

Utilización de los test de Fluorescencia Polarizada (FP) y Elisa de Competencia (C-Elisa) en el diagnóstico de brucelosis de camélidos

The use of polarized fluorescence assay (PF) and competitive ELISA test (C-Elisa) for the diagnosis of *Brucellosis* in South American camelids

X. ROJAS,¹ M.V.; S. MUÑOZ,¹ M.V.; B. OTTO,¹ M.V.; B. PÉREZ,² M.V.; K. NIELSEN,³ Ph.D.

¹Instituto de Microbiología, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

²Servicio Agrícola y Ganadero, Santiago, Chile.

³Animal Disease Research Institute (ADRI), Nepean, Ontario, Canadá. e-mail: xrojas@uach.cl

SUMMARY

Brucellosis is a zoonotic disease representing a risk factor not only to farm animals but also people in contact with, or consuming, their raw milk and raw dairy products. Because *Brucella* organisms can infect several animal species, including camelids, the aim of this research was to apply two primary assays, Fluorescence Polarization assay (PF) and Competitive ELISA (C-ELISA), to detect anti-*Brucella* antibody in camelids sera, along with conventional serological tests such as the Rose Bengal test, (RB), Seroagglutination test (SAT) and Complement Fixation test (CF). A total of 336 serum samples obtained from 315 llamas and 21 alpacas from a herd of the IXth Region (Chile), clinically and serologically free of brucellosis, were tested. The results were analyzed considering a threshold of 98.7 milipolarization (mP) for PF and 32% Inhibition for C-ELISA both of them obtained by means of the median of the last percentile. All samples gave negative results in the RB and SAT tests. The CF results were not included as many samples gave anticomplementary reactions. According to the FP and C-ELISA tests, two samples were positive in both tests with values close to or just above the cut-off point, the significance of which is discussed in the text.

Palabras claves: FP, C-Elisa, camélidos, llamas, alpacas.

Key words: PF, C-ELISA, llamas, alpacas.

INTRODUCCION

Desde hace más de seis mil años los camélidos sudamericanos (CSA) forman parte del ambiente físico y cultural de la Región altiplánica Las especies domésticas: llama (*Lama glama*) y alpaca (*Lama pacos*), concentran su población en la I Región de Chile y representan sólo el 1% de la masa total del ganado existente en nuestro país (Torres, 1992; FAO, 1996; Chile, 1997). Sin embargo, la población está creciendo y se está expandiendo a la zona central y sur del país, cumpliendo un rol en la economía de

pequeños productores por la comercialización de su carne, fibra y piel. En el mercado internacional, desde 1979 se inició en Chile un interés por exportar estos animales. Las normas de exportación incluyen diagnóstico para las enfermedades enumeradas como de cuarentena de máxima seguridad, entre las cuales está brucelosis. Para los camélidos, se ha estimado como fuente de infección el ganado caprino y ovino y una susceptibilidad (especialmente de alpacas) a *Brucella melitensis* tipo I. Sin embargo, existen escasos antecedentes al respecto. (Fernández-Baca, 1991; Murray, 1998).

Considerando que la enfermedad puede ser transmitida al hombre, especialmente por consumo de leche cruda y derivados, la presencia

de *Brucella* no sólo representa un factor de riesgo para la explotación pecuaria sino también para quienes laboran o hacen usufructo de ella. La transmisión en los camélidos infectados con cepas lisas se estima que es la misma que en el ganado ovino y de cabras, en los cuales la ruta más usual es la ingestión de alimento y de agua que ha sido contaminada con excreciones corporales, o por contacto directo entre individuos. La placenta y los fluidos fetales de animales infectados son fuente importante de estos organismos, los cuales también son encontrados en la leche (Murray, 1998). Una vez infectados, los títulos séricos pueden ser detectados por los métodos usuales de diagnóstico para detección de *Brucella* lisa. Al respecto, los animales en cuarentena por importación al país (originarios de predios libres de tuberculosis y brucelosis) se les realiza pesquisa de *Brucella* lisa por Aglutinación Lenta en Tubo (SAT) y Rosa de Bengala (RB), pruebas oficiales de brucelosis en Chile para esta especie (Chile, 1999), habiéndose utilizado esporádicamente Fijación de Complemento.

Actualmente existen otras técnicas para el diagnóstico serológico de brucelosis que han sido usadas en diferentes especies animales y han demostrado una mayor sensibilidad y especificidad que las antes mencionadas, como son las técnicas de unión primaria Elisa de Competencia (C-Elisa) y Fluorescencia Polarizada (FP). Sin embargo, para los CSA se desconoce la interpretación de sus resultados. Por ello, el objetivo de este estudio es determinar el valor umbral (nivel de anticuerpos que separa los animales negativos o positivos (Wright y col., 1993)) para estas técnicas y hacer factible su introducción en el diagnóstico de brucelosis en estas especies animales.

MATERIAL Y METODOS

Se trabajó con un total de 336 muestras de suero sanguíneo, 315 de llamas y 21 de alpacas provenientes de un plantel ubicado en la IX Región sin antecedentes clínicos ni serológicos de brucelosis, confinados en un predio cerrado donde no había copastoreo ni se criaban otras

especies animales. Las muestras se obtuvieron mediante punción caudal, en tubos al vacío y fueron llevadas al laboratorio, donde se dejaron en reposo a temperatura ambiente para la liberación del suero. Posteriormente el suero fue centrifugado a 1500 r.p.m. durante 15 minutos y almacenado a -23°C . Al momento de su utilización, se descongelaron y se realizaron las pruebas rutinarias de Rosa de Bengala (RB), Aglutinación Lenta en Tubo (SAT) y Fijación de Complemento (FC), todas de acuerdo a Alton y col. (1988).

Igualmente todas las muestras fueron analizadas con las pruebas de unión primaria Fluorescencia Polarizada (FP) y Elisa de Competencia (C-Elisa) conforme a la metodología propuesta por Nielsen y col. (1996; 1998), estableciendo el valor umbral de ambas técnicas mediante la determinación de la mediana del último percentil.

Básicamente las metodologías de ambas técnicas son las siguientes:

Fluorescencias Polarizada. En un tubo de borosilicato se adicionaron $10\ \mu\text{l}$ de suero de cada animal más 1ml de buffer Litiododecyl sulfato (1:100), en igual procedimiento para los sueros controles. Posteriormente, se agitaron en un vortex y se sometieron a un primer ciclo de lectura en el analizador de Fluorescencia Polarizada, el que expresó los resultados en unidades de milipolarización (mP). A continuación, a cada tubo se adicionó una cantidad pretitulada de antígeno cadena O conjugado con fluoresceína. Para el lote utilizado en este estudio se adicionaron $10\ \mu\text{l}$. Se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente y en el mismo orden en que se analizaron en la primera lectura, cada muestra se agitó y se sometió a la segunda lectura. A mayor formación de complejos inmunes, (muestra positiva) el número de mP será menor, (por cuanto el peso del anticuerpo unido al antígeno es mayor que el del antígeno sólo), siendo expresados por el programa del analizador en valor inverso, es decir, mayor cantidad de unidades de mP. Similar pero a la inversa ocurre en muestras negativas.

ELISA de Competencia. Esta técnica consistió en adsorber en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (NUNC 2-69620) 100 µl de antígeno LPS diluido 1:1000 en buffer de adsorción (Tampón carbonato 0.06M, pH9,6) incubando a temperatura ambiente aproximadamente por 18 horas (o una noche), luego de lo cual se lavó cuatro veces en buffer de lavado. (PBST tampón fosfato 0.01M con NaCl y tween 20). Enseguida se adicionaron 50 µl de los sueros controles en duplicado y 50 µl de sueros problema, todos previamente diluidos 1:10 en tampón PBST adicionado con EDTA y en la misma etapa se adicionaron en cada pocillo 50 µl del anticuerpo monoclonal M84 en concentración preestablecida por titulación. Se agitó por 5 minutos, dejándolo en incubación 25 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el período de incubación se realizó el ciclo de 4 lavados, y se adicionaron 100 µl en cada pocillo de anticuerpo IgG anti-ratón preparado en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano picante. (Jackson Lab.) Se agitó 5 minutos y se incubó 25 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se lavó y adicionó 100 µl de la solución sustrato/cromógeno en agitador orbital por 10 minutos. Posteriormente se leyó la densidad óptica (DO) de los sueros en un espectro fotómetro para placas con filtro de 405 nm. Los datos se analizaron en el programa SPEIA 1.03, basado en el cálculo del Porcentaje de Inhibición (%I) conforme a la siguiente fórmula:

$$\% I = 100 - (DO \text{ suero} : DO \text{ conjugado}) \times 100.$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar el valor de corte de C-Elisa y FP existen alternativas tales como comparación con un test de oro cuando existe la posibilidad de aislamiento del agente, o en caso contrario la comparación con otra técnica de alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, dado que en Chile, no hay experiencias en cuanto a aislamiento de *Brucella* en camélidos sudamericanos y los test que se utilizan en su diagnóstico, a la luz de experiencias realizadas en otros países en esta especie, no tienen los atributos de sensibilidad y

especificidad suficientes, ellos no pueden ser considerados como prueba de oro para la determinación del valor de corte. Así por ejemplo, Abbas y Agab (2002) expresan que la especificidad para Fijación de Complemento (FC) es mucho más alta que la de otras técnicas. Sin embargo, la experiencia en este estudio con FC, es que a pesar de que se utilizaron dos temperaturas diferentes para inhibición del complemento de los sueros problemas (60°C y 62°C) existieron 40 (11.9%) sueros anticomplementarios, situación que descalifica el uso rutinario y como estándar de esta técnica en el diagnóstico de brucelosis en llamas y alpacas. Este mismo autor (Abbas y Agab, 2002) opina que RB tiene una buena sensibilidad analítica en sueros de camélidos en comparación con SAT; indudablemente esta ventaja detectada por RB estriba en que esta técnica detecta IgG₁ e IgG₂, sin detectar IgM. Como se sabe, esta última inmunoglobulina pentamérica, es causante de reacciones cruzadas con diferentes microorganismos con los cuales, las brucelas lisas comparten epitopes a nivel de la cadena O. De este modo, obviar esta inmunoglobulina es valioso en cuanto a especificidad. Sin embargo, en una infección incipiente, es IgM la primera inmunoglobulina que se expresa, en tanto que tarda algunos días en aparecer la IgG₁ y con cierta dilación se genera posteriormente IgG₂, situación que podría ocasionar reaccionantes falsos negativos al utilizarse RB. Además, para que RB reaccione positivamente, se requiere una cantidad de IgG relativamente alta. Ambos antecedentes demuestran que tanto RB como SAT no deberían ser consideradas pruebas de oro, puesto que SAT tiene problema de especificidad y RB limitaciones en sensibilidad, especialmente en infecciones incipientes (Nielsen y col., 1996; Cherwonogrodzky y col., 2000).

La realidad chilena implica el uso de SAT como técnica oficial para camélidos sudamericanos (CSA), pero además se utiliza RB probablemente por su facilidad de ejecución y por su mayor especificidad. Sin embargo, las limitaciones ya señaladas para estas dos técnicas no hacen aconsejable utilizarlas como test de oro para la determinación del umbral.

Tomando en consideración que los animales muestreados provenían de un hato sin antecedentes clínicos ni serológicos de brucelosis y que están confinados en un predio cerrado donde no hay copastoreo ni se crían otras especies que pudiesen actuar como reservorios de *Brucella* en origen, estos animales pueden considerarse negativos. Por esta razón, se optó por determinar el umbral en relación a la mediana del último percentil, técnica aplicable en poblaciones negativas (FAO, 1989) y que determinó un umbral de 98.7 mP para FP y 32% I para C-Elisa.

Una vez determinado el umbral, el análisis de los resultados del examen de suero sanguíneo (cuadro 1) permitió observar que, en la totalidad de las muestras (336) analizadas, mediante RB, SAT, FP y C-Elisa, un 98.81% fueron negativas a todas las pruebas diagnósticas, en tanto un 1.18% (4 muestras) correspondieron a muestras positivas a alguna de las pruebas y negativas al resto. Como se aprecia, se excluyen de esta tabla los resultados a FC por las razones anteriormente expuestas.

De los resultados positivos a las pruebas de C-Elisa y FP (cuadro 2), se puede observar que en los dos casos en que C-Elisa presentó valores de inhibición de 32%, o sea positivo justo en la

línea umbral, los resultados a la prueba de FP fueron también cercanos al umbral establecido en este estudio (98.7 mP). Considerando que el predio de origen de las muestras no presentaba antecedentes de la enfermedad, las pruebas de unión primarias C-Elisa y FP podrían indicar la presencia de bajos títulos de inmunoglobulina en estos dos animales, por lo que en la práctica se recomendaría un nuevo muestreo con el fin de pesquisar mayores títulos en caso de desarrollarse la enfermedad. Con ello se dilucidaría un posible error del operador o un eventual estado inicial de infección, en que los títulos deberían subir en sangrados posteriores. Igualmente las 2 muestras positivas a FP, negativas a las otras pruebas y lejanas al valor de corte de C-Elisa (17% de inhibición), en la práctica ameritan repetición, aunque la reacción de positividad fue mínima por estar ambas prácticamente en el valor de corte.

Por otro lado, atendiendo a que la brucelosis bovina es endémica en la región de origen de los animales, representa un cierto contacto de todos los animales y el hombre con la *Brucella* como antígeno. Así las especies animales, aunque sin enfermar, pueden generar cierta cantidad de inmunoglobulinas pesquisables por técnicas altamente sensibles como lo son C-Elisa y FP aunque en valores trazas y por supuestos

CUADRO 1: Anticuerpos anti*Brucella* detectados en suero sanguíneo de llamas y alpacas usando las pruebas RB, SAT, FP, y C-ELISA.

AntiBrucella antibodies detected in blood serum samples from lama and alpaca by RB, SAT, FP and

C-ELISA test.

| Resultados | Llamas | Alpacas | Total | % |
|-----------------------------------|--------|---------|-------|-------|
| Neg. a todas las pruebas | 311 | 21 | 332 | 98.81 |
| Neg. RB, SAT, FP y Pos. a C-Elisa | 2 | 0 | 2 | 0.59 |
| Neg. RB,SAT,C-ELISA y Pos a FP | 2 | 0 | 2 | 0.59 |
| Total | 315 | 21 | 336 | 100 |

Neg: Negativo. Negative

Pos: Positivo. Positive

RB: Rosa de Bengala. Rose Bengal test.

SAT: Aglutinación Lenta en tubo. Slow agglutination test.

FP: Fluorescencia Polarizada. Polarized Fluorescence Assay.

C-ELISA: ELISA de Competencia. Competitive ELISA test.

CUADRO 2: Niveles de positividad en muestras de suero sanguíneo de llama a los test de FP o C-ELISA para diagnóstico de brucelosis con resultados negativos a RB y SAT.

FP or C-ELISA seropositive level of antibrucella antibodies in two lama serum negative samples to RB and SAT.

| Muestra N° | RB | SAT | FP (mP) | C-Elisa (% I) |
|------------|-----|-----|------------|------------------|
| 310 | Neg | Neg | 97.39 | 32 |
| 219 | Neg | Neg | 96.13 | 32 |
| 325 | Neg | Neg | 98.7 | 17 |
| 305 | Neg | Neg | 99.11 | 17 |

 Muestra Positiva.
Positive sample.

fluctuantes entre los sangrados con márgenes de negatividad en algunos hechos que fundamentan aún mas la repetición de muestras positivas débiles para determinar cinética de anticuerpos.

Desde un punto de vista práctico, las ventajas de la técnica de FP son su fácil ejecución, bajo costo por muestra y su posibilidad de ser realizada en terreno. Por otra parte, la experiencia de su uso en el diagnóstico de brucelosis bovina, demuestra su capacidad de evitar positivos vacunales, ya que no detecta anticuerpos resultantes de la vacunación con cepa 19. Pese a que la vacunación con esta cepa ya no se practica en Chile en el bovino, este dato pudiese ser de importancia en países que sí la utilizan y que, eventualmente, pudieran introducirla en camélidos (Dahoo y col., 1986). Además, se requiere de solo un antígeno, un solo tampón y la ejecución de una muestra no demora más de 5 minutos; los resultados son registrados de manera sencilla mediante programas computacionales de fácil manejo, donde el sistema de lectura de resultados es automático de modo que su aplicación resulta objetiva. Su desventaja podría radicar en la inversión inicial que se debe realizar para adquirir el analizador de Fluorescencia Polarizada.

Respecto de las ventajas de la introducción de C-Elisa, entre otras están también su sensibilidad, especificidad y objetividad en la lectura. Los costos de implementación han ido

bajando debido a que los equipos pueden utilizarse para el diagnóstico de otras enfermedades, con la consecuente masificación de la técnica y capacitación del personal. El diagnóstico en sí se hace con bastante rapidez y precisión, y al igual que FP, diferencia anticuerpos de infección de aquellos generados por cepa 19 (Nielsen y col., 1992).

Resumiendo, la población negativa estudiada, permitió establecer el valor umbral de los dos métodos de unión primaria aplicados a ellas, (FP y C-ELISA), con lo cual es posible su introducción en el diagnóstico de brucelosis de estas especies.

RESUMEN

En Chile, como en muchos países de Latinoamérica, la brucelosis es una zoonosis presente, representando no sólo un factor de riesgo para las explotaciones pecuarias sino también para quienes laboran y hacen usufructo de ella, especialmente por el consumo de leche cruda y sus derivados. Como la *Brucella* afecta a diferentes especies de animales, el objetivo de este trabajo fue utilizar las técnicas de unión primaria, como son Fluorescencia Polarizada (FP) y Elisa de Competencia (C-Elisa), para la detección de anticuerpos anti-*Brucella* en suero de camélidos y, comparar sus respuestas con las pruebas de Rosa de Bengala (RB), Aglutinación

Lenta en Tubo (SAT) y Fijación de Complemento (FC) en atención a que estas especies representan un potencial pecuario de cierta trascendencia.

Para ello se analizaron 336 sueros, de los cuales 315 pertenecían a llamas y 21 a alpacas, provenientes de un predio de la Novena Región clínica y serológicamente libre de *Brucella*.

Los resultados obtenidos señalan que el umbral de positividad para FP, calculado según la mediana del último percentil, fue de 98.7 milipolarizaciones (mP) y, el corte para C-Elisa con el mismo método fue de 32% de Inhibición (% I).

Todas las muestras analizadas dieron resultados negativos a RB y SAT. Los resultados con FC no pudieron ser considerados, por cuanto un alto porcentaje de las muestras fueron anticomplementarias. Con las técnicas de C-Elisa y FP, dos muestras reaccionaron positivamente en cada uno de los test con valores en el nivel de corte o levemente superiores. Se discute la significación de ellas.

BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS, H., H. AGAB. 2002. A review of camel brucellosis. *Prev. Vet. Med.* 55: 47-56.
- ALTON, G. G., L. M. JONES, R.D. ANGUS, J.M. VERGER. 1988. Techniques for the Brucellosis laboratory. Institute National de la Recherche Agronomique, París. Francia.
- CHERWONOGRODZKY, J., G. DUBRAY, E. MORENO, H. MAYER. 2000. Antigens of *Brucella* in Animal Brucellosis. Eds, Klaus Nielsen, J. Robert Duncan, Florida. USA.
- CHILE. 1997. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICAS (INE), VI Censo Agropecuario Nacional.
- CHILE. 1999. MINISTERIO DE AGRICULTURA, SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO, DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN PECUARIA. Informe: Exigencias sanitarias para la internación de camélidos a Chile.
- DAHOO, I., P. WRIGTH, G. RUCKERBAUER, B. SAMAGH, ROBERTSON, L. FORBES. 1986. A comparison of five serological test for bovine brucellosis. *Can. J. Vet. Pres.* 50: 485-493.
- FAO/ IAEA, Food Agricultural Organization/ International Atomic Energy Agency. 1989. Division Elisa Kit For Animal Disease Diagnosis. Agriculture Laboratory. Animal Production and Health Unit, Seibersdorf. Austria.
- FAO, Food Agricultural Organization. 1996. Manual de prácticas de manejo de Alpacas y Llamas, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. Italia.
- FERNÁNDEZ-BACA, S. 1991. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos Sudamericanos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación, Santiago, Chile.
- MURRAY, E. 1998. Medicine and surgery of South American camelids Llama-Alpaca-Vicuña- Guanaco. 2nd ed., Iowa State University Press/Ames, USA.
- NIELSEN, K., D. GALL, W. A. KELLY, M. D. HENNING, M. M. GARCÍA. 1992. Enzyme Immunoassay Application to diagnosis of bovine brucellosis. Agriculture and Agri-Food Canada, Nepean, Ontario, Canada.
- NIELSEN, K., D. GALL, W. A. KELLY, A. M. VIGLIOCO, M. D. HENNING, M. M. GARCÍA. 1996. Application to Enzyme Immunoassay for the diagnosis of brucellosis. ADRI Agriculture and Agri-Food Canada.
- NIELSEN, K., D. GALL, M. LIN, C. MASSANGILL, L. SAMARTINO, B. PEREZ, M. COATS, S. HENNAGER, A. DAJER, P. NICOLETTI, F. THOMAS. 1998. Diagnosis of bovine brucellosis using homogeneous Fluorescence Polarization Assay. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 68:321-329.
- TORRES, H. 1992. South American Camelids An Action Plan for their Conservation. IUCN, Gland, Switzerland.
- WRIGHT, P. F., E. NILSSON, E. VAN ROODIJ, M. LETENTA, M. JEGGO. 1993. Standardization and validation of enzyme linked immunosorbent assay techniques for detection of antibody in infectious diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 12: 435-450.