



Archivos de Medicina Veterinaria

ISSN: 0301-732X

archmv@uach.cl

Universidad Austral de Chile

Chile

BLANK, O.; RETAMAL, P.; ABALOS, P.; TORRES, D.

Detección de anticuerpos Anti-brucella en focas de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) de Cabo Shirref, Antártica

Archivos de Medicina Veterinaria, vol. 34, núm. 1, 2002, pp. 117-122

Universidad Austral de Chile

Valdivia, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013842013>

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

redalyc.org

Sistema de Información Científica





Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



Archivos de medicina veterinaria

ISSN 0301-732X *versión impresa*

-  Como citar este artículo
-  Agregar a favoritos
-  Enviar a e-mail
-  Imprimir HTML

Arch. med. vet. v.34 n.1 Valdivia 2002

Arch. Med. Vet., Vol. XXXIV, N° 1, 2002, pp. 117-122

COMUNICACIONES

Detección de anticuerpos Anti-brucella en focas de Weddell (Leptonychotes weddellii) de Cabo Shirref, Antártica

Detection of anti-*brucella* antibodies in Weddell seals (*Leptonychotes weddellii*) from cape Shirref, Antarctica

O. BLANK¹, M.V.; P. RETAMAL², M.V.; P. ABALOS², M.V., M.Sc.; D. TORRES³, Lic. Cs. Nat.

¹ Instituto Antártico Chileno, Rómulo Correa 375, Punta Arenas, Chile.

² Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

³ Instituto Antártico Chileno, Av. Luis Thayer Ojeda 814, Correo 9, Providencia, Santiago.

Summary

After the finding of anti-*Brucella* antibodies in samples of Antarctic fur seal (*Arctocephalus gazella*), the serological study on Antarctic Pinniped was continued in order to determine the presence of anti-*Brucella* antibodies in other species. Blood and extra vascular fluid samples were taken from 12

Weddell seals (*Leptonychotes weddellii*) at the Site of Special Scientific Interest (SSSI) N° 32 and CCAMLR* Ecosystem Monitoring Program (CEMP) site N° 2 "Cape Shirreff and San Telmo Islets" (62° 47' S; 60° 27' W), located on the Norwest coast Livingston Island (South Shetland Islands), Antarctica.

The samples were tested by the conventional Rose Bengal test (RB) and two competitive enzymatic immunoassay: Compelisa, and c-ELISA.

In five of the samples studied, anti-*Brucella* antibodies were detected and the enzyme linked immunosorbent assays were the most sensible tests. These results strongly suggest the presence of infections by bacteria of the genus *Brucella* in *L. weddellii* and point out the necessity of complementary studies to know the etiology and their epidemiology in this region of the world.

Key words: Anti-*Brucella* antibodies, Phocidae, Weddell Seal, Antarctica.

Resumen

Posterior al hallazgo de anticuerpos anti-*Brucella* en muestras de lobo fino antártico (*Arctocephalus gazella*), el estudio serológico en Pinnipedia Antárticos se continuó con el fin de determinar la presencia de anticuerpos anti-*Brucella* en otras especies. Se colectaron muestras de sangre y de fluido extravascular de 12 ejemplares de foca de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) encontrados en el Sitio de Especial Interés Científico (SEIC) N° 32 y sitio CCAMLR Ecosystem Monitoring Program (CEMP) N° 2, "Cabo Shirreff e Islotes San Telmo" (62° 47' S; 60° 27' W), localizado en la costa Noroeste de la isla Livingston (Shetland del Sur), Antártica. Las muestras obtenidas fueron analizadas por la técnica convencional Rosa de Bengala (RB) y dos inmunoensayos enzimáticos de competencia: Compelisa®, y c-ELISA. De las muestras estudiadas se identificaron cinco con anticuerpos anti-*Brucella*, siendo las pruebas inmunoenzimáticas las técnicas más sensibles.

Estos resultados muestran una alta probabilidad de presencia de infección por una bacteria del género *Brucella* en ejemplares *L. weddellii* y plantean la necesidad de realizar estudios complementarios, que permitan conocer la etiología y entender la epidemiología de *Brucella* en esta región del mundo.

Palabras claves: Anticuerpos anti-*Brucella*, Phocidae, foca de Weddell, Antártica.

INTRODUCCION

Actualmente existen múltiples antecedentes bibliográficos acerca de la infección de mamíferos marinos del hemisferio norte con una especie de *Brucella* aún no bien determinada, denominada *Brucella maris* ([Clavareau y col., 1998](#)). Entre los animales afectados se encuentran pinípedos (*Halichoerus grypus*, *Phoca vitulina*, *Cystophora cristata*), cetáceos (*Orcinus orca*, *Globicephala melas*, *Delphinus delphis*, *Stenella coeruleoalba*) y nutrias (*Lutra lutra*) entre otros, desde los cuales, en algunos casos se ha cultivado la bacteria y en otros, sólo se ha detectado respuesta humoral ([Clavareau y col., 1998](#)).

Por otro lado, la bacteria ha sido aislada también desde el ser humano, confirmandose su carácter de zoonosis ([Ross y col., 1996](#)). Sin embargo, aún no está claro el efecto patógeno en las especies de mamíferos marinos afectadas, aunque aparentemente sería capaz de generar abortos, al igual que otros microorganismos pertenecientes a este género ([Ewalt y col., 1994](#)).

En Chile se ha informado sobre la evidencia serológica de anticuerpos dirigidos contra el antígeno lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* sp. en el lobo fino antártico (*Arctocephalus gazella*) y en un ejemplar de foca de Weddell (*Leptonychotes weddellii*), estudiados durante campañas de verano realizadas entre los años 1998 y 2000 en Cabo Shirreff, isla Livingston, Antártica ([Blank y col., 1999](#); [Retamal y col., 2000a](#); [Retamal y col., 2000b](#); [Blank y col., 2001](#)). Estos estudios representan las primeras evidencias serológicas contra *Brucella* sp. en mamíferos marinos del

hemisferio sur y particularmente en Pinnipedia de la Antártica. Sin embargo, recientemente se ha informado sobre la evidencia serológica de infección por *Brucella* en Odontocetos capturados frente a las costas de Perú, en el Océano Pacífico ([Van Bressem y col., 2001](#)). El objetivo del presente trabajo fue complementar los estudios serológicos de *Brucella* sp. en ejemplares *A. gazella* y un *L. weddellii*, con un número mayor de muestras de *L. weddellii*, obtenidas durante el año 2001, en la Antártica.

* Convention for the Conservation of the Antarctic Marine Living Resources

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se realizó, en su etapa de terreno, dentro del Proyecto 018 "Estudios ecológicos sobre el lobo fino antártico, *Arctocephalus gazella*", del Instituto Antártico Chileno (INACH), mientras que los análisis de laboratorio se realizaron en el Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. El trabajo de campo se llevó a cabo durante enero de 2001, en el Sitio de Especial Interés Científico (SEIC) N° 32 y sitio CCAMLR¹ Ecosystem Monitoring Program (CEMP) N° 2, "Cabo Shirreff e Islotes San Telmo" (62° 47' S; 60° 27' W), localizado en la costa noroeste de la isla Livingston (islas Shetland del Sur), Antártica. El lugar de estudio, además de ser un importante sitio para la reproducción de *A. gazella*, es también un lugar de descanso para ejemplares *L. weddellii*, los que durante noviembre de 2000 y febrero de 2001 fluctuaron entre 18 y 20 individuos contados en los censos semanales realizados en el área ([Hucke-Gaete y col., 2001](#)).

Durante el trabajo de terreno se colectaron 12 muestras de *L. weddellii*: una de fluido pericárdico, obtenida a partir de una hembra muerta a la que se le practicó la necropsia y 11 muestras de sangre, provenientes de animales vivos. El grupo de animales vivos estudiado estuvo compuesto por siete hembras y cuatro machos ([cuadro 1](#)). La estimación de edad se realizó mediante observación del tamaño corporal, color de pelaje y características físicas de los animales. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante la punción de una vena interdigital de las aletas posteriores, previa inmovilización física de los animales.

Las muestras fueron centrifugadas a 700 x g por 10 minutos, para obtener los sueros, los que fueron almacenados bajo congelación durante dos meses, hasta su arribo al laboratorio, donde se aliquotaron y almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Para la detección de anticuerpos anti-*Brucella*, las muestras fueron sometidas a las siguientes pruebas serológicas:

- Rosa de Bengala (RB), según la técnica descrita por la Organización Internacional de Epizootias ([O.I.E.](#)) (1996).
- Enzimo inmuno ensayo de competencia (c-ELISA), según [FAO/IAEA \(1994\)](#). La técnica consiste en la utilización de una placa Nunc Polysorp sensibilizada con antígeno LPS de *Brucella abortus* en dilución 1:1000. La muestra (1:20) se aplicó junto al anticuerpo monoclonal de ratón anti-LPS (1:6000). Después de una incubación de 30 minutos a 37°C en agitación y un ciclo de lavado, se aplicó el conjugado de caprino anti-ratón (1:5000). Luego de una nueva incubación y un nuevo ciclo de lavado, se aplicó la solución sustrato, se incubó por 10 minutos y se detuvo la reacción agregando la solución de detención. Finalmente, la lectura se realizó en un equipo IMMUNOSKAN Plus®, (BDSL), con filtro de 405 nm.
- ELISA de competencia "Compelisa®," (Veterinary Laboratories Agency, UK), realizado según las indicaciones del laboratorio productor. La lectura se realizó con un filtro de 450 nm.

¹ Convention for Conservation of the Antarctic Marine Living Resources.

de muestra y resultados de las pruebas serológicas aplicadas para detección de anticuerpos anti- *Brucella*.

Characteristics of the sampled *Leptonychotes weddellii*, sample type and serological results of the tests for anti-*Brucella* antibodies detection.

| Nº | Sexo/Sex | Grupo etario/ Age group | Muestra/ Sample | Resultados serológicos/ Serological results | | |
|----|----------|----------------------------|--------------------|---|------------------|--------------|
| | | | | RB | Compelisa ® (%I) | c-ELISA (%I) |
| 1† | H | SA | Liq. Pericárdico | Ag. | 49 (S) | 29 |
| 2 | M | 1 a | Suero | N | 3 | 8 |
| 3 | M | 3 a | Suero | Ag. | 78 (S) | 76 (S) |
| 4 | H | 1 a | Suero | N | 17 | 14 |
| 5 | M | 2 a | Suero | N | 2 | 9 |
| 6 | H | 3 a | Suero | N | 74 (S) | 70 (S) |
| 7 | H | 1 a | Suero | N | 10 | 15 |
| 8 | H | 4 a | Suero | N | 5 | 11 |
| 9 | H | 2 a | Suero | N | 7 | 6 |
| 10 | H | 3 a | Suero | N | 76 (S) | 59 (S) |
| 11 | M | 3 a | Suero | Ag. | 80 (S) | 61 (S) |
| 12 | H | 2 a | Suero | N | 14 | 5 |

†: animal muerto; RB: prueba de Rosa de Bengala; Compelisa ®: Veterinary Laboratories Agency, UK; c-ELISA: ([FAO/IAEA, 1994](#)); %I: porcentaje de Inhibición; H: hembra; M: macho; a: años de edad estimada; SA: sub-adulto; Ag: aglutinación; N: Negativo; S: porcentaje significativo de reacción serológica.

†: Dead animal; RB: Rose Bengal test; Compelisa ®: Veterinary Laboratories Agency, UK; c-ELISA: ([FAO/IAEA, 1994](#)); %I: Inhibition percentage; Liq. Pericárdico: percardic fluid; suero: serum; H: female; M: male; a: estimate age in years; SA: sub-adult; Ag: agglutination; N: Negative; S: significant percentage of serologic reaction.

Para ambas pruebas inmunoenzimáticas la competencia fue determinada como porcentaje de inhibición (%I) del desarrollo de color, según la siguiente fórmula,

$$DO \text{ muestra} \times 100$$

$$\%I = 100 - \frac{\text{DO muestra}}{\text{DO control negativo}}$$

$$\text{DO control negativo}$$

Siendo DO la densidad óptica de cada pocillo.

En el c-ELISA la línea de corte +/- recomendada para el bovino es 35%I, mientras que en el Compelisa, esta línea fue calculada en 40%I para el bovino. Tomando en consideración lo anterior, en este estudio se consideró como %I significativo, a las muestras que presentaron una reacción de anticuerpos superior a 35%I y 40%I para cada prueba respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de las tres técnicas indican una presencia significativa de anticuerpos anti-*Brucella* en cinco de las 12 muestras estudiadas ([cuadro 1](#)), las que correspondieron a una hembra sub-adulta muerta, dos hembras juveniles vivas (con una edad estimada de 3 años) y 2 machos juveniles vivos de la misma edad estimada.

Con la prueba Compelisa®, se detectó presencia significativa de anticuerpos en cinco muestras, cuatro con c-ELISA y tres con RB.

Mediante la técnica c-ELISA, cuatro animales presentaron valores altos de %I respecto de la línea de corte. La única muestra de líquido pericárdico estudiada, proveniente del animal identificado como N°1 ([cuadro 1](#)), presentó valores cercanos pero inferiores a la línea de corte para c-ELISA (29%I) y superiores a la línea de corte para Compelisa®, (49%I). Las demás muestras, consideradas sin respuesta o con respuesta serológica menor, tanto para c-ELISA como para Compelisa® entregaron valores menores a 20%I en ambas técnicas, sin mostrar discrepancia en la interpretación de sus resultados.

Las tres muestras que presentaron aglutinación al ser sometidas a la prueba RB presentaron reacción serológica significativa al someterlas a la prueba Compelisa®.

En contraste con lo encontrado previamente cuando se estudiaron sueros de *A. gazella* ([Blank y col., 2001](#)), la prueba Compelisa®, detectó la mayor cantidad de animales con reacción serológica significativa (cinco de un total de 12), lo que equivale al 41.7%. En cambio c-ELISA, técnica internacionalmente recomendada para el estudio serológico de infección por *Brucella* en mamíferos marinos ([Jepson y col., 1997](#)), sólo detectó respuesta humoral en cuatro de los cinco animales reaccionantes a Compelisa® (33.3% del total).

Tomando en consideración las líneas de corte +/- aplicadas para el bovino, el resultado discordante entre las técnicas de c-ELISA y Compelisa®, evidenciado en la muestra del animal N°1, puede atribuirse a una mayor especificidad de la técnica de c-ELISA o a la inversa, a una mejor sensibilidad de Compelisa®, si se tratara de una infección real por alguna especie del género *Brucella*. Considerando que la muestra N°1 correspondió a líquido pericárdico, puede interferir además la naturaleza diferente de las muestras estudiadas. Dicha muestra presentó también reacción serológica ante la prueba de RB. Sin embargo, es necesario considerar que en el diagnóstico rutinario de brucelosis bovina, una muestra positiva por RB y negativa por c-ELISA, debe interpretarse finalmente como negativa, ya que esta última técnica es de carácter confirmatorio por su mayor sensibilidad y especificidad ([OIE, 1996](#)). Los resultados obtenidos al estudiar la muestra N°1 manifiestan, además, la utilidad que representa el líquido pericárdico como muestra para estudios serológicos de *Brucella* sp., realizados a partir de animales muertos, ya que, al igual que lo sugerido por [Blank y col. \(2001\)](#), permitió la detección de anticuerpos.

Para el diagnóstico confirmatorio de infección por *Brucella* sp., debe descartarse la posibilidad de obtener respuesta serológica por cualquiera de las tres técnicas empleadas, atribuibles a la presencia de reacción cruzada con anticuerpos generados contra otras bacterias portadoras del LPS, en cuyo caso, el cultivo bacteriológico y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se constituyen actualmente en los "estándares de oro" ([OIE, 1996](#)) mediante los cuales se pueden realizar comparaciones y determinar niveles de sensibilidad y especificidad de otras pruebas. Sin embargo, las técnicas inmunoenzimáticas empleadas en este estudio, son reconocidas como de muy buena eficiencia en el diagnóstico serológico de la infección por *Brucella* en mamíferos marinos del hemisferio norte ([Jepson y col., 1997](#)), permitiendo aseverar, con alta probabilidad, la existencia de esta bacteria en la especie investigada.

Si bien el tamaño muestral impide concluir estimaciones de prevalencia en la población, ya que, en el lugar de estudio sólo se observan animales de paso, es interesante destacar la alta proporción de muestras reaccionantes (5/12) y, dentro de éstas, el alto nivel de anticuerpos con que fueron identificadas la mayoría de ellas (59-80%I) ([cuadro1](#)). Esta situación es semejante a lo encontrado en un estudio anterior, donde sólo se analizó la muestra de un ejemplar muerto *L. weddellii*, utilizando la misma técnica serológica de c-ELISA y en el que se detectó un alto título de anticuerpos (73%I) ([Retamal y col., 2000a](#)), a diferencia de lo encontrado en las muestras de *A. gazella* estudiadas, donde los títulos de anticuerpos siempre se presentaron cercanos a la línea de corte +/- ([Blank y col., 1999](#); [Retamal y col., 2000a](#); [Retamal y col., 2000b](#); [Blank y col., 2001](#)).

Aunque se requiere un mayor número de muestras y el aislamiento del patógeno para determinar las características epidemiológicas de una posible infección por *Brucella* sp., estos hallazgos parecen indicar que la especie *L. weddellii* podría ser más susceptible a la supuesta infección, ha estado más expuesta a fuentes de infección o su respuesta humoral es mayor que la observada en *A. gazella* (Blank y col., 1999; Retamal y col., 2000a; Retamal y col., 2000b; Blank y col., 2001), haciéndose muy necesario el aislamiento del agente infeccioso, la determinación de los factores del huésped y los del ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Antártico Chileno (INACH), por hacer posible la realización práctica del trabajo en terreno, como parte del Proyecto 018 "Estudios ecológicos sobre el lobo fino antártico, *Arctocephalus gazella*. Especialmente, se reconoce la colaboración de los integrantes del grupo de terreno, Rodrigo Hucke-Gaete (Biología Marina, Universidad Austral de Chile), Romeo Vargas (Biología Marina, Universidad de Valparaíso) y Layla Osman (Biología Marina, Universidad Austral de Chile), otorgada en condiciones de trabajo tan extremas. A los investigadores norteamericanos del Programa AMLR, especialmente a Michael Goebel, Rennie Holt, Brian Parker, Mike Taft, Iris Saxer y Wayne Trivelpiece, por su apoyo en terreno.

BIBLIOGRAFIA

BLANK, O., P. RETAMAL, D. TORRES, P. ABALOS. 1999. First record of *Brucella* sp. antibodies in *Arctocephalus gazella* and *Leptonychotes weddellii* from Cape Shirreff, Livingston Island, Antarctica. Scientific Abstracts; SC-CAMLR-XVIII/BG/17.

BLANK, O., P. RETAMAL, D. TORRES, P. ABALOS. 2001. New data on anti-*Brucella* antibodies in *Arctocephalus gazella* from Cape Shirreff, Livingston Island, Antarctica. *CCAMLR Science*. 8: 147-154.

CLAVAREAU, C., V. WELLEMANS, K. WALRAVENS, M. TRYLAND, J. M. VERGER, M. GRAYON, A. CLOECKAERT, J. J. LETESSON, J. GODFROID. 1998. Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a Minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Microbiol.-UK*. 144: 3267-3273.

EWALT, D., J. PAYEUR, B. MARTIN, D. CUMMINS, G. MILLER. 1994. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*T. truncatus*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 448-452.

FAO/IAEA. 1994. Brucellosis ELISA kit manual. Competitive enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus*. Joint FAO/IAEA Program. Animal Production and Health unit. Seibersdorf. Austria.

HUCKE_GAETE, R., J. ACEVEDO, L. OSMAN, R. VARGAS, O. BLANK, D. TORRES. 2001. Informe Científico ECA XXXVII (2000/2001). Proyecto 018: "Estudios ecológicos sobre el lobo fino antártico, *Arctocephalus gazella*, Cabo Shirreff, isla Livingston, Shetland del Sur, Antártica. 104 p. (Informe anual del Proyecto 018-INACH).

JEPSON, P., S. BREW, A. MacMILLAN, J. BAKER, J. BARNETT, J. KIRKWOOD, T. KUIKEN, I. ROBINSON, V. SIMPSON. 1997. Antibodies to *Brucella* in marine mammals around the coast of England and Wales. *Vet. Rec.* 141: 513-515.

O.I.E. 1996. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 3th edition. ISBN 92-9044-423-1.

RETAMAL, P., O. BLANK, P. ABALOS, D. TORRES. 2000a. Detection of anti-*Brucella* antibodies in pinnipeds from the Antarctic Territory. *Vet. Rec.* 146: 166-167.

RETAMAL P., O. BLANK, P. ABALOS, D. TORRES. 2000b. Detección de anticuerpos anti-*Brucella* en lobo fino antártico (*Arctocephalus gazella*) de Cabo Shirreff, Antártica. XI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. 25-27 de octubre. Santiago, Chile.

ROSS, H., K. JAHANS, A. MacMILLAN, R. REID, P. THOMPSON, G. FOSTER. 1996. *Brucella* species infection in North Sea seal and cetacean populations. *Vet. Rec.* 138: 647-648.

VAN BRESSEM, M.F., K. VAN WAEREBEEK, J.A. RAGA, J. GODFROID, S.D. BREW, A.P. MACMILLAN. 2001. Serological evidence of *Brucella* species infection in odontocetes from the south Pacific and the Mediterranean. *Vet. Rec.* 148: 657-661.

Aceptado: 18.11.2001.