



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS.**



**DESCRIPCIÓN DE LESIONES PULMONARES OBSERVADAS
EN EL ESTUDIO RADIOGRÁFICO SIMPLE EN LOBO
MARINO (*Otaria flavescens*); Y EL DIAGNÓSTICO DE
TUBERCULOSIS PULMONAR POR PCR**

VALENTINA ROJAS SANTANA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: JORGE MENDOZA ANTUNEZ

**SANTIAGO – CHILE
2011**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS.



**DESCRIPCIÓN DE LESIONES PULMONARES OBSERVADAS
EN EL ESTUDIO RADIOGRÁFICO SIMPÑE EN EL LOBO
MARINO (*Otaria flavescens*); Y EL DIAGNÓSTICO DE
TUBERCULOSIS PULMONAR POR PCR**

VALENTINA ROJAS SANTANA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: JORGE MENDOZA ANTUNEZ
PROFSOR CONSEJERO	: PATRICIO RETAMAL MERINO
PROFESOR CONSEJERO	: GINO CATTANEO UNIVASO

**SANTIAGO – CHILE
2011**

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá porque sin ella no podría haber llegado hasta aquí, por su esfuerzo, enseñanzas y por su alegría de vivir.

A mi papá por su apoyo directo en esta memoria y por su confianza plena en que soy capaz de conseguir lo que me proponga en la vida.

A mi hermana por ser mi compañera en los buenos y malos momentos.

A Pablo por su apoyo incondicional, por sus conocimientos, cariño e infinita paciencia.

Al Dr. Hernán Barrios, por trabajar codo a codo para lograr sacar a adelante este estudio, por compartir sus conocimientos todos estos años y por confiar en mi como profesional y persona.

Al Dr. Jorge Mendoza, por guiarme en la memoria, por su voluntad por ayudar y hacer lo mejor para y por mí.

Al Dr. Patricio Retamal por la ayuda necesaria para realizar esta memoria de título y por la buena disposición siempre.

Y a todos aquellos que forman parte de mi vida y que han contribuido a que me convierta en una buena profesional, y por sobretodo en una buena persona.

RESUMEN

Con el fin de pesquisar y describir las lesiones pulmonares en Lobos marinos (*Otaria flavescens*), se realizó un estudio radiográfico simple de tórax a 20 ejemplares cachorros y juveniles. También se realizaron lavados traqueales para la obtención de muestras que fueron analizadas para la búsqueda de bacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, mediante la prueba de Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), con el objetivo de investigar la presencia de tuberculosis pulmonar. Para ambos estudios los animales se encontraban bajo anestesia general mediante la utilización de Isoflurano, con buena respuesta a la inducción y recuperación. Se logró estandarizar la técnica radiográfica, kVp y mAs, y se extrapoló técnica de lavados traqueales de caninos a lobos marinos.

Los resultados mostraron que 11 animales (55%) presentaban algún tipo de lesión pulmonar, en 10 individuos (50%) se observó un infiltrado del parénquima pulmonar, en 5 de ellos este infiltrado es de tipo difuso, mientras que en los 5 restantes es de tipo celular. En cuanto a la presencia de broncogramas aéreos positivos (BAP), éste estuvo presente en 9 de los individuos en estudio (45%). En lo referente a la prueba de PCR, ésta arrojó resultados negativos en la totalidad de los animales, probablemente, debido a que los animales no se hayan encontrado infectados con alguna bacteria del complejo *M. tuberculosis*.

Palabras claves: *Otaria flavescens*, PCR, lesiones pulmonares, tuberculosis.

ABSTRACT

With the aim of finding and describing lung injuries in sea lions (*Otaria flavescens*) a simple thoracic radiographic investigation was conducted in 20 cubs and young specimens. Tracheal washes were also performed to obtain samples that were analyzed searching for *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria, using Polymerase Chain Reaction tests (PCR), in order to investigate the presence of Pulmonary Tuberculosis (TB). In both cases, animals were under general anesthesia using isoflurane, with good response to induction and normal recovery of the individuals. The radiographic technique, kVp and mAs were standardized and tracheal washing technique was extrapolated from canine to sea lions.

The results indicated that 11 animals (55%) showed some type of lung injury. In 10 specimens (50%) infiltrated lung parenchyma was observed, in 5 of them this infiltrate was diffuse type, while the 5 remaining was cell type. In relation to presence of air bronchograms (BAP), this was present in 9 of the specimens under study (45%). In terms to PCR tests, the results were negative in all animals, probably due to the fact that the animals were not actually infected with bacteria of the *M. tuberculosis* complex.

Keywords: *Otaria flavescens*, PCR, lung injury, tuberculosis.

ÍNDICE

	Página
> INTRODUCCIÓN	1
> REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
> OBJETIVOS	21
> MATERIAL Y MÉTODO	22
> RESULTADOS	28
> DISCUSIÓN	35
> CONCLUSIONES	38
> BIBLIOGRAFÍA	39

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa provocada por diversas bacterias del género *Mycobacterium*, la cual provoca una patología de múltiples manifestaciones, siendo la más común aquella que afecta los pulmones, pudiendo también afectar otros sistemas y órganos.

Infecta a una gran variedad de especies animales, mayormente mamíferos, incluido el ser humano, y algunas aves y reptiles.

La manifestación clínica más importante de la infección por *Mycobacterium* en lobos marinos es aquella que afecta al sistema respiratorio provocando lesiones pulmonares. Por este motivo una de las pruebas que proporciona información diagnóstica es la radiografía de tórax.

En este estudio se evaluó la presencia de la tuberculosis en el Lobo Marino (*Otaria flavescens*), perteneciente al orden de los pinnípedos. En estos animales se hicieron pruebas radiográficas de tórax a fin de pesquisar lesiones pulmonares, y también se realizaron lavados traqueales para la obtención de muestras que fueron analizadas para la búsqueda de bacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, mediante la prueba de Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR).

La tuberculosis en mamíferos marinos ha ido tomando gran importancia en la investigación científica durante los últimos años. Sin embargo, no existen registros sobre la incidencia y/o prevalencia de tuberculosis en lobos marinos. Sólo se dispone de algunos estudios de casos en diversos lugares del planeta. Por esta razón la presente memoria de título pretende aportar información para futuras investigaciones sobre tuberculosis en mamíferos marinos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Otaria flavescens

Generalidades.

El lobo marino sudamericano (*Otaria flavescens*) es un mamífero marino perteneciente a la familia Otariidae, que se encuentra dentro de la superfamilia Pinnipedia (Berta, 2008) (Cuadro 1).

CUADRO 1
TAXONOMÍA *O. flavescens*

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Subfilo	Vertebrata
Clase	Mammalia
Subclase	Theria
Infracase	Placentalia
Orden	Carnivora
Suborden	Caniformia
Superfamilia	Pinnipedia
Familia	Otariidae
Subfamilia	Otariinae
Género	Otaria
Especie	<i>Otaria flavescens</i>

Los Pinnípedos son un grupo de mamíferos acuáticos, los cuales son reconocidos como mamíferos carnívoros. Dentro de éstos se incluyen tres familias: Otariidae (lobos marinos

de dos pelos y lobos marinos de un pelo), Odobenidae (morsas) y Phocidae (focas) (Berta, 2008).

Los lobos marinos evolucionaron en la costa del Océano Pacífico Norte hace 11 – 12 millones de años, para luego desplazarse hacia el hemisferio Sur hace cerca de 3 millones de años, donde se separaron evolutivamente de las focas. La diferencia entre ambos se distingue en su pelaje, los lobos marinos poseen un pelaje simple, mientras que las focas tienen una capa de pelo rígido de protección que emerge desde una densa y gruesa capa de pelo fino que repele el agua, proporcionándoles así un sistema de termorregulación (Gentry, 2008).

Existen siete especies de lobos marinos dentro de cinco géneros, con un género exclusivo del hemisferio Norte (*Eumetopias jubatus*), uno que se encuentra en ambos hemisferios (*Zalophus californianus* y *Z. japonicus* en el Norte y *Z. wolfebaeki* en el Sur) y tres géneros solamente en el hemisferio Sur (*Otaria flavescens*, *Neophoca cinerea* y *Phocarctos hookeri*) (Berta, 2008).

Distribución y Estado de Conservación.

En Chile se encuentran 51 especies de mamíferos marinos, un 36 por ciento de la diversidad mundial, con representantes en tres grupos: cetáceos, nutrias y pinnípedos (lobos marinos y focas) (Capella, 2008).

El lobo común *Otaria flavescens* es la especie más frecuente en el litoral chileno, distribuyéndose desde el norte del Perú hasta el Cabo de Hornos y por el Atlántico hasta el sur de Brasil (Sielfeld, 1999).

El estado sobre el conocimiento de estas especies es, en general, incompleto e insuficiente. Ello es especialmente válido en lo concerniente a biología reproductiva y dinámica poblacional, donde los esfuerzos de estudio de los últimos años se han centrado fundamentalmente en estimaciones de los tamaños poblacionales. El litoral chileno continental alberga actualmente alrededor de 121.000 lobos marinos comunes y 105.000 lobos finos australes (Sielfeld, 1999).

En Chile el Servicio Nacional de Pesca es la entidad pública encargada de controlar el cumplimiento de la normativa pesquera, acuícola, sanitaria y ambiental, así como los acuerdos internacionales que regulan la actividad, con el fin de conservar los recursos hidrobiológicos y contribuir a asegurar el desarrollo sustentable del sector (SERNAPESCA, 2006).

La Ley General de Pesca y Acuicultura de 1991, considera a los mamíferos marinos como recursos factibles de ser explotados bajo condiciones especiales y define una serie de normas de carácter administrativo. En virtud de esta Ley el Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción publica en el Diario Oficial el Decreto Exento N° 225 del 09 de Noviembre de 1995 que establece una veda extractiva de 30 años para mamíferos, aves y reptiles, donde se excluye al lobo marino común (*Otaria flavescens*) cuya administración es regulada a través de sucesivos decretos que establecen vedas extractivas de 5 años. Luego, el Decreto Exento N° 765 del 27 de Septiembre de 2004 establece una veda extractiva para el lobo marino común, en todo el litoral chileno por un periodo de 5 años a contar del 30 de Septiembre de 2004 (FIP, 2006).

La situación actual respecto a la caza y captura de *Otaria flavescens* establece una veda extractiva para el recurso Lobo marino común (*Otaria flavescens*), en todo el litoral del país, por el término de 3 años, a contar del 18 de diciembre de 2009. También establece un

área y cuota de extracción racional de Lobo marino común a ser capturados por la comunidad Kawashkar o Alacalufe residente en Puerto Edén, XII Región (Chile, 2009).

Se permite la captura de ejemplares vivos de Lobo marino común (*Otaria flavescens*) para su mantención en cautiverio, siempre que sea efectuada con fines de exhibición pública en zoológicos, acuarios o centros de exhibición no itinerantes ubicados en el territorio nacional. En todo caso, el número de ejemplares capturados de conformidad con lo anterior no podrá exceder de un máximo de 10 en un período de un año (Chile, 2009).

Tuberculosis en Mamíferos Marinos.

La tuberculosis es una patología infecciosa producida por diversas bacterias, bacilos ácido alcohol resistentes, del género *Mycobacterium*, siendo las más comunes las del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), pudiendo afectar a variadas especies animales incluido el ser humano. El complejo *M. tuberculosis* tradicionalmente está compuesto por cuatro miembros: *M. tuberculosis* que afecta primariamente a humanos y simios; *M. bovis*, que causa principalmente tuberculosis en ganado, pero que puede también causar la enfermedad en una amplia variedad de otros animales, incluido el ser humano; *M. africanum*, un grupo heterogéneo de aislados responsables de tuberculosis humana en África; *M. microti*, un patógeno poco frecuente que tradicionalmente causa tuberculosis en ratas (Cuadro 2). Cada miembro del complejo *M. tuberculosis* es asociado a un hospedero primario específico (Cousins *et al.*, 2003; Uneyama y Mori, 2007).

CUADRO 2

TAXONOMÍA DE LOS AGENTES CAUSANTES DE TUBERCULOSIS.

Reino	Bacteria
Filo	Actinobacteria
Clase	Actinobacteria
Subclase	Actinobacteridae
Orden	Actinomycetales
Suborden	Corynebacterineae
Familia	Mycobacteriaceae
Género	Mycobacterium
Especies	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. Bovis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. Microti</i> , <i>M. canettii</i> , <i>M. Caprae</i> , <i>M. pinnipedii</i>

Adaptado de Tuberculosis 2007 (Palomino *et al.*, 2007).

Las bacterias del género *Mycobacterium* son bacilos no-móviles y no esporulados. Éstos se agrupan en el orden Actinomycetales los cuales, inusualmente, tienen un alto contenido (61 – 71%) de guanina más citosina (G – C) en su ADN, y un alto contenido de lípidos en su pared, probablemente el más alto dentro de todas las bacterias. La capa serosa que envuelve a las micobacterias les confiere las características idiosincrásicas del género: ácido-alcohol resistentes, hidrofobicidad extrema, resistencia a la injuria, entre ellas a muchos antibióticos, y las propiedades inmunológicas. Esto, probablemente, también contribuye la tasa de crecimiento de algunas especies, limitando la absorción de nutrientes (Barrera, 2007).

Entre 1986 y 2000 se aislaron bacterias del complejo *M. tuberculosis* desde mamíferos marinos en cautiverio en Australia, Sudamérica, Gran Bretaña y Nueva Zelanda, las cuales

fueron identificadas como un único miembro del complejo *M. tuberculosis*, distinto a las cuatro especies ya identificadas (Cousins *et al.*, 2003). Esta nueva especie ha sido aislada e identificada como *Mycobacterium pinnipedii*, y afecta al menos a 7 especies de pinnípedos que habitan el hemisferio Sur del planeta, dentro de los cuales se incluye a *O. flavescens* (EAAM, 2009). Los pinnípedos parecen ser el hospedero natural de este bacilo aunque la bacteria es también patógena en cobayos, conejos, humanos, tapir brasileño, y, posiblemente, en el ganado. Así como otros miembros del complejo *M. tuberculosis*, la ruta de transmisión más importante son los aerosoles (Cousins *et al.*, 2003; Forshaw y Phelps, 1991).

Signos y síntomas

Los síntomas de la infección por *M. pinnipedii*, en el lobo marino, son inespecíficos como pérdida de peso, tos y anorexia, aunque a menudo no aparecen síntomas incluso cuando la enfermedad se encuentra en estados avanzados (EAAM, 2009).

Se encontraron lesiones pulmonares en la mayoría de los casos en los que *M. pinnipedii* fue aislado. Sin embargo, la tos no es un signo característico de la enfermedad en estos animales. La infección diseminada afecta a hígado, bazo, riñones, páncreas, meninges y también se describe que afecta a linfonódulos bronquiales, mesentéricos, colónicos y duodenales (Kiers *et al.*, 2008). La infección causada por este bacilo es predominantemente asociada con lesiones granulomatosas en linfonódulos periféricos, pulmón, pleura, bazo y peritoneo (Cousins *et al.*, 2003). Se han observado lesiones fibrogranulomatosas y piogranulomatosas en pulmones, pleura, linfonódulos y bazo (Forshaw y Phelps, 1991). La distribución de las infecciones extrapulmonares es la siguiente: 27.5 % linfáticas, 23.4 % pleurales, 12.7% genitourinarias, 36.4% otras (Cawthorn, 1994).

Métodos diagnósticos

La identificación del rol de las enfermedades bacterianas en mortalidades de mamíferos marinos silvestre, puede verse afectada por múltiples factores. Las enfermedades bacterianas debilitantes incrementan la probabilidad de que los individuos afectados sean predados, lo que resulta en una subevaluación de las mortalidades de animales. Por otra parte, la colonización post mortem de órganos en animales muertos varados, por parte de la microflora gastrointestinal, ambiental y/o superficial, puede llevar a posibles diagnósticos errados, y la subsecuente sobre representación de mortalidades asociadas a estas bacterias. La obtención de bacterias patógenas desde un animal muerto, no prueba que las bacterias recuperadas son las causantes de la muerte del animal (Dunn *et al.*, 2001).

La detección de tuberculosis en las especies de zoológicos apunta a dos niveles: el primer nivel es el destinado a proteger al personal del zoológico (veterinarios y personal de manejo animal) y al público de la contaminación zoonótica. Para esto es necesario un diagnóstico de tuberculosis mediante la detección de algún bacilo perteneciente al complejo *M. tuberculosis*, en muestras obtenidas desde el tracto respiratorio (Tuberculosis pulmonar) o desde otro sistema u órgano (Tuberculosis extrapulmonar) (De Waard y Robledo, 2007). Algunas herramientas actuales, como el PCR, apuntan a este propósito, enfocándose en la fase activa de la enfermedad (excreción). El segundo nivel hace referencia al censo de individuos con la enfermedad latente y el monitoreo de éstos. Para esto puede ser de ayuda un test dérmico (por ejemplo prueba de tuberculina) que mida la inmunidad mediada por células (EAZWV, 2010) (Cuadro 3).

CUADRO 3

MÉTODOS ACTUALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

MÉTODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Signos clínicos	Diagnóstico rápido	No específico, no conclusivo No siempre presentes
Rayos X	Fácil disponibilidad	No específico o conclusivo
Microscopía (tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes)	Bajo costo Diagnóstico rápido	Baja sensibilidad (sobre 2/3 de los casos de TB pulmonar resultan negativos) Dificultad en la obtención de muestras
Cultivo	Específico	Tiempo consumido (sobre 4 – 8 semanas) No siempre posible de realizar
PCR	Relativamente rápido Muy específico	Relativamente costoso Se requiere un alto nivel de entrenamiento Instrumentación costosa Puede detectar enfermedad latente
BACTEC	Específico	Lento, 2 – 3 semanas Costoso
Kit test ELISA para Tuberculosis	Rápido (tiempo de procedimiento: 110 min) Reproducibile Bajo entrenamiento	Se requieren algunos equipos
Test rápidos	Muy rápido (tiempo de procedimiento: 15 min) Mínimo entrenamiento No requiere equipamiento específico	Baja sensibilidad comparado con los kit de test ELISA Sin resultados cuantitativos

Adaptado de Tuberculosis 2007 (Palomino *et al.*, 2007).

Diagnóstico por imágenes de tuberculosis

Entre las técnicas de imágenes, la radiografía y tomografía computarizada (CT) pueden ser de gran ayuda, pero como consecuencia de ser una técnica interpretativa depende de la experiencia del radiólogo. Estudios radiográficos seriados en el tiempo, son preferibles a un solo estudio. El radiólogo debe tener conocimientos claros sobre la anatomía torácica radiológica de los pinnípedos. En la radiografía debe inspeccionarse el campo pulmonar y en lo posible observar linfonódulos torácicos y abdominales, los que no son visibles normalmente. La CT es de mayor utilidad que los rayos X para evidenciar pequeños linfonódulos o lesiones pulmonares intraparenquimales. En una radiografía sospechosa de tuberculosis se espera encontrar un patrón miliar (EAAM, 2009).

Reacción de la Polimerasa en cadena (PCR)

El PCR es un método que incrementa eficientemente el número de moléculas de una forma logarítmica y controlada. Cuando una molécula de ADN es sometida al calor, los puentes de hidrógenos que mantienen unida la doble hélice son rotos y la molécula se separa o denatura en hebras simples. Si la solución de ADN se enfría, los pares de bases complementarias se reordenan para restaurar la doble hélice original. Para hacer un PCR es necesario conocer el área de interés (la zona blanco a ser amplificada), información necesaria para diseñar los partidores, que complementan las secuencias que flanquean la zona blanco (Pestana *et al.*, 2010a).

El marcador genético más utilizado para epidemiología molecular de tuberculosis es la secuencia de inserción IS6110 la cual es un elemento genético móvil presente exclusivamente en el genoma de los miembros del complejo *M. tuberculosis*. A menudo se ha encontrado que aislados de *M. bovis* presentan una sola copia de la secuencia IS6110,

mientras que las bacterias aisladas desde focas, tal como *M. tuberculosis*, presentan varias copias de esta secuencia (Zumárraga *et al.*, 1999).

La prueba de PCR puede realizarse en varias muestras como esputos, lavados gástricos y fluidos traqueales (obtenidos de lavados endotraqueales) (Woods *et al.*, 1995). El PCR se ve alterado por heparina y su eficiencia es reducida en algunos tejidos como los pulmones. Es esencial inspeccionar los linfonódulos mediastinales y mesentéricos en las necropsias, a fin de obtener muestras, incluso si son de difícil acceso en algunos animales (EAAM, 2009).

La muestra de esputo debe ser de al menos 1mL de volumen. Para tomar la muestra para PCR se requiere de una tórula estéril para obtener el esputo/moco/descarga y éste debe ser puesto en un tubo estéril. La saliva obtenida desde el hocico puede dar resultados positivos, pero los animales muestreados más profundamente tienen mayores posibilidades de dar resultados positivos incluso cuando la eliminación de la bacteria es baja (EAAM, 2009).

La mejor muestra para realizar un PCR se obtiene en la necropsia de los linfonódulos (especialmente mediastinal, traqueobronquial, gástrico y mesentérico). Un resultado positivo en muestras de esputo en frotis, PCR o cultivo tiene un fuerte valor diagnóstico (EAAM, 2009).

PCR en tiempo real

El PCR en tiempo real tiene la ventaja de medir las amplificaciones desde las etapas tempranas del PCR, las cuales son guardadas en un modo de “detección en tiempo real” que detecta y cuantifica los productos amplificados en cada ciclo del proceso de PCR, que son directamente proporcionales a la suma de los templados de ADN antes de comenzar el PCR (Pestana *et al.*, 2010b).

Estudio Radiográfico de Tórax

Anatomía topográfica de tórax

La anatomía general de los mamíferos marinos se estudia en comparación a los mamíferos terrestres, y en particular comparando con el ser humano y el perro. El diafragma de muchos de los mamíferos marinos tiene, generalmente, una orientación similar al del perro. Éste se encuentra en forma transversal conformando una lámina músculo-tendinosa que separa la cavidad torácica de la abdominal, con su porción ventral más craneal que la porción dorsal, generalmente coincide con un septo transversal, uniéndose en su extremo ventral al esternón (figura 1) (Rommel y Lowenstine, 2001). El diafragma es atravesado por estructuras vasculares como la aorta, que cruza en una posición dorsal y central; la vena cava caudal que cruza más ventral que la aorta y ligeramente a la izquierda de la línea media, aunque aparece cerca del centro del hígado; y el esófago que cruza ligeramente a la derecha de la línea media. (Rommel y Lowenstine, 2001).

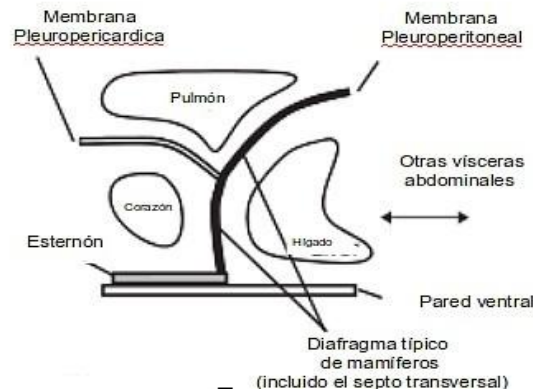


Figura 1. Posición del diafragma en *O. flavescens*

Adaptado de la Encyclopedia of Marine Mammals, Segunda Edición (Rommel y Lowenstine, 2001).

Existe una estructura que está asociada con el sistema circulatorio en focas y lobos marinos, atípica en mamíferos terrestres, localizada en la parte craneal al diafragma. Este es un esfínter muscular de la vena cava caudal, el cual puede regular el flujo de sangre oxigenada en los grandes senos venosos hepáticos hacia el corazón durante las inmersiones (Reinolds *et al.*, 2002).

El corazón ocupa una posición ventral en el tórax, inmediatamente dorsal al esternón. En muchos mamíferos marinos el corazón es aplanado de ventral a dorsal, adquiriendo un aspecto grueso y de poca altura, con un ápice redondeado que le da un aspecto diferente al corazón de los mamíferos terrestres. (Rommel y Lowenstine, 2001).

En pinnípedos la aorta ascendente es dilatada, formando lo que se conoce como bulbo aórtico. El bulbo aórtico puede adaptarse al volumen sistólico eyectado por el corazón, y es más distensible que la aorta distal. Esto tiene como propósito actuar como un amortiguador, lo que se conoce como efecto Windkessel, que consiste en la contracción gradual del bulbo debido a la elongación de las fibras elásticas en la pared lo que contribuye a la mantención del flujo sanguíneo, especialmente al cerebro y corazón, durante el extenso diástole en inmersiones prolongadas (Ponganis, 2001).

La cavidad pleural y los pulmones se encuentran dorsal y lateral al corazón. La lobación en los pinnípedos es similar a la de los perros, el pulmón izquierdo está conformado por dos lobos: el lobo craneal (con una porción craneal y otra caudal) y el lobo caudal; el pulmón derecho con cuatro lobos: craneal, caudal, medio y accesorio. Las vías respiratorias terminales están reforzadas ya sea con cartílago o músculo, en todos los mamíferos marinos. En otáridos la bifurcación de la tráquea dentro del bronquio principal toma lugar en la entrada del tórax y no en el hilio pulmonar como es el caso de los fócidos y cetáceos (Reinolds *et al.*, 2002).

El mediastino es considerado como el área entre los pulmones, excluyendo al corazón y al pericardio. Éste contiene vasos mayores que provienen del corazón, nervios (ej. nervio frénico); y linfonódulos mediastinal y traqueobronquial (Reinolds et al., 2002). El mediastino es delgado y completo en los pinnípedos (Rommel y Lowenstine, 2001).

Anatomía radiológica de tórax

Para interpretar una radiografía es fundamental poseer un conocimiento de la anatomía radiográfica del animal. Además hay que tener en cuenta que las radiografías muestran estructuras en dos dimensiones. Por lo tanto al interpretar signos radiográficos hay que tener en consideración la anatomía tridimensional del tórax (Douglas y Williamson, 1963; Suter y Lord, 1971; Myer y Bonagura, 1982).

Tal como la anatomía general de los mamíferos marinos se estudia en comparación a los mamíferos terrestres, y en particular con el perro, la anatomía radiográfica sigue la misma norma (Rommel y Lowenstine, 2001). El diagnóstico eficiente de las enfermedades torácicas caninas se basa en la identificación de los indicadores radiográficos de enfermedades (IREs) torácicos individuales e interpretación de sus patrones. De igual importancia es, sin embargo, identificar las variantes normales anatómicas y fisiológicas que pueden mimetizar enfermedades torácicas (Farrow, 2003).

Dentro de las variantes normales anatómicas se encuentran, por ejemplo, el engrosamiento del mediastino craneal por grasa que puede ser confundido con un linfoma o timoma; el pezón de la glándula mamaria que puede confundirse con un nódulo pulmonar; o pliegues cutáneos que se confunden con fluido pleural (Farrow, 2003).

En cuanto a las variantes fisiológicas que pueden interpretarse como IREs torácicos, las radiografías en espiración pueden mimetizar varias enfermedades cardíacas y pulmonares , como son la insuficiencia cardíaca congestiva y la neumonía. Debido a la reducción de volumen pulmonar durante la espiración, incrementa la tasa corazón-tórax, haciendo que el corazón parezca falsamente aumentado de tamaño. Durante la anestesia general la mitad superior del pulmón se sobre insufla para compensar el volumen perdido de los lobos inferiores, como consecuencia de ello se produce un giro del corazón y un incremento de la densidad pulmonar (Farrow, 2003).

También es posible que variantes posturales se confundan con IREs, como es el caso de un posicionamiento oblicuo del paciente que hace que el corazón parezca más alto y redondo, y a menudo altera la apariencia del diafragma; así mismo en el caso de la flexión de una o ambas extremidades anteriores que resulta en grados variables de superposición del codo pudiendo confundirse con una masa o consolidación pulmonar (Farrow, 2003).

Otro punto a considerar son las variantes de técnica radiográfica, las radiografías claras acentúan los vasos pulmonares, principal fuente de densidad pulmonar. Cuando esto se combina con radiografías en espiración, esta combinación puede resultar en una serie de enfermedades torácicas. Las radiografías oscuras, por otro lado, crean la impresión de una sobredistensión o, en la situación de un traumatismo, de un neumotórax (Farrow, 2003).

Indicadores Radiográficos de Enfermedad Torácica

Consolidación Pulmonar

La consolidación pulmonar se produce cuando los espacios aéreos sufren un reemplazo de su contenido por fluido o células, haciendo que los bronquios sean visibles, lo que también se denomina como signo del broncograma aéreo (Farrow, 2003).

Atelectasia Pulmonar

La atelectasia pulmonar puede concebirse como un cierto grado de colapso pulmonar que puede variar de parcial a completo. Tal como la consolidación alveolar, la atelectasia se asocia con pérdida de aire, sin embargo, en ésta no existe reemplazo del aire perdido por edema, sangre, pus u otros. De acuerdo con ello, es más probable que la atelectasia se asocie con desviación cardíaca que con consolidación, consideración diagnóstica extremadamente importante dado que ambas alteraciones se muestran como opacidades pulmonares (Farrow, 2003).

La atelectasia pulmonar puede ser resultado de problemas intra y extrapulmonares. La atelectasia intrapulmonar puede ocurrir a nivel alveolar como resultado de una neumonía o a nivel más proximal como resultado de una obstrucción bronquial. La atelectasia extrapulmonar suele estar causada por compresión por parte de una masa adyacente, aire o fluido que lo rodea (Farrow, 2003).

Nódulos Pulmonares Únicos

Los nódulos pulmonares solitarios raramente son causantes de enfermedad, y son habitualmente hallazgos radiográficos. Una vez identificados, diagnosticados, pero no reseccionados, el objetivo de la monitorización radiográfica de un nódulo pulmonar consiste en evaluar los cambios en su tamaño, e identificar nuevos nódulos (Farrow, 2003).

Nódulos Pulmonares Múltiples

Los nódulos pulmonares múltiples pueden no causar signos clínicos, sin embargo es posible que se observe el incremento de la frecuencia respiratoria. En otros casos, existe una disnea pronunciada pero raramente hay tos. Los nódulos pulmonares difusos (típicamente objetos esféricos de 0,5 cm de diámetro o mayores) suelen ser indicativos de neoplasia pulmonar metastásica. En general, a mayor número de lesiones, mayor probabilidad de que sean de tamaño y forma similar; de forma contraria, números más bajos de lesiones suelen mostrar mayor diversidad. Tales lesiones raramente se calcifican (Farrow, 2003).

El diagnóstico diferencial de nódulos pulmonares múltiples, incluye:

- › Abscesos bacterianos.
- › Proyección transversa de las uniones costocondrales (particularmente se ven si están calcificadas).
- › Proyección transversa de los pezones.
- › Proyección transversa de los vasos sanguíneos pulmonares normales, estando los nódulos mayores en el hilio, donde los vasos son más grandes.
- › Proyección transversa de bronquios llenos de secreción en animales asmáticos.
- › Proyección transversa de tumores cutáneos.
- › Sacos alveolares llenos de líquido.

- › Granulomas fúngicos.
- › Focos parasitarios inflamatorios.
- › Metástasis pulmonares.
- › Osteomas pulmonares.

Grandes Masas Torácicas

Las grandes masas torácicas, especialmente cuando son identificadas de manera incidental, son, generalmente, tumores pulmonares primarios. Otras lesiones solitarias, como abscesos por espigas, usualmente se asocian con atelectasia regional o consolidación, derrame pleural, tos, y signos claros de enfermedad. Los quistes y hematoma son poco vistos. La neumonía micótica y la granulomatosis pulmonar suelen mostrar masas múltiples (Farrow, 2003).

Lesiones Pulmonares Quísticas y Cavitarias

Traumatismos torácicos, abscesos pulmonares, algunos químicos y algunos parásitos son ejemplos de alteraciones que pueden producir “agujeros en el pulmón”, lo que se conoce como lesiones cavitarias (Farrow, 2003).

En el caso de un traumatismo, tales lesiones son el resultado de un incremento brusco de la presión intrapulmonar, que fuerza a las paredes alveolares rotas en todas direcciones, formando una esfera de bordes finos o un objeto de forma oval. Inmediatamente, la cavidad resultante se llena con sangre, la cual generalmente es reabsorbida en uno o dos días. En otras ocasiones drena hacia los bronquiólos comunicantes. En este último caso, el aire puede entrar en la cavidad donde se combina con la sangre que queda, creando una línea de fluido (Farrow, 2003).

Las lesiones pulmonares cavitarias o los espacios pulmonares anormales pueden aparecer en cualquier parte del pulmón. Aquellas localizadas justo por debajo de la superficie pulmonar se denominan vesículas, las que yacen en la profundidad del pulmón se conocen como bullas (Farrow, 2003).

Para demostrar la presencia de lesiones pulmonares cavitarias se requiere de radiografías posturales, principalmente la proyección lateral en estación. En las radiografías estándares en decúbito lateral, tales lesiones suelen parecer sólidas en lugar de objetos esféricos o de forma ovalada con una discreta línea de fluido o con una interfase entre gas y fluido (Farrow, 2003).

Características de imágenes radiográficas en Otáridos

La tráquea cursa sagital o parasagital (sistemáticamente al lado derecho) antes de su bifurcación a nivel de la primera vértebra torácica (T1). Desde ahí, los bronquios primarios derecho e izquierdo continúan hacia caudal, ubicados parasagital en las vistas ventrodorsal (VD) y dorsoventral (DV) y ligeramente divergentes de la columna vertebral hacia la base cardíaca en la vista lateral (Dennison *et al.*, 2009). (Figura 2)

Las vías respiratorias terminales están reforzadas ya sea con cartílago o músculos, éstos atenúan más los rayos X que el aire filtrado en lo alveolos, resultando en un incremento de la opacidad radiográfica en esos sectores. Adicionalmente, los cartílagos del tracto respiratorio tienden a la mineralización, aumentando aún más las propiedades de atenuación de esos tejidos y resultando en un incremento aún mayor en la radiopacidad. Esto significa que un infiltrado intersticial difuso y uniforme, acompañado de la visualización de bronquios es un hallazgo normal (Dennison *et al.*, 2009). La carina se ubica a nivel de T1,

marcadamente craneal al nivel de la base cardiaca, donde está localizada la carina en perros y gatos (Dennison *et al.*, 2009).



Figura 2. Radiografía normal de tórax, vista dorso ventral, de un lobo marino de un año. Flecha negra: bifurcación de la Carina (bifurcación de la tráquea). Aquí se observa el infiltrado intersticial difuso y uniforme, acompañado de la visualización de bronquios en todo el campo pulmonar.

Adaptado de Normal Thoracic Radiographic Anatomy of Immature California Sea Lions (*Zalophus californianus*) and Immature Northern Elephant Seals (*Mirounga angustirostris*) (Dennison *et al.*, 2009).

El bulbo aórtico es una importante adaptación para el buceo que se encuentra en los mamíferos marinos y no debe ser confundido con una patología (Dennison *et al.*, 2009).

El timo, que es relativamente más largo en jóvenes que en individuos viejos de cualquier especie, se encuentra craneal al pericardio (algunas veces se extiende caudalmente para abarcar el corazón por completo) y puede extenderse hasta el cuello en otáridos (Rommel y Lowenstine, 2001).

OBJETIVO GENERAL

Describir lesiones pulmonares en el estudio radiográfico simple y diagnosticar tuberculosis pulmonar en lobos marinos (*Otaria flavescens*) mediante PCR.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar lobos marinos (*Otaria flavescens*) infectados con *Mycobacterium sp.*
- Describir lesiones pulmonares en el estudio radiográfico simple de tórax observadas en ejemplares de *Otaria flavescens*.
- Determinar la concordancia entre las pruebas de PCR y el estudio radiográfico simple de tórax, en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar de lobos marinos comunes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales

Para el procedimiento de anestesia general se utilizó una máquina portátil de anestesia inhalatoria Carba, con vaporizador de isofluorano Cyprane Isotec 3.

Se estudiaron 20 ejemplares de lobos marinos (*Otaria flavescens*) juveniles o cachorros, sin restricción de sexo del Centro de Rescate de Animales Marinos “Buin Marino”, ubicado en la comuna de Buin, Región Metropolitana, procedentes de diversos lugares del país. Se sometió a los animales a un estudio radiográfico simple de tórax que fue realizado con un equipo de Rayos X Siemens Nanomobil 2, utilizando un chasis radiográfico Kodak 30x40 cm. con folio reforzador emisor verde velocidad regular, conteniendo una película radiográfica marca Kodak TGM sensible al verde. Las placas radiográficas fueron reveladas en una máquina de revelado automático AGFA Curix 60. Para la toma de éstas se utilizaron como elementos de protección delantales plomados.

Para la realización del lavado traqueal se utilizó:

- Laringoscopio de paleta Miller tamaño 2 MIL.
- Tubos endotraqueales con balón de neumotaponamiento Nubenco, del tamaño adecuado para el individuo en estudio.
- Sonda urinaria estéril 3,3 x 500 mm, marca Kruuse.
- Jeringa Nipro de 10 mL.
- Solución salina isotónica estéril Sanderson (suero fisiológico NaCl 0,9%).
- Tubos estériles de 10 mL.

Para el procesamiento de las muestras de lavados traqueales para análisis de PCR se utilizaron los siguientes equipos:

- Termociclador Apollo ATC 201.
- Transiluminador UV.
- Cámaras de electroforesis Apollo.

El equipo utilizado para el PCR en tiempo real fue el LightCycler 1.x,2.0

Método

Los procedimientos de obtención de radiografías y muestras de lavados traqueales fueron realizados en el Hospital Clínico Veterinario SOS, Buin Zoo, bajo la supervisión de un médico veterinario.

A cada animal que ingresó se le realizó una ficha clínica que contiene los siguientes datos: especie, sexo, edad estimada, peso, procedencia, tiempo de estadía en el recinto, existencia de lesiones externas y antecedentes de enfermedad previa.

Se realizó un estudio radiográfico simple a cada individuo, obteniendo vistas latero-lateral y dorso-ventral de tórax. La técnica de exposición (kVp y mAs) fue determinada según el espesor de la zona a radiografiar en cada animal. Las placas se analizaron en búsqueda de lesiones pulmonares, las cuales se describen en los resultados de acuerdo a signos y patrones radiográficos.

Además se obtuvieron muestra de lavados traqueales para análisis de tuberculosis mediante PCR (reacción de polimerasa en cadena), en todos los individuos pertenecientes al estudio. La obtención de las muestras de lavado traqueal, así como la toma de radiografías de tórax,

fueron obtenidas bajo anestesia general utilizando Isoflurano al 5% para la inducción, el cual fue administrado mediante el uso de mascarilla, y posteriormente ajustada la dosis a una concentración del 2,5-3,5%, según respuesta individual, para la mantención de la anestesia. Para el posicionamiento de la mascarilla utilizada para la inducción de la anestesia, el animal fue contenido mediante sujeción manual realizada por personal calificado del centro de rescate. Una vez que el animal se encontraba anestesiado se procedió a registrar el peso de éste.

Para obtener las muestras de lavado traqueal es necesario mantener al animal intubado. La intubación se realiza bajo anestesia general una vez perdido el reflejo palpebral. Se comienza posicionando al animal en decúbito esternal con la cabeza en alto, continuando con la apertura del hocico mediante el uso de 2 “cuerdas”, se toma la lengua y se visualiza la abertura de la laringe con la ayuda del laringoscopio de paleta y se introduce el tubo endotraqueal no más de 10 a 15 cm dentro de la tráquea evitando así una intubación unilateral del pulmón (Figuras 3 y 4). Luego de tener al animal intubado se realiza el lavado traqueal con 10 a 15 mL de una solución salina isotónica estéril, la que es administrada tibia mediante una jeringa de 10 mL conectada a una sonda urinaria estéril que se introduce dentro del tubo endotraqueal. Esta solución es recuperada a través del mismo sistema, sin que éste sea retirado del tubo endotraqueal, y depositada en un tubo estéril.

Figuras 3 y 4. Intubación y toma de muestra de lavados traqueales en *O. flavescens*.



Las muestras se refrigeraron y, dentro de un lapso de 24 h, fueron enviadas al laboratorio de Enfermedades Infecciosas perteneciente al departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinaria y Pecuarias de la Universidad de Chile, donde fueron procesadas para el análisis de PCR a fin de detectar la secuencia de inserción IS6110, específica para las bacterias del complejo *M. tuberculosis*. Además las muestras fueron enviadas al Laboratorio Biotecnología del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), donde se realizó un PCR en tiempo real.

Las muestras fueron sometidas a un proceso de homogenización con perlas de zirconio-silíce bajo agitación en un disruptor Mini Bead Beater® (Cole-Parmer) a 4600 rpm por 90s. El ADN fue extraído usando el High pure PCR template preparation kit (Roche®) para la preparación de la muestra, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para la amplificación de la secuencia de inserción IS1081 (CGACACCGAGCAGCTTCTGGCTGGTCGCCACCACGCTGGTCAGTG) se utilizaron los partidores BW6 y BW7 descritos por Wards *et al.* 1995, que amplifican un segmento de 306 pb de la secuencia de DNA. Para la amplificación de IS6110 (CAGATGCACGTCGAACGGCTGATTTGGATGCCTGCCTCGGCGA) se utilizaron los partidores IS6110_D2 IS6110_R2 desarrollados en este trabajo, que amplifican un segmento de 123 pb de la secuencia. Ambas amplificaciones fueron efectuadas en volúmenes de 50 µl conteniendo: buffer PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 1 µM de los partidores y 2.5 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Promega, EUA). El programa de amplificación consistió en una denaturación inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 32 ciclos consistentes en denaturación a 95 °C por 30 segundos, anillaje a 63 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos, para realizar una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y

visualización en transiluminador de luz ultravioleta, en comparación con marcadores de peso molecular (Eisenach *et al.*, 1991; Wards *et al.*, 1995).

En el caso de la prueba de PCR en tiempo real, éste se realizó en un equipo LightCycler para PCR en capilares de vidrio. Un fragmento de ADN de *M. bovis* es amplificado con partidores específicos. El amplicon es detectado por fluorescencia usando un partidor específico con dos fluorocromos ligados detectable en el canal 530 (descrito como F1 en el LightCycler) (TIB MOLBIOL, 2010).

El mix de *M. bovis* está compuesto por 2 μL de FastStar DNA Master Hybridization Probes, 2 μL de MgCl_2 , 1 μL del partidor para *M. bovis* 10 μL de agua y 5 μL de ADN. El programa del equipo consta de 3 etapas: la primera es la activación de la Taq-polimerasa que se realiza a una temperatura de 95 °C por 480 segundos. La segunda etapa es la de Amplificación, la cual comprende 3 pasos que se repiten 45 veces cada uno, el paso uno se realiza a una temperatura de 95 °C por 5 segundos; el paso dos se lleva a cabo a una temperatura de 68 °C por 12 segundos; y el tercer paso es a 72 °C por 1 segundo. Se finaliza con la etapa de enfriamiento, la que se desarrolla a una temperatura de 40 °C por 30 segundos. Los resultados son mostrados en un computador a través de curvas de amplificación (TIB MOLBIOL, 2010).

RESULTADOS

PCR

Todas las muestras procesadas por PCR resultaron negativas.

Estudio Radiográfico Simple.

En los veinte ejemplares sometidos al estudio radiográfico simple se visualizan los bronquios primarios intralobares con buena definición. En dos de los individuos, la visualización de bronquios está acompañada de un infiltrado peribronquial (Figura 5). Así mismo, en todos se observa la bifurcación traqueal a nivel de T1-T2 y la presencia del timo. Esto último corrobora que se trata de individuos juveniles en su totalidad, además de que en todos se observan las fisis humerales con bajos grados de mineralización.

En nueve casos es posible la visualización de bronquios secundarios, lo que se conoce como broncograma aéreo positivo (BAP) y es considerado patológico. De estos, cuatro tienen una distribución panlobar, tres peribronquial y en dos se observan principalmente en los lobos craneal y caudal (Cuadro 5).

CUADRO 5

VISUALIZACIÓN DE BRONQUIOS SECUNDARIOS (BAP)

BAP	Nº DE CASOS	PORCENTAJE
PRESENTE	9	45%
AUSENTE	11	55%
TOTAL	20	100%

El parénquima pulmonar se encontraba conservado en diez de los lobos marinos. En cinco animales se observó un infiltrado intersticial difuso y en los cinco restantes se visualizó un infiltrado de tipo celular. De estos últimos, tres presentaron un infiltrado celular no consolidado (Figura 5c y 5d), en dos se observa un infiltrado celular consolidado y en uno de los casos este infiltrado es mixto, con un patrón difuso con zonas de consolidación (Cuadro 6).

CUADRO 6
LESIONES DEL PARENQUIMA PULMONAR

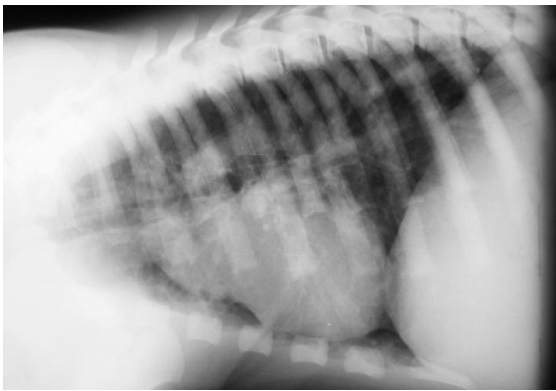
INTERSTICIO		N° DE CASOS	PORCENTAJE
CONSERVADO		10	50 %
INFILTRADO DIFUSO		5	25 %
INFILTRADO CELULAR	Consolidado	3	15 %
	No consolidado	1	5 %
	Mixto	1	5 %
TOTAL		20	100 %



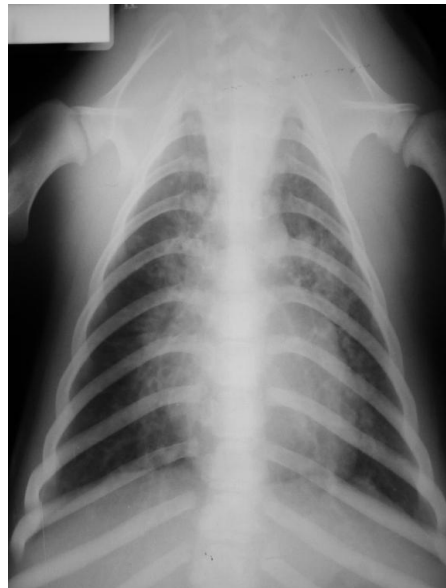
a



b



c



d

Figura 5. Radiografías de tórax de Lobos marinos (*O. flavescens*) **a:** Vista dorso-ventral donde se observa infiltrado peribronquial en zona apical de hemitórax derecho, **b:** Vista dorso-ventral de una radiografía sin alteraciones patológicas, es posible visualizar los bronquios primarios intralobares. **c y d:** Vista latero-lateral y dorso-ventral con infiltrado celular panlobar y presencia de BAP.

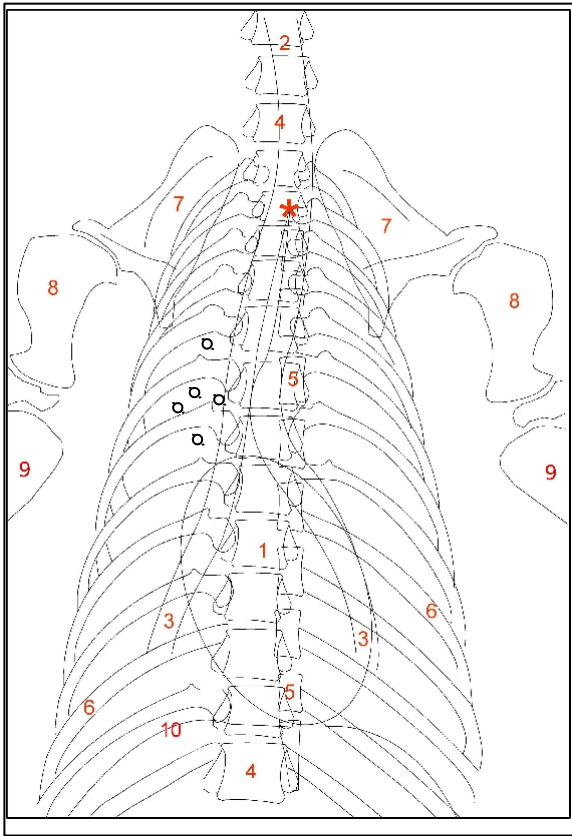


Figura 6. Vista dorso-ventral de radiografía de tórax de *O. flavescens*.

1. Corazón
2. Tráquea
3. Bronquios Primarios
4. Vertebras
5. Esternebras
6. Costillas
7. Escápula
8. Húmero
9. Radio
10. Diafragma
- * Carina

Círculos indican la presencia de BAP

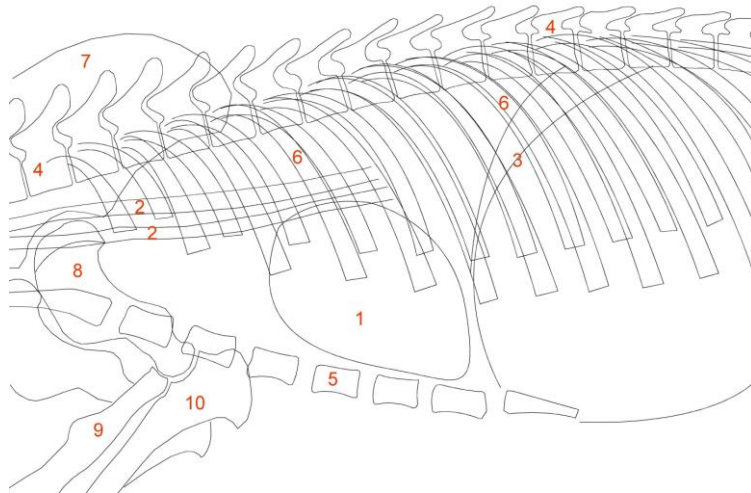
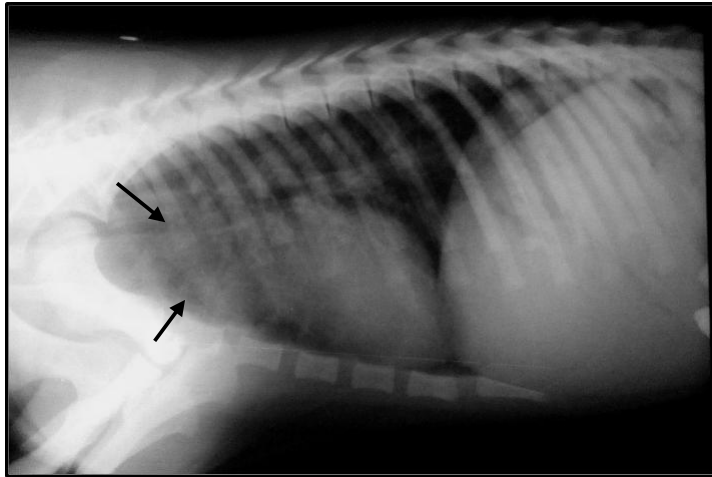


Figura 7. Vista latero-lateral de radiografía de tórax de *O. flavescens*

1. Corazón
2. Bronquios Primarios
3. Diafragma
4. Vertebras
5. Esternebras
6. Costillas
7. Escápula
8. Húmero
9. Radio
10. Ulna

Las flechas indican la presencia de infiltrado del parénquima pulmonar, de tipo celular.

DISCUSIÓN

Estudio radiográfico simple.

Las lesiones pulmonares observadas en las imágenes radiográficas son comparables con lo descrito para perros y gatos (Rommel y Lowenstine, 2001). Dennison *et al.*, 2009 señala que un infiltrado difuso y uniforme, acompañado de la visualización de bronquios es un hallazgo normal, por lo que existe una sobre evaluación de patologías pulmonares debido al reforzamiento cartilaginoso y/o muscular de las vías respiratorias terminales en lobos marinos, lo que permite una mayor visualización de bronquios secundarios y terciarios que en mamíferos terrestres. Es por esto que en los veinte ejemplares sometidos al estudio radiográfico simple de tórax es posible visualizar los bronquios primarios intralobares, sin que esto implique, necesariamente, una condición patológica.

En nueve animales se aprecia la visualización de bronquios secundarios, que en condiciones de normalidad no se observan, denominado broncograma aéreo positivo (BAP), que se produce, según Farrow 2003, cuando los espacios aéreos sufren un reemplazo de su contenido por fluido o células, haciendo que los bronquios sean visibles. La presencia de BAP es considerada patológica y puede asociarse a una bronquitis, neumonía, tuberculosis, neoplasia, etc. De estos nueve animales, en todos se ve afectado el hemitórax derecho y en cinco de ellos, además se observa la presencia de BAP en el hemitórax izquierdo.

El infiltrado celular, tanto consolidado como no consolidado, que se observó en cinco animales corresponde a una neumopatía cuya etiología debe establecerse, teniendo en cuenta lo mencionado por Dennison *et al.* 2009, referente al reforzamiento cartilaginoso y muscular de las vías aéreas terminales.

En tres de los animales se observó un infiltrado celular consolidado, lo que puede relacionarse con un cuadro crónico, que generalmente es asociado con áreas de consolidación y presencia de BAP. También se observan este tipo de lesiones en neumopatías de origen fúngico y en tuberculosis pulmonar, donde se han encontrado

lesiones pulmonares en la mayoría de los casos en los que *M. pinnipedii* fue aislado (Kiers *et al.*, 2008).

De los diez casos en los que se observó infiltración del parénquima pulmonar, en todos se encontraba afectado el hemitórax derecho y en ocho de ellos también se visualizaba infiltrado intersticial en el hemitórax izquierdo.

No es posible determinar si, en los individuos en los que se observaron lesiones pulmonares concordantes con alguna neumopatía, éstas fueron previas o posteriores a la captura de ellos.

En todos los animales sometidos al estudio radiográfico simple de tórax se observa la bifurcación de la traquea a nivel T1-T2, lo que se corresponde con lo encontrado en la literatura, donde se menciona que la carina se ubica a nivel de T1, marcadamente craneal al nivel de la base cardiaca donde está localizada la carina en perros y gatos (Dennison *et al.*, 2009).

En las 20 placas radiográficas evaluadas, se observa la presencia de una masa semiopaca, craneal a la imagen cardiaca lo que concuerda con la descripción de la imagen del timo, que se encuentra craneal al pericardio y puede extenderse hasta el cuello en otáridos, según lo estudiado por Rommel y Lowenstine, 2001. Esto confirma, junto con la observación de cartílagos de crecimiento abiertos en las fisis humerales y extremos vertebrales, y de los segmentos costo-esternales no mineralizados, que se trata en la totalidad de los casos de animales juveniles. En todas las imágenes analizadas se encontraron dentro de rangos normales los límites de la cavidad torácica.

PCR

Tanto en la prueba de PCR como en la de PCR en tiempo real, todas las muestras dieron resultados negativos. en ambos casos se utilizaron controles positivos de bacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* para validar las pruebas. esto demuestra que no existen errores asociados a factores humanos o de equipos en el proceso de implementación del PCR. Además, en ambos casos se utilizaron controles positivos de bacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* para validar las pruebas.

Woods *et al.*, 1995 señalan que la prueba de PCR puede realizarse en varios tipos de muestras como esputos, lavados gástricos y fluidos traqueales (obtenidos de lavados endotraqueales), así mismo la EAAM, 2009 menciona que la saliva obtenida desde el hocico puede dar resultados positivos, pero los animales muestreados más profundamente tienen mayores posibilidades de dar resultados positivos incluso cuando la eliminación de la bacteria es baja. En el caso de este estudio las muestras fueron obtenidas de lavados endotraqueales, lo que hace menos probable que la muestra obtenida no haya sido la correcta para obtener resultados positivos, en el caso de que algún animal se haya encontrado infectado con bacterias del complejo *M. tuberculosis*.

El marcador genético más utilizado para epidemiología molecular de tuberculosis es la secuencia de inserción IS6110 (Zumárraga *et al.*, 1999). Además, según mencionan Cousins *et al.*, 2003; en un estudio realizado en Australia se recolectaron muestras de aislados del complejo *M. tuberculosis* obtenidas de 30 pinnípedos, todos los aislados resultaron ser *M. pinnipedii* y todos ellos contenían las secuencias genéticas IS6110, IS1081.

Las muestras de lavados endotraqueales obtenidas de los 20 lobos marinos de este estudio fueron sometidas a pruebas de PCR donde se utilizaron las secuencias genéticas de inserción IS6110 e IS1081, las mismas descritas Cousins *et al.*, 2003 y por Zumárraga *et al.* 1999; por lo tanto se descarta que las muestras hayan resultado negativas debido a un error en la secuencia blanco de amplificación.

Al resultar todas las muestra negativas lo más probable es que, efectivamente, los animales sometidos al estudio hayan sido individuos que no se encontraban contagiados con *M. pinnipedi* ni con alguna otra bacteria del complejo *M. tuberculosis*, y por tratarse de animales jóvenes este es el escenario más probable. Además, la tuberculosis pulmonar no siempre infiltra hacia las vías aéreas, por lo tanto es posible que no se encuentren bacterias en las muestras obtenidas de lavados traqueales. Para comprobar esto es necesario tomar contra muestras y someterlas, además de PCR, a otras pruebas diagnósticas, lo cual no era el objetivo de este estudio. También es posible que existan algunos falsos negativos debido los porcentajes de error de la prueba.

CONCLUSIONES

- Se logró describir lesiones pulmonares en el estudio radiográfico simple de 11 ejemplares de *Otaria flavescens*. Siendo la mas común la presencia de infiltrado del parénquima pulmonar en el 90,9% de los casos, seguida por la presencia de BAP, representando el 81,8% de las lesiones.
- No fue posible detectar *Mycobacterium sp.* en lobos marinos (*Otaria flavescens*), a través de la prueba de PCR para la detección de la secuencia genética IS6110 e IS1081.
- No fue posible realizar estudios de concordancia entre ambas pruebas diagnósticas, ya que todas las pruebas de PCR resultaron negativas.
- La imagen radiográfica normal de tórax en *Otaria flavescens* es concordante con lo descrito para otras especies de lobos marinos.

BIBLIOGRAFÍA

BARRERA, L. 2007 The tubercle bacillus: a continuous taxon **In:** Palomino, J. C.; Leão, S.; Ritacco, V. Tuberculosis 2007 From basic science to patient care, Editorial www.TuberculosisTextbook.com, pp. 93 – 94.

BERTA, A. 2008 Pinnidepia, Overview **In:** Perrin, W. F.; Würsing, B.; Thewissen, J. G. M. Encyclopedia of Marine Mammals, Segunda Edición, Editorial Academic Press, Estados Unidos, pp. 878 – 88.

CAPELLA, J.; GIBBONS, J. 2008 Diversidad de Especies: Mamíferos Marinos **In:** CONAMA Biodiversidad de Chile, Patrimonios y Desafíos, Segunda Edición, Ocho libros editores, Santiago, Chile, pp. 234

CAWTHORN, M.W. 1994 Seal finger and mycobacterial infections of man from marine mammals occurrence, infection and treatment. Conservation Advisory Science Notes No. 102, Department of Conservation, Wellington. 15 pp.

CHILE, MINISTERIO DE ECONOMÍA, FOMENTO Y TURISMO 2009 Artículo Único: Rectificación del Artículo 4° del Decreto Exento N° 1.892 Veda extractiva para el recurso Lobo marino común *Otaria flavescens*, en todo el litoral de la República. 2 de Febrero de 2010.

COUSINS, D. V.; BASTIDAS, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, W. R., DAWSON, D.; RODRÍGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. 2003 Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp.nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53: 1305-1314.

DENNISON, S.; FORREST, L.; GULLAND, F. M. D. 2009 Normal Thoracic Radiographic Anatomy of Immature California Sea Lions (*Zalophus californianus*) and Immature Northern Elephant Seals (*Mirounga angustirostris*) . Aquatic Mammals 35(1): 36-42.

DE WAAR, J.; ROBLEDO, J. 2007 Conventional Diagnostic Methods **In:** Palomino, J. C.; Leão , S.; Ritacco, V. Tuberculosis 2007 From basic science to patient care, Editorial www.TuberculosisTextbook.com, pp. 401 – 402.

DOUGLAS, S. W.; WILLIAMSON, H. D. 1963 Principles of Veterinary Radiography. Editorial William and Wikins co., Baltimore, pp. 243.

DUNN, J. L.; BUCK, J. D.; ROBECK, T. R. 2001 **In:** Dierauf, L.; Gulland, F. CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, Segunda Edición, Editorial CRC Press, Estados Unidos, pp. 309 – 310.

EAAM, EUROPEAN ASSOCIATION FOR AQUATIC MAMMALS. 2009 Mycobacterium pinnipedii Workshop September 2009 Report.

EAZWV, EUROPEAN ASSOCIATION OF ZOO AND WILDLIFE VETERINARIANS, TUBERCULOSIS WORKIG GROUP. 2010 Tuberculosis in zoo species: diagnostic update and management issues **In:** EAZWV Transmissible Diseases Handbook.

EISENACH, K.; SIFFORD, M.; CAVE, M.; BATES, J.; CRAWFORD, J.; 1991 Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. Am J Respir Dis 144: 1160 – 3

FARROW, C.; 2003 Thoracic Radiographic Disease Indicators **In:** Farrow, C. Veterinary Diagnostic Imaging: The Dog and Cat, Volumen 1, Editorial Mosby Inc, China, 2003, pp. 368 - 386

FIP, FONDO DE INVESTIGACIÓN PESQUERA. 2006 Términos Básicos De Referencia Proyecto FIP N° 2006-49 Cuantificación Poblacional de Lobos Marinos en el Litoral de la V a IX Región.

FORSHAW, D.; PHELPS, G. R. 1991 Tuberculosis in a captive colony of pinnipeds. Journal of Wildlife Diseases 27(2): 288-295.

GENTRY, R. L.; 2008 Eared Seals *Otariidae* **In:** Perrin, W. F.; Würsing, B.; Thewissen, J. G. M. Encyclopedia of Marine Mammals, Segunda Edición, Editorial Academic Press, Estados Unidos, pp 339.

KIERS, A.; KLARENBECK, A.; MENDELTS, B; VAN SOOLINGEN, D.; KOËTER, G. 2008 Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. International Journal Tuberculosis Lung Diseases 12(12): 1469-1473.

MYER, C. W.; BONAGURA, J. D. 1982 Survey Radiography of the heart. Veterinary Clinic North American 12 (2) : 213 – 237.

PALOMINO, J. C.; LEÃO , S.; RITACCO, V. 2007, Tuberculosis 2007 From basic science to patient care, Editorial www.TuberculosisTextbook.com.

PESTANA, E.; BELAK, S.; DIALLO, A.; CROWTHER, J.; VILJOEN, G. 2010a What is PCR? **In:** Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics – Real Time PCR Applications, Editorial Springer, Estados Unidos, pp. 1-2.

PESTANA, E.; BELAK, S.; DIALLO, A.; CROWTHER, J.; VILJOEN, G. 2010b Tradicional PCR **In:** Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics – Real Time PCR Applications, Editorial Springer, Estados Unidos, pp. 9 – 25.

PONGANIS, P. J. 2001 Circulatory Sistem **In:** Dierauf, L.; Gulland, F. CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, Segunda Edición, Editorial CRC Press, Estados Unidos, pp. 230 – 234.

REINOLDS, J.; ROMMEL, S.; BOLEN, M. 2002 Anatomical Dissection: Thorax and Abdomen **In:** Perrin, W.; Würsig, B.; Thewissen, J. Encyclopedia of Marine Mammals, Editorial Academic Press, Estados Unidos, pp. 21 – 25.

ROMMEL, S.; LOWENSTINE, L. 2001 Gross and Microscopic Anatomy **In:** Dierauf, L.; Gulland, F. CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, Segunda Edición, Editorial CRC Press, Estados Unidos, pp. 142 – 144.

SERNAPESCA, SERVICIO NACIONAL DE PESCA 2006 Definiciones de Términos Pesqueros [en línea]. <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=205:definiciones-de-tinos-pesqueros&catid=60:fismedadm&Itemid=365> [consulta: 07-06-2011]

SIELFELD, W. 1999 Estado del conocimiento sobre conservación y preservación de *Otaria flavescens* (Shaw, 1800) y *Arcotephalus australis* (Zimmermann, 1783) en las costas de Chile. Estud. Oceanol. 18: 81 – 96.

SUTER, P. F.; LORD, P. F. 1971 A critical evaluation of the radiographic finding in canine cardiovascular disease. Journal American Veterinary Medical Association., 158 : 358 – 371.

TIB MOLBIOL 2010 LightCycler Real-Time PCR, Bovine LCSet, Guidelines for the proper use of reagents (for use on LightCycler 1.X;2.0) **In:** Boviman Manual ed2 r1

UNE, Y.; MORI, T. 2007 Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 30: 415-425.

WARDS, B.; COLLINS, D.; DE LISLE, G. 1995 Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 43: 227 – 40.

WOODS, R.; COUSINS, D.; KIRKWOOD, R.; OBENDORF, D. 1995 Tuberculosis in a Wild Australian Fur Seal (*Arctocephalus pusillus doriferus*) from Tasmania. *Journal of Wildlife Diseases* 31 (1): 83 – 86.

ZUMÁRRAGA, M.J.; BERNARDELLI, A.; BASTIDA, R.; QUSE, V.; LOUREIRO, J.; CATALDI, A.; BIGI, F.; ALITO, A.; CASTRO, M.; SAMPER, S.; OTAL, I.; MARTIN, C.; ROMANO, M. I. 1999 Molecular characterization of mycobacteria isolated from seals. *Microbiology* 145: 2519–2526.