



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

ISSN: 1851-6114

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires  
Argentina

Susana Kin, Marta; Giménez, Hugo; Fort, Marcelo Cristian  
La técnica de polarización fluorescente para el diagnóstico de Brucella en Chaetophractus villosus  
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 52, núm. 1, 2018, pp. 61-64  
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires  
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53568572008>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso  
abierto

# La técnica de polarización fluorescente para el diagnóstico de *Brucella* en *Chaetophractus villosus*

*Technique of fluorescence polarization for the diagnosis of Brucella in Chaetophractus villosus*

*A técnica de polarização fluorescente para o diagnóstico de Brucella em Chaetophractus villosus*

► Marta Susana Kin<sup>1a</sup>, Hugo Giménez<sup>2b</sup>, Marcelo Cristian Fort<sup>3b</sup>

<sup>1</sup> Doctora en Biología.

<sup>2</sup> Técnico de laboratorio.

<sup>3</sup> Master en Veterinaria.

<sup>a</sup> Cátedra de Biología de Cordados, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam, Uruguay 151, Santa Rosa, La Pampa, Argentina. CP. 6300.

<sup>b</sup> Laboratorio de Sanidad Animal, INTA, Anguil, Ruta Nacional 5 km 580. CC 11 (6326) Anguil, La Pampa, Argentina.

## Resumen

La brucelosis es una enfermedad muy extendida por todo el mundo. El diagnóstico se realiza mediante el uso de diferentes técnicas, entre ellas el aislamiento del agente etiológico o por serología detectando anticuerpos específicos. Todos estos métodos están estandarizados y validados en general para las distintas especies animales de interés zootécnico. En animales silvestres pueden utilizarse los mismos procedimientos serológicos, pero cada uno debe ser validado para la especie animal estudiada. El objetivo de este trabajo fue comprobar si la técnica de Polarización Fluorescente (FPA) utilizada para la determinación de anticuerpos contra *Brucella* en bovinos puede ser usada para el diagnóstico de *Brucella* en el armadillo (*Chaetophractus villosus*). Para ello se tomaron 150 muestras de sangre de *Chaetophractus villosus*. Veinticuatro muestras fueron positivas por medio de las técnicas de antígeno *bufferado* en placa, seroaglutinación lenta en tubo, 2-mercaptoetanol y fijación del complemento. Las mismas muestras resultaron positivas a la técnica de Polarización Fluorescente, estableciéndose un límite de corte de 82 mP. El índice *Kappa* registrado fue de 1 para todos los *tests* de diagnóstico comparados con FPA (IC: 0,84-1).

**Palabras clave:** polarización fluorescente \* *Brucella* \* *Chaetophractus villosus*

## Abstract

*Brucellosis is a disease widespread throughout the world. The diagnosis is made through the use of different techniques including the isolation of the etiological agent or by serology detecting specific antibodies. All these methods are standardized and validated in general for animal species of zoo-technical interest. In wild animals, serological procedures may be used, but each should be validated for the particular animal species studied. The objective of this work was to verify if the technique of Fluorescent Polarization used for the determination of antibodies against Brucella in ruminants*

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

can be used for the diagnosis of *Brucella* in *Chaetophractus villosus*. To this aim, 150 blood samples of *Chaetophractus villosus* were taken. Twenty-four samples were positive by the techniques of Antigen Buffered in Plate, serum agglutination test (SAT), 2-mercaptoethanol (2-ME) agglutination test and complement fixation test (CFT). The same samples were also positive by Fluorescent Polarization, and a cut-off limit of 82 mP was established. The KAPPA index was 1 for all diagnostic tests compared to FPA (CI: 0.84-1).

**Keywords:** fluorescent polarization \* *Brucella* \* *Chaetophractus villosus*

## Resumo

A brucelose é uma doença muito espalhada pelo mundo. O diagnóstico é feito por meio de diferentes técnicas, incluindo o isolamento do agente etiológico ou por sorologia detectando anticorpos específicos. Todos esses métodos são padronizados e validados em geral para diferentes espécies animais de interesse zootécnico. Em animais silvestres podem ser utilizados os mesmos métodos serológicos, mas cada um tem de ser validado para a espécie de animal estudada. O objetivo deste estudo foi testar se a técnica de Polarização Fluorescente utilizada para a determinação de anticorpos contra *Brucella* em bovinos pode ser utilizada para o diagnóstico de *Brucella* em tatu (*Chaetophractus villosus*). Para isso, 150 amostras de sangue de *Chaetophractus villosus* foram coletadas. Vinte e quatro amostras foram positivas por técnicas de antígeno bufferado em placa, soroaglutinação lenta em tubo, 2-mercaptoetanol e fixação do complemento. As mesmas amostras foram positivas para a técnica de Polarização Fluorescente, estabelecendo um limite de corte de 82 mP. O índice Kappa registrado foi de 1 para todos os testes de diagnóstico em comparação com FPA (CI: 0,84-1).

**Palavras-chave:** polarização fluorescente \* *Brucella* \* *Chaetophractus villosus*

## Introducción

La brucelosis es una enfermedad muy extendida por todo el mundo. Es causada por bacterias intracelulares facultativas gram negativas (1), la cual se caracteriza clínicamente en rumiantes por uno o más de los siguientes signos: aborto, retención de placenta, eliminación de los microorganismos en las secreciones uterinas y en la leche, orquitis, epididimitis y en ocasiones muy infrecuentes, artritis.

Esta enfermedad también ha sido detectada en muchas especies silvestres alrededor del mundo. En Argentina existen registros en zorro gris (*Pseudalopex gymnocercus*) 17% (2), zorros colorados y grises (*Dusicyon culpaesus* y *Dusicyon griseus*) 17,8% (3), liebres (*Lepus europaeus*) 6,6% (4) y peludos (*Chaetophractus villosus*) 16% (5). En algunas de estas especies se ha aislado la *Brucella* productora de la enfermedad, encontrándose que la misma correspondía a *Brucella suis* biotipo I en el caso de liebres (6) y peludos (5). La caza de ambas especies es habitual en la región, utilizándose su carne para consumo. La manipulación que se realiza luego de la caza y el consumo de carne mal cocida, constituye un serio riesgo para la salud humana considerando la alta prevalencia encontrada, particularmente en peludos.

El diagnóstico se realiza mediante el uso de diferentes técnicas, entre ellas el aislamiento del agente etiológico o el diagnóstico por serología utilizando distintas técnicas

como la de antígeno *bufferado* en placa (BPA), soroaglutinación lenta en tubo (SAT), 2-mercaptoetanol (2-ME), Fijación del complemento (FC), ensayo por Inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y la técnica de polarización fluorescente (FPA), siendo estos dos últimos ensayos similares o superiores a la FC (7).

La técnica de PFA requiere manipulaciones mínimas y se puede completar en pocos minutos (8).

La prueba de BPA se utiliza como *screening* por su alta sensibilidad en paralelo con FC, ELISA y FPA como pruebas confirmatorias; éstas son adecuadas tanto para analizar rodeos como animales individuales, siendo todos estos métodos estandarizados y validados para el ganado bovino (7).

En otras especies, como por ejemplo en búfalos (*Bubalus bubalus*), bisonte americano y europeo (*Bison bison*, *Bison bonasus*), yak (*Bos grunniens*), ciervo colorado (*Cervus elaphus*), camellos (*Camelus bactrianus* y *C. dromedarius*) y camélidos sudamericanos, la infección por *Brucella* sp. sigue un curso similar que en el ganado bovino (7)(9). Para estos animales pueden utilizarse los mismos procedimientos serológicos (10), pero cada uno debe ser validado para la especie animal estudiada (11)(12).

El objetivo de este trabajo fue comprobar si la técnica de FPA utilizada para la determinación de anticuerpos contra *Brucella* en diferentes especies puede ser validada para su uso en el diagnóstico de brucelosis en *Chaetophractus villosus*.

## Materiales y Métodos

De un total de 150 *Chaetophractus villosus*, capturados en predios rurales de la provincia de La Pampa, se extrajo una muestra de sangre (sin anestesia), por punción de la *rete mirabile* de la cola (13), que fue centrifugada a 2500 rpm durante 15 minutos. Luego se procedió a separar el suero en tubos Eppendorf y se los almacenó a -20 °C hasta su procesamiento. A cada uno de los sueros se le realizaron las siguientes pruebas BPA, SAT, 2-ME, FC y FPA. Para comparar las distintas técnicas de brucelosis se utilizó el *Test* de Concordancia de Diagnóstico ( $\kappa$ ) y la proporción de conformidad observada.

## Resultados

De un total de 150 muestras de sueros de *C. villosus*, se obtuvieron 24 muestras positivas a BPA. Las mismas también resultaron positivas por medio de las técnicas SAT, 2-Me, FC y FPA, estableciéndose un límite de corte de 82 mP para esta última técnica. A ese nivel de corte la sensibilidad y especificidad del FPA se ubicó en el 100%, al igual que los valores predictivos positivos y negativos.

El nivel de anticuerpos para las distintas técnicas analizadas fue registrado en UI (unidades internacionales) para cada una de las 24 muestras de sueros positivas (Tabla I).

El índice  $\kappa$  fue de 1 para todos los *tests* de diagnóstico comparados con FPA (IC: 0,84-1), considerándose un nivel de confianza de 0,95%, siendo la sensibilidad y especificidad del 100% para una prevalencia

verdadera y aparente del 16%, siendo los límites de prevalencia entre 10,1 y 21,8 (Win Episcopo 2.0).

Los valores mínimos y máximos obtenidos mediante el uso de la técnica de Polarización Fluorescente estuvieron entre 3,4 mP y 81,5 mP para los sueros negativos y entre 82,6 mP y de 277,3 mP para los sueros positivos (Tabla II).

Para los dos animales infectados naturalmente en los cuales fue posible aislar *Brucella suis* biotipo 1 (5), la serología resultó positiva para todas las pruebas diagnósticas, registrándose valores de FPA del orden de 106,2 mP y 271,3 mP, respectivamente, para cada uno de los sueros.

## Discusión y Conclusiones

En Argentina la técnica de FPA ha sido utilizada para la detección de brucelosis en fauna silvestre en *Lepus europaeus* (4), *Pseudalopex gymnocercus* (2), *Hydrochoerus hydrochaeris* (14), *Blastocercus dichotomus* (15) y *Bubalus bubalis* (16).

En *C. villosus*, la utilización de FPA resultó ser muy eficaz, ya que detectó los mismos sueros positivos que las Técnica de Aglutinación en Placa, SAT, 2-Me y FC. La alta concordancia entre las técnicas se ve reflejada con un valor de  $\kappa$  de 1, por lo que se puede afirmar que el *test* de FPA a los valores de corte establecidos ( $\geq 82$  mP), resulta ser una técnica aplicable a la detección serológica de *Brucella* en *Chaetophractus villosus*.

Trabajos previos realizados en animales infectados experimentalmente con *B. suis*, en los cuales fue posible aislar el microorganismo de distintos órganos, mos-

Tabla I. Muestras positivas a BPA y grado de titulación de SAT, 2-ME, FC y FPA.

	Muestras negativas	Muestras positivas				Np/Nt (%)			
BPA	126	24				24/150 (16)			
SAT T	126	25-50	50-100	100-200		24/150 (16)			
Np		2	1	21					
2-ME T	126	25	25-50	50-200		24/150 (16)			
Np		3	1	20					
FC T	126	41	63	83	165	250	760	1323	24/150 (16)
Np		1	1	3	2	2	2	13	
FPA T	126	82-100	100-200	$\geq 200$		24/150 (16)			
Np		2	6	16					

T: títulos (U.I./mL), grado de aglutinación; Np: muestras positivas; Nt: muestra total; (%): prevalencia.

Tabla II. Valores mínimos y máximos de FPA.

Sueros	N	FPA Mín	FPA Media	FPA Máx
Negativos	126	3,4	60,9	81,5
Positivos	24	82,6	220,0	277,3

traron valores muy superiores a los indicados a partir de la tercera semana de inoculación (datos sin publicar). También fue posible constatar los mismos valores en dos animales infectados naturalmente en los cuales *B. suis* biotipo 1 fue aislada siendo los valores registrados para FPA de 106,2 mP y 271,3 mP respectivamente.

La importancia de poder utilizar una técnica como FPA, que es rápida, sencilla y de bajo costo, redundará en un beneficio para el diagnóstico en animales silvestres en situaciones de reintroducción de individuos en una población salvaje, en las translocaciones de los mismos o en relación con proyectos de reproducción *ex situ*. Otro de los posibles usos de esta técnica sería para la confirmación de la ausencia de brucelas en armadillos (*Chaetophractus villosus*) destinados a consumo humano.

Como conclusión se puede decir que la técnica de FPA mostró excelente correlación con las otras técnicas utilizadas (BPA, SAT, 2-ME, FC), siendo la aplicación del *test* práctica y rápida, pudiendo recomendarse para el diagnóstico de rutina de la brucelosis en *Chaetophractus villosus*.

#### CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a UNLPam e INTA por financiar este trabajo (Beca de Investigación UNLPam 2009 Res CS 156/09 y Proyecto de Investigación UNLPam 208 Res CS 161/09; a los agricultores, por permitir el acceso a sus propiedades rurales y a todos los que colaboraron con la captura de animales. Los autores desean agradecer al Laboratorio Santa Rosa y a Rubén Cayupán por su colaboración.

#### CORRESPONDENCIA

Dra. MARTA SUSANA KIN  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad Nacional de La Pampa  
Uruguay 151, 6300 SANTA ROSA, La Pampa, Argentina  
Fax: 54-(0)2954-432535  
E-mail: kinsusana@yahoo.com.ar

## Referencias bibliográficas

- Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J* 2010 Aug; 51 (4): 296-305.
- Fuchs L, Baldone V, Fort M, Rojas MC, Samartino L, Giménez H. Brucelosis en el zorro gris pampeano (*Pseudalopex gymnocercus*) en la provincia de La Pampa (Argentina). *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2009; 43 (2): 227-31.
- Martino PE, Montenegro JL, Preziosi JA, Venturini C, Bacigalupe D, Stanichi NO *et al.* Serological survey of selected pathogens of free ranging foxes in southern Argentina, 1998-2001. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2004; 23 (3): 801-6.
- Baldone VN, Fuchs LI, Fort MC, Rojas MC, Bedotti DO, Samartino L, *et al.* Presencia de anticuerpos contra *Brucella* en la liebre europea (*Lepus europaeus*, Pallas 1778) en la provincia de La Pampa, Argentina. *Rev Med Vet* 2007; 88: 242-5.
- Kin MS, Fort M, T. de Echaide S, Casanave EM. *Brucella suis* in armadillos (*Chaetophractus villosus*) from La Pampa, Argentina. *Vet Microbiol* 2014; 170: 442-5.
- Fort M, Baldone V, Fuchs L, Rojas M, Bedotti D, Giménez H. Aislamiento de *Brucella suis* en liebre europea (*Lepus europaeus*) en la provincia de La Pampa, Argentina. *Rev Inv Prod Animal. INTA Bol de Div Técnica* 2006; 90: 175-81.
- OIE 2012. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Manual de animales terrestres 7ª ed. 2012. T.I. Capítulo 2.4.3. Brucelosis bovina Pg. 1-39.
- Nielsen KH, Gall D, Jolley M, Leishman G, Balsevicius S, Smith P, *et al.* A homogeneous fluorescence polarization assay for the detection of antibody to *Brucella abortus*. *J Immunol Methods* 1996; 195: 161-8.
- El Behiry A. Evaluation of diagnostic techniques and antimicrobial resistance of *Brucella* spp. isolated from blood serum of camels and camel ranchers. *J Microbiol Res* 2014; 4 (2): 104-11.
- Nicoletti P. An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Trop Anim Health Prod* 1992 Feb; 24 (1): 40-4.
- Gall D, Nielsen K, Forbes L, Davis D, Elzer P, Olsen S, *et al.* Validation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological tests for detection of serum antibody to *Brucella abortus* in bison. *J Wildl Dis* 2000 Jul; 36 (3): 469-76.
- Gall D, Nielsen K, Forbes L, Cook W, Leclair D, Balsevicius S, *et al.* Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. *J Wildl Dis* 2001 Jan; 37 (1): 110-8.
- Luaces JP, Rossi LF, Aldana Marcos HJ, Merani MS. The rete mirabile of the tail, an effective site for sampling sterile blood from armadillos (Dasypodidae, Xenarthra). *Ital J Zool* 2011; 78: 63-9.
- Corriale MJ, Orozco MM, Jiménez Pérez I. Parámetros poblacionales y estado sanitario de carpinchos (*Hydrochoerus hydrochaeris*) en lagunas artificiales de los Esteros del Iberá. *Mastozoología Neotropical* 2013 Jun; 20 (1): 31-45.
- Orozco MM, Maruull C, Jiménez I, Gürtler RE. Mortalidad invernal de ciervo de los pantanos (*Blastocerus dichotomus*) en humedales del noreste de Argentina. *Mastozoología Neotropical* 2013; 20 (1): 163-7.
- Konrad JL, Campero LM, Caspe GS, Brihuega B, Draghi G, Moore DP, *et al.* Detection of antibodies against *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., and Apicomplexa protozoa in water buffaloes in the Northeast of Argentina. *Trop Anim Health Prod.* 2013 Nov; 45 (8): 1751-6.

**Recibido: 12 de julio de 2017**

**Aceptado: 22 de septiembre de 2017**