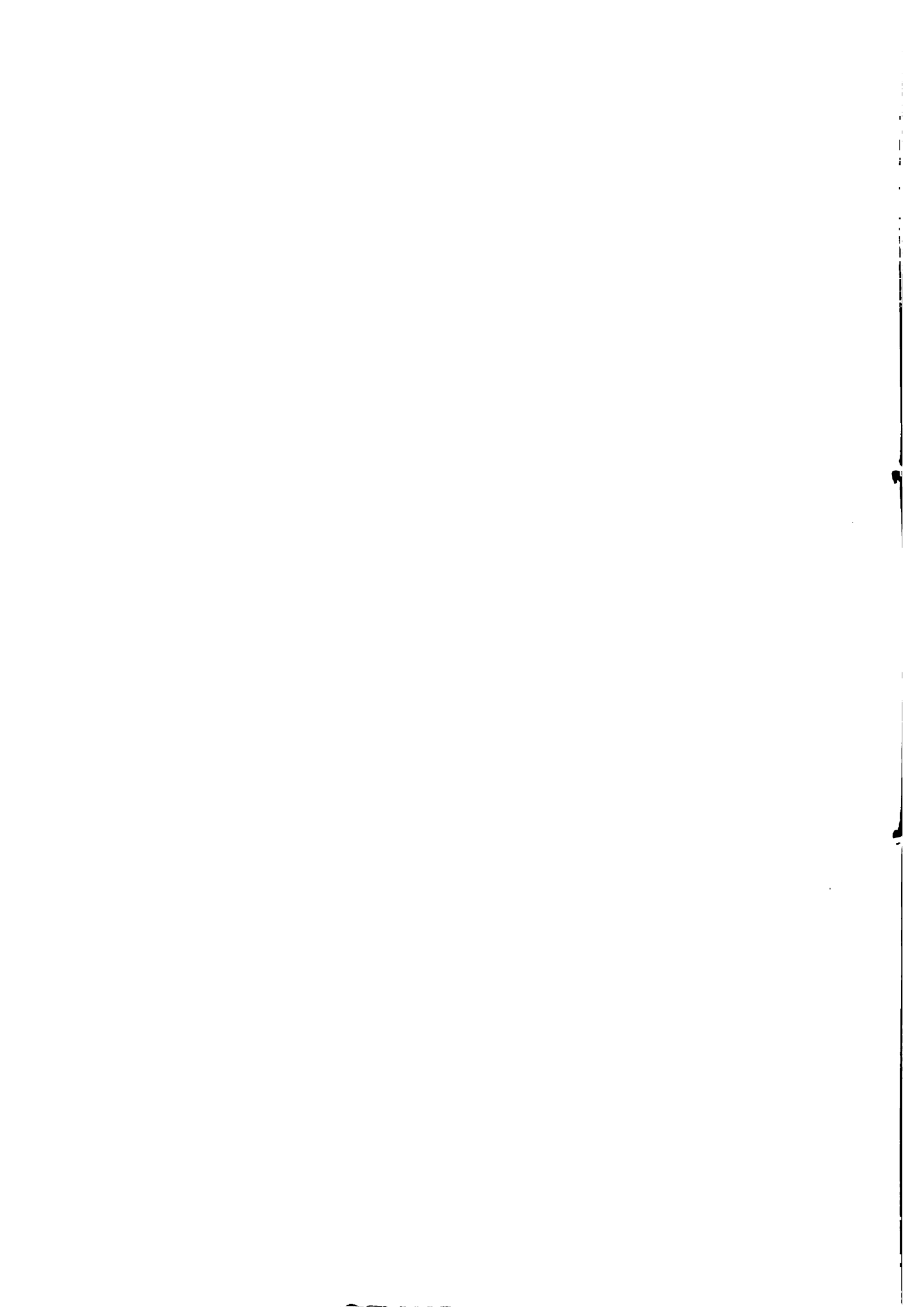
Estandarización de la suspensión de hematíes de oveja

Usar sangre de oveja colectada en solución Alsever no menos de 5 días antes y conservada en refrigeración (Anexo 2.a).

Filtrar la sangre a través de una gasa y depositar en un tubo de centrifuga graduado de 40 ml.

Por cada 10 ml de sangre se obtienen aproximadamente 2 ml de hematíes aglomerados, cantidad suficiente para preparar 70 ml de una suspensión que contenga 6.7×10^8 hematíes/ml (equivalente a la suspensión al 2.8%).

Centrifugar la sangre a 1 000 xg (aprox. 2 000 rpm en centrifuga con cabezal de 30 cm) 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. Resuspender los hematíes en solución salina tope y repetir los lavados 4 veces.

La centrifugación del cuarto lavado se hace durante 10 minutos a 1 000 xg. Se determina el volumen de la columna de glóbulos y se calcula la cantidad de solución tope necesaria para hacer una suspensión al 3%, aproximadamente.

Colocar 0.2 ml de la suspensión de hematíes en 2 cubetas de 10 x 75 y agregar a cada uno 2.8 ml de agua destilada. Una vez lisados los hematíes, se leen las densidades ópticas contra blanco de agua destilada. Cuando se emplea el mismo instrumento, el método espectrofotométrico permite obtener los mismos resultados en pruebas repetidas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la densidad óptica (DO) de la oxihemoglobina varía mucho según el instrumento que se emplee, aún tratándose de la misma marca y modelo. Cualquier densidad óptica recomendada en la literatura debe ser usada solamente como una guía. Cada laboratorio deberá determinar experimentalmente la densidad óptica para su propio instrumento.

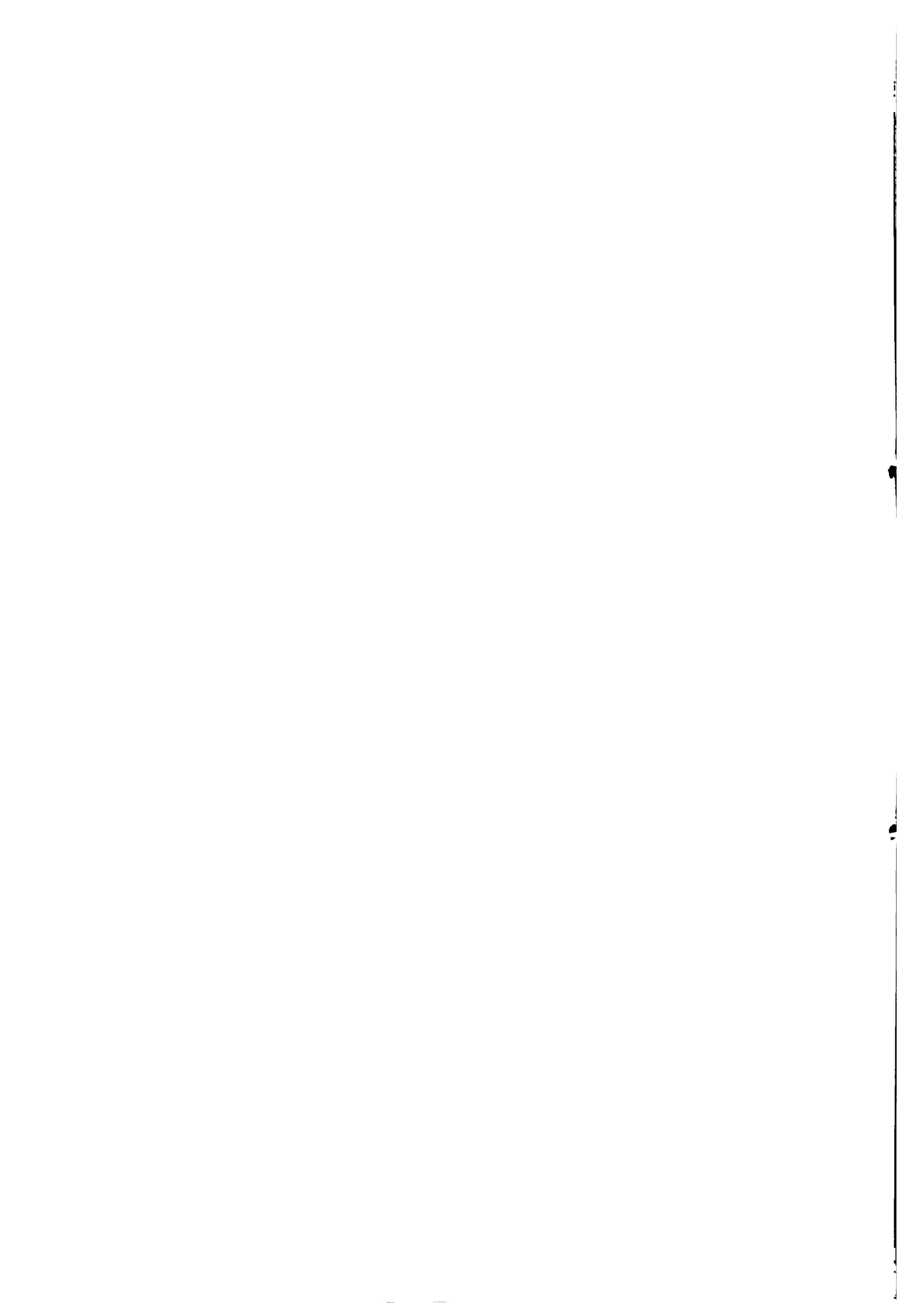
Estandarización de la hemolisina

La hemolisina (suero antihematíes de oveja) es una mezcla de anticuerpos de alto (1 000 000) y bajo (165 000) peso molecular. Las hemolisinas con preponderancia en anticuerpos de alto peso molecular tienen mayor capacidad para sensibilizar los hematíes para la acción del complemento. Aquellas con predominio de anticuerpos pequeños son menos eficaces.

Las hemolisinas se preparan inmunizando conejos con hematíes de oveja lavados, o con estromas de hematíes de oveja. La hemolisina preparada según el último procedimiento suele tener alta actividad hemolítica y títulos de aglutinación bajos, por lo que se prefiere este método.

Para titular la hemolisina se prefiere el método de la meseta, que mide la cantidad de hemólisis producida por varias diluciones de hemolisina en presencia de una cantidad limitada de complemento.

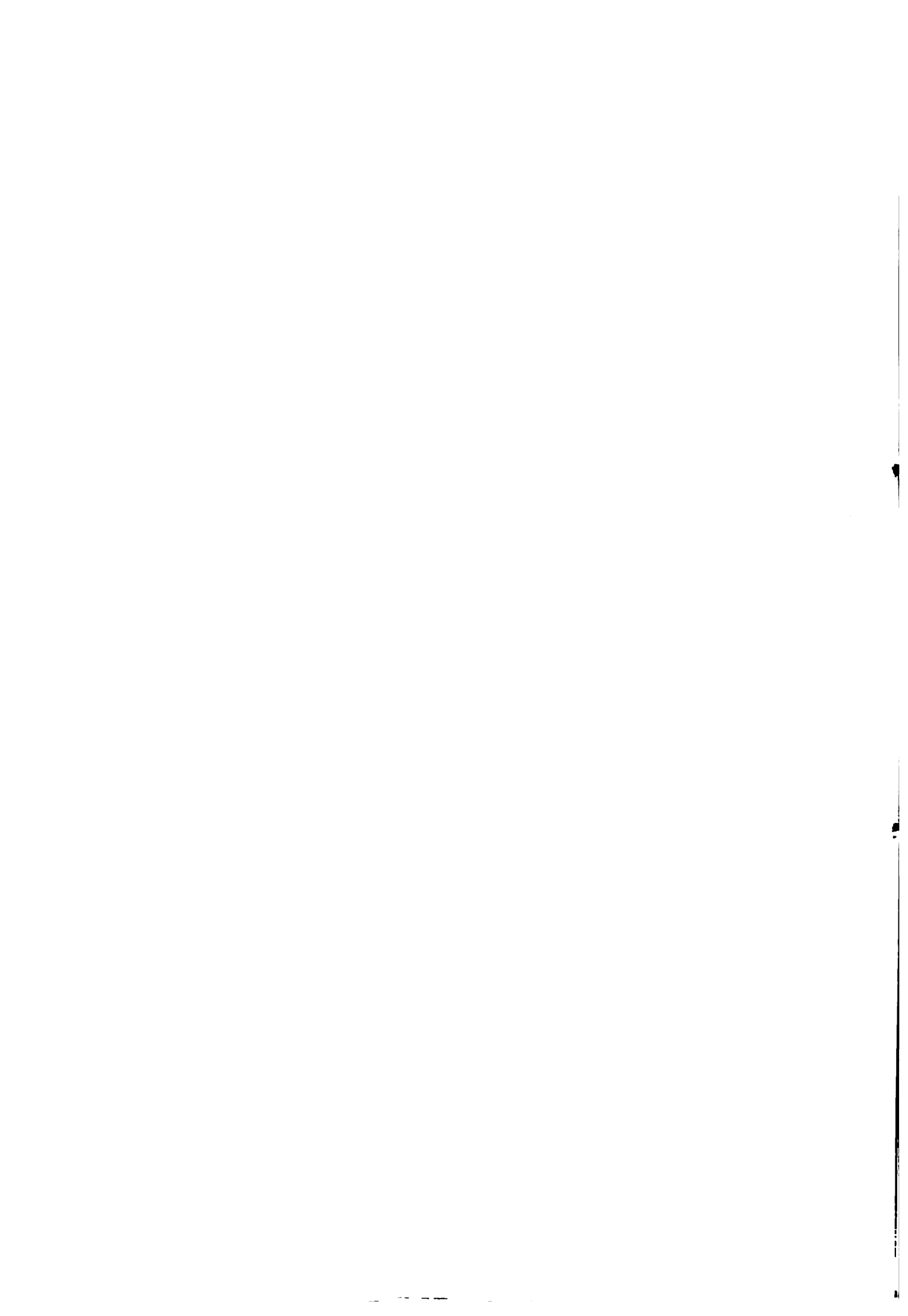
La titulación de la hemolisina se debe hacer cada vez que se prepara un nuevo lote de la dilución 1:100 y cada vez que se usa un nuevo lote de células de oveja. Cuando los resultados se grafican en papel aritmético, la curva mostrará -si hay una concentración suficiente de hemolisina- que las cantidades crecientes de hemolisina no producen aumentos significativos del porcentaje de hemólisis, lo que constituye una meseta. La primera porción de esta meseta representa la cantidad de hemolisina suficiente para una sensibilización óptima de los hematíes de oveja (ver figura 1). En la práctica, se procede así:



- Preparar una suspensión de hematíes en la forma descrita.
- Reconstituir 1 ml de hemolisina liofilizada con 1 ml de agua destilada y agregar solución SVB hasta completar 100 ml. Si la hemolisina se mantiene con glicerina, mezclar 2 ml de hemolisina glicerinada con 98 ml de SVB. Agregar 0.1 l de ázida sódica al 10% (esta solución se conserva bien en refrigeración, pero debe ser descartada cuando se observe precipitación). A partir de la solución madre de hemolisina al 1/100 se hacen diluciones: 1/1 000, 1/2 000, 1/2 500, 1/3 000, 1/4 000, 1/5 000, 1/8 000 y 1/12 000 (ver cuadro 4).
- Mezclar agitando suavemente, 1 ml de cada dilución de hemolisina y 1 ml de suspensión normalizada de hematíes de oveja. Dejar reposar durante 15 minutos a 25°C. A partir de este período de incubación los hematíes son células sensibilizadas lista para ser usadas.
- A cada uno de los 8 tubos por duplicado, agregar 1.2 ml de solución diluyente fría y 1.2 ml de la solución de complemento, los que producirán aproximadamente 70–80% de hemólisis con la solución más concentrada de hemolisina (una dilución 1/400 de complemento suene ser apropiada). Para complementos de muy alta o baja actividad, pueden ser necesarias diluciones 1:500 o 1:300, respectivamente.
- Transferir 0.6 ml de cada una de las mezclas de hematíes y hemolisina a los tubos que contiene complemento o diluyente y mezclar.
- Incubar los tubos a 37°C en baño maría durante 30 minutos, con una agitación a los 15 minutos.
- Sumergir la gradilla con los tubos en agua helada para detener la reacción y centrifugar los tubos a 1 000 xg durante 5 minutos.
- Transferir el sobrenadante a cubetas 10 x 75 de espectrofotómetro Coleman y leer las densidades ópticas (DO) por duplicado.
- Calcular los porcentajes de hemólisis para cada dilución de hemolisina, según la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{DO de cualquier lisado} \times 100}{\text{DO en tubos con hemólisis completa}}$$

- Graficar los porcentajes de hemólisis y las diluciones de hemolisina sobre un papel aritmético milimetrado, según se muestra en la Figura 1. La dilución óptima de hemolisina se determina por la inspección del gráfico. Se selecciona una dilución tal que un incremento de hemolisina (la curva progresa hacia la derecha) no aumente apreciablemente el porcentaje de hemólisis. La dilución óptima debe contener hemolisina en exceso; en consecuencia, se elegirá la dilución siguiente de izquierda a derecha. En el gráfico de la Figura 1, la dilución óptima es 1:3 000.



Cuadro 4

PREPARACION DE DILUCIONES DE HEMOLISINA

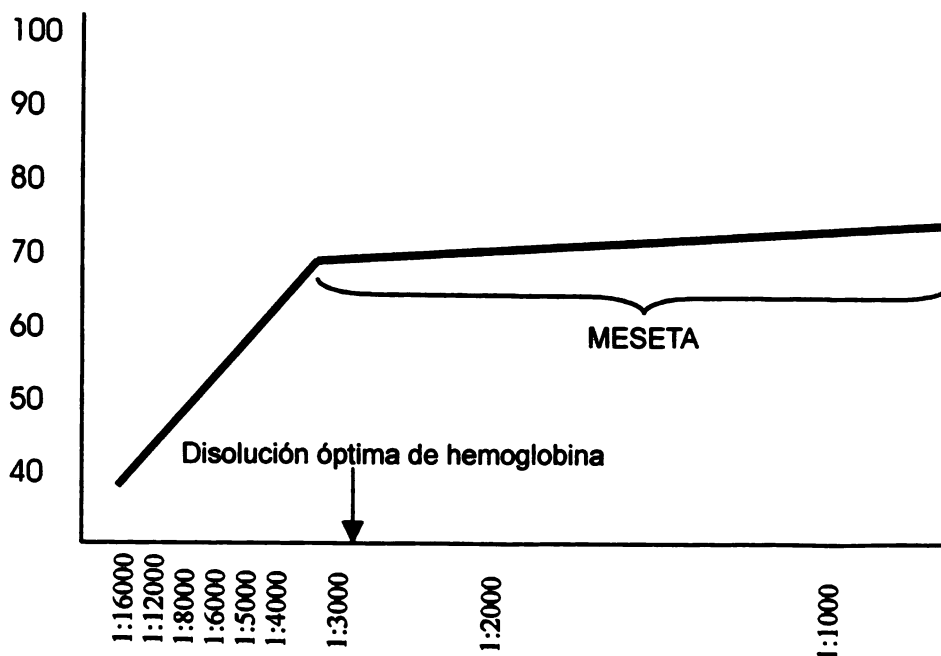
Dilución de hemolisina, 1 ml		Dilución final de hemolisina
1:100	+ 9 ml de diluyente =	1 000
1:1 000	+ 1 ml de diluyente =	2 000
1:1 000	+ 1.5 ml de diluyente =	2 500
1:1 000	+ 2 ml de diluyente =	3 000
1:1 000	+ 3 ml de diluyente =	4 000
1:1 000	+ 4 ml de diluyente =	5 000
1:1 000	+ 7 ml de diluyente =	8 000
1:3 000	+ 3 ml de diluyente =	12 000

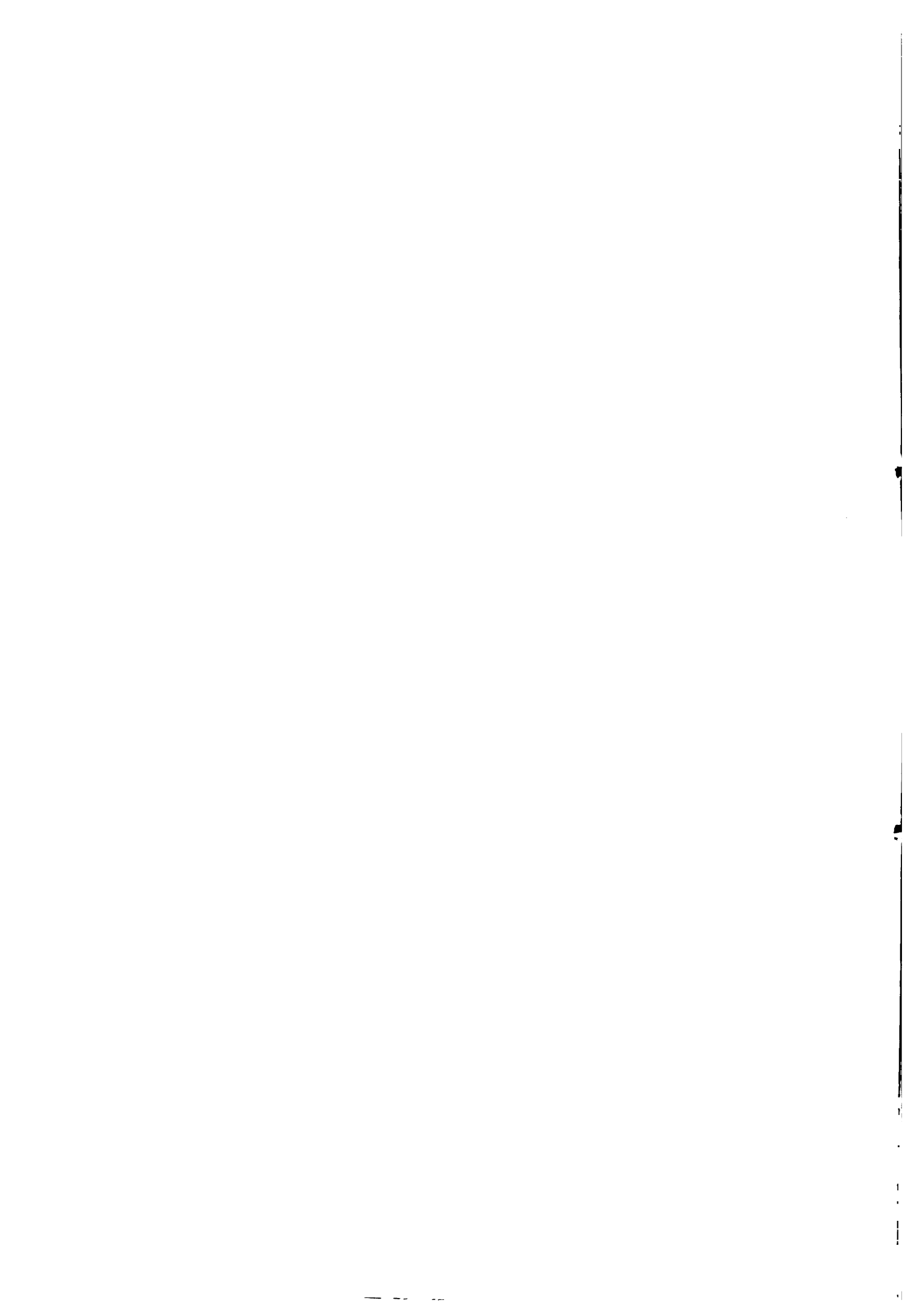
Preparación de hematíes sensibilizados para las titulaciones de complemento y antígeno y para la prueba diagnóstica

A un volumen de hematíes al 2.8%, agregar un volumen de la dilución óptima de hemolisina y agitar en torbellino rápidamente. Dejar incubar durante 15 minutos a 25°C.

Figura 1

TITULACION DE HEMOLISINA





Titulación de complemento (En cantidades triples)

El complemento debe titularse cada vez que se realiza la prueba. Para la titulación, se procede en la forma siguiente:

- Preparar hematíes sensibilizados.
- Rotular 11 tubos de serología y colocar en una gradilla. Para mayor exactitud es preferible hacer todo por duplicado y usar los promedios.
- Preparar una solución de complemento 1:40 y de ella, una dilución 1:400. Usar SVB fría y mantener la dilución 1:40 en refrigeración.
- Agregar los reactivos en las cantidades y orden mostrados en el cuadro 5.
- Agitar los tubos y colocar a baño maría a 37°C durante 30 minutos. Agitar nuevamente a los 15 minutos de incubación.

Cuadro 5

TITULACION DEL COMPLEMENTO (En cantidades triples)

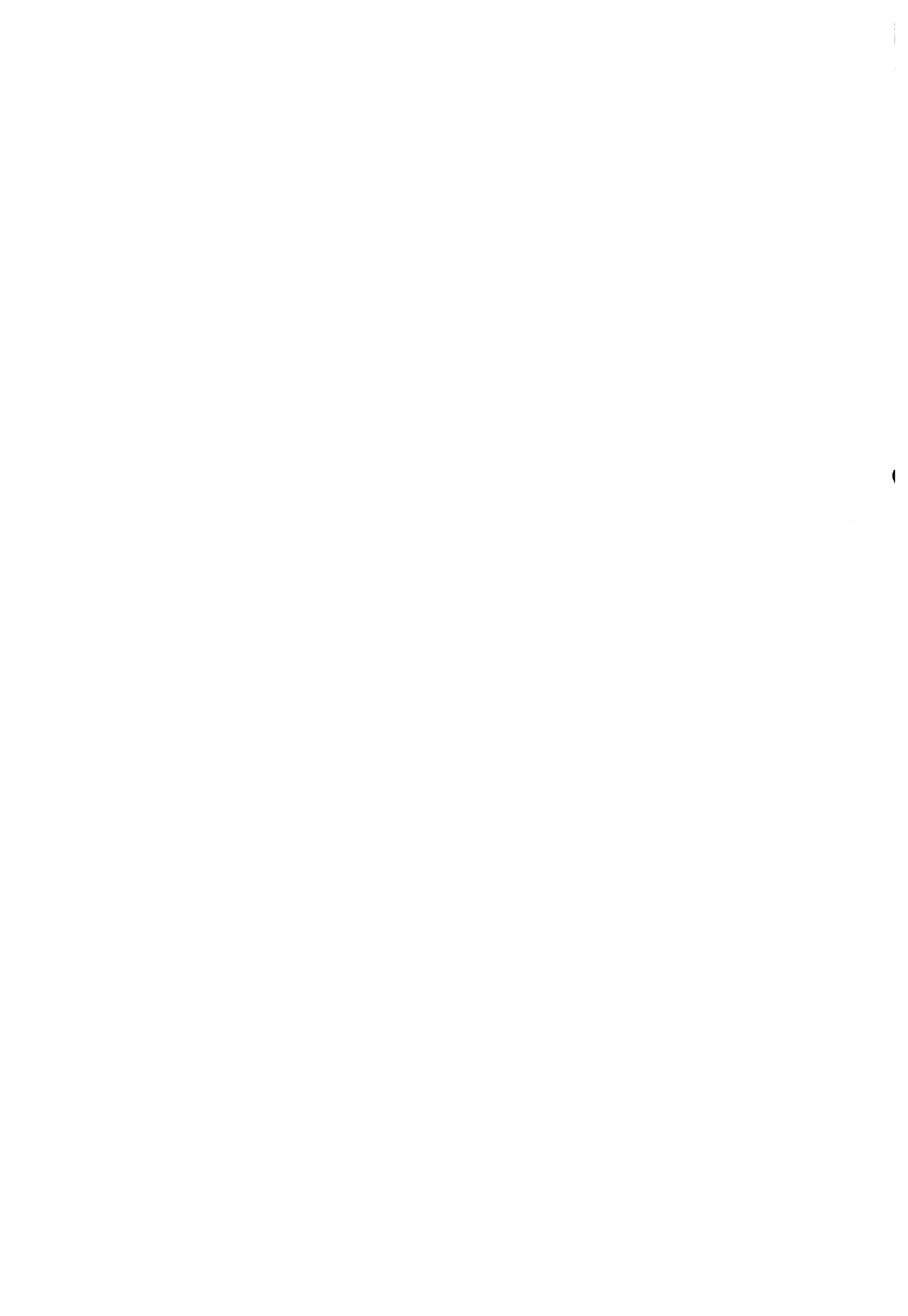
Lote de complemento CEPANZO 18/81

Lote de hemolisina CEPANZO 8/80

Fecha : 7 de julio de 1981

Hematíes de la oveja N° 815 (20-III)

	Titulación						Hemólisis Completa			Blanco	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Soluc. Tope SCB fría	1.95	1.80	1.65	1.50	1.35	1.20	1.05	1.40	1.40	1.40	2.40
Complemento dil. 1:40	-	-	-	-	-	-	-	1.00	1.00	1.00	
Complemento dil. 1:400	0.45	0.60	0.75	0.90	1.05	1.20	1.35				
Hematíes sensibilizados	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
	a) Mezclar bien e incubar 30 minutos a 37°C b) Enfriar el baño de agua fría										
Densidad óptica (DO)	0.023	0.122	0.240	0.326	0.385	0.440	0.450	0.460	0.450		
Porcentaje hemólisis	5	27	53	72	85	97	100	100	100	100	0
Relación $\frac{Y}{100 - Y}$	0.05	0.37	1.15	2.52	5.7						



- Sacar los tubos del baño y sumergir en agua fría para detener la reacción.
- Centrifugar a 1 000 xg durante 5 minutos (preferiblemente en centrífuga refrigerada a 4°C).
- Transferir los sobrenadantes a cubetas 10 x 75 y hacer las lecturas de densidad óptica en un espectrofotómetro Coleman Jr.
- Determinar el porcentaje de hemólisis en cada tubo relacionando su densidad óptica con la densidad óptica de los tubos de hemólisis total (tubos 8, 9 y 10).
- Calcular la relación $\frac{Y}{100 - Y}$. Colocar los valores obtenidos sobre el eje

horizontal de un papel logarítmico doble (2 x 2) y sobre el eje vertical, las cantidades correspondientes de complemento al 1:400 utilizado. Descartar los valores correspondientes a porcentajes de hemólisis inferiores al 10% o superiores al 90%. En la figura 2 se muestra el procedimiento.

- Unir los puntos por medio de una recta y trazar una línea horizontal en el punto que esta línea intercepta la vertical "1" (10) del papel. Leer la cantidad de complemento gastado, la que corresponde a una unidad hemolítica 50%. En el ejemplo de la figura 2, esa cantidad es 0.80 ml de la solución 1:400.
- En las pruebas diagnósticas se emplean 5 unidades. En el ejemplo serán necesarios 4 ml de complemento 1:400, o bien una cantidad menor de una solución más concentrada.
- Cálculo de 5 unidades en 1.2 ml. En el ejemplo se procede de la siguiente forma:

$$\begin{array}{r} 4 \text{ ml} \quad 400 \\ 1.2 \text{ ml} \quad x \end{array}$$

De donde se deduce que 1.2 ml de la dilución 1:120 contendrá 5 unidades hemolíticas. Para las pruebas diagnósticas se usa la tercera parte de todos los reactivos; en la prueba cuyo volumen final es 1 ml, se usará, por lo tanto, 0.4 ml de complemento 1:120.

- Determinar la pendiente de la línea. Para ello, medir 10 cm desde cualquier punto de la línea hacia la derecha. Sobre el extremo derecho de los 10 cm, trazar una vertical y sobre ella medir la distancia hasta la curva de titulación (recta sobre papel logarítmico). Este valor debe ser de alrededor de 2 cm (de 1.80 a 1.20 cm), lo que equivale a una pendiente del 20%.

Las pendientes mayores al 20% se deben generalmente a error técnico, exceso en la concentración de hematíes o a la fragilidad de éstos.

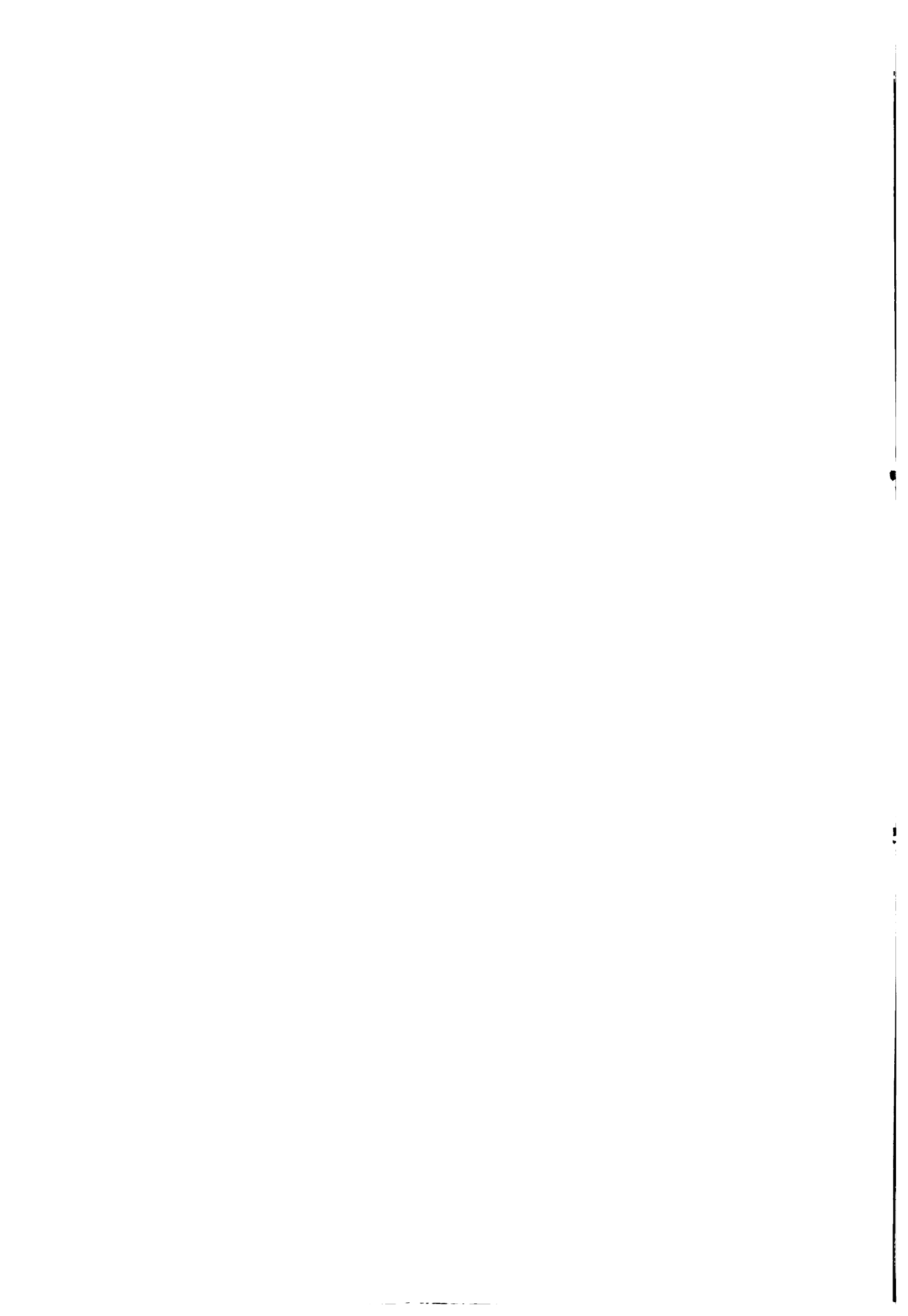
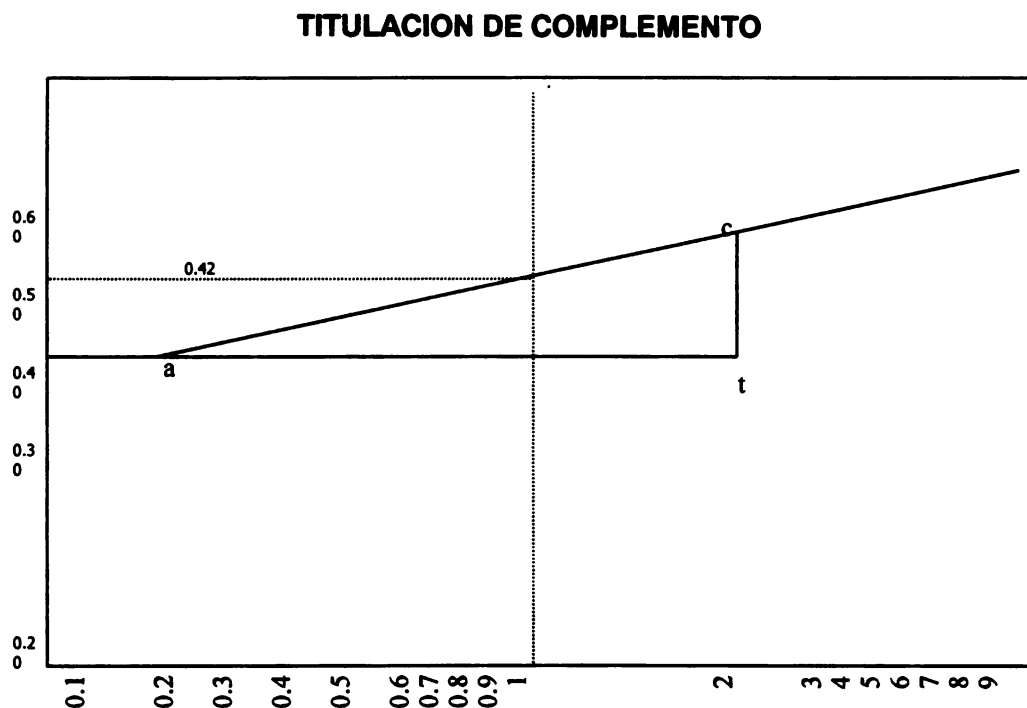


Figura 2



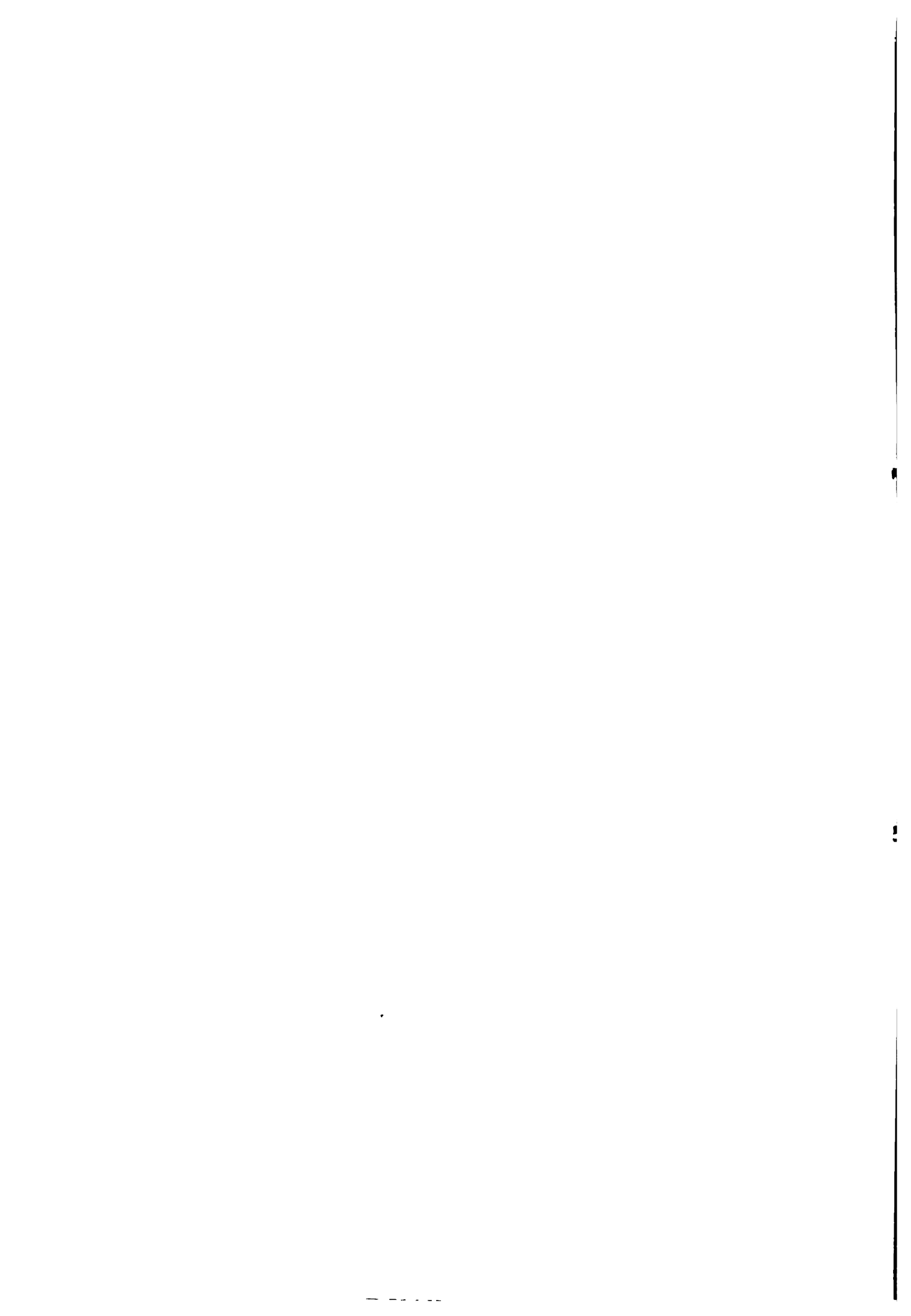
Titulación del antígeno

Para titular el antígeno se hacen diluciones seriadas de un suero inmune específico contra diluciones seriadas del antígeno, como se muestra en el cuadro 6. El volumen total en cada tubo es de 1 ml.

Luego de la titulación con las diluciones expresadas en el cuadro, se puede hacer un ajuste más fino estrechando la relación entre las diluciones límite satisfactorias.

En la práctica se procede de la forma siguiente:

- Colocar 0.2 ml de cada dilución en los tubos previamente rotulados.
- Agregar 0.2 ml de cada dilución de antígeno a los tubos correspondientes que contienen las diluciones del suero (ver cuadro) y a los controles del complemento. En el lugar del antígeno, agregar 0.2 ml de SVB a los controles de suero. Agregar los volúmenes apropiados de SVB a los controles de complemento. Agitar los tubos y dejar reposar de 10-15 minutos a temperatura ambiente.



- Agregar 0.4 ml de complemento frío que contenga 5C'H₅₀ a cada tubo con el suero y el antígeno. Agregar los volúmenes de complemento apropiados a los controles de complemento.
- Agitar bien los tubos y colocar en el refrigerador de 15-18 horas
- Sacar los tubos del refrigerador y preparar células sensibilizadas, según el procedimiento ya descrito.
- Agregar 0.2 ml de células sensibilizadas a cada uno de los tubos de la prueba e incubar en baño maría a 37°C durante 30 minutos, agitando una vez a los 15 minutos.
- Centrifugar durante 15 minutos a 600 xg todos los tubos que no muestren lisis completa y leer la densidad óptica en el espectrofotómetro y/o por comparación con los patrones de hemólisis.

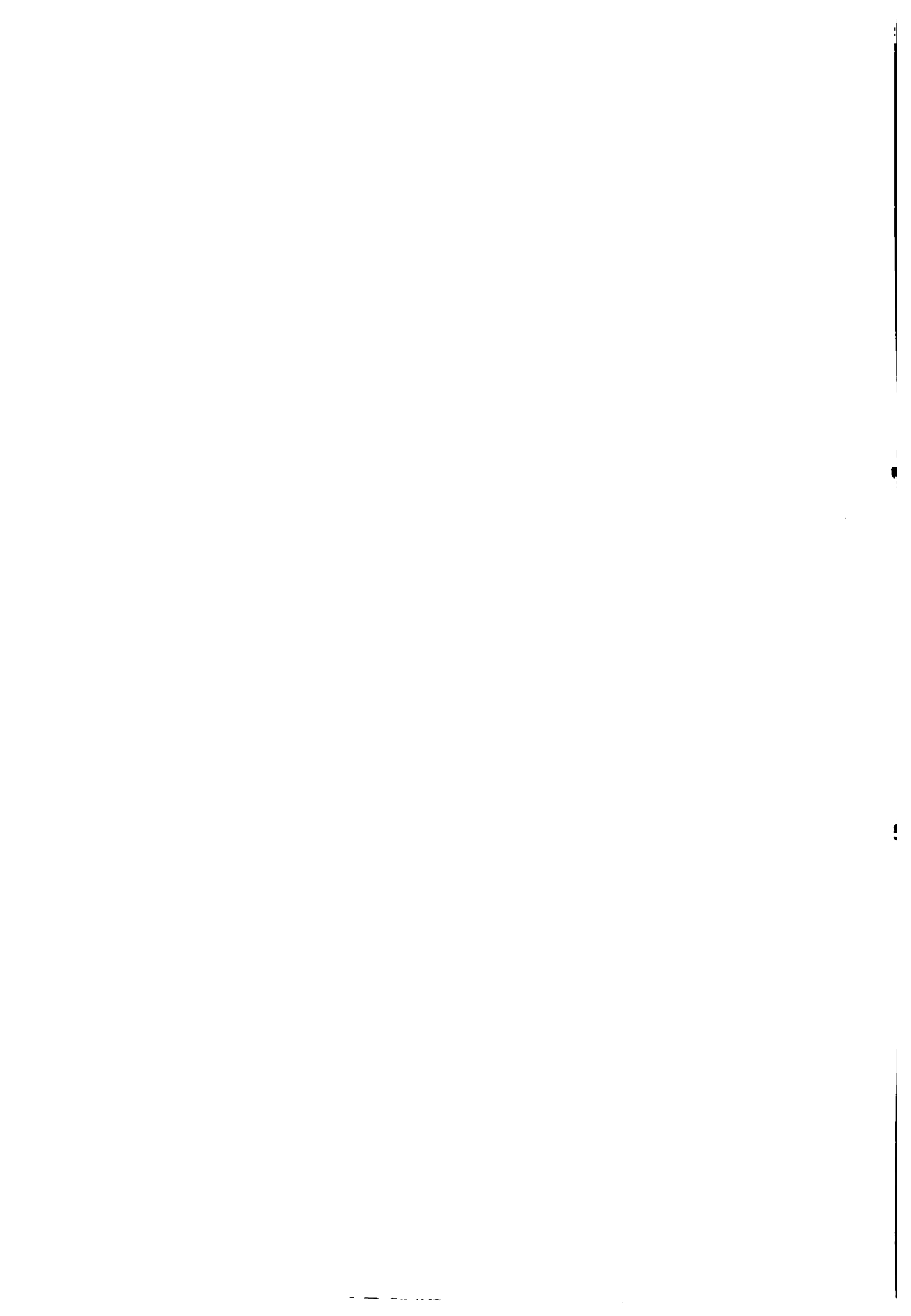
Cuadro 6

TITULACIÓN DEL ANTIGENO PARA FIJACION DEL COMPLEMENTO

Diluciones del antígeno*	Diluciones del suero**									Control del poder anticomplementario del antígeno (sin suero)		
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	C'H ₅₀ 5	C'H ₅₀ 2.5	C'H ₅₀ 1.25
1/50	0	0	0	0	0	20	100	100	100	100	100	20
1/100	0	0	0	0	0	10	90	100	100	100	100	30
1/200	0	0	0	0	0	0	10	90	100	100	100	50
1/300	0	0	0	0	0	0	0	50	100	100	100	50
1/400	0	0	0	0	0	0	0	20	100	100	100	50
1/600	0	0	0	0	0	0	0	60	100	100	100	50
1/800	0	0	0	0	0	0	20	80	100	100	100	50
Suero s/antígeno	100	100	100	100	100	100	100	100	100	---	---	--
Dil. Suero 1/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	90	40
Dil. Suero 1/10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	90	40
SVB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	50

* Diluciones del antígeno a partir de la suspensión madre del antígeno de tubo que se considera puro

** Se recomienda usar cantidades de 0.6 ml para volumen final de 3 ml.



- La dilución óptima de antígeno es definida como aquella dilución que produce lecturas del nivel máximo de fijación con el antisuero específico. En la interpretación de cada titulación de antígeno, es conveniente trazar una línea - conocida como la curva de dilución óptima- que une los puntos finales de 30% de hemólisis (interpolando, si es necesario) de cada dilución de antígeno que no tenga actividad anticomplementaria.

Cada lote de antígeno debería ser titulado con sueros de títulos altos y bajos de anticuerpos. En la práctica se ha visto que para el diagnóstico de la brucelosis, una dilución 1:300 del antígeno para la prueba en tubo da buenos resultados y que los distintos lotes están siempre alrededor de dicho valor (antígeno particulado de concentración final 0.015%).

1.1.9.2 Procedimiento

- Preparar una dilución 1:5 del suero en SVB en cantidad suficiente para la prueba y los controles. Inactivar el suero en esta dilución durante 30 minutos a 60°C.

Nota: Algunos laboratorios prefieren efectuar previamente una prueba tamiz (screening) usando solamente la dilución inicial del suero. En este caso, también se deben agregar los controles de antígeno, suero y SVB.

- Después que la dilución del suero se haya enfriado a temperatura ambiente, preparar diluciones mayores del suero en razón 2 (por lo general hasta completar 4 diluciones). Los sueros hiperinmunes requieren diluciones mayores.
- Transferir 0.2 ml de cada dilución a los tubos de prueba y controles correspondientes (cuadro 7).
- Agregar 0.2 ml de la dilución óptima de antígeno a los tubos correspondientes de dilución de suero y a los controles de complemento. El antígeno debe ser fresco y preparado en SVB fría.
- Agregar 0.2 ml de SVB en lugar del antígeno a los controles de suero y los volúmenes correspondientes de SVB a los controles de complemento.
- Preparar con SVB fría la dilución de complemento que contenga 5C'H₅₀ en 0.4 ml. Mezclar muy suavemente para evitar la formación de espuma y agregar inmediatamente a los tubos de la prueba y al 5C'H₅₀ del complemento. Agregar 0.2 ml a los controles de 2.5 unidades y 0.1 ml a los controles de 1.25 unidades.
- Agitar manualmente las gradillas de los tubos para mezclar el complemento. Incubar la prueba y los tubos de control de 4-6°C de 15-18 horas.
- Preparar el control de los hematíes de oveja colocando 0.8 ml de SVB en un tubo seco.
- Sacar la prueba del refrigerador y agregar 0.2 ml de células sensibilizadas a todos los tubos, incluyendo el control de células rojas.



Cuadro 7

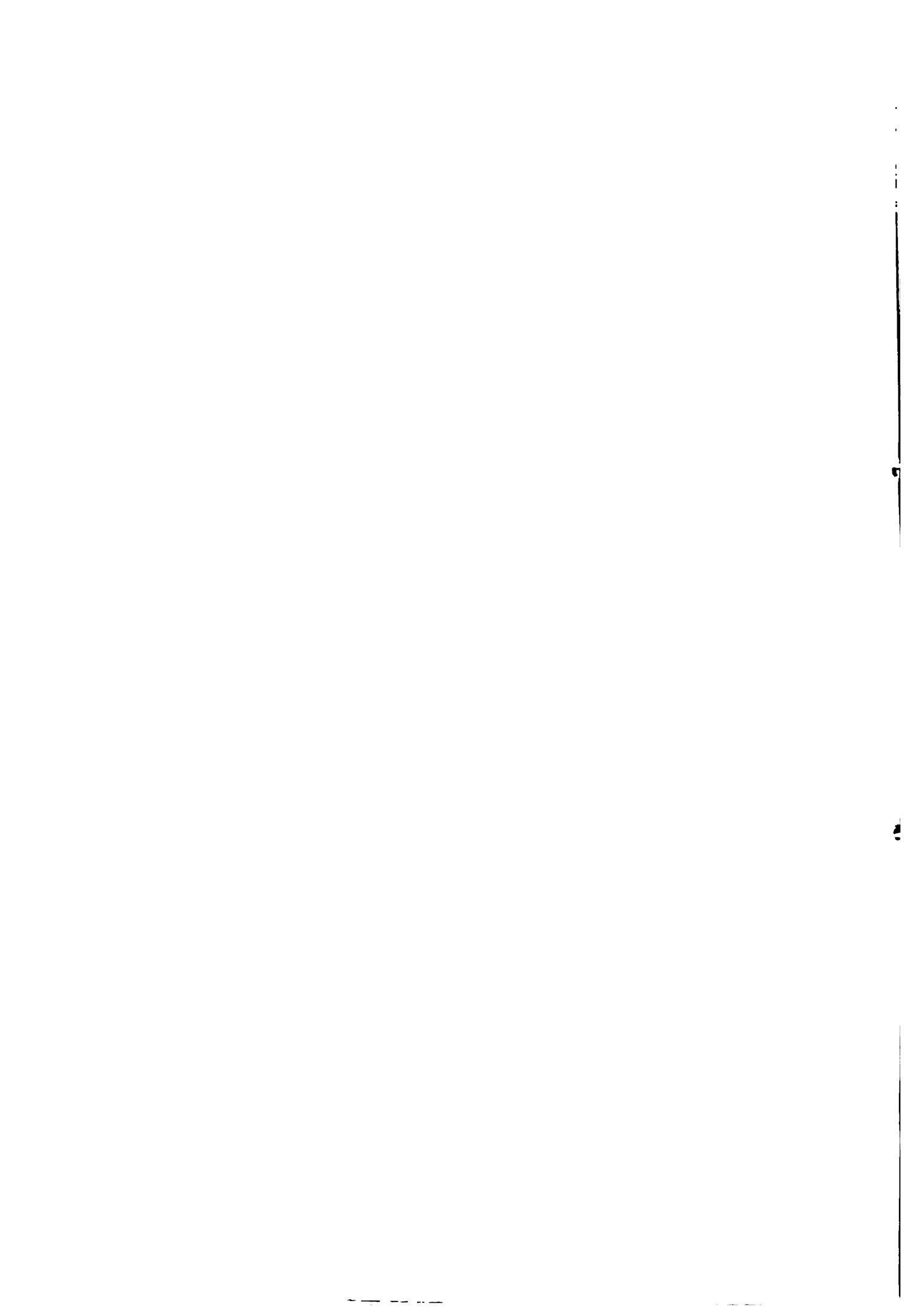
ESQUEMA DE LA PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO

Fila de tubos	Descripción	Diluciones del suero MI				Antígeno MI	SVB ml	C' ml 5 C'H ₅₀ en 0,4 ml	Hematías sensibilizados
		1/5	1/10	1/20	1/40				
1	Suero problema	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-	0.4	0.2
2	Control AC del suero	0.2	0.2	-	-	-	0.2	0.4	0.2
3	Controles del antígeno								
a	5 unidades de C'	-	-	-	-	0.2	0.2	0.4	0.2
b	2.5 unidades de C'	-	-	-	-	0.2	0.4	0.2	0.2
c	1.25 unidades de C'	-	-	-	-	0.2	0.5	0.1	0.2
4	Control sol. SVB								
a	5 unidades de C'	-	-	-	-	-	0.4	0.4	0.2
b	2.5 unidades de C'	-	-	-	-	-	0.6	0.2	0.2
c	1.25 unidades de C'	-	-	-	-	-	0.7	0.1	0.2
5	Control de Hematías	-	-	-	-	-	0.8	-	0.2

- Agitar los tubos para asegurar la suspensión uniforme de las células e incubar en baño maría a 37°C durante 30 minutos (agitar a los 15 minutos).
- Sacar las gradillas del baño maría y enfriar en baño de agua helada; centrifugar todos los tubos que no muestren lisis completa.

1.1.9.3 Resultado

- Leer los controles de complemento por comparación con los patrones de hemólisis. Si los controles de SVB no están dentro de los límites aceptables, los resultados de la prueba no son válidos.
- El suero se registra como anticomplementario, si los controles de la dilución menor del suero muestran menos del 75% de hemólisis. Cuando se encuentra actividad anticomplementaria del suero es necesario tomar una nueva muestra para esta prueba.



Si se ha probado la actividad anticomplementaria del suero en las 2 primeras diluciones, el serólogo no tiene otra elección que informar el suero como anticomplementario. En los casos especiales en que se establecen fuertes diferencias entre los títulos de fijación y actividad anticomplementaria, se pueden informar como positivos con la reserva de que el título es aproximado.

- Si todos los controles son satisfactorios, se leen los tubos de la prueba por comparación con los patrones del 20, 30 y 40% de hemólisis. El punto final de las titulaciones de suero es la dilución más alta que muestre el 30% o menos de la hemólisis.

Si bien las pruebas diagnósticas son leídas o como positivas o negativas a cualquier dilución, los valores numéricos que se dan a continuación pueden ser usados para registrar los resultados en las diluciones de sueros.

Porcentaje de hemólisis (preferido)	Valor numérico (tradicional)
0	4
30	3
50	2
75	1
90	±
100	-

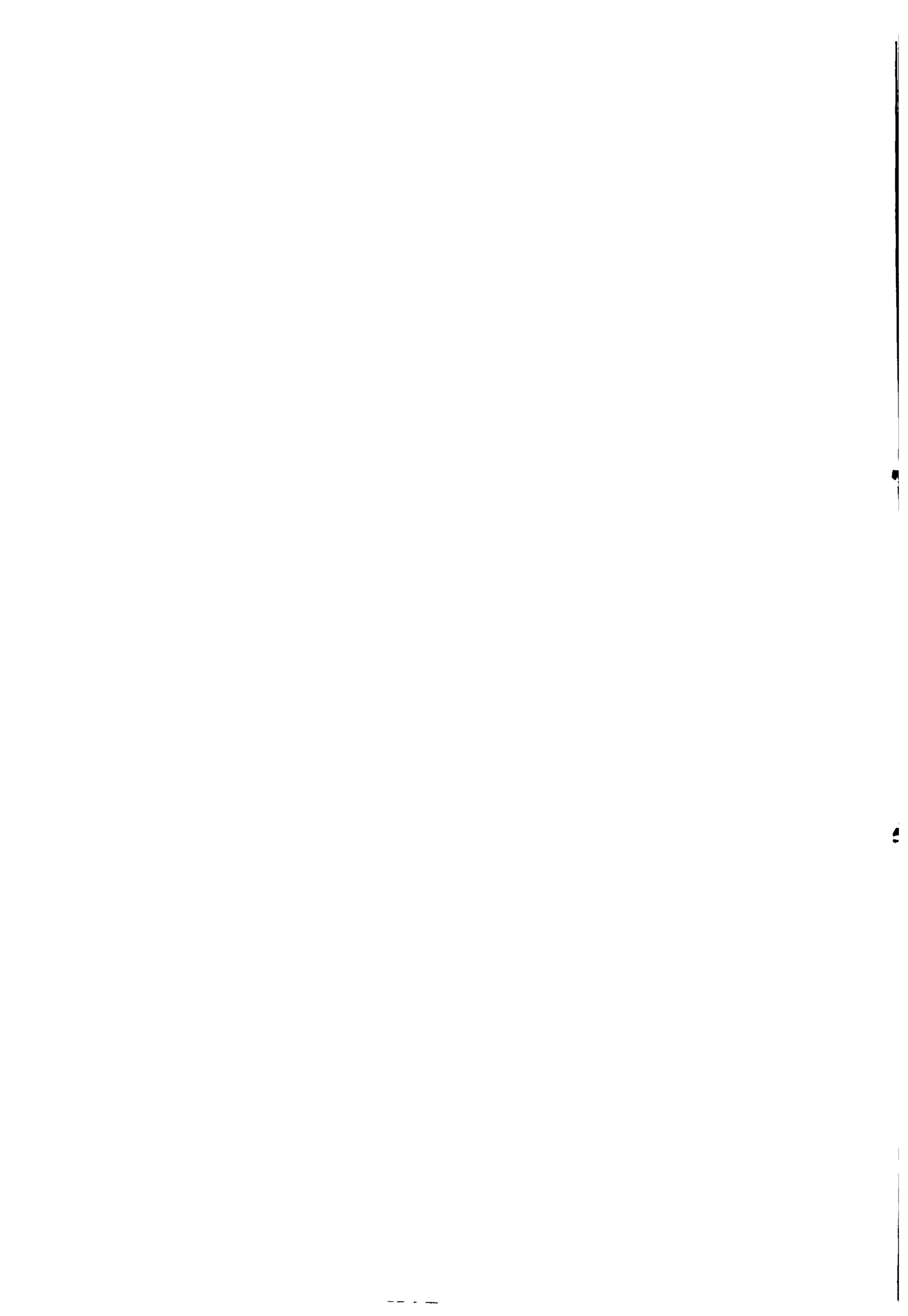
- En los métodos usuales para informar los resultados de la prueba de fijación del complemento se aplica cualquiera de estos procedimientos.

Realización de la prueba con pipetas serológicas de Bang

Por regla general, en los laboratorios de brucelosis se cuenta con un número grande de pipetas Bang, que se utilizan en las pruebas de aglutinación, en tanto suenen ser escasas las pipetas serológicas de otro tipo.

Para aprovechar los materiales disponibles, se puede proceder de la forma siguiente:

- Disponer de 6 tubos de 12 x 75 mm en una gradilla apropiada.
- Cargar el suero con la pipeta Bang hasta la segunda marca y depositar en los 4 primeros tubos las cantidades de 0.04, 0.02, 0.01 y 0.05 ml, respectivamente (estas cantidades corresponden a títulos de 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40). Cargar de nuevo la pipeta y colocar 0.04 ml en el quinto tubo y 0.02 ml en el sexto.
- Agregar 0.2 ml de SVB a los 4 primeros tubos y 0.4 a los 2 últimos.
- Mezclar bien e inactivar en baño maría a 60°C durante 30 minutos.



- Agregar 0.2 ml de la suspensión óptima de antígeno (1:300 de la suspensión madre de antígeno de la prueba de tubo). Mezclar bien.
- Agregar 5 unidades 50% de complemento contenidas en un volumen de 0.4 ml. Dejar los tubos en refrigeración durante la noche.
- Agregar a cada tubo 0.2 ml de células sensibilizadas, incubar a 37°C y leer en la forma usual de la prueba.

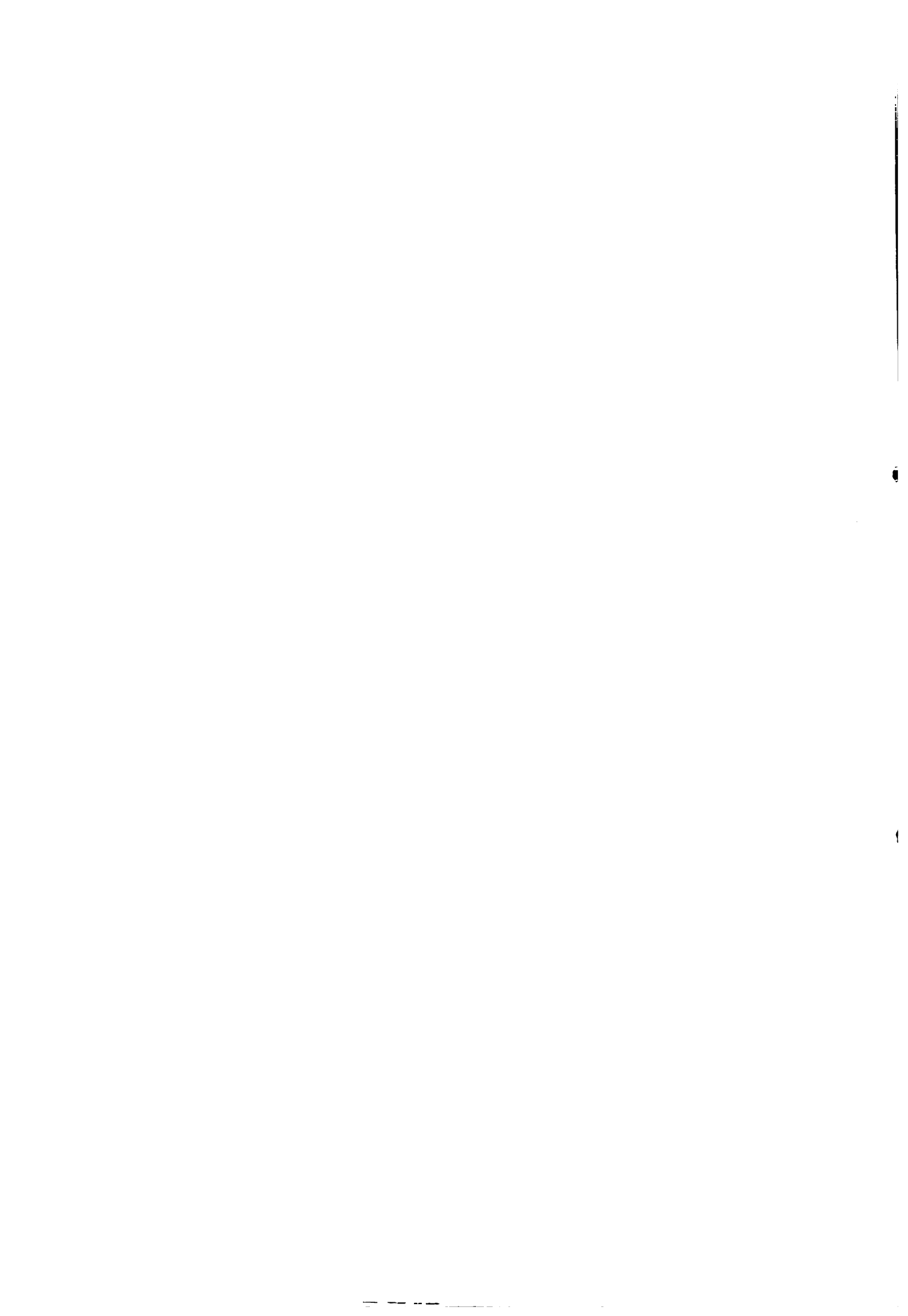
Microtécnica de fijación del complemento

La titulación de los reactivos—complemento, hemolisina y antígeno— debe hacerse por el macrométodo en tubo. Es preferible utilizar cantidades triples en la forma aconsejada en el cuadro 5.

La microtécnica se hace en placas plásticas. La diferencia más importante entre la macro y la microtécnica es el volumen que se emplea.

Proceder en la forma siguiente:

- En un tubo de ensayo, depositar 0.25 ml del suero problema. Agregar 1 ml de SVB e inactivar en baño maría a 60°C durante 30 minutos.
- En las placas Linbro de Microtiter o similares, colocar 0.05 ml de SVB en todas las cubetas de las hileras B, C, D, E, F y H.
- De la solución 1:5 inactivada del primer suero problema, depositar 0.1 ml en las cubetas A1 y G1. Del segundo suero colocar 0.1 ml en las cubetas A1 y G1. Del segundo suero colocar 0.2 ml en las cubetas A2 y G2 y así sucesivamente hasta el suero 12, número que se puede trabajar en una placa.
- Proveer al portador automático de 12 microdiluctores 0.05 ml. Introducir en la hilera A. Agitar y pasar a la hilera B, agitar y pasar a la C y así hasta la hilera F.
- Después de agitar la hilera F, descartar el contenido de los microdiluctores y, previo secado, introducir éstos en la hilera G, agítense y pasar a la hilera H. Agitar y descartar el contenido de los microdiluctores.
- Agregar 0.025 ml de antígeno de doble concentración (1:150 de la suspensión madre de antígeno tubo) a todas las cubetas de las hileras A a F.
- Agregar 0.025 ml de SVB a las hileras G y H. Agitar las placas en el vibrador.
- Agregar a cada microcubeta 0.05 ml de complemento de doble concentración.
- Agitar bien las placas en el vibrador mecánico y dejar en refrigeración durante la noche.
- Trabajar el suero estándar en sus diluciones 1:12, 1:24 y 1:48.
- Además de todos los controles hechos en microtécnica, preparar controles de complemento y sistema hemolítico en tubos según macrotécnica.
- Agregar 0.025 ml de hematíes de oveja sensibilizados. Cubrir las placas con celofán. Agitar en vibrador e incubar en baño maría a 37°C durante 30 minutos.



- Centrifugar a 500 xg durante 5 minutos y hacer la lectura en el visor correspondiente.

1.2 DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

1.2.1 Aislamiento

1.2.1.1 Medios básicos

- Agar nutriente
- Agar dextrosa con suero
- Agar dextrosa con glicerina
- Agar infusión de patata

1.2.1.2 Medios selectivos

Cualquiera de los arriba descritos pueden servir de base para la elaboración de medios selectivos.

Medio de Kuzdas y Morse

Consiste en agregar por cada litro del medio de base, 100 mg de ciclohemida (fungistático); 25000 UI de bacitracina (activa contra bacteria gram-positivas); y 6 000 UI de polimixina B (activa contra una amplia variedad de bacterias gram -negativas).

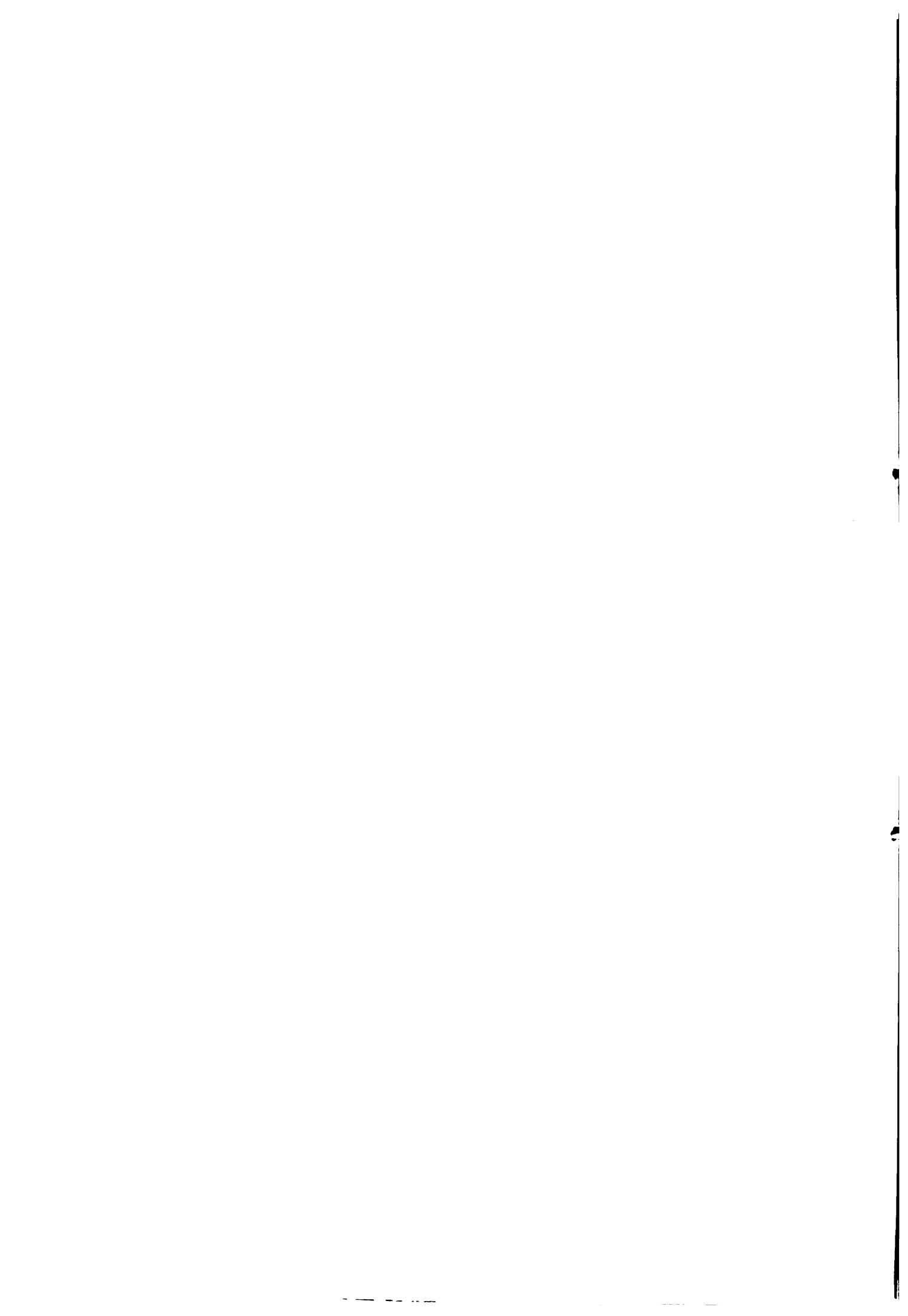
Puede, además, agregarse violeta de etilo hasta obtener una concentración final de 1:800 000.

1.2.1.3 Medios para hemocultivos

Medio de Castañeda

Para el hemocultivo se recomienda el medio inicialmente descrito por Castañeda, consistente en una fase sólida y otra líquida en el mismo frasco. De ese modo se evita la necesidad de practicar numerosos pases del medio líquido al medio sólido.

El medio líquido se prepara según las indicaciones de los fabricantes, agregando, además, citrato sódico hasta una concentración final del 2%. Después de la esterilización del medio en autoclave se enfría y se introduce en condiciones de asepsia en los frascos de cultivo, a razón de 15 ml por frasco de 125 ml.



Antes del empleo, los frascos con medio se incubarán a 37°C durante varios días para comprobar su esterilidad.

1.2.1.4 Cultivo de muestras

Las muestras más utilizadas para el aislamiento de *Brucella* son la leche, membranas fetales, fetos abortados, cotiledones, tejidos de animales, sangre (para hemocultivo se recomienda el medio Castañeda).

Los cultivos de estos materiales se incuban a 37°C (algunas cepas como *Brucella abortus* requiere atmósfera enriquecida con 5-10% de anhídrido carbónico para su aislamiento primario).

1.2.2 Identificación de las Brucelas

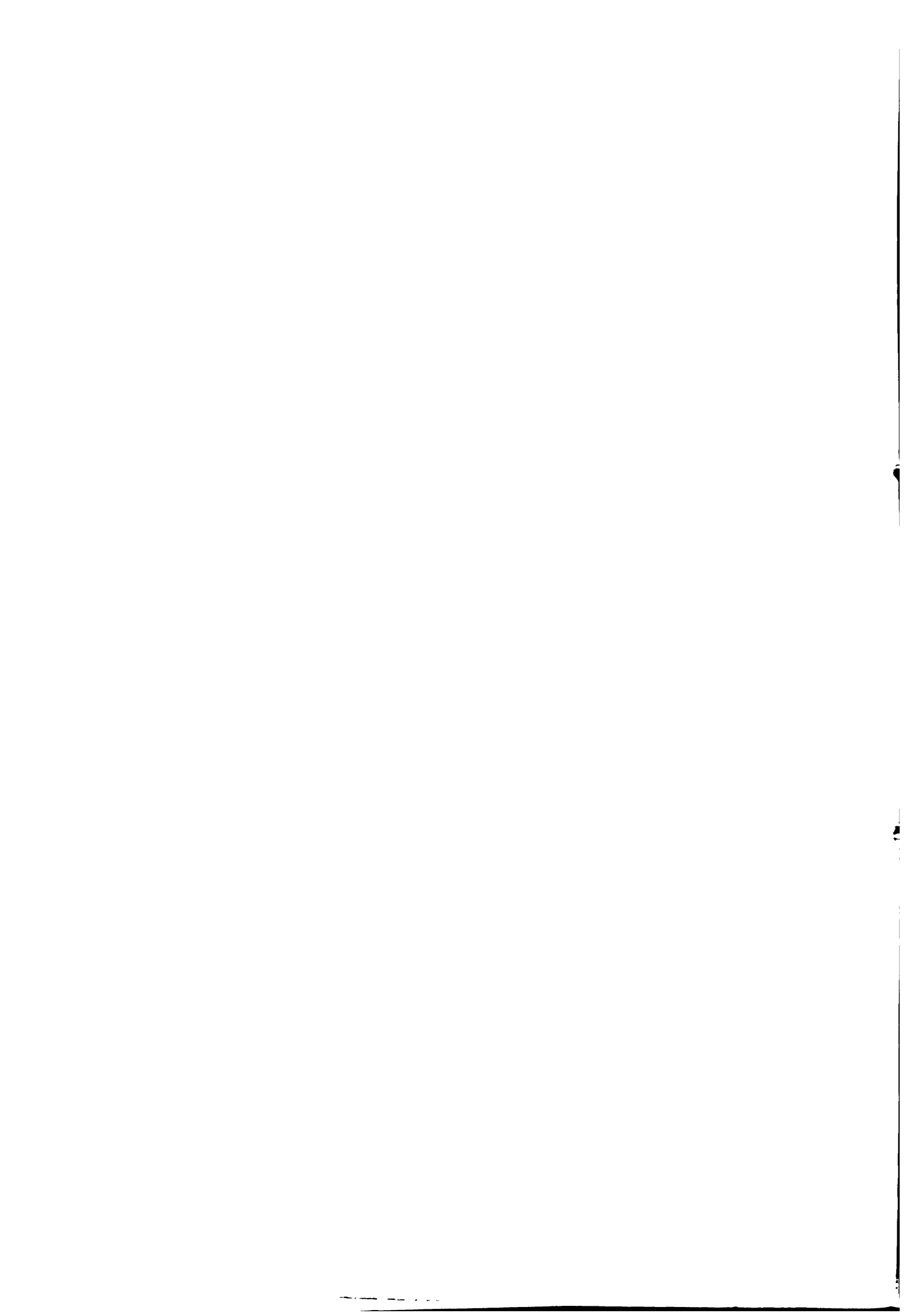
1.2.2.1 Características de los cultivos

Las colonias de *Brucella* suelen ser visibles a los 3 días de incubación. Las colonias son lisas, transparentes, translúcidas, con bordes redondeados, de 2-3 mm. de diámetro. En medios selectivos la proliferación es un poco más lenta y a veces no crece más que una colonia por placa. Por ello se recomienda preparar el cultivo de más de una placa por muestra.

Métodos de observación de la morfología de las colonias

Los cultivos de brucelas tienden a modificarse durante su crecimiento y esas variaciones morfológicas se acompañan de cambios de infecciosidad y antigenicidad. Las colonias lisas suelen ser patógenas, mientras que las rugosas tienen menor infecciosidad y diferentes características antigénicas. Así pues, la observación de la morfología de las colonias es indispensable para llevar a cabo los procedimientos que a continuación se describen.

- Al preparar vacunas vivas es necesario mantener al nivel previsto la infecciosidad y la inmunogenicidad de la cepa vacunal. El material de siembra se obtendrá a partir de 10 colonias lisas como mínimo y antes de la distribución se verificará el grado de disociación del producto final.
- Para obtener antígenos de diagnóstico se emplearán cultivos de un grado de reactividad alto y uniforme.
- Las cepas recientemente aisladas que se someten a pruebas de tipificación suelen dar colonias lisas (excepto *B. ovis* y *B. canis*), aunque se han dado casos auténticos de aislamiento de brucelas no lisas, sobre todo de *B. melitensis*, en la leche. Los cultivos no lisos no se pueden tipificar con sueros monoespecíficos ni



con fagos antibrucela. Si durante el cultivo sobrevienen cambios morfológicos conviene seleccionar una colonia lisa para su tipificación.

Observación directa de las colonias

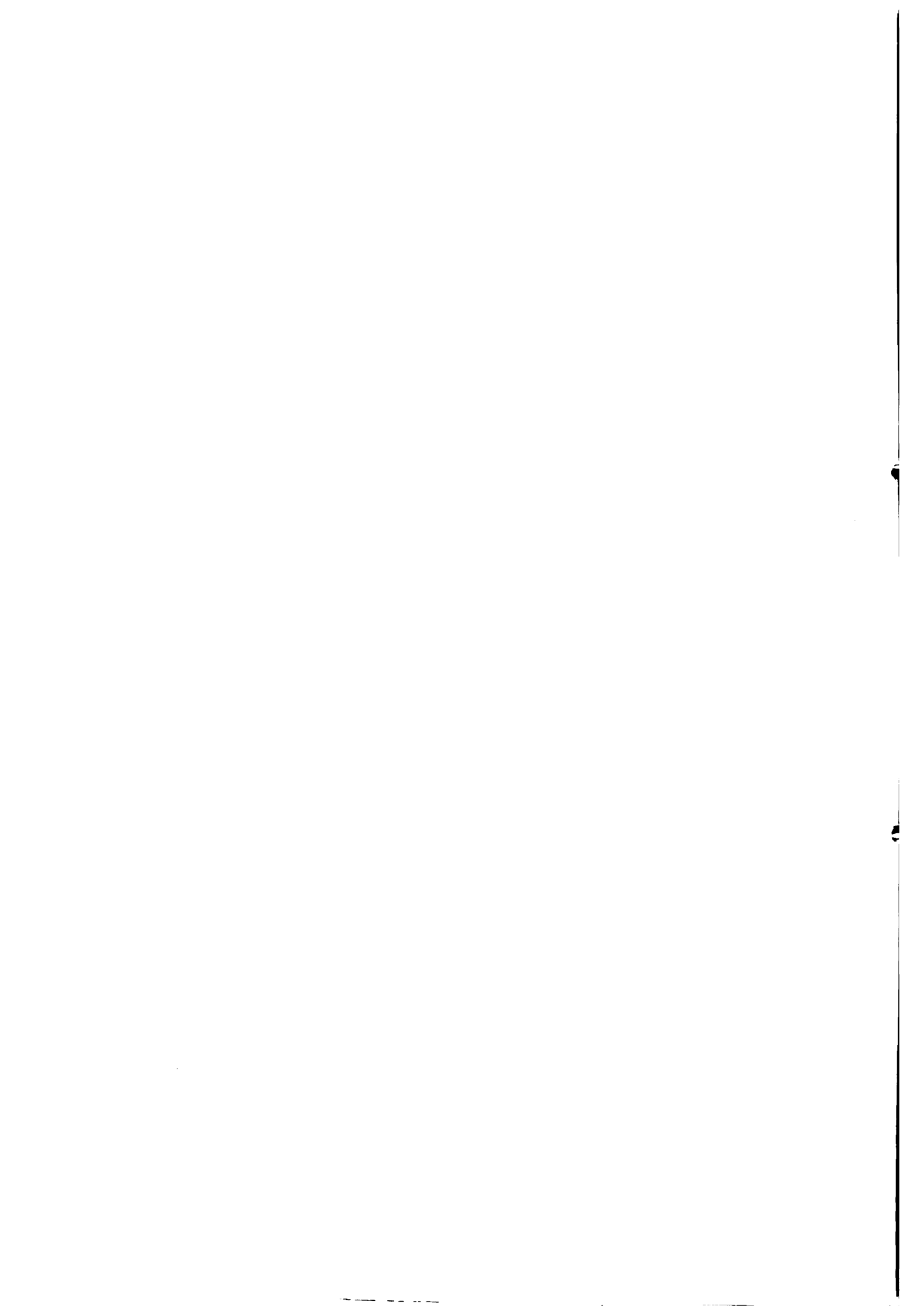
Método de examen directo de colonias de brucelas con iluminación oblicua. El aparato consta de:

(1) un reflector provisto de un condensador regulable; (2) un microscopio estereoscópico de pequeño aumento con un sistema óptico que proporcione ampliaciones de 15x a 20x y una platina de vidrio transparente y (3) un pequeño espejo cóncavo y redondo, normalmente montado bajo de la platina del microscopio que se puede desmontar y colocar entre éste y el reflector el aparato se coloca de modo que la luz de la lámpara incida sobre la superficie del espejo y se refleje hacia arriba para atravesar la placa de agar en un ángulo de unos 45°C. Con otros tipos de lámparas habrá que hacer pequeños ajustes de posición.

El aparato se instalará en una habitación oscura para que la luz incidente no dificulte la observación. El medio de agar debe ser lo más incoloro y transparente que sea posible. Los medios más adecuados son el agar-dextrosa con glicerina (2:1 de agar) y el agar-tripticosa-soja, ya que revelan pequeñas diferencias en los tipos de colonias. Las placas deben estar bien secas en el momento de la siembra, que se hará en estrías sobre la superficie de la placa fin de que las colonias estén más juntas en unos sitios y más dispersas en otros. Las pequeñas diferencias morfológicas se ven mejor en las colonias que están más agrupadas.

El examen de las placas se hace a los 4 días de la siembra, excepto cuando se trata de cepas de desarrollo más lento, como las cepas de la vacuna Rev. 1, que requiere 1 día más para la incubación. Las colonias lisas son pequeñas, redondas, brillantes y su color oscila entre el azul y el azul verdoso, mientras que las rugosas son de aspecto granuloso y reseco y su color oscila entre el amarillo rojizo y el blanco amarillento. Las colonias mucoides son a veces transparentes y grisáceas y pueden distinguirse por su consistencia viscosa muy perceptible cuando se tocan con una aguja o un asa. Las colonias intermedias son las más difíciles de diferenciar por tener características morfológicas situadas entre las lisas y las rugosas; en otros términos, son algo más opacas y granulosas que las lisas.

Conviene siempre confirmar la observación directa de la morfología de las colonias mediante los 2 métodos que se describen a continuación y que pueden aplicarse correctamente con un mínimo de experiencia previa.



Aglutinación en portaobjetos

La presencia de colonias de *Brucella* pueden confirmarse mediante la aglutinación en portaobjetos. Una pequeña porción de cultivo se emulsiona sobre un portaobjetos en tres gotas de solución salina (realizarlo dentro de una cabina de seguridad). A la primera gota de suspensión bacteriana se añade una gota de suero anti-brucela lisa convenientemente diluido; a la segunda gota se añade una gota de suero antibrucela rugosa y a la tercera se añade una gota de suero normal. Se mezclan las suspensiones y los sueros y se observa si hay aglutinación. Las brucelas lisas se aglutinan en presencia del suero antibrucela lisa; las colonias disociadas y las especies rugosas de brucelas (ej. *B. canis* y *B. ovis*) se aglutinan con sueros antibrucelas rugosas y pueden presentar cierta aglutinación con el suero antiliso y el suero normal.

Prueba de la acriflavina

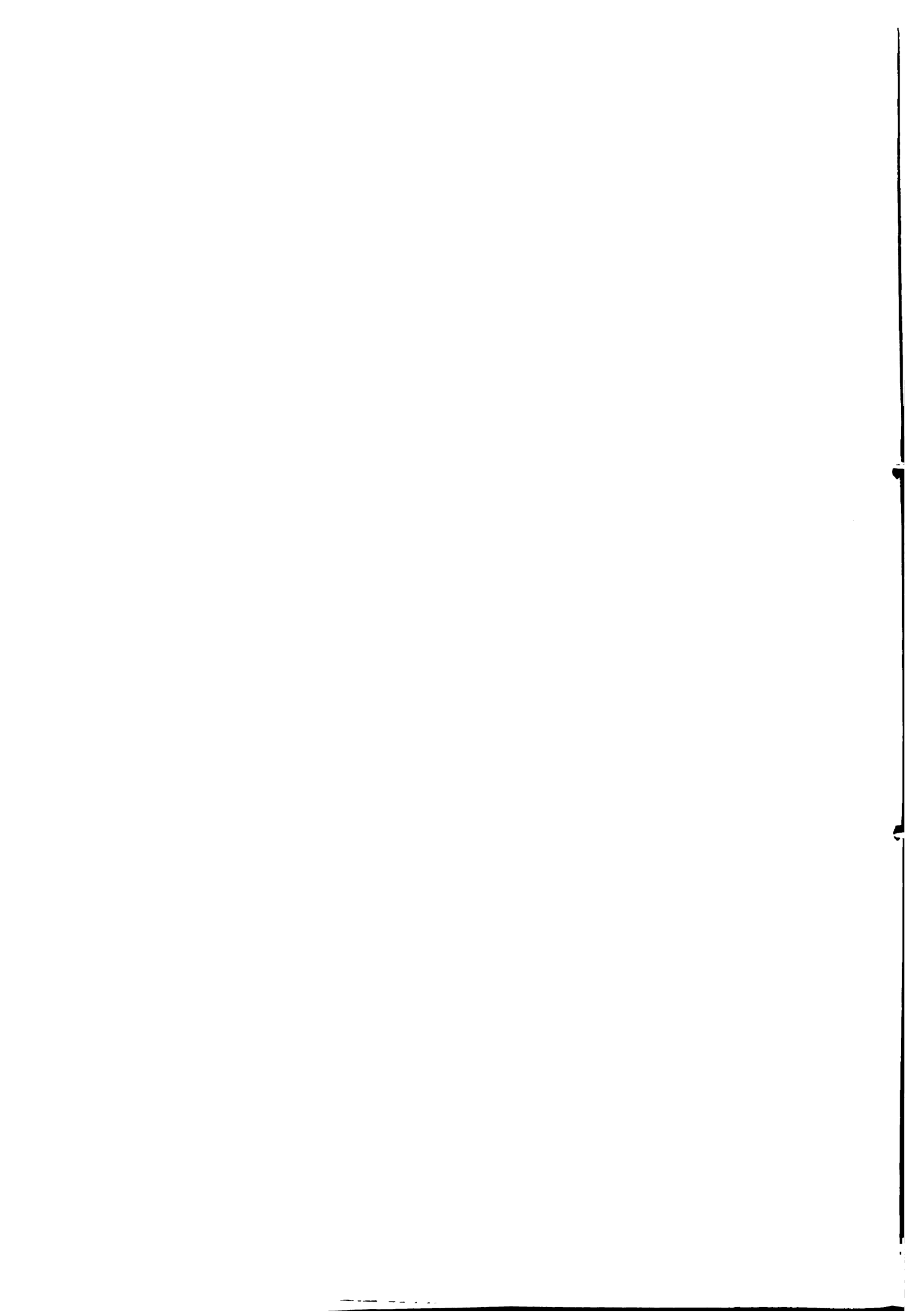
La acriflavina neutra se diluye al 1:1 000 en agua destilada. Para obtener resultados seguros es preciso preparar el día mismo en que va a utilizarse. Pueden pesarse de antemano y colocarse en tubos de ensayo pequeñas cantidades de acriflavina. Cuando se necesitan, puede añadirse la cantidad requerida de agua (esto es, 10 ml por 10 gr. de acriflavina) y al final del día se desecha la solución.

El modo operatorio más sencillo es depositar sobre un portaobjetos una gota de la solución de acriflavina y, con el asa, suspender en ella una colonia o una porción muy pequeña de cultivo. El examen del portaobjetos se hace con un microscopio estereoscópico de pequeño aumento. Las colonias lisas permanecen en suspensión, mientras que las rugosas se aglutinan inmediatamente y las mucoides forman filamentos. Las colonias intermedias pueden permanecer en suspensión o aglutinarse ligeramente.

Tinción de las colonias con cristal violeta

El método de tinción con cristal violeta está especialmente indicado cuando las colonias están bien separadas, por ejemplo, en las placas utilizadas para el recuento de los gérmenes viables presentes en una vacuna. La solución madre se prepara disolviendo 2 gr. de cristal violeta certificado en 20 ml de alcohol absoluto y 0.8 gr. de oxalato amónico en 80 ml de agua destilada; una vez que se han disuelto por completo ambas soluciones, se las mezcla para formar la solución madre. La solución se conserva en un frasco herméticamente cerrado y no es necesario renovarla antes de 3 meses. Inmediatamente antes de emplearla debe diluirse 1:40 de agua destilada.

Las placas se cubren con la dilución del colorante durante 15 a 20 segundos y después de verter éste en un desinfectante mediante una pipeta de Pasteur, se examinan inmediatamente con una lupa o un microscopio estereoscópico.



Las colonias lisas no toman el colorante; las disociadas se tiñen en distintos tonos de rojo y violeta y en su superficie pueden presentarse grietas radiales. En ocasiones, de una colonia disociada se desliza una película superficial teñida que aparece al lado de la colonia no teñida. Cuando en la placa de petri hay un alto grado de humedad, las colonias pueden separarse del agar al cubrir éste con el colorante.

1.2.2.2 Métodos de tinción

En general, se utilizan los 2 métodos que se describen a continuación:

Método de Ziehl - Nielsen modificado

- Secar y fijar el frotis a la llama.
- Teñir durante 10 minutos con una dilución al 1:10 de la solución madre de fucsina fenicada de Ziehl-Nielsen (solución madre: disolver 1 gr. de fucsina básica en 10 ml. de alcohol absoluto y agregar 90 ml de solución de fenol al 5%).
- Lavar con agua corriente.
- Decolorar con ácido acético al 0.5% durante 30 segundos como máximo.
- Lavar cuidadosamente.
- Recolorar ligeramente (20 segundos) con azul de metileno al 1%.

Las brucelas aparecen teñidas de rojo sobre fondo azul. En los frotis de membranas fetales suelen estar agrupadas en racimos redondeados dentro de las células del tejido teñidas de azul.

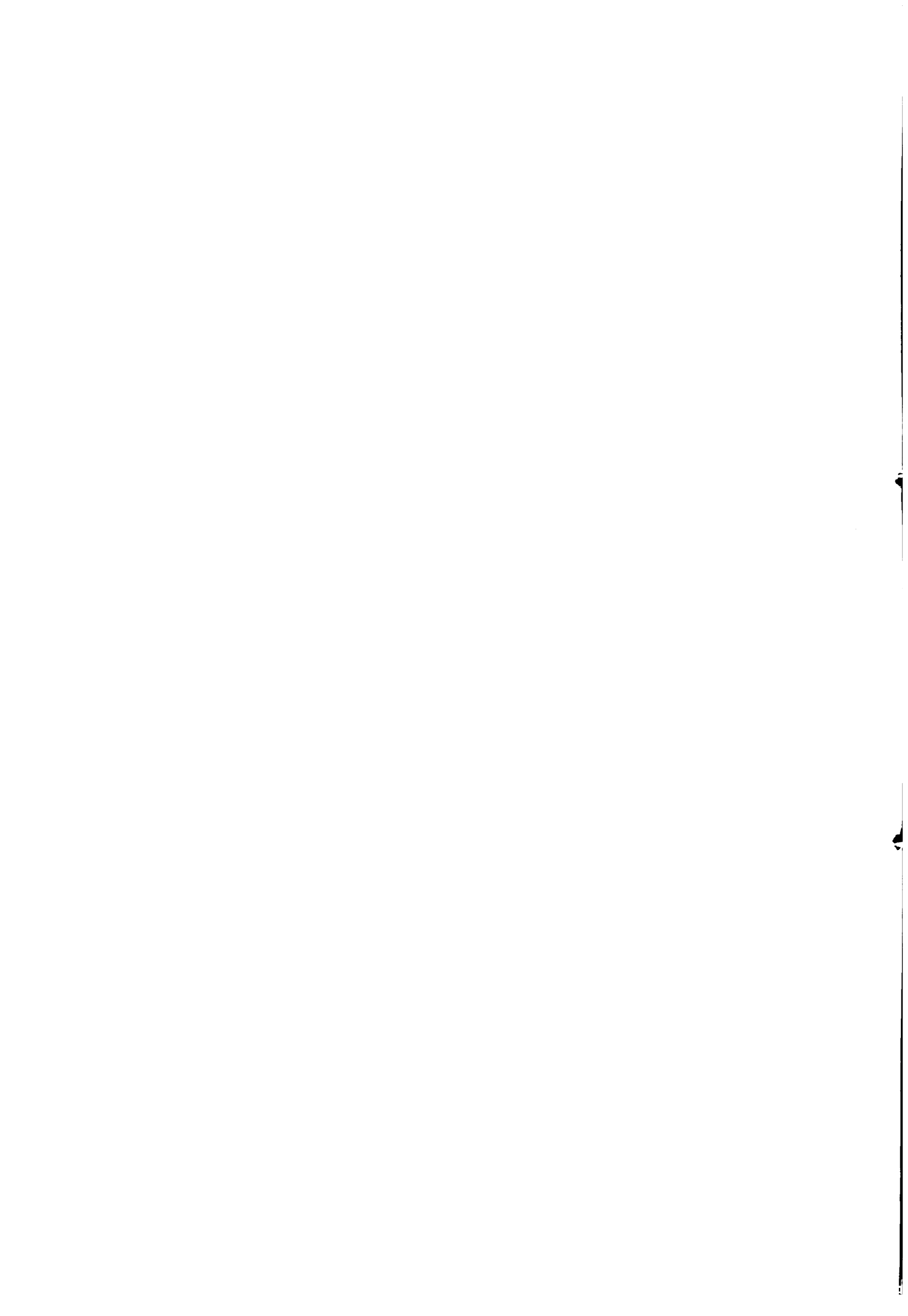
Método de Koster modificado

- Secar y fijar el frotis a la llama.
- Teñir durante 1 minuto con una mezcla recién preparada de 2 partes de solución acuosa saturada de safranina y 3 partes de una solución de 1 mol/lit. de hidróxido potásico.
- Lavar con agua corriente.
- Recolorar con azul de metileno fenicado al 1%.

Las brucelas aparecen teñidas de rojo anaranjado sobre fondo azul.

Identificación

Organismos gramnegativos, bacilos cortos o cocobacilos, inmóviles, generalmente aislados; 0.6 a 2.6 μm . de longitud y 0.5–0.7 μm . No forman esporas ni cápsulas



Cuadro 8

TIPIFICACION DE LAS CEPAS DE BRUCELLA

Especies	Biotipo	Requerimiento de CO ₂	Producción de H ₂ S	Crecimiento en presencia de colorantes ^a		Aglutinación con sueros ^b			Lisis por fago en D.P.O. ^c			
				Tionina	Fucsina	A	M	R	Tb	Wb	Bk	Fz
<i>B. abortus</i>	1	+(-) ^d	+	- - -	+ +	+	-	-	L	L	L	L
	2 ^e	+	+	- - -	- -	+	-	-	L	L	L	L
	3	+(-)	+	+ + +	+ +	+	-	-	L	L	L	L
	4	+(-)	+	- - -	- -	-	+	-	L	L	L	L
	5	-	-	- + +	+ +	-	+	-	L	L	L	L
	6	-	- O +	- + +	+ +	+	-	-	L	L	L	L
	7	-	- O +	- + +	+ +	+	-	-	L	L	L	L
	8	+	-	- + +	+ +	-	-	-	L	L	L	L
	9	- O +	+	- + +	+ +	-	+	-	L	L	L	L
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	- + +	+ +	-	+	-	NL	NL	L	NL
	2	-	-	- + +	+ +	+	-	-	NL	NL	L	NL
	3	-	-	- + +	+ +	+	+	-	NL	NL	L	NL
<i>B. suis</i>	1	-	++	+ + +	- -	+	-	-	NL	L	L	LP
	2	-	-	- + +	- -	+	-	-	NL	L	L	LP
	3	-	-	+ + +	+ +	+	-	-	NL	L	L	LP
	4	-	-	+ + +	+ +	+	+	-	NL	L	L	LP
<i>B. ovis</i>	1 ^e	+	-	+ + +	+ +	-	-	+	NL	NL	NL	NL
<i>B. canis</i>	1	-	-	+ + +	- ±	-	-	+	NL	NL	NL	NL
<i>B. neotomae</i>	1	-	+	- - +	- -	+	-	-	NL o LP	L	L	L

^a La diferenciación de las especies se hace en agar tripticosa soja o agar triptosa con la siguiente gama de diluciones de colorante: a) 1:25 000; b) 1:50 000; c) 1:100 000. Las pruebas con cepas que requieren CO₂ deben hacerse en una atmósfera enriquecida con ese gas; las demás se realizan en atmósfera normal.

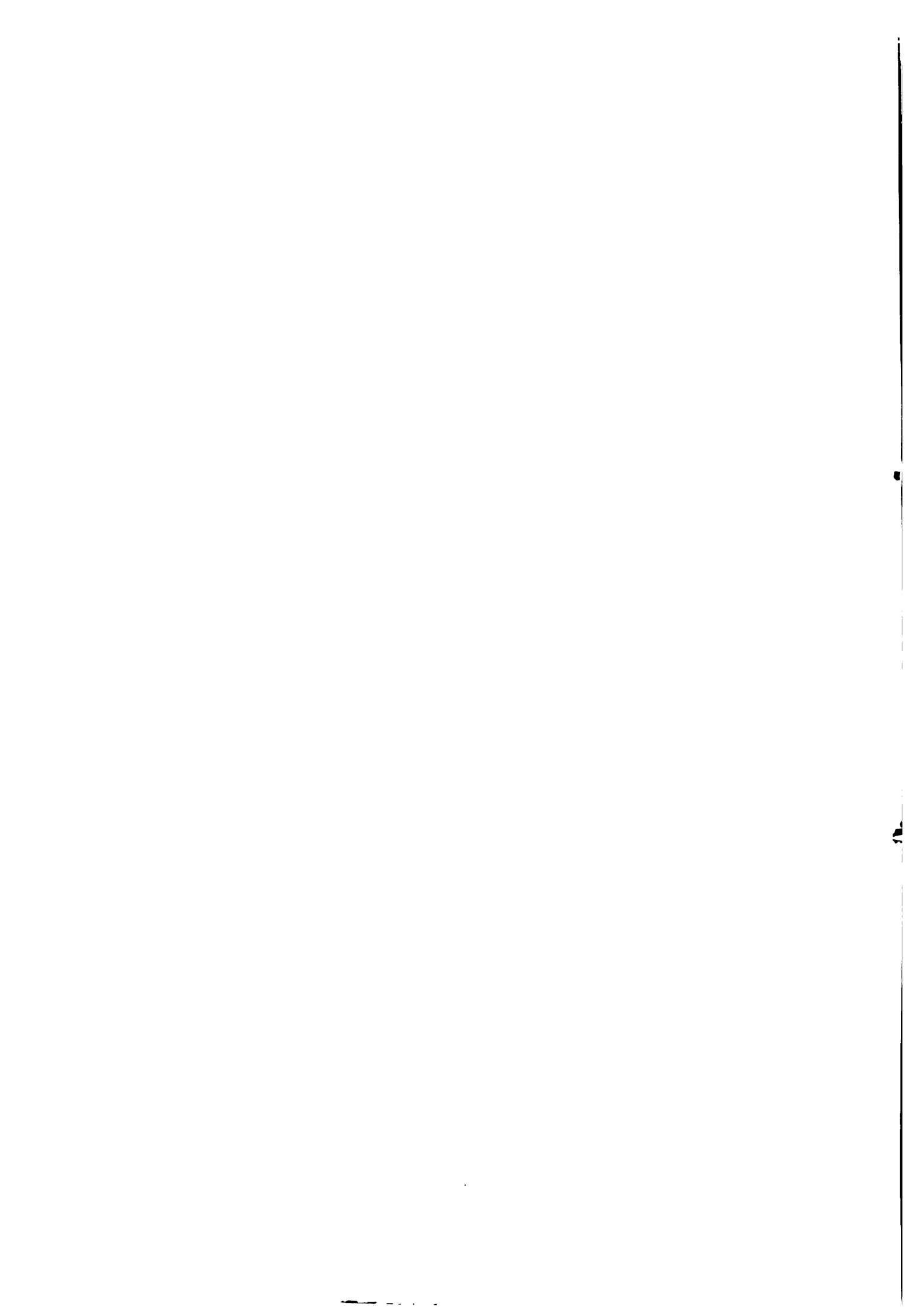
^b A = suero monoespecífico *abortus*; M = suero monoespecífico *melitensis*; R = suero antibrucelas rugosas.

^c Tb = Tbilisi; W= Weybridge; B= Berkeley; Fz= Firenze; D.P.O. = dilución para pruebas ordinarias.

^d +(-) = Prueba generalmente positiva, pero pueden encontrarse variedades negativas, por ejemplo, la Cepa 19.

^e Para el cultivo de *B. abortus* biotipo 2 y *B. ovis* es preciso añadir 5% de suero al medio base.

L= lisis total; LP= Lisis parcial; NL= no lisis



1.2.2.3 Necesidades de anhídrido carbónico

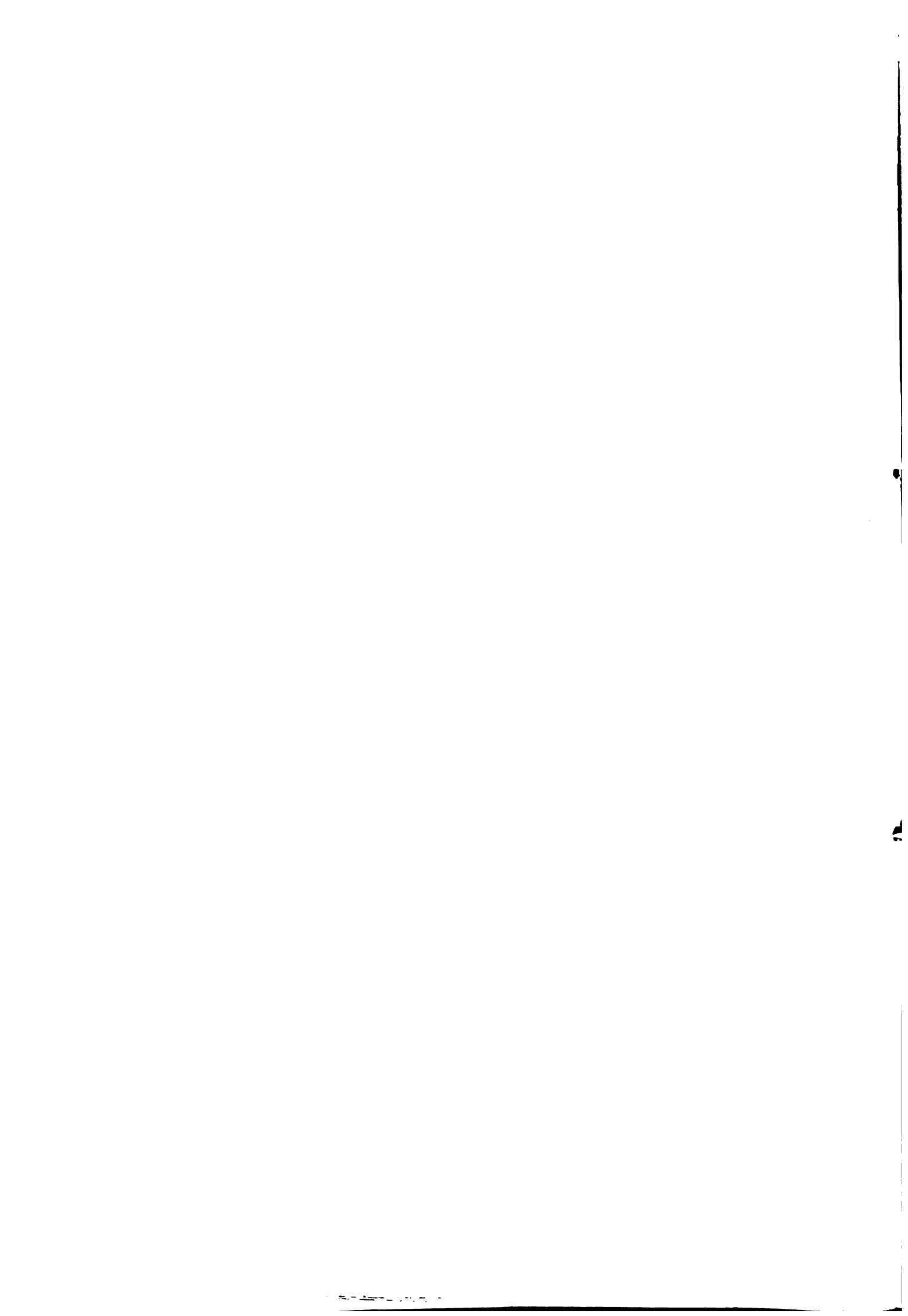
Para evaluar las necesidades de anhídrido carbónico de la cepa estudiada se resiembr en 2 tubos inclinados de agar, de los cuales uno se incuba en atmósfera normal y otro en una atmósfera enriquecida con 5–10% de anhídrido carbónico. Esta prueba debe hacerse inmediatamente después del aislamiento para evitar que los sucesivos subcultivos del germen original provoquen la aparición de mutantes menos exigentes de anhídrido carbónico. Si en el cultivo en atmósfera normal sólo aparecen escasas colonias, éstas no se tendrán en cuenta. A fin de emplear la atmósfera adecuada de incubación en las placas de tinción, es preciso evaluar las necesidades de anhídrido carbónico antes de comprobar la proliferación de los cultivos en presencia de los colorantes.

1.2.2.4 Proliferación en presencia de colorantes

Los colorantes fucsina básica y tionina¹, en 2 o 3 concentraciones, se incorporan en medios de base fundidos. Con cada colorante se prepara una solución madre al 0.1% en agua destilada; se mantienen las soluciones durante 20 minutos en corriente de vapor o durante 1 hora en agua hirviendo y luego se añaden al agar fundido mientras está caliente. Es preferible conservar las soluciones madre en frascos con tapón de rosca y renovarlas cada mes.

Para las pruebas de colorantes se suelen emplear como medios de base el agar-triptosa y el agar-dextrosa con suero. Aunque también son adecuados otros medios, hay que tener en cuenta que el medio de base que se elija deberá mantener el desarrollo de todos los biotipos sometidos a prueba. Cualquiera sea el medio de base que vaya a emplearse, es necesario precisar cuáles son las concentraciones de colorantes que permiten diferenciar con mayor claridad los biotipos 1 *de B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*. En general, esas concentraciones suelen estar comprendidas entre 1:25 000 y 1:100 000 (o 10–40 µg. De colorante por ml de medio).

Al medio de base fundido se le agrega la cantidad necesaria de la solución madre del colorante y, después de mezclar cuidadosamente, se vierte en placas de petri o en tubos inclinados. Para la tipificación de cultivos de animales vacunados, prepararse simultáneamente placas que contengan las concentraciones adecuadas de azul de tionina, eritritol, penicilina y estreptomina con objeto de diferenciar las cepas vacunales. Cuando el medio se ha enfriado, se dejan las placas en estufa a 37°C hasta la mañana siguiente, o si han de emplearse el día mismo de su elaboración, se ponen a secar dejando la tapa entreabierta y el medio boca abajo durante 1 o 2 horas en la estufa.



Las suspensiones de los cultivos que se van a examinar y los cultivos testigo se preparan tomando con el asa una porción de un cultivo reciente y suspendiéndola en 1ml de solución salina estéril. El grado de turbiedad de las suspensiones así preparadas debe ser bastante uniforme.

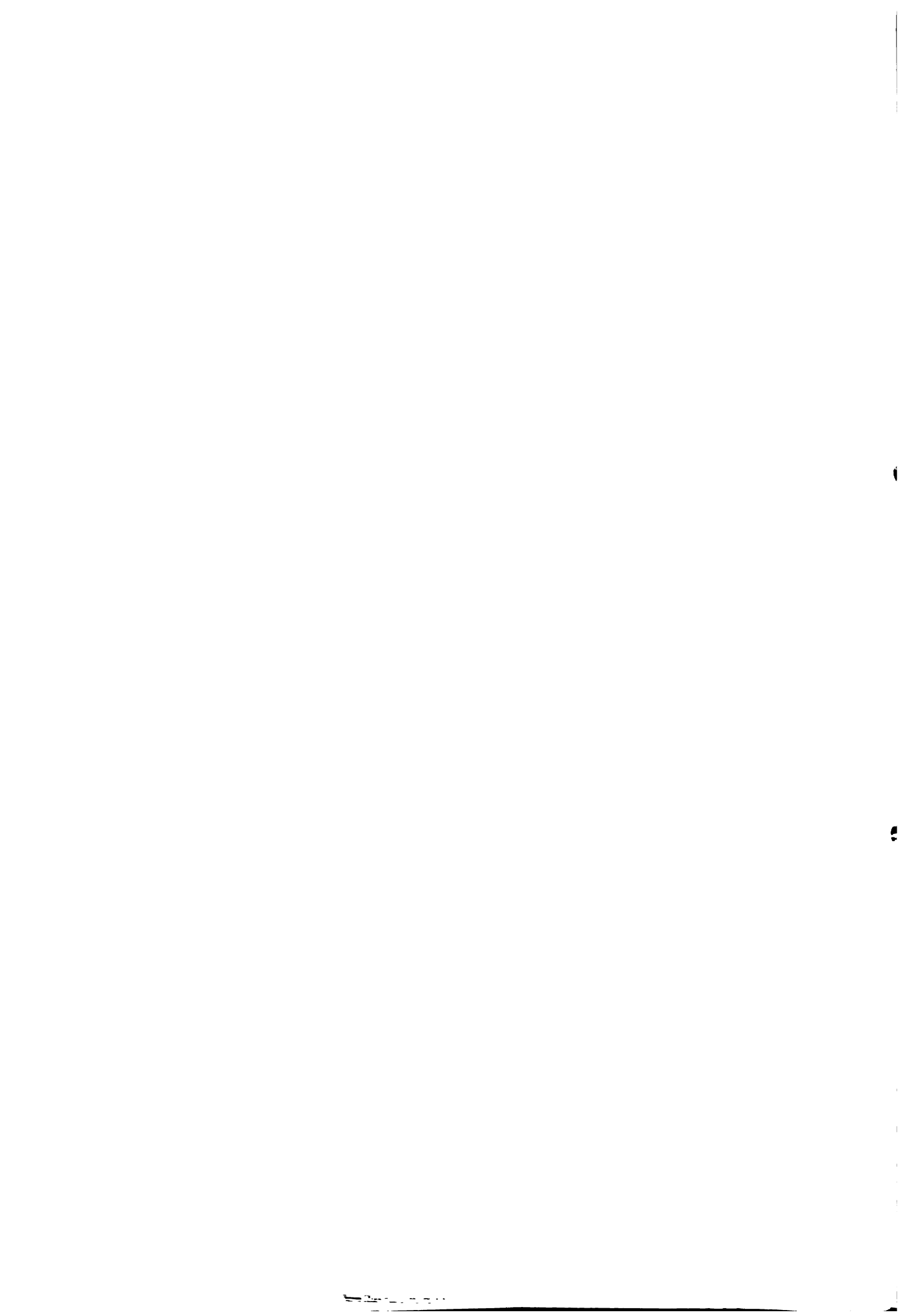
Un método sencillo y satisfactorio para sembrar las placas consiste en sumergir en la suspensión bacteriana una torunda de algodón estéril con la que se siembra una sola estría en cada una de las placas de colorante y en una placa testigo de medio ordinario, sin volver a cargar la torunda. (El otro método, consistente en emplear un asa que se vuelve a cargar después de la siembra de cada placa, lleva más tiempo, además de que es peligroso manipular un asa llena de la suspensión). Antes de la siembra hay que marcar en las placas (o el número de la clave). En cada placa pueden examinarse hasta 6 cultivos, pero habrá que cerciorarse de que las siembras en estría no se toquen. En cada serie de pruebas de colorante han de incluirse testigos preparados con las principales cepas de referencia. La cepa de referencia *B. abortus* 544, que requiere anhídrido carbónico, debe incluirse en una de las placas en que se hayan sembrado otros cultivos que precisan de una atmósfera enriquecida con anhídrido carbónico. Esas placas se incuban en una atmósfera enriquecida con 5–10% de anhídrido carbónico.

Las cepas de referencia *B. melitensis* 16M, *B. suis* 1330 y *B. abortus* cepa vacunal 19 deben sembrarse en placas que contengan cultivos que no precisan anhídrido carbónico; esas placas se incuban en atmósfera normal. A los 3–4 días de incubación se examina el desarrollo de los cultivos en las placas. En términos generales, los cultivos de *B. melitensis* no se desarrollan tanto en las placas de colorante como casi todos los de *B. abortus* y *B. suis*. Esta útil distinción es menos manifiesta cuando las placas se incuban en atmósfera enriquecida con anhídrido carbónico.

En algunos laboratorios se utilizan otros colorantes para las pruebas corrientes de tipificación. Por ejemplo, se ha observado que la safranina O en dilución al 1:5 000 inhibe el crecimiento de todos los biotipos de *B. suis*; en cambio, todos los biotipos de *B. abortus* y *B. melitensis* proliferan en grado variable en presencia de la safranina O.

1.2.2.5 Producción de ácido sulfhídrico

El cultivo se siembra en un tubo inclinado de agar adecuado para el desarrollo de las brucelas y luego se introduce en el tubo una tira de papel impregnado en acetato de plomo, sujetándola entre el borde y el tapón para que no llegue a tocar el medio. Aunque en la técnica descrita por Huddleson se utiliza como medio de cultivo agar-hígado, también dan buenos resultados el agar-dextrosa con suero o los medios de base recomendados. El extremo del papel de acetato de plomo se oscurece cuando se



desprende ácido sulfhídrico. Se registran los resultados y se cambian los papeles a diario durante 4 días.

Para preparar los papeles de acetato de plomo se empapa un papel de filtro en una suspensión al 10% de acetato neutro de plomo en agua destilada y después se cuelga y se deja secar al aire. Una vez seco el papel, se corta en tiras del tamaño correspondiente al del tubo de ensayo que se va a emplear para el cultivo inclinado; normalmente se emplean tiras de unos 12 x 1 cm. No es necesario esterilizar.

1.2.2.6 Prueba de la ureasa

En las zonas donde es posible encontrar *B. suis*, la prueba de la ureasa permite una rápida diferenciación. Casi todas las cepas de *Brucella* poseen actividad ureásica, pero las de *B. suis* descomponen la urea con mayor rapidez. La reacción es algo más retardada en los cultivos de *B. abortus* y la cepa de referencia 544 es atípica en la medida en que no descompone la urea. En este caso es necesario emplear como cepa testigo otro cultivo de *B. abortus*, como la cepa 19. Por lo general los cultivos de *B. melitensis* tardan más en descomponer la urea que los cultivos de *B. abortus*. También desintegran la urea *B. neotomae* y *B. canis*, pero no *B. ovis*.

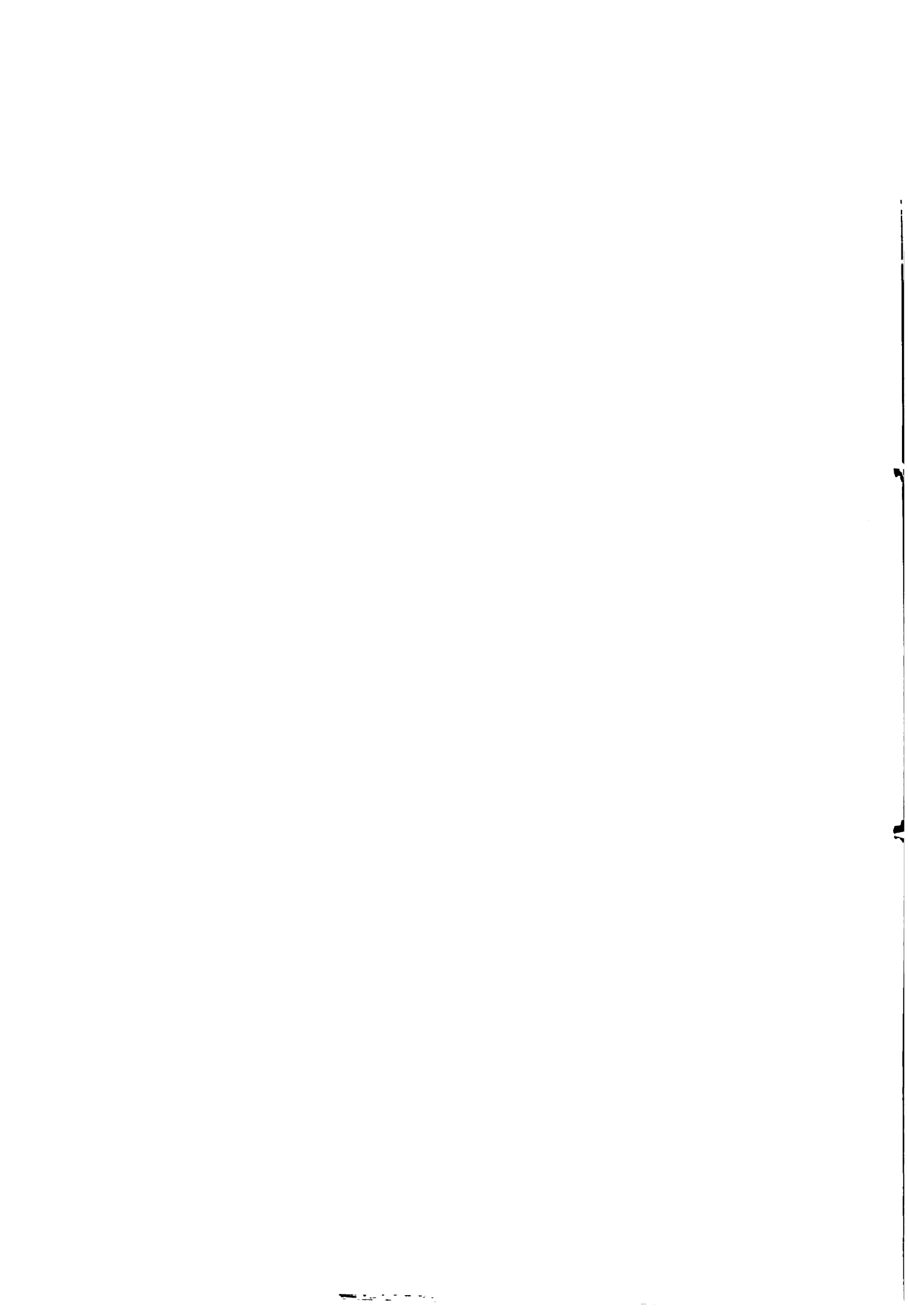
Hay diversos métodos para determinar la actividad ureásica; asimismo, en el comercio existen medios para efectuar la prueba.

Empleo del medio de Christensen

El medio es muy utilizado para la detección de gérmenes que descomponen la urea, como *Proteus* y ciertas cepas de *Staphylococcus* y *Brucella*. Se prepara con los siguientes ingredientes:

Peptona.....	1 gr.
Cloruro sódico.....	2 gr.
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄).....	2 gr.
Rojo fenol (sol. acuosa al 1:500)	6 ml.
Dextrosa.....	1 gr.
Agar.....	20 gr.
Agua destilada.....	1 000 ml.

Se aplica calor para disolver el agar, se lleva el pH a 6.8 y se distribuye el medio en tubos de ensayo (5 ml en cada tubo), esterilizándolo luego a 120°C durante 20 minutos. Cuando los tubos se han enfriado a 50°C, se agrega 0.5 ml de una solución al 20% de urea, previamente esterilizada por filtración a través de un filtro bacteriológico, obteniéndose una concentración final de urea del 2%. Se deja



solidificar el medio en los tubos inclinados; al enfriarse debe presentar un color amarillo.

Se siembra con asa sobre medio inclinado. Si existe *B. suis*, el medio toma una coloración rosa purpúrea casi inmediatamente, mientras que con otras brucelas el viraje puede tardar en producirse varias horas. Los tubos se mantienen a temperatura ambiente y se deben examinar cada hora durante 5 horas y finalmente a las 24 horas.

Método de Bauer

Se recomienda este método para la determinación semicuantitativa de la actividad ureásica. El sustrato no contiene sustancias que fomenten la proliferación; por eso conviene que las suspensiones de brucelas que se vayan a examinar contengan gérmenes recién cultivados cuya densidad sea poco más o menos igual.

1.2.2.7 Aglutinación con sueros monoespecíficos

Los cultivos de brucelas se presentan en forma lisa o en forma rugosa y son aglutinados por sus antisueros respectivos. Por medio de los sueros monoespecíficos *B. abortus* y *B. melitensis* absorbidos se puede determinar cuál es el aglutinógeno (A y M) que predomina en los cultivos que presentan forma lisa.

El cultivo que se va a ensayar se siembra en medio inclinado y se prepara una suspensión densa, recogiendo en 1-2 ml de solución salina. Se calienta la suspensión a 65°C durante 1 hora a baño maría. Por lo general se hacen pruebas sobre portaobjetos. Las pruebas en tubo de ensayo resultan más satisfactorias pero también más complicadas y requieren mayor cantidad de suero.

Para la prueba en portaobjeto se diluyen los sueros, de forma que los cultivos testigos (*B. abortus* biotipo 1, *B. melitensis* biotipo 1 y un cultivo de forma rugosa, ej., *B. ovis*) se aglutinen en 1 minuto con el suero homólogo y no den una aglutinación perceptible con otros sueros en el mismo lapso. Se deposita en un portaobjetos una gota de cada una de las diluciones del suero y a cada una de ellas se añade una gota de cada una de las diluciones de suero y a cada una de ellas se agrega una gota de la suspensión y se mezcla con una asa. La aglutinación debe producirse durante el primer minuto con uno de los sueros. Si los dos sueros monoespecíficos provocan aglutinación se practicará la prueba en tubo de ensayo.

Para la prueba en tubo de ensayo, cada uno de los sueros mono específicos se prepara en diluciones de razón 2, a partir de 1:5 hasta el título inmediatamente siguiente al suyo conocido. Para cada uno de los cultivos que se va a ensayar, se disponen 2 series de diluciones del suero monoespecífico con 0.5 ml por tubo. La suspensión con el cultivo muerto se usa en la prueba ordinaria.



1.2.2.8 Sensibilidad a fagos antibrucelares

La manipulación de los fagos exige precauciones especiales para evitar que los aerosoles de fagos contaminen caldos de cultivo en desarrollo o cultivos permanentes de brucelas. La prueba de sensibilidad a los fagos puede incluirse entre los procedimientos habituales de tipificación anteriormente descritos. Las diluciones del fago se conservan durante varios años a 4°C y se pueden transportar sin pérdida de actividad. El más empleado es el Tbilisi o Tb, aislado inicialmente en la URSS y que ha sido designado fago de referencia.

En las pruebas de lisotipia se emplean 2 concentraciones de fago: la dilución habitual de prueba (DHP) y una suspensión más concentrada, la 10 000 x DHP.

Cultivo del fago. El agar-tripticosa-soja y el caldo-tripticosa-soja son los mejores medios existentes en el comercio para el cultivo de los fagos. También da buenos resultados el agar-dextrosa con suero. El medio semisólido se prepara agregando 0.7% de agar al medio líquido elegido.

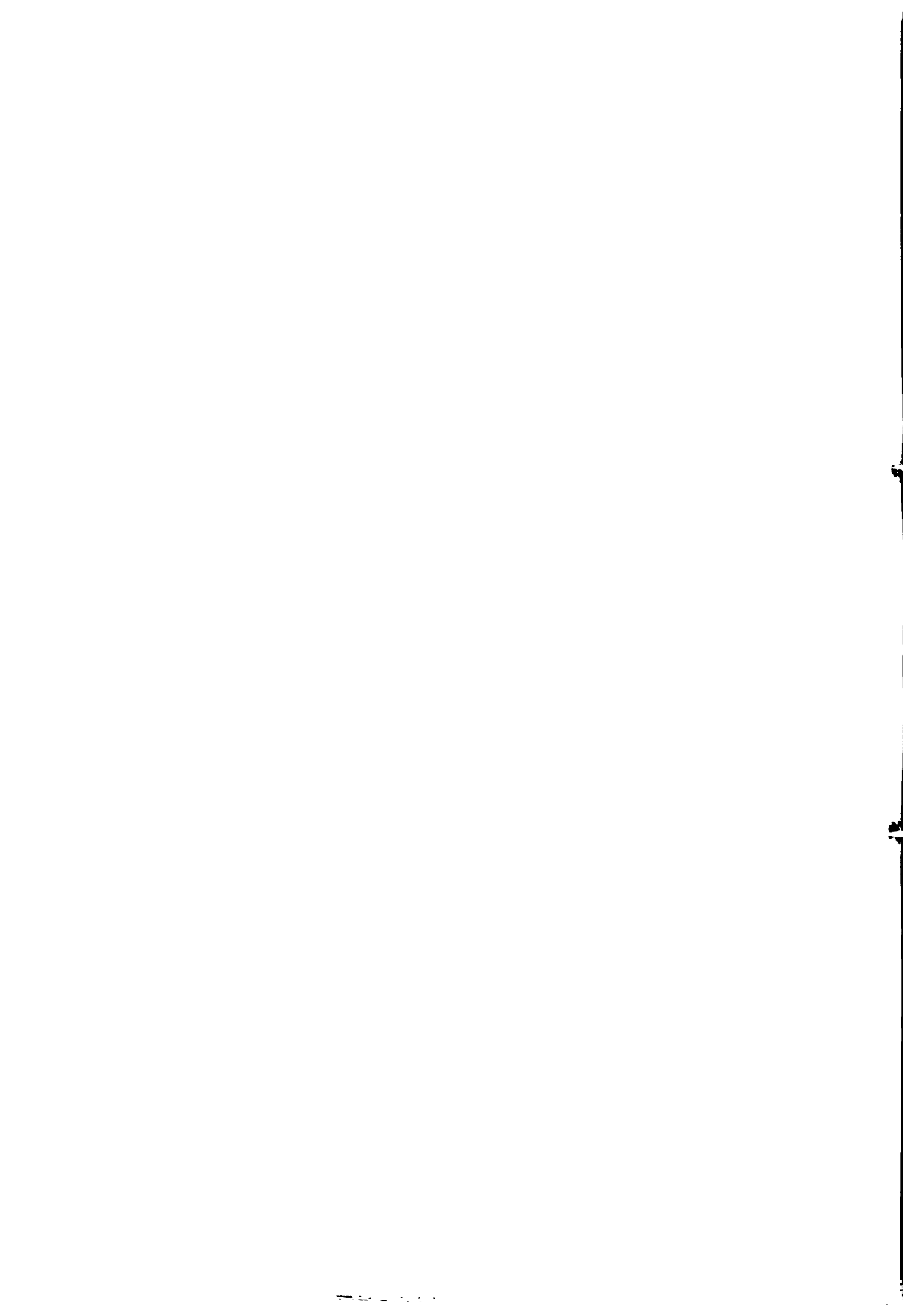
Para la filtración de los lisados bacterianos se utilizan con buenos resultados los filtros de membrana.

La adición de tolueno (a una concentración final de 0.14%) a los lisados destruye las células residuales sin detrimento de la estabilidad del fago durante el almacenamiento prolongado a 4°C. No conviene utilizar cloroformo.

Las diluciones del fago en caldo tripticosa-soja o en solución salina peptonada se puede conservar en recipiente de tapón roscado durante varios años a la temperatura de 4°C sin que disminuya su título. Los fagos antibrucelares se conservan asimismo en forma congelada o liofilizada.

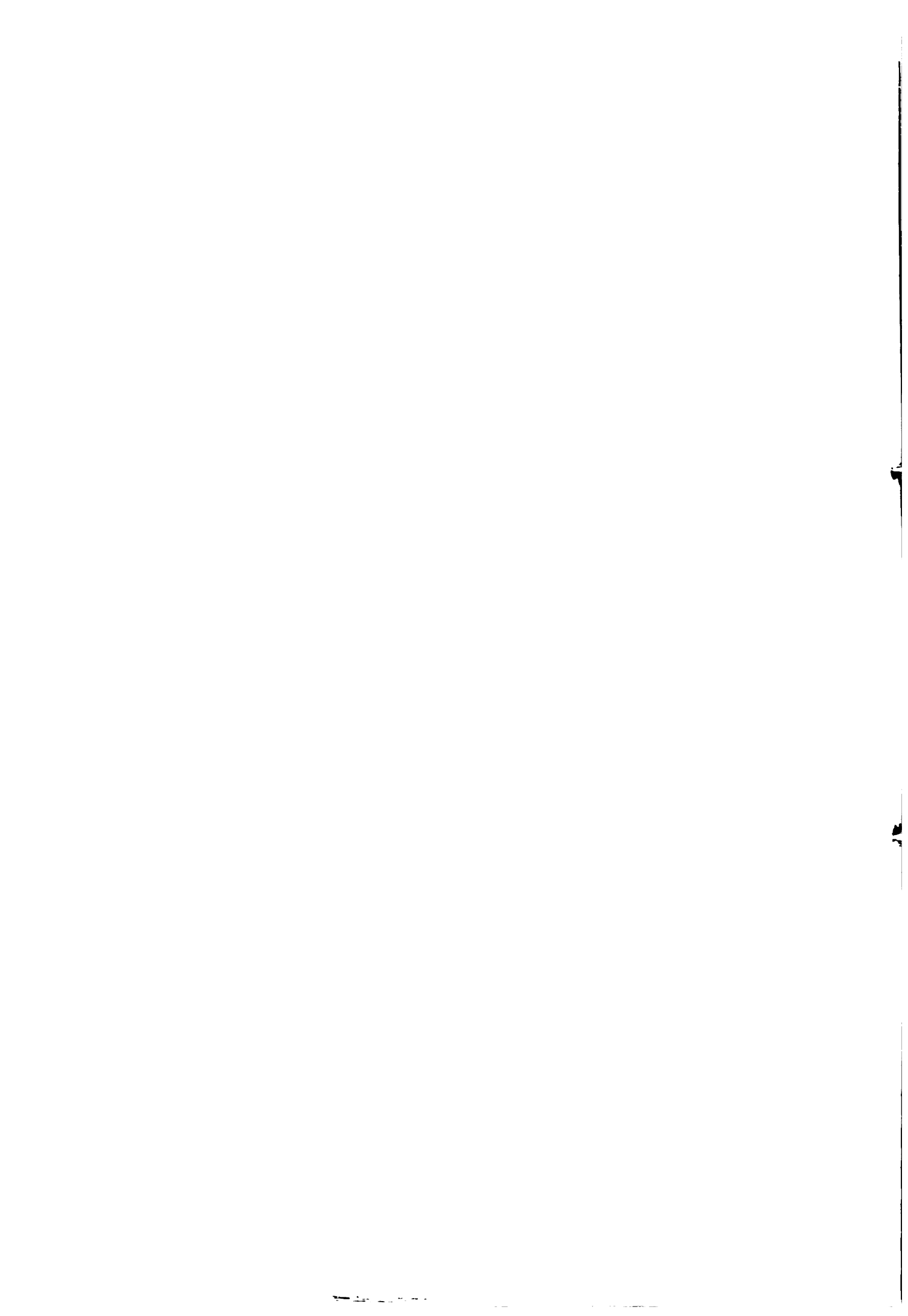
Como cepas huéspedes para el cultivo de los fagos, se han recomendado la cepa de referencia *B. abortus* 544 o un cultivo de la cepa 19, acompañante del fago Tbilisi aislado en la URSS. Si se emplea la 544, que requiere anhídrido carbónico, habrá que hacer el cultivo en agar. Con la cepa 19 se puede hacer el cultivo en agar o caldo, pues ésta no requiere anhídrido carbónico. Conviene señalar que es más rápido el cultivo de la cepa 19 obtenida con un fago de la URSS que el cultivo de otras cepas 19 (esto es, las cepas vacunales) y por ello se obtienen resultados más satisfactorios en el cultivo de fagos cuando se emplea el cultivo obtenido en la URSS.

Las preparaciones de fago que alcanzan un título de 10 000 x DHP, que basta para los fines de lisotipia corriente, pueden prepararse mediante el cultivo en frascos de Roux.



Para obtener fagos de título más elevado se puede recurrir al cultivo en doble capa de agar o al cultivo en caldo.

- *Cultivos en frascos de Roux.* En los frascos de Roux de agar-tripticosa-soja se siembra 1 ml de una suspensión salina peptonada obtenida de un cultivo inclinado de 24 horas de la cepa huésped. Se añade 1 ml de una dilución del fago más o menos de 10 000 x DHP. Se hacen girar suavemente los frascos de Roux de manera que el material se mezcle y cubra el agar. Los frascos se incuban a 37°C durante 24 horas, con el agar hacia arriba. Cuando la lisis es completa deja de ser visible el desarrollo de las brucelas en el frasco. Se recogen los fagos añadiendo 25 ml de solución salina peptonada y algunas cuentecillas de vidrio que previamente se han esterilizado en tubo. Sobre la superficie del agar se mueve suavemente la solución con las cuentecillas a fin de realizar la elución de los fagos. Se deja reposar el frasco verticalmente sobre la mesa durante 10 minutos y luego se aspira el material. Después de centrifugar el material para que se sedimenten las células residuales (8 000 g durante 20 minutos) se filtra el líquido sobrenadante a través de un filtro Millipore. Con arreglo al método descrito más adelante, se titula el filtrado exento de células.
- *Cultivo en doble capa de agar.* El material bacteriano, obtenido de un cultivo inclinado de 24 horas de la cepa huésped, se suspende en solución salina y se ajusta de forma que tenga una concentración de unos 10^8 organismos/ml. Un ml de esta suspensión y 1 ml de la suspensión de fago, se mezclan con 2 ml de agar semisólido fundido, enfriado a 45°C. La mezcla se vierte en una placa de agar sólido, que luego se incuba durante 24 horas sin dar la vuelta y, si lo exige la cepa huésped, en una atmósfera enriquecida con anhídrido carbónico. Para recoger el fago se agregan a la placa varios mililitros de caldo. Con una varilla estéril de cristal se desmenuza el agar blando y, después de raspar la placa, se vierte en un tubo de centrifuga. Después de centrifugar a una velocidad suficiente para que se sedimenten las bacterias pero no el fago (esto es, 8 000 g durante 20 minutos) se filtra el líquido sobrenadante a través de un filtro Milipore y el filtrado se conserva a 4°C.
La cantidad de fago utilizada para el cultivo puede modificarse , pero lo ideal es que la proporción respecto de las bacterias sea la necesaria para provocar una lisis casi completa. Esto se puede determinar mediante una titulación preliminar con 1 ml de la dilución al 1:10 de fago, 1 ml de dilución al 1:100 y 1 ml de dilución al 1:1 000, en 3 placas e doble capa de agar, preparadas como se ha descrito antes. Para el cultivo se elegirá la dilución que provoque en 24 horas una lisis casi completa.
- *Cultivo en caldo.* Con este método resultan particularmente satisfactorios el caldo-tripticosa-soja y el cultivo con cepa 19 obtenida de la URSS. El método exige el empleo de un agitador oscilante o de un agitador rotatorio magnético en



una estufa a 37°C. En cada matraz se coloca una pequeña cantidad de caldo-tripticosa-soja, por ejemplo, 30 ml por matraz de 250 ml), a fin de que el cultivo esté bien aireado y se mantenga así en forma lisa. En el caldo se siembra una suspensión de un cultivo de 24 horas de la cepa 19, de modo que la concentración sea de aproximadamente de 5×10^8 cél/ml de caldo. El cultivo se coloca en agitador a 37°C durante 6 horas. A continuación se añade el fago hasta que su concentración en el caldo de cultivo sea de unas 10^9 unidades formadoras de placas por ml. Se prosigue la incubación sin dejar de agitar durante 16 horas aproximadamente y después de dejar el matraz en reposo ya 37°C durante varias horas; finalmente se conserva toda la noche en frío. La inmovilidad favorece la lisis de las células infectadas. Después de centrifugar el caldo para eliminar los restos celulares gruesos, se filtra a través de un filtro Milipore y el filtrado exento de células se conserva a 4°C.

Determinación de la dilución habitual de prueba para la lisotipia. La determinación de la DHP requiere el empleo de cuentagotas o pipetas Pasteur que emitan de 47 a 53 gotas por ml.

Con un cultivo de 24 horas de la cepa huésped diluido de manera que contenga unas 10^9 cél/ml, se siembra una placa de agar bien seca frotándola en toda su extensión con un algodón empapado en la suspensión bacteriana. La placa se deja después en la estufa con la tapa entreabierta hasta que se seque.

El filtrado del fago se prepara en diluciones de razón 10 en caldo o en solución de peptona.

Una vez seca la placa con la cepa huésped, se marca por debajo a fin de poder saber fácilmente dónde están las gotas de las distintas diluciones. Con la pipeta cuentagotas y partiendo de la dilución más alta (es decir, del tubo que contenga en menor número de partículas del fago) se deposita una gota de cada dilución en los lugares previamente señalados. La pipeta se debe mantener en posición vertical mientras cae la gota y debe emplearse una pipeta distinta para cada dilución del fago.

Una vez secas las gotas, la placa se lleva a la estufa y se examina al cabo de 24 horas. La incubación no se debe prolongar demasiado, pues el desarrollo secundario de brucelas resistentes a los fagos puede dificultar la interpretación de los resultados. La DHP será la dilución más alta del fago que produzca una lisis completa en el punto cubierto por la gota.

El número aproximado de partículas de fago presentes en el lisado se puede calcular contando el número de placas en las diluciones más altas y multiplicándolo por el factor de dilución.

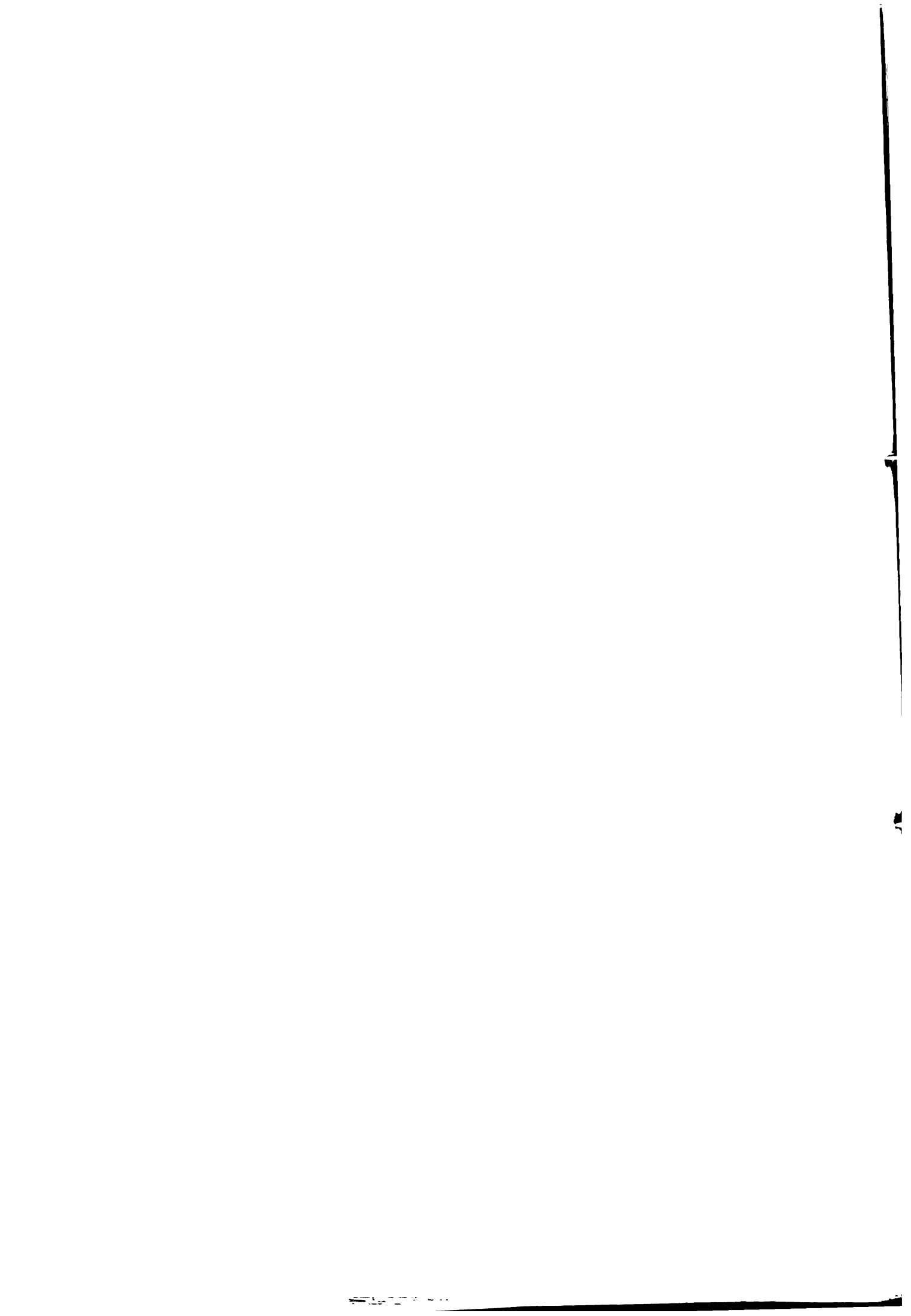


Es más preciso el método de Adams de la doble capa de agar, que consiste en agregar cantidades determinadas de las diluciones del fago y de las bacterias a 2 ml de agar fundido (0.7%) y verter la mezcla en una placa de medio sólido.

Lisotipia. El material de prueba se cultiva durante 24 horas en tubos inclinados de agar y luego se lava en una cantidad suficiente de solución salina normal para producir una suspensión que contenga aproximadamente 10^9 gérmenes/ml. En las pruebas habituales de lisotipia es preferible emplear la misma suspensión que se ha preparado para los cultivos en presencia de colorantes. En el momento de sembrar las placas de colorante, con una torunda de algodón previamente empapada en la suspensión que va a ensayarse, se siembra una placa de agar bien seca (agar-tipticasa-soja o agar-dextrosa con suero). En una misma placa pueden hacerse 2 siembras. En una de las placas de la serie debe incluirse siempre como testigo la cepa huésped (*B. abortus* 544 o 19). Las placas de agar se marcan por debajo con el número correspondiente a cada cultivo, lo mismo que la posición de las gotas de DHP y 10 000 x DHP de cada cultivo.

Con una pipeta Pasteur calibrada a unas 50 gotas por ml se deposita una gota de la dilución del fago sobre los puntos sembrados de cada cultivo. Con una pipeta análoga se deposita una gota de la dilución de 10 000 x DHP del fago en otro punto de cada cultivo. No debe tocarse el agar con la pipeta de Pasteur.

Se dejan reposar las placas hasta que las gotas del fago se sequen y luego se llevan a la estufa. Los cultivos que precisen anhídrido carbónico se incubarán en una atmósfera con 5-10% de este gas. Las placas se examinan al cabo de 24-48 horas de incubación. Las colonias lisas o lisas intermedias de *B. abortus* presentan una lisis completa en las zonas donde se han depositado gotas de cualquiera de las 2 diluciones, mientras que las colonias rugosas o no lisas no presentan lisis. La mayor parte de los cultivos de *B. suis* se lisan parcialmente con la 10 000 x DHP, pero no se alteran con la DHP. A la mayoría de los cultivos de *B. melitensis* no les afecta ninguna de las 2 diluciones, aunque de cuando en cuando algunos cultivos muestran lisis parcial con 10 000 x DHP, como ocurre con *B. suis*. Los cultivos de *B. neotomae* se lisan completamente con la 10 000 x DHP y con la dilución de DHP pueden observarse minúsculas placas de lisis evidente. *B. ovis* y *B. canis* no se lisan con ninguna de las 2 diluciones. La norma lítica que siguen diversas especies de brucelas con las investigaciones que muestran que *B. abortus* absorbe los fagos y recorre un ciclo lítico, mientras que *B. suis* absorbe los fagos y es sensible a la lisis desde el exterior pero no recorre un ciclo lítico. Tanto *B. melitensis* como las cepas rugosas de *B. abortus* y las especies rugosas no absorben los fagos.



2. ELABORACION Y NORMALIZACION DE ANTIGENOS

Para obtener resultados uniformes y fidedignos en la prueba de seroaglutinación de brucelosis, es necesario realizar la prueba según un método estándar e interpretar los resultados de acuerdo a ese método, empleando un antígeno que conforme un patrón establecido.

Ha sido recomendado por los congresos interamericanos de brucelosis, que en cada país se designe una autoridad centralizada, responsable de la uniformación de los reactivos empleados en las pruebas de seroaglutinación para la brucelosis. Tal procedimiento corresponde a la norma general, universalmente aceptada, para el control de productos biológicos.

Abajo se describen los métodos para la producción y patronización de los antígenos utilizados en las pruebas de seroaglutinación de brucelosis en tubo y placa, de acuerdo con el estándar recomendado por los congresos interamericanos de brucelosis. Las pruebas serológicas realizadas con el antígeno normalizado e interpretadas de acuerdo a ese método, conforman a su vez el estándar internacional establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y el Oficina Internacional de Epizootias (OIE).

2.1 ELABORACIÓN DE LA SUSPENSION MADRE

2.1.1 Medios de cultivo

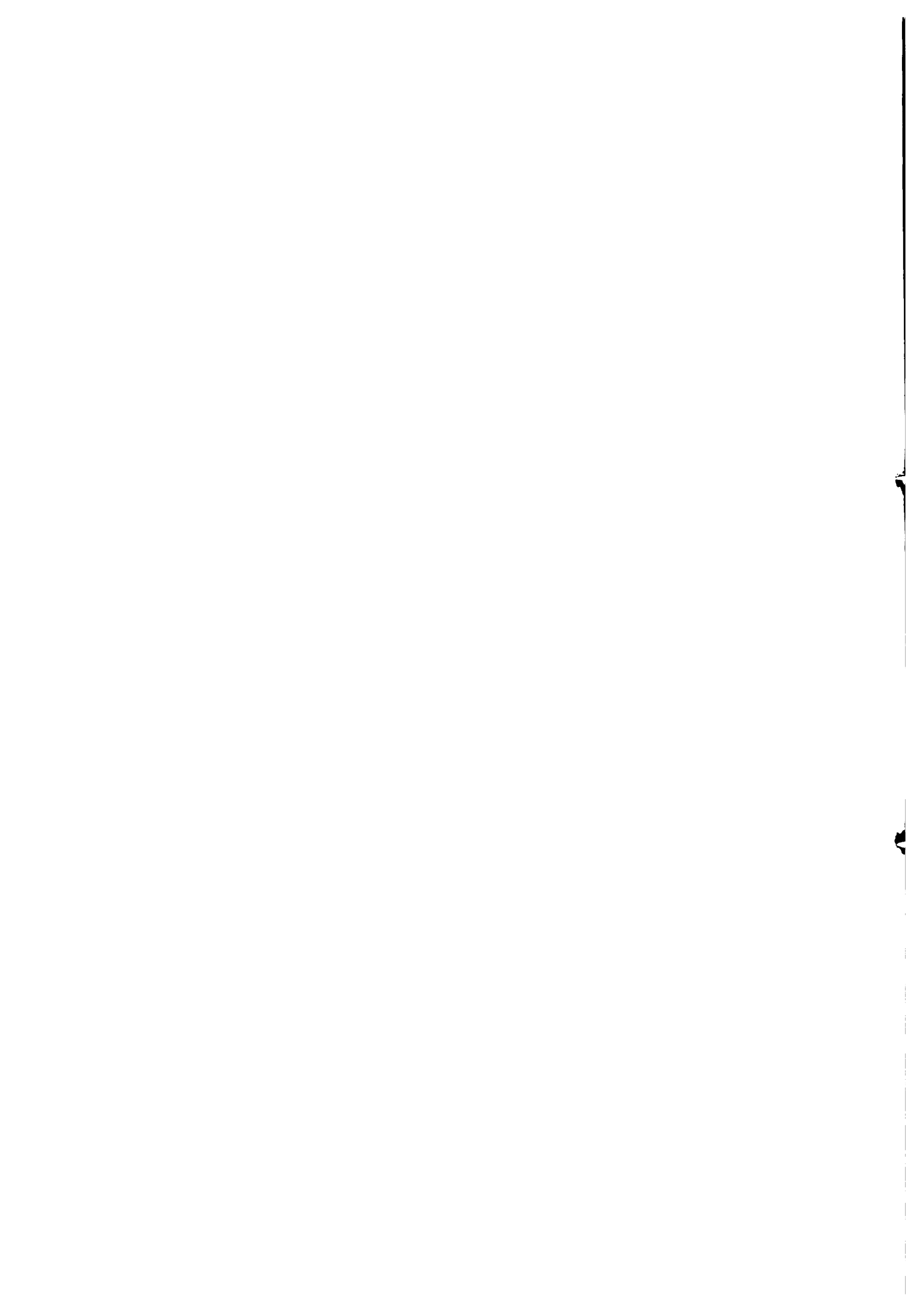
Fórmula de la infusión de agar papa

Infusión de papa.....	1 000 ml
Agar (lavado).....	30 gr
Peptona, DIFCO o equivalente.....	10 gr
Extracto de carne.....	5 gr
Cloruro de sodio A.C.S.....	5 gr
Glicerina A.C.S.....	20 ml

Preparación del medio

Se lavan papas sanas y maduras (de preferencia mantenidas almacenadas de una cosecha a otra), se cortan en pequeños cubos y se agregan 250 gr, sin mayor exposición al aire, a 1 000 ml de agua destilada.

La mezcla se deja en infusión a 60°C de un día para otro, en un recipiente cerrado y luego se filtra a través de un lienzo. Este filtrado, restituido al volumen original con agua destilada, constituye la infusión de papa indicada en la fórmula anterior.



Se agregan todos los demás ingredientes a la infusión (ver fórmula), aplicando suficiente calor para lograr la infusión completa. Con este objeto se utiliza un baño maría hirviente o, si se trata de varias cantidades, calderas de vapor cuyas paredes interiores estén revestidas de vidrio. El medio se ajusta a pH 7.0 (con Na OH al 10%) con el fin de obtener un pH final de 6.8. Se hierve durante 5 minutos y si fuese necesario se reajusta de nuevo el pH.

Envase del medio

En la producción de antígeno se utilizan para envasar el medio, botellas de Roux de vidrio Pyrex, de 1 lt. Son también satisfactorias las botellas de 1 lt. de borosilicato (de alta resistencia y baja alcalinidad). Las botellas de tipo común de vidrio blando y alta alcalinidad no son adecuadas, ya que pueden afectar el pH del medio. Se vierte suficiente cantidad del medio en las botellas para que se forme en cada una de ellas una capa de 1 cm. de grosor cuando la botella se coloque en posición horizontal (aproximadamente 150 ml).

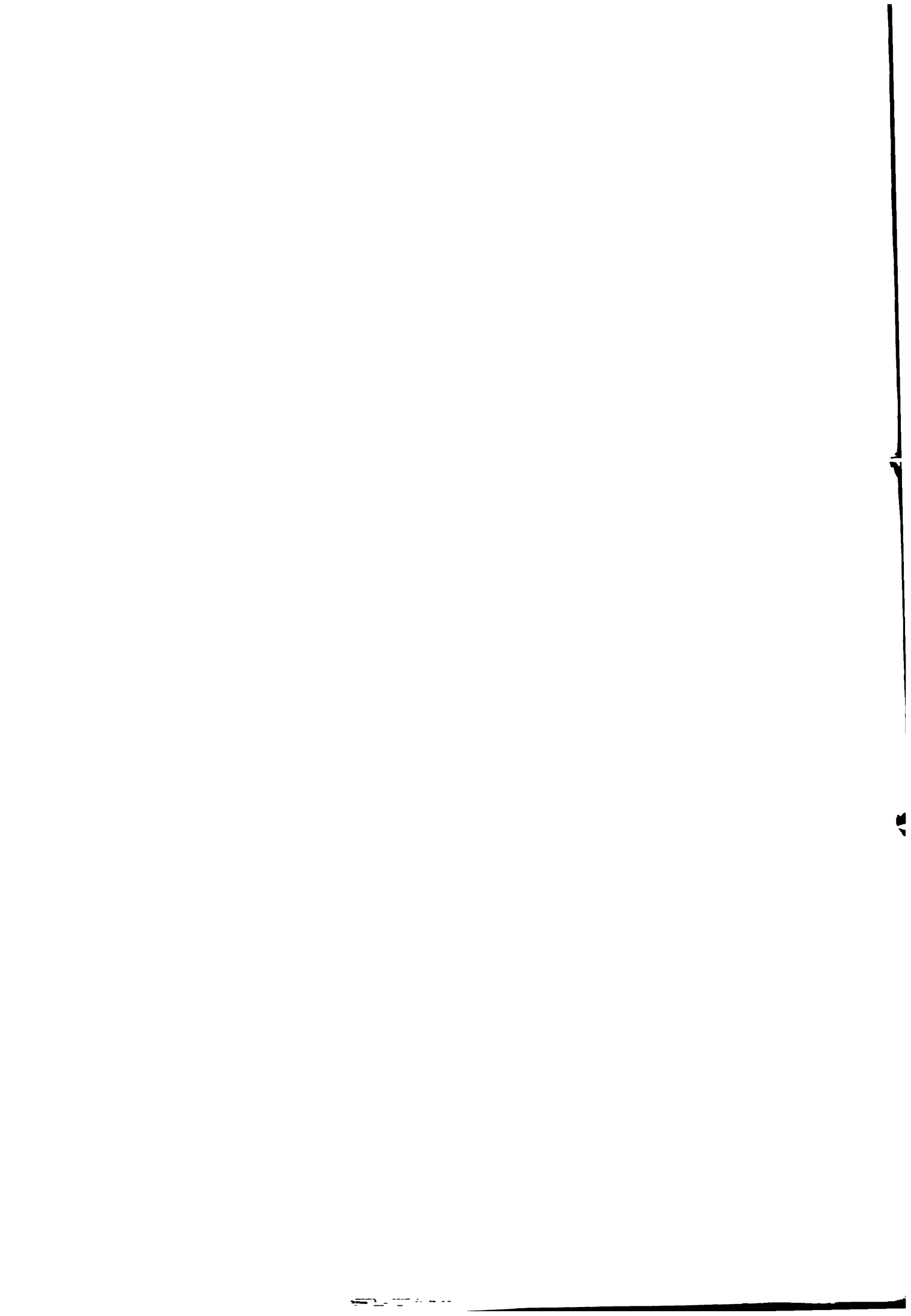
Después se esterilizan las botellas con el medio a 15 libras de presión (121°C), durante 40 minutos.

Finalmente, estas botellas se mantienen a temperatura ambiente durante 4 días, o en estufa por 48 horas antes de sembrarlas, a fin de permitir la evaporación del agua de condensación.

2.1.2 Mantenimiento de *Brucella abortus* cepa 1119-3

En la preparación de antígenos, todos los procedimientos se realizan en cámaras de siembra cerradas, equipadas con mecanismos para filtrar el aire. Para la preparación se emplea exclusivamente la cepa *B. abortus* 1119-3. Esta cepa seleccionada por su estabilidad posee cualidades antigénicas, apropiadas para fines de diagnóstico. Su virulencia relativamente baja, permite que se emplee en el trabajo diario con un mínimo de riesgo. Sin embargo, para prevenirse de una infección, el personal de laboratorio debe tomar todas las precauciones posibles, en cada una de las fases de elaboración, mientras que la suspensión bacteriana no sea sometida a la esterilización.

Mensualmente se hacen subcultivos de la cepa 1119-3 en placas, con medio de agar papa clarificado o agar triptosa, las que se incuban 96 horas a 37.5°C; se seleccionan colonias lisas típicas y se resiembran en tubos de agar papa, los cuales se incuban a 37.5°C durante 48 horas. Los tubos se cierran con parafina para impedir el exceso de deshidratación y se mantienen refrigerados a 4°C.



La selección de colonias lisas se hace por la forma de la colonia, su color, grado de transparencia y consistencia. Para ello se utiliza un microscopio estereoscópico, usando luz reflejada con un ángulo de incidencia de 45°. Como métodos auxiliares se usan la prueba de acriflavina y la impregnación de las placas con solución acuosa de cristal violeta. Se requiere considerable entrenamiento y experiencia para fase lisa de las variantes culturales de *Brucella*. Los encargados de la elaboración de antígenos deben capacitarse en la selección de colonias lisas. En cada país debe haber un laboratorio central encargado de la distribución periódica de cultivos seleccionados de la cepa *B. abortus* 1119-3 a los laboratorios elaboradores de antígenos.

2.1.2.1 Cultivos para semilla, siembra e incubación

Partiendo de cultivos seleccionados se siembra un número suficiente de tubos de agar papa, que se incuban a 37.5°C durante 48 horas. Con el fin de obtener suficiente inóculo para la siembra, se usan tubos de 25 mm. x 200 mm.

Con precauciones asépticas, se cubre el cultivo de cada tubo con suficiente cantidad de solución estéril de NaCl al 0.85%, bufferada a pH 6.4 (Anexo 2.b). Se agita el tubo suavemente hasta que el cultivo queda suspendido. La suspensión de un tubo se vierte en una botella distribuidora u otro envase adecuado para la siembra, provista de campana protectora, que contiene 1 800 ml de solución estéril de NaCl al 0.85% bufferada a pH 6.4.

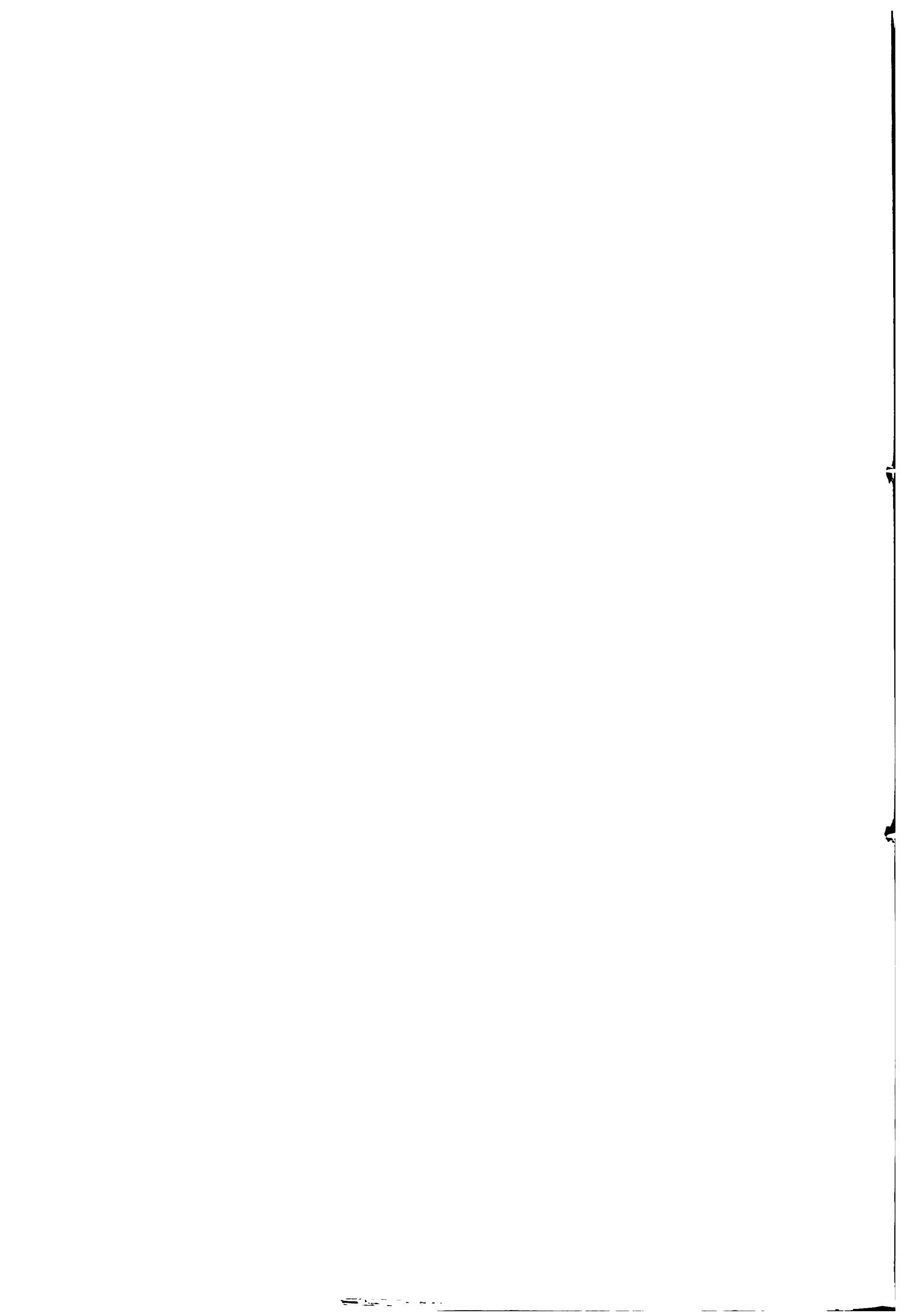
Esto constituye el inóculo para la siembra, el cual tiene una densidad aproximada de 2.5×10^8 (250 millones) de gérmenes por mililitro.

A cada botella de medio de cultivo se le agrega la menor cantidad que sea suficiente para cubrir la superficie del medio (5 ml de medio, aproximadamente). Se balancea suavemente la botella sembrada hasta obtener una distribución uniforme de la suspensión. Después las botellas se ponen a incubar invertidas (con la cara libre hacia abajo), en posición horizontal, durante 72 horas. a 37.5°C.

2.1.3 Recolección

Después de la incubación se examina macroscópicamente la botella, descartando todas las botellas contaminadas y aquellas que tengan el medio de cultivo despegado o resquebrajado.

Se extrae el resto del agua de condensación y el líquido de siembra sobrante, insertando un tubo estéril conectado a la bomba de vacío. Si no se dispone de vacío, se flamea la boca de la botella y se vierte el exceso de líquido, haciéndolo escurrir por la cara de la botella. La eliminación de este líquido es de importancia, dado que contiene elementos que pueden afectar la sensibilidad del antígeno.



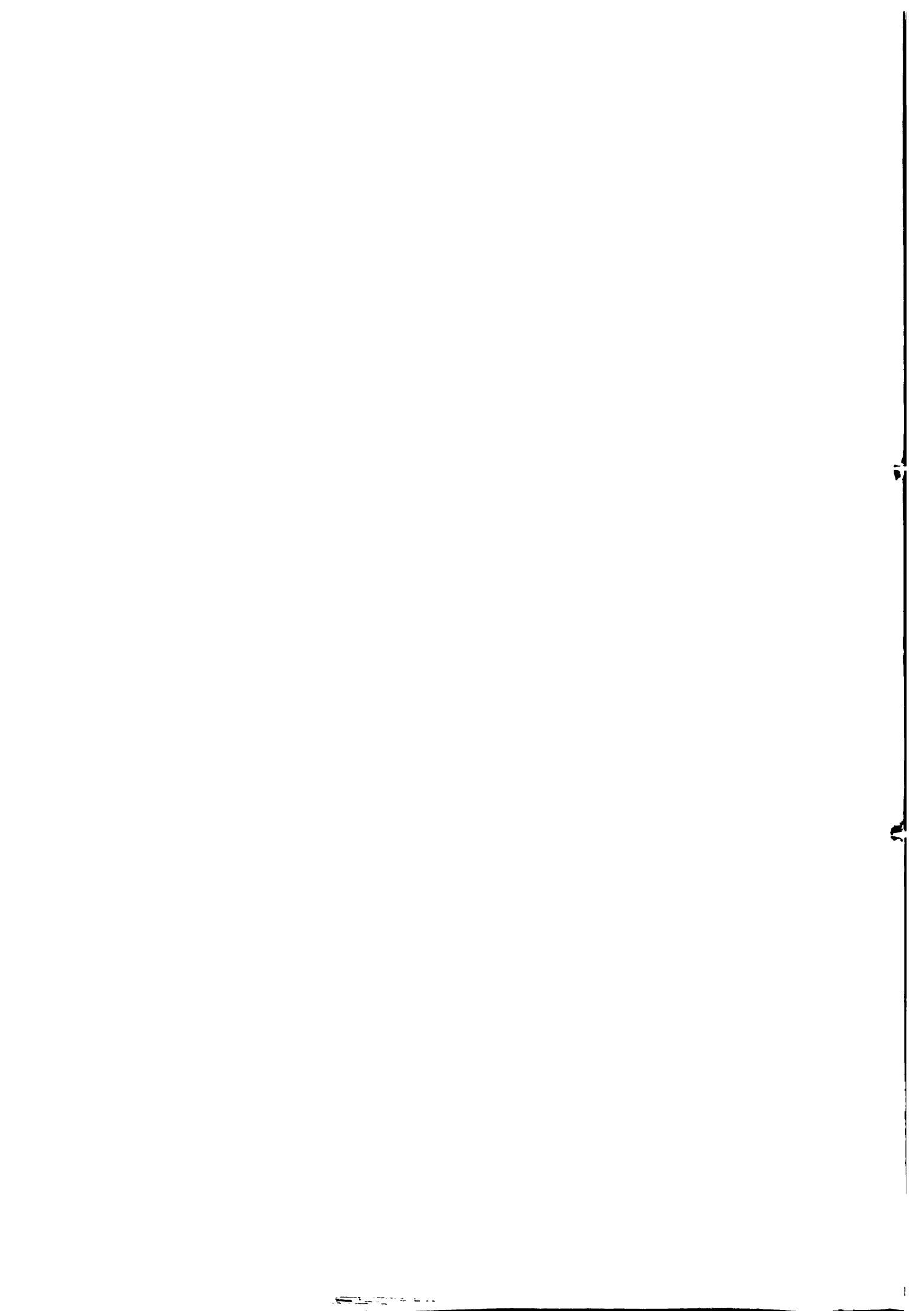
Se agrega a cada botella aproximadamente 60 ml. de solución estéril de NaCl al 0.85% fenolada al 0.5%. Se colocan las botellas en posición horizontal con el medio hacia abajo. Transcurridos 30 minutos se balancea suavemente hasta que el cultivo quede suspendido. La recolección de la suspensión bacteriana de cada botella no debe demorarse más tiempo para prevenir la absorción del agar soluble. Esto se hará por medio de vacío o transvasando su contenido. La demora en la recolección puede afectar la sensibilidad del antígeno. Es conveniente dividir el total de botellas en varios grupos y recoger la suspensión de cada uno de ellos en frascos separados. Se hace un control de pureza de cada frasco de la suspensión mediante una extensión (frotis) teñida por el método de Gram. Los frascos de suspensión que resulten satisfactorios al examen microscópico se filtran a través de algodón absorbente esterilizado y el filtrado se recibe en un erlenmeyer de capacidad adecuada.

Posteriormente, se procede a centrifugación de la suspensión en una centrífuga Sharples entre 30 000 a 40000 rpm, la cual separa la porción líquida, eliminando así cualquier extracto soluble del medio. Las células bacterianas recolectadas en el recipiente clarificador de la Sharples, en forma de pasta, se transfieren a botellas esterilizadas y previamente pesadas de 500 ml, de boca ancha, cada una provista de tapón de goma, anotándose el peso de la pasta. Se agregan aproximadamente dos partes de solución salina fisiológica (NaCl al 0.85%), fenolada al 0.5%; se amarra el tapón a la botella y se agita durante 3 horas en máquina agitadora para obtener una suspensión homogénea. Si preparan pequeñas cantidades de antígeno, se puede efectuar la centrifugación en centrífuga corriente. En este caso el filtrado se recibe en tubos de centrífuga Pirex de 50–200 ml con tapón de goma, previamente pesados. La centrifugación se efectúa a 3 000 rpm, hasta que el líquido sobrenadante se vuelva claro. Este se vuelca, se pesa la pasta y se agrega a cada tubo aproximadamente dos partes de la solución salina fisiológica NaCl al 0.85% fenolada al 0.5% y se agita como se indicó anteriormente.

La suspensión obtenida se pone en autoclave abierto y se somete a la acción del vapor a 100°C, durante 45 minutos o en baño maría a 95°C durante 1 hora.

2.1.4 Prueba de esterilidad

De la suspensión madre se siembran tubos inclinados de agar infusión papa y caldo glucosado con indicador de Andrade (Anexo 2.b). Se incuban a 37.5°C y se examinan diariamente durante 7 días. Se descarta si hay contaminación.



2.1.5 Prueba de pureza

Se prepara un frotis a partir de la suspensión y la tinción de Gram. Deberán observarse solamente pequeños cocobacilos gram negativos con las características de *Brucella*.

Con la suspensión madre obtenida se preparan todos los antígenos de B. abortus:

- Antígeno para seroaglutinación lenta en tubos
- Antígeno para seroaglutinación rápida en placa
- Antígeno para prueba de anillo en leche
- Antígeno para la prueba de rosa de bengala
- Antígeno para la prueba de rivanol

Si no se necesita preparar inmediatamente los antígenos, la solución madre puede guardarse en la heladera a 4°C.

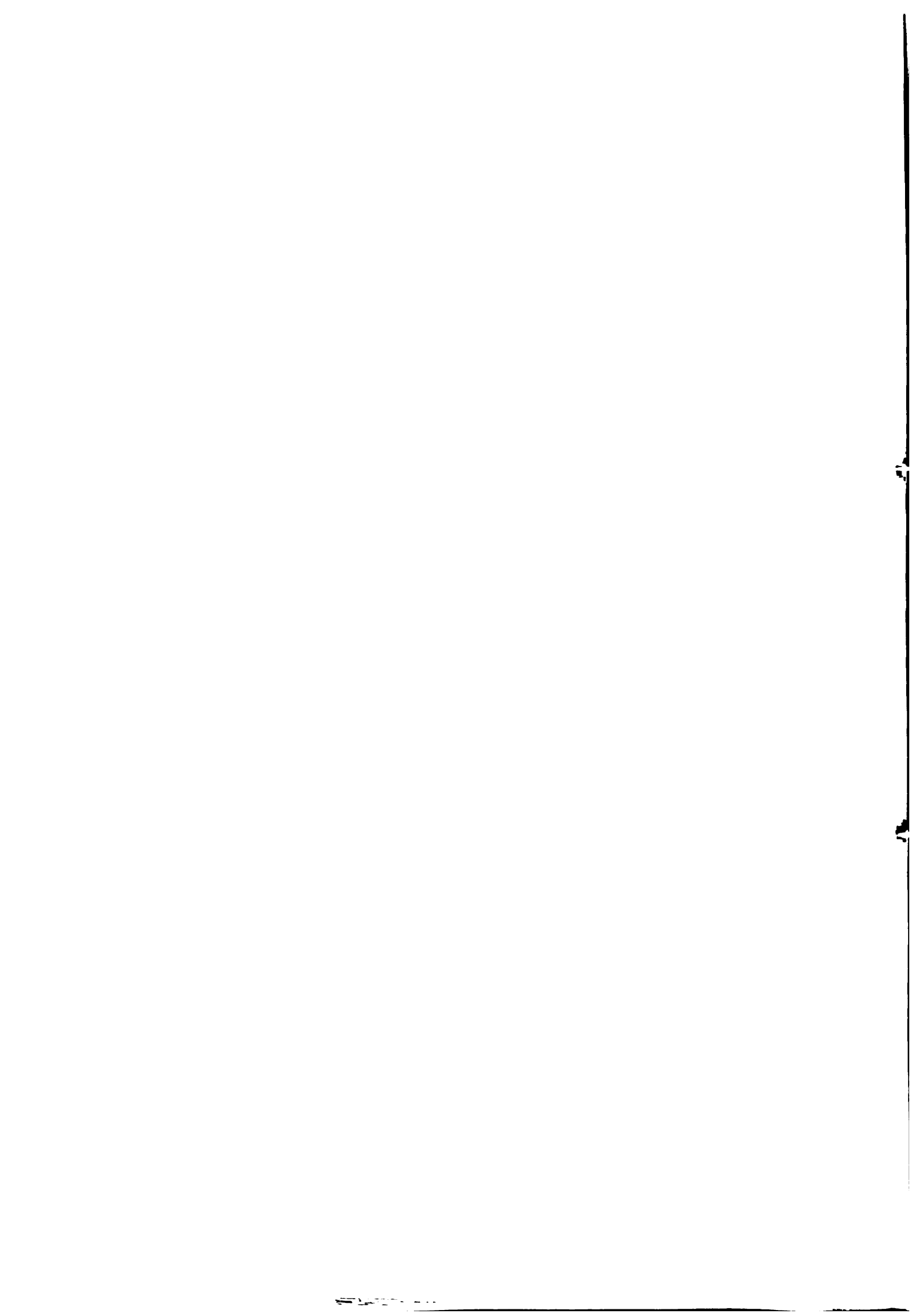
2.2 ELABORACION DEL ANTÍGENO PARA LA PRUEBA EN TUBOS

2.2.1 Dilución de la suspensión madre

El antígeno para tubos preparado con la cepa *B. abortus* 1119-3, contendrá 0.045% de células bacterianas por volumen, determinados por tubos Fitch-Hopkins. Sin embargo, para envío a los laboratorios y para su almacenamiento, se prepara una suspensión concentrada que contiene 4.5% de brucelas por volumen, que luego se diluye adecuadamente para el uso.

Generalmente se preparan lotes de antígeno concentrado para prueba en tubos, de aproximadamente 16 lt. cada uno, aunque pueden elaborarse lotes más pequeños usando proporcionalmente menor cantidad de pasta bacteriana. Para un lote de 16 lt. se toma una cantidad de suspensión madre que contiene 800 gr de pasta y se coloca en un matraz estéril de 20 lt. de capacidad, llevando el volumen total a 16 lt. con el agregado de suficiente cantidad de solución estéril de NaCl al 0.85%, fenolada al 0.5%, hasta restituir el volumen original.

Si se dispone de agitador magnético tamaño gigante, se coloca en el interior del recipiente la barra estéril y se agita durante la noche a 4°C. Si no se dispone de agitador magnético se agita manualmente durante 30 minutos. Después se deja en suspensión en reposo por lo menos 24 horas. a 4°C.



2.2.2 Normalización del antígeno

2.2.2.1 Determinación del volumen celular

El volumen celular se determina colocando con una pipeta 4 ml de agua destilada en cada uno de los 6 tubos de Fitch-Hopkings y agregando exactamente 1 ml de la suspensión bacteriana (bien agitada previamente) a cada tubo.

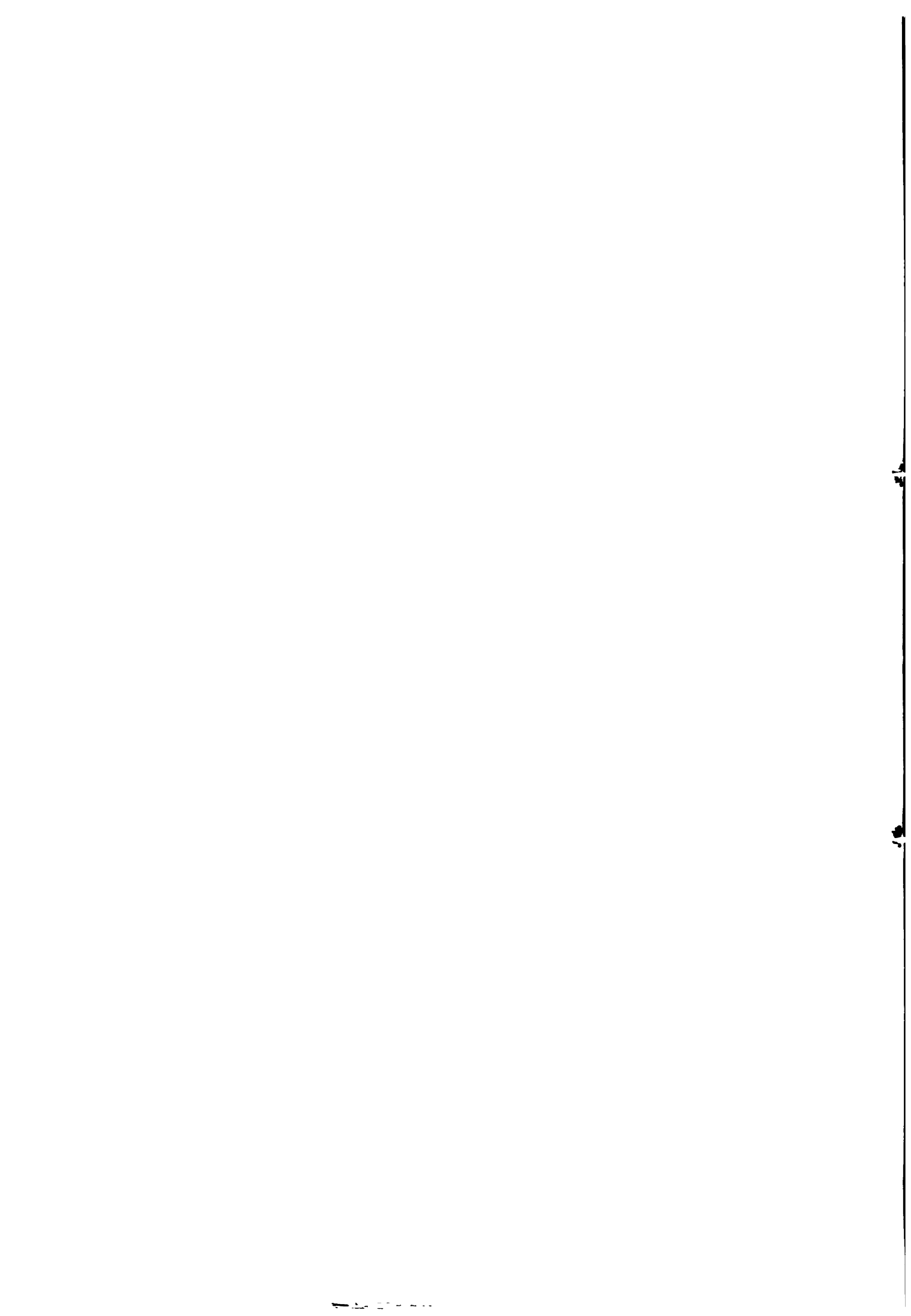
Los tubos se centrifugan durante 75 minutos a 1945 g (por ej. a 2 750 rpm, usando cabezal estándar de 30 cm de diámetro y porta tubos de 11 cm, lo que da un radio de giro de 23 cm para los efectos de calcular la fuerza relativa de centrifugación); se lee cada tubo y se toma el promedio de lectura para calcular el volumen de bacterias. El volumen se calcula de la siguiente manera: si el promedio de lectura de los 6 tubos es de 0.045 para 1 ml., se multiplica 0.045 por 100, lo que da un porcentaje de 4.5, o sea el volumen celular. Si fuere necesario, se corrige la densidad agregando más suspensión o diluyente y se vuelve a determinar el volumen celular en igual forma. Después de agregar suspensión o diluyente conviene agitar 1-2 horas en agitador magnético.

Todas las manipulaciones se hacen con precauciones asépticas a fin de evitar la contaminación del antígeno.

Previa agitación prolongada del lote de antígeno para prueba en tubos, se toma una muestra en un frasco pequeño estéril, para examinar su pureza, sensibilidad y esterilidad.

2.2.2.2 Prueba de sensibilidad

La sensibilidad de un nuevo lote de antígeno se compara con la sensibilidad de un antígeno tipo estándar. Tal procedimiento disminuye el peligro de acumular pequeños errores que pueden ocurrir comparando lotes sucesivos. La prueba consiste en hacer la aglutinación en tubos a diferentes diluciones, con ambos antígenos, usando 20 sueros bovinos de títulos escalonados desde negativos a 1/25 hasta positivos en 1/400, de los cuales 3-4 serán negativos; 3-4 de título alto y los demás de título bajo, determinados con el antígeno estándar. Se leen los resultados de cada suero en sus diferentes diluciones, comparando una misma dilución, con ambos antígenos. Luego se suman las reacciones positivas e incompletas de todos los sueros hechas con cada antígeno (total de aglutinación), asignando un valor numérico de 1 por cada aglutinación completa (+) y de ½ por cada aglutinación incompleta (I). Enseguida se comparan los valores totales de aglutinación de cada antígeno. Se tolera una diferencia en más o en menos de 3 puntos del total obtenido con el antígeno estándar, siempre que la diferencia no sea mayor de ½ dilución en ninguna muestra de suero.



2.2.2.3 Examen de pureza y esterilidad

La muestra obtenida se examina desde el punto de vista de la pureza y esterilidad, La prueba de pureza se hace preparando un frotis (extensión), que se colorea por el método de Gram y se observa al microscopio con el fin de descubrir gérmenes contaminantes.

Para la prueba de esterilidad se siembra 0.1 ml de antígeno en cada uno de los 3 tubos de fermentación de Smith que contiene caldo peptonado con dextrosa al 1% e indicador de pH y 3 tubos inclinados de agar papa. El tubo de Smith puede ser sustituido por un tubo de ensayo que contenga en el fondo un tubito Durham invertido. Después de 3 días de incubación a 37.5°C, de cada caldo dextrosado se siembran 3 tubos de agar papa inclinado. Todos los cultivos se incuban a 37.5°C y se examinan durante 7 días. El producto debe estar libre de contaminación y no mostrar desarrollo de *Brucella*.

2.2.2.4 Envase

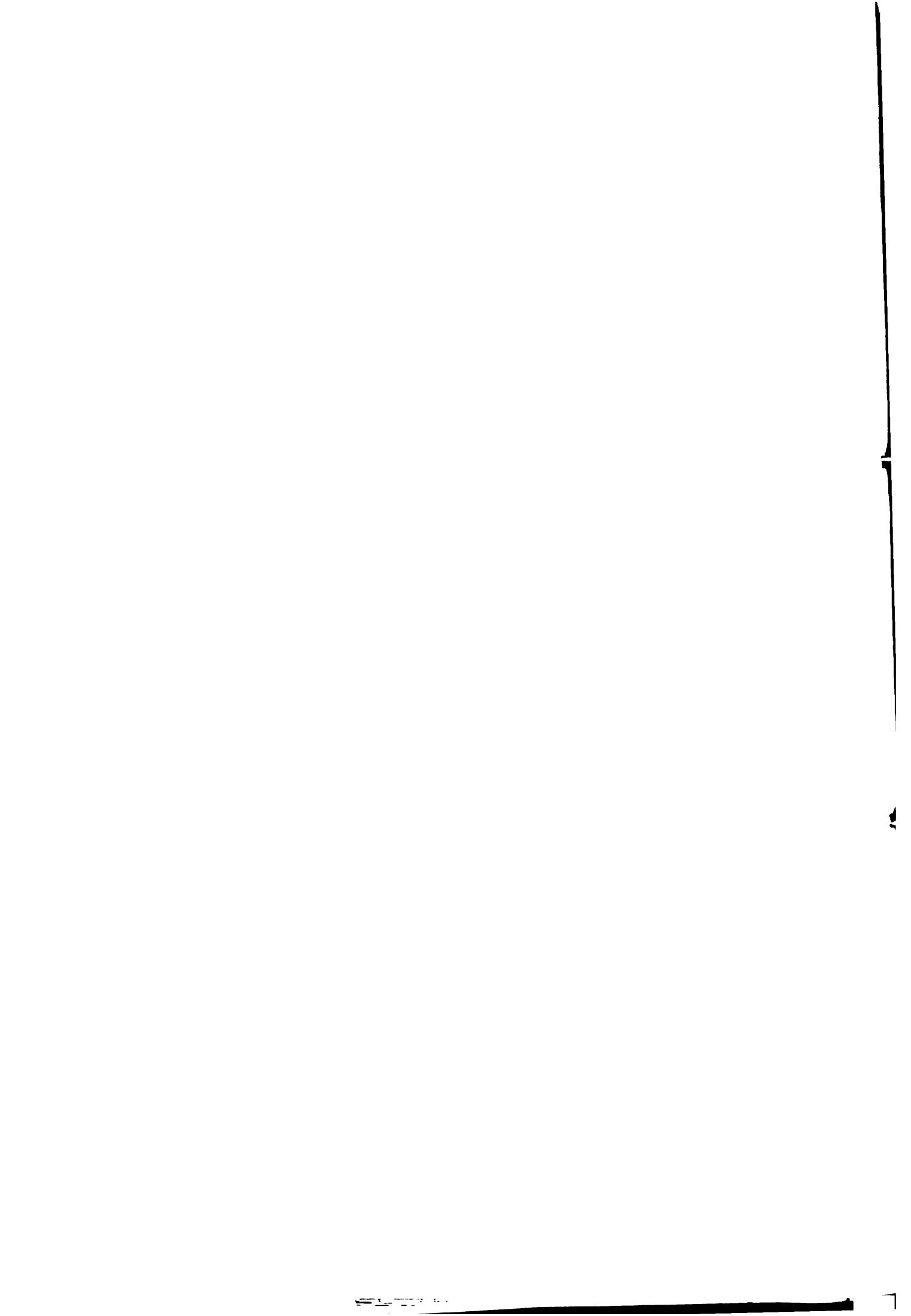
El producto terminado se envasa en condiciones asépticas en frascos adecuados, utilizando una campana protectora. Es de importancia que se agite bien el antígeno inmediatamente antes de envasarlo y frecuentemente durante esta operación, asegurando así una suspensión homogénea.

Los frascos de antígeno, antes de utilizarse, se esterilizan en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 30 minutos. Los tapones de bakelita se esterilizan de igual manera.

Se repite la prueba de pureza y esterilidad seleccionando frascos al azar, que en total representa el 1% del lote.

A cada frasco del producto terminado se le pone una etiqueta con el nombre del producto, número de serie, fecha de producción y expiración y nombre del productor. Al producto elaborado se le da un año de validez, a partir de la fecha de elaboración. El antígeno se mantiene a 4°C. Se guardan muestras de cada serie, con fines de referencia.

Con este antígeno se hace la prueba de seroaglutinación estándar en tubos a 37°C; además, pueden hacerse las siguientes pruebas: 1) Seroaglutinación en tubos con inactivación a 56°C; 2) Seroaglutinación en tubos con inactivación a 65°C; 3) Prueba de mercaptoetanol y 4) Aglutinación en tubos para suero de leche.



2.3 ELABORACION DE ANTIGENO PARA PRUEBA EN PLACA

El antígeno para esta prueba se prepara a partir de la misma suspensión madre de la cepa *B. abortus* 1119-3 y contiene 10-12% de células bacterianas por volumen, determinado los tubos de Fitch-Hopkins. Con esta concentración de gérmenes el antígeno tiene una sensibilidad comparable al antígeno de tubos.

2.3.1 Dilución de la suspensión madre

Comúnmente se preparan lotes de aproximadamente 16 lt. cada uno. Para obtener esta cantidad, se pone en un matraz esterilizado de 20 lt. de capacidad, una cantidad de la suspensión madre contiene 2 000 gr. de pasta llevando el volumen a 8 lt. aproximadamente, con el agregado de solución estéril de NaCl al 0.85%, fenolada al 0.5%. Por cada litro de suspensión se agregan 6 ml. de la solución colorante. El antígeno se filtra entonces por un algodón absorbente esterilizado con el fin de eliminar material coagulado por el calor y se agrega solución salina fenicada a través del filtro hasta el volumen total de 16 lt. Todas estas manipulaciones se realizan con precauciones asépticas para impedir la contaminación del antígeno. Esta suspensión es agitada mecánicamente para obtener una mezcla homogénea. En igual forma se pueden preparar cantidades menores agregando a un peso dado de pasta la cantidad correspondiente de solución salina fenolada. Por ejemplo, si tenemos 500 ml. de suspensión madre que contiene 100 gr. de pasta, la ponemos en un matraz de 1 lt. y ajustamos el volumen a 800 ml con solución fisiológica fenicada. La suspensión se deja reposar durante 24 horas.

Solución colorante para antígeno de placa

Se trituran en un mortero 10 gr. de verde brillante y 5 gr. de cristal violeta. Se agrega agua destilada hasta completar 1 500 ml Se vierte en un frasco ámbar y se deja en refrigerador durante 6 meses antes del uso.

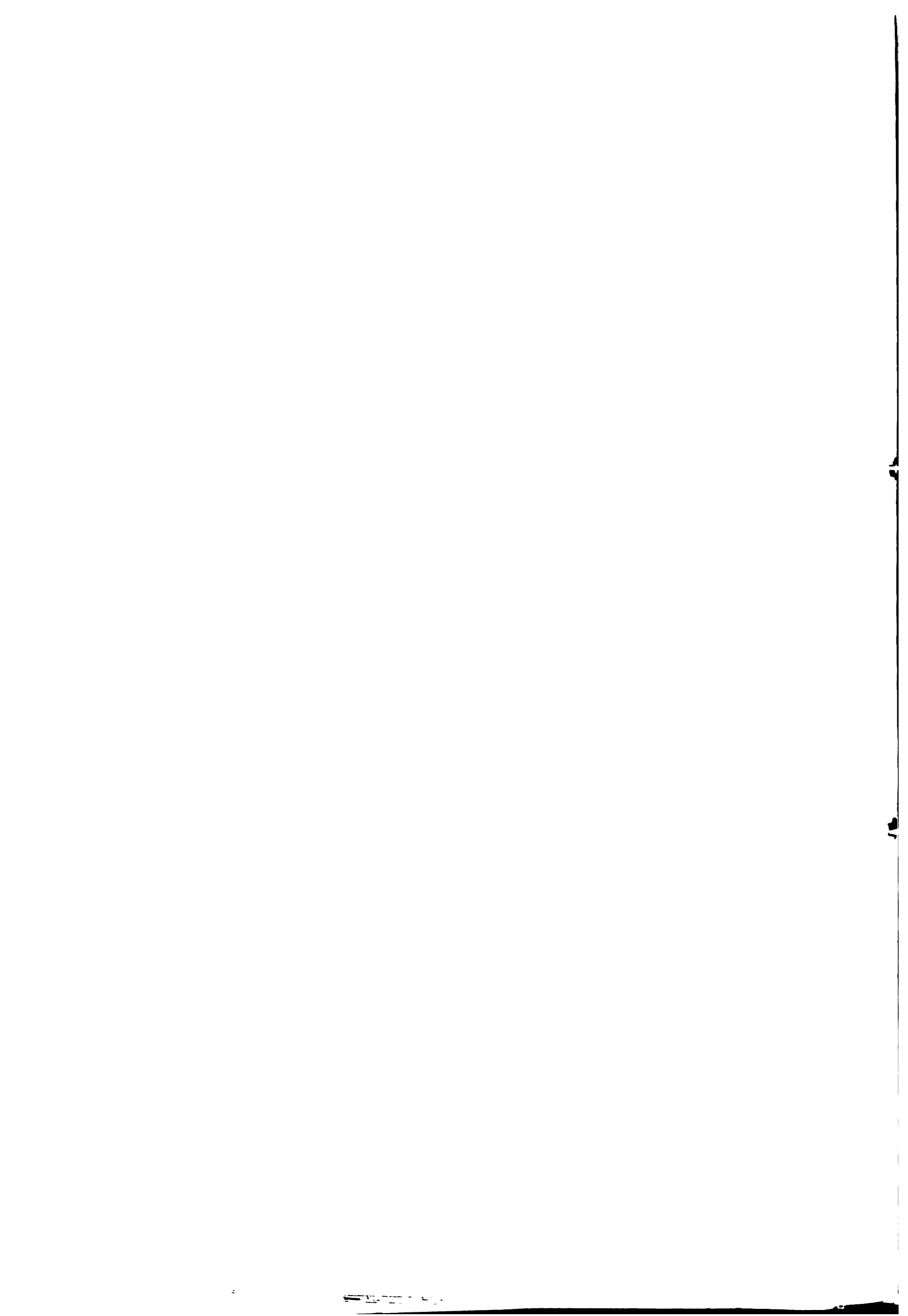
Para usarlo se debe agitar muy bien, de preferencia en agitador magnético.

No se debe emplear la solución colorante después de 6 meses de uso (o sea, 1 año a partir de su preparación).

2.3.2 Normalización del antígeno

2.3.2.1 Determinación del volumen celular

El volumen celular se determina poniendo con una pipeta exactamente 0.2 ml de la suspensión en cada uno de los 6 tubos de Fitch-Hopkins, a los cuales previamente se han agregado 4.8 ml de agua destilada, lo que eleva el volumen de cada tubo a 5 ml.



Los tubos se centrifugan durante 75 minutos a 1 945 g (2 750 rpm con cabezal estándar de 30 cm. de diámetro y porta - tubos de 11 cm.). Se toma el promedio de lectura de los 6 tubos para calcular el volumen celular, en la forma siguiente: si el promedio de la lectura de los 6 tubos es de 0.02; se multiplica este valor por 5, para obtener el equivalente para 1 ml. y luego por 100. La concentración final de células debe ser del 11%.

Si es necesario se corrige la concentración agregando más suspensión madre diluyente y el volumen celular se vuelve a determinar en la forma descrita.

Previa agitación prolongada del lote de antígeno para prueba en placa, se toma una muestra en un frasco pequeño estéril para examinar su pureza, sensibilidad y esterilidad.

El pH del antígeno debe quedar entre 6.4 y 7.0. Generalmente no es necesario el ajuste.

2.3.2.2 Prueba de sensibilidad

La sensibilidad de cada nuevo lote de este antígeno es cuidadosamente comparada con los antígenos de tipo estándar usando el método de aglutinación en placa. El resto de la prueba es tal como se describió previamente en la prueba en placa (ítem 1.1.2).

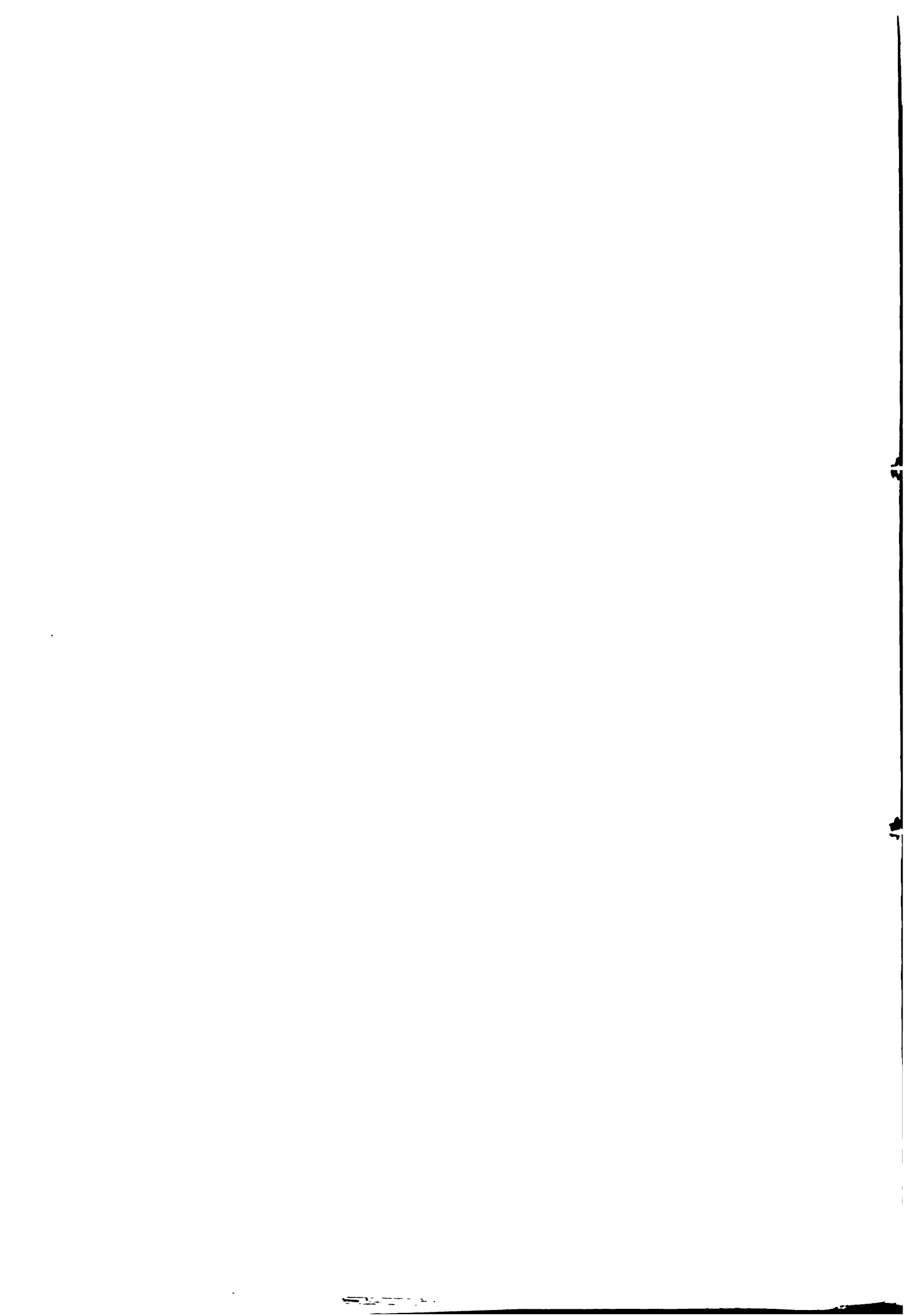
2.3.2.3 Examen de pureza y esterilidad

En la muestra obtenida se examina su pureza y esterilidad, tal como se hizo para el antígeno de la prueba en tubos.

2.3.2.4 Envase

El producto terminado se agita muy bien y se envasan en condiciones asépticas (mientras se envasa se debe agitar con frecuencia). Finalmente, se repite la prueba de pureza y esterilidad tomando al azar el 1% de los frascos.

De cada serie de antígeno terminado se deben guardar algunos frascos para fines de referencia.



2.4 ELABORACION DEL ANTÍGENO PARA LA PRUEBA DEL ROSA DE BENGALA

2.4.1 Dilución y coloración de la suspensión madre

Usar pasta de *Brucella abortus* 1119-3 propagada en medios sólidos o en fermentación con garantía de que el 100% de las células cosechadas se encuentren en fase lisa.

Solución diluyente (Por cada litro)

Hidróxido de sodio.....	20 gr
Acido láctico (HC ₃ H ₅ O ₃).....	90 ml
Solución salina (0.85% de NaCl) con fenol (0.5%) c.s.p.....	1 000 ml

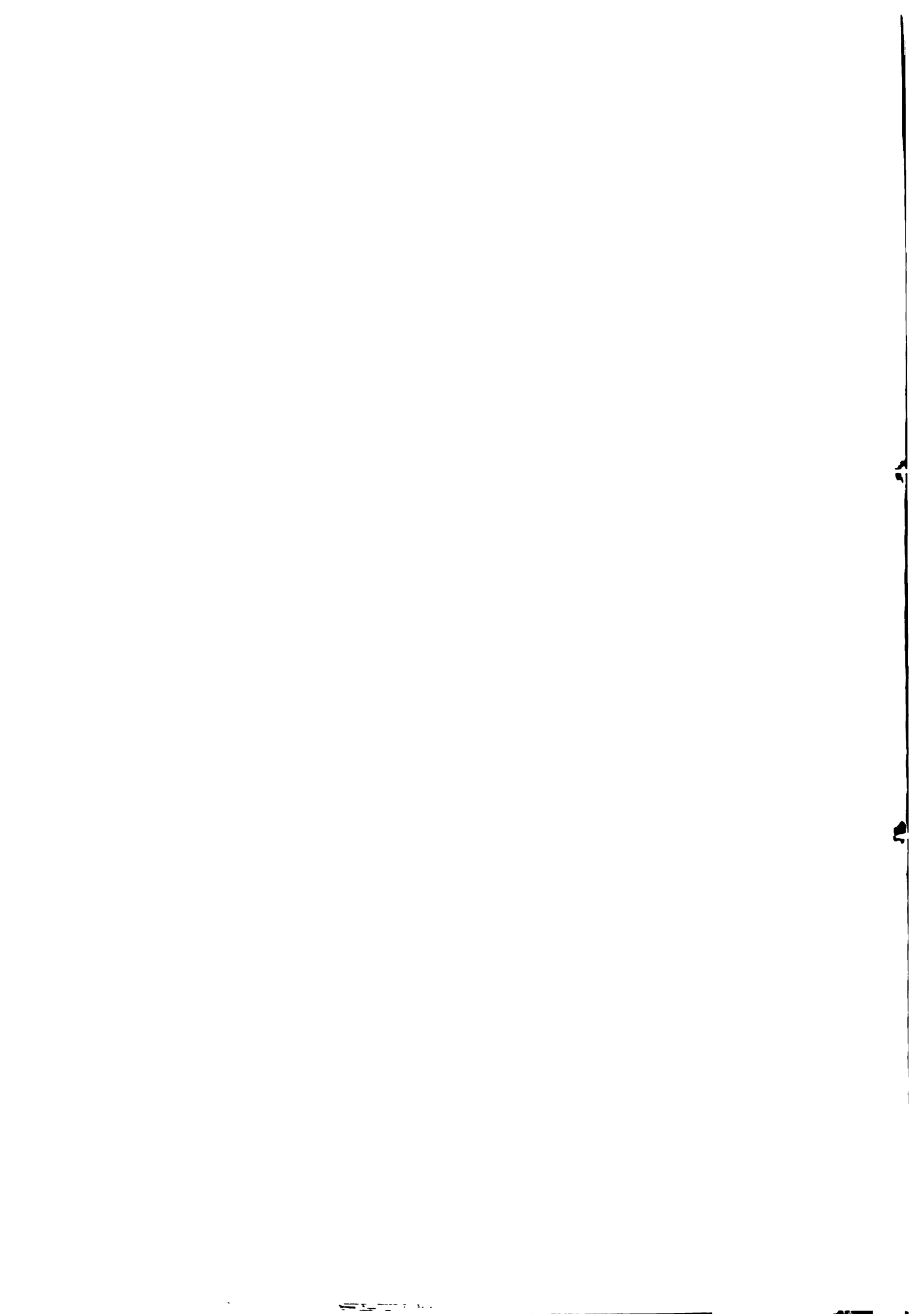
Disolver el hidróxido de sodio en 500 ml de solución salina fisiológica fenolada; agregar el ácido láctico y completar el volumen hasta un lt.

Solución colorante

Usar una solución al 1% (peso/volumen) de rosa de bengala en agua destilada estéril

Procedimiento de coloración

- En un frasco de 20 lt. estéril provisto de barra magnética de 7 cm, colocar suspensión madre de brucelas que contenga aproximadamente 500 gr. de pasta seca.
- Agregar solución salina fisiológica fenolada estéril hasta completar el volumen total de 10 lt.
- Agregar 285 ml de solución colorante de rosa de bengala al 1%.
- Colocar el frasco en un agitador magnético de tamaño gigante y agitar durante toda la noche.
- Filtrar a través de gasa y algodón estériles.
- Centrifugar durante 30 minutos en Sharples refrigerada a 40 000 rpm o en centrífuga refrigerada de vasos grandes a 5 000 xg.
- Colocar la pasta coloreada en frascos estériles de borosilicato u otro plástico esterilizable. Estos frascos con sus tapones individualizados deben ser tarados previamente.
- Pesar los frascos y determinar por diferencia los gramos de células teñidas en cada uno de ellos.



2.4.2 Normalización del antígeno

- Agregar a cada frasco solución diluyendo en cantidad aproximada al doble del número de gramos de brucelas y agitar durante 3 horas. en un agitador mecánico.
- Transvasar las células teñidas a un frasco estéril de 20 lt. con barra magnética, agregar diluyente hasta un volumen total de 14 ml por gramo de células teñidas y agitar a temperatura ambiente durante 2 horas.
- Filtrar a través de algodón y gasa estéril recogiendo el filtrado en frasco también estéril provisto de barra magnética.
- Agitar durante 2 horas. y recoger una muestra para determinar el volumen celular y la sensibilidad.

2.4.2.1 Determinación del volumen celular

- Para determinar el volumen celular, proceder de la forma siguiente:
 - Colocar 4.5 ml de agua destilada en cada uno de 4 tubos Fitch-Hopkins, agregar 0.5 ml de antígeno y centrifugar a 1 945 xg. durante 75 minutos.
 - El promedio de las lecturas multiplicado por 200 expresa en porcentaje la concentración celular.
- La concentración celular debe ser del 8%. Se ajustará esta concentración agregando diluyente o células teñidas.

2.4.2.2 pH del antígeno

Medir el pH del antígeno, que deberá ser 3.65.

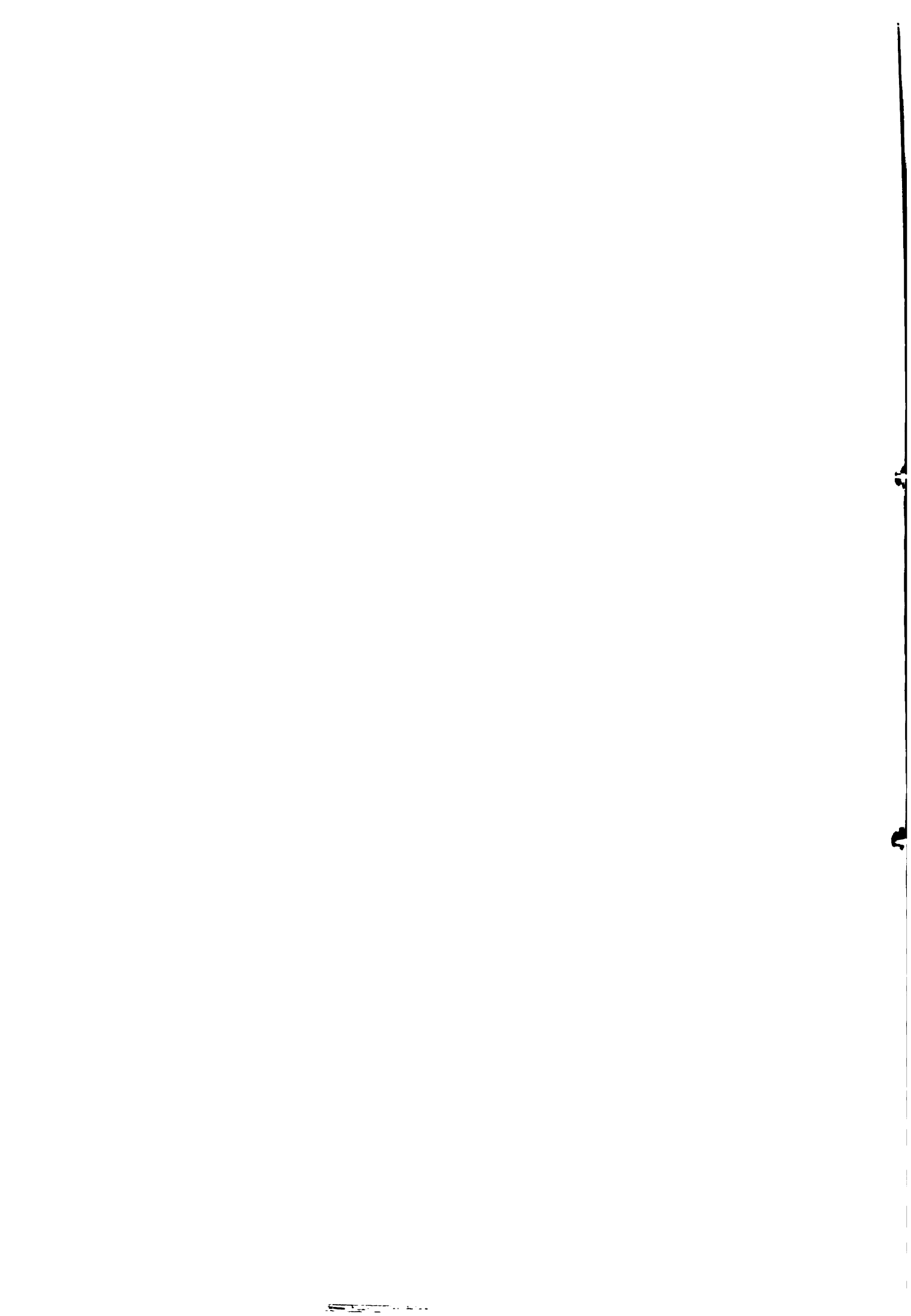
Mezclar partes iguales de antígeno y suero bovino y medir nuevamente el pH, que debe ser 3.80.

2.4.2.3 Sensibilidad

Medir la sensibilidad del antígeno frente a diluciones de no menos de 20 sueros bovinos de reactividad escalonada, de negativos a positivos de alto título. La prueba se hace simultáneamente con un antígeno patrón y se comparan los resultados. El criterio de aceptación o rechazo es el mismo que para los antígenos de aglutinación.

2.4.2.4 Envase

Si el antígeno pasa las pruebas, envasarlo convenientemente y rotularlo dándole un período de validez de 1 año.



El producto terminado debe ser sometido a nuevos controles de calidad en una sección diferente a la de producción.

2.5 PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO PARA LA PRUEBA DEL RIVANOL

2.5.1 Dilución de la suspensión madre y tinción

Utilizar una suspensión de *B. abortus* cepa 1119-3 propagada por cualquiera de los métodos de cultivo líquido o sólido.

- **Solución colorante**

Es la misma solución que se emplea para teñir el antígeno de aglutinación en placa, cuya fórmula es la siguiente:

Verde brillante.....	20 gr.
Cristal violeta.....	10 gr.
Agua destilada c.s.p.....	3 000 gr.

Nota: Conservar esta solución en frasco ámbar, dejar madurar en frío durante 2 meses antes del uso y descartar después de transcurrido 1 año de su preparación.

- **Solución de ácido cítrico ($H_3C_6H_5O_2 \cdot H_2O$)**

Acido cítrico en polvo.....	1.92 gr.
Agua destilada c.s.p.....	100 ml.

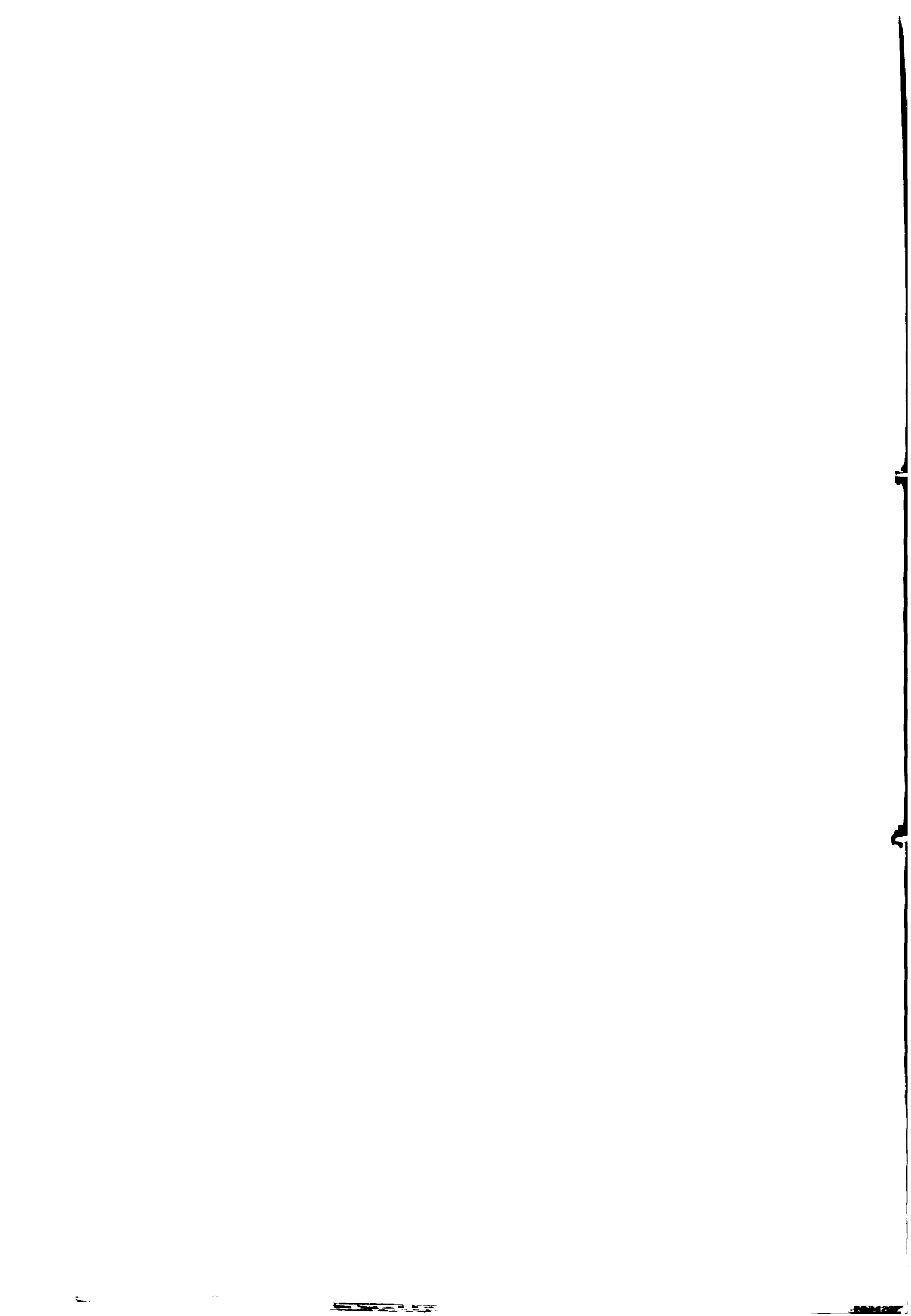
- **Solución de fosfato ($Na_2 HPO_4$)**

Fosfato dibásico de sodio.....	7.16 gr.
Agua destilada.....	100 ml.

- **Solución diluyente del antígeno rivanol**

Solución de ácido cítrico	10.5 gr.
Solución de fosfato	4.0 ml.
Solución salina fenolada al 0.5%.....	4 000 ml.

** Nota: Ajustar el pH a 4.0 agregando solución de ácido cítrico o de fosfato según se requiera.*



2.5.2 Normalización del antígeno

En un frasco de vidrio Pyrex de aproximadamente 10 lt. de capacidad provisto de barra magnética estéril colocar:

Suspensión concentrada de brucelas que contiene:

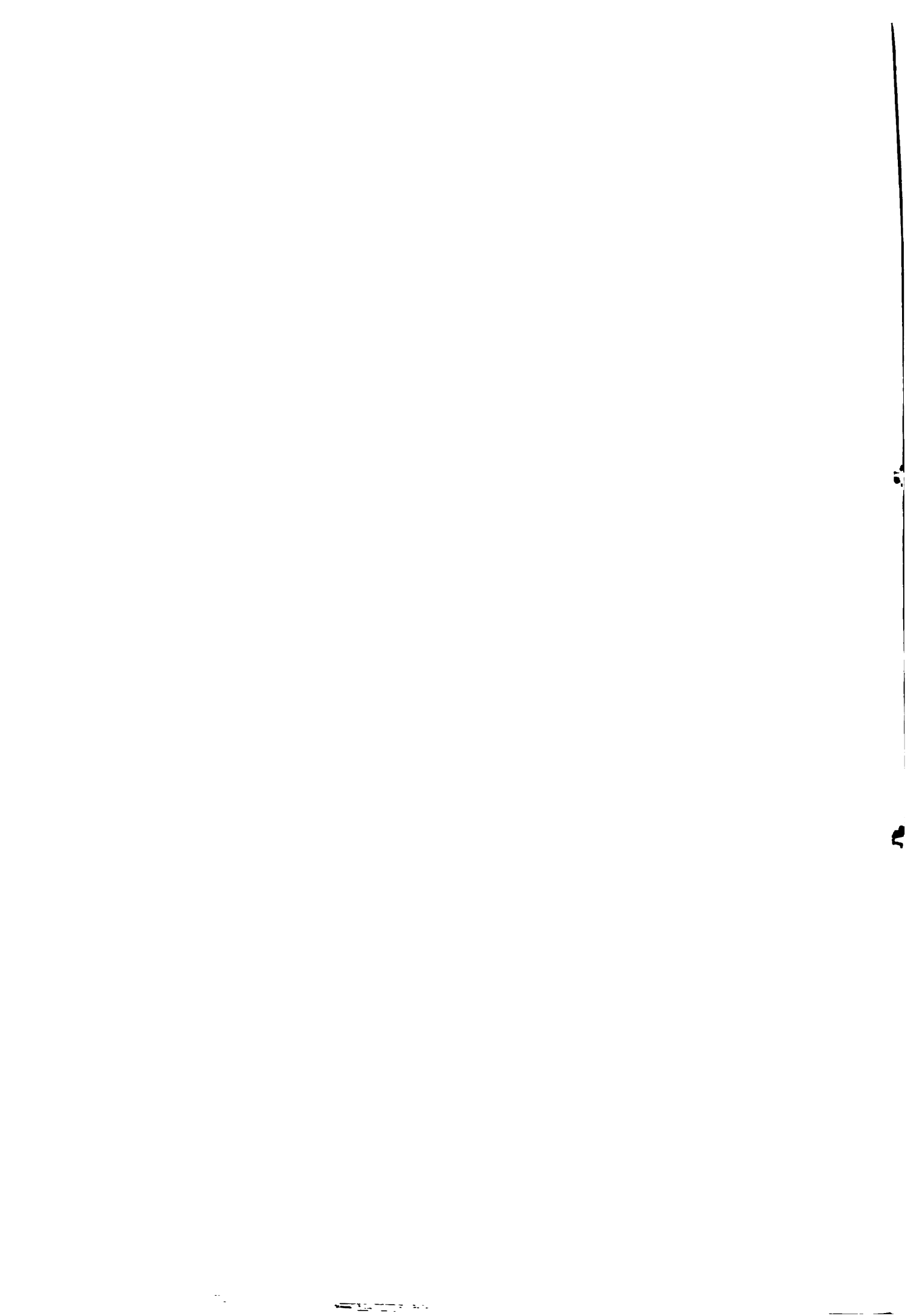
Pasta aprox.....	375 gr.
Solución salina fenolada (0.5%), c.s.p.....	3 000 ml.
Solución colorante	18 ml.

- Agitar en frío en un agitador magnético durante una noche.
- Filtrar la suspensión a través de algodón estéril.
- La suspensión filtrada se centrifuga a 40 000 r.p.m. en Sharples o a 7000xg. en otro tipo de centrifuga.
- La pasta recuperada se coloca en recipientes estériles tarados previamente. Estos frascos deben ser resistentes a golpes y de cierre hermético.
- Por cada gramo de pasta de brucelas, agregar 2 ml. de diluyente y agitar vigorosamente en una máquina agitadora durante 3 horas.
- Ajustar la concentración final del antígeno a 27 ml. por cada gramo de pasta de brucelas agregando líquido diluyente. Dejar en agitación en frío durante toda la noche.
- Al terminar la agitación, tomar una muestra para determinaciones de densidad, pH y sensibilidad.
- Ajustar la concentración celular a 4%. Para determinar el volumen celular, colocar en cada uno de 4 tubos de Fitch-Hopkins 1 ml. de suspensión de antígeno y 4 ml. de agua destilada. Llenar otros 4 tubos de Fitch - Hopkins en la misma forma con un antígeno conocido.
- Centrifugar a 1 945 xg. (2 750 r.p.m. aprox.) durante 75 minutos. Si la concentración fuera distinta del 4%, ajustar agregando pasta teñida o líquido diluyente, según el caso.
- Medir el pH después de ajustar la concentración celular al 4%. El pH debe quedar entre 5.80 y 6.20. Para ajustarlo, emplear la solución de ácido cítrico o la de fosfato.

2.5.3 Prueba de sensibilidad

Emplear para la prueba 20 o más sueros bovinos cuyos títulos aglutinantes para brucelosis vayan desde negativos a positivos en 1:200.

Se deben incluir también no menos de 3 sueros con título muy alto (1:3 200 o superior) con el fin de detectar posibles fenómenos de zona.



2.5.4 Prueba de pureza

Hacer extensiones del antígeno sobre láminas portaobjetos, colorearlas con Gram y observar al microscopio. La morfología de las células debe ser homogénea y compatible con la de las brucelas.

2.5.5 Prueba de esterilidad

Sembrar por duplicado 0.1 ml. en cada uno de los medios siguientes:

- Agar albimi en tubo inclinado
- Caldo dextrosado
- Caldo tioglicolato
- Agar Sabouraud

No debe ser observable el crecimiento de brucelas ni de ningún otro microorganismo.

Cuando el antígeno ha pasado satisfactoriamente todas las pruebas descritas, se envasa en frascos estériles, se rotula, se le asigna un número de serie y se le calcula plazo de validez de 18 meses.

Se almacena en frío, entre 4-8°C. Evitar temperaturas de congelación ya que éstas deterioran el antígeno.

2.5.6 Solución de rivanol

Se utiliza polvo rivanol (lactato de 2 etoxi-6-9-diamino acridina) diluido en agua destilada estéril, en concentración final del 1 por ciento. Se envasa en frascos estériles color ámbar.

Se conserva en refrigeración entre 4-8°C, al abrigo de la luz, con fecha de expiración de 18 meses.

2.6 PRODUCCION DEL ANTIGENO PARA LA PRUEBA DEL ANILLO EN LECHE

2.6.1 Reactivos

Reactivo A

Sulfato aluminico amónico (AlNH ₄ (SO ₄) ₂ ·12 H ₂ O).....	900 gr.
Agua destilada c.s.p.....	9 000 ml.

11

12

Disolver en 5 lt. de agua destilada mediante calentamiento a 90°C y ajustar el volumen a 9000 ml. con agua destilada a temperatura ambiente.

Reactivo B

Hematoxilina.....16.5 gr.
Alcohol de 95° c.s.p.....100 . ml.

Calentar ligeramente (50 - 60°C) para disolver.

Reactivo C

Iodato de sodio (NaIO₃).....1.70 gr.
Agua destilada.....50 ml.

Calentar a 90°C para disolver.

Solución colorante

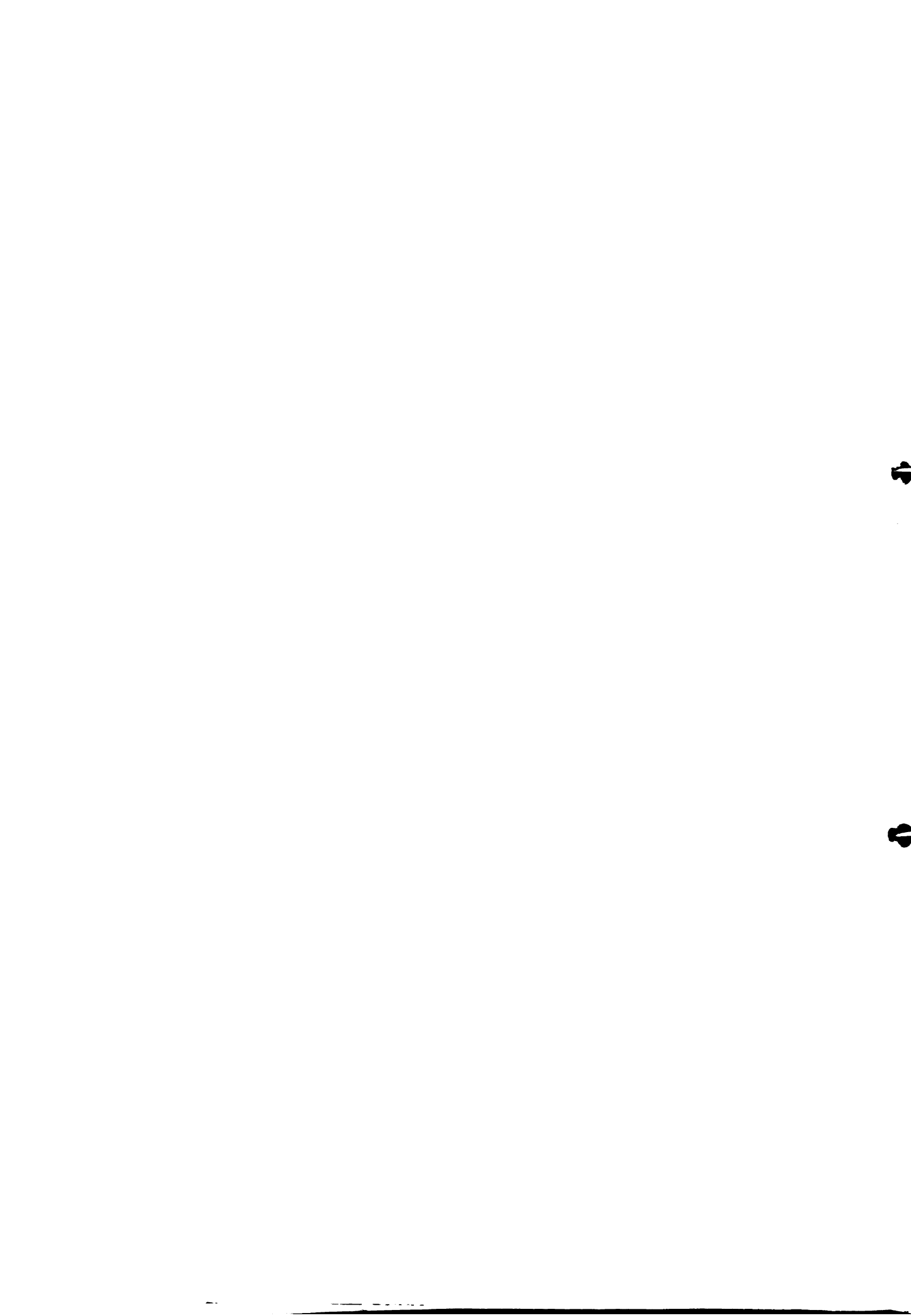
- En un frasco de capacidad para 12 o más litros, mezclar los reactivos siguientes:

Glicerina neutra ...255 ml.
Reactivo B (hematoxilina).....100 ml.
Reactivo C (yodato de sodio).....50 ml.
Reactivo A.....850 ml.
Agua destilada.....750 ml.

- Mezclar muy bien, agitando de vez en cuando; dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos para que la solución se oxide. La oxidación se observa por una serie de cambios de color hasta llegar a púrpura azul muy oscuro con brillo metálico.
- Agregar 8 lt. del reactivo A.
- Dejar que la mezcla anterior adquiera la temperatura ambiente, determinar el pH y, si fuese necesario, ajustarlo a 3.10 agregando la cantidad necesaria de hidróxido de sodio al 10% (NaOH, 10% P/V).
- La solución colorante debe conservarse a temperatura ambiente y en lugar oscuro o protegido de la luz.

Coloración de las brucelas y lavado de células coloreadas

La *Brucella abortus* cepa 1119-3 se reproduce en tanque de fermentación o en medios sólidos, según se describió anteriormente.



- Agitar bien la solución colorante y filtrarla a través de gasa y algodón.
- En un frasco provisto de una barra magnética y estéril, colocar la suspensión madre de brucelas y 1 lt. de solución colorante por cada 45 gr. de pasta seca.
- Llevar el frasco a un agitador magnético y mantenerlo en agitación constante durante 48 horas. a temperatura ambiente.

Preparar una solución de lavado en la forma siguiente:

Cloruro de sodio (NaCl).....	40 gr.
Acido láctico.....	10 ml.
Hidróxido de sodio (NaOH) al 10%.....	28 ml.
Agua destilada.....	10 000 ml.

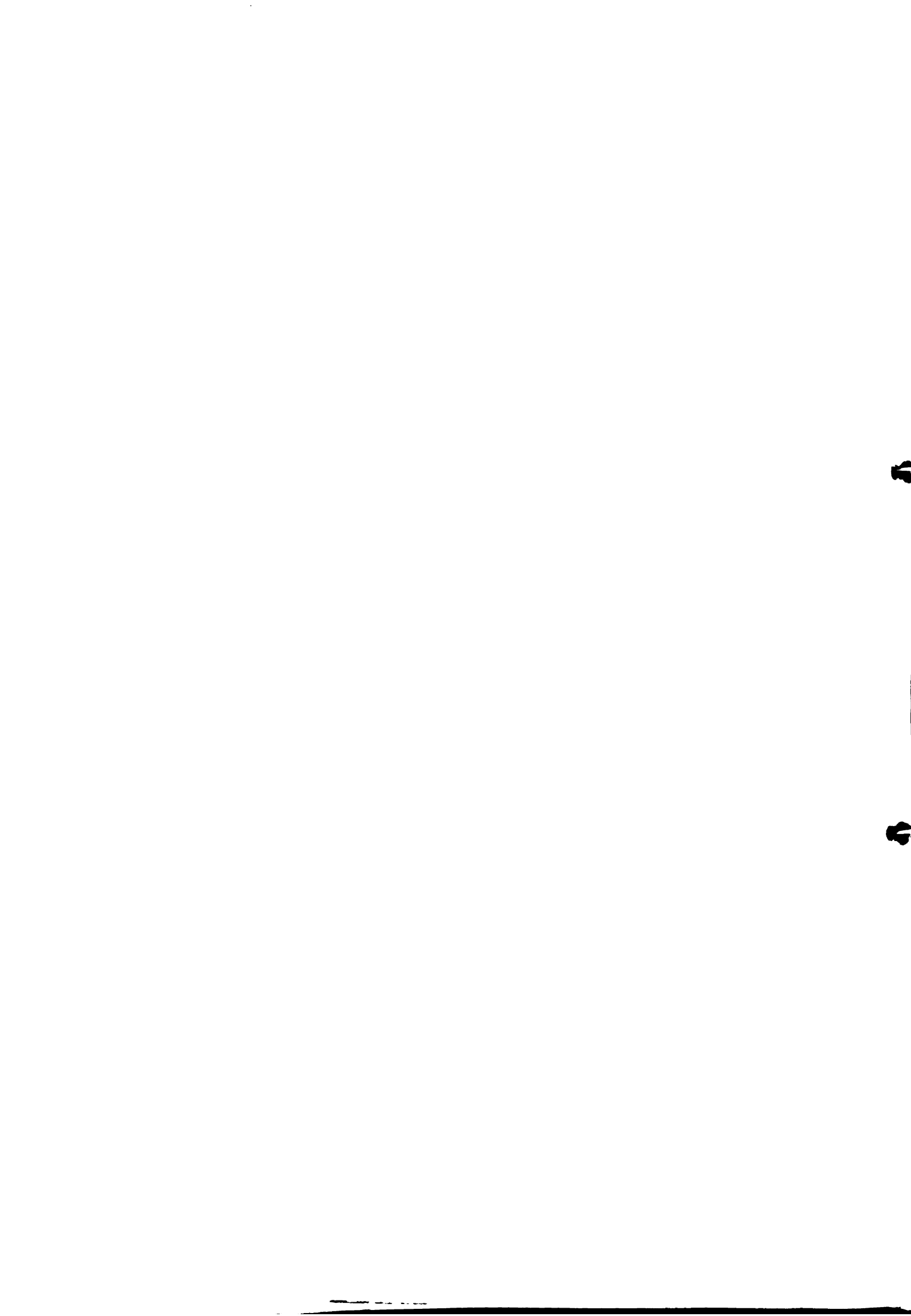
Ajustar el pH a 4 agregando hidróxido de sodio al 10% o ácido láctico.

- Centrifugar las células teñidas a 40 000 r.p.m. en centrífuga Sharples o en centrífuga de vasos grandes a 5 000 xg. durante 30 minutos para separarlas de la solución colorante.
- Recoger la pasta de células teñidas en frascos de plástico autoclavables que se puedan agitar mecánicamente.
- Agregar solución de lavado hasta la mitad de cada frasco y colocar los frascos en el agitador mecánico durante 4 horas.
- Transvasar la suspensión coloreada a un frasco grande provisto de barra magnética, agregar solución de lavado hasta completar un volumen aproximado de 20 veces el contenido en gramos de brucelas y dejar en el agitador durante una noche.
- Repetir la centrifugación y el lavado 2 veces, si se usa centrífuga Sharples. Cuando se usa otro tipo de centrífuga suele ser necesario hacer cuatro lavados.
- Después del último lavado, recoger las células teñidas en frascos tarados estériles y determinar el peso de brucelas teñidas (masa relativamente seca).

2.6.2 Normalización del antígeno

Diluyente final del antígeno:

Solución acuosa de ácido cítrico ($H_3C_2H_5O_7 \cdot H_2O$) al 2%.....	24 ml.
Solución acuosa de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) al 7%.....	10 ml.
Solución salina fenolada NaCL 0.85%, fenol 0.5%).....	10 000 ml.



Ajustar el pH a 4.00 agregando solución de ácido cítrico o de fosfato.

- A cada frasco plástico que contiene células teñidas agregar diluyente final en cantidad aproximada a cuatro veces el volumen de células y dejar en el agitador mecánico durante 4 horas.
- Transvasar la suspensión a un botellón con barra magnética, agregar solución diluyente final hasta completar 27 ml. de diluyente por cada gramo de brucelas. Dejar en el agitador durante una noche.
- Filtrar a través de algodón y gasa estériles. Tomar una muestra para determinaciones y dejar el resto en refrigeración a 4°C.

2.6.2.1 pH del antígeno

El pH final debe ser de 4.0 a 4.3. Si fuese necesario, ajustarlo mediante la adición de ácido cítrico o de fosfato.

2.6.2.2 Volumen celular

La densidad o volumen celular debe ser del 4%. Para su determinación, colocar 4 ml. de agua destilada en cada uno de 6 tubos de Fitch - Hopkins. Agregar a cada tubo 1 ml. de la muestra de antígeno y centrifugar a 1 945 xg. durante 75 minutos. Determinar el promedio de las lecturas y multiplicarlo por 100 para expresarlo en porcentaje. Si el volumen celular no es igual a 4.0%, ajustarlo agregando diluyente o células coloreadas según sea necesario y volver a hacer la determinación.

2.6.2.3 Sensibilidad

Comparar la sensibilidad de cada lote de antígeno con la del antígeno estándar realizando la prueba del anillo con diluciones seriadas en 5 o más muestras de leche de títulos elevados.

2.6.2.4 Envase

Si el antígeno nuevo pasa todas las pruebas satisfactoriamente, ponerlo a agitar durante toda una noche en un agitador magnético y, mientras continúa la agitación, envasarlo en condiciones asépticas en frascos estériles. Conservarlo a 4°C evitando la congelación.

De cada lote conviene reservar un par de frascos con fines de referencia y para el estudio de su conservación a largo plazo.

El período de validez del antígeno se fija en 1 año a partir de la fecha de elaboración, bien conservado a 4°C.

3

4

2.7 ANTIGENO PARA LA PRUEBA DE DIFUSION EN GEL DE AGAR

2.7.1 Materiales, reactivos y medios

- Tubos de ensayo de 16 x 150 mm
- Tubos de ensayo de 25 x 200 mm.
- Ampollas o viales p/ liofilización
- Erlenmeyers de 250 y 500 ml.
- Botellas de Roux o similares
- Perlas de vidrio o vástagos de vidrio
- Tubos de diálisis de celofán de 1.6 cm.
- Frascos de vidrio p/ diálisis
- Solución salina fisiológica con tope de fosfatos estéril
- Solución salina al 5% con tope de fosfatos pH 7.2 estéril
- Agua destilada estéril
- Solución de cristal violeta (p/ estudio de disociación)
- Reactivos p/ tinción de Gram
- Suero específico anti – *B. ovis* (preparado en conejo)
- Suero monoespecífico anti – *B.abortus*
- Suero monoespecífico anti – *B.melitensis*
- Suero anti – *B.ovis* (preparado en carnero)
- Brucella agar (Albimi)
- Bacto agar
- Suero normal estéril de conejo o bovino
- Caldo tioglicolato de sodio
- Caldo dextrosado c/ indicador de Andrade
- Caldo tripticasa soja

2.7.2 Procedimiento de elaboración

Cepa: se emplea un cultivo de una cepa de *B. ovis* recientemente aislada que, debidamente tipificada, presente los caracteres de la especie.

El antígeno preparado con *B. ovis* se usa tanto para el diagnóstico de la epididimitis de los carneros por *B. ovis*, como para detectar anticuerpos de *B. canis*. La cepa se mantiene liofilizada o en nitrógeno líquido.

Preparación de la semilla

La cepa de *B. ovis* liofilizada se reconstituye con agua destilada; si se mantiene en nitrógeno líquido, se debe descongelar y sembrar en tubos (25 x 200 mm) de *Brucella*



agar al que se haya agregado 5 gr. de Bacto agar por litro y 5% de suero de conejo o de bovino. Se incuba a 37°C en una atmósfera con 10-20% de CO₂ durante 48 horas

Se examina la pureza de cada tubo por el método de Gram; luego se suspende el cultivo con 10 ml. de agua peptonada estéril. Con la suspensión, se siembran botellas de Roux que contengan *Brucella* agar más el agregado de 10 gr. de Bacto agar por litro de medio de cultivo y 5% de suero estéril de conejo o de bovino. Cada botella de Roux recibe 5 ml. de la suspensión. Se incuban en posición invertida a 37°C, en una atmósfera que contenga 10 – 20% de CO₂ durante 48-72 horas

Se examinan los cultivos macroscópicamente y, si no presentan contaminación, se suspenden en 50 ml. de solución fisiológica por botella de Roux y se cosechan asépticamente en frascos erlenmeyer.

Se examina la suspensión celular por el método de Gram y se realizan controles de pureza en medio de agar Albimi, tioglicolato de sodio, tripticasa soja y caldo glucosado con indicador de Andrade. Los medios para el control de pureza se incuban a 37°C, con excepción de la tripticasa soja, que se incuba a 22°C, y se observan por un período de 7 días.

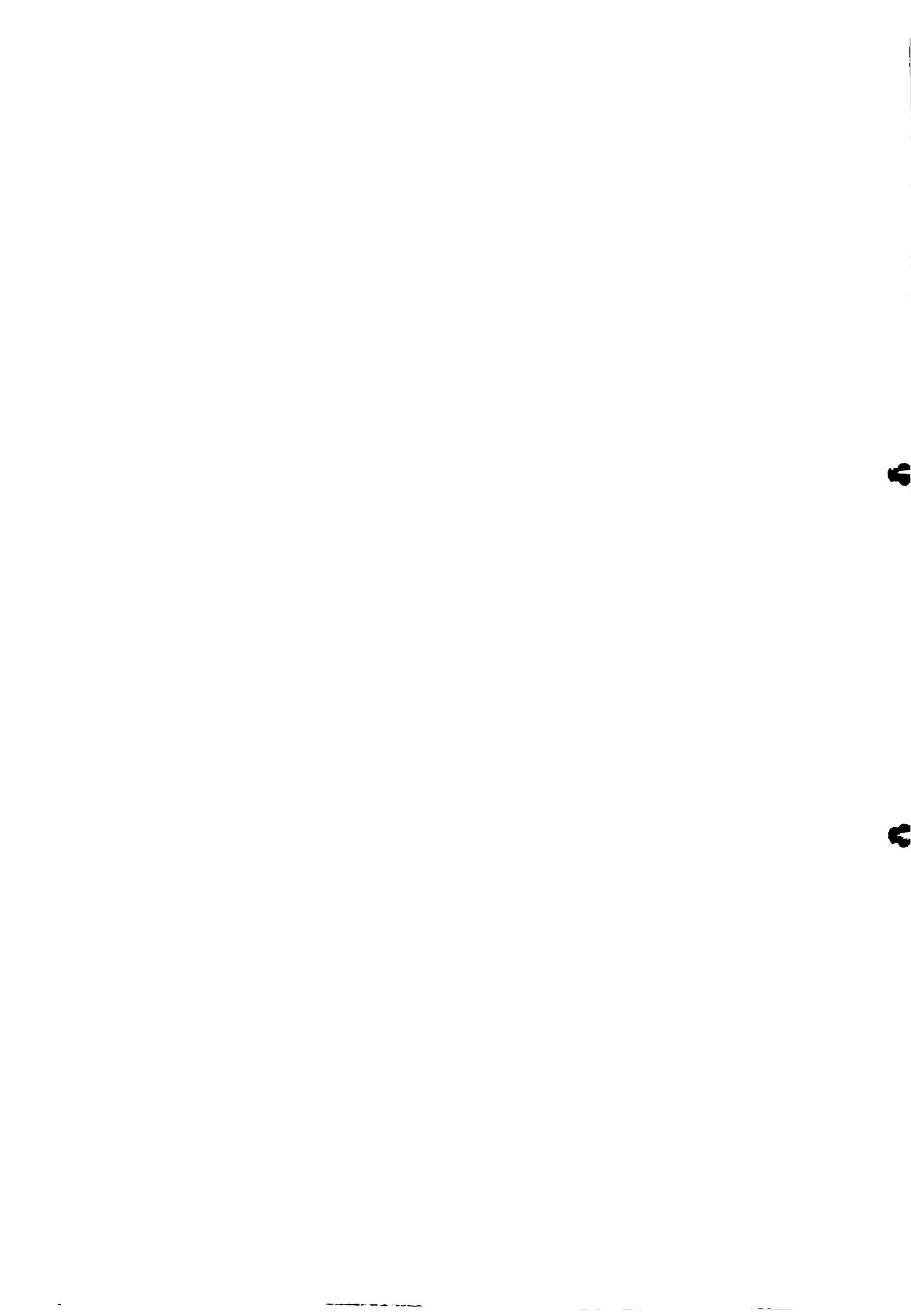
Al mismo tiempo, se preparan placas para el estudio de colonias y se controla la suspensión de la semilla frente los sueros anti-*B. abortus*, anti-*B. melitensis* y anti-*B. ovis*.

Las placas para el estudio de colonias se incuban 96 horas a 37°C, en una atmósfera que contenga 10-20% de CO₂; al cabo de este lapso, se examina la apariencia de las colonias con el microscopio estereoscópico con luz oblicua y también con el método de inundación con cristal violeta. La *B. ovis* posee colonias de caracteres morfológicos rugosos.

Siembra del lote de producción

Se ajusta un dispositivo con campana de distribución en el erlenmeyer que contienen la suspensión controlada de semilla y se siembra un grupo de botellas de Roux que contienen agar Albimi con el agregado de 10 gr. de Bacto agar por cada litro de medio y 5% de suero estéril de conejo o de bovino. La cantidad de inóculo debe ser pequeña (5 ml. aproximadamente), pero suficiente como para cubrir toda la superficie del medio.

Las botellas se rotan suavemente de manera que la suspensión celular se distribuya uniformemente sobre toda la superficie del medio y se incuban en posición invertida 72 horas, a 37°C en una atmósfera a 10-20% de CO₂.



Cosecha

Transcurridas 72 horas de incubación, se examinan las botellas para descubrir evidencia macroscópica de contaminación. Se deben cosechar grupos de no menos de 8 - 10 botellas eliminándose previamente las que muestran contaminación o aquellas en las que el medio se haya desprendido. Se elimina el líquido sobrenadante de los cultivos que se van a cosechar. El cultivo se cosecha con aproximadamente 20 ml. de solución fisiológica tope con fosfato de Sorensen (pH 7.2) (Anexo 2.b); se lo deja estacionar algunos minutos mientras se hacen movimientos suaves de rotación para desprender el cultivo de la superficie del agar. También se pueden emplear perlas o vástagos de vidrio para facilitar el desprendimiento. La mezcla de la suspensión celular se filtra por gasa o algodón o muselina para remover pequeñas partículas de medio que pudieran haberse desprendido durante la cosecha. Se hacen los controles especificados en 2.1.4 y 2.1.5.

Procesamiento de la suspensión celular

Inmediatamente después de la cosecha, se procede a centrifugar la densa suspensión celular a 15 000 x g. durante 15 minutos. El líquido sobrenadante se descarta y el paquete celular se resuspende en 10 ml. solución salina tope (buffer) (pH 7.2)

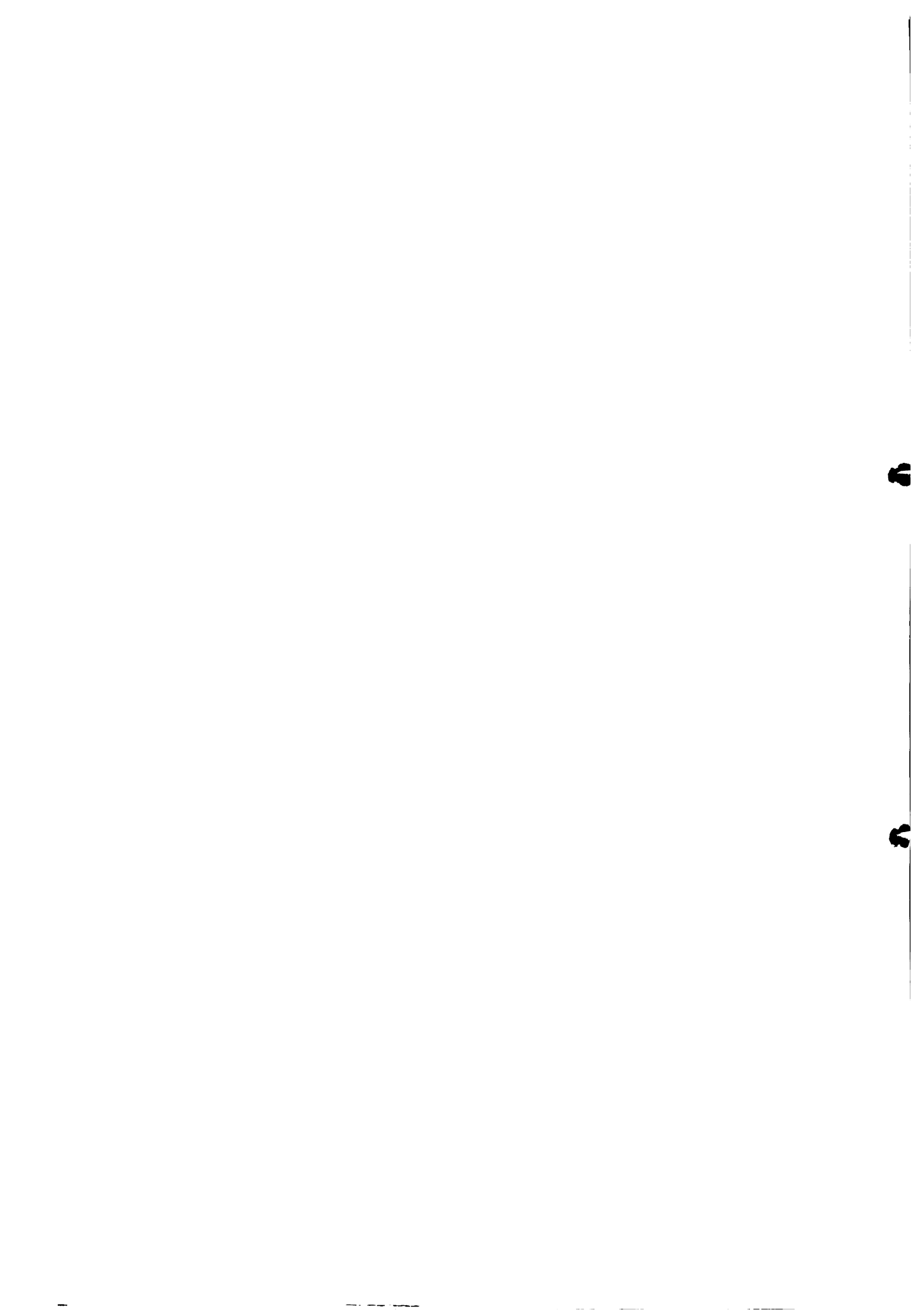
Se repite una vez más el proceso de centrifugación, se elimina el sobrenadante y se suspende nuevamente la masa celular de 100 ml. de solución fisiológica tope.

La suspensión resultante se vierte en erlenmeyer en el que se ha introducido una barra magnética, con la cual se agita la suspensión.

La suspensión celular se calienta en baño maría a 80°C durante 2 horas, agitándola a intervalos por rotación. Se deja enfriar y se centrifuga a 15 000 x g. durante 15 minutos para eliminar las macropartículas de restos celulares. Se recoge el líquido sobrenadante opalescente que constituye el antígeno y se congela durante la noche a -20°C o menos. El sedimento se descarta.

El antígeno se descongela y se vuelve a centrifugar a 15 000 x gr. en centrifuga refrigerada durante 15 minutos para eliminar lípidos; se vuelve a cosechar el sobrenadante y se elimina el sedimento.

El sobrenadante se dializa colocándolo en un tubo de diálisis de 1.6 cm. y depositando el tubo en 4 lt. de solución salina fisiológica con tope de fosfatos (pH 7.2) a 4°C durante 3 días. La solución fisiológica se cambia diariamente. Durante todo el período de la diálisis, se mantiene el líquido en movimiento por medio de un agitador magnético o por burbujeo del aire. La diálisis conveniente para mejorar la pureza del antígeno.



Liofilización

El antígeno se distribuye en ampollas o pequeños viales, en volúmenes de 2 ml. por cada envase y se liofiliza inmediatamente. Si no se dispone de liofilizador, se pueden mantener congelado a bajas temperaturas inferiores a -30°C y descongelar sólo las ampollas que se utilicen en el día.

El antígeno liofilizado se reconstituye antes de usarlo con 1 – 2 ml. de agua destilada estéril para proceder a su titulación.

2.7.3 Titulación

La titulación se hace frente a distintas diluciones de un suero conocido, comparándolas con las del antígeno estándar y se ajusta la dilución del liofilizado a aquella que produce las bandas de precipitación más nítidas y comparables con las que produce el estándar.

3. CONTROL DE CALIDAD DE VACUNA

3.1 VACUNA *BRUCELLA ABORTUS* CEPA 19

3.1.1 Requerimientos mínimos

Protocolos

Los laboratorios productores deberán llevar protocolos de cada serie o lote de vacuna que produzcan. Estos protocolos indicarán:

- Fecha de producción
- Cantidad de dosis producidas
- Control de pureza
- pH de la vacuna
- Recuento viable
- Control de disociación

Las firmas productoras deberán someter copias de los protocolos, junto con muestras de cada serie de la vacuna, al laboratorio de control oficial.

Cada serie de vacuna deberá conformar los siguientes requerimientos:

5

5

- La vacuna deberá estar libre de toda contaminación, según se comprueba por examen microscópico (tinción de Gram) y por siembra en tubos de agar papa y en caldo dextrosado e indicador.
- El pH estará entre 6.4 y 6.8.
- El recuento viable, en la fecha de la producción, no será menor a 12 000 millones de células de *Brucella* por 1 ml., o sea, 20.000/24.000 millones por dosis de 2 ml.; el recuento viable no será menor de 12 000 millones de células de *Brucella* por 1 ml., dentro del término de validez de la vacuna y hasta la fecha de su expiración.
- La disociación en la vacuna no podrá sobrepasar el 2% de las colonias de *Brucella*.
- Para las vacunas líquidas no se podrá establecer un término mayor de 3 meses de validez; para la vacuna liofilizada, no mayor de 1 año.
- Las etiquetas deberán indicar la fecha de producción y de expiración de la vacuna, dosis y temperatura de conservación.
- Los frascos deberán de ser de vidrio neutro y resistente incoloro, tipo I o II.
- Los envases deberán contener una cantidad razonable de exceso de vacuna, para permitir retirar fácilmente las dosis indicadas (normalmente un 10% más del volumen de la totalidad de las dosis).

Cepa:

Los laboratorios productores interesados deberán elaborar su vacuna con la cepa *B. abortus* cepa 19, que las autoridades sanitarias nacionales les remitirán periódicamente.

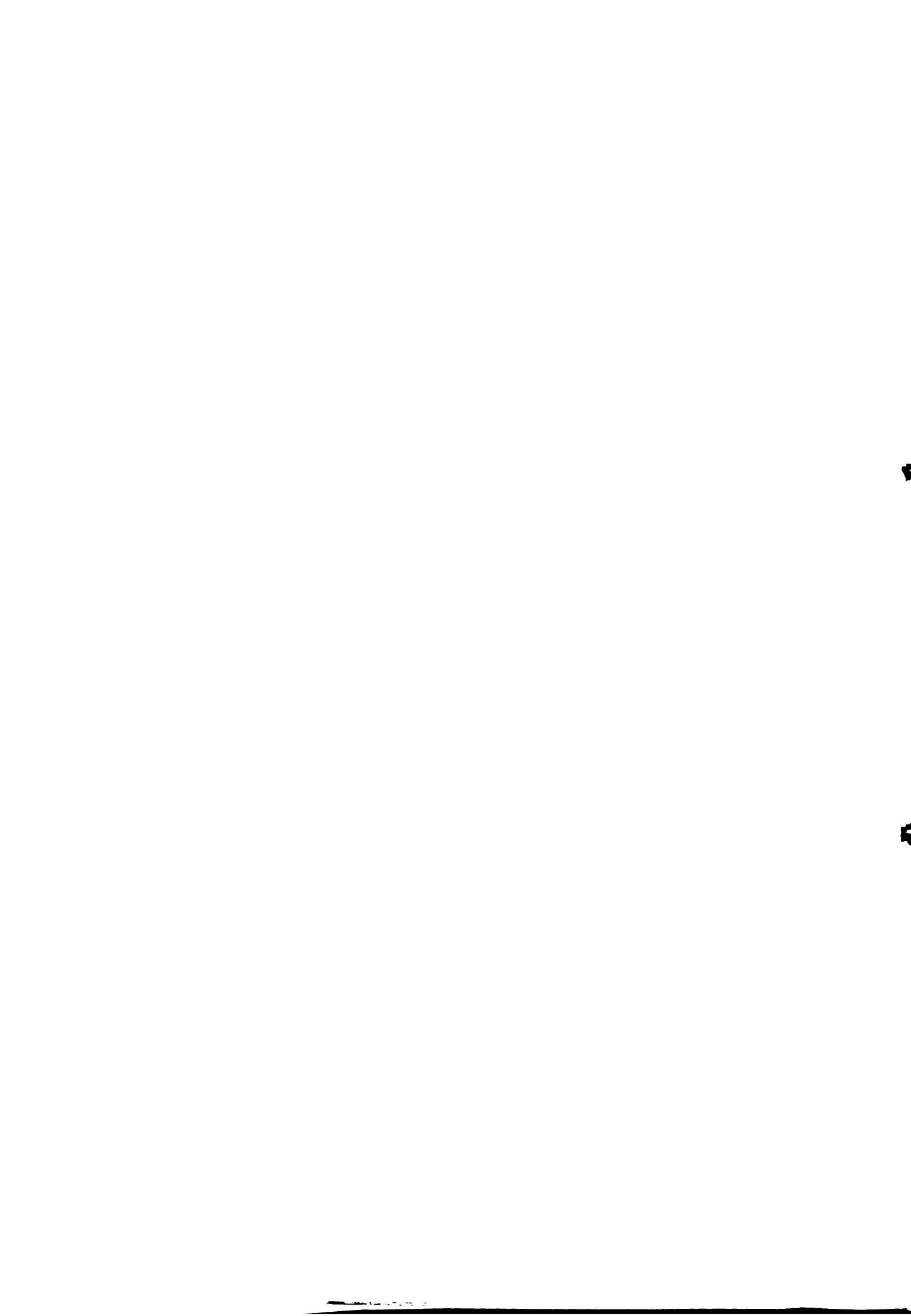
3.1.2 Técnica para el recuento viable de la vacuna *Brucella abortus* cepa 19

Solución diluyente

Peptona (DIFCO o equivalente).....10 gr.
 Cloruro de sodio q...p.....5 gr.
 Agua destilada.....1 000 ml.

Mezclar los ingredientes, ajustar el pH a 7.2 y esterilizar en autoclave a 121°C, durante 30 minutos.

En 3 frascos de dilución Pyrex estériles, provisto de tapones de goma o de tapas de rosca, colocar asépticamente 99 ml. de diluyente en cada uno y en un cuarto frasco (N° 4) 90 ml. de diluyente. Controlar la esterilidad del agua peptonada, incubando los frascos a 37°C, durante 24 horas. y a temperatura ambiente por un período igual.



Procedimiento de dilución

Agitar la vacuna por 1 minuto y tomar con una pipeta 1 ml. para hacer las siguientes diluciones:

- **Dilución N° 1:** agregar 1 ml. de la vacuna al frasco N° 1 que contiene 99 ml. de agua peptonada; agitar por 1 minuto en posición horizontal a mano o en agitador mecánico.
- **Dilución N° 2 (1:10 000):** agregar 1 ml. de la dilución N° 1 al frasco N° 2, que contiene 99 ml. de agua peptonada; agitar por 1 minuto.
- **Dilución N° 3 (1:1 000 000):** agregar 1 ml. de la dilución N° 2 al frasco N° 3, que contiene 99ml. de agua peptonada; agitar por 1 minuto.
- **Dilución N° 4 (1:10 000 000):** agregar 10 ml. de la dilución N° 3 al frasco N° 4, que contiene 90ml. de agua peptonada; agitar por 1 minuto.

Siembra

Los frascos N° 1 y 2 se descartan, ya que sus diluciones son demasiado bajas para un recuento satisfactorio. Se marcan 2 placas de agar - papa - suero o agar triptosa (DIFCO) con el N° 3 y 4 placas del mismo medio con el N° 4.

Del frasco N° 3 (dilución 1:1 000 000), se toman 0.2 ml. y se siembran con 0.1 ml. cada una de 2 placas marcadas con el N° 3. Una dispersión uniforme se obtiene mediante un alambre de platino doblado convenientemente o con una espátula de drigalsky.

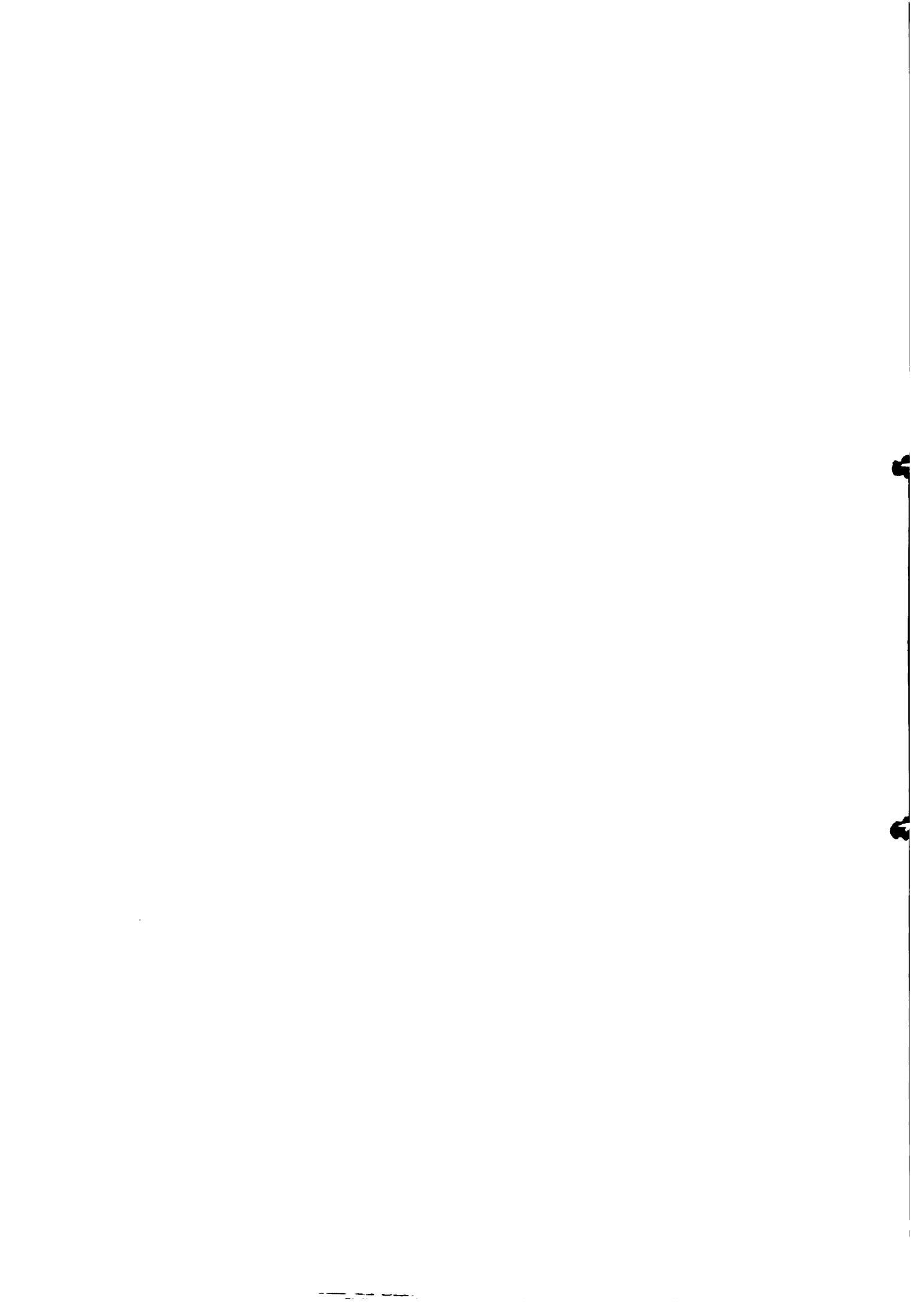
Del frasco N° 4 (dilución 1:10 000 000), se siembran con 0.1 ml. cada una de las 4 placas marcadas con el N° 4. Se extiende como en el caso anterior. La espátula de Drigalsky no debe ser flameada entre la dispersión de las placas 1 y 2 de la dilución 1:1 00 000 o las placas 1, 2, 3 y 4 de la dilución 1:10 000 000.

Incubación

Se invierten las placas y se incuban a 37.5°C durante 96 horas.

Recuento

Después de la incubación se dividen las placas en secciones con un lápiz dermográfico para facilitar la lectura.



Se cuentan las colonias de cada una de las 4 placas de la dilución N° 4. El valor obtenido se multiplica por 10 (para llevar a 1 ml., ya que el inóculo fue de 0.1 ml.) y por 10 000 000 (factor de dilución). Se suman los valores finales obtenidos.

Suponiendo, por ejemplo, que se obtuvieran los siguientes números de colonias en cada una de las placas de la dilución N° 4: 128, 114, 121 y 120, se tendría entonces:

$$\begin{array}{rcl} 128 \times 10 \times 10\,000\,000 & = & 12\,800\,000\,000 \\ 114 \times 10 \times 10\,000\,000 & = & 11\,400\,000\,000 \\ 121 \times 10 \times 10\,000\,000 & = & 12\,100\,000\,000 \\ 120 \times 10 \times 10\,000\,000 & = & \underline{12\,000\,000\,000} \\ & & 48\,300\,000\,000 \end{array}$$

Determinación del promedio y recuento viable final

Se divide el valor final por 4, que es el número de placas:

$$48\,300\,000\,000 : 4 = 12\,075\,000$$

Este es el valor que representa el número de brucelas viables por 1 mililitro.

3.1.3 Pruebas de control

De cada serie de vacunas se retira un número de frascos pruebas de control; mientras tanto, los frascos se mantienen en refrigerador a 4°C.

Las pruebas de control del cultivo son:

- a) **Prueba de pureza:** se efectúa sembrando el contenido de cada frasco de vacuna en 2 tubos de agar papa y 2 tubos con caldo dextrosado e indicador (bromocresol púrpura u otro que tenga el mismo rango de pH), provistos de tubitos de fermentación. Los tubos de agar papa se incuban a 37.5°C y son examinados diariamente durante 96 horas. Los tubos de caldo dextrosado se incuban durante 7 días a 37.5°C y también se examinan diariamente por la presencia de gas y ácido. Los erlenmeyer que contienen suspensión para semilla contaminada son descartados.
- b) **Prueba de disociación:** se siembran placas de agar papa con la suspensión de semilla de cada frasco de vacuna, con el fin de confirmar que el cultivo fue bien seleccionado y que no hay disociación. Las suspensiones para semilla en las cuales se comprueban colonias variantes son descartadas.

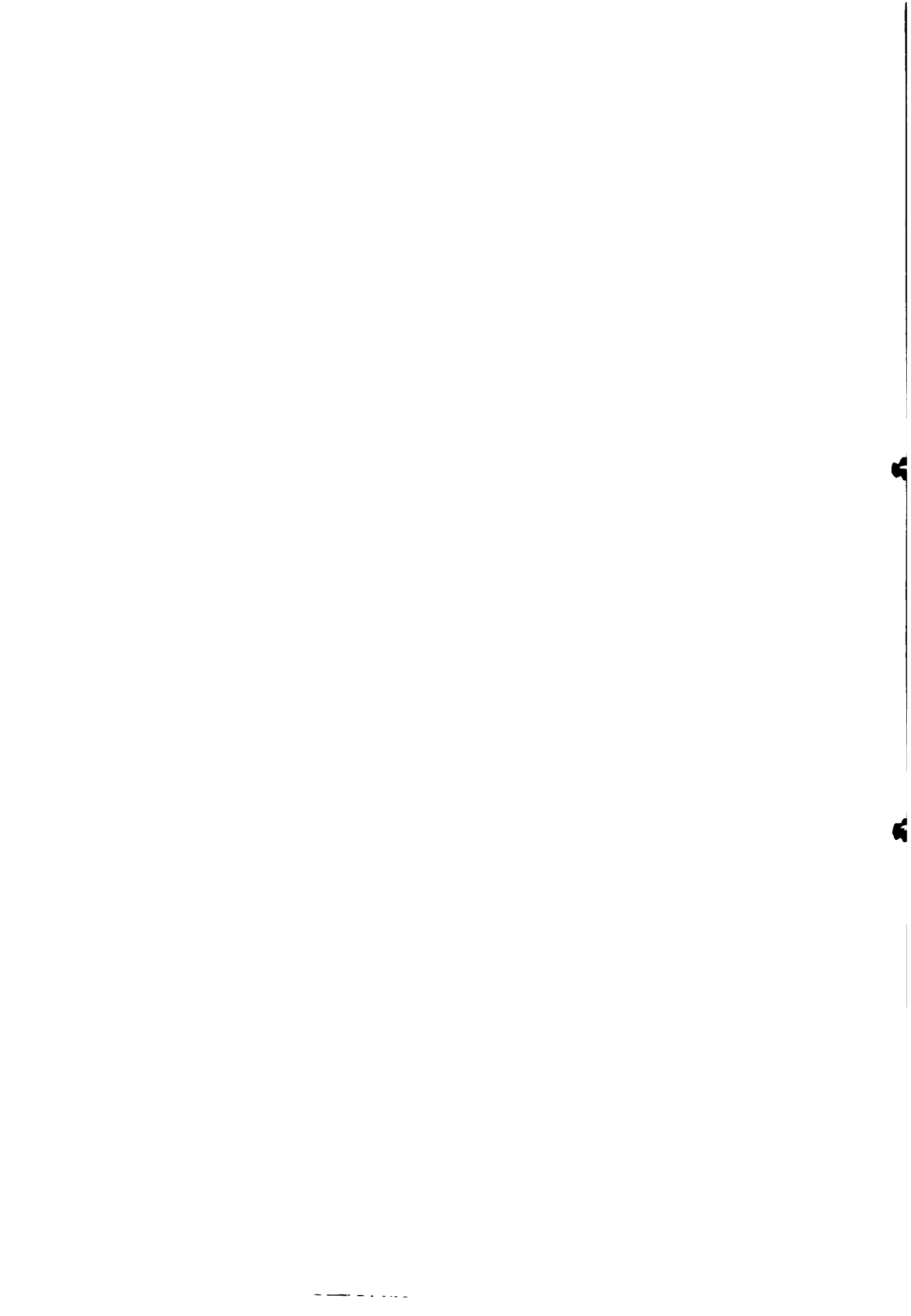


Los laboratorios que producen lotes pequeños de vacuna para elaborar la semilla sembrando cultivos seleccionados en tubos gruesos (25 mm. x 20 mm.) de agar papa. Estos se incuban por 48 horas, se examinan macroscópicamente para descartar los contaminados, se suspende el cultivo en solución salina bufferada y se hacen las pruebas de control. La suspensión de 4 tubos gruesos corresponde aproximadamente a la cantidad que se obtienen de una botella de Roux.

3.2 VACUNA *BRUCELLA ABORTUS* CEPA RB 51

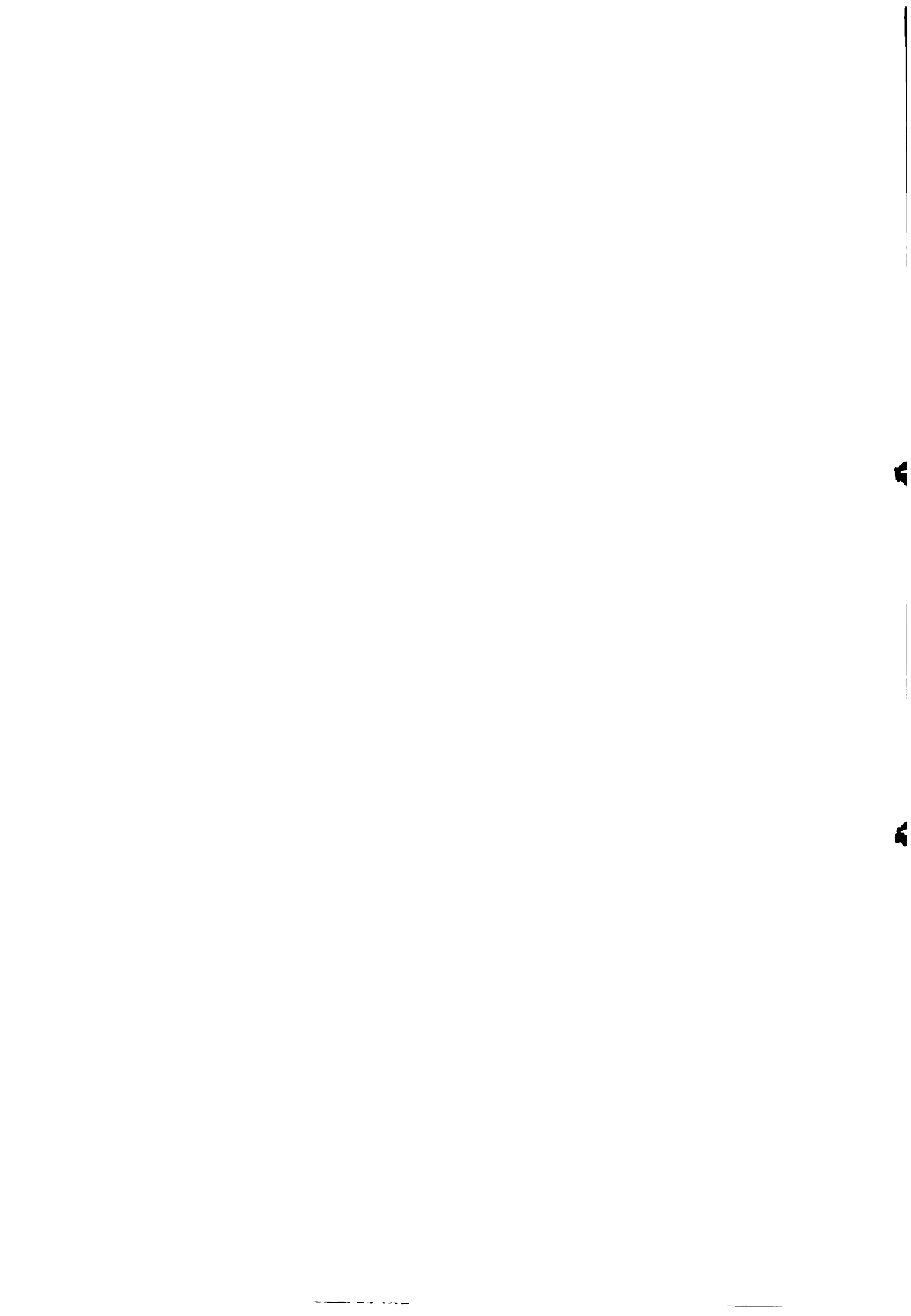
Los requerimientos mínimos de la vacuna *B. abortus* RB51 son similares a los descritos para la Vacuna *B. abortus* Cepa 19, con algunas diferencias:

- La *Brucella abortus* cepa RB51 es una cepa rugosa, por lo que no se deben observar colonias lisas en la pruebas de disociación.
- La concentración celular no será menor de 10×10^9 ni mayor a 34×10^9 de colonias por dosis de 2 ml.
- Las pruebas de control para pureza y esterilidad son también similares.

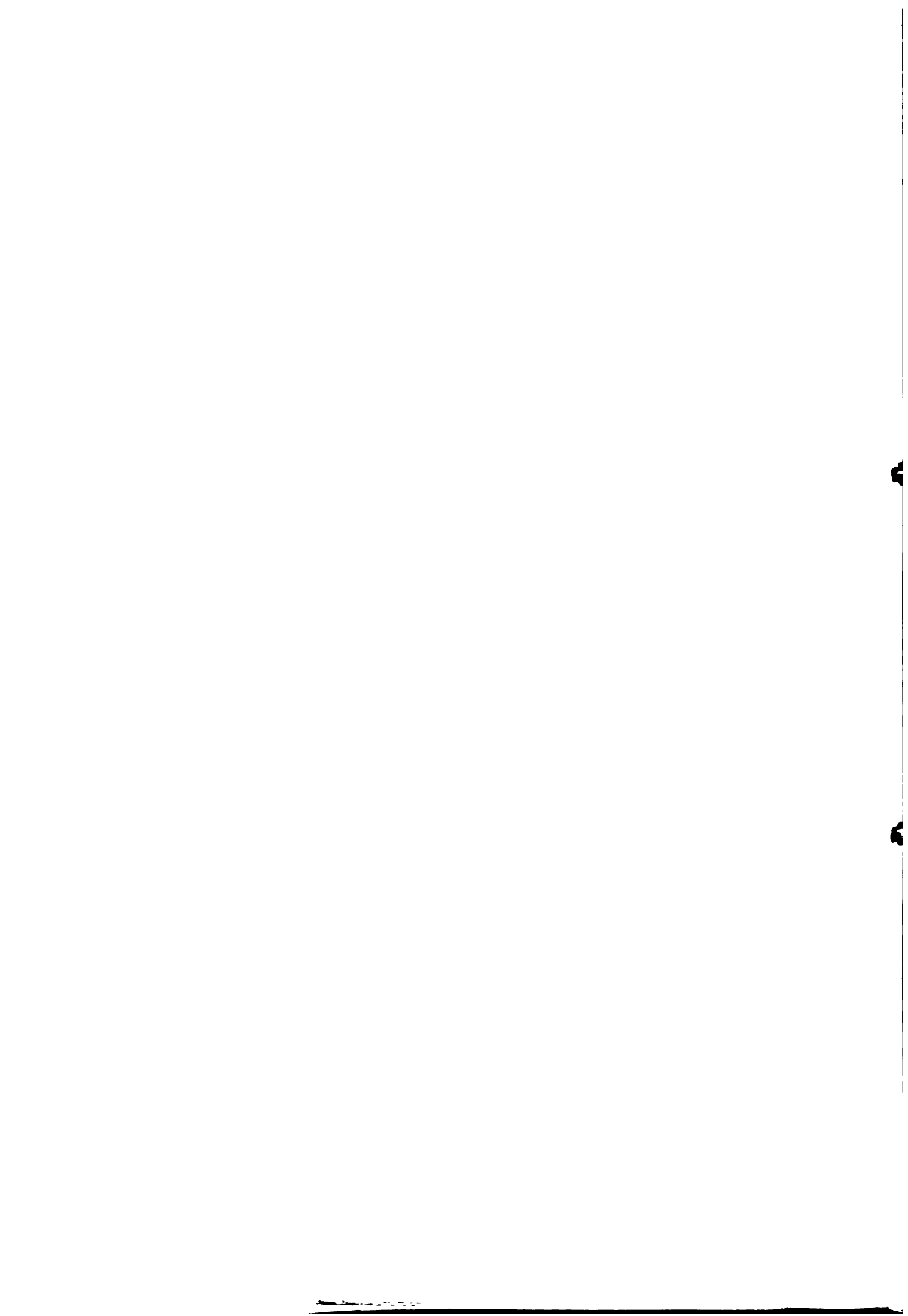


5. LITERATURA CONSULTADA

- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. 1978. *Brucellosis diagnosis standard techniques*. 2a. Edición. 53 p.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS)/OPS (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 1982. *Pruebas Suplementarias para el Diagnóstico de la Brucelosis*. Nota técnica No. 25. 30 p.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS/ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 1971. *Elaboración y normalización de Antígenos para las Pruebas de Aglutinación de la Brucelosis*. Nota técnica No. 3. 21 p.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS/ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 1981. *Prueba de fijación de complemento para el diagnóstico de la brucelosis*. Nota técnica No. 24. 30 p.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS/ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 1982. *Técnicas de seroaglutinación. Brucelosis*. Nota técnica No. 2. .30 p.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS/ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 1981. *Técnica de difusión en gel de agar para el diagnóstico de la epididimitis de los carneros*. Nota técnica No. 20. 15 p.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS/ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 1969. *Vacuna Brucella abortus Cepa 19*. Nota técnica No. 4. 19 p.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. 1985. *Brucella antigen production and standarization*. 96 p.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. 1978. *Methods for identification of Brucella*. 55 p.
- WHO (World Health Organization)/FAO. 1975. (Food and Agriculture Organization). By: Alton, G.G. *et al. Laboratory techniques in brucellosis*. 2nd. Edition. 163 p.

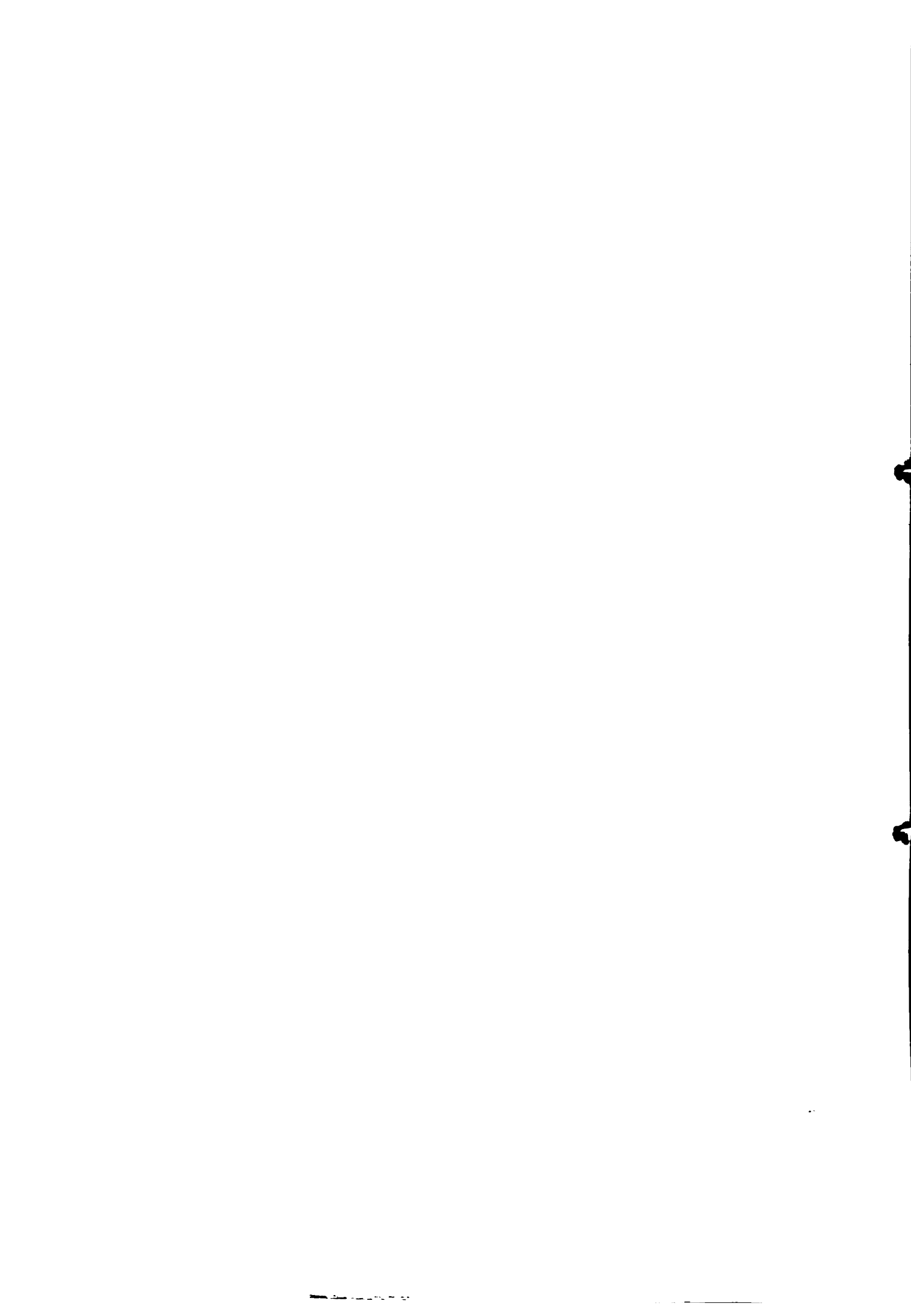


- OIE (Office International of Epizooties). 1996. *Manual of Standards for diagnostic tests and vaccines*. 723 p.



III. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

**MANUAL DE TECNICAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO
EN SALUD ANIMAL**



III. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Dra. Graciela Vergara de Insfrán

1. INTRODUCCION

El agente etiológico es un virus perteneciente a la familia *Paramixoviridae*, género *Paramixovirus* (PMV), que contiene ácido ribonucleico (ARN) y se replica en el citoplasma de las células. Existen 9 serotipos de *Paramixovirus* y el virus de Newcastle está clasificado en el serotipo o grupo 1 (PMV – 1).

De acuerdo con su patogenicidad (de mayor a menor), las cepas del virus de Newcastle se clasifican en varios grupos:

- Velogénico neurotrópico
- Mesogénico viscerotrópico
- Lentogénico asintomático

Las cepas lentogénicas son mundialmente utilizadas para preparar vacunas a virus vivo y/o inactivadas.

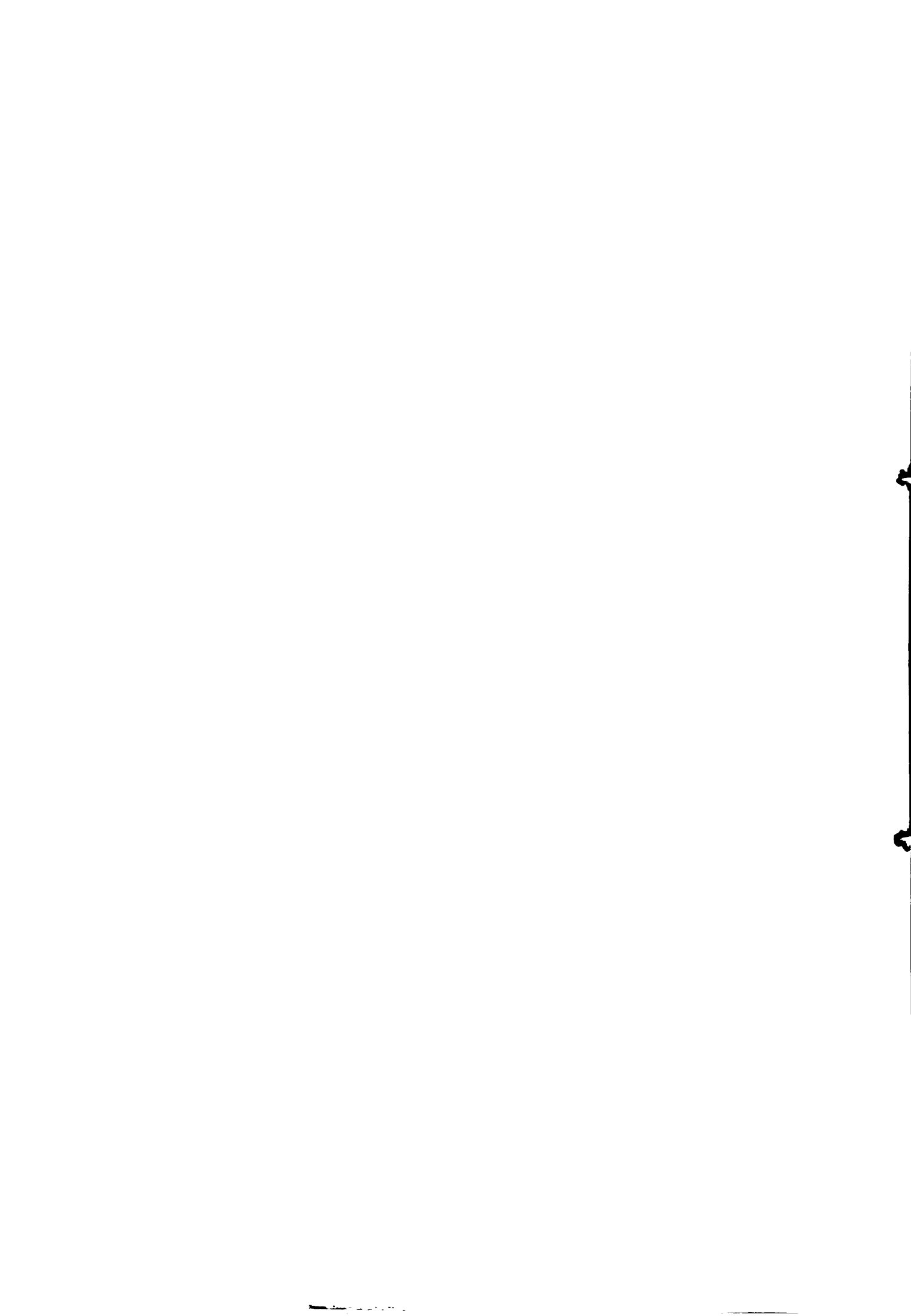
2. DIAGNOSTICO

2.1 Muestras

El muestreo se realiza a través del hisopado traqueal y cloacal, materia fecal o contenido intestinal, tejido cerebral, pulmonar (tráquea, pulmones), intestino (delgado y grueso), proventrículo, hígado, bazo, riñón, corazón, sueros y otras muestras procedentes de aves enfermas o recientemente muertas.

Deberán tomarse muestras de sangre o hisopados de todas la aves cuando la parvada esté compuesta de menos de 20 animales y 20 muestras cuando la manada sea mayor (la posibilidad de detectar al menos un suero positivo, será de 99%).

En aves de matadero destinados a exportación se deberán tomar al menos 60 muestras de aves por lote, identificables desde su origen y hasta su despacho correspondiente, de tal forma a poder determinar la trazabilidad de los mismos.



El trabajo se realizará en presencia de veterinarios autorizados por el SENACSA y las muestras se enviarán al Laboratorio acreditado oficialmente.

2.2 Tratamiento de las muestras

Los órganos limpios y sucios se procesan por separado, así como también la materia fecal. Se podrán procesar pools de hasta 5 (cinco) muestras de igual tipo.

Se sumergirán completamente los hisopados en una cantidad suficiente de medio con antibióticos, que garantice la probable supervivencia de eventual presencia de virus de Newcastle, a su vez, las muestras de materia fecal y de órganos deben homogeneizarse en un mezclador cerrado o mortero y arena esterilizada en un medio con antibióticos para convertirlas en suspensiones al 10-20% p/v. Posteriormente las suspensiones se dejarán a temperatura ambiente por 2 horas aproximadamente o más tiempo, a una temperatura de 4°C y se clarificarán por centrifugación (800-1000 g/10 min.), posteriormente se procederá a inocular estas suspensiones.

2.3 Medio con Antibióticos

Para las muestras con materia fecal es necesaria una alta concentración de antibióticos. Una mezcla típica es la siguiente:

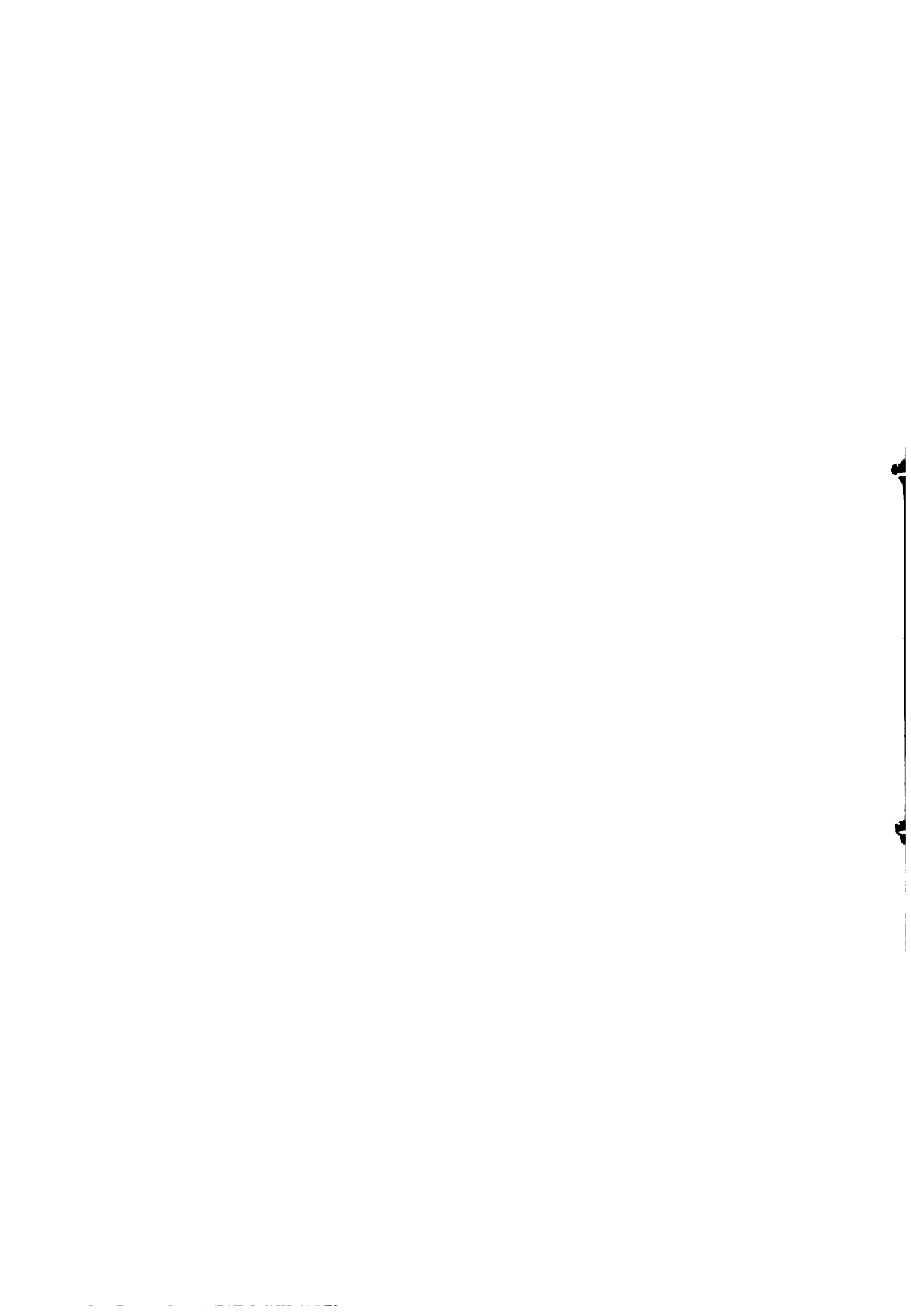
Penicilina.....	10.000 UI/ml.
Estreptomicina	10 mg/ml.
Gentamicina.....	0.25 mg/ml
Micostatina.....	5000 UI/ml

En solución salina bufferada (PBS) con pH entre 7.2 y 7.4.

Estos niveles pueden reducirse hasta 5 veces cuando se trabaje con tejidos e hisopados traqueales. Para evitar el crecimiento de Chlamydia pueden añadirse 50 mg/ml de oxitetraciclina. Al elaborar el medio es imprescindible comprobar el pH después de añadir los antibióticos y corregirlos hasta que fluctúe entre 7.0 – 7.4.

2.4 Aislamiento del virus en huevos embrionados SPF

Deberán inocularse dosis de 0.1 a 0.2 ml de líquido sobrenadante clarificado dentro de la cavidad alantóidea de al menos 4 huevos embrionados, que hayan sido incubados de 8–10 días. Es preferible que los huevos procedan de una parvada exenta de patógenos específicos (SPF), si ello no fuera posible podrán utilizarse huevos de una parvada exenta de anticuerpos del virus de la enfermedad de Newcastle. Los huevos inoculados deberán mantenerse a 37°C y se examinarán a trasluz diariamente.



Los huevos que contengan embriones moribundos o muertos serán refrigerados a 4°C a medida que se vayan comprobando. Los demás se refrigerarán a la misma temperatura 6 días después de la inoculación. Las muertes embrionarias ocurridas dentro de las 24 horas después de la inoculación deberán descartarse.

Los fluidos alantoideos serán sometidos a la prueba de hemoaglutinación, con hematíes a una concentración entre 5 y 10%, si ésta resultase negativa, deberá repetirse dos pasajes más utilizando fluido alantóideo o amniótico no diluido como inóculo. En muestras no tradicionales aves silvestres o acuáticas se procederá hasta cinco pasajes ciegos para luego dar como negativa. En estos pasajes se realizan control de esterilidad.

Si fuese positiva deberá descartarse la posible presencia de bacterias mediante la realización de un cultivo. Si se confirma la presencia de bacteria, podrán filtrarse los fluidos con filtro de membrana de 450 nm, añadirse más antibióticos e inocularse en huevos embrionados, como ya se explicó anteriormente.

Se considerará que el resultado de la prueba es **negativo**, si no se detecta hemoaglutinación ni se aísla ningún virus. De detectarse actividad hemoaglutinante o sospecha de Newcastle, se realizará su aislamiento y tipificación.

2.5 Diagnóstico Diferencial

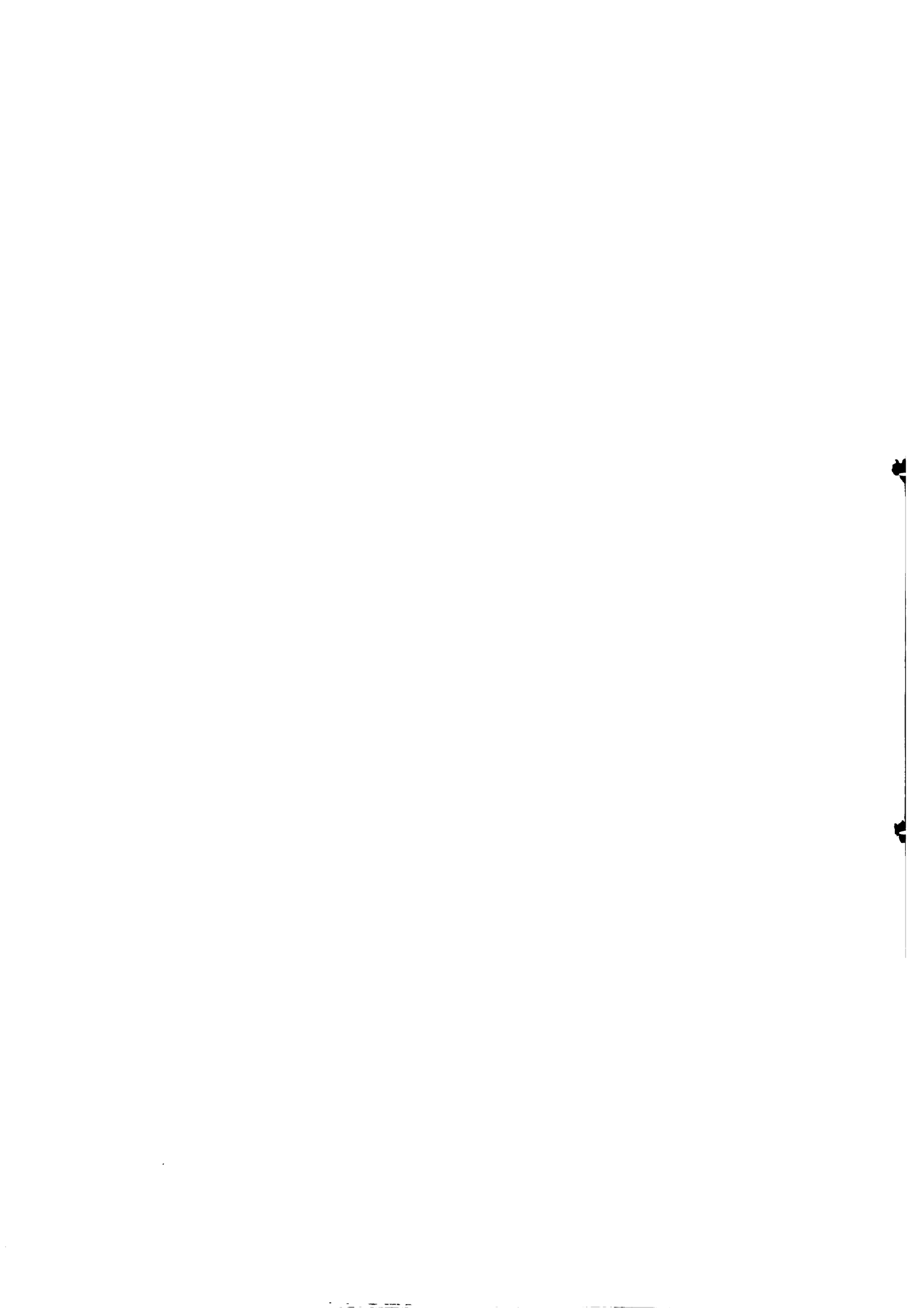
2.5.1 Diferenciación preliminar

Como es fundamental que se adopten, lo antes posible, medidas provisionales para limitar la extensión de la enfermedad de Newcastle, los fluidos hemoaglutinantes deberán someterse a las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación descrita en el ítem 2.8.

Una inhibición positiva, es decir, de 1/16 o más con antisuero policlonal específico para el virus de la enfermedad de Newcastle, se considerará una identificación preliminar suficiente para imponer medidas provisionales para la lucha contra la enfermedad

2.5.2 Confirmación

La presencia del virus de la enfermedad de Newcastle volverá a confirmarse por inhibición de la hemoaglutinación con antisuero de gallina monoespecífico. Todo el material positivo deberá someterse a la prueba del Índice de Patogenicidad Intracerebral (IPIC). Los índices de patogenicidad superiores a 0.7 indicarán la presencia del virus que exige la aplicación de todas las medidas de lucha contra la enfermedad.



2.6 Detección de Anticuerpos en aves no vacunadas. Serología

Se probará la capacidad de las muestras individuales de sueros para inhibir el antígeno hemoaglutinante del virus de la enfermedad de Newcastle en pruebas estándares de HI de acuerdo con lo descrito en el ítem 2.8.

Se utilizan 4 u 8 unidades de hemoaglutinación en la prueba de HI, y al parecer ambas son válidas, se deja al arbitrio del laboratorio. Téngase en cuenta, sin embargo que del antígeno utilizado dependerá el nivel en el que un suero sea considerado positivo: con 4 unidades de hemoaglutinación, un suero se considera positivo cuando presente un título superior o igual a 2^4 , mientras que con ocho unidades deberá ser igual o mayor a 2^3 .

2.7 Prueba de la Hemoaglutinación (HA)

2.7.1 Reactivos

- Solución salina isotónica amortiguadora de fosfato (0.005 M) de pH 7.0 a 7.4.
- Hematíes extraídos de gallinas SPF o exenta de anticuerpos del virus de la enfermedad de Newcastle, mezclados en partes iguales con solución de Alsever, luego los hematíes se lavan 3 veces en solución salina isotónica amortiguadora de fosfato. Para la prueba se sugiere una suspensión de dicha solución al 1%.
- Se recomienda la utilización como antígeno estándar la cepa de virus La Sota de la enfermedad de Newcastle.

2.7.2 Procedimiento

- Distribuir 0.025 ml de solución salina isotónica amortiguadora de fosfato.
- Agregar 0.025 ml de suspensión de virus (fluido alantoideo) en el primer pocillo.
- Utilizar una micro pipeta para preparar diluciones del virus (de 1:2 a 1:4096) en toda la placa.
- Distribuir otros 0.025 ml de solución salina isotónica amortiguadora de fosfato en cada pocillo.
- Añadir 0.025 ml de una suspensión al 1% de hematíes a cada pocillo
- Homogeneizar golpeando ligeramente la placa y refrigerarla a 4°C.
- Leer las placas después de 30 o 40 minutos cuando hayan sedimentado los controles. La lectura se efectuará inclinando la placa y observando la presencia o ausencia de un movimiento de los hematíes en forma de lágrimas.
- Los pocillos en los que no se haya producido la hemoaglutinación deberán presentar un movimiento similar al de los pocillos de control que no tengan virus.



- El título de hemoaglutinación será la mayor dilución que produzca la aglutinación de los hematíes; puede considerarse que tal dilución contiene el título de hemoaglutinación.
- Otro método más preciso para determinar el título de hemoaglutinación consiste en realizar pruebas de hemoaglutinación con virus en una gama de diluciones iniciales muy cercanos entre sí (1:3, 1:4, 1:5 etc.), éste método se recomienda para preparar con gran precisión antígeno para la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

2.8 Prueba de inhibición de la Hemoaglutinación (HI)

2.8.1 Reactivos

- Solución salina isotónica amortiguadora de fosfato
- Fluido alantóideo que contenga el virus diluido con solución salina isotónica amortiguadora de fosfato hasta que contenga 4 u 8 unidades de hemoaglutinación
- Suspensión de hematíes de gallina al 1%
- Suero de gallina de control negativo
- Suero de gallina control positivo

2.8.2 Procedimiento

- Distribuir 0.025 de solución salina isotónica amortiguadora de fosfato en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de plástico (utilizar pocillos de fondo en U).
- Introducir 0.025 ml de suero en el primer pocillo de la placa .
- Utilizar una micropipeta para hacer diluciones a la mitad del suero en toda la placa.
- Añadir 0.025 ml de fluido alantoideo diluido que contenga 4 u 8 unidades de hemoaglutinación.
- Homogeneizar golpeando ligeramente la placa y refrigerarla a 4°C al menos durante 60 minutos o dejarla a temperatura ambiente durante 30 minutos como mínimo.
- Añadir 0.025 de suspensión de hematíes al 1% a todos los pocillos
- Homogeneizar golpeando ligeramente la placa y refrigerarla a 4°C.
- Leer las placas después de 30 a 40 minutos, cuando se hayan sedimentado los hematíes de control. La lectura se efectúa inclinando las placas y observando la presencia o ausencia de un movimiento en forma de lágrimas similar al de los pocillos de control que contengan hematíes (0.025 ml) y solución salina isotónica amortiguadora de fosfato (0.05 ml) solamente.
- El título de inhibición de la hemoaglutinación será la mayor dilución del antisuero que produzca una inhibición completa de 4 u 8 unidades de virus (en



todas las pruebas deberá incluirse una titulación de hemoaglutinación para confirmar la presencia de las unidades de hemoaglutinación necesarias).

- La validéz de los resultados dependerá de la obtención de un título de menos de 2^3 para 4 unidades de hemoaglutinación o de 2^2 para 8 unidades de hemoaglutinación con el suero de control negativo y de un título de dilución inmediatamente superior o inmediatamente inferior al título conocido del suero de control positivo.

2.9 Índice de Patogenicidad Intracerebral (IPIC)

- Diluir a 1:10 fluido alantoideo recogido o infeccioso (el título de hemoaglutinación deberá ser superior a 2^4) en un fluido fisiológico estéril (no podrá utilizarse antibióticos).
- Inyectar en el cerebro de cada uno de los 10 pollitos (libres de patógenos específicos SPF) de un día de edad, es decir (24 horas y 40 horas después de salir del huevo) 0.05 ml de virus diluido.
- Examinar las aves cada 24 horas durante 8 días.
- Clasificar las aves en cada examen de acuerdo al siguiente puntaje: 0 = normal, 1 = enferma, 3 = muerta.
- Calcular el índice del siguiente modo:

Síntomas clínicos	Días después de la inoculación								(N° de aves)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	Total	Puntaje
Normal	10	4	0	0	0	0	0	0	14 x 0	= 0
Enferma	0	6	10	4	0	0	0	0	20 x 1	= 20
Muerta	0	0	0	6	10	10	10	10	46 x 2	= 92
									Total = 112	

El índice será: el puntaje medio por aves y por observación = $112/80 = 1.4$

Tiempo Medio de Muerte con Dosis Letal Mínima (TMM- DLM)

- Diluir virus de 10^{-1} a 10^{-10} .
- Inocular 6 embriones con cada dilución, comenzando por 10^{-6} . La dosis fue de 0.1 ml por embrión en la cavidad alantoidea.
- Observar cada 8 horas.
(La DLM es la dilución más alta en la que mueren todos los embriones del grupo).



3. CONTROL DE VACUNA

3.1 Retiro de Muestras

El médico veterinario, designado por la Dirección de Laboratorio de SENACSA, se hará presente en el local de la Empresa productora de Vacunas Aviares, en el día y hora indicada por la Dirección, acompañado por una persona responsable de la Firma (preferentemente un técnico), controlará si la totalidad de la partida declarada se halla en la cámara fría, cuya temperatura debe estar a -20°C . El producto deberá estar envasado y rotulado convenientemente, luego el funcionario del SENACSA retirará las muestras tomadas al azar la cantidad de 70 frascos por lote; con ellas se hará 2 (dos) paquetes con igual número de muestras en cada uno, los sellará y lacrará e identificará correctamente, firmando por el paquete juntamente con el responsable de la firma. Se procederá a elaborar un acta por triplicado, en la que se hará constar tipo de vacuna, número de serie, número de dosis, fecha de vencimiento y cantidad de muestras retiradas, y se firmarán los tres ejemplares. Uno de los paquetes que contienen las vacunas y una copia del acta quedará en poder de la firma productora, el otro paquete y dos copias del acta (el original entre ellas), juntamente con el protocolo de control de calidad del origen de la vacuna llevará el funcionario de SENACSA.

Al llegar las muestras al laboratorio de control se registrarán en el libro de entrada de la dirección, posteriormente dichas muestras se apuntarán en el libro de entrada de Newcastle.

Desde el momento en que el funcionario retire las muestras, todas, las, series, quedarán en caución en la cámara fría productora o importadora, hasta tanto sea autorizada su comercialización o el decomiso según corresponda.

3.2 Control de Calidad

Las muestras del paquete que fueron entregados a la División de Newcastle se someterán a las siguientes pruebas: Prueba de esterilidad y control del título de las vacunas.

3.2.1 Prueba de Esterilidad

Objetivo

Asegurar que las vacunas de Newcastle sean libres de contaminación por bacterias en general (aeróbicas y anaeróbicas), salmonellas, micoplasma y hongos.



3.2.1.1 Etapas de la prueba

Primera etapa

Preparación de tubos de agua destilada estéril desionizada (se realiza un día antes de la 2da. Etapa). Pasos a seguir:

- Preparar 7 frascos de 500 ml de agua destilada cada uno, e identificarlos y 7 tubos conteniendo 5.0 ml de caldo BHI (brain heart infusion) también identificados del 1 al 7.
- Preparar 15 tubos para el agua destilada.
- Dos placas de Petri con BHI agar en el fondo del flujo laminar para iniciar el trabajo.
- Se utiliza 10 frascos de vacunas del mismo lote en la prueba
- Del frasco 1 de agua destilada se extrae 30 ml para cada uno de los 15 en total y 1 ml para el caldo BHI, el cual será incubado a 37 grados hasta el día de la lectura final del test. Se utiliza los 15 tubos conteniendo 30 ml cada uno, 10 para diluir las vacunas y las restantes, 1 para control de agua y 4 de reserva.
- Se repite igual para cada uno de los frascos, del 2° al 7°.
- Posteriormente se colocan los 10 tubos de un mismo frasco a lado de los caldos en una misma gradilla. Cada tubo de caldo contiene:

Selenito.....	50 ml
Tetrationato.....	50 ml
Sabouraud	40 ml
2 tubos de Casoy	40 ml (cada uno)
Thioglicolato.....	20 ml

Los tubos tienen que ser tapa rosca y de capacidad de 25 x 200 ml y para el Thioglicolato 20 x 160

Segunda etapa

Rehidratación de vacunas y siembra en caldo.

- Prever cubetas autoclavables conteniendo hipoclorito de sodio al 5%, para los frascos de vacunas y tubos.
- Del 1er. tubo de 30 ml extraer 5 ml, colocar en el frasco de vacuna, homogeneizar y devolver en el tubo, repetir la operación retirándose todo el contenido del frasco de vacuna, homogeneizar el contenido del tubo.
- Aspirar 6 ml de suspensión y sembrar 2.5 ml en caldo Tetrionato y 2.5 ml en caldo Selenito luego desechar las pipetas en las cubetas.

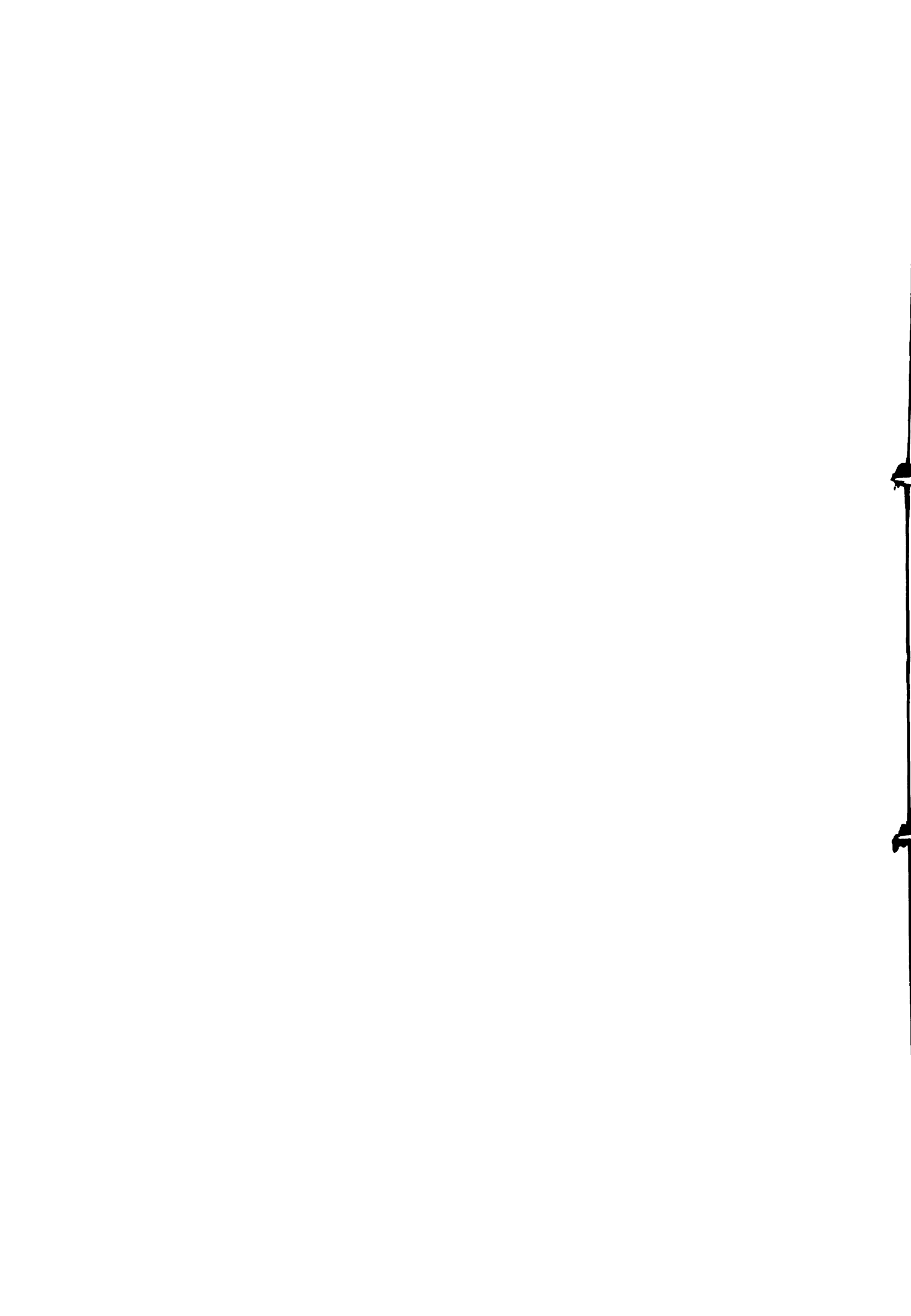


- Con pipetas de 1.0 ml aspirar 0.7 ml de la suspensión y sembrar 0.2 ml en cada tubo de los 2 de Casoy (1 a 22 y otro a 32°C) y 0.2 ml en caldo Saboraud, 0.1 ml de Tioglicolato en profundidad, este medio tiene que ser tratado térmicamente antes (hervir a baño María por 15 minutos). Posteriormente se lleva a hielo se inocula el material en el fondo del medio y se lleva a anaerobiosis.
- Repetir todo el procedimiento desde el 1 hasta el 3 para los demás frascos de la 1° vacuna (10 veces).
- Retirar los estantes y frascos utilizados. Limpiar el flujo con alcohol y colocar material de la 2° vacuna en el flujo y repetir el procedimiento de siembra. Entre la 2° y la 3° vacuna y entre la 4° Y 5° vacuna cerrar las placas de BHI agar, sellarlas, identificarlas (fecha, protocolo, vacuna), Incubando una a 22 grados y otra 32 grados hasta el día de la lectura final. Las dos primeras placas de BHI agar (inoculación de 2 vacunas) expuestas, se identifican como de inicio del test y la 2° (3° y 4° vacuna) como mitad del test y las dos últimas como final.
- Repetir el procedimiento 2, para las 6 muestras de agua. Inocular 0.1 ml de cada una de las cepas, 2 control (positivo) en los respectivos medios, serán dejados 3 tubos sin sembrar, (control negativo)

Las cepas para control positivo son: *Salmonella typhimurium*: C. Selenito y C. Tetracionato, *Escherichia coli*: Casoy, *Candida albicans*: C. Sabouraud, *Bacillus subtilis*: C. Tioglicolato. Incubar el Tetracionato y Selenito a 37°C por 24 horas, continuando después de este periodo, con el test de Salmonella. Incubar los tubos de Casoy a 32 °C por 14 días, el C. Sabouraud y el 2° tubo de C. Casoy de cada vacuna a 22°C por 14 días.

- Vendar los tubos de tioglicolato con parafilm colocando en jarras de anaerobiosis y promover esta con vela. Etiquetar las jarras con número del test fecha, incubar a 37°C por 14 días.
- Será considerado válido, si los tubos controles (+), muestran turbidez, los (-) junto con los controles de frasco de agua no mostraren crecimiento. Anotar los resultados en la ficha del test de esterilidad. **Positivo**: turbidez de los caldos. **Negativo**: ausencia de crecimiento .
- Es considerado *satisfactorio* cuando hay crecimiento en máximo de un frasco de los 10 utilizados en cada serie de caldos e *no satisfactorio* cuando hay crecimiento en dos o más frascos de los diez utilizados en cada serie de caldo; en este caso el test será repetido (retest interno).

Para testar los medios: se conservan tres tubos de cada medio, sin inóculo a temperatura adecuada a ellos y se observa por tiempo adecuado si no verifica crecimiento.



3.2.2 Test de *Salmonella*

Objetivo

Asegurar que las vacunas aviares sean libres de contaminación por Salmonelas, de acuerdo con las exigencias de normas para la producción y control de vacunas aviares

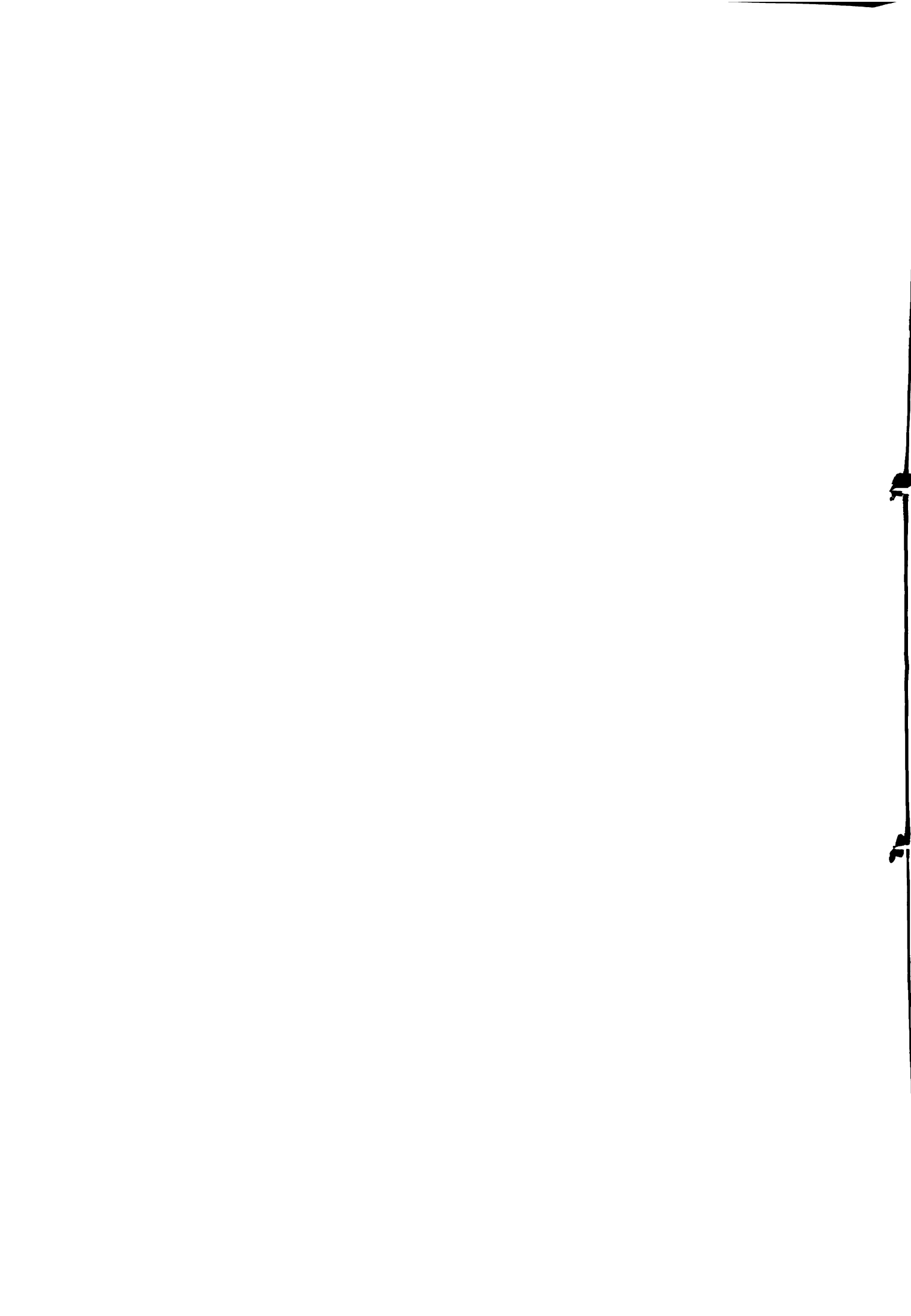
- Se realiza el día siguiente a las otras pruebas. Dividir los medios e identificar las placas de MacConkey y SS de acuerdo con los tubos de Tetrathionato y Selenito; cada tubo deberá ser sembrado en los dos medios.
- Colocar en el flujo correspondiente a la primera vacuna testada en tubos respectivos previamente pulverizado con alcohol y las anzas de platino.
- Homogenizar los tubos, flamear el anza del platino enfriarla y coleccionar el material del tubo, sembrarla en placas correspondientes. Usar un anza de material para cada placa, estriando de manera a obtener colonias de manera aislada. Repetir todo para las demás vacunas.
- Sembrar los controles (-) negativos en C. Tetratinato y Selenito además de los controles (+) positivos; dejar una placa de cada medio sin sembrar, control negativo de medio sólido, e incubar estas a 37°C por 48 horas. Selenito y Tetrathionato autoclavar.
- Será valido el test si dos placas (positivas) mostraren crecimiento típico de Salmonellas y 4 control (negativo) no mostrare crecimiento después del periodo de incubación. Salmonella Shigella agar (SS): *negros*, MacConkey agar: *incoloras*.
- Si ocurriera crecimiento de Salmonellas en las placas se realizarían las siguientes pruebas bioquímicas: TSI, LIA, Ureasa, Motilidad y su posterior diferenciación bioquímica para las *Salmonella qvium*, *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. tiphymurium* y *S. enteritidis*.

3.2.3 Test de Micoplasmosis

Se utilizan 3 (tres) frascos de vacunas del mismo lote y se los siembra en caldos estériles.

Primera etapa

- Se prepara 48 horas antes del test, 1.0 litro de C. Frey, hacer el control de esterilidad del mismo distribuyéndose 9.0 ml en cada uno de los 4 tubos incubados a 37° C, junto a esto dos placas de BHI.
- Al empezar el trabajo abrir las placas conteniendo BHI agar, en el fondo del flujo, uno a cada lado del mismo.



- Identificar los 4 tubos y el Erlenmeyer con el número de registro de la vacuna.
- Distribuir 9.0 ml de C. Frey en cada uno de los tubos y 90 ml de Frey en el Erlenmeyer, resuspender los tres frascos de la primera vacuna con el medio del primer Erlenmeyer, homogenizar.
- Aspirar 5.0 ml de la suspensión de la vacuna y sembrar 1 ml en cada uno de los tubos respectivos
- Incubar en la estufa por 14 días.
- Sembrar en tubos los controles positivos, dejando tres tubos sin sembrar como control negativo.

Segunda etapa. Siembra en placas

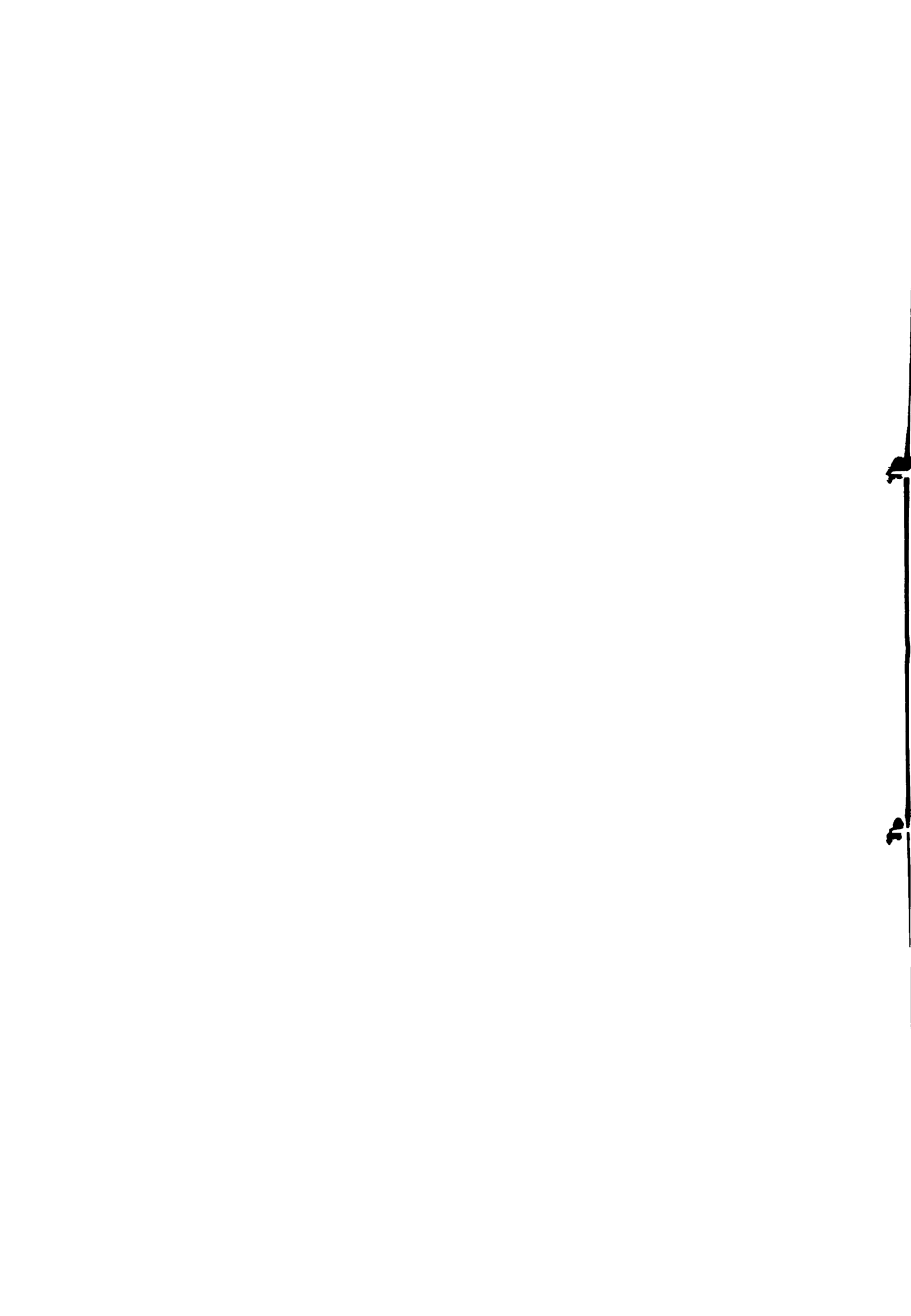
- Realizar las siembras, pasajes en placas a los 3, 7 y 14 días de inoculación de los tubos de la primera etapa, identificar las placas, dejar dos placas sin sembrar, control negativo de medio sólido. Se inocula tres gotas en cada tubo mezclar bien y se lleva a estufa en anaerobiosis por 7 días a 37°C.
- Se realiza la primera lectura del plaqueamiento.
- Segundo plaqueamiento (a los 7 días) de la inoculación si no crecen se eliminan. Tercer plaqueamiento a los 14 días. Cumpliendo los periodos de las placas realizar la lectura correspondiente.
- **Cálculo y validéz del test:** Será válido si la placa de control (+), muestre crecimiento típico en dos placas y control (-) de 4 placas no mostraren crecimiento alguno. La lectura se realiza con estereoscopio y anotando los resultados en la ficha (+) crecimiento de colonias típicas de Micoplasma, redondas, con centro prominentes (aspecto de huevo estrellado, transparente sin refringencia).
- **Negativo:** ausencia de crecimiento
- **Satisfactorio:** Cuando no hay crecimiento de Micoplasma, vacuna aprobada.
- **Insatisfactorio:** Cuando hay aislamiento de Micoplasma: vacuna reprobada, pudiendo ser solicitado el retest, y si vuelve a haber sospecha se solicita la contraprueba.

3.3 Control de Título de las Vacunas

Objetivo

Verificar si estos productos biológicos poseen la cantidad de virus vivo infeccioso mínimo exigido, para tal producto en un volumen, lo cual puede realizarse en dos formas:

- a) *En fresco:* el cual verifica el título de la vacuna en ese mismo instante.



- b) *Estabilidad térmica*: es utilizado para determinar el tiempo de envejecimiento de la vacuna, la vacuna debe ser colocada a 37°C, durante 7 días equivalente a un almacenamiento por dos años a 2-8°C. El título de vacuna para esta prueba es de $10^{-5.5}$ por dosis.

3.3.1 Consideraciones Generales

- Todos los medios utilizados en la prueba deberán ser testados previamente por incubación a 37° C por 24 horas.
- Serán realizados los controles físicos–químicos y bacteriológicos de todos los diluyentes y soluciones utilizados en las titulaciones en el caldo de BHI y utilizados para la prueba huevos libres de patógenos específicos o SPF (specific pathogen free) embrionados de 9-11 días de incubación.
- Serán utilizados en el test 3 frascos de vacuna a virus vivo atenuado y 6 frascos en el retest y contraprueba.
- El cálculo de titulación se realizará por dos métodos del punto final 50% y el Método de Spearman-Kärber.

Titulación por el método del punto final 50%

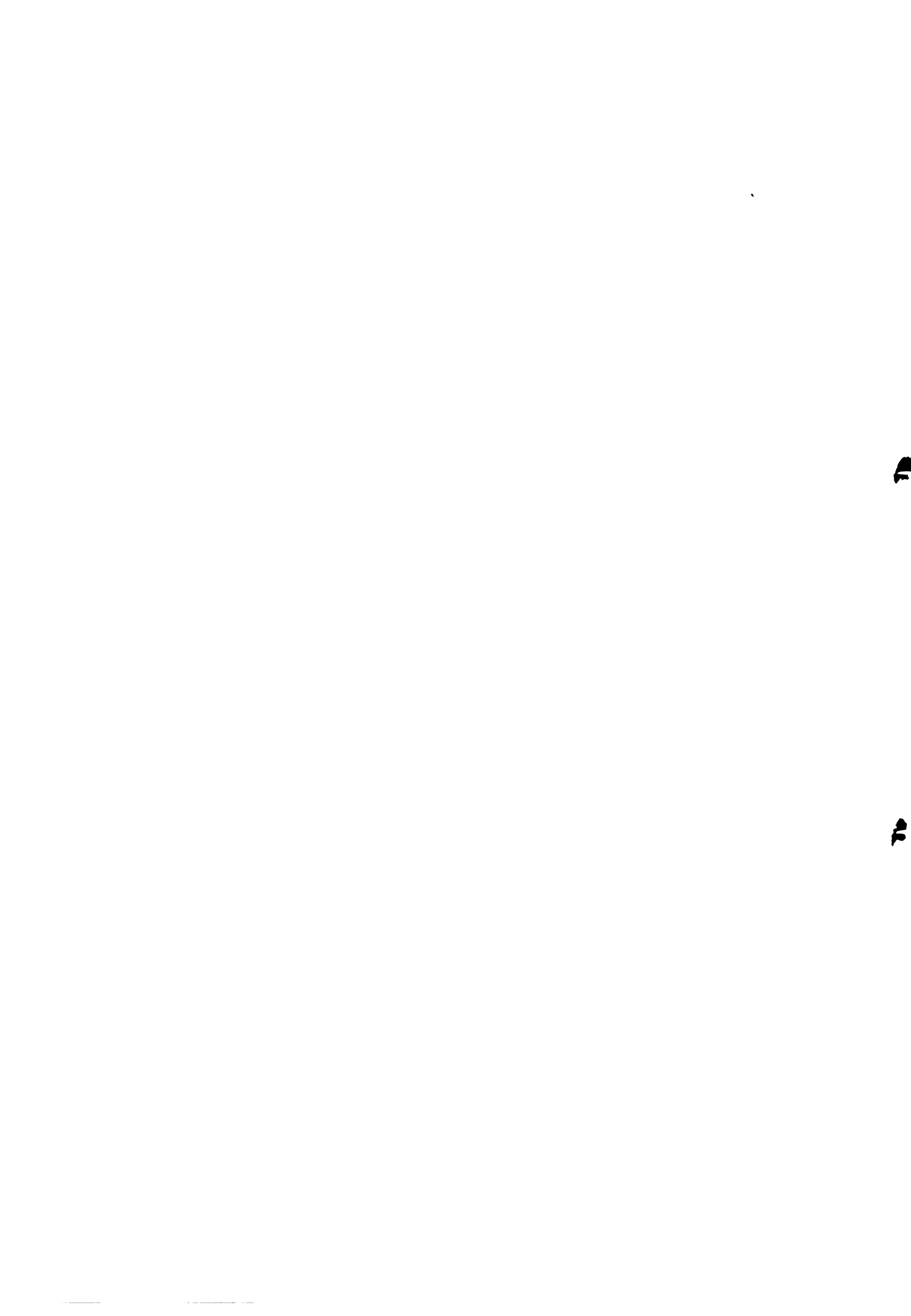
Tiempo atrás, inclusive antes de la utilización del método de placa, pocks o tumor, la dilución límite de virus que mataba o infectaba al 100% de los elementos inoculados, se denominaba Dosis Infecciosa Mínima o Dosis Mínima Letal, siendo éste un valor de referencia muy impreciso porque a mayor concentración viral ya que la estimación es más correcta al utilizar como datos de referencia para el cálculo aquellos valores mayores y menores del 50% en vez de tomar el valor límite del 100%.

Este tipo de análisis se basa en la estimación del número de respuestas positivas sobre el total de respuestas posibles, utilizando un cálculo estadístico que determina la cantidad de dosis infectantes contenidas en el inóculo.

El virus a estudiar se inocula en diluciones a su respectivo hospedador como ratas, ratones, embrión de pollo, cultivo celulares, etc. El criterio a ser aplicado para realizar las lecturas es:

- Muerte o enfermedad del animal, embrión o cultivo.
- Degeneración del embrión o cultivo celular.
- Multiplicación del virus a punto tal de ser reconocido por un método in vitro (ej: hemoaglutinación positiva).

Las diluciones menores de virus contendrán más dosis infectantes que las mayores y entre ellas habrá un gradiente de actividad. Se necesita entonces, determinar el 50% de actividad y tomarla como dosis infectante 50%.



El título es la inversa de aquella dilución a la cual reacciona, estadísticamente, la mitad de los sujetos infectados o unidades reveladoras.

El método más comúnmente utilizado para la interpolación del Punto Final 50% es el Método de Reed y Muench. Su valor estadístico está dado por el aumento del número de repeticiones que se obtiene por el cómputo de los valores acumulativos de las respuestas positivas o negativas.

Los resultados deben expresarse de acuerdo al método utilizado y sólo podrán ser reproducibles siempre que se use el mismo método y el mismo sistema, el que deberá ser referido en el resultado, ej: Dosis letal ratón 50%; Dosis infecciosa pollo 50%; Dosis paralizante ratón 50%; Dosis letal embrión de pollo 50%; Dosis infectante cultivo de tejido 50%; etc.

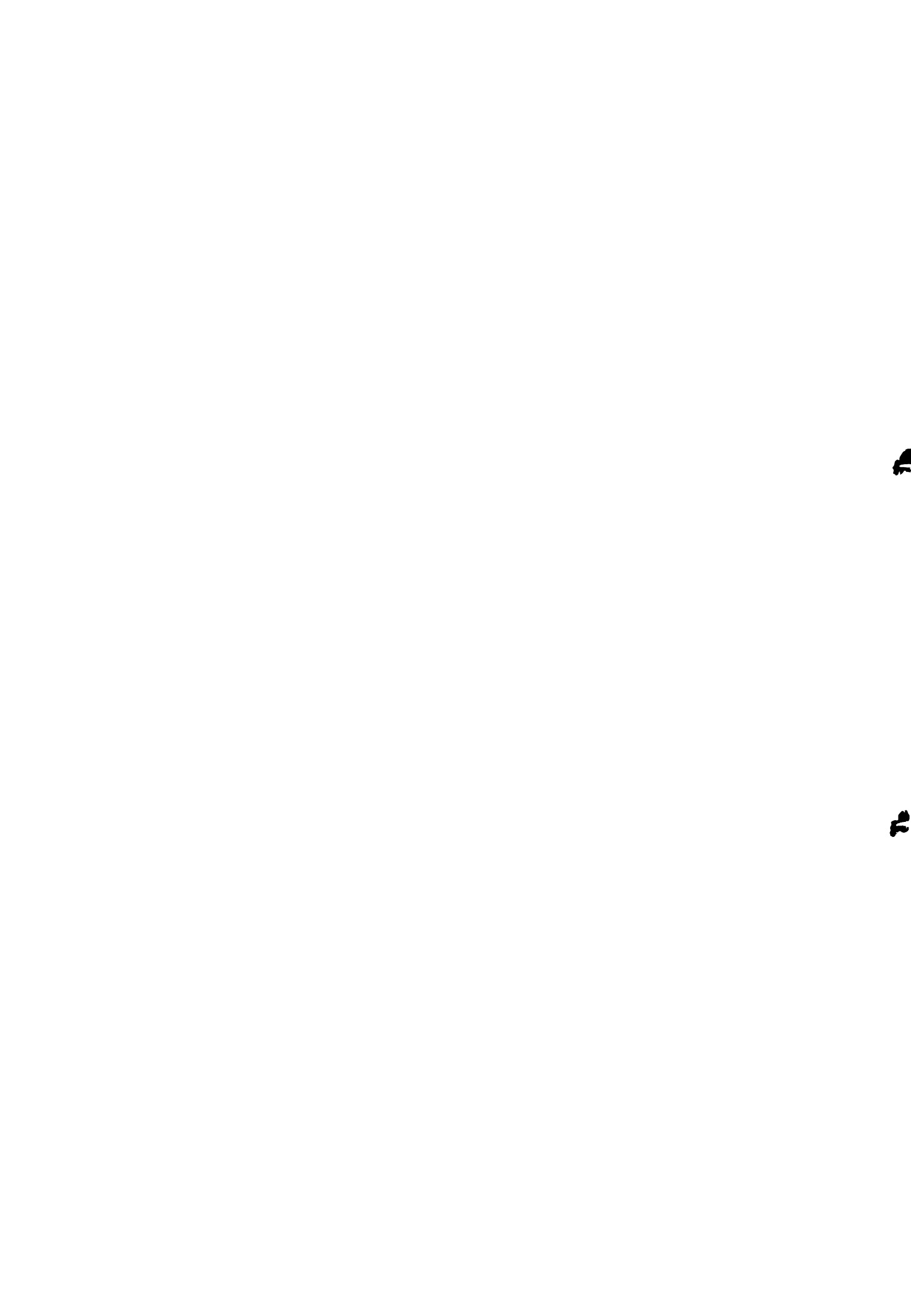
Resumen: El punto final 50% en la titulación de una suspensión viral, es la dilución de virus que produce el 50% de efectos positivos.

Materiales

- Suspensión viral a titular
- Tubos para diluciones
- Pipetas
- Microplacas para cultivos celulares
- Solución tripsina/EDTA
- Medio de cultivo

Método

- Realizar las diluciones virales desde diez a la menos uno a la diez a la menos ocho.
- Sembrar por quintuplicado, 0.05 ml. de cada dilución por pocillo.
- Tripsinar las células.
- Resuspender las células en concentración adecuada y agregar 0.1 ml. por pocillo.
- Incubar en estufa de CO₂
- Observar diariamente y realizar la lectura final.



	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9
A	+	+	+	+	+	+	-	-	
B	+	+	+	+	+	-	-	-	
C	+	+	+	+	+	-	-	-	
D	+	+	+	+	-	-	-	-	
E	+	+	+	+	-	-	-	-	
F									
G									

N° +	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	1/5	0/5	0/5	
N° -	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	4/5	5/5	5/5	

Frec. Acum. + ←	24	19	14	9	4	1	0	0	
Frec. Acum. - →	0	0	0	0	2	6	11	16	

24/24	19/19	14/14	9/9	4/6	1/7	0/11	0/16
100%	100%	100%	100%	66%	14%	0%	0%
					↑		
					50%		

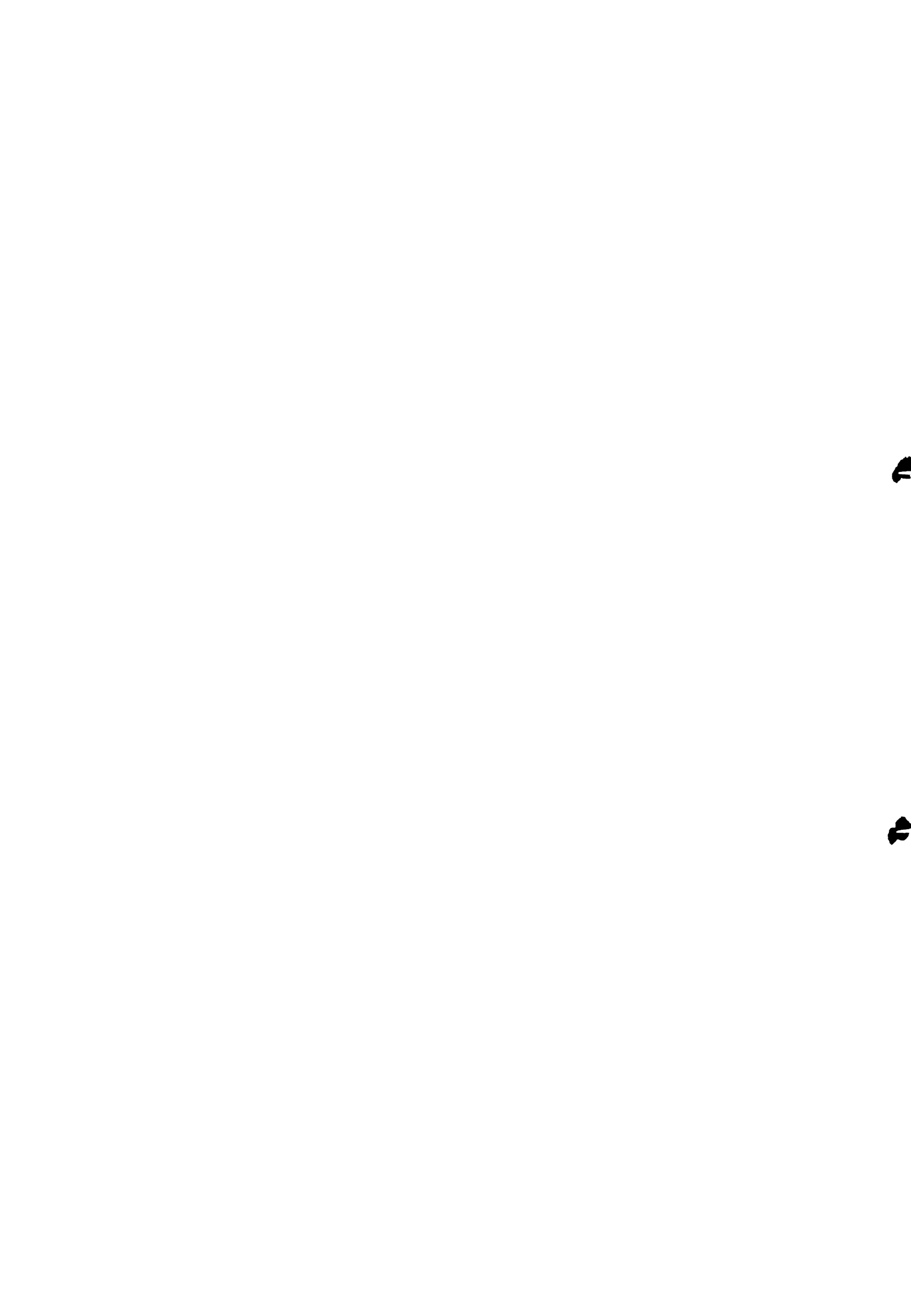
El punto final 50% del virus está en una dilución más alta de 10^{-5} pero más baja de 10^{-6} .

Se debe entonces interpolar la Distancia proporcional a la que se estima que debe estar el punto final 50% entre estas dos diluciones:

$$\frac{(\% \text{ de POSITIVOS más próximo por } \uparrow 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positivos más próximos por } \uparrow 50\%) - (\% \text{ positivos más próximo por } \downarrow 50\%)}$$

$$\frac{66 - 50}{66 - 14} = 0.3$$

Luego debe corregirse la Distancia proporcional por el factor de dilución, que es logaritmo de los incrementos utilizados en la dilución. En este caso las diluciones varían en 10 veces, el factor es 1 ($\log_{10} = 1$).



Como en esta operación, el factor se supone como Negativo, por lo tanto el log. Negativo de DL₅₀ es igual al Log negativo de la dilución por encima del 50% de Positivos más la Distancia proporcional.

En el ejemplo:

$$\begin{array}{l} \text{Log. Negativo de la dilución por arriba del 50\% de Positivos} = -5 \\ \text{Dist. Proporcional (0.3) x Factor de dilución (log. 10=1)} = \frac{-0.3}{-5.3} = 0.3 \\ \text{Logaritmo del Título DL 50\%} = -5.3 \end{array}$$

Es decir que en la dilución -5.3 tenemos 1DL 50%

Antilogaritmo del recíproco del punto final 50% ----
(número de DL 50 contenidas en el inóculo)

$$\begin{array}{l} -5.3 \\ \text{Título DL 50\%/x ml} = 10 \end{array}$$

Cálculo por el Método de Spearman-Kärber

$$\text{Log. del punto final 50\%} = m - fd (S - 0.5)$$

m = log. de la dilución que contiene mayor concentración de virus

fd = log. del factor de dilución

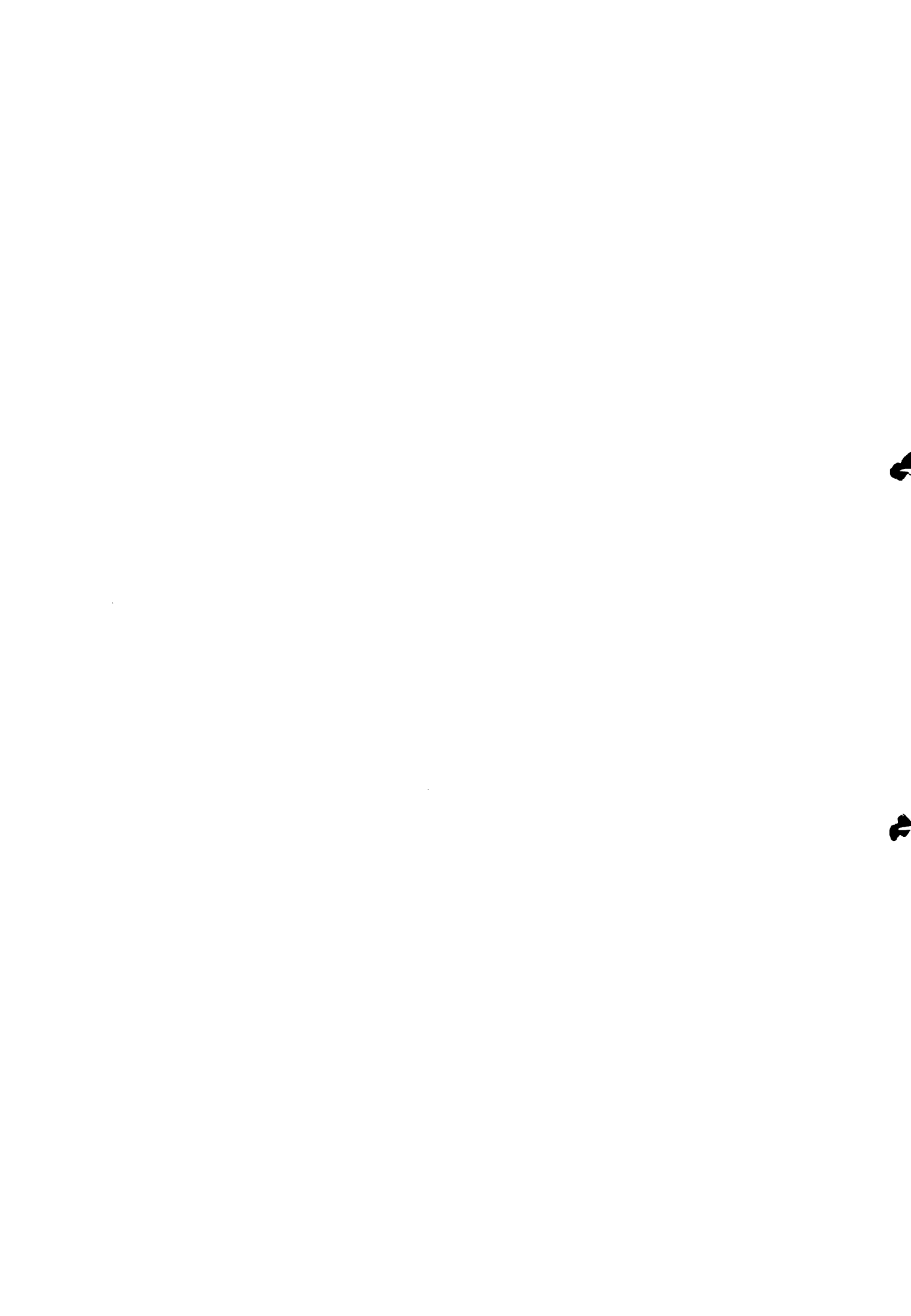
$$S = \frac{\text{suma de los porcentajes a cada dilución}}{100}$$

0.5 = constante usada en todos los casos

De acuerdo al cuadro de datos del ejemplo de Reed y Muench

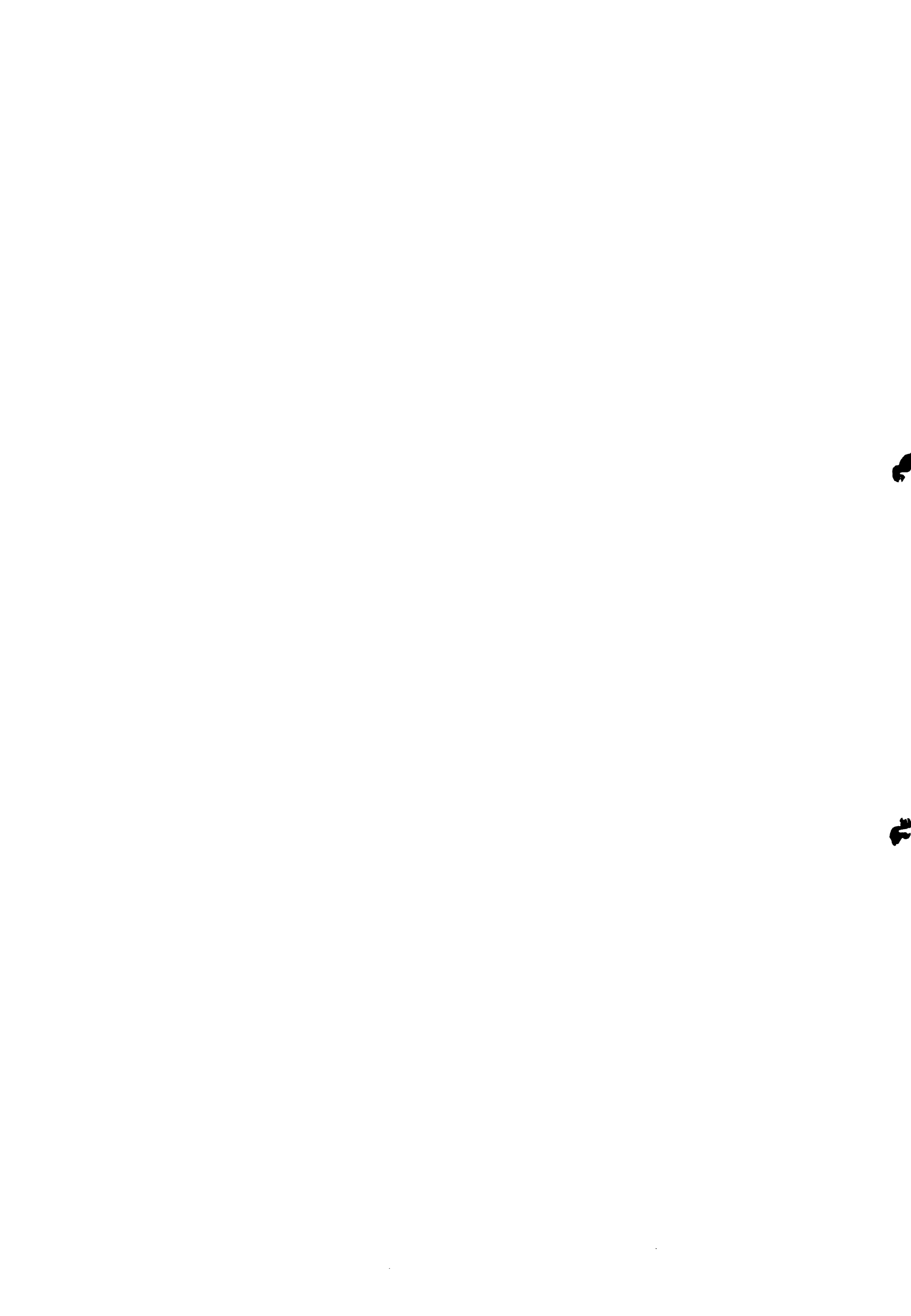
$$\begin{array}{l} -4 - (+1) \frac{(100 + 66 + 14 + 0 - 0.5)}{100} = \\ 4 - (+1) (1.8 - 0.5) = \\ -4 - 1 (1.3) = \\ -4 - 1.3 = -5.3 \end{array}$$

Log del título del virus en la suspensión original = 5.3



4. LITERATURA CONSULTADA

- **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.** 1980. Colección FAO: Producción y Sanidad Animal No. 10. Por W.H.Allan *et al.* *Vacunas contra la Enfermedad de Newcastle. Su Producción y Empleo.*
- **SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (SENASA).** 1996. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y alimentación. Dirección de Laboratorios y Control Técnico. *Manual de Procedimientos Técnicos para el Diagnóstico de la Enfermedad de Newcastle y Mycoplasmosis Aviar.*





GRAFIR. S.A
INDEPENDENCIA NACIONAL 1.525
TEL./FAX.: (595 - 21) 373 153

