

Capítulo XLI

Nuevas tecnologías: fluorescencia polarizada en el diagnóstico de brucelosis y otras patologías

Elí Ramón Rubio Fuenmayor

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas y de algunas toxicosis debe apoyarse en pruebas serológicas de alta capacidad diagnóstica que permitan una identificación eficiente de los animales afectados. Este aspecto es especialmente crítico cuando se trata de problemáticas clínicas sin tratamiento conocido, como son los casos de brucelosis y tuberculosis bovina, de anemia infecciosa equina (AIE) y de intoxicaciones producidas por la presencia de diversas toxinas en los cereales; de ahí la necesidad de mantener la precisión en el diagnóstico. La brucelosis y la tuberculosis son enfermedades muy contagiosas que afectan varias especies animales, representando además una grave amenaza a la salud pública, al ser capaz de transmitirse al hombre. La brucelosis provoca abortos, retención placentaria, nacimiento de crías débiles de bajo peso e infertilidad, lo que conlleva a grandes pérdidas económicas (Sutherland, 1980), mientras que la tuberculosis compromete el desarrollo y productividad de los rebaños.

Hasta el momento, el diagnóstico serológico de brucelosis en Venezuela se ha venido realizando a través de métodos tradicionales que requieren la utilización de una batería de pruebas, unas de detección y otras de confirmación. Sin embargo, pese al esfuerzo e inversión en tiempo y dinero, es posible que esta metodología no logre una adecuada identificación de la enfermedad provocando solo malestar, escepticismo, frustración y pérdida de tiempo y dinero por parte de los productores y agrotécnicos. Por otro lado, la identificación de la tuberculosis y la AIE carece de pruebas rápidas, eficientes y veraces.

Recientes estudios asociados con ensayos de fluorescencia polarizada (FPA) han permitido el desarrollo de tecnologías de punta dirigidas a la detección de anticuerpos en los animales y patógenos en los alimentos. En el caso de brucelosis, tuberculosis y anemia infecciosa equina, las pruebas de este tipo han sido perfeccionadas para lograr un rápido, fácil y preciso diagnóstico, basado en la detección de anticuerpos específicos de cada enfermedad, diferenciando con exactitud entre animales vacunados (si fuese el caso), enfermos y sanos. El método de fluorescencia polarizada es ca-

paz de detectar anticuerpos contra *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*; *Mycobacterium bovis* y contra el lentivirus causante de la AIE.

Se trata de metodologías aprobadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) al señalarla como prueba primaria y confirmatoria del diagnóstico (en el caso de brucelosis), al permitir una visión exacta en poco tiempo del estatus real del rebaño y cada animal en particular frente a estas enfermedades. Esta metodología de FPA ya está disponible en Venezuela para el beneficio de los productores. En este Capítulo se presentan las bases teóricas, su potencial en la determinación de diversas patologías y los resultados preliminares de la validación y puesta en marcha del diagnóstico de brucelosis en Venezuela.

LA FLUORESCENCIA POLARIZADA: HISTORIA Y FUNDAMENTO

La teoría sobre fluorescencia polarizada fue descrita por primera vez en 1926 por Perrin, en base a la observación sobre moléculas fluorescentes que se excitaban con luz polarizada en un plano y cuyo movimiento dependía de su tamaño (Alfonso Méndez, 2008). Sin embargo, fue Weber quien desarrolló en 1953, la primera instrumentación en la resolución de numerosos problemas en biomedicina: detección de drogas y metabolitos en sangre, secuenciación de aminoácidos en proteínas y bases en ácidos nucleicos (Alfonso Méndez, 2008). Más tarde, Dandliker y colaboradores en 1961, amplían la técnica hacia otros sistemas biológicos como las reacciones antígeno-anticuerpo y las interacciones con receptores hormonales. Finalmente fue Jolley quien desarrolló la fluorescencia polarizada como un sistema comercial para el control de niveles de drogas terapéuticas y su abuso en los fluidos del cuerpo humano (Alfonso Méndez, 2008).

Una de las ventajas prácticas de la FPA es la facilidad de la implementación y su rapidez, lo que permite obtener un diagnóstico rápido y preciso en pocos minutos, lo que contribuye a una comunicación rápida de los resultados, facilitando el control de las enfermedades. FPA “...es una tecnología homogénea y las reacciones son muy rápidas, requiere de segundos o minutos para alcanzar el equilibrio, los reactivos son estables, pueden ser preparados lotes de gran tamaño. Esto se traduce en una alta reproducibilidad. Debido a estas propiedades la fluorescencia polarizada ha demostrado ser altamente automatizable. El hecho de no incluir pasos de lavados aumenta la precisión y velocidad a través de tecnologías heterogéneas y reduce los residuos...” (Samartino et al., 2007).

La FPA se fundamenta en el movimiento y rotación de las moléculas, mediante el uso de una sustancia fluorescente (fluorocromo) para marcar una pequeña molécula donde la unión de esta a otra de igual o mayor tamaño puede ser medido a través de su velocidad de rotación y la capacidad de ésta de polarizar o no la luz. En el hipotético caso de que se pudieran mantener moléculas inmóviles, de tal forma que todos sus dipolos de excitación fueran paralelos en el plano vertical y fuesen excitados con luz polarizada en el plano vertical, la luz emitida también estaría totalmente polarizada en el plano vertical (Figura 1).

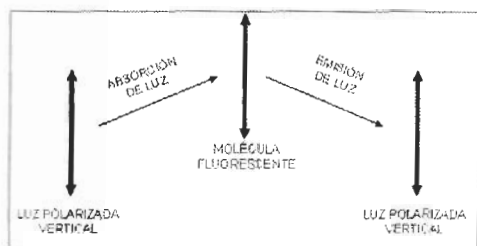


Figura 1. Representación de la emisión de luz polarizada en el plano vertical.

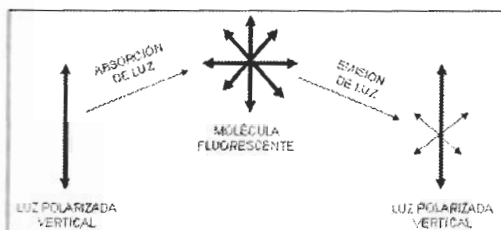


Figura 2. Representación de la emisión parcial de luz polarizada según dirección de componentes.

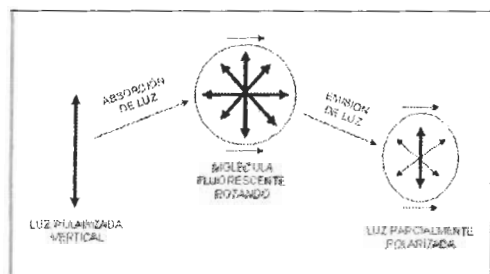


Figura 3. Representación de la emisión de luz ante el movimiento de las moléculas.

niendo así una intensidad que se denomina I_n) y otro orientado perpendicularmente a dicha dirección (obteniendo un valor llamado I). La polarización de la muestra se calcula a partir de estos dos valores como:

$$P = \frac{I_n - I}{I_n + I}$$

Dado que el cociente obtenido es un número adimensional, se considera que sus unidades son unidades de polarización (P), pudiendo expresarse también como unidades de milipolarización (mP) aplicando la conversión: $mP \cdot 1000 = P$.

Si por el contrario, las moléculas inmóviles estuvieran orientadas al azar (de forma que la orientación de sus dipolos de excitación podría ser cualquiera) y fuesen excitadas con luz polarizada en el plano vertical, sucederían varias cosas a la vez. Las moléculas con sus dipolos en el plano vertical actuarían según lo descrito en el caso anterior. Las moléculas con sus dipolos perpendiculares al plano de luz polarizada no absorberían luz y, por lo tanto, no emitirán luz. Las moléculas con cualquier otra orientación absorberían luz en distintos grados, dependiendo de lo cerca o lejos que estuviera su orientación en el plano vertical. Debido a todo ello, la luz emitida no sería totalmente polarizada en el plano vertical sino que incluiría componentes en otras direcciones (Figura 2).

En realidad, las moléculas en general no están inmovilizadas, sino que rotan, lo cual introduce la variable de que las moléculas absorben luz cuando su dipolo tiene una determinada dirección y a la hora de emitirla dicha orientación ha variado (Figura 3).

Para medir la fluorescencia polarizada, la muestra problema se excita con luz verticalmente polarizada y a continuación se mide la intensidad de la luz emitida que pasa a través de dos polarizadores, uno orientado paralelamente a la dirección de la luz polarizada de excitación (obte-

Las condiciones límites de la primera ecuación son: la luz emitida está totalmente despolarizada, por lo que los valores de I_n y de I son iguales y el valor de la polarización es 0. La luz emitida está totalmente polarizada por lo que el valor de I es cero. Aplicando la ecuación se obtiene un valor de polarización de 1. En la práctica, los valores típicos de P oscilan entre 0,01 y 0,3, es decir, entre 10 y 300 mP (Alfonso Méndez, 2008).

Para fluorescencia polarizada existen dos tipos de equipos en el mercado, los sencillos (de tubo para determinaciones individuales) y los automatizados. Entre estos últimos, se dispone de dos marcas: Bio Tek Synergy-2[®] y Tecan GENios Pro[®], los cuales son instrumentos de alto rendimiento diseñado para realizar ensayos a nivel de laboratorio en placas de 96 pocillos en tan solo 90 segundos. Posee un software de recopilación de datos, un monocromador de banda estrecha, un espejo dicroico, diferentes tipos de filtro, tres fuentes de luz de amplio espectro y elementos ópticos de alta sensibilidad para lograr de esta manera un rendimiento óptimo en la lectura.

Por el contrario, Sentry-100[®] es un equipo portátil diseñado para realizar análisis a nivel de campo o laboratorio donde las unidades de alto rendimiento no están disponibles o en los casos donde el número de pruebas es limitado y deben realizarse sobre una base diaria o anual. Aproximadamente pueden ser realizadas 25 mil pruebas anuales y los resultados pueden ser exportados a una computadora externa, la cual está equipada con una caja de tapa dura de transporte, cable de alimentación de electricidad, baterías, cable USB, software, cable RS232, normas y manuales.

Hoy en día existen una serie de kits de ensayos para el diagnóstico de diferentes patologías a través de la tecnología FPA, ellos se dividen en dos tipos: pruebas para garantizar la inocuidad de los alimentos, como la detección de aflatoxinas, fumonisinas y Deoxynivalenol (DON) y un segundo grupo que comprende análisis de tuberculosis bovina, brucelosis y anemia infecciosa equina (Diachemix, 2008).

Las aflatoxinas, un grupo de compuestos tóxicos relacionados estructuralmente y producidos por ciertas cepas del hongo *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, se asocian con una variedad de efectos adversos en un número importante de especies animales, incluyendo seres humanos. En la ganadería, los resultados típicos de la contaminación causan disminución de la ganancia de peso, inhibición del crecimiento, anemia, disminución de la fertilidad o aborto. El kit de análisis de aflatoxina es una prueba cualitativa diseñada para determinar la presencia de estas en el maíz, sorgo y otros cereales.

La fumonisina es una toxina producida por las especies de *Fusarium* que crecen en diversos productos agrícolas, especialmente maíz en el campo o en el almacenamiento del grano. La toxicosis se asocia con una variedad de efectos adversos como leucoencefalomalacia y rechazo moderado al alimento. La técnica de FPA es una prueba cualitativa diseñada para determinar la presencia de fumonisina en maíz.

La detección de Deoxynivalenol (DON) mediante FPA está especialmente diseñada para determinar la presencia de niveles muy bajos de este tóxico en el trigo. El kit incluye una solución de anticuerpo específico que reacciona a la presencia de DON y permite a un lector individual de FP, niveles de detección de 0,17 ppm. El DON es probablemente la micotoxina de *Fusarium* más corriente, contamina diversos cereales, especialmente el maíz y el trigo.

La tuberculosis en los vacunos es producida por *Micobacterium bovis*, una bacteria aeróbica de crecimiento lento, que está íntimamente relacionada a *M. tuberculosis*, que causa tuberculosis en los seres humanos y otros animales como ovejas, cabras, búfalos, leones y antílopes. Es un problema de salud pública y es responsable de importantes pérdidas económicas en muchos países. La presencia de anticuerpos frente a *M. bovis* en suero bovino es indicativa de infección previa por este agente. La prueba de FPA utiliza un péptido marcado con fluoresceína con la misma secuencia de aminoácidos de una región epitópica del agente. La luz emitida por el conjugado es baja cuando no hay presencia de anticuerpos y aumenta la polarización de la luz cuando los anticuerpos se unen al conjugado.

El kit para detección de anticuerpos para anemia infecciosa equina solo está disponible para evaluación por parte de investigadores. Se espera que tras su validación se pueda aprovechar comercialmente en muy corto tiempo.

La brucelosis, como se ha indicado, es una enfermedad infecto-contagiosa zoonótica causada por bacterias del género *Brucella*, de distribución mundial y que afecta a numerosas especies tales como bovinos, porcinos, ovinos, caprinos y humanos. En los rebaños es causa de abortos y numerosas pérdidas económicas debido a la disminución de la producción de carne y de leche (Sutherland, 1980). La técnica diagnóstica mediante FPA detecta anticuerpos específicos de *B. abortus*, ya que emplea un extracto del polisacárido O extraído de la pared celular de la bacteria que se conjuga con un marcador fluorescente (fluoresceína).

Mientras diversos métodos diagnósticos indirectos como Rosa de Bengala (Card Test) producen reacciones de aglutinación inespecíficas por la presencia de anticuerpos contra bacterias con características antigénicas compartidas con *Brucella* como por ejemplo: *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella urbana* y *Campylobacter fetus* (Marino *et al.*, 1991), y otros como Seroaglutinación lenta en tubo y mercapto etanol se consideran inadecuados a efectos del comercio internacional (OIE, 2004). Solo los inmunoensayo enzimáticos (ELISA), Fijación del complemento y FPA se consideran adecuados para el comercio internacional. Sin embargo, pese a su alta sensibilidad y especificidad (SENASA, 1993), los ELISA y fijación de complemento resultan técnicas lentas, complejas y de difícil estandarización (Marino *et al.*, 1991).

Cabe destacar que ninguna prueba serológica es adecuada en todas y cada una de las situaciones epidemiológicas, presentando limitaciones en el análisis de animales individuales; por lo tanto, se deben considerar todos los factores que influyen en la relevancia del método de prueba y de sus resultados para una aplicación o interpretación diagnóstica específica (OIE, 2004).

Como otra característica adicional, FPA se puede realizar en diferentes matrices como suero, sangre entera y leche, siendo capaz de discriminar animales vacunados con Cepa 19 de aquellos infectados a partir de los 45 a 60 días pos-vacunación, contribuyendo en gran medida a evitar la eliminación de falsos positivos (Samartino *et al.*, 2007).

EXPERIENCIAS EN VENEZUELA. VALIDACIÓN EN DISTINTAS ESPECIES Y PUNTOS DE CORTE

El uso de FPA data de inicios del año 2008, cuando un grupo de investigadores de la Facultad de Cs. Veterinarias de la Universidad del Zulia, dirigidos por Sánchez-Villalobos, introducen la técnica tras entrenamiento en la ciudad de Buenos Aires, Argentina, gracias al apoyo de Boscoboinik y la empresa Diachemix®. En la actualidad, la técnica ha sido validada en un importante número de especies domésticas de interés social y comercial, donde se incluyen vacunos (en diferentes sistemas de explotación: doble propósito, extensivos de producción de carne e intensivos especializados en producción de leche), búfalos, porcinos, explotaciones mixtas de ovinos y caprinos, y caprinos productores de leche. También se han ejecutado investigaciones sobre la enfermedad en humanos, donde incluso se desarrolló una técnica de detección rápida basada en FPA (Sánchez & Becerra, 2008).

De acuerdo a los resultados preliminares de ese grupo de investigación sobre brucelosis con el uso de FPA y su comparación con ELISA de competición y otras pruebas tradicionales, se proponen los siguientes puntos de corte como referencia para la implementación oficial de estas técnicas en Venezuela (Cuadro 1). En este Cuadro se establecen parámetros para la vigilancia epidemiológica en Centros de beneficio (mataderos) e industrias lácteas.

Cuadro 1. Propuesta para la aplicación de pruebas de unión primaria en el diagnóstico de brucelosis en Venezuela

	ZONAS DE INTERÉS	FPA	ELISA-C
VACUNOS, EQUINOS Y CANINOS			
DOBLE PROPÓSITO	SUR DEL LAGO / PERIJÁ LLANOS NO INUNDABLES CENTRO OCCIDENTE ANZOÁTEGUI / MONAGAS	90 mP Δ20	40%I
CARNE	LLANOS SUR DEL LAGO / PERIJÁ	95 mP Δ25	45%I
LECHE	GANDERÍA ESPECIALIZADA ZONA ALTA ANDINA	85 mP Δ15	35%I
BÚFALOS			
BÚFALOS	LLANOS SUR DEL LAGO / PERIJÁ	95 mP Δ25	45%I
CENTROS I. ARTIFICIAL, TRANSPLANTES Y RECRÍA	SUR DEL LAGO LLANOS SUR DEL LAGO / PERIJÁ	80 mP Δ10	30%I
OVINOS Y CAPRINOS			
MIXTOS	CENTRO OCCIDENTE SUR DEL LAGO / PERIJÁ MARA / PAÉZ	80 mP Δ10	25%I
ESPECIALIZADO	CENTRO OCCIDENTE		
CENTROS I. ARTIFICIAL TRANSPLANTES y RECRÍA	CENTRO OCCIDENTE SUR DEL LAGO / PERIJÁ		

Cuadro 1. Propuesta para la aplicación de pruebas de unión primaria en el diagnóstico de brucelosis en Venezuela (Continuación)

	ZONAS DE INTERÉS	FPA	ELISA-C
PORCINOS			
ARTESANAL y TRASPATIOS	CENTRO CENTRO OCCIDENTE	80 mP Δ10	25%I
TECNIFICADA			
VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA			
CENTROS de BENEFICIO (Sueros sanguíneos)	TODO EL PAÍS (5% REPRODUCTORES)	SEGÚN ORIGEN	SEGÚN ORIGEN
IND. LÁCTEAS (Leches globales e Individuales)	TODO EL PAÍS: (MENSUAL / GLOBAL / FPA: 90 mP)	100 mP Δ30	ELISA-I > 100%I

FPA: mP: unidades de milipolarización; Δ: referido al diferencial entre la muestra y el promedio del control negativo; ELISA: %: porcentaje de inhibición; ELISA-i: ELISA indirecto.

CONCLUSIONES

Se han descrito las bases teóricas y el mecanismo de acción de la fluorescencia polarizada como técnica diagnóstica dirigida en dos sentidos: inocuidad de los cereales y detección de enfermedades infecciosas. Se hace énfasis en las ventajas competitivas de esta técnica en el diagnóstico de brucelosis al resultar más rápida, confiable, fácil y de mejor relación costo-beneficio que otras pruebas tradicionales. Al mismo tiempo, se destaca su potencial en el control y erradicación, al permitir establecer planes de vigilancia epidemiológica y de barrido en diversas enfermedades presentes en la ganadería venezolana. A propósito de su futura implementación oficial se proponen diferentes puntos de corte en especies, áreas y sistemas de producción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfonso Méndez MC. 2008. Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura. Polarización de la fluorescencia. Tesis doctoral. Universidad Santiago de Compostela, España 29 p.
- Diachemix. 2008. Brucella antibody test. Brochures Brucella FPA. <http://www.diachemix.com/en/products/product-brochures>.
- Marino J, Gallego M, León L, Almansa M. 1991. Comparación de técnicas serológicas en la evaluación de bovinos infectados naturalmente por *Brucella abortus*. Networking in brucellosis research. The United Nations University. pp. 120-130.
- OIE. 2004. Manual sobre animales terrestres. Brucelosis bovina. Organización Mundial de Sanidad Animal. pp 450.
- Samartino L, Schust M, Piazza E, Conde S. 2007. Diagnóstico de la brucelosis animal: Implementación de nuevas tecnologías. Proc XX reunión ALPA, XXX reunión APPA. Cusco-Perú. Resúmenes en extenso.
- Sánchez A, Becerra L. 2008. Fluorescencia polarizada. Proc IX Jorn Med Rumiantes. Maracay, 18 y 19 julio. Curso de actualización.
- SENASA. 1993. Servicio Nacional de Sanidad Animal. Resolución 1269/93. Dirección nacional de sanidad animal, Argentina.
- Sutherland SS. 1980. Immunology of bovine brucelosis. Vet Rec 50:359-368.