

DESARROLLO BIOTECNOLÓGICO DE TIRAS REACTIVAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS A CAMPO

BIOTECHNOLOGICAL DEVELOPMENT OF STRIP-TESTS FOR THE DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS IN FIELD

Ana María Nicola (Departamento de Brucelosis. Dirección General de Laboratorios y Control Técnico. Senasa), Gastón Maximiliano Arocena (Departamento de Biología Molecular. Dirección General de Laboratorios y Control Técnico. Senasa), Silvio Lorenzo Cravero (Instituto de Biotecnología [CICVyA] INTA Castelar), Marcos David Trangoni (Instituto de Biotecnología [CICVyA] INTA Castelar), Oscar Enrique Escobar (Departamento de Biología Molecular. Dirección General de Laboratorios y Control Técnico. Senasa), Sebastián Elena (Departamento de Brucelosis. Dirección General de Laboratorios y Control Técnico. Senasa), Cristina Franco (Departamento de Brucelosis. Dirección General de Laboratorios y Control Técnico. Senasa), Eduardo Bagnat (Departamento de Brucelosis. Dirección General de Laboratorios y Control Técnico. Senasa) y Juan Carlos Manetti (Departamento de Brucelosis. Dirección General de Laboratorios y Control Técnico. Senasa)

Resumen

La brucelosis es una enfermedad bacteriana, producida por *Brucella* sp., de gran importancia y amplia distribución en el mundo. Se trata de una zoonosis que afecta marcadamente la salud pública y la economía agropecuaria en la mayoría de los países en desarrollo. La ocurrencia de la enfermedad en humanos está directamente asociada a la presencia de esta enfermedad en animales, incluida la fauna silvestre.

Los signos clínicos de la enfermedad en animales no son patognomónicos y un diagnóstico definitivo depende del diagnóstico directo e indirecto de laboratorio.

La prevalencia de la enfermedad en bovinos en la Republica Argentina, según el muestreo serológico realizado por el Senasa en 2006, fue de 2,68 %. Cuando la prevalencia es muy baja y en la etapa de erradicación, es fundamental contar con pruebas de vigilancia epidemiológica. Para la toma de muestras se opta por lugares estratégicos de concentración de animales, tales como remates ferias, frigoríficos, lugares de vacunación, etcétera.

El presente proyecto apunta al desarrollo de un método rápido de diagnóstico con aplicación en vigilancia epidemiológica y consiste en la creación de un dispositivo utilizando la tecnología de inmunocromatografía de flujo lateral (ICFL), orientado a la detección *in situ* de anticuerpos anti-*Brucella* como indicador de la presencia de la enfermedad.

Palabras clave: brucelosis, diagnóstico, inmunocromatografía, vigilancia epidemiológica

Abstract

Brucellosis is a major bacterial disease caused by *Brucella* sp. and widely distributed in the world. It is a zoonosis with great impact on public health and agricultural economy in most developing countries. The occurrence of the disease in humans is directly associated with its presence in animals, including wildlife.

Its clinical signs in animals are non-pathognomonic and a definitive diagnosis depends on direct and indirect laboratory diagnosis.

The prevalence of the disease in cattle in the Republica Argentina, according to the serological sampling carried out by Senasa in 2006 was 2.68 %. When prevalence is very low and in the stage of disease eradication, surveillance is essential. Places of great concentration of animals, such as slaughterhouses, vaccination points, etc. are strategic locations for sample collection for the tests.

This project aims to develop a rapid diagnostic method for epidemiological surveillance, a technology device using lateral flow immunochromatography (LFIC) for *in situ* detection of anti-*Brucella* antibodies.

Keywords: brucellosis, diagnosis, immunochromatography, epidemiological surveillance

El presente proyecto ha sido presentado en el marco de los “Premios Senasa a la investigación, transferencia y comunicación de la sanidad, la calidad y la inocuidad agroalimentarias” con el fin de incentivar, desarrollar y profundizar actividades de investigación, desarrollo tecnológico e innovación, así como de promover la formación permanente y continua en el conocimiento y el perfeccionamiento profesional en el ámbito de los Servicios Veterinarios.

La investigación es el fundamento de los avances sanitarios. El mejoramiento de la producción y la sanidad animal, el desarrollo de la actividad pecuaria, la importancia que tienen las enfermedades emergentes y reemergentes y la necesidad de erradicar enfermedades de impacto en la salud pública y en el creciente comercio internacional han generado una gran demanda en la medicina veterinaria de la investigación de nuevas herramientas diagnósticas a partir de los conocimientos y alcances de la biotecnología.

Recientemente el nuevo concepto «un mundo, una salud» ha surgido de la consideración de las grandes oportunidades ligadas a la protección de la salud pública por medio de las políticas de prevención y control de patógenos en las poblaciones animales, en la interfaz entre el hombre, el animal y el medio ambiente (Plumb *et al.*, 2013). Estas políticas implican nuevos mecanismos que permiten al conjunto de actores mantenerse mutuamente informados y actuar de manera concertada con otras instituciones públicas, como en el presente proyecto el Senasa y el INTA, compartiendo objetivos y desarrollos biotecnológicos al servicio de una problemática sanitaria como es la brucelosis, incentivando la apertura de posibilidades a equipos noveles de investigadores jóvenes y fortaleciendo el proceso de apoyo a equipos consolidados dentro del ámbito científico y tecnológico que presenten propuestas innovadoras y transferibles productivamente.

El proyecto de investigación propuesto aborda el tema de una zoonosis, la brucelosis, enfermedad producida por *Brucella* sp. con importancia para la salud pública y la economía agropecuaria en la mayoría de los países en desarrollo. 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 a la preferencia por el hospedador y a la epidemiología, se reconocen seis especies clásicas, cada una de las cuales tiene un hospedador principal: *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (caprinos), *B. suis* (porcinos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (caninos) y *B. neotomae* (rata del desierto). En la última década, se han aislado de mamíferos marinos cepas de *Brucella* que no se pueden atribuir a ninguna de las especies anteriormente reconocidas. Las investigaciones continúan para esta-

blecer su posición correcta en la taxonomía de este género, y se propone que puedan ser clasificadas en dos nuevas especies, *B. ceti* y *B. pinnipedialis* (cetáceos y pinnípedos). Además, dos nuevas cepas llamadas *B. microti*, aislada recientemente de roedores (*Microtus arvalis*) en Europa Central, y *B. inopinata*, aislada de un implante mamario en una mujer en los Estados Unidos, están en estudio para su clasificación taxonómica (Scholz *et al.*, 2010).

En los animales sexualmente maduros, la infección se localiza en el sistema reproductivo. Por lo general, produce placentitis seguida de aborto en las hembras preñadas durante el último tercio de la preñez; en los machos, los signos clínicos principales son epididimitis y orquitis (OIE, 2012).

La transmisión al hombre se produce fundamentalmente por la ingestión de leche cruda y sus derivados, por contacto directo con animales infectados, por inhalación o por inoculación accidental y provoca síntomas de debilidad, cefalalgia, dolor muscular y articular acompañados con fiebre, sudoración y escalofríos. La angustia y la depresión son comunes en los casos de infección prolongada no diagnosticada (WHO, 2006).

La permanencia de esta enfermedad en un rodeo limita las posibilidades del sector pecuario y el comercio internacional. Debido a las pérdidas económicas en la producción animal, estimadas entre un 20 % y 15 % para la producción de leche y carne, respectivamente, y su impacto en la salud pública, diferentes programas de control y erradicación de la brucelosis animal se han desarrollado en el mundo. La prevalencia de la enfermedad en bovinos en la República Argentina, según el muestreo serológico realizado por Senasa en 2006, fue de 2,68 % (De la Sota *et al.*, 2006).

Los signos clínicos de la enfermedad no son patognomónicos y el diagnóstico definitivo se basa en el aislamiento de *Brucella* a partir de material de abortos, leche, ganglios y tejidos infectados, para lo cual es necesario contar con la infraestructura de bioseguridad y metodología de laboratorio adecuada así como con personal debidamente capacitado. El cultivo bacteriológico no es una técnica que se pueda usar masivamente de rutina debido al tiempo que insume su ejecución y a los riesgos de infección para el operador. Además, los resultados negativos no son siempre concluyentes (Alton *et al.*, 1988). El diagnóstico por biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es ampliamente utilizado y constituye otro medio de detección e identificación de *Brucella* sp.

El diagnóstico indirecto, consistente en la determinación de la respuesta específica celular o humoral frente a los antígenos de *Brucella*, se usa masivamente; existe un gran número de pruebas de diferente sensibilidad y especificidad y de mayor o menor complejidad (Nielsen, 2002; Godfroid *et al.*, 2002; McGiven, 2013).

En la etapa de erradicación de la enfermedad es fundamental utilizar pruebas de vigilancia epidemiológica. Para su uso se opta por lugares estratégicos de concentración de animales para la recolección de muestras, como remates ferias, frigoríficos, lugares de vacunación, etcétera.

Por otro lado, este tipo de ensayos también tiene gran utilidad en áreas endémicas, con movimientos de animales sin diagnóstico previo, con una escasa infraestructura de los servicios veterinarios y sin acceso a un laboratorio de diagnóstico en la región como principales obstáculos (McGiven, 2013).

El presente proyecto apunta al desarrollo de un método rápido de diagnóstico para vigilancia epidemiológica. Consiste en el desarrollo de un dispositivo que utilice la tecnología de inmunocromatografía de flujo lateral (ICFL) (O'Farrel, 2009; Millipore, 2013) para la detección in situ de la presencia de anticuerpos contra antígenos de *Brucella* como indicador de la presencia de la enfermedad (Qu *et al.*, 2009).

Desde su introducción en la década de 1980, la tecnología de ICFL ha ido ganando aceptación en el inmunodiagnóstico de enfermedades infecciosas. La principal razón de esta aceptación es la simplicidad del test. Las tiras reactivas son fácilmente transportables y compactas. Usualmente no se requiere el agregado de reactivos externos para obtener los resultados, que son rápidos (en el orden de minutos) y fáciles de interpretar, sin la necesidad de un instrumento analítico (Bandla *et al.*, 2011). Hay pocos antecedentes de desarrollo y evaluación de ICFL aplicados al diagnóstico de brucelosis animal (Bronsvoord *et al.*, 2009).

Existe una amplia variedad de soportes para el desarrollo de las tiras reactivas, así como una variedad de diseños que permiten la detección de antígenos o anticuerpos. La técnica es flexible, ya que la tira reactiva se puede diseñar para detectar anticuerpos contra uno o varios antígenos de *Brucella* simultáneamente. Los antígenos seleccionados para el presente trabajo son el lipopolisacárido (LPS) que es el antígeno inmunodominante de *Brucella* de naturaleza no proteica, y BP26, un antígeno proteico que en ensayos proteómi-

cos presentó los mejores resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad.

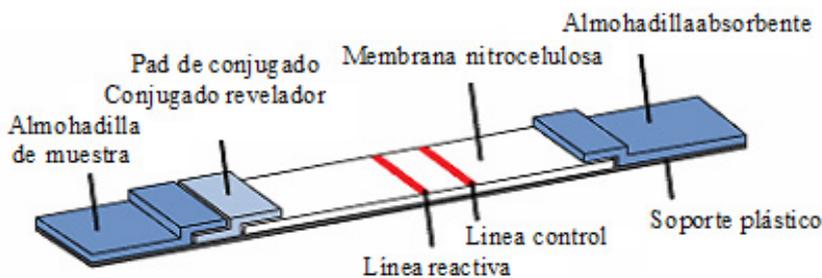
Los principales objetivos del proyecto son:

- Desarrollar un prototipo para la detección de anticuerpos anti-*Brucella* sp. utilizando la tecnología de inmunocromatografía de flujo lateral (ICFL).
- Evaluar la sensibilidad y especificidad relativa del dispositivo frente a otras técnicas diagnósticas.
- Validar el dispositivo de diagnóstico utilizando diferentes matrices de análisis

El principio básico de este test es que cualquier ligando puede ser acoplado a un soporte sólido y detectarse visualmente en un corto período de tiempo. Brevemente, un complejo molécula/receptor (generalmente antígeno-anticuerpo) acoplado a una partícula coloreada (reactivo detector) migra a través de una membrana y se encuentra con un reactivo inmovilizado en una línea de captura con el cual puede reaccionar. El complejo queda retenido en el sitio y puede observarse por el color de las partículas a las cuales está unido (O'Farrel, 2009). Es fácil de usar, descartable, rápido y no requiere instrumental para su lectura, lo que lo convierte en una herramienta ideal para ser usada en el campo, o en servicios de emergencias de hospitales y clínicas para el diagnóstico presuntivo en humanos. Se ha convertido en una plataforma tecnológica para el diagnóstico a partir de su primer dispositivo comercialmente exitoso, el test de embarazo basado en la detección rápida de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana en orina, lo que se logra con el simple agregado de la muestra al dispositivo (May *et al.*, 1991).

La tira reactiva propuesta consiste en una tira de nitrocelulosa porosa flanqueada en un extremo por una almohadilla de papel que contiene los reactivos y en el otro extremo una almohadilla de papel absorbente que guía el flujo líquido de manera unidireccional.

La zona de detección, comprendida entre las dos almohadillas, contiene dos líneas: una correspondiente al antígeno (línea reactiva o de reacción) y la otra, al control positivo. La Figura 1 muestra un esquema del dispositivo.



Fuente: modificado de <http://sites.path.org/dx/files/2013/05/LateralFlow_platform_labels2.gif>.

Figura 1: Mapa de distribución de los establecimientos encuestados y resultado del Copro-ELISA - Western blot, análisis de materia fecal canina.

Como antígenos se emplearán LPS de *Brucella*, obtenido a partir de cultivos de *B. abortus* y extraídos mediante procedimientos químicos (Nielsen *et al.*, 1996b) y la proteína recombinante BP26 de *Brucella abortus* (Rossetti *et al.*, 1996; Cloeckert *et al.*, 2001; Xim *et al.*, 2013). La proteína BP26 recombinante es producida en *Escherichia coli* y al gen codificante se lo manipuló genéticamente para que la proteína lleve en su extremo aminoterminal una etiqueta de polihistinas para facilitar su purificación mediante el empleo de cromatografía de afinidad con una matriz cargada con el catión níquel. El reactivo de detección será preparado conjugando partículas de oro coloidal de 40 nm a anticuerpos contra la IgG de la especie animal en estudio purificados. Este conjugado será portado por la almohadilla de papel reactivo. La línea de control de la reacción estará constituida por Proteína G, que posee la capacidad de reaccionar con IgG bovina.

Los ensayos se realizarán diluyendo los sueros sujetos a evaluación en buffer salino que será transferido a la almohadilla de papel que posee el conjugado. Luego de unos minutos se realizará la inspección visual. En todos los casos, la línea de control debería presentar tinción. Si la línea de antígeno presenta tinción y se observan las dos líneas, la de reacción y la del control, la muestra se considera positiva; si la muestra es negativa solo se observará una línea, correspondiente al control. Para la detección de anticuerpos se trabajará con sueros provenientes de una población de bovinos infectados (condición confirmada por aislamiento de la bacteria) y sueros negativos de establecimientos libres de la enfermedad (analizados por las técnicas serológicas convencionales).

Las tiras reactivas pueden ser diseñadas para la detección de anticuerpos contra *Brucella* en diversas especies animales como bovinos, caprinos, porcinos y humanos (Abdoel *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2011).

La propuesta se diseñó de acuerdo con los diferentes trabajos disponibles en la bibliografía para el desarrollo de equipos de diagnóstico para enfermedades bacterianas relacionadas con *Brucella*, adaptándolo con el uso de reactivos de producción propia a los efectos de generar independencia productiva y con reducción de los costos.

Como resultado del proyecto se espera desarrollar un dispositivo que sea capaz de detectar anticuerpos en sueros bovinos y de otras especies animales con igual o mayor sensibilidad que otras pruebas diagnósticas utilizadas de rutina.

En conclusión, la elección de una estrategia de diagnóstico dependerá de la situación epidemiológica predominante de la brucelosis en animales susceptibles en una región o país.

De acuerdo con las normas sanitarias nacionales e internacionales, la presencia de la brucelosis en un rodeo significa restricciones en los movimientos y en el comercio, lo cual resulta en importantes pérdidas económicas; en este escenario es relevante contar con herramientas diagnósticas como la inmunocromatografía para evaluar el estado serológico al pie del animal en forma rápida y con elevada confiabilidad, de fácil manipulación e interpretación, sin requerimiento de equipamiento costoso o personal altamente capacitado, aplicable en diversas condiciones y en diferentes tipos de muestras (suero, sangre entera) y que permita al Servicio oficial realizar acciones coordinadas para el control y posterior eliminación de la enfermedad, con miras a consolidar en forma progresiva la condición de áreas libres.

En este contexto, se reitera la importancia de la integración de múltiples disciplinas y la colaboración entre instituciones oficiales en proyectos de investigación al servicio del diagnóstico de enfermedades de relevancia sanitaria para la producción pecuaria nacional, para avanzar hacia el concepto “un mundo, una salud”.

Bibliografía

Abdoel, T.; Dias I. T.; Cardoso, R. y H. L. Smits (2008), “Simple and rapid field tests for brucellosis in livestock”, en *Veterinary Microbiology* 130 (3-4), pp. 312-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.01.009. Epub Feb. 2. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18321664>>.

Alton, G. G.; Jones, L. M.; Angus, R. D. y J.M. Verger (1988); *Techniques for the Brucellosis Laboratory*, Institut National de la Recherche Agronomique, París, INRA, pp. 13-190.

Bandla, M.; Thompson, R. y G. Shan (2011), “Lateral flow devices”, en Shan, G. (ed), *Immunoassays in Agriculture Biotechnology*, New Jersey, Wiley, pp. 91-114. Disponible en: <<http://www.worldcat.org/title/immunoassays-in-agricultural-biotechnology/oclc/706669040/viewport>>.

Bronsvoort, B. M. de C. *et al.* (2009), “Comparison of a Flow Assay for Brucellosis Antibodies with the Reference cELISA Test in West African Bos indicus”, *PLoS ONE*, vol. 4, n.º 4, p. 1, e5221. doi:10.1371/journal.pone.0005221. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2667634/>>.

Cloekert, A.; Baucheron, S.; Vizcaino, N. y M.S. Zygmunt (2001), “Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep”, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 8, n.º 4, pp. 772-5. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427425>>.

De La Sota, M.; Bagnat, E.; Cosentino, B. y A.M. Nicola (2006), "Aproximación a la determinación de la prevalencia nacional de la Brucelosis Bovina", Revista del Colegio de Veterinarios de la provincia de Buenos Aires, vol. 11, n.º 35, pp. 31-35.

Godfroid, J. *et al.* (2002), "How to substantiate eradication of bovine brucellosis when a specific serological reactions occur in the course of brucellosis testing", Veterinary Microbiology, vol. 90, n.º 1-4, pp. 461-477.

Kim, J. W. *et al.* (2007), "Evaluation of Immunochromatographic Assay for Serodiagnosis of *Brucella canis*", Journal of Veterinary Medical Science, vol. 69, n.º 11, pp. 1103-1107.

Liang, L. *et al.* (2011), "Systems biology approach predicts antibody signature associated with *Brucella melitensis* infection in humans", Journal of Proteome Research, vol. 10, n.º 10, pp. 4813-24. doi: 10.1021/pr200619r. Epub 2011 Sep. 8. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21863892>>.

May, K. (1991), "Home tests to monitor fertility", American Journal of Obstetrics and Gynecology, vol. 165, n.º 6, parte 2, pp. 2000-2002.

McGiven, J. A. (2013), "New developments in the immunodiagnosis of brucellosis in livestock and wildlife", OIE Scientific and Technical Review, vol. 32, n.º 1, pp. 163-176.

Millipore (2013), "Rapid Lateral flow test strip. Considerations for product development". Disponible en: <[http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/348ee7096d-93729b85256bf40066a40d/\\$FILE/TB500EN00EM.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/348ee7096d-93729b85256bf40066a40d/$FILE/TB500EN00EM.pdf)>.

Nielsen, K (2002), "Diagnosis of brucellosis by serology", Veterinary Microbiology, vol. 90, n.º 1-4, pp. 447-459.

Nielsen, K.; Gall, D.; Kelly, L.; Vigliocco, A.; Henning, D. y M. Garcia (1996), Immunoassay development: application to enzyme immunoassay for diagnosis of brucellosis, Monograph. A62-45/1996E. ISBN 0-662-24163-0. Agriculture and Agri-Food Canada, Animal Diseases Research Institute, Nepean, Ontario, Cap. 17, pp. 68-69.

O'Farrel, B. (2009), "Evolution in Lateral Flow-Based Immunoassay Systems", Wong, R. y H. Tse (ed.), Lateral Flow Immunoassay, New York, Springer, pp. 1-35. Disponible en: <[http://www.diagnostics1.com/MANUAL/LFIA_Book\[1\].pdf](http://www.diagnostics1.com/MANUAL/LFIA_Book[1].pdf)>.

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2012), "Chapter 2, 4, 3 - Bovine brucellosis", Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres, pp. 1-35. Disponible en: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf>.

Plumb, G.; Olsen, S. y G. Pappas (2013), "Brucellosis: recent developments towards 'One Health'", OIE Scientific and Technical Review, vol. 32, n.º 1, pp. 271-276.

Qu, Q. *et al.* (2009), "Rapid and quantitative detection of *Brucella* by up-converting phosphor technology-based lateral-flow assay", J Microbiol. Methods, 79 (1), 121-3. doi: 10.1016/j.mimet.2009.07.015. Epub 2009 Jul. 25. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635504>>.

Rossetti, O. L.; Arese, A.I.; Boschioli, M.L. y S. L. Cravero (1996), "Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis", Journal of Clinical Microbiology, vol. 34, n.º 1, pp. 165-169.

Scholz, H. C. *et al.* (2010), "*Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 60, n.º 4, pp. 801-808. doi:10.1099/ijs.0.011148-0. PubMed: 19661515.

World Health Organization (2006), "Brucellosis in Humans and Animals", WHO/CDS/EPR/2006.7 Corbel, M. J.; Elberg, S. S. y O. Cosivi (ed.), pp. 1-86. Disponible en: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>>.

Xin, T. *et al.* (2013), "Limitations of the BP26 protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Brucellosis", Clinical and Vaccine Immunology, vol. 20, n.º 9, pp. 1410-7. doi: 10.1128/CVI.00052-13. Epub 2013 Jul. 17. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23863503>>.