



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella* spp. EN
UNGULADOS SILVESTRES CAUTIVOS

BÁRBARA ELIZABETH PARRA LIZANA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESOR GUÍA: PEDRO ABALOS PINEDA

SANTIAGO, CHILE
2013



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella* spp. EN UNGULADOS SILVESTRES CAUTIVOS

BÁRBARA ELIZABETH PARRA LIZANA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PEDRO ABALOS PINEDA
PROFESOR CONSEJERO: PATRICIO RETAMAL
PROFESOR CONSEJERO: HERNAN BRIONES

SANTIAGO, CHILE
2013

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que forman parte de este difícil y hermoso proceso, desde el comienzo de la carrera hasta ahora.

Quiero agradecer especialmente:

Al Dr. Ezequiel Hidalgo, por confiar en mí la realización de este trabajo.

Al Dr. Pedro Abalos, por su enorme paciencia, consejos, disposición y cariño.

Al Dr. Patricio Retamal también por su paciencia y colaboración cada vez que lo necesité.

A quienes formaron parte de mi formación fuera de la Universidad, en CESAVE El Roble y en HCV SOS Buin Zoo.

A mis compañeros, por compartir horas de estudio, miedos, penas, pero sobre todo alegrías y hermosos momentos que no olvidaremos.

A mis perros, por ser siempre una inspiración. A los que estuvieron y están: Pucky, Dicky, Rolly, Almendra, Burbuja, Sol, Francisca y Panchito.

A mi Cristián, por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo, sin dudar nunca de mi.

A mis papás, por darme todo lo que he necesitado para cumplir mis sueños. Todo esto es gracias a ustedes.

GRACIAS...

MEMORIA DE TÍTULO

“DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella* spp. EN UNGULADOS SILVESTRES CAUTIVOS”.

“DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST *Brucella* spp. IN WILD UNGULATES MAINTAINED IN CAPTIVITY”.

Bárbara Elizabeth Parra Lizana *

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa zoonótica que afecta a los mamíferos, con amplia distribución mundial y de gran importancia económica. Muchos países han implementado programas de control y/o erradicación dirigidos a especies domésticas. Sin embargo, *Brucella* spp. es capaz de infectar a animales silvestres y en Chile casi no existen registros tanto en aquellos de vida libre como en cautiverio. En zoológicos, es importante conocer los riesgos de las principales enfermedades, especialmente las zoonóticas, para dimensionar a lo que se enfrentan tanto quienes trabajan con los animales como quienes los visitan. Se realizó un estudio serológico en 80 ungulados en cautiverio, pertenecientes a 9 especies, para detectar anticuerpos contra *Brucella* spp. mediante las técnicas Rosa de Bengala y ELISA de Competencia. Ambas pruebas fueron similares en sus resultados. Para la técnica Rosa de Bengala todas las muestras fueron negativas, y para el ELISA de Competencia, 2 muestras reaccionaron positivamente con valores levemente superiores a la línea de corte validada para el bovino.

Palabras claves: *Brucella* spp, Rosa de Bengala, ELISA de Competencia, ungulados.

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic disease that affects mammals worldwide and has great economic importance. Many countries have implemented programs of control and / or eradication targeted at domestic species. However, *Brucella* spp. can also infect wildlife, and in Chile there are limited records on both free-living and captive animals. In zoos it is imperative to be aware of the risks of major diseases, especially those which are zoonotic and which pose a risk to those who work with the animals and visitors as well. Serological studies were performed on 80 captive ungulates belonging to 9 species, to detect antibodies against *Brucella* spp. using the Rose Bengal and competitive ELISA techniques. Both tests had similar results. The Rose Bengal samples were all negative, and 2 ELISA samples reacted positively with values slightly above the bovine limit value.

Keywords: *Brucella* spp, Rose Bengal, competitive ELISA, ungulates.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de amplia distribución mundial, producida por bacterias del género *Brucella*, cocobacilos Gram negativos, intracelulares facultativos. Afecta a los mamíferos y es de gran importancia por generar pérdidas económicas al alterarse la fertilidad de los rebaños y al originar posibles barreras en el comercio de animales y sus productos, además de ser una zoonosis. Hasta la fecha se han descrito 10 especies que corresponden a *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti* y *B. inopinata* (Godfroid *et al.*, 2010). Debido a los riesgos para la salud pública e importancia económica de la enfermedad, muchos países han implementado programas de control y/o erradicación dirigidos especialmente a especies domésticas. Sin embargo, *Brucella* spp. es capaz de infectar a animales silvestres, pudiendo tener éstos un rol importante en la mantención y potencial transmisión de la enfermedad (Godfroid *et al.*, 2010).

B. abortus es responsable de la mayoría de los problemas de la enfermedad en fauna silvestre (Thorne, 2001), siendo considerada endémica en el bisonte americano (*Bison bison*) y ciervo rojo (*Cervus elaphus*) en el Parque Nacional Yellowstone, EEUU; al igual que el bisonte en el Parque Nacional Wood Buffalo en Canadá (Mackintosh *et al.*, 2002). Otras especies descritas con signos clínicos por infección natural por *B. abortus* son el camello (*Camelus bactrianus*) (Musa *et al.*, 2008) y el muflón canadiense (*Ovis canadensis*) (Kreeger *et al.*, 2004).

Históricamente, la brucelosis ha estado ampliamente distribuida, pero gracias a los exitosos programas de control y erradicación en ganado doméstico, esta distribución se ha limitado (Thorne, 2001). La enfermedad todavía es común en el Medio Oriente, Asia, África, América Central y del Sur, Cuenca Mediterránea y el Caribe. *B. abortus* se encuentra en las regiones ganaderas con excepción de Japón, Canadá, algunos países europeos, Australia, Nueva Zelanda e Israel, donde ha sido erradicada (CFSPH, 2009).

Estudios de infección experimental en bisonte y ciervo rojo han demostrado transmisión hacia el ganado susceptible en situaciones de contacto cercano y especialmente relacionados con partos. Estas condiciones se dan durante el invierno bajo manejo de alimentación artificial en Parque Nacional Yellowstone, EEUU (Thorne, 2001).

Con pocas excepciones, la enfermedad clínica ocurre principalmente en artiodáctilos (Thorne, 2001). Sin embargo, la susceptibilidad a infección por *B. abortus* se ha reportado en

diversas especies de mamíferos de distintos órdenes taxonómicos. Entre los ungulados el bisonte americano (*Bison bison*), búfalo africano (*Syncerus caffer*), ciervo dama (*Dama dama*), ciervo rojo (*Cervus elaphus*), camello (*Camelus bactrianus*), hipopótamo (*Hippopotamus amphibius*), cebra (*Equus burchellii*), jirafa (*Giraffa camelopardalis*), gacela (*Gazella thompsonii*) (Thorne, 2001), camélidos sudamericanos (CFSPH, 2009; Rojas *et al.*, 2004; Gidlewski *et al.*, 2000), entre muchos otros.

Como ya se ha mencionado, existen numerosas descripciones de infección natural por *B. abortus* en diversas especies de mamíferos, pero sólo son unos pocos los verdaderos reservorios que pueden mantener la infección, como el bisonte (*Bison bison*) y el alce o wapiti (*Cervis canadensis*) en América del Norte y el búfalo africano en el sur de África (Godfroid, 2002). Se ha especulado que algunos carnívoros son capaces de propagar la infección por *B. abortus*, tales como coyotes, lobos, osos pardo y negro. Pero éstos no son considerados vectores epidemiológicamente significativos en la naturaleza (Van Campen y Rhyan, 2009). Esta información es de gran importancia para el control y/o erradicación de la enfermedad, por lo que resulta fundamental conocer el estado sanitario de las distintas especies y en distintas condiciones.

El diagnóstico requiere la demostración del organismo mediante pruebas directas, o bien evaluar la respuesta inmune del hospedero frente a la infección mediante pruebas indirectas (Godfroid *et al.*, 2010).

Las pruebas directas más usadas son el cultivo y la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”, PCR). Las pruebas indirectas son numerosas y entre ellas las de mayor importancia son las serológicas. Entre las pruebas serológicas de aglutinación se pueden mencionar: la Prueba de Aglutinación Lenta (“Slow Agglutination Test”, SAT), cuyo principio es detectar anticuerpos del tipo IgM contra *Brucella* spp. y la prueba de Rosa de Bengala (RB) que detecta anticuerpos del tipo IgG, la que es usada en muchos países como método de detección estándar por ser simple y tener mayor sensibilidad que SAT; también está la prueba de Fijación del Complemento (Complement Fixation Test, CFT) que permite la detección de anticuerpos anti-*Brucella* que son capaces de fijar el complemento. Por otro lado, están los ELISAs (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”) divididos en ELISA indirecto (i-ELISA), que detecta principalmente IgG y tiene alta sensibilidad pero baja especificidad, siendo vulnerable a reacciones cruzadas, y ELISA de competencia (c-ELISA), que utiliza anticuerpos

monoclonales específicos contra epitopos del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella*, siendo más específico pero menos sensible que iELISA. La validación de estas pruebas de diagnóstico sigue siendo un problema, sobre todo en la fauna silvestre (Godfroid *et al.*, 2010).

En Chile, las pruebas, individuales, de diagnóstico oficial de brucelosis bovina son: RB como prueba tamiz, cuyo resultado positivo debe ser confirmado con CFT o cELISA. La Prueba del Anillo de la Leche que es colectiva y se utiliza para la vigilancia epidemiológica de la infección (Abalos, 2010).

En el país la infección por *Brucella* spp. ocurre en bovinos (*B. abortus*), ovinos (*B. ovis*) y caninos (*B. canis*). Recientemente, Chile fue declarado país libre de brucelosis ovina y caprina causada por *B. melitensis*, el último aislamiento del agente se registró en el año 1975 (SAG, 2013). En cerdos la enfermedad es improbable, lo que es corroborado mediante la vigilancia epidemiológica de los planteles industriales y por la ausencia de alteraciones reproductivas atribuibles a *B. suis* (Abalos, 2010). El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) inició el control de la brucelosis bovina en 1975, y en 1991 se inició el programa de erradicación de ésta en el país, manteniendo desde entonces una vigilancia constante de las principales zonas ganaderas del país. Pero en cuanto a la fauna silvestre, se desconoce casi en su totalidad la importancia que puede tener ésta dentro de la epidemiología del patógeno; igualmente se desconocen aspectos sobre su presencia, tanto de la infección como enfermedad en cualquiera de las especies, especialmente ungulados de vida libre o en cautiverio, los cuales podrían representar el mayor riesgo.

Las distintas especies de *Brucella* pueden expresar en su estructura lipopolisacárido (LPS) liso o rugoso. Las especies más patógenas para el humano (*B. suis*, *B. melitensis* y *B. abortus*) poseen LPS liso, implicado en la virulencia de estas bacterias (Cardoso *et al.*, 2006). Al no existir reportes de la presencia en el país de *B. suis*, ni *B. melitensis*, los resultados positivos para cualquiera de las pruebas realizadas en este trabajo pueden atribuirse a *B. abortus*.

Cabe destacar que dentro de los planes de medicina preventiva en zoológicos, es necesario conocer los riesgos de las enfermedades, especialmente las zoonóticas, para dimensionar a lo que se enfrentan tanto quienes trabajan con los animales (médicos veterinarios, cuidadores) como quienes los visitan. Ya que la brucelosis, al igual que otras zoonosis como la tuberculosis podría infectar a los manipuladores y público en general (De Lisle *et al.*, 2001).

En este trabajo se pretende detectar la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. en distintas especies de ungulados silvestres mantenidos en cautiverio, mediante dos técnicas para el diagnóstico de la infección utilizadas en nuestro país, comparando sus resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, certificando que éste satisface lo estipulado por la guía de principios y directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborado por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas.

La recolección de muestras se realizó en animales del Parque Zoológico Buin Zoo, en el período comprendido entre Septiembre del 2011 y Marzo del 2012, dentro del programa de medicina preventiva de éste. Se llevó a cabo en 80 ungulados, pertenecientes a 9 especies (Tabla 1), que corresponden al total de ungulados existentes durante el período de muestreo, exceptuando hipopótamos pigmeos y cebras.

Tabla 1. Total de especies incluidas para diagnóstico serológico de infección por *Brucella*.

Nombre común	Nombre científico	Machos	Hembras	Total
Alpaca	<i>Lama pacos</i>	4	9	13
Guanaco	<i>Lama guanicoe</i>	1	2	3
Llama	<i>Lama glama</i>	1	3	4
Pudú	<i>Pudu puda</i>	2	5	7
Camello	<i>Camelus bactrianus</i>	1	1	2
Ciervo Dama	<i>Cervus dama</i>	1	10	11
Ciervo Rojo	<i>Cervus elaphus</i>	1	3	4
Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	4	10	14
Jirafas	<i>Giraffa camelopardalis</i>	1	2	3
Muflon	<i>Ovis aries</i>	3	12	15
Antílope Nyala	<i>Tragelaphus angasii</i>	1	0	1
Antílope Sitatunga	<i>Tragelaphus spekii</i>	1	0	1
Tapir	<i>Tapirus terrestris</i>	1	0	1
Jabalí	<i>Sus escrofa</i>	0	1	1
Total				80

Se obtuvieron muestras de sangre mediante punción venosa con jeringas estériles desechables. La toma de estas muestras fue realizada por profesionales entrenados en el manejo de las distintas especies. Todo esto bajo normas de bioseguridad y bienestar animal utilizados en el zoológico.

Las muestras de sangre se dejaron coagular y posteriormente fueron transportadas al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), en donde se centrifugaron y los sueros obtenidos se guardaron congelados en tubos de 1,5 mL a -20° hasta su utilización. Las muestras se analizaron mediante las pruebas Rosa de Bengala y c-ELISA. Se consideraron las medidas de bioseguridad para diagnóstico serológico, que consisten en la utilización de delantal y guantes, realización de los procedimientos bajo campana de bioseguridad, desinfección de superficies y manos con alcohol 70% antes y después del procedimiento, separación del material utilizado y posterior esterilización en autoclave.

Rosa de Bengala:

Según la técnica descrita en el “Instructivo técnico para el análisis de Rosa de Bengala” del SAG (s.f.a), brevemente, se mezclaron 30 uL de antígeno Rosa de Bengala (Bengatest®) con 30 uL de suero sospechoso sobre una placa de vidrio y se agitaron por 4 minutos. La reacción se leyó sobre aglutinoscopio. Se consideró negativa, una prueba que no presentó aglutinación y la preparación tuviese un color rosa uniforme y translúcido al paso de la luz. Se consideró como positiva, desde una prueba que presentó aglutinación débilmente perceptible con grumos muy finos, hasta aquellas de gruesos grumos, claras bien definidas. Se utilizaron sueros controles bovinos positivos y negativos para verificar la reacción, los cuales son mantenidos en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de FAVET.

ELISA de Competencia:

Se realizó según la técnica descrita por Nielsen *et al.* (1996) que consiste en la utilización de placas NUNC 69620 cubiertas con el antígeno LPS de *Brucella abortus* (diluido 1:1000 con tampón carbonato 0,06 M, pH 9,6). Se incubaron a 4°C por 18 horas. Las placas se lavaron añadiendo aproximadamente 300 uL de Tris-HCl pH 8,0 y con 0,05% de Tween 20, 0,15 M NaCl (tampón de lavado), dejando así el tampón durante unos 10 segundos y luego se eliminó. Este paso se repitió cuatro veces. Luego se llenaron los pocillos con 95 uL de anticuerpo monoclonal M84, elaborado en el Animal Disease Research Institute de Canadá (ADRI, Canadá),

apropiadamente diluido en tampón de lavado, que contenía 3,75 mM de EDTA y EGTA, pH 6,3. Inmediatamente se añadieron 5 uL de suero no diluido a cada pocillo. El control de suero incluyó un suero fuertemente positivo C++, un control conjugado, un suero animal vacunado C+ y un suero negativo C-. Se lavó como antes cuatro veces. Luego se añadió 100 uL de anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (SIGMA) diluido apropiadamente en tampón de lavado sin EDTA/EGTA y se dejó incubar 30 minutos a 25°C. Se lavó como antes cuatro veces, se agregaron 100 uL de solución sustrato/cromógeno en tampón citrato, pH 4,5. Esta solución se realizó adicionando 100 uL de peróxido de hidrógeno al 3% (sustrato) y 500 uL de 40 mM ABTS a 20 mL de tampón citrato, pH 4,5. Todos los reactivos se almacenaron por separado a 4°C, pero se mantuvieron a 25°C antes de su uso. Se agitó con un agitador a 25°C por 10 minutos y luego las placas se leyeron en un espectrofotómetro (BDSL, Inmunoskan Plus) (Figura 1).

Los datos fueron interpretados por el cálculo del porcentaje de inhibición (%I) de la siguiente manera:

$$\%I = 100 - \frac{\text{Absorbancia del suero problema} \times 100}{\text{Absorbancia media de los pocillos de control de conjugado}}$$

Absorbancia media de los pocillos de control de conjugado

A pesar de que la técnica sólo se encuentra validada para el bovino, %I de 35% o más, se consideró reacción positiva (Blank *et al.*, 2002).

Los resultados de los promedios de %I entre especies animales del c-ELISA se analizaron mediante la prueba estadística de Análisis de Varianza (ANDEVA) y Kruskal Wallis, considerando un error $\alpha = 0,05$.

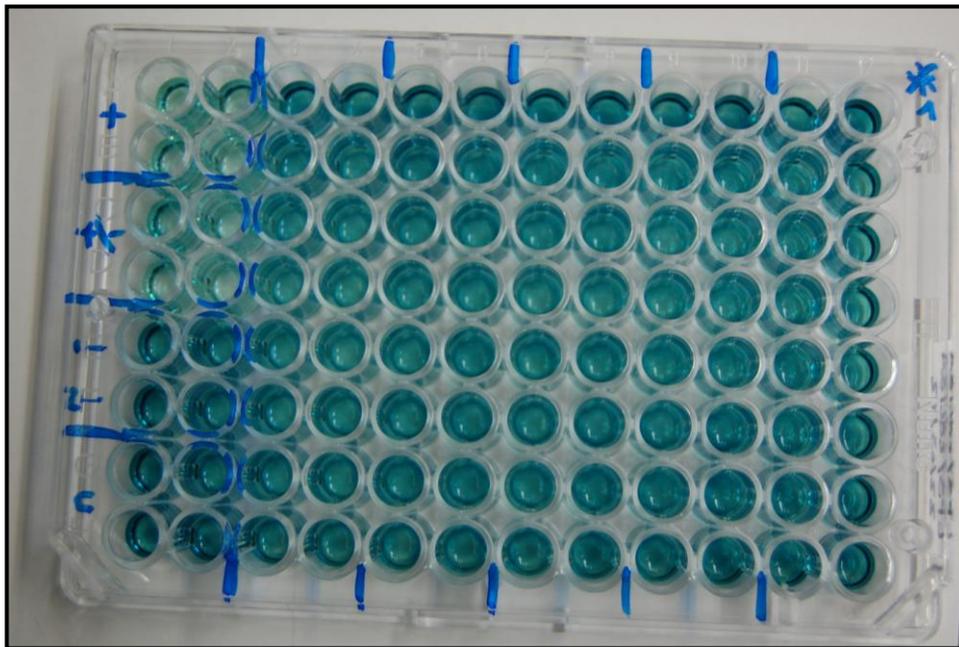


Figura 1. Resultado de una prueba de ELISA de competencia para *Brucella* spp. Los 4 pocillos en la parte superior izquierda, muestran los controles positivos (+), los 4 bajo éste corresponden a animales vacunados (+/-), los 4 siguientes a los controles negativos (-), y finalmente el control conjugado (C). El resto de los pocillos corresponden a 40 de las muestras utilizadas, cada una replicada en dos pocillos continuos.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las pruebas serológicas Rosa de Bengala (RB) y ELISA de competencia (c-ELISA) se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados por individuo para las pruebas RB y c-ELISA para detección de anticuerpos anti-*Brucella*.

N°	Nombre Común	Nombre Científico	Sexo	ID/Nombre	RB	c-ELISA %I
1	Jirafa	<i>Giraffa camelopardalis</i>	M		N	13,8
2	Jirafa	<i>Giraffa camelopardalis</i>	H		N	26,1
3	Jirafa	<i>Giraffa camelopardalis</i>	H		N	26,7
4	Camello	<i>Camelus bactrianus</i>	M	7788, Joe	N	22,3
5	Ciervo Dama	<i>Cervus dama</i>	H	9021	N	17,6
6	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	H	0148	N	12,7
7	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	H	9323	N	21,6
8	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	M	0370	N	3,1
9	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	H	1821	N	14,1
10	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	M	4915	N	23,4
11	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	H	9175	N	22,3
12	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	H	6509	N	22,0
13	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	M	3743	N	18,0
14	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	H	5696	N	21,0
15	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	H	3913	N	18,1
16	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	H	4794	N	3,3
17	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	H	6435	N	11,5
18	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	M	4978	N	20,2
19	Gacela Thomson	<i>Gazella thompsonii</i>	H	6182	N	27,0
20	Antílope Sitatunga	<i>Tragelaphus spekii</i>	M	5573	N	<u>37,5</u>
21	Antílope Nyala	<i>Tragelaphus angasii</i>	M	0493	N	26,2
22	Ciervo Dama	<i>Cervus dama</i>	M	5152	N	23,8
23	Ciervo Dama	<i>Cervus dama</i>	H	3732	N	15,6
24	Ciervo Dama	<i>Cervus dama</i>	H	4859	N	8,4
25	Ciervo Dama	<i>Cervus dama</i>	H	1359	N	12,4
26	Ciervo Dama	<i>Cervus dama</i>	H	3599	N	22,4
27	Ciervo Dama	<i>Cervus dama</i>	H	7805	N	24,9
28	Ciervo Dama	<i>Cervus dama</i>	H	7885	N	24,8
29	Ciervo Dama	<i>Cervus dama</i>	H	6447	N	25,0
30	Ciervo Dama	<i>Cervus dama</i>	H	8619	N	19,2

31	Ciervo Dama	<i>Cervus dama</i>	H	9036	N	10,3
32	Muflón	<i>Ovis aries</i>	H	7692	N	4,2
33	Muflón	<i>Ovis aries</i>	M	6428	N	15,1
34	Muflón	<i>Ovis aries</i>	H	7429	N	29,1
35	Muflón	<i>Ovis aries</i>	H	0813	N	32,5
36	Muflón	<i>Ovis aries</i>	H	3096	N	24,4
37	Muflón	<i>Ovis aries</i>	H	0619	N	27,1
38	Muflón	<i>Ovis aries</i>	H	9765	N	14,6
39	Muflón	<i>Ovis aries</i>	H	5617	N	13,3
40	Muflón	<i>Ovis aries</i>	H	4802	N	11,0
41	Muflón	<i>Ovis aries</i>	M	3854	N	-9,2
42	Muflón	<i>Ovis aries</i>	M	4750	N	9,1
43	Muflón	<i>Ovis aries</i>	H	4885	N	13,3
44	Muflón	<i>Ovis aries</i>	H	6490	N	19,4
45	Muflón	<i>Ovis aries</i>	H	4617	N	15,5
46	Muflón	<i>Ovis aries</i>	H	7263	N	13,3
47	Camello	<i>Camelus bactrianus</i>	H	Mona	N	16,8
48	Alpaca	<i>Lama pacos</i>	H	3121	N	13,9
49	Alpaca	<i>Lama pacos</i>	H	4225	N	3,1
50	Alpaca	<i>Lama pacos</i>	M	5341	N	4,4
51	Alpaca	<i>Lama pacos</i>	H	5612	N	13,0
52	Alpaca	<i>Lama pacos</i>	M	6681	N	21,5
53	Alpaca	<i>Lama pacos</i>	H	2409	N	12,9
54	Alpaca	<i>Lama pacos</i>	M	8531	N	6,4
55	Alpaca	<i>Lama pacos</i>	H	3625	N	5,4
56	Tapir	<i>Tapirus terrestris</i>	M	Manolo	N	-10,5
57	Ciervo Rojo	<i>Cervus elaphus</i>	H	5155	N	0,4
58	Ciervo Rojo	<i>Cervus elaphus</i>	M	8516	N	15,5
59	Ciervo Rojo	<i>Cervus elaphus</i>	H	7216	N	15,5
60	Ciervo Rojo	<i>Cervus elaphus</i>	H	4625	N	<u>39,2</u>
61	Guanaco	<i>Lama guanicoe</i>	H	4008	N	15,5
62	Guanaco	<i>Lama guanicoe</i>	H	1655	N	6,7
63	Guanaco	<i>Lama guanicoe</i>	M	1875	N	10,2
64	Llama	<i>Lama glama</i>	H	9920	N	3,8
65	Llama	<i>Lama glama</i>	H	7182	N	0,2
66	Llama	<i>Lama glama</i>	H	3237	N	8,5
67	Llama	<i>Lama glama</i>	M	8843	N	11,0
68	Pudú	<i>Pudu puda</i>	H	8696	N	15,4
69	Pudú	<i>Pudu puda</i>	H	1154	N	17,4
70	Pudú	<i>Pudu puda</i>	H	7656	N	20,2
71	Pudú	<i>Pudu puda</i>	M	6505	N	7,5

72	Pudú	<i>Pudu puda</i>	H	3174	N	2,9
73	Pudú	<i>Pudu puda</i>	M	6512	N	-4,1
74	Jabalí	<i>Sus escrofa</i>	H		N	19,2
75	Alpaca	<i>Pudu puda</i>	M	2893	N	15,3
76	Alpaca	<i>Lama pacos</i>	H	4008	N	13,2
77	Alpaca	<i>Lama pacos</i>	H	7905	N	17,7
78	Alpaca	<i>Lama pacos</i>	H	5909	N	6,5
79	Alpaca	<i>Lama pacos</i>	H	1007	N	7,3
80	Pudú	<i>Pudu puda</i>	H	0795	N	4,1

RB: Rosa de Bengala

c- ELISA: ELISA de competencia

%I: Porcentaje de inhibición

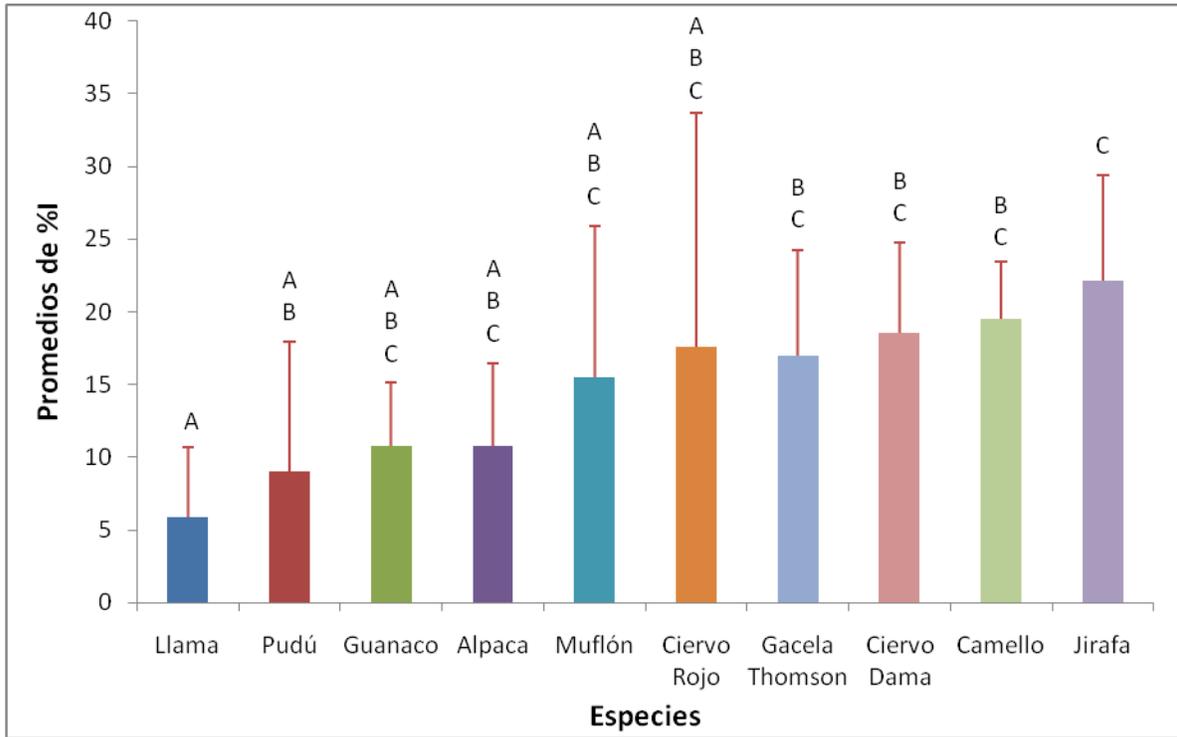
N: Negativo

Como se observa en la tabla anterior, para la prueba RB todas las muestras fueron negativas.

Para la prueba c-ELISA, dos muestras presentaron un porcentaje de inhibición superior al 35%.

El promedio de %I para la población de ungulados fue de 14,8%. Agrupando los resultados por especie, se obtienen promedios que se muestran en la Figura 2.

Según el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre especies ($p < 0,05$), las cuales se detallan también en la Figura 2.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Figura 2. Promedio de %I para la prueba c-ELISA por especie, desviación estándar y análisis estadístico de las medias entre especies.

DISCUSIÓN

La susceptibilidad a infección por *B. abortus* se ha reportado en diversas especies de mamíferos de distintos órdenes taxonómicos (Thorne, 2001). Es por ello que en algunos países se ha estudiado la importancia de transmisión de la infección desde fauna silvestre a ganado doméstico.

En Chile, existe un Plan de Erradicación de la Brucelosis Bovina desde 1991. Realizándose desde entonces una constante vigilancia epidemiológica (SAG, s.f.). Como la atención principal se enfoca en el ganado bovino, es importante obtener información sobre lo que ocurre con las diversas especies de animales no domésticos, que pueden actuar como reservorios de esta enfermedad, tanto para animales productivos como para el humano, así como también para ellos mismos.

Las técnicas utilizadas en este trabajo son las oficiales en Chile para el diagnóstico de la brucelosis bovina, no estando validado su uso en otras especies. Siendo RB la prueba tamiz cuyo resultado positivo debe ser confirmado por CFT o c-ELISA (Abalos, 2010).

Los resultados para ambas técnicas fueron similares. Para RB todas las muestras fueron negativas. Sin embargo, con el c-ELISA, dos muestras presentaron un I% mayor a 35 (siendo de 37,5% y 39,2%), acercándose a la línea de corte +/- recomendada para el bovino. Estos resultados deben ser analizados con cautela, ya que como se ha mencionado, la prueba no está validada en otras especies, variando en los distintos países. Se debe considerar además, la probabilidad de reacciones cruzadas con otras bacterias, que podrían haber generado falsos positivos, como *Yersinia enterocolitica* O:9, debido a la similitud de su LPS con el de *Brucella* (Corbel, 2006).

Las muestras mayores a 35% corresponden a un antílope Sitatunga macho juvenil y a un ciervo rojo hembra adulta. El antílope es el único de su especie en el recinto, a diferencia del ciervo rojo que convive con 3 individuos más. No presentando ninguno de ellos registros de signología clínica asociada a la patología.

El promedio de %I para la población de ungulados fue de 14,8%, los resultados fluctuaron desde -10,5% hasta 39,2%. En el análisis estadístico de los promedios por especie, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$).

Del análisis estadístico se puede inferir que hay variación en cuanto a la expresión de anticuerpos entre las distintas especies, sin embargo, esto no significa que alguna presente

infección o haya tenido contacto con el agente causal. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios que permitan validar éstas u otras pruebas de diagnóstico, para así analizar de manera más certera el estado sanitario de las especies no domésticas en nuestro país.

Es primera vez que se realiza un estudio poblacional en el zoológico, por lo que no se puede hacer un análisis comparativo de los resultados. Sin embargo, la información obtenida resulta valiosa para generar una base de datos confiable tanto para el recinto como tal, así como para futuros estudios que involucren a las especies presentes en este trabajo.

Los resultados son similares a lo observado en otros estudios en diferentes especies de animales no domésticos en cautiverio, en donde hay bajas o nulas prevalencias (Olivares *et al.*, 1993). A diferencia de especies de vida silvestre, en donde las prevalencias varían marcadamente; por ejemplo en los ya mencionados bisonte americano y ciervo rojo quienes son verdaderos reservorios de infección en EEUU (Olsen, 2010). O por el contrario, estudios con resultados negativos como en tapires (Furtado *et al.*, 2010), corzuela parda (Deem *et al.*, 2004) rinocerontes (Fischer-Tenhagen *et al.*, 2000), entre otros.

Debido a que la prueba de RB es económica, entrega resultados inmediatos, es fácil de realizar y permite analizar una gran cantidad de muestras; resultaba de gran importancia comparar los resultados de ambas técnicas. Con estos resultados, se puede considerar que las pruebas serológicas utilizadas fueron concordantes, pudiendo utilizarse RB como prueba confiable para medir seroprevalencia en especies de ungulados distintas al bovino. Con este trabajo también se puede sugerir que la población estudiada no ha tenido exposición a *Brucella* spp. y por lo tanto, se encuentra libre de brucelosis.

REFERENCIAS

ABALOS, P. 2010. Brucelosis. **In:** Retamal, P.; Abalos, P.; Fredes, F. Enfermedades animales producidas por agentes biológicos. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. pp 33-37.

BLANK, O.; RETAMAL, P.; ABALOS, P.; TORRES, D. 2002. Detección de anticuerpos Anti-*brucella* en focas de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) de Cabo Shirref, Antártica. Arch. Med. Vet. 34: 117-122.

CARDOSO, P. G.; MACEDO, C. G.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. 2006. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. Microbial Cell Fact. 5:13.

CFSPH. 2009. CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH. Brucelosis. [en línea] <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucelosis.pdf>> [consulta: 09-02-2011]

CORBEL, M. J. 2006. Brucellosis in humans and animals. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 24 p.

DE LISLE, G.; MACKINTOSH, C.; BENGIS, R. 2001. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20: 86-111.

DEEM, S.L.; NOSS, A.J.; VILLARROEL, R.; UHART, M.M.; KARESH, W.B. 2004. Disease survey of free-ranging grey deer (*Mazama gouazoubira*) in the Gran Chaco, Bolivia. J. Wildl. Dis. 40 (1): 92-8.

FISCHER-TENHAGEN, C.; HAMBLIN, C.; QUANDT, S.; FRÖLICH, K. 2000. Serosurvey for selected infectious disease agents in free-ranging black and white rhinoceros in Africa. J Wildl Dis 36 (2): 316-23.

FURTADO, M. M.; JACOMO, A. T.; KASHIVAKURA, C. K.; TORRES, N. M.; MARVULO, M. F.; RAGOZO, A. M.; DE SOUZA, S. L.; NETO, J. S.; VASCONCELLOS,

S. A.; MORAIS, Z. M.; CORTEZ, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SILVA, J. C.; SILVEIRA, L. 2010. Serologic survey for selected infectious diseases in free-ranging Brazilian tapirs (*Tapirus terrestris*) in the cerradoof central Brazil. *J Zoo Wildl Med*, 41 (1): 33-136.

GIDLEWSKI, T; CHEVILLE, N.F; RHYAN, J.C; MILLER, L.D; GILDSDORF, M.J. 2000. Experimental *Brucella abortus* induced abortion in a llama: Pathologic Effects. *Vet. Pathol* 37: 77-82.

GODFROID, J. 2002. Brucellosis in wildlife. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 21: 277-86.

GODFROID, J.; NIELSEN, K.; SAEGERMAN, C. 2010. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian Med. J.* 51: 296-305.

KREEGER, T.; COOK, W.; EDWARDS, W.; CORNISH, T. 2004. Brucellosis in captive rocky mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis*) caused by *Brucella abortus* Biovar 4. *J. Wild. Dis.* 40: 311–315.

MACKINTOSH, C.; HAIGH, J.; GRIFFIN, F. 2002. Bacterial diseases of farmed deer and bison. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 21: 249-263.

MUSA, M.; EISA, M.; EL SANOUSI, E.; ABDEL WAHAB, M.; PERRETT, L. 2008. Brucellosis in camels (*Camelus dromedarius*) in Darfur, Western Sudan. *J. Comp. Path.* 138: 151–155.

NIELSEN, K.; GALL, D.; KELLY, W.; VIGLIOCCO, A.; HENNING, D.; GARCIA, M. 1996. Immunoassay development: Application to enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis. Agriculture and Agri-Food Canada. Ontario, Canada. pp 8.1-8.7 (Version II).

OLIVARES, R.; RIVERO, V.; PINOCHET, L. 1993. Brucelosis: estudio serológico en animales de un zoológico. *Arch. Med. Vet.* 25 (1): 101-105.

OLSEN, S. C. 2010. Brucellosis in the United States: role and significance of wildlife reservoirs. *Vaccine* 28S: F73-F76.

ROJAS, X.; MUÑOZ, S.; OTTO, B.; PÉREZ, B.; NIELSEN, K. 2004. Utilización de los test de Fluorescencia Polarizada (FP) y Elisa de Competencia (C-Elisa) en el diagnóstico de brucelosis de camélidos. *Arch. Med. Vet.* 26, N° 1. [en línea] <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2004000100006&script=sci_arttext> [consulta: 01-07-2011]

SAG. Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. 2013. RESOLUCIÓN EX. N° 498 - MINISTERIO DE AGRICULTURA, Servicio Agrícola y Ganadero. [en línea] <http://www.legalpublishing.cl/contenidolp/AgAduana/01_Doc_Rec_Publicacion/05_Doctos_Organismo/Resol_0498_20130131_Min%20Agric-SAG.htm> [consulta: 10-04-13]

SAG. Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. s.f. a. Etapas y resultados de los proyectos de control y erradicación de brucelosis bovina 1975 – 2006. [en línea] <<http://historico.sag.gob.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedData=GP1TkTXdhRJAS2Wp3v88hC5eGTZT9I9FR6XKPmjAB0k%3D&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivoId=33001>> [consulta: 04-12-2012]

SAG. Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. s.f. b. Instructivo técnico para el análisis de Rosa de Bengala. [en línea] <http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/7_INSTRUCTIVO_TECNICO_ROSA_BENGALA.pdf> [consulta: 04-12-2012]

THORNE, T. 2001. Brucellosis. **In:** Williams, E.; Barker, I. *Infectious Diseases of Wild Mammals*. 3rd Ed. Iowa State University Press, Ames, IA. pp 372-396.

VAN CAMPEN, H.; RHYAN, J. 2009. The role of wildlife in diseases of cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26: 147-61.