



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

Detección de la infección por *Brucella abortus* y *Brucella canis* en cánidos no domésticos de centros de rehabilitación y exhibición de la zona central de Chile

Sebastián Ignacio De la Fuente González

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: NICOLÁS GALARCE G.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile

Financiamiento Proyecto FONDECYT N° 1180544

SANTIAGO, CHILE
2021



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Detección de la infección por *Brucella abortus* y *Brucella canis* en
cánidos no domésticos de centros de rehabilitación y exhibición de la
zona central de Chile**

Sebastián Ignacio De la Fuente González

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Nota Final:

Profesor Guía: Nicolás Galarce

Profesor Corrector: Julio Larenas

Profesor Corrector: Pedro Ábalos

PROFESOR GUÍA: NICOLÁS GALARCE G.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile

Financiamiento Proyecto FONDECYT N° 1180544

SANTIAGO, CHILE

2021

A Gloria González y Carlos De la Fuente

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer y dedicarle esta memoria de título a mi madre Gloria González por su constancia, preocupación y esfuerzo para sacar adelante a una gran familia, También a mi padre Carlos De la Fuente que siempre tuvo una palabra de aliento para instarme a ser feliz, enseñándome siempre que para tener frutos necesitaba primero sembrar.

A mi profesor guía, Dr. Nicolás Galarce por ser un mentor integral, apoyándome tanto en lo académico como en lo personal, que me enseñó que para destacarse en la ciencia también tenemos que trabajar las habilidades blandas, convirtiendo el espacio de trabajo en un lugar seguro y de contención. A Beatriz Escobar quien me brindo su mano y su hombro en todo momento que necesité, por entregarme risas y conocimientos en los momentos más frágiles de mi carrera universitaria. A mis profesores correctores Julio Larenas y Pedro Ábalos, quienes me dieron las herramientas para pulir mis conocimientos y me enseñaron a ser crítico en la búsqueda de información. A la Dra. Consuelo Borie por confiar en mí y en mi trabajo, por enseñarme el valor de hacer ciencia y lo importante que es aportar al mundo desde el conocimiento.

A Nicole Salaberry y el staff de UFAS quienes en mi última práctica profesional me volvieron a enamorar de la Medicina Veterinaria, grabando en mí que el conocimiento se obtiene para compartirlo desde la humildad y el cariño.

Y por último a mis amigos y amigas que fueron al rescate cada vez que necesitaba un poco de distracción, que creyeron en mí y me dieron su apoyo incondicional tanto en los momentos de estrés como en los de alegría.

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
Generalidades del género <i>Brucella</i>	7
Patogenia de <i>Brucella</i> spp.....	7
Brucelosis en humanos	9
Brucelosis en cánidos no domésticos producida por <i>B. abortus</i> y <i>B. canis</i>	9
Epidemiología de la brucelosis	10
Situación nacional.....	11
Cánidos no domésticos en la zona central de Chile	12
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Diseño	15
Obtención de muestras	15
Detección serológica de <i>B. abortus</i>	16
Detección serológica de <i>B. canis</i>	16
Detección bacteriológica de <i>B. abortus</i> y <i>B. canis</i>	16
Confirmación molecular de <i>B. abortus</i> y <i>B. canis</i>	17
Análisis de resultados	18
Bioseguridad	18
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXOS	35
Anexo N°1: Consentimiento informado para toma de muestras	35
Anexo N°2: Planilla de identificación de muestras	36
Anexo N°3: Certificado de bioética.....	37
Anexo N°4: Detección serológica de <i>B. abortus</i> mediante prueba de aglutinación con Rosa de Bengala.....	38
nexo N°5: Detección serológica de <i>B. canis</i> mediante prueba de precipitación de contrainmunolectroforesis (CIEF).	38
Anexo N°6: Certificado de Bioseguridad	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los partidores a utilizar para la detección de *B. abortus* y *B. canis* tamaño del amplicón esperado, condiciones de PCR, y referencia utilizada.....20

Tabla 2. Ejemplares positivos a la prueba de CIEF 23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1. Distribución porcentual de los animales muestreados según origen..... 21

Figura N°2. Distribución porcentual del total de animales muestreados según especie.... 22

Figura N°3: Porcentaje de animales positivos y negativos a CIEF. 22

RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad de gran importancia mundial debido a su distribución cosmopolita, su potencial zoonótico y su gran variedad de hospederos. Esta enfermedad es producida por *Brucella* spp., cocobacilos Gram negativos, aeróbicos, inmóviles, preferentemente intracelulares y con un marcado tropismo hacia tejidos reproductivos, produciendo en sus hospederos alteraciones en su fertilidad y reproducción, lo que podría amenazar la preservación de especies silvestres.

En nuestro país se encuentran presentes tres especies de cánidos nativos no domésticas, además de otras foráneas en centros de exhibición, y dado a que hoy en Chile están presentes dos de las especies del género *Brucella* que podrían infectar a los cánidos no domésticos, además de la creciente problemática del contacto entre la vida humana y fauna silvestre. En atención a los pocos estudios al respecto en nuestro país y la literatura internacional que postula que el agente circula en cánidos silvestres, es que se llevó a cabo este estudio con el objetivo de determinar la infección por *Brucella abortus* y *B. canis* en cánidos no domésticos de centros de rehabilitación y exhibición de la zona central de Chile. Para llevar a cabo esta investigación se analizaron muestras sanguíneas mediante cultivo microbiológico y dos pruebas serológicas, correspondientes a la técnica de rosa de bengala y la técnica de contraelectroforesis (CIEF) para *B. abortus* y *B. canis* respectivamente.

Para ello, se recolectaron un total de 53 muestras de cánidos de las especies *Lycalopex culpaeus* (31), *L. griseus* (14), *Vulpes vulpes* (4) y *Canis lupus* (4) de la zona antes señalada. Así, se logró pesquisar un 9,4 % de positividad a anticuerpos anti *B. canis* en zorros de la especie *L. culpaeus*, pero sin detección serológica de *B. abortus* ni microbiológica de ambas especies bacterianas.

Conforme con los resultados de este estudio es que se establece por primera vez el precedente de que estas poblaciones han tenido contacto con *B. canis* en nuestro país, lo que hace necesario la elaboración de nuevas investigaciones sobre el comportamiento de *Brucella* en la fauna silvestre, con una perspectiva de una salud.

Palabras clave: Brucelosis, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, cánidos, zorros.

ABSTRACT

Brucellosis is a disease of high global importance due to its cosmopolitan distribution, its zoonotic potential and its wide variety of hosts. This disease is produced by Gram negative, aerobic, immobile, preferably intracellular coccobacilli with a marked tropism towards reproductive tissue, producing a deficit in fertility and reproduction in their hosts, which could threaten the preservation of wild species.

In our country, three species of non-domestic native canids are present, in addition to other foreign species in exhibition centers, and due to the fact that currently in Chile there are two of the species of the genus *Brucella* that could infect non-domestic canids, in addition to the growing problem of contact between human life and wildlife, the few studies on the matter in our country and the international literature that postulates that the agent circulates in wild canids, is that this study was carried out aiming to determine the infection by *Brucella abortus* and *B. canis* in non-domestic canids of rehabilitation and exhibition centers in the central zone of Chile. To achieve this, blood samples were analyzed by microbiological culture and two serological tests for the detection of antibodies, corresponding to Rose Bengal and counterimmunoelectrophoresis (CIEF) techniques for *B. abortus* and *B. canis*, respectively.

For this purpose, a total of 53 samples of canids of the species *Lycalopex culpaeus* (31), *L. griseus* (14), *Vulpes vulpes* (4) and *Canis lupus* (4) from the aforementioned area were collected. Thus, it was possible to register a 9.4% of positivity to anti-*B. canis* antibodies in foxes of the species *L. culpaeus*, but without detecting serological detection of *B. abortus* or microbiological detection of both bacterial species.

Given the results of this study, the precedent is established for the first time that these populations have had contact with one of the agents investigated in our country, which allows new investigations to be carried out on the behavior of *Brucella* in wild fauna, with a perspective from one health to a disease that affects environmental, animal and public health worldwide.

Key words: Brucellosis, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, canids, foxes.

INTRODUCCIÓN

Los animales silvestres, al igual que los animales domésticos, sufren varias enfermedades de origen infeccioso, las que pueden producir impactos directos en sus poblaciones y por ende en su conservación. Además, y de gran preocupación para la salud pública, es que muchos de estos animales constituyen reservorios de agentes infecciosos capaces de transmitirse a hospederos domésticos, y a su vez, éstos transmitirlos al ser humano. Entre estos agentes se encuentran los causantes de la brucelosis, enfermedad causada por bacterias del género *Brucella*, y que pueden afectar a una gran variedad de animales, incluyendo al ser humano. Este género incluye diversas especies, de las cuales *B. abortus* y *B. canis* tienen dentro de sus hospederos a miembros de la familia *Canidae*, como hospederos accidentales y específicos respectivamente.

La brucelosis se encuentra presente prácticamente en todo el mundo, sin embargo, sus reservorios silvestres no son conocidos en su totalidad, lo cual, como en toda enfermedad infecciosa zoonótica, constituye una piedra angular en el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad para su posterior control y prevención. En este sentido, el rol que cumplen los cánidos no domésticos en la mantención y diseminación de *Brucella* spp. es aún desconocido, siendo descrita la presencia de anticuerpos en ellos en diferentes estudios a nivel mundial llegando a porcentajes máximos del 33% tanto para *B. abortus* como para *B. canis* (Oliveira *et al.*, 2012). En estos animales, al igual que en los cánidos domésticos, *B. abortus* y *B. canis* pueden producir principalmente signos clínicos reproductivos, siendo de mayor importancia la presentación de abortos y la disminución de fertilidad, lo que podría amenazar aún más la preservación de especies que se encuentran bajo alguna categoría de amenaza. En este contexto, *B. abortus* y *B. canis* son las únicas especies de su género presentes en Chile que pueden infectar cánidos, por lo que realizar estudios sobre sus reservorios silvestres es de gran importancia para preservar la salud animal, salud pública y salud ambiental nacional.

En nuestro país a la fecha se han publicado sólo dos estudios serológicos del género *Brucella* que involucran cánidos no domésticos, tanto de colecciones zoológicas como de vida silvestre. Sin embargo, en ninguno de ellos se logró pesquisar la presencia de anticuerpos contra especies de *Brucella*, ya sean lisas o rugosas. A pesar de estos resultados, las técnicas

serológicas no permiten establecer por sí solas que estas especies estén infectadas con estos patógenos en sus poblaciones silvestres o en cautiverio, siendo necesario el uso de diferentes técnicas simultaneas.

Expuesto lo anterior, es que este estudio inserto en el proyecto FONDECYT N° 1180544 “¿Qué sabemos sobre la situación actual de *Brucella canis* en Chile?: caracterización filogenética y de virulencia de su población circulante en Santiago, Valdivia y Temuco” tuvo por objetivo determinar la infección con *B. abortus* y *B. canis* en cánidos no domésticos de centros de rehabilitación y exhibición en Chile mediante la detección de anticuerpos y aislamiento bacteriano. Con ello, se buscó evaluar la exposición y posible infección en estas especies animales, además de permitir caracterizar molecularmente el patógeno, lo cual entregará información relevante para establecer el rol de estos animales en la epidemiología de la enfermedad provocada por dichos agentes.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Generalidades del género *Brucella*

El género *Brucella* está compuesto por cocobacilos Gram negativos, aeróbicos, inmóviles, asporogénos, y preferentemente intracelulares. Este género está compuesto por 11 especies, designadas en base a diferencias en su patogenicidad y preferencias de hospedero, dentro de las que se incluye a *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (caprinos), *B. suis* (porcinos), *B. canis* (cánidos), *B. neotomae* (roedores), *B. ovis* (ovinos), *B. ceti* (cetáceos), *B. pinnipedialis* (pinípedos), *B. microti* (topillo de campo), *B. inopinata* (aislada desde un implante mamario), y *B. papionis* (papiones) (Whatmore, 2009; Moreno, 2014). De estas especies, *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. microti* y *B. suis* tienen el potencial de infectar cánidos y al ser humano (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015), sin embargo *B. canis* es reconocida como la más frecuentemente relacionada con la infección en cánidos (Borie *et al.*, 2002).

Al igual que otras bacterias Gram negativas, las especies de este género presentan lipopolisacárido (LPS), siendo un componente principal de su membrana externa que actúa como factor de virulencia. Debido a las diferencias en la constitución de su LPS, el género se puede dividir en dos categorías: cepas lisas que expresan la cadena O completamente, y cepas rugosas que tienen una muy pequeña o nula expresión de esta cadena. Bajo esta clasificación, las especies *B. ovis* y *B. canis* son catalogadas como rugosas, mientras que las especies restantes como lisas (Whatmore, 2009).

Patogenia de *Brucella* spp.

Los animales pueden infectarse al lamer las membranas fetales, fetos abortados, crías recién nacidas, y órganos genitales infectados (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015), describiéndose también la transmisión vertical por vía placentaria o a través de la lactancia (Ardoino *et al.*, 2017). Una vez en el organismo, la bacteria rápidamente atraviesa la capa de la mucosa epitelial, estimulando una respuesta inmune y siendo fagocitada por macrófagos de la mucosa y células dendríticas (Figueiredo *et al.*, 2015). La forma de ingreso dependerá de si la cepa es lisa o rugosa. Así, se describe que la entrada de cepas lisas no opsonizadas es a través de la interacción con balsas lipídicas dentro de la membrana plasmática, las cuales facilitan el

contacto con la célula hospedera y median la internalización por fagocitos (Olsen *et al.*, 2010). El polisacárido O resulta fundamental para la internalización mediante balsas lipídicas y también previene la lisis bacteriana mediada por el complemento (Jiménez *et al.*, 2004). Por otra parte, la opsonización de este tipo de bacterias impide su ingreso por balsas lipídicas, debiendo realizarlo por fagocitos (Olsen *et al.*, 2010), siendo dirigidas posteriormente al fagolisosoma. Una vez en este compartimiento, estas cepas son capaces de multiplicarse de forma significativa.

Una situación diferente ocurre con las cepas rugosas, debido a que por la ausencia de polisacárido O son incapaces de interactuar con las balsas lipídicas, siendo rápidamente fagocitadas. De esta forma, las cepas rugosas demuestran una mayor capacidad invasiva a macrófagos (Jiménez *et al.*, 2004). Como consecuencia, las cepas rugosas no opsonizadas son fagocitadas tan eficientemente como las opsonizadas y rápidamente dirigidas al fagosoma, donde son generalmente incapaces de multiplicarse, describiéndose además una mayor invasividad en *B. canis* debido a factores de virulencia, como son las proteínas inmunogénicas de la membrana externa (Omps), donde se ha relacionado con su invasividad a la familia Omp25/31 (Martín-Martín *et al.*, 2009; Olsen *et al.*, 2010).

Una vez dentro del fagosoma, son expuestas a radicales de oxígeno y pH ácido, condiciones que estimulan la expresión del operón *virB*, el cual controla la expresión de genes asociados a un sistema de secreción tipo IV (SST4). Este SST4 permite neutralizar el pH del fagosoma y transporta efectores al citoplasma de los macrófagos infectados para interferir con la maduración fagosomal, transformándolo en una “vacuola contenedora de *Brucella*” mediante la adquisición de componentes del retículo endoplásmico (Martín-Martín *et al.*, 2009; Olsen *et al.*, 2010). Producto de estos mecanismos de evasión de la respuesta inmune, *Brucella* se adapta al entorno intracelular, persistiendo de forma prolongada y pudiendo diseminarse a diferentes tejidos, con un marcado tropismo hacia útero en gestación, genitales, glándula mamaria y linfonodos (Figueiredo *et al.*, 2015; Hull y Schumaker, 2018)

Brucelosis en humanos

La brucelosis, como ya se mencionó anteriormente, tiene potencial zoonótico, pudiendo ser transmitida al ser humano por diferentes vías, siendo una de las principales mediante el consumo de productos lácteos no pasteurizados, la ingestión de carnes crudas y vísceras. Además, existe un alto riesgo en quienes trabajan diariamente manipulando y teniendo contacto directo con animales infectados o por la inhalación de sus aerosoles. Debido a estas conductas de riesgo, es que se describe que la población de mayor riesgo de infección son los trabajadores de plantas faenadoras, médicos veterinarios y personal de laboratorio (Álvarez-Hernandez *et al.*, 2015).

La brucelosis se presenta en humanos con un cuadro clínico inespecífico, donde predomina la fiebre ondulante y signos parecidos a la gripe, tales como: dolor de cabeza, malestar, y mialgia generalizada. Además, se ha observado esplenomegalia y hepatomegalia, entre otros hallazgos (CFSPH, 2009).

Brucelosis en cánidos no domésticos producida por *B. abortus* y *B. canis*

A pesar de la escasa literatura científica disponible sobre la transmisión del patógeno a cánidos silvestres, se puede realizar una extrapolación del modo de transmisión del agente a cánidos domésticos, donde se describe que en el caso de *B. abortus* se produce cuando los individuos tienen contacto directo con otro animal infectado o mediante la ingestión de leche contaminada, fetos o desechos de abortos de animales infectados (Castro *et al.*, 2017)

Por otra parte, en el caso de *B. canis* son las secreciones vaginales y el semen la fuente de mayor importancia en la transmisión del agente, debido a que son las secreciones donde existe un mayor recuento de bacterias. La infección intra-específica se describe que puede ser producida desde animales clínicamente sanos mediante la monta y contacto oronasal (Veintimilla, 2015).

A pesar de que esta enfermedad ha sido muy poco estudiada en cánidos no domésticos, se describe que, tanto en estas especies como en las domésticas, *B. abortus* y *B. canis* pueden producir signos clínicos reproductivos. Así, se ha reportado que la brucelosis incluye dentro

de su signología aborto tardío, nacimiento de camadas débiles, y pirexia leve. Además, en los machos la infección puede causar epididimitis, orquitis y prostatitis (Hull & Schumaker, 2018; Wareth *et al.*, 2017)

Epidemiología de la brucelosis

La brucelosis causada por *B. abortus* es una enfermedad de notificación obligatoria (ENO) a la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE), por lo que muchos países han desarrollado programas de control y erradicación de este agente en animales de abasto (Olsen *et al.*, 2010). En el caso de *B. canis*, al no ser considerada dentro de las ENO, no se encuentran disponibles datos oficiales de prevalencia, lo que representa un desafío para el estudio de su epidemiología. Sin embargo, existen reportes sobre su presencia a nivel mundial con valores que varían entre un 6% a 35% en perros (Hensel *et al.*, 2018), considerándose exótica en Australia y Nueva Zelanda donde no se ha reportado su presencia (Buhmann *et al.*, 2019).

Entre los estudios en cánidos no domésticos sobre estas dos especies de *Brucella*, se encuentra el de McCue y O'Farrell (1988) en Estados Unidos, donde detectaron la presencia de anticuerpos anti-*B. abortus* en 3 de 23 zorros del desierto (13%) (*Vulpes macrotis*) mediante la técnica de fijación del complemento, y un 22% a anticuerpos anti-*B. canis* mediante la misma técnica. En este mismo contexto, Azevedo *et al.* (2010) en Brasil, analizaron muestras obtenidas desde 60 zorros de campo (*Pseudalopex vetulus*), registrando un 26,6% de seropositividad contra *B. abortus* mediante la prueba de aglutinación estándar en tubo (SAT). Además, cuatro muestras (6,7%) fueron confirmadas mediante la prueba de 2-mercaptoetanol a *B. abortus*, pero sin resultados positivos para la pesquisa serológica de *B. canis*. Más recientemente, Hayashi (2013) pesquisó en Brasil la presencia de anticuerpos contra *B. canis* en un lobo de crin (*Chrysocyon brachyurus*), mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IGDA). Estos estudios confirman que, al menos, diferentes poblaciones de cánidos silvestres de diversos países se han visto enfrentados a estos patógenos, donde algunos autores indican la posibilidad de transmisión desde animales domésticos hacia fauna silvestre (Azevedo *et al.*, 2010). Sin embargo, no se ha descrito si la bacteria puede infectarlos de la misma forma que a cánidos domésticos, debido a que la gran mayoría de los estudios disponibles a la fecha han utilizado técnicas serológicas, y no técnicas

oficiales como el aislamiento bacteriano, por lo que la información disponible no permite establecer con claridad el rol que tendrían los miembros silvestres de la familia *Canidae* en la epidemiología de esta enfermedad.

Situación nacional

Si bien, y como se mencionó anteriormente, diversas especies de *Brucella* tienen la capacidad de infectar cánidos, en Chile estos animales sólo podrían ser infectados por *B. abortus* y *B. canis*, ya que desde el año 2013 nuestro país es libre de brucelosis ovina y caprina causada por *B. melitensis* (MINAGRI, 2013), y en el caso de *B. suis* no hay reportes de aislamientos en animales, siendo el último caso notificado en porcinos domésticos data del año 1987 (SAG, 2017; OIE, 2019).

La vigilancia de la brucelosis en Chile y la pertinente notificación a las autoridades correspondientes estaban enfocados en su mayoría a hallazgos de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis* en seres humanos y ganado doméstico. Sin embargo, hoy en día, gracias al Decreto número 7 del Ministerio de Salud del año 2020, que aprueba el reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria y su vigilancia, son incluidos por primera vez los laboratorios de sanidad animal, tanto públicos como privados como organismos responsables de la notificación de agentes biológicos de importancia para la salud pública. Esto resulta bastante beneficioso para el acceso a nueva información de este agente y para las especies de *Brucella* que antes no han sido tan consideradas, a pesar de su capacidad zoonótica como lo es *B. canis* (MINSAL, 2020).

En el caso particular de los cánidos no domésticos, en Chile a la fecha se han realizado sólo dos estudios serológicos para la detección de *Brucella* spp. En el primero, Olivares *et al.* (1993) obtuvieron muestras de 158 animales del Zoológico Metropolitano de Santiago, las que fueron analizadas mediante la prueba de SAT y Rosa de Bengala (RB) para detectar cepas lisas, y mediante IGDA para la detección de cepas rugosas. En este estudio, si bien se detectaron seis animales positivos a SAT (una cabra, un jabalí, dos monos capuchinos de frente blanca, un tigre y un jaguar), y dos animales positivos a RB (el tigre y el jaguar anteriores), ningún cánido resultó positivo en la detección de ambos tipos de *Brucella*. En el

segundo estudio, desarrollado por Moya *et al.* (2018), analizaron 27 sueros obtenidos de zorros de Tierra del Fuego entre los años 2008 y 2012, los que fueron sometidos a contraelectroforesis (CIEF) para la detección de anticuerpos anti-*B. canis*, sin detectar ninguna muestra positiva.

A pesar de dichos estudios, la información disponible a nivel nacional es insuficiente para poder establecer la presencia de la bacteria en dichas especies, y esclarecer el papel de estos en la epidemiología de la brucelosis en Chile. Por esta razón, se hace necesaria la elaboración de estudios dirigidos al aislamiento bacteriano, que permitan el establecimiento de una colección nacional de cepas de *B. abortus* y *B. canis* aisladas desde cánidos no domésticos, para así poder caracterizar las cepas circulantes en dichas especies animales, y determinar las similitudes genómicas de las cepas aisladas desde otras especies animales, y su papel en la salud animal, ambiental, y humana.

Cánidos no domésticos en la zona central de Chile

En Chile existen tres especies de cánidos nativos, zorro culpeo (*Lycalopex culpaeus*), zorro chilla o gris (*L. griseus*) y zorro de Darwin (*L. fulvipes*), sin embargo, sólo los dos primeros se encuentran en la zona central de nuestro país (Alvarado, 2011). Además, existen diferentes cánidos exóticos mantenidos en centros de exhibición, donde predominan los lobos (*Canis lupus*) y zorros europeos (*Vulpes vulpes*), entre otras especies.

Si bien ambas especies de cánidos nativos que se pueden encontrar en la zona central de Chile se encuentran bajo la categoría de preocupación menor, hoy en día se encuentran bajo ciertas amenazas a su preservación debido a la destrucción de su hábitat, la caza, conflicto con el ganado doméstico y comercialización de su piel, además del ataque y acoso de perros, tanto callejeros como asilvestrados, y consecuentemente la transmisión de agentes infecciosos entre las poblaciones domésticas y silvestres, lo que representa un potencial riesgo de extinción de estas últimas (Alvarado, 2011; Veintimilla, 2015; MMA, 2020).

Estas enfermedades infecciosas representan un riesgo de extinción importante e intratable para muchas especies de cánidos causando problemáticas en la conservación de éstas (Sillero y Macdonald, 2014). Además, este escenario podría ser aún peor en aquellas enfermedades infecciosas que afectan directamente su éxito reproductivo, y, por tanto, a la preservación de

estas especies. Este es el caso de la brucelosis, la que en el caso de la fauna silvestre podría comportarse de manera silente por su difícil seguimiento, aumentando así la amenaza a la conservación de las especies afectadas.

Considerando este escenario y la evidencia científica que en cánidos sudamericanos del género *Lycalopex* se evidencia el contacto con *Brucella* y el aislamiento de *B. abortus* biovar 1 de un zorro gris de la pampa (*L. gymnocercus*) (Kosoy y Goodrich, 2019), es que es de vital importancia reunir esfuerzos para la conservación de los cánidos no domésticos en Chile, ya que cumplen un rol bastante importante en el medio ambiente, siendo un agente ecológico de dispersión de flora y también como controladores de densidad de otras especies al ser depredadores tope en los medios que habitan. Esto indirectamente aumenta la diversidad de los ecosistemas al aumentar mediante efecto cascada los niveles tróficos más bajos, y aportar a la prevención de la diseminación de enfermedades y la competencia por alimento al eliminar individuos enfermos, menos aptos o muy abundantes (Rumiz, 2010).

Por lo anterior, esta memoria de título tuvo por objetivo determinar la infección con *B. abortus* y *B. canis* en cánidos no domésticos de centros de rehabilitación y exhibición en Chile mediante la detección de anticuerpos y aislamiento bacteriano. Con ello, se buscó evaluar la exposición y posible infección en estas especies animales, además que permitiría caracterizar molecularmente el patógeno, lo cual entregaría información relevante para establecer el rol de estos animales en la epidemiología de la enfermedad provocada por dichos agentes.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la infección con *B. abortus* y *B. canis* en cánidos no domésticos de centros de rehabilitación y exhibición de la zona central de Chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar la presencia de *B. abortus* y *B. canis* en cánidos no domésticos de la zona central de Chile.
2. Determinar la presencia de anticuerpos contra *B. abortus* y *B. canis* en cánidos no domésticos de la zona central de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño

Se realizó un estudio observacional descriptivo de la presencia de *B. abortus* y *B. canis* en 53 cánidos no domésticos provenientes de cinco centros de rehabilitación y cuatro colecciones zoológicas de la zona central de Chile. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Clínica Veterinaria, perteneciente al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), y fue financiado por el Proyecto FONDECYT n° 1180544.

Se efectuó un muestreo por conveniencia, donde se obtuvieron muestras desde todos los animales presentes en los centros colaboradores. Así, se obtuvieron muestras de sangre desde cánidos no domésticos mayores a un año, machos o hembras, esterilizados o enteros, sin terapia antimicrobiana en las últimas cuatro semanas, con o sin signos de brucelosis presentes. Como requisito previo a la toma de muestras, se solicitó al profesional a cargo la firma de un consentimiento informado (Anexo 1), además de una planilla de identificación del animal en el cual se solicitaron datos como: especie, edad, sexo, procedencia, presencia de signos de brucelosis, y tratamientos antibacterianos en las últimas cuatro semanas (Anexo 2). Para el procedimiento de obtención de muestras, se contó con un certificado de bioética otorgado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (Anexo 3).

Obtención de muestras

Las muestras fueron obtenidas bajo normas de bioética y bioseguridad, por médicos veterinarios capacitados de cada centro, obteniendo un total de 3 a 4 mL de sangre, la que se repartió en dos tubos estériles: uno sin anticoagulante (1 mL) y otro con anticoagulante, de preferencia heparina (≥ 3 mL). Las muestras fueron transportadas a temperatura de refrigeración en un lapso no mayor a 24 h al laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras obtenidas en tubos sin anticoagulante se centrifugaron a 5000 x g (Labofuge 200,

Heraeus Sepatech®) durante 10 min para la obtención de suero. Las muestras de sangre con anticoagulante se utilizaron para hemocultivo y se procesaron de forma inmediata.

Detección serológica de *B. abortus*

Para determinar la presencia de anticuerpos contra *B. abortus*, se realizó la técnica de Rosa de bengala (RB), de acuerdo con las recomendaciones de la OIE (OIE, 2018). Para ello, se utilizó el suero obtenido previamente y el antígeno BengaTest^R, de acuerdo con las recomendaciones del Instructivo Técnico para el Análisis de Rosa de Bengala (SAG, 2006). Así, sobre una placa cuadrículada de vidrio se depositaron 30 µL de suero por cuadrante y 30 µL del antígeno, los que se mezclaron suavemente durante 4 min. Luego se procedió a la lectura de la reacción sobre fondo blanco con luz indirecta. Para la validación de la prueba se usó como control positivo suero bovino positivo a la prueba de Rosa de Bengala, donado gentilmente por el Dr. Pedro Ábalos (Anexo 4).

Detección serológica de *B. canis*

Para determinar la presencia de anticuerpos contra *B. canis*, se realizó la técnica de CIEF descrita por Borie *et al.* (2002). Para ello, se utilizó antígeno LPS-R de *B. ovis*, el cual se preparó diluyendo 5 µL de antígeno stock *B. ovis* en 500 µL de solución salina tope. Se usó un portaobjetos, en el cual se depositaron 3 mL de agarosa al 1% diluida en buffer stock barbital pH 8,6. Luego de cargar las placas, éstas se depositaron en una cámara electroforética con solución buffer barbital pH 8,6, la que fue sometida a una corriente de 200 V y 30 mA por 90 min. Posteriormente, las placas se incubaron en citrato de sodio al 5% durante 30 min para eliminar bandas de precipitación inespecíficas. Finalmente, la lectura se realizó sobre un fondo oscuro con luz directa. En este caso, como control positivo se utilizaron muestras de suero de perros positivos previamente obtenidas (Galarce *et al.*, 2020) (Anexo 5).

Detección bacteriológica de *B. abortus* y *B. canis*

Para la realización de los hemocultivos, se utilizó el protocolo de Keid *et al.* (2009) con algunas modificaciones. Este método consistió en agregar 3 mL de muestra de sangre por cada 30 mL de caldo tripticasa de soya (BBL®) al 3% con citrato de sodio (Merck®) hasta una concentración final de 2% y un pH 7,4. De este frasco, se extrajeron 12 mL bajo gabinete de bioseguridad 2A (Heal Force Safe 1200) que fueron transferidos a un tubo estéril para ser

incubados a 37°C durante 30 días en una estufa con 5% de CO₂ para la pesquisa de *B. abortus* (Alton *et al.*, 1976). En el caso de *B. canis*, las muestras del caldo original inoculado con sangre se incubaron a 37° C durante 30 días en aerobiosis. Para verificar el crecimiento en los caldos incubados en ambas condiciones, se sembró una alícuota (0,1 mL) con asa Digrafsky (Biologix®), en una placa de agar *Brucella* (BBL®), una vez por semana hasta cumplir 30 días (cuatro subcultivos). Las placas con agar se incubaron a 37°C durante tres días para *B. canis*, mientras que para *B. abortus* las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por el mismo tiempo. Los cultivos y subcultivos se realizaron bajo gabinete de bioseguridad 2A. En cada subcultivo, y para crear un medio selectivo, se utilizó el método descrito por Kuzdas y Morse (1953), el cual consistió en agregar por cada litro de medio sólido, 100 mg de cicloheximida (Merck®), 25.000 UI de bacitracina (Merck®) y 6.000 UI de polimixina B (Merck®). Frente a un desarrollo sospechoso (colonias pequeñas, azulinas, translúcidas, y con desarrollo en un lapso mayor o igual a 48 h) se realizó tinción de Gram para observar su morfología característica.

Confirmación molecular de *B. abortus* y *B. canis*

La identificación final de ambas especies se realizó mediante la técnica de PCR. Bajo gabinete de bioseguridad se seleccionaron cinco colonias sospechosas, las cuales se suspendieron en un tubo de microcentrífuga con 500 µL de agua libre de nucleasas, el que se incubó en baño termoregulado (Aquabath 18100, Merk®) a 100°C por 15 min y centrifugó (Centrífuga Dicigen21 Orto Alresa ®) a 5000 x g por 5 min, para posteriormente extraer el sobrenadante, donde se ubica el ADN. Antes de realizar la reacción de PCR, se realizó un control de viabilidad, sembrando 50 µL del sobrenadante, e incubando las placas a 37°C por 72 h. El objetivo de este control fue corroborar que la bacteria estuviera muerta, con el fin de resguardar la bioseguridad del personal de laboratorio. Luego de esto, y para identificar la presencia de *B. canis*, se mezclaron 15 µL de 2X PCR Mastermix (Fermentas®), 5 µL de cada partidor (1 µM) y 5 µL del ADN extraído, siguiendo el protocolo de Silva (2016). En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los partidores utilizados, el tamaño esperado de los amplicones, y las condiciones de PCR utilizadas. El producto amplificado se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% a 90 V por 40 min, en buffer Tris Acetato EDTA 1X (TAE) (Fermentas®) adicionado con SafeView Plus™ 0,02%. Se utilizó un marcador de tamaño molecular de 100-1500 pb (AccuRuler 100 bp DNA Ladder, Maestrogen®). Las

bandas obtenidas se visualizaron en un transiluminador LED (Maestrogen®) y fueron fotografiadas digitalmente para su registro. Como control negativo se utilizó ADN purificado de *Escherichia coli* ATCC 25922, como control de reactivos agua libre de nucleasas, y como control positivo la cepa *B. canis* SCL (número de acceso: NZ_LGAQ00000000.1) (Borie *et al.*, 2020).

Por otro lado, y para la identificación molecular de *B. abortus*, se utilizaron los partidores y el protocolo de PCR multiplex descritos por García-Yoldi *et al.* (2006). La mezcla de reacción consistió en 1 µL de ADN templado, 400 µM de cada dNTP, 3 mM MgCl₂, 1,5 U de polimerasa, y 6,25 pmol de cada partidor. Los productos amplificados se visualizaron de la misma forma descrita para *B. canis*, utilizando como control negativo ADN de la cepa *B. canis* SCL, como control de reactivos agua libre de nucleasas, y como control positivo una cepa de campo de *B. abortus*, donada gentilmente por la Dra. María Esther Saldías, de la Unidad de Bacteriología Pecuaria, del Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias, SAG. En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los partidores utilizados, el tamaño esperado de los amplicones, y las condiciones de PCR utilizadas.

Los aislamientos, identificados por origen, sexo, edad y estado de salud de cada animal, se mantuvieron en criotubos (CryoBank™) para ser congelados a -20°C hasta su futura caracterización genómica por otro estudio.

Análisis de resultados

Para el caso del hemocultivo y serología, los resultados fueron expresados como porcentaje de positividad a *B. abortus* y *B. canis* por tipo de centro, según el método diagnóstico. Finalmente, se expresó la cantidad total de animales positivos sea por serología o hemocultivo.

Bioseguridad

Para la ejecución de esta investigación se establecieron estrictas medidas de bioseguridad, ya que *Brucella* spp. posee un riesgo individual elevado, por lo que se realizó el manejo de muestras bajo una contención de nivel 2. Esta investigación no contempló el manejo de cultivos puros más allá de la realización del cepario y suspensiones para PCR, que fueron

realizados por los investigadores del proyecto, por lo que no se requirió un laboratorio con nivel de bioseguridad nivel 3. Además, se contó con un certificado de bioseguridad otorgado por el Comité de Bioseguridad de FAVET (Anexo 6). Las medidas utilizadas incluyeron el uso de un laboratorio acondicionado especialmente para este tipo de bacterias, capacitación previa, uso de gabinete de bioseguridad clase 2A, restricción de ingreso de personal, uso de delantal, zapatos cerrados, guantes, mangas y desinfectantes. Los desechos contaminados fueron colocados, transportados y autoclavados en bolsas especiales antes de su eliminación, bajo el protocolo establecido por el Departamento de Medicina Preventiva Animal de FAVET.

Tabla 1. Secuencia de los partidores a utilizar para la detección de *B. abortus* y *B. canis* tamaño del amplicón esperado, condiciones de PCR, y referencia utilizada.

Patógeno	Blanco de amplificación	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Condiciones de PCR
<i>B. abortus</i>	<i>wboA</i>	F: ATCCTATTGCCCCGATAAGG	1.682	Denaturación inicial a 95°C por 7 min, luego 25 ciclos que constan de una denaturación por 35 s a 95°C, alineamiento a 64°C por 45 s, y elongación a 72°C por 180 s.
		R: GCTTCGCATTTTCACTGTAGC		
	<i>bp26</i>	F: GCGCATTCTTCGGTTATGAA	450	
		R: CGCAGGCGAAAACAGCTATAA		
	Polisacárido deacetilasa	F: ACGCAGACGACCTTCGGTAT	794	
R: TTTATCCATCGCCCTGTCAC				
<i>eryC</i>	F: GCCGCTATTATGTGGACTGG	587		
	R: AATGACTTCACGGTCGTTTCG			
Regulador transcripcional, familia CRP	F: CGCAGACAGTGACCATCAAA	152		
	R: GTATTCAGCCCCCGTTACCT			
<i>B. canis</i>	Segmento intergénico del cromosoma I	F: ACGAACACAAGGGCC AATAC R: ACGAACACAAGGGCC AATAC	430	Denaturación inicial a 94°C durante 1 min, 35 ciclos que constan de una denaturación a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y elongación a 72°C por 1 min. Por último, una elongación final a 72° C por 5 min.

F: forward; R: reverse.

Resultados

Se obtuvo un total de 53 muestras, obtenidas de nueve centros de la Región Metropolitana y de O'Higgins, correspondientes a la zona central de Chile. Del total de las muestras, 10 (18,9%) correspondieron a centros de exhibición y 43 (81,1%) a centros de rehabilitación (Figura 1).

Respecto a la distribución por especies, del total de muestras obtenidas 8 de ellas correspondieron a cánidos exóticos pertenecientes a las especies *V. vulpes* (7,5%) y *Canis lupus* (7,5%) correspondiente al 15% de las muestras incluidas en este estudio. El resto de los ejemplares pertenecieron a especies nativas, con un total de 45 individuos correspondientes al 85% del total de animales incluidos en el estudio. De éstos, 31 (58,5%) pertenecieron a la especie *L. culpaeus* y 14 (26,5%) a *L. griseus* (Figura 2).

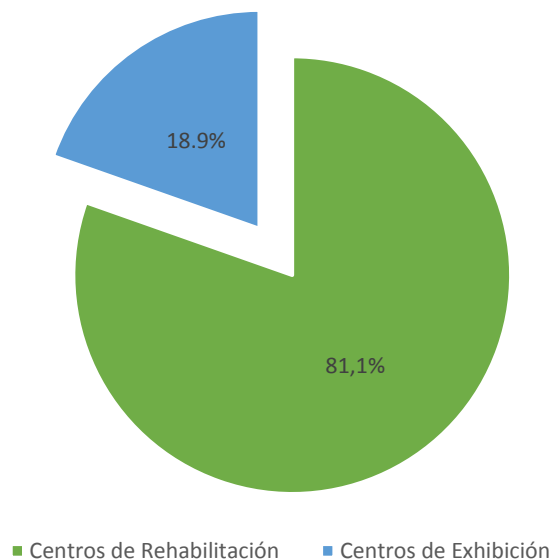


Figura 1. Distribución porcentual de los animales muestreados según origen.

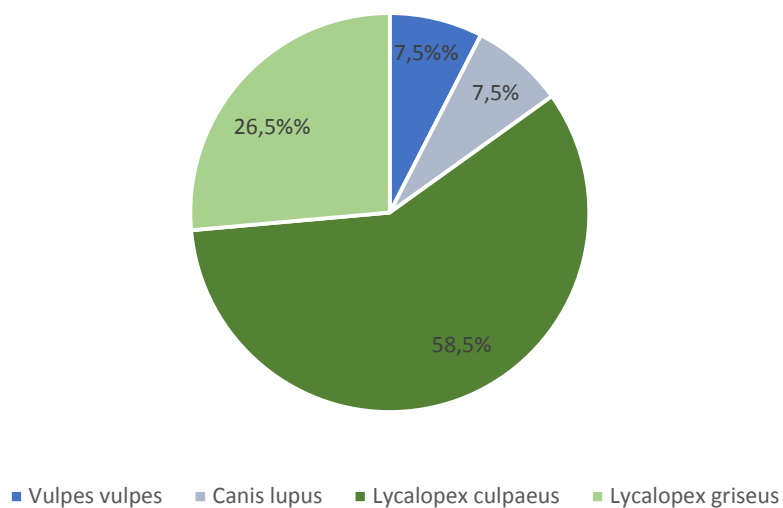


Figura 2. Distribución porcentual del total de animales muestreados según especie.

De las 53 muestras obtenidas, 5 (9,4%) resultaron positivas a la técnica de CIEF (Figura 3), correspondiendo todas ellas a la especie *L. culpaeus* (Tabla 1). Sin embargo, en ninguna de éstas se pesquisó positividad al hemocultivo para el agente, incluso luego de seis subcultivos (45 días de incubación).

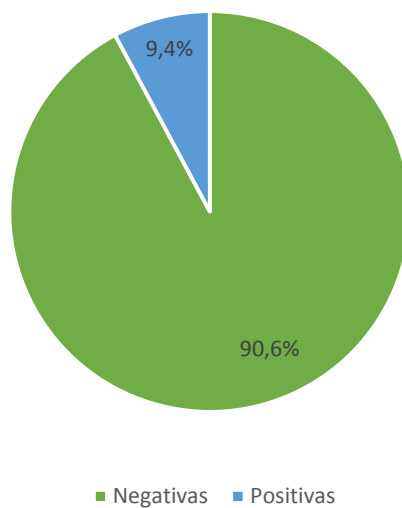


Figura 3. Porcentaje de animales positivos y negativos a CIEF.

Tabla 2. Ejemplares positivos a la prueba de CIEF y origen.

Ejemplar	Tipo de centro
LC-10	Exhibición 1
LC-18	Rehabilitación 3
LC-21	Rehabilitación 1
LC-22	Rehabilitación 1
LC-24	Rehabilitación 1

Por otra parte, en las 53 muestras obtenidas no se logró pesquisar positividad ni en cultivo ni serología de *B. abortus*.

Discusión

En los últimos años se han podido evidenciar diversas modificaciones en el ecosistema, donde los seres humanos han expandido su ocupación a nuevos terrenos, estrechando así la relación de poblaciones humanas y animales domésticos con animales silvestres. Este hecho incrementa los conflictos para la salud a nivel global, debido a la mayor probabilidad de transmisión de agentes infecciosos entre poblaciones de diferentes ambientes que antes no tenían contacto, traduciéndose en un factor de riesgo para la emergencia y reemergencia de enfermedades infecciosas de importancia ambiental, animal y pública global (Berra *et al.*, 2017). Así, hoy en día existe una mayor cantidad de evidencia que indica que estos patógenos pueden ser un factor importante de amenazas para las diferentes especies. Esto cobra aún más importancia si se tiene en cuenta que estos agentes podrían seguir en circulación en el medio ambiente en diferentes reservorios, muchos de ellos aún desconocidos (Valenzuela y Medina, 2014; Buriticá, 2019).

La brucelosis es una de las enfermedades infecciosas de origen animal de mayor importancia, debido a que se encuentra presente prácticamente en todo el mundo afectando la economía y la salud pública. Esto implica que su control y erradicación dependen de una eficiente y rápida detección y vigilancia, debido a que este agente normalmente se encuentra en diferentes poblaciones animales con un patrón de infección de sistemas complejos de múltiples hospedadores. Es por este motivo que se deben diseñar e implementar diversas estrategias de detección y vigilancia del patógeno, y así detectar las cepas locales para establecer las correspondientes políticas preventivas y de control de la enfermedad (Alamian *et al.*, 2017; Godfroid, 2018).

En Chile hasta la fecha los estudios de brucelosis en cánidos silvestres son muy escasos, existiendo sólo dos publicados, y en ambos se utilizaron solamente pruebas serológicas para su detección, aun cuando el aislamiento del agente es el diagnóstico definitivo. Sin embargo, se sugiere la formulación de variadas técnicas de laboratorio, debido a la falta de un método de diagnóstico único y fiable (Wanke, 2004; Wanke *et al.*, 2012). A pesar de que en nuestro país existe evidencia de la presencia tanto de *B. canis* con un 7% de positividad en poblaciones de perros vagabundos, de refugio y domésticos (Galarce *et al.*, 2020) y actualmente la prevalencia de *B. abortus* en el país es de 0,4% en animales domésticos

(MINSAL, 2015), sin embargo, en ninguno de los dos estudios realizados en poblaciones de cánidos no domésticos en Chile se pudo establecer positividad a estos agentes.

En el presente estudio se logró pesquisar un 9,4% de positividad a anticuerpos contra *B. canis* mediante la prueba de CIEF, resultados mayores a los que se esperaban encontrar en comparación a los estudios publicados hasta la fecha en Chile y representan la primera pesquisa serológica de este patógeno en zorros nativos del país. Todos los ejemplares positivos pertenecían a centros de rehabilitación, a excepción de uno, que a pesar de estar en un centro de exhibición había estado en un centro de rehabilitación y, debido a su desfavorable evolución clínica e incompatibilidad con la liberación fue derivado a este centro para su cautiverio. Esto indica que posiblemente los individuos positivos estuvieron en cierto momento de su vida en contacto con *B. canis* en su ambiente. Además, y considerando que este agente tiene como hospedero natural a cánidos silvestres y domésticos (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015), se puede inferir que, en caso de ser verdaderos positivos, los individuos muestreados en esta memoria provienen del contacto con perros domésticos o por otros individuos silvestres infectados.

En Chile, existe una constante expansión de las zonas urbanas, sumado a la escasa tenencia responsable de mascotas y, por tanto, el posible aumento de perros callejeros que deambulan hacia zonas naturales donde habitan estas especies de cánidos silvestres, es que pudo producirse el contacto. Esta inferencia se robustece al evidenciar que en todas las regiones del país y en diferentes ecosistemas, existen asentamientos humanos de diferentes tamaños los que frecuentemente mantienen poblaciones de perros que deambulan libremente tanto por zonas urbanizadas como silvestres; favoreciendo la interacción directa de cánidos domésticos con especies silvestres (Medina, 2010), y así el aumento del riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas virales, bacterianas o parasitarias, entre ellas la brucelosis. Sumado a lo anterior, se considera que los perros ferales en zonas rurales tienen una probabilidad mucho mayor de adquirir la enfermedad y son su principal reservorio (Hollett, 2006), además de que existe evidencia de que en poblaciones de perros vagabundos, de refugio y domésticos de la zona central de Chile circula el agente, como lo comprueba el estudio de Galarce *et al.* (2020), donde pudieron pesquisar en 771 muestras analizadas, un total de 54 (7,0%) positivas a cultivo y / o serología, con 51 (6,6%) seropositivas y aislándose el patógeno en 10 (1,3%)

de ellas. Esto permite inferir que el agente está en circulación en la zona antes señalada y la transmisión podría haber sido por contacto entre estas poblaciones.

Por otro lado, en comparación a otros estudios internacionales con objetivos similares a esta investigación, los resultados obtenidos son levemente inferiores a lo reportado. Sin embargo, ninguno de estos estudios ha utilizado las técnicas empleadas en este trabajo, utilizando variadas pruebas que varían en sus parámetros de sensibilidad y especificidad (Azevedo *et al.*, 2010; Hayashi, 2013; Martino *et al.*, 2004; McCue y O'Farrell, 1988). Esto puede influir en la cantidad de individuos falsos positivos y falsos negativos obtenidos en cada estudio, lo que dependerá de diversos factores dependientes del individuo o directamente de la técnica empleada (Wanke, 2004). Además, en su mayoría estos estudios utilizaron pruebas serológicas, a pesar de que la prueba confirmatoria es el cultivo bacteriológico.

Es necesario mencionar que la prueba de CIEF cuenta con una sensibilidad y especificidad en su hospedero natural de un 100% y 96,8% respectivamente en relación con la prueba AGID, lo que nos daría un bajo margen de falsos positivos (Salgado, 2016). De todas formas, es necesario mencionar que los resultados obtenidos en esta memoria podrían estar subestimados debido a que se indica en estudios precedentes que los anticuerpos contra *B. canis* pueden no estar presentes en estadios tempranos de infección, ya que la seroconversión ocurre entre las segunda y cuarta semana post infección y algunos individuos pueden no tener títulos de anticuerpos detectables hasta los tres o cuatro meses post-infección, describiéndose también que individuos crónicos pueden no ser pesquisados por las pruebas serológicas (CFSPH, 2018). De esta forma existe la posibilidad de no haber detectado positividad a la CIEF en los individuos muestreados si es que estos no se encontraban dentro del periodo en que el título de anticuerpos no era suficiente o estuvieran en fase crónica del cuadro.

En el caso de *B. abortus*, se obtuvieron resultados concordantes con la escasa bibliografía nacional, a pesar de que lo esperado eran animales positivos a las pruebas, debido a que en su hospedero definitivo sí se ha pesquisado presencia del agente, además de haber sido reportado la presencia de anticuerpos en perros de diferentes países latinoamericanos. Tal es el caso de Brasil con el estudio de Aguiar y colaboradores (2005) que logro pesquisar anticuerpos contra el agente mediante diferentes pruebas, siendo la positividad más alta la de

la prueba de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) con un 18,4%. Con este antecedente, y teniendo en cuenta la expansión de la frontera agrícola a nivel mundial con su consiguiente interacción de nuevos hospederos que facilitan la presentación y distribución de enfermedades infecciosas en especies silvestre, se podría esperar resultados positivos (Medina, 2010). Sin embargo, en este estudio no se detectó anticuerpos contra *B. abortus*, este resultado podría deberse a que en Chile existe el Plan de Erradicación de la Brucelosis Bovina desde 1991, realizándose desde entonces una constante vigilancia epidemiológica. Así en el año 2010, el SAG evidencia en su informe “Situación sanitaria de brucelosis bovina”, causada por *B. abortus*, una prevalencia calculada de 6,4 animales por cada 10.000 animales detectados mediante la prueba de RB (SAG, 2010). Este resultado es bastante bajo, y se asocia a las buenas prácticas de vigilancia para los objetivos sanitarios del país. A pesar de ello, la vigilancia sólo se realiza en especies domésticas, lo que podría provocar una reemergencia de la enfermedad si es que no se realiza una vigilancia exhaustiva en los posibles reservorios silvestres, lo que podría provocar grandes pérdidas económicas a nivel nacional, aún más cuando se ha establecido que cánidos infectados por *B. abortus* tienen el potencial de infectar el ganado vacuno, por lo que podrían ser una amenaza en la cadena de transmisión de esta enfermedad (Wareth *et al.*, 2017; Miceli *et al.*, 2019).

Dentro de otros estudios internacionales concordantes con esta memoria encontramos el de Martino *et al.* (2004) llevado a cabo en Argentina, donde se pudo pesquisar un 17,8% de seropositividad a anticuerpos anti-*Brucella* spp., donde se utilizaron un total de 84 sueros, 28 de ellos pertenecientes a *L. culpaeus* y 56 a *L. griseus* de vida libre. Estos autores registraron positividad para *Brucella* spp. un total de 8 muestras de *L. culpaeus* y 7 de *L. griseus* mediante el método de ELISA.

Es importante destacar que no se ha diseñado ni estandarizado hasta el momento ninguna prueba de laboratorio que permita el diagnóstico indirecto de la infección con especies de *Brucella* lisas en cánidos domésticos, menos aún en especies silvestres, y la metodología que se empleó en este estudio fue la misma que se utiliza para el tamizaje en bovinos. Además, está descrito que en *C. lupus familiaris* la seroconversión en individuos infectados por *B. abortus* se presenta entre 5 y 20 días después de la infección (Miceli *et al.*, 2019), por lo que,

nuevamente, si estos individuos se encontraban en infección reciente, es posible que no se haya podido detectar positividad a la prueba de RB.

Respecto al hemocultivo, en esta memoria no se logró pesquisar en ninguno de los casos *Brucella* en sangre. Esto puede ser debido a que la bacteria tiene un comportamiento de intermitencia en el torrente sanguíneo pudiendo no ser pesquisado al momento de la toma de muestra (Moral, 2013). Es por esto que se infiere que un cultivo negativo no necesariamente nos indica que un animal no esté infectado. Por lo tanto, es necesario realizar hemocultivos seriados para lograr la pesquisa del agente mediante aislamiento microbiológico.

Finalmente, estos hallazgos son de gran importancia ya que son los primeros de Chile en registrar positividad en estas poblaciones de cánidos de centros de rehabilitación y exhibición, dándonos información relevante para el estudio de la epidemiología de la enfermedad y posibles oportunidades para la conducción de nuevos estudios sobre este agente en especies silvestres, tanto de vida libre como de cautiverio. Además, si se toma en cuenta que algunas condiciones ambientales, como, por ejemplo, las bajas temperaturas, la humedad y la materia orgánica prolongan la supervivencia de *Brucella* desde días hasta semanas en el ambiente (Abalos, 2010), sería interesante realizar estos estudios en zonas de latitudes más altas, en donde la bacteria podría permanecer más tiempo por las condiciones climáticas de estas regiones y por ende haber una mayor cantidad de casos en zorros silvestres presentes en la zona.

Conclusiones

Se logró pesquisar la presencia de anticuerpos contra *B. canis* en cinco zorros nativos en centros de rehabilitación y de exhibición de la zona central de Chile.

Es posible que los cánidos no domésticos de nuestra región estén en contacto con el agente, pero aun así los resultados no son concluyentes para determinar que estas especies son reservorio de *Brucella* spp., Para poder determinarlo se necesita dirigir nuevos estudios que incluyan variadas técnicas de diagnóstico debido a las características del agente, para luego realizar el seguimiento clínico del animal.

BIBLIOGRAFÍA

- ABALOS, P.** 2010. Brucelosis. In: Retamal, P.; Abalos, P.; Fredes, F. Enfermedades animales producidas por agentes biológicos. Ed. Universitaria. Santiago, Chile. pp. 33-37.
- AGUIAR, D. M. D., CAVALCANTE, G. T., VASCONCELLOS, S. A., MEGID, J., SALGADO, V. R., CRUZ, T. F., ... & GENNARI, S. M.** 2005. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella canis* em cães rurais e urbanos do Município de Monte Negro, Rondônia, Brasil. *Ciênc Rural*, 35(5), 1216-1219.
- ALAMIAN, S., ESMAELIZAD, M., ZAHRAEI, T., ETEMADI, A., MOHAMMADI, M., AFSHAR, D., & GHADERI, S.** 2017. A novel PCR assay for detecting *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Osong Public Health Res Perspect*, 8(1), 65.
- ALTON, G.; JONES, L.; PIEZT, D.** 1976. Las técnicas de laboratorios en la brucelosis. 2ª ed. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza. 175 p.
- ALVARADO, R.** 2011. Apuntes sobre los Zorros Culpeo y Chilla en Chile. *La Chiricoca*, 13, 51-55.
- ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, N.; DIAZ, M.; ORTIZ, M.** 2015. Brucelosis, una zoonosis frecuente. [en línea] <<http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/49566>> [consulta: 10-04-2019].
- ARDOINO, S.; BARUTA, D.; TOSO, R.** 2017. Brucelosis canina. *Ciencia Veterinaria* 8(1), 50-61.
- AZEVEDO, S.; RODRIGUES, M.; SOUSA, C.; BARROS, A.; ARRUDA, S.; ALVES, C.** 2010. Anticorpos anti *Brucella abortus*, anti *Brucella canis* e anti *Leptospira* spp. em raposas (*Pseudalopex vetulus*) do semiárido paraibano, Nordeste do Brasil. *Ciênc Rural* 40(1), 1-4.
- BERRA, Y., NICOLA, A. M., AROCENA, G., ELENA, S., FRANCO, C., OROZCO, M., & DEGREGORIO, O.** 2017. *Brucella* sp. en la interfase humano-animal-ambiente de la reserva ecológica costanera sur, argentina. [en línea] <http://cvpba.org/wp-content/uploads/2017/09/4.EYSP_POSTER2017.pdf> [consulta: 15-08-2020].
- BORIE, C., BRAVO, C., DETTLEFF, P., GALARCE, N., DORNER, J., & MARTÍNEZ, V.** 2020. First genome sequence of Chilean *Brucella canis* SCL strain provides insights on the epidemiology and virulence factors, explaining differences between geographical origins. *J Biotechnol*, (49), 1-4.
- BORIE, C.; CEPEDA, R.; VILLAROEEL, M.; DE LOS REYES, M.** 2002. Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. *Arch Med Vet*. 34(1), 111-116

- BUHMANN, G., PAUL, F., HERBST, W., MELZER, F., WOLF, G., HARTMANN, K., FISCHER, A.** 2019. Canine Brucellosis: Insights into the epidemiologic situation in Europe. *Front. Vet Sci.* 6(151), 1-9.
- BURITICÁ, S.** 2019. Enfermedades emergentes y reemergentes con potencial zoonótico. Fondo Editorial Biogénesis, 29-36.
- CASTRO, M., GUARDADO, V., & TOVAR, P.** 2017. Identificación serológica de *Brucella abortus* en perros (*Canis lupus familiaris*) de 27 ganaderías bovinas pertenecientes a los municipios de Metapán y El Porvenir, Santa Ana, El Salvador. Memoria de Título de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ciudad Universitaria. El Salvador. U. de el Salvador. Fac. Ciencias Agronómicas, Departamento de Medicina Veterinaria. 44pp.
- CFSPH (THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH).** 2009. Brucellosis. [en línea]. < <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucellosis.pdf> > [consulta: 07-07-2020].
- CFSPH (THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH).** 2018. Canine Brucellosis: *Brucella canis*. [en línea]. < http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf >. [consulta: 06-08-2020].
- DECRETO N° 7.** Diario Oficial de la República de Chile, Santiago, Chile, 24 de enero del 2020.
- FIGUEIREDO, P.; FICHT, T.; RICE-FICHT, A.; ROSSETTI, C.; ADAMS, L.** 2015. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-Host Interactions. *Am J Patol.* 185(6), 1505-1517.
- GALARCE, N., ESCOBAR, B., MARTÍNEZ, E., ALVARADO, N., PERALTA, G., DETTLEFF, P., ... & BORIE, C.** 2020. Prevalence and Genomic Characterization of *Brucella canis* Strains Isolated from Kennels, Household, and Stray Dogs in Chile. *Animals*, 10(11), 2073.
- GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C.; DE MIGUEL, M.; MUÑOZ, P.; VIZMANOS, J.; LÓPEZ-GOÑI, I.** 2006. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis*. *Clin Chem.* 52(4), 779-781.
- GODFROID, J.** 2018. *Brucella* spp. at the wildlife-livestock interface: an evolutionary trajectory through a livestock-to-wildlife “host jump”?, *Vet sci*, 5(3), 81.
- HAYASHI, E.** 2013. Pesquisa de cinomose, parvovirose e brucelose em carnívoros selvagens de vida livre e cães domésticos da região do Parque Nacional das Emas, Goiás. [en línea] <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-29042013-153257/en.php>> [consulta: 20-04-2019].
- HENSEL, M.; NEGRON, M.; ARENAS, A.** 2018. Brucellosis in dogs and Public Health risk. *Emerg Infect Dis.* 24(8): 1401-1406.

- HOLLETT, RB** (2006). Brucelosis canina: brotes y cumplimiento. *Theriogenology*, 66 (3), 575–587.
- HULL, N.; SCHUMAKER, B.** 2018. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. *Infect Ecol Epidemiol.* 8(1), 1500846.
- JIMÉNEZ, M.; TERRAZA, A.; GROSS, A.; DORNAND, J.** 2004. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infect Immun.* 72: 2429 – 2433
- KEID, L.; SOARES, R.; VASCONCELLOS, S.; MEGRID, J.; SALGADO, V.; RICHTZENHAIN, L.** 2009. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. *Res. Vet Sci.* 86(1): 22-6.
- KOSOY, M., & GOODRICH, I.** 2019. Comparative ecology of *Bartonella* and *Brucella* infections in wild carnivores. *Front. Vet Sci.*, 5, 322.
- KUZDAS, C.; MORSE, E.** 1953. A selective medium for the isolation of *Brucellae* from contaminated materials. *J Bact.* 66:502.
- MARTÍN-MARTÍN, A. I., CARO-HERNÁNDEZ, P., SANCHO, P., TEJEDOR, C., CLOECKAERT, A., FERNÁNDEZ-LAGO, L., & VIZCAÍNO, N.** (2009). Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. *Vet Microbiol.* 137(1-2), 74-82.
- MARTINO, P., MONTENEGRO, J., PREZIOSI, J., VENTURINI, C., BACIGALUPE, D., STANCHI, N., & BAUTISTA, E.** (2004). Serological survey of selected pathogens of free-ranging foxes in southern Argentina, 1998--2001. *Rev Sci Tech*, 23(3), 801-806.
- MCCUE, P.; O'FARRELL, T.** 1988. Serological survey for selected diseases in the endangered San Joaquin kit fox (*Vulpes macrotis mutica*). *J Wildl Dis.* 24(2) 274-281.
- MEDINA, G.** 2010. Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. *Arch Med Vet*, 42(1), 11-24.
- MICELI, G. S., MEYER, L. P., PERALTA, L. M., & MORTOLA, E.** 2019. Detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* en perros en contacto con zona rural. *Analecta Vet.* 39(2), 038-038.
- MINAGRI. MINISTERIO DE AGRICULTURA DE CHILE.** 2013. Resolución ex. n° 498 Declara país libre de brucelosis caprina y ovina causada por *Brucella melitensis* a la República de Chile. 31 enero 201.
- MINSAL. MINISTERIO DE SALUD.** 2015. Brucelosis. [En línea]. [en línea] <<https://www.minsal.cl/brucelosis/#:~:text=En%201991%20se%20inici%C3%B3%20el,alcanza%20el%200%2C4%25.&text=Estudios%20han%20encontrado%20entre%20un,de%20zonas%20urbanas%20del%20pa%C3%ADs>> [consulta: 09-02-2021].

- MMA. MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE.** 2020. Inventario nacional de especies de Chile. [En línea]. <http://especies.mma.gob.cl/CNMWeb/Web/WebCiudadana/webCiudadana_busquedaGrilla.aspx?cx=010884267946229321636%3Aoo8i2-maa4&cof=FORID%3A10&q=zorro> [consulta: 16-07-2020]
- MORAL, M.** 2013. Diagnóstico de brucelosis: Guía para el equipo de salud n° 12. Dirección de Epidemiología-Ministerio de Salud de la Nación Argentina Buenos Aires. [en línea] <<http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000304cnt-guia-medica-brucelosis.pdf>> [consulta: 03-09-2020].
- MORENO, E.** 2014. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front Microbiol.* 5, 213.
- MOYA, S.; OETTINGER, S.; BORIE, C.; FLORES, R.; ABALOS, P.; BRICEÑO, C.** 2018. Serologic survey of *Brucella canis* and *Leptospira* spp. in free-ranging wild and domestic canids from Tierra del Fuego, Chile. *J Wildl Dis.* 53(3) 1-4.
- OIE. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE SANIDAD ANIMAL.** 2018. Brucelosis (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*). [en línea] <<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2019/>> [consulta: 15-04-2019]
- OIE. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE SANIDAD ANIMAL.** 2019. Enfermedades de la Lista de la OIE 2019. [en línea] <<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2019/>> [consulta: 15-04-2019]
- OLIVARES, R.; RIVEROS, V.; PINOCHET, L.** 1993. Brucelosis: estudio serológico en animales de un zoológico. *Arch Med Vet.* 25, 101-105.
- OLIVEIRA, E.; JÚNIOR, J.; SOUZA, M.; SANTANA, V.; SILVA, J.; MOTA, R.; SÁ, F.** 2012. Serologic survey of brucellosis in captive neotropical wild carnivores in Northeast Brazil. *J Zoo Wildl Med,* 43(2), 384-387.
- OLSEN, S.; BELLAIRE, B.; ROOP II, R.; THOEN, C.** 2010. *Brucella.* **In:** Gyles, C.; Prescott, J.; Songer, G.; Thoen, C. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4ª Ed. Wiley-Blackwell. USA. pp. 429-441
- RUMIZ, D.** 2010. Roles ecológicos de los mamíferos medianos y grandes. Distribución, ecología y conservación de los mamíferos medianos y grandes de Bolivia, 53-73.
- SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO DE CHILE.** 2006. SAG. Instructivo Técnico para el Análisis de Rosa de Bengala. Cod: IT-LAB-06-v1. 13 p.
- SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO DE CHILE.** 2017. Informe semestral para la notificación de la presencia de enfermedades de la lista de la OIE [en línea] <

http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/informe_oie_ii-semester_2017.pdf
[consulta: 15-04-2019].

- SALGADO, S.** 2016. Evaluación de la prueba de aglutinación rápida en placa con 2 mercaptoetanol para el diagnóstico de *Brucella canis*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 53pp.
- SILLERO, C. Y MACDONALD, D.** 2004. The biology and conservation of wild canids. 1st ed. Oxford University Press. Oxford, UK. 465 p.
- SILVA, I.** 2016. Sensibilidad analítica de una reacción en cadena de la polimerasa convencional, para el diagnóstico de *Brucella canis* en cultivo puro y muestras de sangre y orina. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 22pp.
- VALENZUELA, A. Y MEDINA, G.** 2014. Importancia de las enfermedades infecciosas para la conservación de la fauna silvestre amenazada de Chile. *Gayana (Concepción)*, 78(1), 57-69.
- VEINTIMILLA, N.** 2015. Presencia de enfermedades parasitarias e infecciosas (Leptospirosis, distemper y brucelosis) en zorros andinos (*Lycalopex culpaeus*) que habitan en los páramos de la Hacienda Antisanilla (Pintag-Ecuador). Memoria de Título Médico Veterinario. Quito, Ecuador. U. San Francisco de Quito. Colegio de Ciencias de la Salud, 100pp.
- WANKE, M.** 2004. Canine brucellosis. *Anim Reprod Sci.* 82: 195-207.
- WANKE, M.; CAIRÓ, F.; ROSSANO, M.; LAIÑO, M.; BALDI, P.; MONACHESI, N.; COMERCIO, E.; VIVOT, M.** 2012. Preliminary study of an immunochromatography test for serological diagnosis of canine brucellosis. *Reprod. Dom. Anim.* 47(6): 370-372.
- WARETH, G., MELZER, F., EL- DIASTY, M., SCHMOOCK, G., ELBAUOMY, E., ABDEL- HAMID, N., ... & NEUBAUER, H.** 2017. Isolation of *Brucella abortus* from a dog and a cat confirms their biological role in re- emergence and dissemination of bovine brucellosis on dairy farms. *Transbound Emerg Di.* 64(5), 27-30.
- WHATMORE, A.** 2009. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, anexpanding genus of zoonotic pathogens. *Infect Genet Evol.* 9(6), 1168-1184.

ANEXOS

Anexo N°1: Consentimiento informado para toma de muestras



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo....., RUT....., declaro en forma voluntaria que estoy de acuerdo en que los cánidos silvestre a mi cargo participen en la investigación “¿Qué sabemos sobre la situación actual de *Brucella canis* en Chile?: Caracterización filogenética y de virulencia de su población circulante en Santiago, Valdivia y Temuco”, aceptando para ello donar su sangre (máximo 5 mL) y además permitiendo la obtención de una muestra urogenital (secreción vaginal o prepucial) mediante procedimientos seguros y no dolorosos.

La información de los resultados respecto de la detección de *B. abortus* y *B. canis*, positiva o negativa (por cultivo y serología), será gratuita y estrictamente confidencial y se me hará llegar, en un plazo no superior a los 30 días hábiles, por mail con los siguientes datos:

Mail:.....

Teléfono fijo:....., celular:.....

Fecha:.....

Firma Profesional Responsable

Firma Investigador Responsable/
Co-Investigador

Anexo N°2: Planilla identificación de muestras

Identificación	Especie	Origen (silvestre/cautiverio)	Procedencia (Lugar)	Edad	Sexo	Historial de enfermedad reproductiva- tratamientos últimas 4 semanas

El ítem identificación es el código con que se marcaron los tubos y tórula, se debe intentar ser lo más claro posible para que sea de utilidad para la individualización del animal.

Anexo N°3: Certificado de bioética



Santiago, 13 de mayo de 2019

Certificado N°: 19259-VET-UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo 06-2019, del Proyecto de Investigación titulado: “**Detección bacteriológica y serológica de *Brucella abortus* y *Brucella canis* en cánidos no domésticos de centros de rehabilitación y exhibición de Chile**”, del Sr. **Sebastián De la Fuente González**, tesista de Pregrado, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile y cuyo Investigador Responsable es el Dr. **Nicolás Galarce Gálvez**, Jefe de Laboratorio de Diagnóstico de Agentes Infecciosos, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

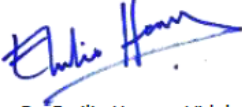
Los Investigadores se han comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **50** animales: Zorro chilla (*Lycalopex griseus*), Zorro culpeo (*Lycalopex culpaeus*), Zorro rojo (*Vulpes vulpes*), Lobo europeo (*Canis lupus*), Licaón (*Lycan pictus*), Lobo de crin (*Chrysocyon brachyurus*), Zorro ártico (*Vulpes lagopus*), provenientes de las colecciones de parques zoológicos públicos y privados, y también de centros de rehabilitación ubicados en la zona central de Chile, desde mayo de 2019 a diciembre de 2019, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado **parcialmente por FONDECYT Nro. 1180544**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.

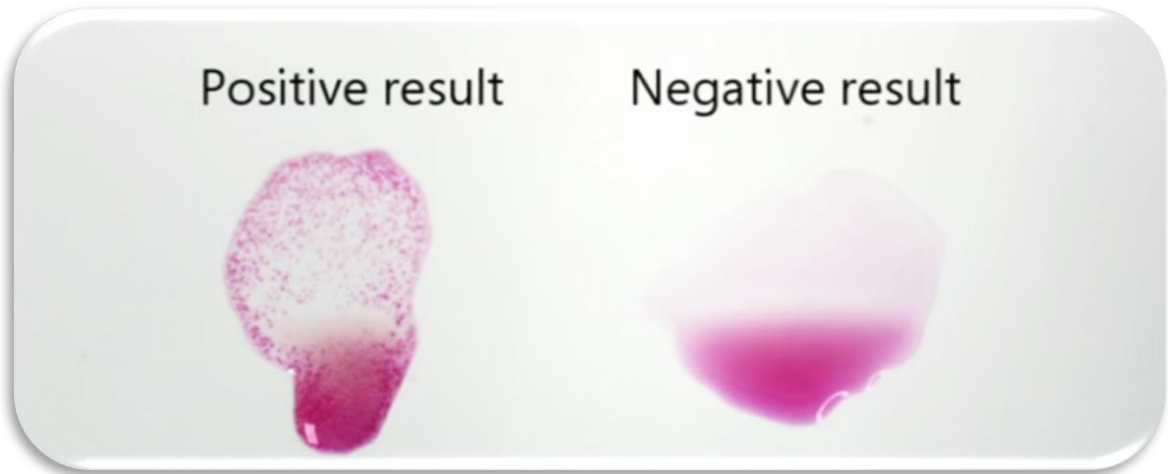

Ronald Vargas Casanova
Director
CICUA – VID
Universidad de Chile




Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

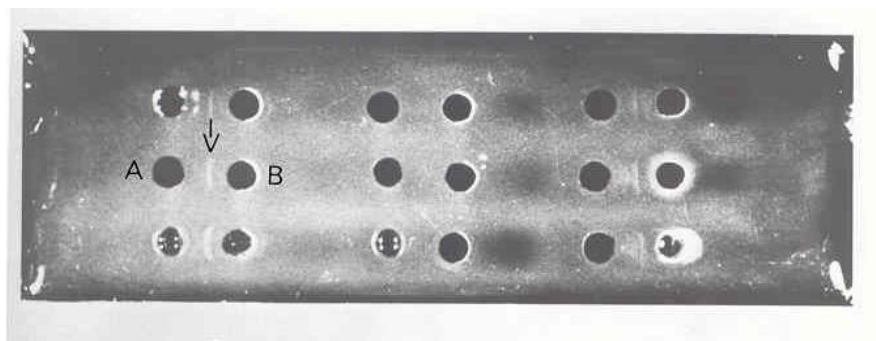
Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl

Anexo N°4: Detección serológica de *B. abortus* mediante prueba de aglutinación con Rosa de Bengala.



Prueba de Rosa de Bengala, se considerará positivo toda formación de un agregado de aglutinación de partículas pequeñas o grandes.

Anexo N°5: Detección serológica de *B. canis* mediante prueba de precipitación de contraelectroforesis (CIEF).



Prueba de (CIEF), se considerará positivo toda banda precipitación en el gel agar. A: antígeno LPS-R de *B. ovis*; B: suero en estudio.

Anexo N°6: Certificado de bioseguridad



CERTIFICADO N° 114

Santiago, 9 abril, 2018

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto, titulado "What do we know about the current situation of Brucella canis in Chile?: Phylogenetic and virulence characterization of its circulating population in Santiago, Valdivia and Temuco", cuya Investigadora Responsable es la Dra. Consuelo Borie P., académico de FAVET. El proyecto fue aprobado en el concurso FONDECYT Regular 2018.

El proyecto cumple las normas de bioseguridad, las que se encuentran descritas en el mismo y en el formulario de solicitud de certificados de bioseguridad de FAVET, y que son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)" y en el "Manual de Bioseguridad de Conicyt" (versión 2008), que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.


DRA. LISETTE LAPIERRE A.

Coordinadora
Comité de Bioseguridad
FAVET

