

CAPÍTULO 3.1.4.

BRUCELOSIS (BRUCELLA ABORTUS, B. MELITENSIS Y B. SUIS) (INFECCIÓN POR B. ABORTUS, B. MELITENSIS Y B. SUIS)

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: *Brucelosis es la denominación genérica de las infecciones, animales o humanas, causadas por cualquier especie del género Brucella, principalmente Brucella abortus, B. melitensis y B. suis. En el ganado bovino, la infección por Brucella suele deberse a B. abortus, menos frecuentemente a B. melitensis y en ocasiones a B. suis. Brucella melitensis es el principal agente causal de la infección por Brucella en ovejas y cabras. La infección por Brucella en cerdos se debe a las biovariedades 1-3 de B. suis, pero la enfermedad causada por la biovariedad 2 difiere en cuanto a gama de hospedadores, a la distribución geográfica, que es limitada, y a la patogenicidad. En algunas zonas, la infección por B. suis se ha establecido en jabalíes. Clínicamente, la enfermedad se caracteriza por uno o más de los siguientes signos: aborto, retención de placenta, orquitis, epididimitis y, en ocasiones muy infrecuentes, artritis, con excreción de los microorganismos en las secreciones uterinas y en la leche. El diagnóstico definitivo solo puede realizarse a partir del aislamiento de Brucella procedente de los abortos, de las secreciones de la ubre y de los tejidos tomados en el examen postmórtem. Brucella abortus, B. melitensis y B. suis son muy patógenos en el ser humano, de tal forma que los tejidos, cultivos o materiales que puedan estar contaminados deben manipularse en las condiciones de contención correspondientes.*

Identificación del agente: *La evidencia de Brucella la proporciona la observación de microorganismos de tipo Brucella en material abortado o en secreciones vaginales mediante la tinción con la técnica ácido alcohol resistente modificada, sobre todo si está respaldada por pruebas serológicas, y se considera provisional. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye un medio de detección de ADN de Brucella en una muestra. Cuando sea posible, se debe aislar Brucella spp. cultivando muestras de secreciones uterinas, fetos abortados, secreciones de las ubres o tejidos específicos, como ganglios linfáticos u órganos reproductores masculinos o femeninos. Las especies y biovariedades deben identificarse mediante fagolisis y según criterios de cultivo, bioquímicos y serológicos. La PCR puede constituir un método complementario tanto de identificación como de tipificación basado en secuencias específicas del genoma.*

Pruebas de inmunidad humoral y celular: *Las pruebas con el antígeno tamponado de Brucella, es decir, la prueba con rosa de bengala y la prueba de aglutinación en placa con antígeno tamponado, así como la fijación del complemento, el enzoinmunoanálisis (ELISA) o el ensayo de polarización de la fluorescencia, son pruebas adecuadas tanto para analizar rebaños/manadas como animales específicos, ya sean pequeños rumiantes, camélidos o bovinos (ganado bovino o búfalos). Sin embargo, ninguna prueba serológica es adecuada por sí sola para todas las especies animales ni para todas las situaciones epidemiológicas, y algunas no son adecuadas para el diagnóstico de la brucelosis porcina. Por lo tanto, la reactividad de las muestras que dan positivo en las pruebas de cribado debe comprobarse utilizando un sistema confirmativo y/o complementario establecido. El ELISA indirecto o la prueba del anillo de leche, realizadas con muestras de leche de tanque, son eficaces para el cribado y el control de la brucelosis en las vacas lecheras. Y la prueba de la brucelina cutánea puede emplearse en rumiantes y cerdos no*

vacunados, ya sea a modo de cribado o de prueba confirmativa a nivel de rebaño cuando surgen positivos en las pruebas serológicas en ausencia de factores de riesgo evidentes.

Requisitos para las vacunas y el material biológico de diagnóstico: La cepa 19 de *Brucella abortus* y la cepa Rev.1 de *B. melitensis* continúan siendo los microorganismos vacunales de referencia para el control de las infecciones por *Brucella* en ganado bovino y en ganado ovino y caprino, respectivamente, con las que deben compararse otras vacunas. Ambas deben prepararse a partir de cultivos de inóculo suficientemente derivados. En algunos países, la vacuna preparada con la cepa rugosa de *B. abortus* RB51 también se ha convertido en la vacuna oficial para la prevención de la infección por *B. abortus* en ganado bovino. Para el control de la infección por *Brucella* en cerdos no existe ninguna vacuna adecuada. Las preparaciones a base de brucelina deben estar libres de lipopolisacárido liso, y los antígenos para las pruebas serológicas deben prepararse a partir de la cepa lisa de *B. abortus* 1119-3 o 99 y, en el caso del ELISA indirecto, también a partir de la cepa lisa de *B. melitensis* 16M. Tanto las vacunas como las preparaciones a base de brucelina deben cumplir con la normativa correspondiente.

A. INTRODUCCIÓN

Brucelosis es el nombre genérico que se aplica a las infecciones, humanas o animales, causadas por distintas especies del género *Brucella*, principalmente *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*. La infección de ganado ovino por *B. ovis* se describe por separado en el Capítulo 3.7.7 *Epididimitis ovina* (*Brucella ovis*).

Agentes patógenos causales: La evidencia genética e inmunológica indica que todos los miembros del género *Brucella* están estrechamente relacionados. Sin embargo, teniendo en cuenta que existen diferencias relevantes entre las principales variantes en cuanto al tipo de hospedador y a la epidemiología, así como evidencias moleculares de variaciones genómicas, el Comité Internacional de Sistemática de Procariotas, Subcomité de Taxonomía de *Brucella*, adoptó en 2005 una decisión firme sobre el retorno a las posiciones anteriores a 1986 en lo relativo a la taxonomía de *Brucella*; la consecuencia de ese posicionamiento es la reaprobación de las seis especies tipo de *Brucella* con sus biovariedades reconocidas. Los nombres clásicos relacionadas con las seis especies tipo de *Brucella* están publicados en las Listas Autorizadas de Nombres de Bacterias de 1980, y las cepas típicas designadas aparecen asociadas a esos nombres publicados y validados: *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*¹. Las tres primeras se subdividen en biovariedades por sus características de cultivo y serológicas (véanse las Tablas 2 y 3). En la última década se han aislado cepas de *Brucella* de mamíferos marinos que no pueden adscribirse a ninguna de las especies ya reconocidas. Hay estudios en curso destinados a establecer su posición en la taxonomía de este género y se ha propuesto que podrían clasificarse en dos nuevas especies, *B. ceti* y *B. pinnipedialis*. Recientemente se ha aislado una nueva cepa, denominada *Brucella microti*, en el topillo campesino (*Microtus arvalis*) y en zorros y suelo de Europa Central (Scholz *et al.*, 2008). También se han descrito por primera vez ciertas cepas aisladas de infecciones humanas de implantes mamarios y de pulmón, aunque todavía no está claro cuál es el reservorio natural de las mismas. Aunque solo se han descrito dos cepas de cada nuevo tipo, formalmente se han publicado como décima y onceava especies de *Brucella*, *B. inopinata* y *B. papionis*, respectivamente (Scholz *et al.*, 2010; Whatmore *et al.*, 2014). Por último, las cepas aisladas de roedores, zorros y ranas se han caracterizado como cepas atípicas de *Brucella* claramente diferenciables de las especies descritas actualmente, pero todavía no se han aprobado como nuevas especies de *Brucella*.

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

1. Descripción de la enfermedad

1.1. Infección por *Brucella* en ganado bovino

La infección por *Brucella* en ganado bovino suele estar causada por biovariedades (bv.) de *Brucella abortus*. En algunos países, sobre todo del sur de Europa, África y Asia occidental, en los que el ganado bovino se cría en estrecha relación con ganado ovino o caprino, la infección también puede deberse a *B. melitensis* (Verger, 1985). En ocasiones, *B. suis* puede causar una infección crónica de la glándula mamaria del ganado bovino, pero no se ha observado que cause aborto ni que se

1 <http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>

transmita a otros animales. La infección por *Brucella* en ganado bovino se transmite a nivel mundial, pero varios países del norte y centro de Europa, así como Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda se consideran libres tanto de *B. abortus* como de *B. melitensis*.

Esta enfermedad suele ser asintomática en animales de corta edad y en hembras no gestantes. Tras la infección por *B. abortus* o *B. melitensis*, las hembras adultas gestantes presentan placentitis, que suele dar lugar a aborto entre el quinto y el noveno mes de gestación. Incluso en ausencia de aborto, en la placenta, los líquidos fetales y las secreciones vaginales se produce una profusa excreción del microorganismo. La glándula mamaria y los ganglios linfáticos relacionados también pueden resultar infectados, y es posible que se excreten microorganismos con la leche. Las siguientes gestaciones suelen llegar a término, pero la infección uterina y mamaria reaparece, con cantidades bajas de microorganismos tanto en los productos del parto como en la leche. En las infecciones agudas, el microorganismo se encuentra presente en la mayoría de ganglios linfáticos principales del organismo. Los bovinos macho adultos pueden presentar orquitis/epididimitis y la brucelosis puede ser una causa de infertilidad en ambos sexos. Los higromas, que suelen afectar a las articulaciones de las extremidades, son un signo frecuente en caso de brucelosis en algunos países tropicales y pueden ser el único indicador manifiesto de infección; el líquido de los higromas suele estar infectado por *Brucella*.

1.2. Infección por *Brucella* en ovejas y cabras

La infección por *Brucella* en ovejas y cabras (excepto la infección por *B. ovis*) está causada principalmente por las biovariedades de *B. melitensis*. En ovejas y cabras se han observado infecciones esporádicas causadas por *B. abortus* o *B. suis*, pero estos casos son extremadamente infrecuentes. La infección por *Brucella* en ovejas y cabras es endémica en la región del Mediterráneo, pero se dan casos en todo el mundo. América del Norte (excepto México) se considera libre del agente, del mismo modo que el norte y el centro de Europa, el sudeste asiático, Australia y Nueva Zelanda. Patológica y epidemiológicamente, la infección por *B. melitensis* en ovejas y cabras es muy similar a la infección por *B. abortus* en ganado bovino. En la mayoría de los casos, las vías principales de transmisión de *Brucella* son la placenta, los líquidos fetales y las secreciones vaginales expulsadas por las ovejas y cabras infectadas, ya sea al abortar o al parir a término. La expulsión de *Brucella* también es frecuente en las secreciones de la ubre y en el semen, y puede aislarse *Brucella* de distintos tejidos, como los ganglios linfáticos de la cabeza, el bazo y los órganos asociados a la reproducción (útero, epidídimo y testículos), así como de lesiones artríticas (Alton *et al.*, 1988).

1.3. Infección por *Brucella* en cerdos

La infección por *Brucella* en cerdos está causada principalmente por las biovariedades 1, 2 o 3 de *B. suis*. En cerdos también se han observado infecciones esporádicas por *B. abortus* o *B. melitensis*, pero estos casos son muy infrecuentes. La enfermedad tiene lugar en muchos países en los que se crían cerdos. En general, la prevalencia es baja, pero en algunas regiones, como América del Sur o el sudeste asiático, la prevalencia puede ser mucho más alta. En algunos países, la brucelosis porcina puede ser un problema grave, aunque actualmente no reconocido. Se ha observado infección por la bv 1 de *Brucella suis* en jabalíes de algunos estados del sur de EE.UU., así como de Queensland (Australia) y de otros países de Oceanía. En estos países, se han documentado varias infecciones humanas en personas que practicaban la caza y manipulaban material obtenido de jabalíes. En general, la enfermedad se transmite por la ingesta de alimento contaminado por productos del parto o de un aborto, o bien por secreciones uterinas. Los cerdos se comen de inmediato los fetos abortados y las membranas fetales. La transmisión durante la copula también es frecuente, y la excreción de *B. suis* en el semen tiene implicaciones para el personal que lleva a cabo la inseminación artificial. En los cerdos, como en los rumiantes, tras la bacteriemia inicial, *B. suis* coloniza las células del tracto reproductor de ambos sexos. En las hembras, resultan invadidas la placenta y los fetos, mientras que en los machos la invasión tiene lugar en uno o más de los siguientes tejidos: testículos, próstata, epidídimo, vesículas seminales o glándulas bulbouretrales. En los machos, las lesiones, que suelen ser unilaterales, empiezan con una hiperplasia que puede avanzar a absceso; la fase final se caracteriza por esclerosis y atrofia. Pueden aparecer artritis en varias articulaciones, y a veces tiene lugar una espondilitis. En las cerdas, el signo más frecuente de brucelosis es el aborto en cualquier momento de la gestación, aunque es más habitual entre los días 50 y 110. La secreción vaginal no suele ser evidente y, en los rebaños infectados de forma crónica, el signo clínico más relevante es la infertilidad, no el aborto. En los machos, la brucelosis tiene más probabilidades de ser persistente, y ocasiona lesiones en el tracto genital que a menudo dan lugar a una interferencia con la actividad sexual, que puede ser temporal o irreversible. El verraco puede excretar *Brucella* con el semen sin ninguna anomalía aparente en los órganos sexuales ni interferencia con la actividad sexual. En ambos sexos puede aparecer una tumefacción articular y de las vainas de los tendones, cojera y, en ocasiones, parálisis posterior. Un porcentaje considerable tanto de cerdos como de cerdas se recupera de la infección, a menudo en un plazo máximo de 6 meses, pero muchos quedar infectados de por vida (Olsen *et al.*, 2012).

La infección causada por la bv 2 de *B. suis* difiere de la causada por la bv 1 y la bv 3 en cuanto a la gama de hospedadores, la distribución y la patogenicidad. Históricamente, la distribución geográfica de la bv 2 de *B. suis* ha sido un amplio territorio situado entre Escandinavia y los Balcanes. La prevalencia en jabalíes parece ser alta en toda Europa continental (EFSA, 2009). En los brotes de Europa, los jabalíes intervienen como fuente de transmisión de la bv 2 a cerdos criados en el exterior, y se consideran el principal reservorio salvaje de esta infección (EFSA, 2009). La bv 2 de *Brucella suis* causa lesiones miliare, sobre todo en tejidos reproductivos, que a menudo se vuelven purulentas. Hasta la fecha, la bv 2 se ha documentado en muy pocos casos como causa de brucelosis humana. No obstante, sí se han observado infecciones por la bv2 en cazadores con inmunocompromiso que hayan estado excesivamente expuestos debido a prácticas como el destripado y despellejado de jabalíes o liebres. Asimismo, en ganado bovino y ovino de Europa expuesto a jabalíes infectados, se han observado casos, aunque muy infrecuentes, de infección por la bv 2 de *B. suis* sin signos clínicos.

1.4. Infección por *Brucella* en otras especies: domésticas, salvajes en cautividad o salvajes en libertad

Se ha observado infección por *B. abortus* y *B. melitensis* en el dromedario (*Camelus dromedarius*) y en el camello (*C. bactrianus*), así como en camélidos de América del Sur: la llama (*Lama glama*), la alpaca (*Lama pacos*), el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*), y se ha relacionado con el contacto con rumiantes grandes y pequeños infectados por *B. abortus* y *B. melitensis*.

Asimismo, se ha observado brucelosis en el búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*), el bisonte americano y el europeo (*Bison bison* y *B. bonasus*, respectivamente), el yak (*Bos grunniens*), el elk/wapiti (*Cervus elaphus*), el búfalo africano (*Syncerus caffer*) y varias especies de antílopes de África. Los signos clínicos de brucelosis en estos animales son similares a los que se observan en el ganado bovino, ovino y caprino.

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

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

Además del jabalí, la liebre común europea (*Lepus europaeus*) también se considera reservorio de la bv 2 de *B. suis* y se ha observado que interviene como posible fuente de transmisión al ganado doméstico. En la liebre común europea, la enfermedad se caracteriza por la formación de nódulos, de tamaños variables comprendidos entre el de una semilla de mijo y el de una cereza o incluso mayor; a menudo se vuelven purulentos. Estos nódulos pueden tener lugar en casi cualquier lugar, a veces en el tejido subcutáneo o intramuscular, en el bazo, el hígado o los pulmones y en los órganos reproductivos de ambos sexos. La condición corporal de la liebre puede quedar sorprendentemente intacta. Otras especies también pueden resultar infectadas por cohabitación con cerdos, jabalíes o liebres infectados por la bv 2 de *B. suis*. El destripado o despellejado de jabalíes en explotaciones bovinas podría ser una vía de transmisión al ganado bovino.

La bv 4 de *Brucella suis* causa una zoonosis grave en renos salvajes o domesticados (*Rangifer tarandus* y sus distintas subespecies) en toda la región del Ártico, incluidos Siberia, Canadá y Alaska. *Rangifer tarandus* es muy susceptible a la infección por *B. suis*, que causa fiebre, abatimiento y distintos signos locales, como aborto, retención de placenta, metritis, a veces con secreciones

sanguinolentas, mastitis, bursitis y orquitis. La transmisión al ser humano puede tener lugar por contacto directo o por el consumo de leche cruda u otros productos cocidos de manera insuficiente procedentes del reno, especialmente la médula ósea.

1.5. Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad

La infección por *Brucella* es fácilmente transmisible al ser humano, en el que causa un proceso febril (fiebre ondulante) que puede avanzar a una forma más crónica y también producir complicaciones graves que afecten a los sistemas musculoesquelético y cardiovascular y al sistema nervioso central. Deben aplicarse medidas de precaución para prevenir la infección humana. La infección se contrae básicamente por vía oral, respiratoria o conjuntival, pero la ingesta de productos lácteos crudos constituye el principal riesgo para el público general en los lugares en los que la enfermedad es endémica. Existe un riesgo ocupacional en veterinarios, trabajadores de mataderos y ganaderos que manipulen animales/canales infectados y fetos abortados o placentas. La brucelosis también es una de las infecciones de laboratorio más fáciles de contraer, y todas las manipulaciones de laboratorio relacionadas con cultivos vivos o material que pueda estar infectado o contaminado deben realizarse a un nivel de bioseguridad y contención adecuado, que se determinará a partir de un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4. *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). Se han realizado recomendaciones específicas relativas a las precauciones en materia de bioseguridad que deben aplicarse con los materiales infectados por *Brucella* (se ofrece más información en Alton *et al.*, 1988; Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis, 1986; OMS, 1953; OMS, 2004; Capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico*).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de infección por *Brucella abortus*, *melitensis* o *suis*

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

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales concretos ^a	Contribuir a las políticas de erradicación ^b	Confirmar casos clínicos sospechosos ^c	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia en el rebaño/manada	Determinar el estado inmunitario en animales concretos o en poblaciones tras la vacunación
Pruebas en leche de tanque ^f I-ELISA con leche o prueba del anillo de leche	+++	–	+++	+	+++	n/a

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método adecuado; + = puede utilizarse en ciertas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan su aplicación; – = no adecuado para esta finalidad; n/a = no aplicable.

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

^aSolo aplicable a rebaños/manadas, países o zonas libres de infección por *Brucella*.

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

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

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

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

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

^dEs posible que se obtengan falsos positivos.

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

^fSolo ganado lechero.

Todos casos de aborto u orquitis del ganado bovino, ovino y caprino, así como porcino, deben considerarse sospechosos de brucelosis y deben estudiarse teniendo en cuenta los antecedentes del rebaño/manada y enviando muestras al laboratorio. El cuadro clínico no es patognomónico, de tal forma que el diagnóstico definitivo de infección por *Brucella* solo puede realizarse a partir del aislamiento e identificación de *Brucella*, pero en situaciones en las que no es posible el análisis bacteriológico, el diagnóstico debe basarse en los métodos serológicos.

1. Identificación del agente

No existe ninguna prueba que por sí sola permita identificar de forma definitiva una bacteria como *Brucella*. Así, para una identificación definitiva, es necesario aplicar una combinación de métodos basados en las características de crecimiento, serológicas, bacteriológicas o moleculares (Alton *et al.*, 1988; Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis, 1986).

Todas las muestras de casos sospechosos deben enfriarse de inmediato una vez obtenidas y transportarse al laboratorio por el medio más rápido. Si el transporte va a durar más de 12 horas, todas las muestras excepto los hisopos vaginales deberán congelarse. Al llegar al laboratorio, las muestras que no deban cultivarse de inmediato deberán congelarse (Alton *et al.*, 1988). En todos los casos, cuanto menos dure el transporte y el periodo de conservación, mayor será la probabilidad de aislar *Brucella*, especialmente cuando la cantidad inicial de *Brucella* en la muestra sea baja. No se ha demostrado que ningún medio de transporte específico mejore la supervivencia de *Brucella* en las muestras obtenidas de animales.

1.1. Métodos de tinción

El género *Brucella* está formado por cocobacilos o bacilos cortos que miden 0,6–1,5 µm de largo por 0,5–0,7 µm de ancho. Normalmente aparecen aislados, y con menos frecuencia en pares o en grupos pequeños. La morfología de los microorganismos del género *Brucella* es bastante constante, aunque en cultivos viejos se pueden observar formas pleomórficas. *Brucella* no es una bacteria móvil. No

forma esporas ni produce flagelos, fimbrias ni cápsulas verdaderas. Los microorganismos del género *Brucella* son gramnegativos y no suelen mostrar tinción bipolar. Resisten al cambio de color por ácidos débiles y, por lo tanto, se tiñen de rojo mediante el método de Ziehl–Neelsen modificado por Stamp (Alton *et al.*, 1988). Con este método, en frotis de órganos o de líquidos biológicos fijados previamente con calor o con etanol, *Brucella* se tiñe de rojo sobre un fondo azul. También puede utilizarse una técnica basada en anticuerpos conjugados a un fluorocromo o marcados con peroxidasa. La presencia de microorganismos intracelulares con morfología de *Brucella*, débilmente resistentes a ácidos, o inmunoespecíficamente teñidos, constituye un indicio preliminar de brucelosis. Sin embargo, estos métodos no son factibles o presentan una baja sensibilidad en la leche y en productos lácteos, donde los microorganismos del género *Brucella* se presentan a menudo en escaso número, y donde la presencia de glóbulos de grasa a menudo impide una interpretación correcta. En la interpretación de los resultados positivos por el método de Stamp hay que proceder con prudencia, puesto que en estas preparaciones, otros microorganismos que también causan aborto, como *Chlamydophila abortus* o *Coxiella burnetii* pueden ser difíciles de diferenciar de *Brucella*. Los resultados, tanto positivos como negativos, deben confirmarse por cultivo.

Para poner de manifiesto el agente en diversas muestras biológicas, también se pueden utilizar métodos directos basados en sondas de ADN o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Bricker, 2002; Whatmore y Gopaul, 2011), pero por el momento, la sensibilidad y la especificidad de estos sistemas siguen siendo menores que las de la bacteriología clásica. No obstante, algunas de estas pruebas moleculares facilitan la identificación definitiva y la tipificación de las cepas de *Brucella* aisladas (véase el apartado B.1.4).

1.2. Obtención y cultivo de las muestras

El aislamiento bacteriológico es lento, caro y engorroso, pero para confirmar la enfermedad y determinar qué especies/biovariedades de *Brucella* la están causando debe realizarse siempre que sea posible. Aunque a menudo se considera insensible, puede ser efectivo cuando se optimiza el tipo y número de muestras, la forma de conservación, la cantidad sembrada y los medios de cultivo utilizados.

1.2.1. Medios basales

El aislamiento y cultivo directo de *Brucella* suelen realizarse en un medio sólido. En general, este representa el método más satisfactorio porque permite aislar y reconocer claramente las colonias. Los medios sólidos también limitan el establecimiento de mutantes no lisos y el desarrollo excesivo de contaminantes. Sin embargo, en el caso de muestras voluminosas o cuando se pretenda lograr un enriquecimiento, puede recomendarse el empleo de medios líquidos. Existe una gran variedad de medios basales deshidratados a nivel comercial, como la base de medio para *Brucella*, o el agar triptosa (o tripticasa)-soja (TSA). Es necesario añadir un 2–5% de suero bovino o equino para el cultivo de algunas cepas, como la biovariedad 2 de *B. abortus*, y muchos laboratorios añaden sistemáticamente suero al medio basal con resultados excelentes, como en el caso del agar sangre o del agar Columbia. También pueden utilizarse otros medios satisfactorios, como el agar de suero-dextrosa (SDA) o el agar de glicerol dextrosa (Alton *et al.*, 1988). El medio SDA suele ser el de elección para la observación de la morfología de las colonias. Para el aislamiento de *Brucella* de la sangre u otros líquidos corporales o de la leche, donde se aconseja un cultivo de enriquecimiento, se recomienda un medio bifásico no selectivo, conocido como medio de Castañeda. Este medio se emplea porque en medio líquido las brucelas tienden a disociarse, lo cual interfiere con la biotipificación llevada a cabo mediante las técnicas bacteriológicas convencionales.

1.2.2. Medios selectivos

Todos los medios basales indicados anteriormente se pueden utilizar para la preparación de medios selectivos, añadiendo los antibióticos apropiados para evitar el crecimiento de microorganismos distintos a *Brucella*.

El medio selectivo más difundido es el de Farrell modificado (FM) (Stack *et al.*, 2002), que se prepara añadiendo a 1 litro de agar: sulfato de polimixina B (5 000 unidades = 5 mg); bacitracina (25 000 unidades = 25 mg); natamicina (50 mg); ácido nalidíxico (5 mg); nistatina (100 000 unidades) y vancomicina (20 mg). Se ha comercializado un suplemento de antibióticos liofilizado. Sin embargo, a las concentraciones utilizadas en el medio de Farrell, el ácido nalidíxico y la bacitracina tienen efectos inhibidores sobre algunas cepas de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*. Por ello, el uso simultáneo del FM y del medio de cultivo modificado de Thayer-Martin (mTM), que es menos selectivo, se ha considerado el sistema de elección para el aislamiento primario de *Brucella* en muestras de campo obtenidas de animales. Aun así, el mTM no es translúcido debido a que contiene hemoglobina como componente basal, siendo

así inadecuado para la observación directa de la morfología de las colonias, que probablemente sea el procedimiento más práctico para la identificación provisional de *Brucella* (Alton *et al.*, 1988). Recientemente, se ha formulado un nuevo medio de cultivo selectivo y translúcido (denominado CITA) (De Miguel *et al.*, 2011). Para prepararlo, se usa agar sangre como componente básico y se suplementa con un 5% de suero de ternero estéril y vancomicina (20 mg/ litro), metanosulfonato de colistina (7,5 mg/litro), nitrofurantoína (10 mg/ litro), nistatina (100 000 Unidades Internacionales [UI]/litro), y anfotericina B (4 mg/litro). Esta combinación de antibióticos puede prepararse del siguiente modo: se pesan la vancomicina, la colistina y la nistatina en el recipiente estéril de 50 ml, a continuación se rehidrata la mezcla con 10 ml de una solución 1:1 de metanol absoluto en agua purificada estéril. Se pesa la nitrofurantoína en un tubo estéril y se disuelve con 1 ml de una solución de NaOH 0,1 M (previamente esterilizada por filtración a través de un filtro de 0,22 µm). Por último, se pesan 10 mg de anfotericina B en un recipiente estéril de 20 ml y se disuelven con 1 ml de dimetilsulfóxido. Una vez disueltos por completo (se precisan 5-10 minutos), se añaden 9 ml de una solución salina estéril tamponada con fosfato 10 mM (PBS) (pH=7,2 ± 0,2). La concentración final de la anfotericina B sería de 1 mg/ml; para 1 litro de medio se precisa un total de 4 ml de esta solución. La suspensión de anfotericina B restante puede conservarse a 5°C ± 3°C varios días para usos posteriores. Este nuevo medio CITA inhibe la mayoría de microorganismos contaminantes pero al mismo tiempo permite el crecimiento de todas las especies de *Brucella* y es más sensible que el mTM y que el medio de Farrell para el aislamiento de todas las especies lisas de *Brucella* de las muestras de campo, de tal forma que se convierte en el medio selectivo de elección para el aislamiento de *Brucella* en términos generales, aunque la máxima sensibilidad diagnóstica se logre empleando de forma simultánea FM y CITA (De Miguel *et al.*, 2011).

Contrariamente a lo que ocurre con algunas biovariedades de *B. abortus*, así como con *B. ovis*, para el crecimiento de *B. melitensis* y *B. suis* no es indispensable una atmósfera de incubación que contenga un 5–10% de CO₂ (Tabla 2), pero una atmósfera de este tipo, enriquecida con CO₂, sí es la óptima para el cultivo de todas las especies de *Brucella*.

Como es probable que el número de microorganismos de *Brucella* en la leche, en el calostro y en algunas muestras tisulares sea menor que en material de abortos, se recomienda un enriquecimiento. En el caso de la leche, los resultados también mejoran mediante centrifugación y cultivo de la crema y el precipitado, pero deben aplicarse estrictas medidas de seguridad para evitar la formación de aerosoles. Una forma más práctica de aumentar la sensibilidad del cultivo de leche evitando los riesgos de la centrifugación es aumentar el número de placas de cultivo tanto FM como CITA por muestra de leche analizada (dos placas por cuarterón como mínimo), e inocular cada placa con unos 0,5 ml de leche. El enriquecimiento se puede realizar en medio líquido formado por caldo de suero-dextrosa, con caldo de triptosa o caldo de (tripticasa)-soja (TSA) o con caldo para *Brucella* suplementado con una mezcla de antibióticos que lleve al menos anfotericina B (1 µg/ml) y vancomicina (20 µg/ml) (concentraciones finales). El medio de enriquecimiento debe incubarse a 37°C ± 2°C en aire suplementado con un 5–10% (v/v) de CO₂ hasta un máximo de 6 semanas, realizando subcultivos semanales a los medios sólidos selectivos FM y CITA. Si se prefiere, se puede utilizar un sistema bifásico de medio selectivo líquido y sólido en el mismo frasco (técnica de Castañeda) para reducir el subcultivo. Para el aislamiento de *Brucella* de la leche a veces se recomienda un medio selectivo bifásico formado por el medio base de Castañeda al que se añaden los siguientes antibióticos en la fase líquida (las cantidades que se indican son por litro de medio): sulfato de polimixina B (6 000 unidades = 6 mg); bacitracina (25 000 unidades = 25 mg); natamicina (50 mg); ácido nalidíxico (5 mg); anfotericina B (1 mg); vancomicina (20 mg) y D-cicloserina (100 mg).

Todos los medios de cultivo deben someterse a un control de calidad con las cepas de referencia para comprobar que funcionan adecuadamente. Lo ideal es usar un inóculo pequeño de cepas exigentes, como la bv 2 de *B. abortus*, *B. ovis* o la bv 2 de *B. suis*.

En medios sólidos adecuados, pueden observarse colonias claramente visibles de *Brucella* después de 3-4 días de incubación. Tras 4 días de incubación, las colonias de *Brucella* son redondas, de 1-2 mm de diámetro, con los bordes lisos. Son translúcidas y de color miel pálido a la luz del día en medio transparente. Vistas desde arriba son convexas y de color blanco perla. Posteriormente, las colonias crecen y se oscurecen ligeramente. Los cultivos en fase lisa (S) de *Brucella* presentan tendencia a sufrir variaciones durante el crecimiento, especialmente en el caso de los subcultivos, y a disociarse a formas rugosas (R). En este caso, las colonias son mucho menos transparentes, presentan una superficie mate más granular y el color varía de blanco mate a marrón al usar luz reflejada o transmitida. La comprobación de esta disociación se realiza fácilmente por tinción con cristal violeta: las colonias rugosas se tiñen de rojo/violeta y las lisas no captan colorante o bien se tiñen de color amarillo claro. Si las colonias

son lisas deben comprobarse con un antisuero anti-*Brucella* en fase lisa, o preferiblemente con sueros monoespecíficos contra los antígenos de superficie A y M. En cuanto a las colonias rugosas, deben comprobarse con antisuero contra el antígeno R de *Brucella*. Por lo general, los cambios de morfología de las colonias se asocian a cambios en la virulencia, en las propiedades serológicas o en la sensibilidad a los fagos. La morfología típica de las colonias y un resultado positivo en la prueba de aglutinación con un antisuero específico anti *Brucella*, seguido de las pruebas de la oxidasa y la ureasa (véanse las Tablas 2 y 3) proporcionan una identificación provisional de la cepa como *Brucella*. De todas formas, se recomienda que la confirmación y tipificado posteriores se realicen en un laboratorio de referencia.

1.2.3 Obtención y cultivo de las muestras

Para el diagnóstico de la brucelosis animal mediante cultivo, la elección de las muestras en general depende de los signos clínicos observados. Las muestras más adecuadas son secreciones vaginales (hisopos), fetos abortados (contenido gástrico, bazo y pulmones), membranas fetales, leche, semen y líquidos de las artritis o de los higromas. Los tejidos preferidos para cultivo de las canales animales son los del sistema reticuloendotelial (es decir, ganglios linfáticos de la cabeza, mamarios y genitales, y el bazo), el útero inmediatamente antes o después del parto, y las ubres. Suele aparecer crecimiento pasados 3 a 4 días, pero los cultivos no deben considerarse negativos hasta que hayan pasado 7 a 10 días.

1.2.3.1. Tejidos

Las muestras se toman asépticamente con instrumentos estériles. Las muestras de tejido se preparan retirando el material irrelevante (como la grasa), cortándolas en pequeños trozos y macerándolas con un digestor (“Stomacher”) o en un homogeneizador de tejidos con una pequeña cantidad de solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS) antes de inocularlas en medios sólidos.

1.2.3.2. Secreción vaginal

Una fuente excelente para recoger *Brucella* es un hisopo vaginal tomado después del aborto o del parto, y es mucho menos arriesgado para el personal que el material del aborto. A continuación, el hisopo se siembra directamente en medios sólidos.

1.2.3.3. Leche

Las muestras de leche deben recogerse de forma limpia después de lavar y secar toda la ubre y desinfectar los pezones. Es esencial que las muestras contengan leche de todos los cuarterones, y se deben tomar 10–20 ml de cada pezón cambiando o desinfectando los guantes entre animales para evitar la contaminación cruzada de las muestras. Los primeros chorros se desechan y la muestra se recoge directamente en un recipiente estéril. Se ha de proceder con cuidado de evitar el contacto entre la leche y las manos del ordeñador. La leche se puede centrifugar y la crema y la parte depositada se siembran en medio selectivo sólido, por separado o mezclados, o bien se siembran directamente como se ha indicado previamente. Si en muestras de leche de tanque se detecta *Brucella*, su número suele ser muy bajo y el aislamiento a partir de tales muestras es improbable.

1.2.3.4. Productos lácteos

Los productos lácteos, como los quesos, deben cultivarse en los medios descritos arriba. Como es probable que estos materiales contengan un bajo número de microorganismos, se recomiendan cultivos de enriquecimiento. Es necesario que las muestras estén homogenizadas cuidadosamente antes del cultivo, después de haberlas sometido a un triturador de tejidos, a un digestor (“Stomacher”) o a una batidora eléctrica con un volumen adecuado de PBS estéril (evitando un exceso de dilución). Deben cultivarse las capas superficiales (corteza y partes adyacentes) y el interior del producto. Como las brucelas crecen, sobreviven y desaparecen rápidamente, su distribución por las diferentes partes del producto varía en función de las condiciones físico-químicas locales derivadas de la tecnología específica del proceso.

1.2.3.5. Contenido de los líquidos – abscesos en artritis/higromas

Este tipo de muestras debe obtenerse de forma aséptica y sembrarse directamente en medios selectivos sólidos.

Después de la toma, todas las muestras deben enfriarse rápidamente (4–10°C) y transportarse al laboratorio lo antes posible. De lo contrario, deben congelarse para evitar pérdidas de

viabilidad. A su llegada al laboratorio, deben congelarse todas las muestras de leche y de tejidos o de otros líquidos biológicos que no vayan a cultivarse de inmediato.

El empleo de animales de laboratorio debe evitarse a menos que sea absolutamente necesario, aunque a veces constituyen el único medio para detectar la presencia de *Brucella*, sobre todo cuando las muestras están muy contaminadas o es probable que contengan un número bajo de microorganismos del género *Brucella*. La inoculación en los animales puede realizarse por vía intravenosa o intraperitoneal en ratones o por vía intramuscular, subcutánea o intraperitoneal en cobayas. Este trabajo debe realizarse en condiciones adecuadas de bioseguridad, como se indica en el Capítulo 1.1.4. Los bazos de los animales inoculados se cultivan durante 7 días (ratones) o 3-6 semanas (cobayas) después de la inoculación. Pueden obtenerse muestras de suero de los cobayas mediante punción intracardiaca antes de la necropsia y someterse a pruebas de antígeno tamponado de *Brucella* (BBAT); un resultado serológico positivo es muy indicativo de brucelosis (Alton *et al.*, 1988).

1.3. Identificación y tipificación

Cualquier colonia con una morfología similar a la de *Brucella* debe examinarse tiñendo un frotis con la tinción de Gram. Como en las fases no lisas se alteran las propiedades serológicas, tintoriales y de sensibilidad a los fagos, la morfología colonial resulta esencial para las pruebas de tipificación que se describen más abajo. Los métodos recomendados para observar la morfología de las colonias son el método de Henry mediante luz reflejada oblicua, la prueba de la acriflavina descrita por Braun y Bonestell, o el método de White y Wilson de tinción de colonias con cristal violeta (Alton *et al.*, 1988).

La identificación de *Brucella* se puede realizar mediante una combinación de las siguientes pruebas: morfología celular mediante la tinción de Gram o de Stamp, observación directa de la morfología de las colonias, propiedades de crecimiento, pruebas de ureasa y oxidasa, y la prueba de la aglutinación en porta con un suero policlonal anti-*Brucella*. La identificación de especies y de biovariedades requiere pruebas elaboradas (como la lisis por fagos y la aglutinación con sueros monoespecíficos anti-A, anti-M o anti-R), que deben realizarse en laboratorios de referencia con experiencia en estos métodos. La utilización simultánea de varios fagos, como Tbilissi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar₁ (Iz₁) y R/C, representa un sistema de tipificación fágica que, con suficiente experiencia, permite identificar las especies lisas y rugosas de *Brucella*. No obstante, algunas propiedades, como el requerimiento de CO₂ para crecer, la producción de H₂S (detectada mediante papeles con acetato de plomo) y el crecimiento en presencia de fucsina básica y tionina, se detectan mediante pruebas sistemáticas que pueden realizarse en laboratorios no especializados moderadamente equipados (véanse las Tablas 2 y 3).

Para el mantenimiento de cepas de *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis*, o cuando se envían a un laboratorio de referencia para su tipificación, es esencial seleccionar solo cepas lisas. Los cultivos se pueden conservar durante algún tiempo a 5°C ± 3°C, pero para periodos largos deben liofilizarse o conservarse en un tubo con tapón de rosca a temperaturas ≤ -16°C en caldo de triptosa con glicerol al 15% (v/v). Para el envío, se liofilizan y se cierran en ampollas dentro de tubos con tapón de rosca o se subcultivan en un agar inclinado con los nutrientes adecuados en tubos con tapón de rosca. Las cepas también pueden enviarse suspendidas en medios de transporte (como el medio Amies), aunque este puede ocasionar disociación.

Para el transporte de cultivos de *Brucella*, las tapas de los frascos o recipientes deben enroscarse bien ajustadas y sellarse con cinta de PVC (cloruro de polivinilo). Los frascos deben envolverse con papel absorbente o algodón, sellarse en bolsas de polietileno e introducirse en un recipiente rígido (triple envoltorio) de acuerdo con los requisitos de la Asociación Internacional del Transporte Aéreo (IATA) para el envío de bienes peligrosos (IATA, 2013). Estas normas se resumen en el Capítulo 1.1.2 *Recogida, presentación y almacenamiento de muestras para el diagnóstico* y en el Capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico*, y deben cumplirse.

1.4. Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos

La PCR, incluido el formato en tiempo real, constituye otro medio de detección e identificación de *Brucella* sp. (Bricker, 2002; Lopez-Goñi *et al.*, 2011; Ocampo-Sosa *et al.*, 2005; Whatmore y Gopaul, 2011). Pese al alto grado de homología del ADN dentro del género *Brucella*, se han desarrollado varios métodos moleculares que permiten, hasta cierto punto, la diferenciación entre especies de *Brucella* y algunas de sus biovariedades, como la PCR, el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción ampliados mediante PCR (RFLP) y la transferencia Southern (se ofrece una revisión en las referencias Bricker, 2002; Moreno *et al.*, 2002; Whatmore y Gopaul, 2011). También se ha desarrollado una electroforesis en gel de campo pulsante que permite la diferenciación entre varias

especies de *Brucella*. Mediante el empleo de la PCR puede biotipificarse *Brucella* y pueden diferenciarse las cepas vacunales, pero la PCR se ha validado poco para el diagnóstico primario.

La primera prueba de PCR múltiple específica de especie para la diferenciación de *Brucella* fue descrita por Bricker y Halling. La prueba, denominada PCR AMOS, se basaba en el polimorfismo resultante de la localización, específica de especie, de la secuencia de inserción IS711 en el cromosoma de *Brucella* e incluía cinco cebadores oligonucleótidos que podían identificar, sin diferenciarlas, las biovariedades 1, 2 y 4 de *B. abortus*, pero no las biovariedades 3, 5, 6 y 9 de *B. abortus*. Con el tiempo, se han introducido modificaciones de la prueba para mejorar el rendimiento, y se han incorporado otros cebadores específicos de cepa para la identificación de las cepas vacunales de *B. abortus* y de otras biovariedades y especies (Ocampo-Sosa *et al.*, 2005). Se ha propuesto una nueva prueba de PCR múltiple (*Bruce-ladder*) para la identificación rápida y en un solo paso de *Brucella*. La principal ventaja de esta prueba respecto a las PCR descritas previamente es que permite identificar y diferenciar en un solo paso la mayoría de especies de *Brucella*, así como las cepas vacunales *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev.1. Contrariamente a lo que ocurre con otras PCR, *Bruce-ladder* también permite detectar ADN de *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* y *B. ceti*. Además, mediante esta nueva PCR múltiple se pueden detectar las biovariedades 3, 5, 6 y 9 de *B. abortus* y las biovariedades 2, 3, 4, 5 de *B. suis*. Se ha descrito una actualización del protocolo de PCR *Bruce-ladder* original. Esta nueva versión (*Bruce-ladder* v2.0), que se ha validado en varios laboratorios, también permite diferenciar entre *B. suis* y *B. canis*, así como diferenciar *B. microti*. Además, se ha creado una nueva PCR múltiple (*Suis-ladder*) con la cual pueden identificarse con rapidez y exactitud cepas de *B. suis* a nivel de biovariedad (Lopez-Goñi *et al.*, 2011).

Otra prueba avanzada PCR multiplex también puede distinguir entre *B. suis* y *B. canis* y entre *B. suis* y *B. Microti* en una sola etapa, y entre las cepas vacunales *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev.1 (Kang *et al.*, 2011). Esta prueba podría permitir también la diferenciación de las dos especies de mamíferos marinos, aunque requiere mayor validación de las cepas de campo.

Existen otras pruebas, como las PCR/RFLP *omp25*, 2a y 2b, que pueden utilizarse para identificar ciertas especies de *Brucella*.

Recientemente se han descrito otros procedimientos que permiten la identificación de todas las especies de *Brucella*, biovariedades de *B. suis* y cepas vacunales basados en la discriminación por polimorfismo de nucleótido único (SNP) mediante la extensión de cebador, PCR en tiempo real o la reacción en cadena de la ligasa. Estas pruebas son rápidas, sencillas e inequívocas y, al basarse en un análisis filogenético robusto, ayudan a garantizar la especificidad de especie/biovariedad de los marcadores que se utilizan (Whatmore y Gopaul, 2011).

Recientemente también se han descrito otros métodos que pueden añadir información epidemiológica útil. Se trata de un esquema de secuenciación multilocus (Whatmore y Gopaul, 2011) y de varios esquemas de tipificación basados en la utilización de análisis de repeticiones en tándem de un número variable de locus múltiples (MLVA) (Bricker *et al.*, 2003; Le Flèche *et al.*, 2006; Whatmore y Gopaul, 2011). Dependiendo de los marcadores concretos escogidos, estos métodos permiten diferenciar las cepas a nivel de especie o incluso subclasificarlas pudiendo llegar a obtener información epidemiológica útil a nivel de subespecie.

1.5. Identificación de cepas vacunales

La identificación de las cepas vacunales *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev.1 puede realizarse a partir de pruebas PCR específicas (Kang *et al.*, 2011; Lopez-Goñi *et al.*, 2011) o bien en función de sus características de crecimiento en cultivo.

La cepa S19 de *Brucella abortus* presenta las propiedades normales de una biovariedad 1 de *B. abortus*, pero no requiere CO₂ para crecer, ni crece en presencia de bencilpenicilina (3 µg/ml = 5 UI/ml), azul tionina (2 µg/ml) o i-eritritol (1 mg/ml) (todas ellas concentraciones finales), y presenta una alta utilización de L-glutamato (Alton *et al.*, 1988).

La cepa Rev.1 de *Brucella melitensis* tiene las propiedades normales de una biovariedad 1 de *B. melitensis*, pero crece más lentamente en medios sólidos, no crece en presencia de fucsina básica, ni con tionina (ambas a 20 µg/ml) o bencilpenicilina (3 µg/ml), pero sí en presencia de estreptomina a 2,5 o 5 µg/ml (5 UI/ml) (Alton *et al.*, 1988).

La cepa RB51 de *Brucella abortus* se puede distinguir de su homóloga lisa, la biovariedad 1 de *B. abortus*, por su morfología rugosa y el hecho de que crezca en presencia de rifampicina (250 µg por ml de medio).

Tabla 2. Características diferenciales de las especies del género Brucella

Especie	Morfología colonial ^b	Requisitos de suero	Lisis por fagos ^a					Oxidasa	Actividad ureasa	Hospedador preferente
			Tb		Wb	Iz ₁	R/C			
			RTD ^c	10 ⁴ RTD	RTD	RTD	RTD			
<i>B. abortus</i>	S	_d	+	+	+	+	-	(+) ^e	(+) ^f	Ganado bovino y otros Bovidae
<i>B. melitensis</i>	S		-	-	(-) ^g	+	-	+	+ ^h	Ovejas y cabras
<i>B. suis</i>	S	-	-	+	(+) ⁱ	(+) ⁱ	-	+	+ ^j	Bv. 1: suidos Bv. 2: suidos, liebres Bv. 3: suidos Bv. 4: renos Bv. 5: roedores
<i>B. neotomae</i>	S	-	_k	+	+	+	-	-	+ ^j	Rata del desierto ^l
<i>B. ovis</i>	R	+	-	-	-	-	+	-	-	Ovejas
<i>B. canis</i>	R	-	-	-	-	-	+	+	+ ^j	Perros
<i>B. ceti</i>	S	ND	(-)		(+)	(+)	-	(+)	+	Cetáceos
<i>B. pinnipedialis</i>	S	ND	(-)		(+)	(+)	-	(+)	+ ^h	Pinnípedos
<i>B. microti</i>	S	-	-	+	+	+	ND	+	+ ^h	Topillo común
<i>B. inopinata</i>	S	ND	-	PL ^m	ND	ND	ND	ND	+ ^j	Desconocido
<i>B. papionis</i>	S		PL ^m	PL ^m	+	ND	-	-	+ ^j	Desconocido

De Alton *et al.* (1988), Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis (1986), Whatmore (2009), y Whatmore *et al.* (2014).

(+)/(–) La mayoría de cepas son positivas/negativas

a Fagos: Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1 (Iz₁) y R/C

b Fase habitual: S: lisa, R: rugosa

c RTD: dilución habitual para la prueba

d La bv 2 de *B. abortus* por lo general requiere suero para crecer en aislamiento primario

e Algunas cepas africanas de la bv 3 de *B. abortus* son negativas

f Intermedia, excepto la cepa 544 y algunas cepas naturales, que son negativas

g WB lisa algunas cepas

h Lenta, excepto en algunas cepas, que es rápida

i Algunas cepas de la bv 2 de *B. suis* no resultan lisadas por los fagos Wb e Iz₁, o solo parcialmente

j Rápida

k Placas minuto

l *Neotoma lepida*

m Lisis parcial

ND Por determinar

Tabla 3. Características diferenciales de las biovariedades de las especies de Brucella

Especie	Biovariedad	Requisitos de CO ₂	Producción de H ₂ S	Tinción ^a		Aglutinación con sueros monoespecíficos			Cepa de referencia ²		
				Tionina	Fucsina básica	A	M	R	Cepa	ATCC	NCTC
<i>B. abortus</i>	1	(+) ^b	+	-	+	+	-	-	544	23448	10093
	2	(+) ^b	+	-	-	+	-	-	86/8/59	23449	10501
	3 ^c	(+) ^b	+	+	+	+	-	-	Tulya	23450	10502
	4	(+) ^b	+	-	(+)	-	+	-	292	23451	10503
	5	-	-	+	+	-	+	-	B3196	23452	10504
	6 ^c	-	(-)	+	+	+	-	-	870	23453	10505
	9	+/-	+	+	+	-	+	-	C68	23455	10507
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-	16M	23456	10094
	2	-	-	+	+	+	-	-	63/9	23457	10508
	3	-	-	+	+	+	+	-	Ether	23458	10509
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	(-)	+	-	-	1330	23444	10316
	2	-	-	+	-	+	-	-	Thomsen	23445	10510
	3	-	-	+	+	+	-	-	686	23446	10511
	4	-	-	+	(-)	+	+	-	40	23447	11364
	5	-	-	+	-	-	+	-	513	ND	11996
<i>B. neotomae</i>	-	+	- ^d	-	+	-	-	5K33	23459	10084	
<i>B. ovis</i>	+	-	+	(-)	-	-	+	63/290	25840	10512	
<i>B. canis</i>	-	-	+	(-)	-	-	+	RM6/66	23365	10854	
<i>B. ceti</i>	(-)	-	(+)	(+)	+	(-)	-	B1/94 BCCN 94-74	ND	12891	
<i>B. pinnipedialis</i>	(+)	-	+	(+)	(+)	(-)	-	B2/94 BCCN 94-73	ND	12890	
<i>B. microti</i>	-	-	+	+	-	+	-	CCM4915 BCCN 07-01 CAPM 6434	ND	ND	
<i>B. inopinata</i>	-	+	+	+	-	+ ^e	-	BO1 BCCN 09-01 CAPM 6436	ND	ND	
<i>B. papionis</i>	-	-	-	-	+	-	-	F8/08-60 CIRMBP 0958	ND	13660	

De Alton *et al.* (1988), Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis (1986), Whatmore (2009), y Whatmore *et al.* (2014).

(+)/(-) La mayoría de cepas son positivas/negativas

a Concentración de tinción en el agar dextrosa con suero: 20 µg/ml

b Normalmente positiva en el aislamiento primario

c Para diferenciar entre la bv. 3 y la 6, también se usa tionina a 40 µg/ml: bv 3 = +, bv 6 = -

d Crecimiento a una concentración de 10 µg/ml de tionina

e Aglutinación débil

ND Por determinar

2 <http://www.the-icsp.org/taxa/Brucellalist.htm>

2. Pruebas serológicas

No existe ninguna prueba serológica que sea adecuada en todas las situaciones epidemiológicas ni en todas las especies animales; todas tienen limitaciones, sobre todo cuando se trata de detectar la enfermedad en animales aislados. Para una interpretación o aplicación diagnóstica concreta, se deben tener en cuenta todos los factores que influyen en la idoneidad del método analítico y en los resultados de la prueba. En unidades epidemiológicas en las que se practique la vacunación con *Brucella* lisa, y dependiendo del método de vacunación que se utilice, pueden esperarse reacciones serológicas positivas en animales vacunados porque los anticuerpos presentan reacción cruzada con la infección por la cepa natural. Además, varias bacterias, en concreto *Yersinia enterocolitica* O:9, pueden inducir respuestas humorales que causen reacciones serológicas positivas falsas (FPSR) en pruebas de detección de la brucelosis, lo cual impedirá un diagnóstico serológico exacto. Estas FPSR pueden tener lugar en todas las especies animales a niveles variables según el momento y la región.

La prueba de la seroaglutinación (SAT) en general se considera inadecuada a efectos del comercio internacional. La prueba de la fijación del complemento (CFT) es más específica que la SAT y además posee un sistema estandarizado de concepto unitario. Las características de rendimiento diagnóstico de algunos enzoinmunoanálisis (ELISA) y de la prueba de polarización de la fluorescencia (FPA) son similares o superiores a las de la CFT y, como son técnicamente más fáciles de ejecutar y más robustas, pueden ser preferibles. Se ha realizado una comparación entre los rendimientos diagnósticos de varias de estas en ganado bovino, pequeños rumiantes y suidos.

Para el control de la brucelosis a nivel nacional o local, la prueba con rosa de bengala (RBT) y la prueba de aglutinación en placa con antígeno tamponado (BPAT), así como el ELISA y la FPA se consideran pruebas de cribado adecuadas. En función del objetivo de la prueba, las reacciones positivas deben comprobarse de nuevo utilizando un método confirmativo o complementario adecuado.

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

2.1. Sueros de referencia

Los estándares de referencia de la OIE son aquellos con los que se comparan y calibran todos los demás estándares. Estos estándares de referencia están a disposición de los laboratorios nacionales de referencia y deben utilizarse para establecer estándares secundarios o nacionales frente a los que puedan prepararse otros de trabajo para ser utilizados en el diagnóstico diario sistemático de laboratorio.

Estos sueros se han desarrollado y designado por la OIE como Sueros Internacionales Estándar³. El uso de estos reactivos favorece la armonización internacional de las pruebas de diagnóstico y la estandarización de antígenos:

- i) Para la RBT, la CFT y la prueba del anillo de leche (MRT), se utiliza el Suero Estándar Internacional (OIEISS, anteriormente denominado Segundo Suero anti *Brucella abortus* Internacional de la OMS; OMS, 1953). Este suero es de origen bovino y contiene 1 000 UI (SAT) y 1 000 ICFTU (unidades internacionales de la prueba de fijación del complemento).
- ii) Para el ELISA indirecto (I-ELISA), el ELISA de competición o bloqueo (C-ELISA) y la FPA en ganado bovino, se dispone de tres sueros estándar de la OIE para ELISA. También son de origen bovino y contienen un estándar fuertemente positivo (OIEELISASPSS), uno débilmente positivo (OIEELISAWPSS) y uno negativo (OIEELISANSS).
- iii) Para el I-ELISA, el C-ELISA y la FPA en ovejas y cabras, se usa el Suero Estándar Internacional anti-*Brucella* (ISaBmS) (McGiven et al., 2011).
- iv) Para el I-ELISA, el C-ELISA y la FPA en cerdos, todavía no existe ningún suero estándar internacional.

3 Se pueden obtener en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la brucelosis, en el Reino Unido.

2.2. Producción de células

Para la producción de antígeno para BBAT, SAT, CFT y FPA, siempre debe utilizarse la cepa 99 de *Brucella abortus* (Weybridge) (S99)³ o la cepa 1119-3 (USDA) (S1119-3)⁴ de *B. abortus*. Estas cepas de *B. abortus* también pueden utilizarse como fuente de extractos de antígeno soluble (lipolisacárido liso [S-LPS] o bien O-lipopolisacárido [OPS]) para los ELISA o las pruebas con Hapteno Nativo, pero la cepa 16M de *B. melitensis* también es adecuada para tal fin. Es importante destacar que el antígeno preparado con cualquiera de las dos cepas de *B. abortus* o con la cepa 16M de *B. melitensis* se utiliza en las pruebas de detección de cualquier infección por especies lisas de *Brucella*.

Las cepas deben ser completamente lisas y no autoaglutinables en solución salina y acriflavina al 0,1% (p/v). Tienen que ser cultivos puros y cumplir las propiedades de las cepas de *B. abortus* bv 1 o *B. melitensis* bv 1 que no necesitan CO₂. Los cultivos de inóculo original deben propagarse para producir un lote de inóculo que tendrá cumplir las propiedades de estas cepas, y deben conservarse por liofilización o por congelación en nitrógeno líquido.

Para la producción de antígeno, el cultivo del inóculo se utiliza para sembrar varios tubos de agar inclinado con medio de infusión de patata que se incuban a 37°C ± 2°C durante 48 horas. Los medios sólidos SDA y TSA, a los cuales se puede añadir un 5% de suero equino o suero de ternero neonato o un 0,1% de extracto de levadura, son satisfactorios con tal de que se utilice un inóculo adecuado, como se ha recomendado anteriormente. Se comprueba la pureza del crecimiento, se resuspende la cepa en PBS estéril, pH 6,4, y se utiliza para sembrar capas de frascos Roux con medio sólido de infusión de patata o con glicerol-dextrosa. Estos se incuban luego a 37°C ± 2°C durante 72 horas con la superficie inoculada hacia abajo. La pureza del crecimiento se comprueba en cada frasco mediante la tinción de Gram, y los microorganismos se recogen añadiendo a cada frasco 50 – 60 ml de solución salina estéril con fenol (con un 0,5% de fenol en una solución de cloruro sódico al 0,85%). Los frascos se agitan suavemente, se decanta la suspensión, y los microorganismos se inactivan por calentamiento a 80°C durante 90 minutos. Después de una prueba de viabilidad, el antígeno se conserva a 5°C ± 3°C.

Como alternativa, las células se pueden producir mediante cultivo en lote o continuo en un fermentador, en un medio líquido que contenga (por litro de agua destilada) D-glucosa (30 g), peptona de grado elevado (30 g), extracto de levadura (Difco) (10 g), fosfato dihidrogenado de sodio (9 g) y fosfato hidrogenado disódico (3,3 g). El pH inicial es 6,6 (± 0,2), pero tiende a subir a 7,2 (± 0,2) durante el ciclo de crecimiento. Debe comprobarse la capacidad de los lotes de peptona y de extracto de levadura para producir un buen crecimiento sin formación de células anormales o disociadas. Durante el crecimiento puede ser necesario airear y remover vigorosamente, y ajustar el pH a 7,2 (± 0,2) mediante la adición de HCl 0,1 M. El inóculo de siembra se prepara como se ha descrito anteriormente. El cultivo se incuba a 37 °C ± 0,2 °C durante 48 horas. El cultivo continuo puede mantenerse más tiempo, pero en este caso se precisa más experiencia. Para garantizar la pureza, deben realizarse controles durante el proceso del crecimiento tanto en medios sólidos como líquidos, un recuento de los microorganismos viables y comprobar que no hay disociación a formas rugosas. Debe comprobarse que las células que vayan a ser utilizadas en la preparación de todos los antígenos sean puras y lisas en la fase de recogida.

El cultivo se recoge mediante centrifugación para precipitar los microorganismos, que se resuspenden en solución salina estéril con fenol. Los microorganismos se inactivan por calentamiento a 80°C durante 90 minutos y se conservan a 5°C ± 3°C. Deben formar suspensiones estables en solución salina fisiológica sin evidencia alguna de autoaglutinación. Con las suspensiones se debe realizar una prueba de viabilidad sin que se evidencie crecimiento alguno después de una incubación de 10 días a 37°C ± 2°C. El volumen de células concentradas (PCV) en las suspensiones inactivadas puede determinarse centrifugando volúmenes de 1 ml en tubos Wintrobe a 3 000 g durante 75 minutos.

2.3. Pruebas con antígeno tamponado de *Brucella* (BBAT)

2.3.1. Prueba del rosa de bengala (prueba prescrita para el comercio internacional)

Esta es una prueba sencilla de aglutinación puntual que utiliza antígeno coloreado con rosa de bengala y tamponado a pH bajo, normalmente a 3,65 + 0,05 (Morgan *et al.*, 1969).

4 Puede obtenerse en los *National Veterinary Services Laboratories* (NVSL) del Departamento de Agricultura de EE.UU (USDA), 1800 Dayton Road, Ames, Iowa, EE.UU.

2.3.1.1. Producción de antígeno

El antígeno para la RBT se prepara depositando células muertas de las cepas de *B. abortus* S99 o S1119-3, recogidas por centrifugación a 23 000 **g** durante 10 minutos a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, y resuspendiéndolas uniformemente en una solución salina con fenol (0,5%) a razón de 1 g por cada 22,5 ml. (Nota: si se utiliza carboximetilcelulosa sódica como agente sedimentador durante la preparación del concentrado celular, los residuos insolubles deben eliminarse antes de la tinción filtrando la suspensión por un prefiltro AMF-CUNO Zeta-plus [Tipo CPR 01A]). A cada 35 ml de esta suspensión se añade 1 ml de rosa de bengala al 1% (p/v) (CI N° 45440) en agua destilada estéril, y la mezcla se remueve durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se filtra a través de una gasa estéril y se centrifuga a 10 000 **g** para depositar las células teñidas, que a continuación se resuspenden uniformemente a razón de 1 g de células por 7 ml de diluyente (21,1 g de hidróxido de sodio disueltos en 353 ml de solución salina estéril con fenol, seguidos de 95 ml de ácido láctico, que se ajusta a 1 056 ml con solución salina estéril con fenol). El color de esta suspensión debe ser un rosa intenso y el sobrenadante de una muestra centrifugada debe carecer de colorante; el pH debe ser de $3,65 \pm 0,05$. Después de la filtración a través de una gasa, la suspensión se filtra dos veces a través de un prefiltro de fibra de vidrio Sartorius N° 13430, se ajusta a un PCV de aproximadamente el 8%, dependiendo de la estandarización final frente a un suero calibrado contra el OIEISS, y se conserva a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad. El antígeno debe conservarse siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. No debe congelarse.

2.3.1.2. Estandarización del antígeno

Cuando se utiliza en la prueba estándar, el antígeno para la RBT debe dar una reacción positiva clara con una dilución 1/45 del OIEISS diluido en solución salina normal o con fenol al 0,5%, pero no a una dilución de 1/55.

Pueden realizarse otras comprobaciones con el ISaBmS. Se ha determinado que la dilución más alta (en suero de cabra negativo) de este estándar que debe dar un resultado positivo y la dilución más baja (en suero de cabra negativo) que debe dar al mismo tiempo un resultado negativo son 1/16 y 1/200, respectivamente (McGiven *et al.*, 2011).

También es aconsejable comparar la reactividad de lotes de antígeno nuevos y previamente estandarizados empleando un conjunto de sueros de referencia bien definidos.

No obstante, la estandarización anterior respecto al OIEISS probablemente sea una causa de baja sensibilidad de algunos lotes de antígeno RB para el diagnóstico de infección por *B. melitensis* en pequeños rumiantes y de discrepancias respecto a la CFT (Blasco *et al.*, 1994a). Al analizar pequeños rumiantes, las discrepancias respecto a la CFT pueden minimizarse usando tres volúmenes de suero y uno de antígeno (por ejemplo, 75 μl y 25 μl , respectivamente) en lugar de un volumen igual de cada uno como se indica en el procedimiento analítico estándar. No obstante, esta modificación de la RBT no debe recomendarse para analizar sueros de ganado bovino o porcino.

2.3.1.3. Procedimiento analítico

- i) Se llevan las muestras de suero y el antígeno a temperatura ambiente ($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$). Debe sacarse de la nevera solo el antígeno necesario para las pruebas del día.
- ii) Se depositan 25–30 μl de cada muestra de suero sobre una baldosa blanca, placa esmaltada o de plástico, o en una placa para hemaglutinación de la OMS.
- iii) Se agita bien el frasco de antígeno, pero suavemente, y se deposita el mismo volumen de antígeno cerca de cada gota de suero.
- iv) Inmediatamente después de añadir la última gota de antígeno a la placa, se mezclan cuidadosamente el suero y el antígeno (usando un porta limpio o una varilla de plástico para cada prueba) hasta producir una zona circular u oval de aproximadamente 2 cm de diámetro.
- v) La mezcla se agita suavemente durante 4 minutos a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) en un agitador circular o tridimensional (si la zona de reacción es oval o circular, respectivamente).
- vi) Se comprueba la aglutinación justo a los 4 minutos. Cualquier reacción visible se considera positiva. Debe analizarse un suero control que dé una reacción positiva mínima

antes de comenzar las pruebas de cada día para comprobar la sensibilidad de las condiciones de la prueba.

La RBT es muy sensible. Sin embargo, como toda prueba serológica, a veces puede originar una reacción positiva debido a vacunación con la cepa S19 de *B. abortus* o a reacciones serológicas positivas falsas (FPSR). Y este mismo fenómeno tiene lugar en los pequeños rumiantes o los cerdos afectados por FPSR y en los pequeños rumiantes vacunados con la cepa Rev.1 de *B. melitensis*. Por lo tanto, las reacciones positivas deben confirmarse con sistemas confirmativos y/o complementarios (que incluyan la investigación epidemiológica). En ocasiones muy infrecuentes se producen falsos negativos serológicos. Sin embargo, la RBT parece adecuada como prueba para detectar rebaños infectados o para garantizar la ausencia de infección en rebaños o manadas libres de brucelosis.

2.3.2 Prueba de aglutinación en placa con antígeno tamponado (prueba prescrita para el comercio internacional)

2.3.2.1. Producción de antígeno

El antígeno para la BPAT se prepara a partir de la cepa S1119-3 de *B. abortus* siguiendo el procedimiento descrito por Angus y Barton (1984).

Se requieren dos soluciones de colorante: verde brillante (2 g/100 ml) y cristal violeta (1 g/100 ml) de calidad garantizada disueltos en agua destilada. Una vez preparadas, las dos soluciones se conservan por separado durante 24 horas, y luego se mezclan en volúmenes iguales en una botella opaca y se conservan en una nevera durante no menos de 6 meses antes de su uso. La mezcla de colorantes solo puede utilizarse entre 6 y 12 meses después de su preparación inicial.

El diluyente tamponado se prepara disolviendo lentamente hidróxido de sodio (150 g) en 3 – 4 litros de solución salina estéril con fenol. A esta solución se añade ácido láctico (675 ml) y el volumen final se ajusta a 6 litros añadiendo solución salina estéril con fenol. El pH de la solución debe ser de $3,65 \pm 0,05$.

Las células concentradas de *B. abortus* S1119-3 se diluyen a una concentración de 250 g/litro en solución salina estéril con fenol; se añaden 6 ml de colorante por litro de suspensión celular, y la mezcla se agita antes de ser filtrada por algodón absorbente estéril. Las células se centrifugan a 10000 **g** a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y las células concentradas se resuspenden a continuación a una concentración de 50 g/100 ml en diluyente tamponado (como se ha descrito anteriormente). La mezcla se agita vigorosamente durante 2 horas y después se diluye añadiendo 300 ml de diluyente tamponado por cada 100 ml de células resuspendidas (es decir, a una concentración final de 50 g de células concentradas/400 ml de diluyente tamponado). La mezcla se remueve a temperatura ambiente durante 20–24 horas antes de que la concentración celular se ajuste al 11% (p/v) con diluyente tamponado. Esta suspensión se remueve durante toda la noche antes de ser analizada. Pendiente de las pruebas de control final de calidad, el antígeno se conserva a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. El antígeno no se debe congelar.

El pH del antígeno tamponado en placa debe ser de $3,70 \pm 0,03$, y el pH de una mezcla de suero/antígeno a una proporción de 8:3 debe ser de $4,02 \pm 0,04$. La suspensión al 11% de células teñidas debe ser azul-verdosa. Cada lote de antígeno tamponado en placa debe comprobarse con al menos 10 sueros de reactividad débil, y los resultados deben compararse con uno o más lotes previos de antígeno. Si es posible, los lotes de antígeno deben compararse con el antígeno estándar preparado por el NVSL, USDA (la dirección se indica en la nota 4 a pie de página). Sin embargo, no se dispone de ningún procedimiento establecido de estandarización internacional ni para el OIEISS ni para el ISaBmS.

2.3.2.2. Procedimiento analítico

- i) Se llevan las muestras de suero y el antígeno a temperatura ambiente ($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$). Debe sacarse de la nevera solo el antígeno necesario para las pruebas del día.
- ii) Se agita bien la muestra. Se depositan 80 μl de cada muestra de suero en una placa de vidrio marcada con cuadros de 4×4 cm.
- iii) Se agita bien la botella de antígeno, pero con suavidad, y se depositan 30 μl de antígeno cerca de cada gota de suero.

- iv) Inmediatamente después de añadir la última gota de antígeno a la placa, se mezclan completamente el suero y el antígeno (utilizando un vaso limpio o una varilla de plástico para cada prueba) hasta producir una zona circular de unos 3 cm de diámetro.
- v) Después de la mezcla inicial, la placa se rota tres veces con inclinación para asegurar la dispersión homogénea de los reactivos y se incuba 4 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- vi) Se extrae la placa y se rota como antes, y se vuelve a incubar otros 4 minutos.
- vii) Se lee de inmediato la aglutinación una vez transcurridos 8 minutos. Toda reacción visible se considera positiva. Debe analizarse un suero control que dé una reacción positiva mínima antes de comenzar las pruebas de cada día para comprobar la sensibilidad de las condiciones de la prueba.

Como la RBT, esta prueba es muy sensible, especialmente para la detección de anticuerpos inducidos por la vacuna, y las muestras positivas deben volver a analizarse con pruebas confirmativas y/o complementarias. Pueden producirse falsos negativos, debidos por lo general a fenómenos de prozona, que pueden eliminarse diluyendo el suero o volviendo a analizarlo después de cierto tiempo. Aunque en algunos países la BPAT se ha usado mucho para pequeños rumiantes y cerdos, aparentemente con buenos resultados, su valor diagnóstico en estas especies no se ha comprobado a nivel internacional.

2.4. Prueba de la fijación del complemento (prueba prescrita para el comercio internacional)

La CFT se utiliza mucho pero es difícil de ejecutar y requiere unas buenas instalaciones y una formación específica del personal para titular y conservar los reactivos adecuadamente. Existen muchas variaciones de la CFT, pero esta prueba se suele realizar de forma más cómoda en formato de microtitulación. Para la incubación de suero, antígeno y complemento, se puede utilizar la fijación en caliente o en frío: $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 minutos o $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ durante 14–18 horas. Varios factores influyen en la elección del método: la actividad anticomplementaria de muestras de suero de baja calidad es más evidente con la fijación en frío, mientras que a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ aumenta la frecuencia e intensidad de las prozonas, y se deben probar varias diluciones para cada muestra.

Se han propuesto varios métodos para la CFT en los que se utilizan diferentes concentraciones de eritrocitos de oveja (SRBC) frescos o conservados (normalmente se recomienda una suspensión al 2, 2,5 o 3%). Los SRBC están sensibilizados con un volumen igual de suero de conejo anti-SRBC diluido hasta contener varias veces (en general de dos a cinco) la concentración mínima necesaria para producir un 100% de lisis de SRBC en presencia de una solución titulada de complemento de cobaya. El último se titula independientemente (en presencia o ausencia de antígeno, según el método) para determinar la cantidad de complemento necesaria para producir el 50% o el 100% de lisis de los SRBC sensibilizados por unidad de volumen de una suspensión estandarizada; estas se definen como la unidad hemolítica de complemento al 50% o al 100%/ dosis hemolítica mínima (C'H o MHD₅₀ o C'H o MHD₁₀₀), respectivamente. Se suele recomendar titular el complemento antes de cada serie de pruebas, siendo preferible un macrométodo para la determinación óptima de C'H₅₀. Normalmente se utilizan en la prueba 1,25 – 2 C'H₁₀₀ o 5–6 C'H₅₀.

El diluyente estándar para la CFT es una solución salina tamponada con barbital (veronal). Se prepara con comprimidos comerciales; como alternativa, se puede preparar a partir de una solución madre de cloruro sódico (42,5 g), ácido barbitúrico (2,875 g), dietil barbiturato sódico (1,875 g), sulfato magnésico (1,018 g) y cloruro cálcico (0,147 g) en 1 litro de agua destilada, y se diluye antes de utilizarla añadiendo cuatro volúmenes de una solución de gelatina al 0,04%. No obstante, este tampón contiene derivados barbitúricos que en muchos países ya no se consiguen. También pueden obtenerse resultados satisfactorios con una solución de cloruro sódico sin barbitúrico al 0,85% que contenga calcio y magnesio, preparada a partir de 1 ml de una solución madre con cloruro de magnesio 1M y cloruro de calcio 0,3 M (MgCl₂ anhidro: 9,5 g; CaCl₂: 3,7 g; agua purificada: hasta 100 ml) (se conserva en pequeñas cantidades a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$) hasta 1 litro de solución salina (Alton *et al.*, 1988). El pH es crítico y debe ajustarse estrictamente a 7,35 ($\pm 0,05$). La sustitución del tampón veronal por este tampón sin barbitúrico ha sido validada por el Laboratorio de Referencia de la OIE para la Brucelosis, en Francia⁵.

2.4.1. Producción de antígeno

Existen numerosas variaciones de la prueba, pero sea cual sea el procedimiento, debe emplearse un antígeno preparado a partir de una cepa lisa aprobada de *B. abortus*, como la

5 Puede obtenerse en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la Brucelosis, en Francia.

S99 o la S1119-3, y que esté estandarizado frente al OIEISS. El antígeno para la CFT puede prepararse mediante procedimientos especializados (Alton *et al.*, 1988), o bien deben utilizarse células enteras diluyendo la suspensión madre de modo que el PCV de la suspensión de antígeno concentrado para la CFT sea aproximadamente del 2% antes de la estandarización frente al OIEISS.

2.4.2. Estandarización del antígeno

El antígeno debe estandarizarse para dar una fijación del 50% a una dilución 1/200 del OIEISS y debe mostrar también una fijación completa a diluciones más bajas de suero, porque una concentración demasiado débil (o demasiado fuerte) de antígeno puede no producir un 100% de fijación a diluciones de suero más bajas. Cuando son adecuadas dos diluciones de antígeno, debe escogerse la suspensión de antígeno más concentrada para evitar el fenómeno de prozona. El aspecto del antígeno a una dilución de 1/10 debe ser el de una suspensión blanca, uniforme y densa, sin agregación visible ni formación de depósito después de incubarla a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas. No debe producir efectos anticomplementarios a la concentración de trabajo utilizada para la prueba. El antígeno se conserva a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y no debe congelarse.

2.4.3. Procedimiento analítico (ejemplo)

Los sueros problema sin diluir y los estándares de trabajo adecuados se inactivan durante 30 minutos en un baño de agua a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Si previamente se han diluido a la mitad con una solución salina tamponada con veronal, se pueden inactivar a $58^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 50 minutos. En general, solo se analiza sistemáticamente una dilución del suero (generalmente a 1/4 o 1/5, dependiendo del procedimiento de CFT escogido), pero para el comercio o cuando se hayan comprobado signos clínicos, se recomiendan diluciones seriadas a efectos de detectar la existencia de prozona.

Con el empleo de placas de microtitulación estándar de 96 pocillos de fondo redondeado (en U), la técnica se suele realizar del siguiente modo:

- i) En el pocillo de la primera, segunda y tercera filas, se depositan 25 μl de suero problema inactivado diluido. La primera fila es un control anticomplementario para cada suero. Se añaden a los pocillos de la primera fila 25 μl de tampón de CFT (controles anticomplementarios) para compensar la falta de antígeno. A todos los demás pocillos se añaden 25 μl de tampón de CFT excepto a los de la segunda fila. A continuación se realizan diluciones seriadas a la mitad transfiriendo volúmenes de 25 μl de suero de la tercera fila en adelante. Se descartan 25 μl de la mezcla resultante en la última fila.
- ii) A cada pocillo, excepto en la primera fila, se añaden 25 μl de antígeno, diluido a la concentración de trabajo.
- iii) Se añaden a cada pocillo volúmenes de 25 μl de complemento diluido hasta el número de unidades exigido.
- iv) Se establecen controles con:
 - a. diluyente solo,
 - b. complemento + diluyente,
 - c. antígeno + complemento + diluyente,que contengan en cada caso un volumen total de 75 μl .

En cada serie de pruebas debe analizarse un suero control que dé una reacción positiva mínima para comprobar la sensibilidad en las condiciones de la prueba.

- v) Las placas se incuban a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos o durante toda la noche a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y se añade a cada pocillo un volumen de SRBC sensibilizados (25 o 50 μl dependiendo de la técnica). Las placas se reincuban a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.
- vi) Los resultados se leen después de centrifugar las placas a 1 000 **g** durante 10 minutos a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ o de dejarlas en reposo a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 2–3 horas para permitir que sedimenten las células no lisadas. El grado de hemólisis se compara con los estándares que correspondan a una lisis del 0, 25, 50, 75 y 100% de lisis. La ausencia de actividad anticomplementaria se comprueba en la primera fila para cada suero.
- vii) Estandarización de los resultados de la CFT:

Para la estandarización de los resultados existe un sistema de unidades basado en el OIEISS. Este suero contiene 1 000 UIFC (unidades internacionales de la prueba de fijación de complemento) por ml. Si este suero se analiza mediante un método determinado y origina un título de, por ejemplo, 200 (50% de hemólisis), entonces el factor de un suero problema analizado por el mismo método se deduce de la fórmula: $1\ 000 \times 1/200 \times \text{título del suero problema} = \text{número de UIFC de anticuerpos en el suero problema por ml}$. El OIEISS contiene IgG específica; los sueros estándar nacionales también deben depender de este isotipo para su actividad específica de fijación de complemento. Surgen dificultades en la estandarización porque diferentes técnicas favorecen selectivamente la CFT mediante diferentes isotipos de las inmunoglobulinas. Se recomienda que cualquier país que use la CFT a escala nacional acuerde un método concreto entre los diversos laboratorios que realizan la prueba con el fin de obtener el mismo nivel de sensibilidad. Para facilitar la comparación entre países, los resultados deben expresarse siempre en UIFC calculadas en relación a las obtenidas en una titulación paralela con un suero estándar, que a su vez se puede calibrar frente al OIEISS.

- viii) Interpretación de los resultados: Los sueros con un título equivalente a 20 UIFC/ml o más, se consideran positivos.

Los animales que se han vacunado con *B. abortus* S19 o *B. melitensis* Rev.1 entre los 3 y 6 meses generalmente se consideran positivos si los sueros dan una fijación positiva con un título de 30 o más UIFC/ml cuando los animales se diagnostican a una edad de 18 meses o superior.

Este procedimiento es solo un ejemplo y se pueden escoger otros volúmenes y cantidades de reactivos con tal de que la prueba se calibre frente al OIEISS, como se ha descrito anteriormente, y que los resultados se expresen en UIFC /ml.

La CFT suele ser muy específica pero menos sensible que la RBT y que el ELISA, sobre todo en el caso de los cerdos, puesto que el complemento porcino interacciona con el complemento de cobaya produciendo una actividad pro-complementaria que reduce la sensibilidad. Así, la CFT tiene menor sensibilidad para el diagnóstico de la infección por *B. suis*, no permite eliminar el problema de los falsos positivos y, en el caso de los cerdos, solo puede recomendarse como prueba complementaria. Además, como ocurre con la mayoría de pruebas serológicas, la CFT a veces da resultados positivos debido a vacunación con *B. abortus* S19 o con *B. melitensis* Rev.1 y no es lo bastante específica en caso de falso positivo. En consecuencia, las reacciones positivas en la CFT deben investigarse mediante sistemas confirmativos y/o complementarios.

2.5. Enzimoimmunoanálisis

2.5.1. ELISA indirecto (prueba prescrita para el comercio internacional)

Para ganado bovino, pequeños rumiantes y cerdos se han descrito muchas variaciones de ELISA indirecto (I-ELISA) en las que se usan diferentes preparaciones antigénicas, diversos conjugados de antiglobulinas con enzimas, y varios sustratos/cromógenos. Para la producción de estos antígenos debe utilizarse la cepa 99 de *Brucella abortus* (Weybridge) (S99)³, la cepa 1119-3 (USDA) (S1119-3)⁴ de *B. abortus* o bien la cepa 16M de *B. melitensis*. Se dispone de varios I-ELISA comerciales en los que se utiliza célula entera, lipopolisacárido liso (sLPS) u O-polisacárido (OPS) como antígenos que han sido validados en extensos ensayos de campo, y se utilizan mucho. Sin embargo, tanto la técnica utilizada como la interpretación de los resultados deben validarse de acuerdo con los principios establecidos en el Capítulo 1.1.6. *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*.

2.5.1.1. Estandarización del I-ELISA (EU, 2008; McGiven *et al*, 2011)

2.5.1.1.1. Infección por *Brucella* en ganado bovino

- i) Una predilución a 1/2 del OIEELISA_{WP}SS o una predilución a 1/16 del OIEELISA_{SP}SS preparadas con suero bovino negativo (o un conjunto de sueros bovinos negativos) debe dar una reacción positiva;

y

- ii) Una predilución a 1/8 del OIEELISA_{WP}SS o una predilución a 1/64 del OIEELISA_{SP}SS preparadas con suero bovino negativo (o un conjunto de sueros bovinos negativos) debe dar una reacción negativa;

y

- iii) El OIEELISA_NSS siempre debe dar una reacción negativa.

2.5.1.1.2. Infección por *Brucella* en ovejas y cabras:

- i) Una predilución a 1/64 del ISaBmS preparada con suero caprino negativo (o un conjunto de sueros caprinos negativos) debe dar una reacción positiva;

y

- i) Una predilución a 1/750 del ISaBmS preparada con suero caprino negativo (o un conjunto de sueros caprinos negativos) debe dar una reacción negativa;

y

- i) El suero caprino negativo mencionado arriba (o conjunto de sueros caprinos negativos) siempre deben dar una reacción negativa.

2.5.1.1.3. Infección por *Brucella* en cerdos:

- i) En ausencia de suero estándar internacional para brucelosis porcina, la prueba debe validarse por completo y debe establecerse el umbral en la población de destino con técnicas de validación adecuadas (véase el capítulo 1.1.6).

El I-ELISA en el que se utiliza sLPS u OPS como antígenos es muy sensible para la detección de anticuerpos anti *Brucella* en ganado bovino, pequeños rumiantes y cerdos, pero no permite resolver por completo el problema de la diferenciación respecto a anticuerpos originados por la vacunación con S19 de *B. abortus* o con Rev.1 de *B. melitensis*. La vacunación con RB51 de *B. abortus* también podría interferir con los I-ELISA en los que se usa S-LPS.

Las reacciones positivas deben comprobarse empleando sistemas confirmativos o complementarios, como BBAT o CFT.

Al utilizar I-ELISA estandarizado respecto a los sueros estándar de la OIE descritos arriba, la sensibilidad diagnóstica debería ser igual o mejor que la de BBAT (RBT /BPAT) o que la de la CFT en el análisis de ganado bovino, pequeños rumiantes o cerdos infectados. No obstante, la especificidad normalmente será menor (Praud *et al.*, 2012).

El problema con las FPSR podría resolverse en parte, sobre todo en cerdos, llevando a cabo un I-ELISA utilizando extractos de cepas rugosas de *Brucella*. La mayor parte de las FPSR son resultado de la reacción cruzada con la porción del polisacárido OPS de la molécula del S-LPS; sin embargo, son menos frecuentes las reacciones cruzadas entre los epítomos centrales del LPS. El uso de I-ELISA caotrópico o de procedimientos en los que se usen extractos de proteínas del citosol de *Brucella* como antígenos no resuelve este problema, al menos en ganado bovino (Muñoz *et al.*, 2005). Asimismo, en el contexto de las FPSR, el procedimiento diagnóstico más específico sigue siendo la prueba cutánea de la brucelina (véase el Apartado B.3.1, más adelante).

Pueden usarse conjugados a antiglobulinas monoclonales o policlonales, proteína G o enzima AG según la disponibilidad y requisitos de rendimiento. Un anticuerpo monoclonal (MAb) específico para la cadena pesada de la IgG₁ bovina puede suponer cierta mejora de la especificidad a pesar de la posible pérdida de sensibilidad, mientras que un conjugado a proteína G o enzima AG puede constituir un reactivo útil para el análisis de gran variedad de especies de mamíferos.

Se comercializan varios I-ELISA. Algunos protocolos son menos sensibles o menos específicos que otros; por lo tanto, los resultados que se obtienen de distintos ensayos no siempre son comparables. El I-ELISA para el diagnóstico de anticuerpos anti-*Brucella* en pequeños rumiantes y cerdos es básicamente el mismo que el que está descrito para ganado bovino, pero debe establecerse adecuadamente el umbral para estas especies usando técnicas de validación apropiadas (véase el Capítulo 1.1.6), y, además, el I-ELISA para cabras y ovejas debe estandarizarse respecto al ISaBmS (McGiven *et al.*, 2011).

Sea cual sea el formato de I-ELISA utilizado:

- i) En cada placa se incluyen un control positivo y uno negativo. Deben establecerse los intervalos de DO (densidad óptica) que deben obtenerse con estos dos controles, con el fin de definir los criterios para validar los resultados de cada placa. La DO del control

positivo es aquella con la cual se compara la DO de cada suero problema para establecer el resultado final (determinar si es negativo o positivo).

- ii) En cada placa debe incluirse un suero positivo adicional (control interno) para validar la repetibilidad de la prueba entre placas y entre días.

2.5.2. ELISA de competición (prueba prescrita para el comercio internacional)

Para ganado bovino, pequeños rumiantes y cerdos se han descrito distintas variaciones de C-ELISA, en las que se usan como antígeno S-LPS u OPS, y que incluyen distintos conjugados antiglobulina-enzima, sustratos o cromógenos y antígenos preparados a partir de cepas lisas de *Brucella*. No obstante, la técnica que se utilice, así como la interpretación de los resultados, deben validarse de acuerdo con los principios establecidos en el capítulo 1.1.6.

2.5.2.1. Estandarización del C-ELISA (EU, 2008; McGiven *et al.*, 2011)

2.5.2.1.1. Infección por *Brucella* en ganado bovino

- i) Una predilución a 1/2 del OIEELISA_{WP}SS o una predilución a 1/16 del OIEELISA_{SP}SS preparadas con suero bovino negativo (o un conjunto de sueros bovinos negativos) debe dar una reacción positiva;
y
- ii) Una predilución a 1/8 del OIEELISA_{WP}SS o una predilución a 1/64 del OIEELISA_{SP}SS preparadas con suero bovino negativo (o un conjunto de sueros bovinos negativos) debe dar una reacción negativa;
y
- iii) El OIEELISA_NSS siempre debe dar una reacción negativa.

2.5.2.1.2. Infección por *Brucella* en ovejas y cabras:

- i) Una predilución a 1/8 del ISaBmS preparada con suero caprino negativo (o un conjunto de sueros caprinos negativos) debe dar una reacción positiva;
y
- ii) Una predilución a 1/300 del ISaBmS preparada con suero caprino negativo (o un conjunto de sueros caprinos negativos) debe dar una reacción negativa;
y
- iii) El suero caprino negativo mencionado arriba (o conjunto de sueros caprinos negativos) siempre debe dar una reacción negativa.

2.5.2.1.3. Infección por *Brucella* en cerdos:

- i) En ausencia de suero estándar internacional para brucelosis porcina, la prueba debe validarse por completo y debe establecerse el umbral en la población de destino con técnicas de validación adecuadas (véase el capítulo 1.1.6).

Se ha comprobado que en ganado bovino, ovejas y cerdos, el C-ELISA en el que se usa un MAb específico de uno de los epítomos del OPS de *Brucella* sp. suele tener más especificidad pero menos sensibilidad que BBAT o I-ELISA (Muñoz *et al.*, 2005; 2012; Nielsen *et al.*, 1995; Praud *et al.*, 2012; Stack *et al.*, 1999).

No obstante, se ha observado que en ganado bovino (Muñoz *et al.*, 2005) y porcino (Praud *et al.*, 2012) el C-ELISA elimina parte de las reacciones positivas causadas por bacterias que presentan reacción cruzada. En algunos casos, en rumiantes o cerdos pueden observarse reacciones positivas en C-ELISA pero no en otras pruebas en las que se usa S-LPS, como I-ELISA. Además, el C-ELISA reduce, aunque no del todo, las reacciones causadas por anticuerpos producidos en respuesta a la vacunación.

Es muy probable que gran parte de la mejora de la especificidad se deba a una reducción de la sensibilidad del C-ELISA en comparación con BBAT o I-ELISA. Por lo tanto, las reacciones positivas en el C-ELISA deben comprobarse con sistemas confirmativos o complementarios, como BBAT, CFT o I-ELISA.

La elección del MAb y su especificidad y afinidad más o menos altas y características tendrán un efecto claro en el rendimiento diagnóstico de la prueba. Como ocurre con cualquier prueba

basada en MAb, para decidir si se acepta a nivel internacional y si puede utilizarse de forma generalizada también debe tenerse en cuenta si se va a disponer de MAb o de híbridos de forma universal.

Se comercializan varios C-ELISA. Algunos protocolos son menos sensibles o específicos que otros; por lo tanto, los resultados obtenidos de distintas pruebas no siempre son comparables entre ellos. El C-ELISA para el diagnóstico de anticuerpos anti-*Brucella* en pequeños rumiantes y cerdos es básicamente el mismo que el que se ha descrito para ganado bovino, pero debe establecerse correctamente el umbral para estas especies empleando técnicas de validación adecuadas (véase el capítulo 1.1.6; además, el C-ELISA para ovejas y cabras debe estandarizarse respecto al ISaBmS (McGiven *et al.*, 2011).

Sea cual sea el formato de C-ELISA utilizado:

- i) Se incluye un control positivo y uno negativo en cada placa. Deben establecerse los intervalos de DO que deben obtenerse con estos dos controles, con el fin de definir los criterios para validar los resultados de cada placa. La DO del control positivo es aquella con la cual se compara la DO de cada suero problema para establecer el resultado final (determinar si es negativo o positivo).
- ii) En cada placa debe incluirse un suero positivo adicional (control interno) para validar la repetibilidad de la prueba entre placas y entre días

2.6. Prueba de polarización de la fluorescencia

La FPA es una técnica sencilla para determinar la interacción antígeno/anticuerpo. Es una prueba homogénea que no requiere la separación de los analitos y que, por tanto, es muy rápida. No obstante, a diferencia de otros métodos homogéneos (como la RBT), se precisa una lectura de blanco/fondo para cada muestra antes de añadir el antígeno. Por lo tanto, es una prueba de dos pasos.

Para el diagnóstico de la brucelosis, se emplea como antígeno un fragmento de bajo peso molecular (de 22 kD de media) del OPS del sLPS de la cepa 1119-3 de *B. abortus* que se marca con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y se usa como antígeno. Una vez realizada la lectura del blanco/fondo (2-3 minutos), este antígeno se añade a suero diluido y se obtiene una medida del contenido en unos 2 minutos tras añadir antígeno empleando un analizador de la polarización de la fluorescencia (FPM) (Nielsen *et al.*, 1996).

2.6.1. Producción de antígeno (ejemplo)

El OPS se prepara a partir de 5 g de peso seco (o 50 g de peso húmedo) de *B. abortus* S1119-3 añadiendo 400 ml de ácido acético al 2% (v/v), esterilizando en autoclave la suspensión durante 15 minutos a 121°C y eliminando los restos celulares mediante centrifugación a 10 000 **g** durante 10 minutos a 5°C ± 3°C. A continuación, la solución de sobrenadante se trata con 20 g de ácido tricloroacético para precipitar las proteínas y los ácidos nucleicos. El precipitado se elimina de nuevo mediante centrifugación a 10 000 **g** durante 10 minutos a 5°C ± 3°C. El sobrenadante se dializa frente a un mínimo de 100 volúmenes de agua destilada y se liofiliza; se disuelven 3 mg de OPS en 0,6 ml de hidróxido de sodio 0,1 M (4 g de NaOH/litro) y se incuban a 37 °C ± 2°C durante 1 hora. Después se añaden 0,3 ml de isómero 1 de FICT a una concentración de 100 mg/ml en dimetilsulfóxido y se incuban otra vez durante 1 hora a 37°C ± 2°C. El OPS conjugado se aplica a una columna de 1 × 10 cm de DEAE (dietilaminoetil) Sephadex A 25 equilibrada con tampón fosfato 0,01 M, pH 7,4 ± 0.2. La primera fracción (después de 10–15 ml de elución con tampón) es verde fuerte, y después se cambia el tampón a fosfato 0,1 M, pH 7,4 ± 0.2. Esto da lugar a la elución de 10 – 15 ml de tampón seguidos de 25–40 ml de material verde fluorescente. Este último material es el antígeno utilizado en la FPA. La preparación de antígeno se puede aumentar proporcionalmente.

La cantidad de antígeno utilizada por prueba se determina diluyendo el material antes obtenido hasta lograr una intensidad de fluorescencia de 250 000–300 000 utilizando el FPM.

El antígeno se puede conservar como líquido durante varios años a 5°C ± 3°C en un frasco opaco o se puede liofilizar en frascos opacos. Son pocos los proveedores comerciales de este antígeno marcado.

2.6.2. Estandarización del FPA (EU, 2008; McGiven *et al.*, 2011)

2.6.2.1. Infección por *Brucella* en ganado bovino

- i) el OIEELISA_{WPSS} y el OIEELISA_{SPSS} siempre dan una reacción positiva;
y
- ii) una predilución a 1/8 del OIEELISA_{WPSS} o una predilución a 1/64 del OIEELISA_{SPSS} preparadas con suero bovino negativo (o un conjunto de sueros bovinos negativos) deben dar una reacción negativa;
y
- iii) El OIEELISA_{NSS} siempre debe dar una reacción negativa.

2.6.2.2. Infección por cepas lisas de *Brucella* en ovejas y cabras

- i) una predilución a 1/16 del ISaBmS preparada con suero caprino negativo (o un conjunto de sueros caprinos negativos) debe dar una reacción positiva;
y
- ii) una predilución a 1/200 del ISaBmS preparada con suero caprino negativo (o un conjunto de sueros caprinos negativos) debe dar una reacción negativa;
y
- iii) el suero caprino negativo mencionado arriba (o conjunto de sueros caprinos negativos) siempre debe dar una reacción negativa.

2.6.2.3. Infección por *Brucella* en cerdos

- i) En ausencia de suero estándar internacional para brucelosis porcina, la prueba debe validarse por completo y debe establecerse el umbral en la población de destino con técnicas de validación adecuadas (véase el capítulo 1.1.6).

La sensibilidad y la especificidad diagnósticas de la FPA para la brucelosis bovina son casi idénticas a las del C-ELISA. La FPA para el diagnóstico de anticuerpos anti-*Brucella* en pequeños rumiantes y cerdos es básicamente la misma que la descrita en ganado bovino, pero debe establecerse bien el umbral para estas especies con métodos de validación adecuados (véase el capítulo 1.1.6) y la prueba debe estandarizarse respecto a los correspondientes Estándares internacionales, como se ha explicado anteriormente.

La FPA permite reducir, aunque no del todo, las reacciones debidas a anticuerpos residuales producidos en respuesta a la vacunación (Nielsen *et al.*, 1996). Además, la especificidad de la FPA en caso de falsos positivos todavía no se conoce ni en ganado bovino ni en pequeños rumiantes, pero se ha comprobado claramente que no resuelve el problema de los falsos positivos en cerdos (Praud *et al.*, 2012).

Así, como debe hacerse con todas las demás pruebas serológicas, las reacciones positivas deben comprobarse mediante sistemas confirmativos y/o complementarios adecuados.

2.6.3. Procedimiento analítico (Nielsen *et al.*, 1996)

La FPA puede realizarse en tubos de vidrio o en una placa de 96 pocillos.

Los sueros bovinos se diluyen a 1/10 para la prueba en placa o a 1/100 para la prueba en tubo.

Los sueros de oveja, cabra o cerdo se diluyen a 1/10 para la prueba en placa o a 1/25 (cabra y cerdo) y a 1/40 (oveja) para la prueba en tubo.

El diluyente es Tris 0,01 M (1,21 g), con cloruro de sodio 0,15 M (8,5 g), Igepal CA630 al 0,05% (500 µl) (antes denominado NP40) y EDTA 10 mM (3,73 g) por litro de agua purificada, pH 7,2 ± 0,2 (tampón Tris).

La lectura inicial para determinar la dispersión de la luz se obtiene con el FPM, tras el mezclado. Se añade antígeno titulado y adecuadamente marcado, mezclado, y se obtiene una segunda lectura en el FPM unos 2 minutos después.

Una lectura (en unidades de milipolarización, mP) por encima del nivel umbral establecido indica una reacción positiva.

Un umbral habitual es el de 90-100 unidades de mP, pero la prueba debe estandarizarse a nivel local respecto a los correspondientes sueros estándar de referencia de la OIE (como se indica arriba). Debe incluirse un suero fuertemente positivo, un suero débilmente positivo y un suero estándar de trabajo negativo (estandarizado respecto a los sueros estándar de referencia de la OIE mencionados arriba).

2.6.3.1. Ejemplo para sueros bovinos

- i) Se añade 1 ml de diluyente a tubos de vidrio de borosilicato de 10 × 75 mm y después 10 µl de suero o 20 µl de sangre tratada con EDTA. Para el formato de 96 pocillos, se añaden 20 µl de suero a 180 µl de tampón. Es importante mezclar bien. Se obtiene una lectura en el FPM para determinar la dispersión de la luz.
- ii) Se añade al tubo un volumen de antígeno que corresponda a una intensidad total de fluorescencia de 250-300 × 10³ y se mezcla bien. Este volumen puede variar de un lote a otro, pero en general es de unos 10 µl. Se obtiene una segunda lectura en el FPM después de una incubación a temperatura ambiente (22°C ± 4°C) de unos 2 minutos para suero y de 15 segundos para sangre tratada con EDTA.
- iii) Una lectura superior al umbral predeterminado indica una reacción positiva.

2.7. Prueba de aglutinación del suero (solo ganado bovino)

Aunque no está reconocida como prueba prescrita, la SAT se ha utilizado con eficacia durante muchos años en programas de vigilancia y control de la brucelosis bovina, sobre todo en el norte de Europa. Su especificidad mejora notablemente si se añade EDTA al antígeno (MacMillan y Cockrem, 1985).

El antígeno es una suspensión bacteriana de la cepa 99 o la cepa 1119-3 de *B. abortus* en solución salina fenolada (NaCl al 0,85% [p/v] y fenol al 0,5% [v/v]). No debe usarse formaldehído. Los antígenos pueden presentarse en forma concentrada siempre que el factor de dilución a utilizar se indique en la etiqueta del frasco. Para reducir los falsos positivos se puede añadir EDTA a la suspensión antigénica a una concentración final en la prueba de 5 mM. A continuación, el pH de 7,2± 0,2 debe reajustarse en la suspensión de antígeno.

El OIEISS contiene 1 000 UI de aglutinación. El antígeno debe prepararse sin referencia a la concentración celular, pero su sensibilidad debe estandarizarse con relación al OIEISS de modo que el antígeno produzca el 50% de aglutinación con una dilución sérica final de 1/600 a 1/1 000, o el 75% con una dilución sérica final de 1/500 a 1/750. También se aconseja comparar la reactividad de los lotes de los antígenos nuevos con los estandarizados previamente, utilizando un juego de sueros definidos.

La prueba se realiza en tubo o en microplaca. La mezcla de antígeno con las diluciones de suero debe incubarse 16 – 24 horas a 37 °C± 2°C. Si la prueba se realiza en microplaca, el tiempo de incubación puede acortarse a 6 horas. Para cada suero debe prepararse un mínimo de tres diluciones para evitar respuestas negativas debidas a los fenómenos de prozona. La dilución de sueros sospechosos debe llevarse a cabo de modo que la lectura de la reacción al límite de la positividad se haga en el tubo central (o pocillo en el método de microplaca).

Interpretación de los resultados: El grado de aglutinación de *Brucella* en un suero debe expresarse en UI por ml. Un suero con 30 UI o más por ml, se considera positivo.

2.8. Pruebas basadas en el hapteno nativo y en la proteína del citosol (solo rumiantes)

Las pruebas basadas en el hapteno nativo⁶ son muy específicas en contextos de vacunación con la cepa S19 de *B. abortus*, y se han utilizado con éxito en un programa de cribado junto con la RBT. La sensibilidad óptima (cercana a la de la CFT pero considerablemente inferior a la de la RBT y la del I-ELISA basado en sLPS) se obtiene en un sistema de inmunodifusión radial inversa (RID) en el que el suero difunde hacia un gel hipertónico que contiene el polisacárido, pero la prueba de la doble difusión en gel también resulta útil (Muñoz *et al.*, 2005). Los terneros vacunados por vía subcutánea con la dosis estándar de la cepa S19 de *B. abortus* a los 3–5 meses de edad son negativos a los 2 meses de

6 El procedimiento detallado se puede conseguir en el Laboratorio para la Brucelosis del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria/Gobierno de Aragón, Avenida Montañana 930, 50059 Zaragoza, España.

la vacunación, y el ganado adulto vacunado por vía subcutánea 4–5 meses antes con dosis reducida de la cepa S19 de *B. abortus* no da reacciones positivas a menos que los animales resulten infectados y excreten la vacuna con la leche. La vacunación conjuntival (tanto en animales de corta edad como en adultos) reduce significativamente el tiempo de obtención de una respuesta negativa en las pruebas con hapteno nativo. Una característica notable de la prueba con hapteno nativo es que un resultado positivo se correlaciona con la excreción de *Brucella*, como se ha demostrado en ganado bovino infectado experimentalmente y en ganado bovino con infección natural (Jones *et al.*, 1980). En los casos de reacciones FPSR causadas por *Yersinia enterocolitica* O:9 y las FPSR de origen desconocido en ganado bovino, las pruebas de precipitación en gel en las que se usa hapteno nativo o proteínas del citosol de *Brucella* suelen dar resultados negativos (Muñoz *et al.*, 2005).

Estas pruebas con hapteno nativo también resultan de interés en ovejas y cabras, puesto que son muy específicas para discriminar las respuestas serológicas de animales infectados (positivas) de las generadas en animales vacunados por la cepa Rev.1 de *B. melitensis* (normalmente negativas tras un cierto tiempo post-vacunación). La sensibilidad diagnóstica óptima (alrededor el 90%) se obtiene en las pruebas de doble difusión en gel o RID en ovejas y cabras, respectivamente.

2.9. Pruebas en la leche

Un medio eficaz de cribar los rebaños de vacas lecheras es analizar la leche de los tanques. Cuando se obtiene un resultado positivo, deben realizarse análisis de sangre en todas las vacas que aportan leche. La prueba I-ELISA en leche es sensible y específica, y resulta particularmente útil para analizar rebaños grandes. La prueba del anillo de leche (MRT) es una alternativa adecuada cuando no se dispone de ELISA para leche. No obstante, la MRT no es adecuada para leche de pequeños rumiantes.

2.9.1. I-ELISA en leche (solo ganado bovino, ovejas y cabras)

Como ocurre en el caso del I-ELISA para suero, existen varios tipos de I-ELISA para leche. Se han comercializado varios I-ELISA que se han validado en grandes ensayos de campo y que se utilizan mucho. A los efectos de una armonización internacional, los laboratorios nacionales de referencia deben utilizar los tres Sueros Estándar de la OIE para ELISA para comprobar o calibrar cada prueba concreta para el ganado bovino.

2.9.1.1. Estandarización del I-ELISA para leche de ganado bovino

El I-ELISA para leche de ganado bovino debe estandarizarse de modo que el estándar fuertemente positivo de la OIE para ELISA diluido a 1/125 en suero negativo y diluido después a 1/10 en leche negativa dé siempre resultados positivos (EU, 2008).

Las muestras de leche de tanque se analizan generalmente a diluciones mucho más bajas que los sueros, es decir, pueden analizarse no diluidas o bien a diluciones comprendidas entre 1/2 y 1/10 en tampón de dilución, y el resto de la prueba es similar a lo descrito para el suero.

En el I-ELISA para leche pueden observarse falsos positivos, pero normalmente con menor frecuencia que en las pruebas en las que se utiliza sangre.

El I-ELISA para el diagnóstico de anticuerpos anti-*Brucella* en leche de oveja o de cabra es básicamente el mismo que el descrito para ganado bovino, pero debe establecerse adecuadamente el umbral para estas especies a partir de técnicas de validación apropiadas (véase el capítulo 1.1.6). No obstante, no existen recomendaciones para la estandarización internacional del I-ELISA para leche respecto al correspondiente ISaBmS.

2.9.2. Prueba del anillo de leche (solo ganado bovino)

En los animales lactantes, la MRT puede utilizarse para el cribado de la brucelosis en rebaños.

En rebaños grandes (>100 terneros lactantes) la sensibilidad de la prueba tiene menos fiabilidad. La MRT puede ajustarse para compensar el factor de dilución de las muestras de leche de tanque procedentes de rebaños grandes. Las muestras se ajustan de acuerdo con la siguiente fórmula: con un tamaño del rebaño <150 animales se usa 1 ml de leche de tanque, de 150 – 450 animales, se usa una muestra de leche de 2 ml, y de 451–700 animales, se usa una muestra de leche de 3 ml.

Pueden obtenerse falsos positivos en ganado bovino que se hayan vacunado hasta 4 meses antes de la prueba, en muestras de leche anormal (como el calostro) o en casos de mamitis. Por tanto, no se recomienda la utilización de esta prueba en explotaciones muy pequeñas, donde estos problemas ejercen un mayor impacto en los resultados de la prueba.

2.9.2.1. Producción de antígeno

El antígeno para MRT se prepara a partir de suspensiones concentradas de bacterias muertas de *B. abortus* S99 o S1119-3, cultivadas como se ha descrito con anterioridad. Se centrifugan, por ejemplo a 23 000 **g**, durante 10 minutos a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y se resuspenden en una solución de hematoxilina. Se pueden emplear varios métodos, todos ellos satisfactorios; un ejemplo es el siguiente: se añaden 100 ml de hematoxilina al 4% (p/v) (CI N° 75290), disuelta en etanol al 95%, a una solución de sulfato amónico aluminico (5 g) en 100 ml de agua destilada y 48 ml de glicerol. A esta solución se añaden 2 ml de yodato sódico al 10% (p/v) recién preparado. Después de 30 minutos de reposo a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), la solución de color púrpura oscuro se añade a 940 ml de sulfato amónico aluminico al 10% (p/v) en agua destilada. El pH de la mezcla se ajusta a $3,1 \pm 0,2$ y la solución se deja envejecer manteniéndola a temperatura ambiente en la oscuridad durante 45 – 90 días.

La solución de colorante se agita antes de utilizarla y se filtra a través de una gasa. Las células concentradas se suspenden en la solución de colorante a razón de 1 g por cada 30 ml de colorante y se mantienen a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) durante 48 horas (en vez de esto, algunos laboratorios prefieren calentar a 80°C durante 10 minutos). A continuación, las células teñidas se concentran por centrifugación y se lavan tres veces con una solución de cloruro sódico (6,4 g), ácido láctico al 85% (1,5 ml) e hidróxido de sodio al 10% (4,4 ml) en 1,6 litros de agua destilada, a un pH final de $3,0 \pm 0,2$. Las células lavadas se resuspenden a razón de 1 g en 27 ml de un diluyente que consiste en solución salina con fenol al 0,5%, ajustada a pH $4,0 \pm 0,2$ por adición de ácido cítrico 0,1 M (aproximadamente 2,5 ml) e hidrogenofosfato disódico 0,5 M (aproximadamente 1 ml), y se mantiene a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. La mezcla se filtra a través de una gasa, se comprueba el pH, y se determina el PCV ajustándolo aproximadamente al 4%.

2.9.2.2. Estandarización del antígeno

El antígeno debe estandarizarse respecto al OIEISS de tal forma que una dilución a 1/500 sea positiva y una dilución a 1/1 000 sea negativa. La sensibilidad del lote nuevo debe compararse con la de un lote previamente estandarizado utilizando un juego de muestras de varios grados de reacción preparado por dilución de un suero positivo en leche.

El antígeno debe conservarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero generalmente se conserva a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

El pH del antígeno debe ser de $3,5 (\pm 0,2)$ y su color debe ser azul oscuro. Se permite la existencia de un poco de colorante libre en el sobrenadante de una muestra centrifugada. Cuando se diluye en leche de un animal sin brucelosis, el antígeno debe producir una coloración uniforme de la capa de leche sin formar depósitos ni coloración en la capa cremosa.

2.9.2.3. Procedimiento analítico

La prueba se lleva a cabo con las muestras de leche de tanque. Si es necesario, las muestras se pueden pretratar con un conservante (formalina al 0,1% o bronopol al 0,02%) durante 2–3 días a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ antes de su utilización.

- i) Las muestras de leche y el antígeno se deben conservar a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$). Debe sacarse de la nevera solo el antígeno necesario para las pruebas del día.
- ii) Se agita suavemente la botella de antígeno.
- iii) La prueba se lleva a cabo añadiendo 30–50 μl de antígeno a un volumen de 1–2 ml de leche entera (el volumen de leche se puede aumentar en el caso de las muestras de rebaños más grandes – véase más arriba).
- iv) La altura de la columna de leche en el tubo debe ser como mínimo de 25 mm. Las muestras de leche no deben haber sido congeladas, calentadas, sometidas a agitación violenta ni conservadas durante más de 72 horas.

- v) Normalmente, las mezclas de leche y antígeno se incuban a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora junto con los estándares de trabajo positivo y negativo. Sin embargo, la incubación durante la noche a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ aumenta la sensibilidad de la prueba y permite una lectura más fácil.
- vi) Una reacción fuertemente positiva viene indicada por la formación de un anillo azul oscuro por encima de la columna blanca de leche. Toda capa azul en la interfase de leche y de crema debe considerarse como positiva y podría ser significativa, especialmente en el caso de rebaños grandes.
- vii) La prueba se considera negativa si el color de la leche, en la parte inferior, supera al de la capa cremosa.
- viii) Cuando se ajusta la MRT para aplicarla a rebaños de gran tamaño (utilizándose 2 o 3 ml de leche), se añaden 0,1 ml de una mezcla de nata negativa al tubo de ensayo y a continuación 30–50 μl del antígeno de la prueba del anillo. Después de mezclar, la prueba se incuba y se lee de la misma forma que para la MRT no ajustada. La mezcla de nata negativa se recoge mediante la separación de la leche compuesta por varias muestras y sin pasteurizar correspondiente a un rebaño de 25 o más vacas que sean negativas a la brucelosis.

2.10. Pruebas serológicas en fauna salvaje

En la fauna salvaje, las pruebas serológicas suelen llevarse a cabo con fines de cribado. En estas circunstancias concretas, es fundamental disponer de una buena especificidad. La RBT puede recomendarse como prueba de diagnóstico general en todas las especies de fauna salvaje. La CFT también podría recomendarse de forma general, pero la temperatura de inactivación del complemento y los títulos umbral no están bien documentados en todas las especies salvajes. Ambas pruebas requieren muestras de suero de calidad que no son fáciles de obtener en especies salvajes. Tanto en el caso de la RBT como en el de la CFT, al analizar muestras de suero de baja calidad los resultados suelen ser imposibles de interpretar. El I-ELISA y el C-ELISA parecen ser útiles para estudios de serovigilancia en animales salvajes, porque ambos suelen ser más fiables que la RBT y que la CFT y, además, pueden usarse con sueros de mala calidad y hemolizados (Stack *et al.*, 1999). Otra ventaja de los ELISA es que, si no se dispone de suero, permiten analizar muestras de jugo de carne. Debe prestarse atención al conjugado que se use en el I-ELISA, que debe tener una afinidad satisfactoria a los isotipos de los anticuerpos correspondientes de las especies salvajes que se estén estudiando. No obstante, en las especies salvajes, la interpretación de los resultados del ELISA puede ser problemática debido a la falta de estudios de validación. Siempre que sea posible, deben establecerse adecuadamente los umbrales de los ELISA para cada especie empleando técnicas de validación apropiadas (véase el capítulo 1.1.6). Aun así, en caso de obtener resultados serológicos positivos o ambiguos y siempre que sea posible, debe realizarse una comprobación bacteriológica para aclarar el diagnóstico.

3. Pruebas de determinación de la inmunidad celular

3.1. Prueba cutánea de la brucelina

Una prueba inmunológica alternativa es la prueba cutánea de la brucelina, que puede utilizarse para el cribado en rebaños no vacunados siempre que se utilice una preparación antigénica purificada (libre de LPS) y estandarizada. La prueba cutánea de la brucelina tiene una especificidad muy alta, de modo que los animales sin vacunar que son serológicamente negativos y reaccionan positivamente en la prueba de la brucelina deben considerarse animales infectados (Pouillot *et al.*, 1997). La prueba cutánea de la brucelina también tiene una sensibilidad alta para el diagnóstico de la infección por *B. melitensis* en pequeños rumiantes y, en ausencia de vacunación, se considera una de las pruebas de diagnóstico más específicas.

La brucelina se creó para ser utilizada en rumiantes, pero también es efectiva para confirmar la enfermedad en cerdos a nivel de piara. En ensayos de campo también se ha comprobado que es sensible para el diagnóstico de cerdos infectados por *Brucella* (Dieste-Pérez *et al.*, 2014). Además, los resultados de esta prueba pueden contribuir a la interpretación de las reacciones serológicas que se consideran falsos positivos debidos a una infección por bacterias que presentan reacción cruzada, dado que los animales que dan falsos positivos en las pruebas serológicas siempre dan negativo en la prueba cutánea (Dieste-Pérez *et al.*, 2014; Pouillot *et al.*, 1997).

Los animales vacunados con la cepa Rev.1 de *B. melitensis* o con las cepas S19 o RB51 de *B. abortus* pueden dar positivo en esta prueba durante varios años después de la vacunación (Pouillot *et al.*, 1997; De Massis *et al.*, 2005). Por lo tanto, esta prueba no puede recomendarse ni como prueba

de diagnóstico única ni para el comercio internacional en zonas en las que se empleen vacunas contra *Brucella*. Además, no todos los animales infectados reaccionan, y por lo tanto esta prueba no puede, por sí sola, recomendarse como prueba de diagnóstico única ni para el comercio internacional. No obstante, debido a su alta especificidad y a su suficiente sensibilidad a nivel de rebaño o manada, puede recomendarse para la vigilancia de rebaños/manadas en zonas libres de brucelosis.

Es fundamental utilizar una preparación estandarizada y definida de brucelina que no contenga antígeno sLPS, ya que este puede producir reacciones inflamatorias inespecíficas o interferir con pruebas serológicas posteriores. Una preparación de ese tipo es la brucelina INRA preparada a partir de una cepa rugosa de *B. melitensis* (cepa B115) que está comercializada, aunque es posible que en el futuro se creen preparaciones alternativas a partir de mutantes de cepas rugosas de *Brucella* (Dieste-Pérez *et al.*, 2014).

Aunque es probable que la prueba intradérmica de la brucelina sea una de las más específicas para el diagnóstico de la brucelosis (en animales no vacunados), el diagnóstico definitivo no puede basarse solamente en reacciones intradérmicas positivas de unos cuantos animales del rebaño, sino en una prueba de diagnóstico complementaria. La inoculación intradérmica de brucelina induce una anergia temporal de la respuesta inmunitaria celular, al menos en algunas especies (Blasco *et al.*, 1994b). Por tanto, en general se recomienda un intervalo de 6 semanas entre dos pruebas realizadas en el mismo animal.

3.1.1. Procedimiento analítico

3.1.1.1. Infección por *Brucella* en ganado bovino

- i) Se inyectan por vía intradérmica 0,1 ml de brucelina (2 000 Unidades/ml) en el pliegue caudal, en la piel del flanco o en la de un lado del cuello.
- ii) La prueba se lee pasadas 48–72 horas.
- iii) El grosor de la piel en el punto de inyección se mide con un calibrador Vernier antes de la inyección y en el momento de volver a examinar al animal.
- iv) Una reacción positiva fuerte se reconoce fácilmente porque es una hinchazón local con induración. No obstante, las reacciones dudosas deben interpretarse con cautela. Un engrosamiento de la piel de 1,5 – 2 mm debe considerarse una reacción positiva.

3.1.1.2. Infección por *Brucella* en ovejas y cabras

- i) Se inyectan por vía intradérmica 0,1 ml de brucelina (2 000 Unidades/ml) en el párpado inferior.
- ii) La prueba se lee pasadas 48 horas.
- iii) Toda reacción visible o palpable de hipersensibilidad, como una reacción edematosa que conduzca a una elevación de la piel o engrosamiento del párpado (≥ 2 mm), debe interpretarse como reacción positiva.

3.1.1.3. Infección por *Brucella* en cerdos

Como agente de diagnóstico en cerdos, se inyectan por vía intradérmica 0,1 ml de la suspensión de alérgeno (2 000 Unidades/ml) en la piel de la base de la oreja o, preferiblemente, cerca de la base de la cola. Este segundo lugar parece ser más práctico y menos peligroso. La reacción se evalúa mediante inspección y palpación de la zona inoculada pasadas 48 horas y la reacción positiva se caracteriza por un eritema de la piel no pigmentada y una tumefacción edematosa. En algunos casos, también puede haber cierto sangrado/necrosis.

3.2. Prueba de liberación de interferón gamma

Para la liberación de interferón gamma es necesaria la estimulación linfocitaria en sangre entera con un antígeno adecuado, como la brucelina. La producción resultante de interferón gamma (IFN- γ) se detecta mediante un ELISA de captura. Esta prueba podría ser útil para discriminar entre brucelosis y falsos positivos serológicos, pero todavía se precisan antígenos más específicos y el protocolo debe estandarizarse y validarse adecuadamente en cada especie animal y situación epidemiológica. Por ahora, no se dispone de ningún protocolo totalmente validado.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL BIOLÓGICO DE DIAGNÓSTICO

1. Vacunas

Como se ha mencionado anteriormente, la brucelosis es una de las infecciones de laboratorio más fáciles de contraer y exige la aplicación de estrictas medidas de seguridad. La manipulación en los laboratorios de cultivos vivos de *Brucella*, incluidas las cepas vacunales, es peligrosa y debe realizarse a un nivel de contención y bioseguridad adecuado, que se determinará a partir de un análisis del riesgo biológico (véase el capítulo 1.1.4). En caso de inoculación o exposición accidental, es necesario acudir al médico (véase el apartado C. 1.2.3.2.3 Precauciones) (Ashford *et al.*, 2004; Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis, 1986; USDA, 2003).

1.1. Antecedentes

1.1.1. Vacuna con la cepa 19 de *Brucella abortus*

Una vacuna muy utilizada para prevenir la brucelosis en el ganado bovino es la vacuna que se prepara con la cepa S19 de *B. abortus*, que continúa siendo la vacuna de referencia con la que se compara el resto de las vacunas. Se utiliza como una vacuna viva que por lo general se administra a terneros de entre 3 y 6 meses de edad en forma de una dosis única subcutánea de $5-8 \times 10^{10}$ microorganismos viables. Se puede administrar al ganado adulto una dosis subcutánea reducida de 3×10^8 a 3×10^9 microorganismos, pero algunos animales generan títulos persistentes de anticuerpos y pueden abortar y excretar la cepa vacunal con la leche. Como alternativa, se puede administrar a ganado de cualquier edad en una o dos dosis de 5×10^9 microorganismos viables por vía conjuntival; esto produce protección frente a *B. abortus* (Nicoletti *et al.*, 1978) y frente a *B. melitensis* (Jiménez de Bagües *et al.*, 1991) sin una respuesta duradera de anticuerpos y reduce los riesgos de aborto y de la excreción en la leche cuando se vacuna ganado bovino adulto.

La vacuna con la cepa S19 de *B. abortus* induce una buena inmunidad frente a la exposición moderada a *B. abortus* o a *B. melitensis* virulentos. La vacuna debe prepararse a partir de inóculos derivados del USDA (la dirección se indica en la nota 2 a pie de página) y en cada lote debe comprobarse la pureza (ausencia de microorganismos extraños), la viabilidad (bacterias vivas por dosis) y si las cepas son o no lisas (determinación de la fase de disociación). La virulencia residual y la inmunogenicidad de los lotes de inóculo para la producción de vacuna con la cepa S19 de *B. abortus* deben comprobarse regularmente en ratones.

Los procedimientos de control para esta vacuna se indican en el apartado C. 1.2.2.3 *Controles durante el proceso*.

1.1.2. Vacuna con la cepa RB51 de *Brucella abortus*

Desde 1996, en muchos países la cepa RB51 de *B. abortus* es la que se utiliza en la vacuna oficial para la prevención de la brucelosis en el ganado bovino. Sin embargo, la eficacia de la cepa RB51 en comparación con la protección inducida por la S19 en el ganado bovino es motivo de controversia (Moriyón *et al.*, 2004). Cada país utiliza métodos ligeramente diferentes de administración de la vacuna. En EE.UU. (un país que estaba casi libre de brucelosis bovina antes de que se introdujera la cepa RB51), los terneros se vacunan por vía subcutánea entre los 4 y 12 meses con $1-3,4 \times 10^{10}$ microorganismos viables. La vacunación del ganado de más de 12 meses solo se lleva a cabo con la autorización de organizaciones estatales o federales de Sanidad Animal, y la dosis recomendada es de $1-3 \times 10^9$ microorganismos viables (USDA, 2003). En otros países, se recomienda la vacunación de terneros (4-12 meses) con dosis de $1-3,4 \times 10^{10}$, y la revacunación desde los 12 meses en adelante con una dosis similar para inducir un efecto de recuerdo y aumentar la inmunidad.

Sin embargo, se ha observado que dosis completas de vacuna preparada con la cepa RB51 de *B. abortus* administradas por vía intravenosa a ganado bovino inducen placentitis e infecciones placentarias graves en la mayor parte del ganado vacunado, y que se produce excreción con la leche en una parte importante de los animales vacunados. La experiencia de campo también indica que pueden inducir aborto y aumento de la mortalidad perinatal si se aplican a vacas gestantes. Debido a estas observaciones, debe evitarse la vacunación de las vacas gestantes con RB51 de *B. abortus*. Una forma de reducir los efectos secundarios de la cepa RB51 de *B. abortus* es reducir la dosis. Al reducir la dosis de la vacuna (1×10^9 unidades formadoras de colonia [UFC]) en vacas gestantes que se encuentran al final de la gestación, no se observan abortos ni lesiones por placentitis, pero la cepa vacunal puede excretarse en un porcentaje importante de los animales vacunados. Sin embargo, esta dosis baja no protege contra

B. abortus cuando se utiliza en terneros, mientras que la protección frente a *B. abortus* en ganado adulto es solo moderada. Se desconoce el grado de protección que confiere RB51 de *B. abortus* contra la infección por *B. melitensis* en ganado bovino.

Los procedimientos de control para esta vacuna se indican en el apartado C.1.2.2.3.

1.1.3. Vacuna con la cepa Rev.1 de *Brucella melitensis*

Es frecuente aislar *B. melitensis* en ganado bovino de países con una prevalencia alta de esta infección en pequeños rumiantes (Verger, 1985). Ha habido cierto debate sobre la eficacia de la protección de la cepa S19 de *B. abortus* contra la infección por *B. melitensis* en ganado bovino, pero hay pruebas documentadas de que esta vacuna permite controlar *B. melitensis* en ganado bovino. Se ha establecido la hipótesis de que en estas condiciones la Rev.1 de *B. melitensis* debería ser una vacuna más eficaz que la S19 de *B. abortus*. No obstante, hay muy poca información relacionada con este tema (Comité Mixto FAO/WHO de Expertos en Brucelosis, 1986) y no se han realizado pruebas que demuestren la eficacia de la cepa Rev.1 de *B. melitensis* en la infección de las vacas. Además, en este ganado la seguridad de la vacuna con Rev.1 es prácticamente desconocida. Mientras no se hayan realizado estudios sobre la seguridad de Rev.1 en ganado bovino de distintas fases fisiológicas y sobre la eficacia contra *B. melitensis* en condiciones estrictamente controladas, esta vacuna no puede recomendarse para ganado bovino.

La cepa Rev.1 de *Brucella melitensis* es la que más se utiliza como cepa vacunal para la prevención de la brucelosis en ovejas y cabras, y, a pesar de sus inconvenientes, sigue siendo la vacuna de referencia con la cual deben compararse las demás. Por el contrario, la vacuna con la cepa rugosa RB51 de *B. abortus* no es efectiva contra la infección por *B. melitensis* en ovejas. La vacuna con la cepa Rev.1 se usa como suspensión liofilizada de cepa Rev.1 de *B. melitensis* viva para la vacunación de ovejas y cabras. Debe administrarse a corderos y cabritos de entre 3 y 5 meses en forma de inoculación única por vía subcutánea o conjuntival, y los 5 meses son el límite máximo para minimizar la respuesta de anticuerpos y hacer que esta vacunación sea compatible con las posteriores pruebas serológicas. Sea cual sea la vía de inoculación, la dosis estándar debe situarse entre los $0,5 \times 10^9$ y los $2,0 \times 10^9$ microorganismos viables. Las dosis bajas confieren una protección significativamente menor que las estándar, y no deben recomendarse para la vacunación de ovejas y cabras. La vacunación subcutánea induce respuestas serológicas duraderas, causa interferencias fuertes con las pruebas serológicas y no debe recomendarse para su uso en programas de erradicación combinados.

No obstante, cuando esta vacuna se administra por vía conjuntival a la dosis estándar, confiere una protección similar sin inducir una respuesta persistente de anticuerpos, facilitando así la aplicación de programas de erradicación combinados con la vacunación. Al utilizar la vacuna con la cepa Rev.1 de *B. melitensis* debe procederse con cuidado de evitar el riesgo de contaminar el ambiente o de causar infección humana. En muchos países en vías de desarrollo y en zonas endémicas, la vacunación de la totalidad de la población debe considerarse la mejor opción para el control de la enfermedad (Blasco, 1997). No obstante, se sabe que la vacuna con Rev.1 a menudo causa aborto y excreción en leche cuando los animales se vacunan durante la gestación, ya sea con dosis completa o reducida (Blasco, 1997). Estos efectos secundarios se reducen considerablemente cuando se vacuna al ganado adulto por vía conjuntival (dosis completa) durante el parto (ovejas y cabras), la lactación o antes de la monta. Por lo tanto, cuando la vacunación masiva es la única forma de controlar la enfermedad, debe recomendarse una campaña de vacunación empleando la dosis estándar de Rev.1 administrada por vía conjuntival en animales no están gestantes o al final de la época de partos y antes de la siguiente monta (Blasco, 1997).

La vacunación por vía subcutánea de animales de corta edad o adultos, incluso a dosis bajas, puede conducir a la persistencia de anticuerpos vacunales a largo plazo en un porcentaje alto de la población de animales vacunados con Rev.1 que crea interferencias importantes con el diagnóstico serológico de la brucelosis. Como se ha indicado anteriormente, la vacunación por vía conjuntival minimiza estos problemas (sobre todo cuando el límite máximo de edad para la vacunación es de 5 meses) y, por lo tanto, es el método de elección para los programas de erradicación combinados. Así, en el diagnóstico serológico de la brucelosis debe tenerse en cuenta el estado vacunal del rebaño y la distribución de frecuencias de los títulos de anticuerpos detectados en el grupo de animales analizados.

Los procedimientos de control para esta vacuna se indican en el apartado C.1.2.2.3.

1.1.4. Vacunación de cerdos

Se ha intentado crear una vacuna adecuada para vacunar cerdos contra *B. suis*, pero ninguna ha llegado a ser del todo efectiva. Solo se ha observado efectividad en la vacuna preparada a partir de la cepa 2 de *Brucella suis* (S2) tras haber sido muy utilizada en condiciones de campo en China (Rep. Pop. De), pero no se dispone de datos de eficacia contra la infección por *B. suis* en condiciones estrictamente controladas. También se ha comprobado que la vacuna con la cepa RB51 de *B. abortus* es ineficaz para la protección de los cerdos contra *B. suis* (Stoffregen *et al.*, 2006).

1.2. Descripción de la producción y requisitos

1.2.1. Características del inóculo

1.2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

El inóculo primario de *B. abortus* S19 para la producción de vacunas debe obtenerse del USDA (la dirección se indica en la nota 4 a pie de página) y utilizarse para producir un lote de inóculos conservado por liofilización o por congelación a temperatura de nitrógeno líquido. Las propiedades de este lote de inóculos deben ser las de un cultivo puro de *B. abortus* biovariedad 1 no dependiente de CO₂, que sea sensible a la bencilpenicilina (3 µg [5 IU]/ml), al azul de tionina (2 µg/ml) y al i-eritritol (1 µg/ml), y que tenga una patogenicidad muy baja en cobayas.

Los inóculos originales para la producción de la vacuna *Brucella abortus* RB51 están disponibles comercialmente. También se pueden obtener del USDA (para la dirección, ver nota 4 de pie de página). *Brucella abortus* RB51 tiene las propiedades normales de una cepa bv.1 de *B. abortus*, pero está 100% en fase rugosa y crece en presencia de rifampicina (250 µg/ml).

El inóculo primario de *B. melitensis* Rev.1 para la producción de vacuna está comercializado. Existe una cepa Rev.1 de referencia a nivel europeo que posee las características del inóculo original de Rev.1 que también puede obtenerse en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la Brucelosis, en Francia (la dirección se indica en la nota 5 a pie de página). La cepa Rev.1 debe cumplir las características de la bv. 1 de *B. melitensis*, excepto por el hecho de que debe crecer más lentamente. Además, cuando se incuba en aire (las atmósferas con CO₂ alteran los resultados) a 37°C± 2°C, debe crecer en agar que contenga estreptomina (2,5 µg/ml), y debe inhibirse al añadir, a un medio de cultivo adecuado, bencilpenicilina sódica (3 µg [5 IU]/ml), tionina (20 µg/ml) o fucsina básica (20 µg/ml).

Para caracterizar las vacunas preparadas con S19, RB51 o Rev.1 se han empleado PCR y técnicas moleculares (véase el apartado B.1.4).

Los requisitos específicos para la producción de vacuna con las cepas S19 o Rev.1 indican que los lotes de siembra (es decir, el cultivo que se utilice para inocular el medio para la producción de vacuna) no pueden haber sido sometidos a más de tres pases desde un lote de siembra o un inóculo original. Antes de su uso, siempre debe comprobarse si el cultivo de inóculo original presenta disociación. El método recomendado para preparar el material de siembra se indica en Alton *et al.* (1988).

1.2.1.2. Criterios de calidad

Debe comprobarse si los inóculos primarios de Rev.1 de *B. melitensis* y de S19 y RB51 de *Brucella abortus* presentan pureza, identidad y, cuando corresponda, si son lisos o rugosos. Los lotes de siembra de S19 y de Rev.1 también deben cumplir las características de virulencia residual e inmunogenicidad en ratones que presenta el inóculo original.

1.2.1.2.1. Pureza

Las pruebas de pureza y de ausencia de contaminación por sustancias biológicas se hallan en el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*.

1.2.1.2.2. Inocuidad

Las vacunas preparadas con S19 y Rev.1 presentan escasa virulencia, pero para ser efectivas deben conservar un mínimo de virulencia (véase el apartado C. 1.2.1.2.3 *Potencia*). No obstante, no suelen realizarse pruebas de inocuidad. Si se desea, cuando se inicia un nuevo proceso de fabricación y cuando es esperable una modificación en la inocuidad de las preparaciones vacunales con S19 y Rev.1, pueden realizarse en ganado ovino (S19) y en ovejas y cabras (Rev.1). Este control debe realizarse del siguiente modo: en la prueba se usan 12 terneras u ovejas/cabras (hembras), respectivamente, de edades comprendidas entre los 4 y los 6 meses. A seis hembras de corta edad se les inyectan una o tres veces la dosis recomendada. Cada lote de seis hembras jóvenes se aloja por separado. Todos los animales se observan durante 21 días. No debe tener lugar ninguna reacción importante, ni local ni sistémica. Si al usar una dosis o vía de administración la prueba da buenos resultados para un lote representativo de la vacuna, no es necesario repetir sistemáticamente la prueba con los lotes de siembra o de vacuna que se hayan preparado con el mismo inóculo original y con el mismo proceso de fabricación. También puede llevarse a cabo una prueba de inocuidad con la vacuna S19/Rev.1 en cobayas. Se administran a grupos de al menos diez animales y por vía intramuscular, inyecciones de dosis de vacuna diluida en PBS, a un pH de $7,2 \pm 0,2$, que contengan 5×10^9 microorganismos viables. Los animales no pueden presentar efectos adversos manifiestos y no puede haber mortalidad.

Si esta prueba de inocuidad da buenos resultados para un lote representativo de la vacuna en estudio, no es necesario repetir sistemáticamente la prueba con los lotes de vacuna que se hayan preparado con el mismo inóculo y con el mismo proceso de fabricación.

Si se desea llevar a cabo una prueba de inocuidad para RB51, puede inyectarse a hembras de ratón Balb/c de 8–10 semanas, por vía intraperitoneal, 1×10^6 UFC, realizando un cultivo de los bazos a las 6 semanas post-inoculación. Los bazos deben estar libres de RB51 y los ratones no pueden generar anticuerpos anti-OPS.

1.2.1.2.3. Potencia

i) Vacuna S19

Una vacuna S19 es efectiva si posee las características de la cepa original S19, es decir, si es satisfactoria respecto a la identidad y a la disociación. Además, debe haberse producido con un lote determinado de inóculo con suficiente inmunogenicidad y virulencia residual (Grilló *et al.*, 2000).

a) Identidad

En las vacunas, *Brucella abortus* se identifica mediante pruebas morfológicas, serológicas y bioquímicas adecuadas, y mediante cultivo: *B. abortus* S19 tiene las propiedades normales de una cepa bv1 de *B. abortus*, pero no requiere CO₂ para el crecimiento, no crece en presencia de bencilpenicilina (3 µg/ml = 5 IU/ml), azul de tionina (2 µg/ml) e i-eritritol (1 mg/ml) (todas son concentraciones finales). Se han descrito PCR y técnicas moleculares para identificar la cepa vacunal S19 (véase el apartado B.1.4).

b) Tersura (determinación de la fase de disociación)

La vacuna S19 reconstituida en agua purificada se siembra por estría en seis placas de agar (agar suero-dextrosa o agar tripticasa-soja (TSA) con suero al 5% [v/v] o extracto de levadura al 0,1 % [p/v]), de tal forma que las colonias queden agrupadas en ciertas zonas, pero semi-separadas y separadas en otras. Las ligeras diferencias de aspecto son más evidentes en las colonias adyacentes que en las que están muy separadas. Las placas se incuban a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 días y se examinan mediante luz reflejada oblicua (método de Henry) antes y después de la tinción (tres placas) con cristal violeta (método de tinción de White y Wilson).

Aspecto de las colonias antes de la tinción: Las colonias S son redondas, brillantes y de color entre azul y azul-verdoso. Las colonias R tienen un aspecto seco y granular y son de color blanco amarillento mate. Las colonias mucoides (M) son transparentes y grisáceas, y pueden distinguirse por su consistencia viscosa al tocarlas con un asa de siembra. Las colonias intermedias (I), que

son las más difíciles de clasificar, tienen un aspecto intermedio entre las formas S y R: son ligeramente opacas y más granulares que las colonias S.

Aspecto de las colonias tras la tinción con cristal violeta: Las colonias S no captan la tinción. Las colonias disociadas (I, M o R) se tiñen de tal forma que presentan varios tonos de rojo y púrpura y la superficie puede presentar grietas radiales. A veces, de una colonia disociada se desprende una película superficial teñida y se observa junto a aquella.

La fase de la colonia puede confirmarse mediante la prueba de aglutinación con acriflavina (Alton *et al.*, 1988). Las colonias S permanecen en suspensión, mientras que las R se aglutinan de inmediato y, si son mucoides, forman hebras. Las colonias intermedias pueden permanecer en suspensión o pueden presentar una aglutinación muy fina.

Deben estar en la fase lisa al menos un 99% de las células de los lotes de inóculo.

- c) Virulencia residual (tiempo hasta la persistencia en el 50% o tiempo hasta la recuperación en el 50%) (Grilló *et al.*, 2000; Pouillot *et al.*, 2004)
- 1) Se preparan suspensiones adecuadas del inóculo de *B. abortus* S19 que tenga que analizarse (vacuna problema) y del cultivo de inóculo original de S19 (como cepa de referencia). Para ello, se recoge el crecimiento de 24-48 horas de cada cepa en una solución salina tamponada estéril (BSS: NaCl 8,5 g; KH₂PO₄ 1,0 g; K₂HPO₄ 2,0 g; agua purificada 1 000 ml; pH 6,8 ± 0,2) y la suspensión se ajusta en BSS a 10⁹ UFC/ml con un espectrofotómetro (DO 0,170 al realizar la lectura a 600 nm). A continuación, debe comprobarse el número exacto de UFC/ml sembrando en un medio de cultivo adecuado en placa diluciones decimales seriadas (se recomienda agar sangre o TSA).
 - 2) Se inyectan por vía subcutánea 0,1 ml (10⁸ UFC/ratón) de la suspensión que contenga la vacuna problema a 32 hembras de ratón CD1, de entre 5 y 6 semanas. Paralelamente, se realiza una inoculación similar a otros 32 ratones empleando la suspensión con la cepa de referencia S19. La cepa S19 del inóculo original, que ha demostrado ser satisfactoria respecto a inmunogenicidad y/o virulencia residual, puede obtenerse en el USDA (la dirección se indica en la nota 4 a pie de página).
 - 3) Los ratones se sacrifican mediante dislocación cervical, en grupos de ocho escogidos aleatoriamente 3, 6, 9 y 12 semanas después.
 - 4) Se extraen los bazos y se homogeneizan individualmente y de forma aséptica con un mortero de vidrio (o en bolsas estériles adecuadas con un Stomacher) en 1 ml de BSS estéril.
 - 5) Se siembra cada suspensión de bazo entero *in toto* en varias placas que contengan medio de cultivo adecuado y se incuban en las condiciones estándar para *Brucella* durante 5-7 días (límite inferior de detección: 1 bacteria por bazo). Un animal se considera infectado cuando se aísla de su bazo al menos 1 UFC.
 - 6) Se calcula el tiempo que transcurre hasta que se llega a una persistencia en el 50% de los ratones o el que transcurre hasta que se llega a una recuperación del 50% de los ratones (RT₅₀) mediante el método estadístico SAS® desarrollado específicamente para cálculos de RT₅₀⁷. Para ello, se determina el número de ratones curados (en cuyos bazos no se ha aislado ninguna colonia) en cada momento de sacrificio (ocho cada vez) y se calcula el porcentaje de ratones curados acumulados a lo largo del tiempo, mediante el método de Reed y Muench (véase la referencia citada por Grilló *et al.*, 2000). La función de distribución de este porcentaje describe una curva sigmoidea, que debe linealizarse para calcular los valores de RT₅₀, empleando el procedimiento PROBIT computadorizado del paquete estadístico SAS®.

7 Para obtener el archivo SAS® específico, consúltese el Laboratorio de Referencia de la OIE para la brucelosis, en Francia

- 7) Se compara estadísticamente el paralelismo (ordenada en origen y pendiente) entre las líneas de distribución obtenidas para las cepas S19 problema y de referencia empleando el archivo SAS® específicamente diseñado para este fin. Solo pueden compararse dos valores de RT₅₀ cuando proceden de líneas de distribución paralelas. Si no existe paralelismo, la virulencia residual de la cepa problema debe considerarse insuficiente y no esta puede usarse para producir vacuna.
- 8) Si se confirma el paralelismo, los valores de RT₅₀ obtenidos para las cepas S19 problema y de referencia se comparan estadísticamente mediante el archivo SAS® específicamente diseñado para este fin. Para que la cepa pueda ser aceptada para la producción de vacuna, el RT₅₀ obtenido con la cepa problema no debe diferir significativamente del obtenido con la cepa S19 de referencia (el RT₅₀ y los límites de confianza suelen situarse alrededor de las 7,0 ± 1,3 semanas).

La base del procedimiento estadístico para realizar los cálculos de la virulencia residual está descrita en detalle (véase la ref. citada por Grilló *et al.*, 2000). Como alternativa, los cálculos estadísticos descritos en los pasos 6 a 8 anteriores pueden evitarse si se emplea un programa script HTML-JAVA específico y fácil de usar (Rev. 2), que además es gratuito (véase la nota 5 a pie de página) (Pouillot *et al.*, 2004).

Si esta prueba da buenos resultados en un lote de siembra representativo, no es necesario repetirla sistemáticamente con los otros lotes de siembra y de vacuna que se hayan preparado a partir de la misma cepa de inóculo y con el mismo proceso de fabricación.

d) Inmunogenicidad en ratones (Grilló *et al.*, 2000)

En esta prueba se usan tres grupos de seis hembras de ratón CD1 de entre 5 y 7 semanas que se habrán seleccionado aleatoriamente.

- 1) Se preparan las suspensiones vacunales y se ajustan mediante espectrofotometría como se indica arriba.
- 2) Se inyecta por vía subcutánea una suspensión de 10⁵ UFC (en un volumen de 0,1 ml/ratón) de la vacuna en estudio (vacuna problema) a cada uno de los seis ratones del primer grupo.
- 3) Se inyecta por vía subcutánea una suspensión de 10⁵ UFC de bacterias vivas de la vacuna S19 de referencia a cada uno de los seis ratones del segundo grupo. El tercer grupo servirá como grupo control no vacunado y debe inocularse por vía subcutánea con 0,1 ml de BSS.
- 4) El número exacto de UFC inoculadas debe comprobarse después sembrando en un medio de cultivo adecuado en placa diluciones decimales seriadas (se recomienda agar sangre o TSA).
- 5) Todos los ratones se exponen por vía intraperitoneal, 30 días después de la vacunación (e inmediatamente después de 16 horas de ayuno), a una suspensión (0,1 ml/ratón) de 2 × 10⁵ UFC de la cepa 544 de *B. abortus* (dependiente de CO₂), preparada, ajustada y comprobada de forma retrospectiva como se indica arriba.
- 6) Los ratones se sacrifican mediante dislocación cervical 15 días después.
- 7) Se extraen los bazos de forma aséptica, y después de retirar la grasa, se pesan y homogeneizan.
- 8) Como alternativa, los bazos se pueden congelar y conservar a ≤ -16°C durante 24 horas a 7 semanas.
- 9) Cada bazo se homogeneiza de forma aséptica en un mortero de vidrio (o en bolsas estériles adecuadas en Stomacher) en nueve veces su peso de BSS, a un pH de 6,8 ± 0,2 y se realizan tres diluciones decimales seriadas (1/10, 1/100 y 1/1000) de cada homogenado en el mismo diluyente. Se siembran 0,2 ml de cada dilución por cuadruplicado en placas de agar y se incuban dos de las placas en una atmósfera con un 10% de CO₂ (que permite el crecimiento de cepas tanto vacunales como problema) y las

otras dos en aire (que inhibe el crecimiento de la cepa de desafío 544 de *B. abortus* dependiente de CO₂), ambas a 37°C ± 2°C durante 5 días.

- 10) Las colonias de *Brucella* (*B. abortus* 544) deben contarse en las diluciones correspondientes a las placas que presenten menos de 300 UFC. Cuando en las placas correspondientes a la dilución 1/10 no se observe ninguna colonia, se considerará que el bazo está infectado por cinco bacterias. Estos números de *Brucella* por bazo se registran inicialmente como X y se expresan como Y, tras la siguiente transformación: $Y = \log(X/\log X)$. A continuación, se calcula la media y la desviación estándar, que son la respuesta de cada grupo de seis ratones.
- 11) Las condiciones del experimento control son satisfactorias cuando: i) la respuesta de los ratones no vacunados (media de Y) es de al menos 4,5; ii) la respuesta de los ratones vacunados con la vacuna S19 de referencia es inferior a 2,5; y iii) la desviación estándar calculada para cada lote de seis ratones es inferior a 0,8.
- 12) Se llevan a cabo comparaciones estadísticas (se recomienda la prueba de la diferencia mínima significativa) de los valores de inmunogenicidad obtenidos en ratones vacunados con la cepa S19 problema respecto a los obtenidos en ratones vacunados con la vacuna de referencia y en el grupo control no vacunado. La vacuna problema sería satisfactoria si el valor de inmunogenicidad obtenido en ratones vacunados con esta vacuna fuera significativamente inferior al obtenido en los controles no vacunados y, además, no difiriera significativamente del obtenido en ratones vacunados con la vacuna de referencia (para más información sobre este procedimiento, consúltese la dirección de contacto en la nota 5 a pie de página).

Si esta prueba da buenos resultados en un lote de siembra representativo, no es necesario repetirla sistemáticamente con los otros lotes de siembra y de vacuna que se hayan preparado a partir de la misma cepa de inóculo y con el mismo proceso de fabricación.

ii) Vacuna RB51

Un lote de vacuna RB51 debe poseer las características de la cepa original RB51, es decir, ser satisfactoria respecto a la identidad, la tersura y la potencia.

a) Identidad

La vacuna RB51 reconstituida no debe contener microorganismos exógenos. La bacteria *B. abortus* presente en la vacuna se identifica por pruebas morfológicas, serológicas y bioquímicas adecuadas, y por cultivo: *B. abortus* RB51 tiene las propiedades normales de una cepa de *B. abortus* biovariedad 1 pero se encuentra al 100% en la fase rugosa y crece en presencia de rifampicina (250 µg/ml). Se han descrito PCR y técnicas moleculares para caracterizar en mayor medida la cepa vacunal RB51 (véase el apartado B.1.4).

b) Tersura (determinación de la fase de disociación)

Los procedimientos técnicos indicados para la vacuna S19 (véase el apartado C.1.2.1.2.3.i Vacuna S19, arriba) deben aplicarse también a la RB51. El 100% de las células RB51 deben estar en la fase rugosa. Además, en el caso de la RB51, las colonias deben ser negativas en las pruebas de transferencia puntual con MAb específicos para el antígeno OPS.

c) Potencia

En EE.UU., dado que la dosis (UFC) de inóculo primario se correlacionó con la protección como parte del registro de RB51 para su uso en ganado bovino, de forma habitual no se realizan pruebas de potencia *in vivo* para series de la vacuna RB51. En EE.UU., se han autorizado recuentos en placa de microorganismos viables y se usan como medida de la potencia (esta estrategia es idéntica a la prueba de potencia que se aplica a la vacuna S19 en EE.UU.). (USDA, 2003). Se ha debatido en cierto detalle el uso de vacunas rugosas contra la brucelosis (Moriyón *et al.*, 2004).

iii) Vacuna Rev.1

Una vacuna Rev.1 es eficiente si posee las características de la cepa original Rev.1, es decir, si es satisfactoria respecto a la identidad y la disociación. Además, debe haberse producido con un lote de inóculo determinado que presente suficiente inmunogenicidad y virulencia residual (Grilló *et al.*, 2000).

a) Identidad

La bacteria *Brucella melitensis* presente en la vacuna se identifica por pruebas morfológicas, serológicas y bioquímicas adecuadas, y por cultivo: cuando se incuba en aire a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, la cepa Rev.1 se inhibe al añadir a un medio de cultivo adecuado 3 μg (5 UI) por ml de bencilpenicilina, tisonina (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o fucsina básica (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$); la cepa crece en agar con 2,5 μg por ml de estreptomycin. Se han descrito PCR y técnicas moleculares para caracterizar en mayor medida la cepa vacunal Rev.1 (véase el apartado B.1.4).

b) Tersura (determinación de la fase de disociación)

Los procedimientos técnicos indicados para la vacuna S19 (véase el apartado C.1.2.1.2.3.i Vacuna S19, arriba) deben aplicarse también a la RB51.

A veces, puede haber diferencias sutiles y difíciles de observar en cuanto al tamaño de las colonias de Rev.1. Las colonias pequeñas (de 1-1,2 mm de diámetro) son características de Rev.1, pero pueden aparecer colonias de Rev.1 más grandes dependiendo del medio que se use, de la cantidad de humedad residual en la atmósfera de la incubadora y de la presencia o ausencia de CO_2 . La frecuencia de variación en el tamaño de las colonias suele ser de 1 colonia grande por cada 10^3 colonias pequeñas. Ambas variantes de Rev.1 son de tipo S (liso). Para evitar un aumento de esta variación en el tamaño de las colonias a lo largo de pases sucesivos, al preparar los lotes de siembra es importante seleccionar siempre colonias pequeñas.

Deben estar en la fase lisa al menos un 99% de las células de los lotes de inóculo.

c) Virulencia residual (tiempo hasta la persistencia en el 50% o tiempo hasta la recuperación en el 50%) (Grilló *et al.*, 2000)

Los procedimientos técnicos indicados para el cálculo del RT_{50} de la vacuna S19 (véase arriba) son los que deben aplicarse a la Rev.1, excepto por el hecho de que el lote de siembra de *B. abortus* S19 en estudio (vacuna problema) y el cultivo de inóculo original S19 (que se usa como cepa de referencia), respectivamente, se sustituyen por el correspondiente lote de siembra de *B. melitensis* Rev.1 (vacuna problema) y cultivo de inóculo original de *B. melitensis* Rev.1 como cepa de referencia. En el caso de la cepa Rev.1 original de referencia, el RT_{50} y los límites de confianza se sitúan alrededor de las $7,9 \pm 1,2$ semanas. Para que un lote de siembra de vacuna Rev.1 sea aceptable, debe mantener una virulencia residual similar.

Si esta prueba da buenos resultados en un lote de siembra representativo, no es necesario repetirla sistemáticamente con los otros lotes de siembra y de vacuna que se hayan preparado a partir de la misma cepa de inóculo y con el mismo proceso de fabricación.

d) Inmunogenicidad en ratones

Los procedimientos técnicos que se han indicado para el cálculo de la inmunogenicidad de la vacuna S19 (véase arriba) son los que deben aplicarse a Rev.1, excepto por el hecho de que el lote de siembra de *B. abortus* S19 (vacuna problema) y el cultivo de inóculo original de *B. abortus* S19 (usada como cepa de referencia), respectivamente, se sustituyen por el correspondiente lote de siembra de *B. melitensis* Rev.1 en estudio (vacuna problema) y el cultivo de inóculo original de *B. melitensis* Rev.1 como cepa de referencia

Las condiciones del experimento control son satisfactorias cuando: i) la respuesta de los ratones no vacunados (media de Y) es de al menos 4,5; ii) la

respuesta de los ratones vacunados con la vacuna Rev.1 de referencia es inferior a 2,5; y iii) la desviación estándar calculada para cada lote de seis ratones es inferior a 0,8

Si esta prueba da buenos resultados en un lote de siembra representativo, no es necesario repetirla sistemáticamente con los otros lotes de siembra y de vacuna que se hayan preparado a partir de la misma cepa de inóculo y con el mismo proceso de fabricación.

1.2.1.3. Validación como vacuna

Muchos estudios independientes han confirmado el valor de la cepa S19 como vacuna que protege al ganado bovino de la brucelosis, y ha sido la vacuna utilizada (junto con pruebas serológicas y sacrificio) para erradicar la brucelosis bovina en la mayoría de países actualmente libres de la enfermedad. Este microorganismo se comporta como una cepa atenuada cuando se administra a ganado sexualmente inmaduro. En casos muy infrecuentes de administración de dosis estándar por vía subcutánea puede producir una infección localizada en el tracto genital, sobre todo en machos. Por ello, está contraindicada para vacunar a los machos. Con animales adultos, es probable que se produzca una respuesta persistente de anticuerpos durante 6 meses o más en una proporción notable del ganado vacunado por vía subcutánea con la dosis estándar. Parte del ganado que es vacunado antes de llegar a la edad adulta puede desarrollar más tarde artropatía, en concreto en las articulaciones femorotibiales. La vacuna es segura para la mayoría de los animales si se administra a terneros de entre 3 y 6 meses de edad. Puede utilizarse también en animales adultos a dosis reducida, con la ventaja de reducir las interferencias con el diagnóstico. Produce una inmunidad duradera ante un desafío moderado con cepas virulentas de *B. abortus*, pero su duración exacta se desconoce. La duración de la protección frente a la infección por *B. melitensis* tampoco se conoce. La cepa vacunal es estable y su reversión a la forma virulenta es extremadamente infrecuente. Administrada involuntariamente a animales gestantes se asocia a la aparición de cepas que utilizan i-eritritol. El microorganismo se comporta como una cepa atenuada en ratones, e incluso grandes inóculos son rápidamente eliminados de los tejidos.

Los informes tanto de estudios de desafío experimental como de campo siguen en debate en cuanto a la utilidad de la cepa RB51 de *B. abortus* para proteger al ganado bovino de la brucelosis (véase arriba). El microorganismo se atenúa en terneros pero puede causar problemas de seguridad en el ganado adulto. La cepa RB51 de *Brucella abortus* contiene un OPS expresado mínimamente, pero en animales vacunados no se observa seroconversión ni en la RBT ni en la CFT. Además, mediante los procedimientos de análisis actuales basados en el OPS, también se ha observado que la RB51 no induce anticuerpos detectables (USDA, 2003). Sin embargo, la presencia de epítomos centrales comunes a *Brucella* lisa y rugosa no siempre permite diferenciar entre la respuesta a la RB51 y la respuesta a las cepas lisas naturales, sea cual sea el I-ELISA basado en S-LPS u OPS utilizado. La eficacia de RB51 contra la infección bovina por *Brucella* está en debate (Moriyón *et al.*, 2004), pero se defiende que protege contra un desafío moderado con *B. abortus* virulento, aunque no se sabe qué duración exacta tiene esta protección. Tampoco se sabe qué eficacia tiene esta vacuna contra la infección bovina por *B. melitensis*. La vacuna es muy estable y no se ha observado que revierta a fase lisa ni *in-vivo* ni *in-vitro*. El microorganismo se comporta como una cepa atenuada en varios tipos de animales, como en ratones, y desaparece rápidamente de los tejidos.

Muchos estudios independientes han confirmado el valor de la cepa Rev.1 de *B. melitensis* como vacuna para proteger a ovejas y cabras frente a la brucelosis. Mantiene la virulencia tras el pase por ovejas y cabras gestantes. No obstante, al inocular la vacuna Rev.1 a ovejas o cabras gestantes, puede causar abortos y excreción en leche. Los abortos inducidos por la vacuna no se evitan por usar dosis reducidas; así, se ha observado que dosis tan bajas como de 10^6 administradas por vía subcutánea o conjuntival a animales gestantes pueden inducir abortos y excreción de la cepa vacunal en la leche (Blasco, 1997).

1.2.2. Método de producción

1.2.2.1. Procedimiento

La producción de vacunas vivas contra *Brucella* se basa en el sistema de lotes de siembra que se describe arriba (apartado B.2.2) para los antígenos de BBAT y CFT.

Para la producción de la vacuna S19, se pueden utilizar los procedimientos descritos anteriormente, excepto por el hecho de que las células se recogen en PBS, pH $6,3 \pm 0,2$, y se depositan por centrifugación o añadiendo carboximetilcelulosa sódica a una concentración final de 1,5 g/litro. El producto obtenido de un fermentador o las células agrupadas de un lote de cultivos en frascos de Roux que se hayan inoculado al mismo tiempo y con el mismo lote de inóculo constituye una recolección individual. Se puede juntar más de una recolección para formar la masa final, que se utilizará para llenar los recipientes definitivos de un lote de vacuna. Antes de mezclarlas, en cada recolección se ha de comprobar la pureza, la concentración celular, la tersura y la identidad. Deben realizarse las mismas pruebas en el producto final, que debe tener un número de microorganismos viables comprendido entre 8 y 24×10^9 UFC /ml. Los ajustes de concentración se llevan a cabo añadiendo PBS a la vacuna presentada en forma líquida, o un estabilizador a la forma liofilizada. Si se emplea un estabilizador debe tenerse en cuenta la pérdida de viabilidad en la liofilización, y no debe superar el 50%. El producto final desecado no debe someterse a temperaturas superiores a 35°C durante el secado, y el contenido en humedad residual debe ser del 1–2%. Los envases deben cerrarse al vacío o en nitrógeno seco inmediatamente después del secado, y han de mantenerse a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

El proceso de producción para la cepa RB51 de *B. abortus* es muy similar al utilizado para la cepa S19.

Para la producción de vacuna con la cepa Rev.1 de *B. melitensis*, pueden aplicarse los procedimientos que se describen arriba para los antígenos (Alton *et al.*, 1988) excepto por el hecho de que las células se recogen en un estabilizador de liofilización y se depositan por centrifugación. El producto obtenido de un fermentador o las células agrupadas de un lote de cultivos en frascos de Roux que se hayan inoculado al mismo tiempo y con el mismo lote de inóculo constituye una recolección individual. Se puede juntar más de una recolección para formar la masa final que se utilizará para llenar los recipientes definitivos de un lote de vacuna. Antes de mezclarlas, en cada recolección se ha de comprobar la pureza, la concentración celular, la tersura y la identidad. El volumen de la masa final se ajusta añadiendo suficiente estabilizador de tal forma que una dosis contenga un número adecuado de microorganismos viables. Tras ajustar la concentración celular de la masa final, se llevan a cabo pruebas de identidad, tersura y ausencia de microorganismos contaminantes (véase abajo).

1.2.2.2. Requisitos relativos a los ingredientes

Las cepas deben cultivarse en un medio adecuado.

Las cepas S19 de *B. abortus* y Rev.1 de *B. melitensis* para la producción de vacuna se cultivan en medios libres de suero y de otros productos de origen animal, en condiciones similares a las que se describen arriba para las cepas S99 o S1119-3 de *B. abortus* (Alton *et al.*, 1988). La solución salina con fenol se sustituye por un estabilizador de la liofilización.

Para la cepa RB51 de *Brucella abortus* se siguen métodos de cultivo similares.

El agar de suero-dextrosa y el agar tripticasa-soja, al cual se puede añadir suero al 5% o extracto de levadura al 0,1%, son los medios sólidos que se ha observado que resultan satisfactorios para propagar la cepa Rev.1 (Alton *et al.*, 1988). No obstante, la cepa Rev.1 no crece bien en agar patata y, en general, precisa 3 a 5 días para crecer.

Sea cual sea la vacuna, mientras se llevan a cabo las pruebas de control de calidad el microorganismo no se inactiva sino que se conserva a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, como se describe abajo.

Para preparar la vacuna liofilizada, se recomienda un estabilizador que contenga un 2,5% de digesto de caseína, como por ejemplo, Tryptone (Oxoid), sacarosa al 5% y glutamato sódico al 1%, disuelto en agua purificada y estabilizado mediante filtración.

En las vacunas preparadas a partir de las cepas vivas S19 o RB51 de *B. abortus* o Rev.1 de *B. melitensis* no deben usarse conservantes antimicrobianos.

1.2.2.3. Controles durante el proceso

Durante la preparación de las recolecciones individuales, debe comprobarse la pureza, la identidad y, cuando corresponda, la tersura de las vacunas preparadas con las cepas S19 o RB51 de *B. abortus* y Rev.1 de *B. melitensis*. La concentración celular del producto final también debe comprobarse. Esto se puede realizar mediante medición de la opacidad, pero debe llevarse a cabo un recuento de los microorganismos viables en los lotes de llenado final. También debe comprobarse su identidad mediante pruebas de aglutinación con antisuero contra el antígeno A, R o M de *Brucella*, respectivamente

La concentración de microorganismos viables en los recipientes finales no debe ser inferior a las dosis recomendadas (véase arriba).

En el caso de las cepas S19 y Rev.1, al menos un 99% de las células (lotes de siembra) y un 95% de las células (lotes finales) deben encontrarse en la fase lisa, mientras que en el caso de las células RB51, el 100% de las células deben encontrarse en la fase rugosa. Además, en el caso de RB51, todas las colonias deben ser negativas en las pruebas de transferencia puntual con anticuerpos monoclonales específicos del antígeno OPS.

En el caso de las cepas S19 y Rev.1, la inmunogenicidad y la virulencia residual (tiempo hasta la persistencia en el 50% o hasta recuperación en el 50%) del modelo murino también deben determinarse en lotes de siembra representativos. Si estas pruebas dan buenos resultados en un lote de siembra representativo, no es necesario repetirlas sistemáticamente con los otros lotes de siembra y de vacuna que se hayan preparado a partir de la misma cepa de inóculo y con el mismo proceso de fabricación.

1.2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

En el caso de la vacuna liofilizada, las pruebas de control deben realizarse en la vacuna reconstituida en la forma en la que vaya a utilizarse (con el mismo diluyente).

1.2.2.4.1. Pureza

Las pruebas de pureza y ausencia de contaminación por materiales biológicos se describen en el capítulo 1.1.9.

1.2.2.4.2. Identidad

Véase el apartado C.1.2.1.2.3 *Potencia*.

1.2.2.4.3. Inocuidad

Véase el apartado C.1.2.1.2.2 *Inocuidad*.

1.2.2.4.4. Potencia del lote

i) Potencia

En el caso de las vacunas S19 y Rev.1, la potencia también puede determinarse en el producto liofilizado final. Este procedimiento es el mismo que se ha descrito anteriormente (se comprueba la identidad, la tersura, la virulencia residual y la inmunogenicidad; véase el apartado C.1.2.1.2.3.). Si las pruebas de virulencia residual y de inmunogenicidad dan resultados satisfactorios en un lote representativo de la vacuna problema, no es necesario repetirlas sistemáticamente con los otros lotes de vacuna preparados a partir del mismo inóculo y con el mismo proceso de fabricación

ii) Recuento de bacterias vivas

En los lotes también debe comprobarse el número de microorganismos viables. El mismo procedimiento es aplicable a lotes de vacuna de S19, Rev.1 y RB51. Se inoculan al menos cinco placas de triptosa, suero-dextrosa u otro agar adecuado con 0,1 ml de diluciones suficientes de la vacuna con un asa estéril de vidrio, alambre o plástico. Se realiza el recuento de las UFC por volumen de vacuna.

Los recuentos de UFC adecuados son los siguientes:

S19:

- a) $0,5-1 \times 10^{11}$ UFC (dosis estándar; vía subcutánea);
- b) $0,5-5 \times 10^9$ UFC (dosis reducida; vía subcutánea);
- c) 5×10^9 UFC (dosis reducida; vía conjuntival).

Rev.1:

- a) $0,5-2 \times 10^9$ UFC (dosis estándar, vía subcutánea o conjuntival).

RB51:

- a) $1-3,4 \times 10^{10}$ UFC (dosis estándar; vía subcutánea).

1.2.3. Requisitos para la autorización/registro/licencia

1.2.3.1. Proceso de fabricación

Para el registro de la vacuna, deben enviarse a las autoridades todos los datos pertinentes relativos a la fabricación de la vacuna y a las pruebas de control de calidad (véase arriba). Esta información debe extraerse de tres lotes consecutivos de vacuna con un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual del lote industrial.

1.2.3.2. Requisitos de inocuidad

1.2.3.2.1. Inocuidad en especies de destino y no de destino

Los posibles efectos secundarios de las vacunas contra *Brucella* en función del estado de los animales se indican en el apartado C.1.1. *Antecedentes*.

1.2.3.2.2. Reversión a la virulencia

Las vacunas preparadas con la cepa S19 de *Brucella abortus* o con la cepa Rev.1 de *B. melitensis* a partir de inóculo primario de un origen adecuado son estables en cuanto a sus características siempre que se cumplan los requisitos relativos a los resultados de las pruebas que se realizan durante el proceso y de control del lote y que se describen arriba, y que no presenten tendencia a revertir a la virulencia.

Se ha comprobado que la cepa RB51 de *Brucella abortus* no presenta tendencia a revertir a microorganismo liso virulento tras múltiples pases *in vitro* o *in vivo*. Probablemente ello se deba al tipo y lugar de las mutaciones que se hallan en esta cepa. La cepa RB51 de *Brucella abortus*, a pesar de contener, entre otras mutaciones desconocidas, un gen *wboA* interrumpido por la inserción del elemento IS711 (un posible gen glicosiltransferasa), acumula pequeñas cantidades de OPS citoplasmático de tipo M.

1.2.3.2.3. Precauciones

Las cepas S19 y RB51 de *Brucella abortus*, así como la Rev.1 de *B. melitensis*, aunque atenuadas, siguen siendo capaces de causar enfermedad en humanos. Así, los cultivos y las suspensiones celulares deben manipularse en las condiciones apropiadas de contención del peligro biológico (véase el capítulo 1.1.4). La reconstitución y posterior manipulación de la vacuna reconstituida deben realizarse con cuidado de evitar una inyección accidental o una contaminación ocular o cutánea. Los residuos y el equipo de inyección de las vacunas deben descontaminarse con un desinfectante adecuado (formulación fenólica, yodófora o a base de aldehídos) a la concentración recomendada. En caso de exposición accidental, debe acudir al médico. La eficacia del tratamiento antibiótico de las infecciones causadas por S19, RB51 o Rev.1 en humanos no se ha establecido del todo. No obstante, es necesario destacar que, aunque la cepa S19 no genera ninguna resistencia específica a antibióticos en comparación con otras cepas naturales de *Brucella*, las cepas Rev.1 y RB51 son resistentes a la estreptomycinina y a la rifampicina, respectivamente.

La vacuna debe considerarse patógena para el personal que la administra. Los fabricantes deben advertir claramente que es necesario acudir al médico en caso de auto-inyección o de exposición a la vacuna (incluidos los aerosoles), y dichas advertencias deben constar en el prospecto/ficha técnica del producto de tal modo que el personal que lo administre sea consciente de todos los riesgos.

1.2.3.3. Requisitos de eficacia

La potencia también se puede determinar en el lote final, pero si las pruebas de inocuidad/eficacia realizadas han dado buenos resultados en un lote de siembra o en un lote de la vacuna problema representativos, no es necesario repetirlas sistemáticamente con los otros lotes vacuna que se hayan preparado a partir del mismo lote de siembra y con el mismo proceso de fabricación.

1.2.3.4. Duración de la inmunidad

Al vacunar terneros con una dosis completa de vacuna S19, se considera que se está confiriendo una inmunidad duradera, y por lo tanto no se recomienda administrar más dosis. No obstante, hay pocas pruebas que respalden tal supuesto y, por lo tanto, en zonas endémicas podría ser aconsejable una revacunación a los 6-12 meses.

La duración de la inmunidad inducida por la vacuna RB51 en ganado bovino se desconoce, sea cual sea la dosis aplicada y la edad de vacunación. Para reforzar la inmunidad, se ha propuesto una revacunación a los 6-12 meses en las zonas endémicas.

Se acepta que la vacunación por vía subcutánea o conjuntival con dosis estándar de Rev.1 confiere una inmunidad sólida y duradera en ovejas y cabras. No obstante, cada vez se dispone de más datos de campo que indican que la inmunidad conferida disminuye con el tiempo, y que en zonas endémicas podría ser aconsejable una revacunación a los 6-12 meses.

1.2.3.5. Estabilidad

Las vacunas preparadas con la cepa S19 de *Brucella abortus* o con la cepa Rev.1 de *B. melitensis* a partir de inóculo primario de procedencias adecuadas son estables en cuanto a sus características siempre que se cumplan los requisitos relativos a los resultados de las pruebas que se realizan durante el proceso y de control del lote y que se describen arriba, y que no presenten tendencia a revertir a la virulencia. La vacuna liofilizada presenta una pérdida progresiva del recuento de microorganismos viables, pero debe conservar la potencia durante todo el periodo de validez recomendado. Normalmente esto se logra garantizando que el recuento de microorganismos viables inmediatamente después de la liofilización sea muy superior al mínimo exigido. Mantener la cadena de frío durante la distribución de la vacuna contribuirá a garantizar su viabilidad.

Se ha comprobado que la cepa RB51 de *Brucella abortus* no presenta tendencia a revertir a microorganismo liso virulento tras múltiples pases *in vitro* o *in vivo*. Probablemente ello se deba al tipo y lugar de las mutaciones que se hallan en esta cepa. La cepa RB51 de *Brucella abortus*, a pesar de contener, entre otras mutaciones desconocidas, un gen *wboA* interrumpido por la inserción del elemento IS711 (un posible gen glicosiltransferasa), acumula pequeñas cantidades de OPS citoplasmático de tipo M.

2. Sustancias biológicas para el diagnóstico: brucelina

2.1. Antecedentes

Brucelina-INRA es un extracto sin LPS de la cepa rugosa B115 de *B. melitensis*, y una única inoculación de esta preparación no provoca formación de anticuerpos reactivos que puedan detectarse mediante BBAT, CFT ni ELISA. No obstante, dado que esta cepa rugosa contiene OPS de *Brucella* en el extracto de citosol, la inoculación reiterada de brucelina podría generar anticuerpos que interferirían con otras pruebas de diagnóstico. Por ello, se han obtenido extractos de proteína de citosol de mutantes rugosas de *B. abortus*, carentes de los genes estrictamente necesarios para sintetizar perosamina, y por lo tanto incapaces de generar una respuesta de anticuerpos anti OPS en ovejas. Estos extractos de proteína del citosol se han analizado con éxito en estudios comparativos con brucelina para el diagnóstico de brucelosis en cerdos (Dieste-Pérez et al., 2014). Estos extractos podrían resultar más ventajosos que la brucelina clásica en un futuro cercano, y sustituirla.

2.2. Descripción de la producción y requisitos

2.2.1. Características del inóculo

2.2.1.1. Características biológicas del inóculo primario y criterios de calidad

La producción de brucelina-INRA se basa en un sistema de lotes de siembra, como el que se describe para los antígenos y las vacunas. El inóculo original de la cepa B115 de *B. melitensis* para la producción de brucelina5 debe propagarse para producir un lote de siembra, que deberá conservarse mediante liofilización o congelación a temperatura de nitrógeno líquido. Debe cumplir con las propiedades de un cultivo puro de una cepa rugosa de *B. melitensis* y no debe producir LPS de *Brucella* lisa. Debe producir cantidades razonables de una mezcla de antígenos proteicos reactivos con antisueros contra cepas lisas y rugosas de *Brucella*.

2.2.1.2. Criterios de calidad

Debe comprobarse la pureza del inóculo de *Brucella melitensis* B115.

Las pruebas de pureza y de ausencia de contaminación por sustancias biológicas se describen en el capítulo 1.1.9.

2.2.1.3. Validación como reactivo para el diagnóstico *in-vivo*

Las pruebas de laboratorio y de campo realizadas en Francia han confirmado que la brucelina-INRA es inocua, no tóxica y que ejerce una acción específica. La preparación contiene un 50–75% de proteínas, principalmente de bajo peso molecular, y un 15–30% de carbohidratos. No contiene antígenos S-LPS, no provoca respuestas inflamatorias en los animales no sensibilizados y en sí misma no es un agente sensibilizante. Tras una única inoculación, no induce anticuerpos detectables con las pruebas serológicas estándar para el diagnóstico de la brucellosis. Más del 90% de los pequeños rumiantes infectados por *B. melitensis* presenta una hipersensibilidad retardada a brucelina-INRA en alguna fase. Esta preparación no se recomienda como agente de diagnóstico individual, pero sí puede resultar útil para el cribado de rebaños. Se administra a pequeños rumiantes en dosis de 100 µg por vía intradérmica, y provoca una reacción local de hipersensibilidad retardada visible a las 48–72 horas en los animales sensibilizados. Pueden obtenerse reacciones positivas tanto en animales vacunados como en animales infectados (Pouillot *et al.*, 1997).

2.2.2. Método de fabricación (Alton *et al.*, 1988)

2.2.2.1. Procedimiento y requisitos para los ingredientes

La brucelina se produce a partir de la cepa B115 de *B. melitensis* según el procedimiento descrito por Alton *et al.*, 1988.

2.2.2.2. Control durante el proceso

En el extracto crudo de brucelina debe comprobarse la esterilidad tras la extracción con acetona para asegurar la muerte de las células de *Brucella*, y de nuevo al final del proceso para comprobar si hay contaminación. Deben determinarse el pH y la concentración de proteína, y deben realizarse las pruebas de control (que se describen en el apartado C.2.2.2.3, abajo) en el material no envasado antes de llenar los recipientes definitivos.

2.2.2.3. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

En las preparaciones con brucelina debe comprobarse la esterilidad, como se describe en el capítulo 1.1.9.

ii) Inocuidad

También debe comprobarse si las preparaciones con brucelina presentan toxicidad anómala. Deben inyectarse por vía intraperitoneal dosis equivalentes a 20 dosis para ganado bovino (2 ml) a dos cobayas normales que no hayan estado nunca expuestas a microorganismos del género *Brucella* ni a sus antígenos. También se deben inyectar por vía subcutánea 0,5 ml (2000 UI/ml) de la brucelina en estudio a cinco ratones normales.

Los animales deben observarse durante 7 días, y no pueden presentar reacción a la inyección, ni local ni generalizada.

La capacidad dermonecrótica se comprueba mediante inoculación intradérmica de 0,1 ml del producto en estudio en el flanco, previamente rasurado y desinfectado, de tres cobayas albinos normales que no hayan estado nunca expuestos a microorganismos del género *Brucella* ni a sus antígenos. No puede observarse ningún tipo de reacción cutánea.

La ausencia de sensibilización alérgica y serológica se comprueba mediante la inoculación intradérmica a tres cobayas albinos normales, tres veces cada 5 días, de 0,1 ml de una dilución 1/10 de la preparación en estudio. Quince días después, se administra una cuarta inyección similar a los mismos tres animales y a un lote control de tres cobayas del mismo peso que no hayan sido inyectados con anterioridad. Los animales no pueden dar positivo en las pruebas estándar de detección de brucelosis (RBT, CFT) al ser analizados 24 horas después de la última inyección, y no pueden presentar respuestas de hipersensibilidad retardada.

iii) Potencia del lote

La potencia de las preparaciones con brucelina se determina mediante la inyección intradérmica de dosis graduales de brucelina a cobayas que hayan sido sensibilizados mediante inoculación subcutánea de 0,5 ml de brucelina de referencia⁸ en adyuvante completo de Freund entre 1 y 6 meses antes (el uso de una cepa viva de *Brucella*, por ejemplo la cepa Rev.1, es posible siempre que produzca el mismo nivel de sensibilización). Las reacciones eritematosas se leen y miden a las 24 horas y el título se calcula por comparación con una brucelina de referencia⁹. Este método solo es válido para comparar preparaciones con brucelina realizadas según el mismo protocolo que el alérgeno sensibilizante. Están descritas la estandarización inicial de un lote de alérgeno y la sensibilización y titulación en rumiantes (Alton *et al.*, 1988).

2.2.3. Requisitos para la autorización/registro/licencia

2.2.3.1. Proceso de fabricación

Para el registro de la brucelina, deben presentarse a las autoridades reguladoras todos los datos relativos a la fabricación del producto y a las pruebas de control de calidad (véase arriba), de acuerdo con los requisitos establecidos. Esta información debe extraerse de tres lotes de producto consecutivos con un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

2.2.3.2. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

Nunca se han observado efectos secundarios a la brucelina en animales.

ii) Reversión a la virulencia

No es aplicable.

iii) Precauciones

La brucelina no es tóxica. No obstante, puede provocar reacciones de hipersensibilidad intensas en animales sensibilizados que resulten expuestos a la misma por accidente. Debe procederse con cuidado de evitar una inyección accidental o una contaminación de las mucosas. Los recipientes y equipo de inyección que se utilicen deben descontaminarse o desecharse correctamente o bien incinerarse en un contenedor desechable adecuado.

8 Puede obtenerse una brucelina de referencia de la UE (2000 unidades/ml) en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la brucelosis, en Francia.

9 El procedimiento estadístico se puede obtener en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la brucelosis, en Francia

La brucelina debe llevar la indicación de que puede resultar dañina para el personal que la manipule. Los fabricantes deben advertir claramente que es necesario acudir al médico en caso de auto-inyección o de exposición a la vacuna, y dichas advertencias deben constar en el prospecto/ficha técnica del producto de tal modo que el personal que lo administre sea consciente de todos los riesgos.

2.2.3.3. Requisitos de eficacia

En el producto final debe determinarse la potencia. El procedimiento está descrito arriba.

2.2.3.4. Duración de la sensibilidad

Se desconoce qué duración tiene la sensibilidad. Se observa una variación considerable entre animales en cuanto al grado de hipersensibilidad que manifiestan a la brucelina. Los animales que se hallan en fases muy iniciales de la infección o que sufren una infección crónica, pueden no presentar hipersensibilidad a la inyección intradérmica.

2.2.3.5. Estabilidad

Las preparaciones liofilizadas conservan toda la potencia durante años. La preparación líquida comercial debe conservar la potencia durante todo el periodo de validez recomendado.

BIBLIOGRAFÍA

ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D. & VERGER J.M. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.

ANGUS R.D. & BARTON C.E. (1984). The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. *Dev. Biol. Stand.*, **56**, 349–356.

ASHFORD D.A., DI PIETRA J., LINGAPPA J., WOODS C., NOLL H., NEVILLE B., WEYANT R., BRAGG S.L., SPIEGEL R.A., TAPPERRRO J. & PERKINS B.A. (2004). Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, **22**, 3435–3439.

BLASCO J.M. (1997). A review on the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.*, **31**, 275–283.

BLASCO J.M., GARIN-BASTUJI B., MARÍN C.M., GERBIER G., FANLO J., JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P. & CAU C. (1994a). Efficacy of different rose bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Rec.*, **134**, 415–420.

BLASCO J.M., MARÍN C.M., JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P., BARBERAN M., HERNANDEZ A., MOLINA L., VELASCO J., DIAZ R. & MORIYÓN I. (1994b). Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection of sheep. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1835–1840.

BRICKER B.J. (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.*, **90**, 435–446.

BRICKER B.J., EWALT D.R. & HALLING S.M. (2003). *Brucella* 'HOOF-Prints' strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol.*, **3**, 15.

DE MASSIS F., GIOVANNINI A., DI EMIDIO B., RONCHI G.F., TITTARELLI M., DI VENTURA M., NANNINI D. & CAPORALE V. (2005). Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *Vet. Ital.*, **41** (4), 291–299.

DE MIGUEL M.J., MARÍN C.M., MUÑOZ P.M., DIESTE L., GRILLÓ M.J. & BLASCO J.M. (2011). Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 1458–1463.

DIESTE-PÉREZ L., BLASCO J.M., DE MIGUEL M.J., MARÍN C.M., BARBERÁN M., CONDE-ÁLVAREZ R., MORIYÓN I., MUÑOZ P.M. (2014). Performance of skin tests with allergens from *B. melitensis* B115 and rough *B. abortus* mutants for diagnosing swine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, **168**, 161–168.

EUROPEAN FOOD SAFETY AGENCY (EFSA) (2009). Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission on porcine brucellosis (*Brucella suis*). *EFSA J.*, **1144**, 1–112.

- EUROPEAN UNION (2008). Commission Decision of 10 December 2008 amending Annex C to Council Directive 64/432/EEC and Decision 2004/226/EC as regards diagnostic tests for bovine brucellosis (notified under document number C [2008] 7642) (Text with EEA relevance) (2008/984/EC). *Official Journal of the European Union*, L 352/38-45.
- FOSTER G., OSTERMAN B.S., GODFROID J., JACQUES I. & CLOECKAERT A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 2688–2693.
- GRILLÓ M.J., BOSSERAY N. & BLASCO J.M. (2000). *In vitro* markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial *Brucella melitensis* Rev.1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. *Biologicals*, **28**, 119–127.
- INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION (IATA) (2013). Dangerous Goods Regulations, 54th Edition. International Air Transport Association, 800 Place Victoria, P.O. Box 113; Montreal, Quebec H4Z 1M1, Canada, 815 pp <http://www.iata.org/publications/dgr/Pages/manuals.aspx>.
- JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P., MARÍN C. & BLASCO J.M. (1991). Effect of antibiotic therapy and strain 19 vaccination on the spread of *Brucella melitensis* within an infected dairy herd. *Prev. Vet. Med.*, **11**, 17–24.
- JOINT FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)/WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) EXPERT COMMITTEE ON BRUCELLOSIS (1986). Technical Report Series 740, Sixth Report. WHO, Geneva, Switzerland.
- JONES L.M., BERMAN D.T., MORENO E., DEYOE B.L., GILSDORF M.J., HUBER J.D. & NICOLETTI P.L. (1980). Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, **12**, 753–760.
- KANG S.I., HER M., KIM J.W., KIM J.Y., KO K.Y., HA Y.M. & JUNG S.C. (2011). Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 6726–6728.
- LE FLECHE P., JACQUES I., GRAYON M., AL DAHOUK S., BOUCHON P., DENOEUDE F., NÖCKLER K., NEUBAUER H., GUILLOTEAU L.A. & VERGNAUD G. (2006). Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.*, **6**, 9.
- LÓPEZ-GOÑI I., GARCÍA-YOLDI D., MARÍN C.M., DE MIGUEL M.J., BARQUERO-CALVO E., GUZMÁN-VERRI C., ALBERT D., GARIN-BASTUJI B. (2011). New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet Microbiol.*, **154**, 152–155.
- MCGIVEN J., TAYLOR A., DUNCOMBE L., SAYERS R., ALBERT D., BANAI M., BLASCO J.M., ELENA S., FRETIN D., GARIN-BASTUJI B., MELZER F., MUÑOZ P.M., NIELSEN K., NICOLA A., SCACCHIA M., TITTARELLI M., TRAVASSOS DIAS I., WALRAVENS K. & STACK J. (2011). The first International Standard anti-*Brucella melitensis* Serum. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **30**, 809–819.
- MACMILLAN A.P. & COCKREM D.S. (1985). Reduction of non-specific reactions to the *Brucella abortus* serum agglutination test by the addition of EDTA. *Res. Vet. Sci.*, **38**, 288–291.
- MORENO E., CLOECKAERT A. & MORIYON I. (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.*, **90**, 209–227.
- MORGAN W.J.B., MACKINNON D.J., LAWSON J.R. & CULLEN G.A. (1969). The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet. Rec.*, **85**, 636–641.
- MORIYÓN I., GRILLÓ M.J., MONREAL D., GONZALEZ D., MARÍN C.M., LÓPEZ-GOÑI I., MAINAR-JAIME R.C., MORENO E. & BLASCO J.M. (2004). Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.*, **35**, 1–38.
- MUÑOZ P.M., BLASCO J.M., ENGEL B., DE MIGUEL M.J., MARÍN C.M., DIESTE L., MAINAR-JAIME R.C. (2012). Assessment of performance of selected serological tests for diagnosing brucellosis in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **146**, 150–158
- MUÑOZ P.M., MARIN C.M., MONREAL D., GONZALES D., GARIN-BASTUJI B., DIAZ R., MAINAR-JAIME R.C., MORIYON I. & BLASCO J. (2005). Efficacy of several serological tests and antigens for the diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 141–151.

- NICOLETTI P, JONES L M & BERMAN D.T. (1978). Comparison of the subcutaneous and conjunctival route of vaccination with *Brucella abortus* strain 19 vaccine in adult cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **173**, 1450–1456.
- NIELSEN K., GALL D., JOLLEY M., LEISHMAN G., BALSEVICIUS S., SMITH P., NICOLETTI P. & THOMAS F. (1996). A homogenous fluorescence polarisation assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J. Immunol. Methods*, **195**, 161–168.
- NIELSEN K., KELLY L., GALL D., NICOLETTI P. & KELLY W. (1995). Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **46**, 285–291.
- OCAMPO–SOSA A.A., AGÜERO–BALBÍN J. & GARCÍA–LOBO J.M. (2005). Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet. Microbiol.*, **110**, 41–51.
- OLSEN S.C., GARIN-BASTUJI B., BLASCO J.M., NICOLA A.M., SAMARTINO L. (2012). Swine Brucellosis. *In: Diseases of Swine*, Zimmerman J.J., Karriker A.L., Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. eds, 10th Edition, John Wiley & Sons, USA, 697–708.
- POUILLOT R., GARIN–BASTUJI B., GERBIER G., COCHE Y., CAU C., DUFOUR B. & MOUTOU F. (1997). The brucellin skin test as a tool to differentiate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Vet. Res.*, **28**, 365–374.
- POUILLOT R., GRILLÓ M.J., ALABART J.L., GARIN–BASTUJI B. & BLASCO J.M. (2004). Statistical procedures for calculating the residual virulence of *Brucella abortus* strain 19 (S19) and *Brucella melitensis* strain Rev.1 vaccines in mice: theoretical basis and practical applications. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **22**, 1051–1063.
- PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L. & GARIN-BASTUJI B. (2012). Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. *Prev. Vet. Med.*, **104**, 94–100.
- SCHOLZ H.C., HUBALEK Z., SEDLACEK I., VERGNAUD G., TOMASO H., AL DAHOUK S., MELZER F., KÄMPFER P., NEUBAUER H., CLOECKAERT A., MAQUART M., ZYGMUNT M.S., WHATMORE A.M., FALSEN E., BAHN P., GÖLLNER C., PFEFFER M., HUBER B., BUSSE H.J. & NÖCKLER K. (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**, 375–382.
- SCHOLZ H.C., NÖCKLER K., GÖLLNER C., BAHN P., VERGNAUD G., TOMASO H., AL DAHOUK S., KÄMPFER P., CLOECKAERT A., MAQUART M., ZYGMUNT M.S., WHATMORE A.M., PFEFFER M., HUBER B., BUSSE H.J. & DE B.K. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **60**, 801–808.
- STACK J.A., HARRISON M. & PERRETT L.L. (2002). Evaluation of a selective medium for *Brucella* isolation using natamycin. *J. Appl. Microbiol.*, **92**, 724–728.
- STACK J.A., PERRETT L.L., BREW S.D. & MACMILLAN A.P. (1999). C–ELISA for bovine brucellosis suitable for testing poor quality samples. *Vet. Rec.*, **145**, 735–736.
- STOFFREGEN W.C., OLSEN S.C., BRICKER B.J. (2006). Parenteral vaccination of domestic pigs with *Brucella abortus* strain RB51. *Am. J. Vet. Res.*, **67**, 1802–1808.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICES (APHIS) (2003). Availability of an Environmental Assessment for Licensing of *Brucella abortus* Vaccine, Strain RB–51, Live Culture. *Federal Register*, 18 Feb 2003, **68**, 7761.
- VERGER J.M. (1985). *B. melitensis* infection in cattle. *In: Brucella melitensis*, Plommet M. & Verger J.M., eds. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, Netherlands, 197–203.
- WHATMORE A.M. (2009). Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect. Genet. Evol.*, **9**, 1168–1184.
- WHATMORE A.M. & GOPAUL K.K. (2011). Recent advances in molecular approaches to *Brucella* diagnostics and epidemiology. *In: Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*, López-Gofñi I. & O’Callaghan D., eds, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 57–88.
- WHATMORE A.M., DAVISON N., CLOECKAERT A., AL DAHOUK S., ZYGMUNT M.S., BREW S.D., PERRETT L.L., KOYLASS M.S., VERGNAUD G., QUANCE C., SCHOLZ H.C., DICK E.J. Jr, HUBBARD G. & SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH N.E. (2014). *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**, 4120–4128.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1953). WHO Technical Report Series No. 68. Sixth report of the WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO, Geneva, Switzerland.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2004). WHO Laboratory Biosafety Manual, Third Edition. WHO, Geneva, Switzerland.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2012). Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014, WHO/HSE/GCR/2012.12, WHO, Geneva, Switzerland. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/78075>

*

* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la infección por *Brucella abortus*, *B. melitensis* o *B. suis* (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE, <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>). Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para estos agentes.

NB: LA BRUCELOSIS BOVINA ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990; LA BRUCELOSIS EN OVEJAS, CABRAS Y PORCINOS ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991; CAPÍTULO ADOPTADO POR PRIMERA VEZ CON TÍTULO ACTUAL EN 2016.