



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

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella canis* Y
Leptospira spp. EN CÁNIDOS SILVESTRES Y DOMÉSTICOS DE LA
ISLA GRANDE DE TIERRA DEL FUEGO, REGIÓN DE
MAGALLANES Y ANTÁRTICA CHILENA**

Sebastián Jesús Moya Durán

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

PROFESOR GUÍA: CRISTÓBAL BRICEÑO URZÚA
Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

SANTIAGO, CHILE
2016



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

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella canis* Y
Leptospira spp. EN CÁNIDOS SILVESTRES Y DOMÉSTICOS DE LA
ISLA GRANDE DE TIERRA DEL FUEGO, REGIÓN DE
MAGALLANES Y ANTÁRTICA CHILENA**

Sebastián Jesús Moya Durán

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

Nota Final

Firma

Profesor Guía: Cristóbal Briceño Urzúa

Profesor Corrector: Consuelo Borie Polanco

Profesor Corrector: Pedro Abalos Pineda

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecer al apoyo brindado por mi familia, mi madre Ana Durán, mi padre Edinson Moya y mi tía Alicia Durán. Y especialmente a tres personas que forman parte de la piedra angular de mi vida, mi hermano Roberto Moya y a mis tías abuelas Margarita Durán y Julia Durán, siendo ellas las que me criaron y enseñaron el valor del esfuerzo y la lucha en la vida.

Deseo también darle las gracias a dos seres humanos con los que crucé camino, quiénes me enseñaron muchísimo en él permitiéndome tomar lo mejor de ellos, mis estimados Alexis Vargas y Rodrigo Manquián, les estaré eternamente agradecido.

A Rodrigo, decirle que por todo lo que hemos pasado, crecido y madurado, siempre tendrás conmigo alguien incondicional en quien confiar.

Dejar fuera a mis amigos sería inimaginable, a todos los que han sido partícipes de este camino les deseo dar las gracias y decir, que no olviden que aquí cuentan con un amigo para lo que deseen.

Finalmente deseo agradecer a mi profesor guía, Cristóbal Briceño, por su eterna paciencia ante mi insistencia de todos los días y por sus consejos, al igual que a mis profesores correctores, Consuelo Borie y Pedro Abalos, por sus comentarios y recomendaciones.

Quiero dedicar esta Memoria de Título a la memoria de mi hermano Edinson Moya...

...más allá de las circunstancias, siempre estarás presente.

ÍNDICE

Summary	4
Resumen	5
Introducción	6
Revisión Bibliográfica	8
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
Materiales y Métodos	16
Resultados	20
Discusión	24
Conclusión	34
Bibliografía	35
Anexos	41

SUMMARY

The objective of this study was to explore exposure against *Brucella canis* and *Leptospira* spp. through the presence of antibodies in wild and domestic canids in Isla Grande de Tierra del Fuego. A total of 56 sera, 15 from Fuegian culpeo foxes, 12 from grey foxes and 29 from domestic dogs, were analyzed. Two serological techniques were used for antibody detection: counterimmunoelectrophoresis (CIEF) and microscopic agglutination (MAT) for canine brucellosis and leptospirosis, respectively. The results showed the absence of antibodies against *B. canis* and the presence of antibodies against *Leptospira* spp., with prevalence's of 20% for culpeo foxes, 8.3% for grey foxes and 3.4% for domestic dogs. These results could be explained by factors such as intrinsic characteristics of the infectious agent and/or location of the test animals. Thus, a deeper understanding of the interaction of wild and domestic canids with other animal species in an environment in common, is an essential tool towards the conservation of the endangered endemic species from the Isla Grande de Tierra del Fuego like the Fuegian fox.

Key words: *B. canis*, canine brucellosis, CIEF, *Leptospira* spp., leptospirosis, MAT, Tierra del Fuego, Fuegian fox.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue indagar la exposición frente a *Brucella canis* y *Leptospira* spp. a través de la detección de anticuerpos en cánidos silvestres y domésticos en la Isla Grande de Tierra del Fuego. Se analizó un total de 56 sueros, 15 de zorros culpeo fueguino, 12 de zorros chilla y 29 de perros domésticos. Dos técnicas serológicas fueron utilizadas para la detección de anticuerpos: contraelectroforesis inmune (CIEF) y aglutinación microscópica (MAT) para brucelosis canina y leptospirosis, respectivamente. Los resultados mostraron la ausencia de anticuerpos contra *B. canis* y la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp., con prevalencias de un 20% para zorros culpeo, 8,3% para zorros chilla y 3,4% para perros domésticos. Estos resultados se pueden explicar por factores tales como las características intrínsecas del agente infeccioso y/o ubicación de los animales analizados. Así, una comprensión más profunda sobre la interacción de los cánidos silvestres y domésticos con otras especies animales en un medio ambiente en común, es una herramienta esencial hacia la conservación de las especies endémicas en peligro de extinción de la Isla Grande de Tierra del Fuego como el zorro fueguino.

Palabras clave: *B. canis*, brucelosis canina, CIEF, *Leptospira* spp., leptospirosis, MAT, Tierra del Fuego, zorro fueguino.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmisibles, en general, han incrementado su incidencia sobre la fauna silvestre desde 1940, debido principalmente a factores antropogénicos como son la introducción de especies exóticas y la fragmentación y destrucción de hábitats naturales. Entre estas enfermedades infecciosas, especialmente las zoonóticas y de importancia global, se encuentran la brucelosis canina y la leptospirosis.

La brucelosis canina puede afectar a cánidos y se encuentra distribuida en gran parte del mundo. *Brucella canis*, es la bacteria que produce esta enfermedad, la cual es principalmente transmitida sexualmente y puede generar sintomatología reproductiva, entre otras, en hembras y machos. Mientras que la leptospirosis puede afectar a diversos hospedadores mamíferos, tanto silvestres como domésticos, y se encuentra en todo el mundo a excepción de la Antártica. *Leptospira* spp. es una bacteria que puede ser transmitida entre cánidos de forma directa o indirecta, pudiendo generar diversos síntomas, dependiendo de la etapa de infección y sistema afectado.

Por lo tanto, ambos agentes pueden afectar a cánidos, siendo Sudamérica la región con la mayor diversidad de ellos a nivel global; existiendo en Chile tres especies de cánidos nativos. De estas, el zorro culpeo o *Pseudalopex culpaeus* (*P. c.*) presenta una subespecie única para la Isla Grande de Tierra del Fuego, la que se considera endémica y amenazada: el zorro fueguino (*P. c. lycoides*). No sólo la cacería amenaza esta subespecie, la cual representa al carnívoro más grande de la isla; la reciente introducción del zorro chilla o *Pseudalopex griseus* (*P. g.*) y el perro doméstico (asociado a la actividad humana), amenazan al culpeo fueguino, no solamente al competir por hábitat o alimento, sino que como una amenaza sanitaria importante. Así, ambas infecciones bacterianas en estudio tienen el potencial de afectar las poblaciones amenazadas del zorro culpeo fueguino.

De hecho, estudios realizados en el sur de Chile y a unos 275 km (aprox.) de Isla Grande de Tierra del Fuego, demuestran la presencia de anticuerpos contra *B. canis* y *Leptospira* spp. tanto en zorros como perros domésticos. Finalmente, un estudio realizado en el hemisferio norte, a una latitud similar a la de Tierra del Fuego, permite suponer que *Brucella* spp. y *Leptospira* spp. pueden sobrevivir en condiciones ambientales como las que tendrían en la

isla. Por esta razón, la presente Memoria de Título pesquisar  la presencia de anticuerpos contra *B. canis* y *Leptospira* spp. en muestras de cánidos silvestres y domésticos de la Isla Grande de Tierra del Fuego.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las zoonosis y en particular las enfermedades infecciosas emergentes, las cuales corresponden a un 60,3% de las zoonosis, han aumentado su incidencia desde 1940, y se estima que un 71,8% de ellas tiene su origen en poblaciones de fauna silvestre (Jones *et al.*, 2008). Esta cifra se explica por acciones antrópicas derivadas de la explosión demográfica humana, tales como su invasión en ambientes naturales con la consecuente destrucción y fragmentación de hábitats, así como la introducción de especies exóticas sobre hábitats naturales. Lo anterior, favorece la aparición y mantención de enfermedades infecciosas como pudiesen ser brucelosis canina y leptospirosis en cánidos, tanto silvestres como domésticos (Rhyan y Spraker, 2010).

Brucella canis

La brucelosis canina es causada por la bacteria *Brucella canis*, cocobacilo Gram negativo e intracelular facultativo. Aunque *B. canis* tiene potencial zoonótico, la infección en el ser humano pareciera ser infrecuente, siendo sus principales hospedadores los miembros de la familia Canidae (CFSPH, 2009; CFSPH, 2012). Este patógeno, tiene potencial de distribución global aunque se ha descrito solamente en América y algunos países de África, Asia y Europa. Hasta la fecha, Nueva Zelanda y Australia estarían libres de esta bacteria (CFSPH, 2012).

Brucella canis es principalmente transmitida sexualmente, aunque también puede ser transmitida por el contacto directo de membranas mucosas o lesiones dérmicas con los tejidos infectados productos del aborto, o por la ingestión de éstos. Además, la bacteria se puede diseminar por orina, secreciones (ocular, nasal, salival y láctea) y heces de cánidos infectados. En relación a esto, el ser humano se puede infectar por contacto directo con cánidos infectados, o accidentalmente con cultivos de *B. canis* en laboratorio (CFSPH, 2012).

En cánidos, brucelosis canina puede provocar sintomatología reproductiva. En hembras preñadas puede producir muerte fetal, reabsorción y aborto. Si se produce el parto, los cachorros pueden nacer débiles, morir al poco tiempo después de nacidos o nacer normales y desarrollar posteriormente la enfermedad. En machos, la enfermedad puede producir anomalías morfológicas en los espermatozoides y reducción en la viabilidad de estos,

epididimitis, edema escrotal y orquitis. También, se describe atrofia testicular unilateral o bilateral, e infertilidad cuando la enfermedad es crónica. Por otro lado, puede generar sintomatologías inespecíficas y otras, tales como linfadenitis, discoespondilitis, uveítis y endocarditis (CFSPH, 2012).

Leptospira spp.

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por la espiroqueta *Leptospira spp.* Desde el punto de vista taxonómico, se reconocen 21 especies y dentro de ellas al menos unos 250 serovares patógenos y casi 50 serovares saprófitos (CFSPH, 2013). Los serovares de *Leptospira spp.* se pueden adaptar a uno o más hospedadores mamíferos, presentándose en especies domésticas como perros y silvestres como zorros y roedores. El perro es hospedero de los serovares Canicola e Icterohaemorrhagiae, sin embargo, producto de planes de vacunación contra éstos, otros serovares han tomado relevancia (CFSPH, 2013). Por otra parte, entre los roedores se describen los serovares Icterohaemorrhagiae y Copenhageni como relevantes, aunque potencialmente pueden verse afectados por una gran cantidad de serovares (CFSPH, 2013). Especies patógenas de *Leptospira spp.* se encuentran alrededor de todo el mundo, a excepción de la Antártica; y la predominancia de los diferentes serovares en los distintos hospedadores, variará según la zona geográfica en que se encuentren (CFSPH, 2013).

Leptospira spp. se puede transmitir de forma directa entre hospedadores, por contacto directo de membranas mucosas o lesiones dérmicas con orina, tejidos producidos durante abortos o secreciones reproductivas normales de animales infectados. Indirectamente, la bacteria se puede transmitir a través del medio ambiente, pudiendo ser ingerida a través de alimentos o aguas contaminadas. En el ser humano, *Leptospira spp.* puede ser excretada por orina y transmitida sexualmente, pero son casos infrecuentes (CFSPH, 2013).

En cánidos y durante las etapas iniciales de la infección, *Leptospira spp.* puede producir síntomas inespecíficos y posteriormente, y según el órgano que afecte, sintomatología renal, hepática y/o reproductiva, como aborto. Además, *Leptospira spp.* tiene el potencial de afectar otros órganos como pulmones y páncreas (CFSPH, 2013).

Tanto brucelosis canina como leptospirosis, tienen el potencial de afectar a cánidos domésticos como perros (*Canis lupus familiaris*) y silvestres, como son zorros. Estos últimos, tradicionalmente se incluyen en el género *Pseudalopex* (*P*) o *Lycalopex*, el que abarca varias especies sudamericanas: *P. vetulus*, *P. fulvipes*, *P. gymnocercus*, *P. culpaeus* y *P. griseus* (Prevosti *et al.*, 2013). De las nueve subespecies pertenecientes a *P. culpaeus* (*P. c.*) (zorro culpeo), cuatro de ellas habitan en Chile: *P. c. culpaeus*, *P. c. andinus*, *P. c. magellanicus* y *P. c. lycoides*. Por su parte, de las cuatro subespecies de *P. griseus* (*P. g.*) (zorro chilla) descritas, tres de ellas están presentes en Chile: *P. g. griseus*, *P. g. domeykoanus* y *P. g. maullinicus* (Iriarte, 2008). De las especies mencionadas anteriormente, el zorro culpeo fueguino (*P. c. lycoides*) es una subespecie endémica y amenazada de la Isla Grande de Tierra del Fuego, Región de Magallanes y Antártica Chilena. Por otra parte, el zorro chilla y el perro, son especies exóticas introducidas en la Isla Grande de Tierra del Fuego (Sillero *et al.*, 2004). El perro es considerado una amenaza para la vida silvestre debido a que tiene el potencial de ser reservorio de varias enfermedades infecciosas, las cuales podrían ser transmitidas a poblaciones de cánidos silvestres por su cercanía evolutiva con estos (Silva *et al.*, 2010a; Proenca *et al.*, 2014).

Situación actual de la Isla Grande de Tierra del Fuego

Tierra del Fuego posee una escasa diversidad de especies nativas, debido principalmente a su elevada latitud y condición insular. Esta fue una de las razones que llevó al ser humano a la introducción de especies exóticas en su territorio, desde el siglo XVIII, para así incrementar el número de especies (Anónimo, 2016). Dentro de las especies nativas se encuentra el zorro culpeo fueguino, especie que además es endémica del archipiélago fueguino (Lizarralde y Escobar, 2000). De las 30 especies descritas actualmente en el archipiélago fueguino, el 66% aproximadamente de ellas corresponde a especies exóticas introducidas con fines económicos u otros (Massoia y Chébez, 1993; Lizarralde y Escobar, 2000; Jaksic *et al.*, 2002). Dentro de las especies introducidas se encuentran el zorro chilla, el castor canadiense (*Castor canadensis*), la rata almizclera (*Ondatra zibethicus*), el visón americano (*Neovison vison*), el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) y recientemente el armadillo (*Chaetophractus villosus*) (Gallo *et al.*, 2005). De ellos, son los mamíferos acuáticos los que presentan una mayor proporción poblacional respecto a los mamíferos

terrestres (Anónimo, 2016). Dentro de las especies domésticas se hallan el perro doméstico, el ganado ovino, bovino y equino y el zorro plateado (*Vulpes vulpes*) (Gallo *et al.*, 2005).

El zorro chilla fue introducido en el año 1951 con el fin de controlar la población del conejo europeo, especie que a su vez había sido introducida en territorio nacional del archipiélago fueguino en el año 1936 con fines de caza y obtención de carne (Atalah *et al.*, 1980). En Chile se estima que su población total sería de 65.835 ejemplares, con un promedio de 1 individuo / 43 ha, ello según un estudio realizado en la región en el año 1982 (Duran *et al.*, 1985). Mientras que, en Argentina, datos más recientes indican que su población alcanzaría una densidad entre 0,21-1,31 individuos / km², en la Patagonia Argentina (Pacheco *et al.*, 2004).

El castor canadiense fue introducido en el año 1946 en el sector argentino del Lago Fagnano (Skewes *et al.*, 2006). El objetivo de su introducción fue desarrollar un mercado peletero, el cuál a nivel global estaba en declinación (Silva *et al.*, 2010b). Inicialmente se introdujeron 25 parejas de castores provenientes del oeste de Canadá, las cuales gracias a la amplia disponibilidad de hábitats, incluyendo bosques y ríos, y a la ausencia de depredadores naturales en el lugar, pudieron desarrollarse con un crecimiento exponencial de su población (Skewes *et al.*, 2006; Iriarte, 2008). Pudiendo ser detectado en territorio chileno de Tierra del Fuego desde el año 1956 (Iriarte, 2008). Así, para el año 1999 se estimó una población total de 60.300 ejemplares, mientras que para el año 2005 se estimó una población superior a 100.000 individuos, de los cuales el 83% se encontraba en Tierra del Fuego y el resto en la Isla Navarino (Skewes *et al.*, 2006; Iriarte, 2008).

Por su parte, la rata almizclera y el visón americano también fueron introducidos con la misma finalidad comercial que el castor canadiense (Silva *et al.*, 2010b). La rata almizclera fue introducida entre los años 1946 y 1948, cuando se registraron liberaciones de 225 ejemplares y fugas desde criaderos en territorio argentino, pudiendo dispersarse hacia el sur a través de los distintos cursos de agua, los que finalmente llegaban a Chile (Fabro, 2015; Sandoval, 1994). De esta forma a inicios de la década de 1960, se detectan los primeros ejemplares de rata almizclera en las cercanías de la localidad de Pampa Guanacos, Chile (Iriarte, 2008). Por otra parte, el visón americano fue introducido en Chile y Argentina entre

los años 1930 y 1960, conociéndose al menos cinco introducciones independientes al medio natural, dos en Chile y tres en Argentina (Iriarte, 2008).

Son estas últimas tres especies, de las doce registradas como mamíferos exóticos de la región, las consideradas más invasivas y perjudiciales (Anderson *et al.*, 2006). Estas, en sus hábitats naturales de América del Norte y Canadá, presentan un alto grado de interacción entre ellas (Viljugrein *et al.*, 2001; Shier y Boyce, 2009; Mott *et al.*, 2013).

Por otro lado, si bien no existen antecedentes claros sobre el momento de la introducción del perro doméstico, si existen textos que indican que el perro ha habitado en Tierra del Fuego desde los tiempos de pueblos originarios, como los Haush y Selk´nam. Los Selk´nam posiblemente cruzaron a Tierra del Fuego con ayuda de los Alakaluf a través de sus canoas, en tanto que se desconoce cómo lo hicieron los Haush, los que ya se encontraban allí a la llegada de los Selk´nam. Así, se señala para aquella época la presencia del extinto perro fueguino, posible descendiente de los perros que llegaron junto con los primeros navegantes europeos (Chapman, 1977). También existen registros por parte de algunos europeos que arribaron a este lugar, como el diario de vida de William Blain, un escocés que llegó a la Patagonia contratado para trabajar como ovejero en el año 1891 permaneciendo en ella hasta el año 1898, en cuyas páginas relata hechos acontecidos con perros y el ganado ovino de la zona (Martinic, 2009).

El ganado ovino se considera que fue introducido en 1876, cuando 300 individuos fueron transportados desde las Islas Malvinas a la Isla Isabel a través del Estrecho de Magallanes. Esto fue realizado por Henry L. Reynard, quién creyó encontrar en la Patagonia un lugar con potencial para la industria ovina (Soriano y Paruelo, 1990). De esta forma, para el año 2007 en Tierra del Fuego, la población ovina alcanzaba los 1.046.409 individuos, mientras que para el año 2010 los 910.334 ejemplares (INE, 2010).

Es entonces que la irrupción del perro doméstico en la zona rural de Tierra del Fuego ha traído como consecuencias masivos ataques hacia el ganado ovino (Zanini *et al.*, 2008). De hecho, una encuesta realizada entre los años 2012 y 2013 señala que, de la totalidad de la superficie destinada a producción animal, el área afectada por perros domésticos o asilvestrados ha incrementado desde un 2,5% para el año 1990, a un 69,3% para los años

2012 y 2013, siendo exitosa así su reproducción en las áreas rurales (Schiavini y Narbaiza, 2015).

Antecedentes sobre *Brucella canis* y *Leptospira* spp. en relación a Tierra del Fuego

En Chile, se ha documentado la presencia y la prevalencia serológica de *B. canis* y *Leptospira* spp. Por ejemplo, en la Ciudad de Temuco, Región de La Araucanía, se detectó mediante inmunocromatografía (IC), la presencia de anticuerpos contra *B. canis* en un 1% de muestras provenientes de 400 caninos de un canil administrado por la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco (Tuemmers *et al.*, 2013a). En el caso de *Leptospira* spp. y también a partir de 400 muestras de perros, en la Ciudad de Valdivia, Región de los Ríos, se encontró un 14,8% de seropositivos a ocho serovares de la bacteria. Los serovares Canicola, Icterohaemorrhagiae y Ballum fueron los más prevalentes identificados mediante la prueba de aglutinación microscópica (MAT) (Silva y Riedemann, 2007).

En un estudio realizado en Argentina, a unos 275 km al norte de la Isla Grande de Tierra del Fuego, en la provincia de Santa Cruz (46°36'S, 72°24'W), se analizó el suero de 28 zorros culpeo y 56 zorros chilla de vida libre. Para *Brucella* spp. se obtuvo un 17,8% de seropositividad (ocho culpeos y siete chillas respectivamente) y un 33,3% de seropositividad para *Leptospira* spp. (12 y 16 individuos por especie respectivamente). La presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. se detectó con la técnica del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. utilizando MAT (Martino *et al.*, 2004).

Por otra parte, Goldstein *et al.* (2011) realizaron un estudio en nutrias marinas (*Enhydra lutris kenyoni*) en latitudes similares a la de la Isla Grande de Tierra del Fuego (53°38'S, 69°38'O), pero en el hemisferio norte, al noreste de la Isla Bering en Rusia (55°11'N, 166°8'E) y en el Archipiélago Kodiak, Alaska, Estados Unidos (entre 57°40'N, 152°19'W y 58°24'N, 152°31'W). En Rusia, se analizaron sueros de 89 individuos y en Estados Unidos sueros de 74 individuos utilizando ELISA de competencia (ELISAc). Se detectó la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. en un 28,1% y en un 1,3% de los ejemplares provenientes de Rusia y Estados Unidos, respectivamente. Complementariamente y mediante MAT, se

detectaron anticuerpos contra *Leptospira interrogans* para un 2,3% y un 1,3% de los individuos provenientes de Rusia y Estados Unidos, respectivamente.

Adicionalmente, dos especies de roedores y una de mustélido introducidos en la Isla Grande de Tierra del Fuego y que han sido invasores tremendamente exitosos son; el castor canadiense, la rata almizclera y el visón americano. En el hemisferio norte, se han descrito anticuerpos contra *Leptospira* spp. para los serovares Australis, Autumnalis y Pomona, a partir de suero de castores (Stuart *et al.*, 1978) y para los serovares Grippytyphosa y Ballum en suero de rata almizclera (Paul *et al.*, 1972). Mientras que, en Tierra del Fuego, se señala la presencia de los serovares Lai, Hardjo y Copenhageni para el visón americano en muestras de sangre y riñón (Núñez, 2013).

Tanto *Brucella canis* como *Leptospira* spp., son bacterias que representan una potencial amenaza para la fauna silvestre, en especial bajo presión antrópica, responsable de la destrucción de hábitat e introducción de especies exóticas en la Isla Grande de Tierra del Fuego. Los antecedentes expuestos, demuestran la presencia de ambos patógenos en el sur de Chile y también en Argentina, a unos 275 km (aprox.) al norte del lugar de estudio. Además, la presencia de ambos patógenos a latitudes similares en el hemisferio norte, sugiere que éstos pudiesen persistir en condiciones ambientales similares a las presentes en el archipiélago fueguino. Según la búsqueda bibliográfica realizada, hasta la fecha, no existen estudios publicados de estas enfermedades infecciosas en zorros o perros domésticos de la Isla Grande de Tierra del Fuego, Región de Magallanes y Antártica Chilena. Ambas enfermedades tienen el potencial de afectar al zorro culpeo fueguino, especie amenazada y endémica de la isla. Así, el objetivo de esta Memoria de Título fue pesquisar, a través de técnicas serológicas, la exposición a *B. canis* y *Leptospira* spp. en muestras de cánidos silvestres (zorros culpeo y zorros chilla) y domésticos (perros) provenientes de la Isla Grande de Tierra del Fuego.

OBJETIVO GENERAL

Detectar anticuerpos contra *Brucella canis* y *Leptospira* spp. en zorros culpeo (*Pseudalopex culpaeus*), zorros chilla (*Pseudalopex griseus*) y perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) de la Isla Grande de Tierra del Fuego, Región de Magallanes y Antártica Chilena.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Pesquisar la presencia de anticuerpos contra *Brucella canis* en zorros culpeo, zorros chilla y perros domésticos de la Isla Grande de Tierra del Fuego, Región de Magallanes y Antártica Chilena.
2. Pesquisar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. en zorros culpeo, zorros chilla y perros domésticos de la Isla Grande de Tierra del Fuego, Región de Magallanes y Antártica Chilena.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generalidades del área de estudio

El archipiélago de Tierra del Fuego se encuentra ubicado en el extremo austral de América del Sur, entre los océanos Atlántico y Pacífico, y siendo separado del continente por el Estrecho de Magallanes. La Isla Grande es la isla de mayor tamaño dentro de las cientos de islas que conforman el archipiélago fueguino (Lizarralde, 1993). En la Isla Grande se encuentra la provincia de Tierra del Fuego, correspondiente al territorio occidental, ubicada en el centro este de la XII Región de Magallanes y Antártica Chilena. Su capital provincial es la ciudad de Porvenir. La isla tiene una superficie de 29.484,7 km² y posee una población humana de 6.904 habitantes (Gobernación de Tierra del Fuego, 2015).

Diseño de estudio, recolección y tamaño de muestra

Se analizaron un total de 56 muestras de suero sanguíneo provenientes de cánidos silvestres y domésticos (15 zorros culpeo fueguino, 12 zorros chilla y 29 perros). En el caso de las muestras de zorros, éstas se obtuvieron de capturas vivas de animales, mientras que las muestras de perros se obtuvieron con el consentimiento de sus dueños. Todas ellas provinieron de animales clínicamente sanos ante el examen clínico. En el caso del muestreo en perros, se recabó información respecto a su manejo y estado sanitario, como por ejemplo vacunas administradas. Las muestras fueron geo referenciadas según el lugar de captura de cada una de las especies (anexo 1). Las muestras fueron recolectadas por el Dr. Cristóbal Briceño, en la Isla Grande de Tierra del Fuego, Región de Magallanes y Antártica Chilena, en un periodo comprendido entre los años 2008 y 2012. Estas muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (LaBFAVET) de la Universidad de Chile y en el Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos del Instituto de Salud Pública (ISP) del Ministerio de Salud.

Detección de anticuerpos contra *Brucella canis*

Siguiendo los estándares de bioseguridad para un laboratorio de serología, se utilizó el método de contrainmunolectroforesis (CIEF) con un antígeno LPS-R de *Brucella ovis*, obtenido mediante el método salino caliente (Díaz y Bosseray, 1973; Myers *et al.*, 1972). La

técnica se realizó bajo el protocolo del Laboratorio de Bacteriología, en el cual, se utilizaron portaobjetos barnizados con agar al 2%. Sobre estos, se depositaron 3 mL de agarosa al 1% en Buffer Barbital Sódico (pH 8,6) y se dejaron solidificar bajo refrigeración por al menos treinta minutos, para su posterior utilización. Una vez solidificados, se les realizaron perforaciones equidistantes entre sí. En las perforaciones del polo anódico (negativo) se puso el antígeno y en las del polo catódico (positivo) los sueros y antisueros (anexo 2).

Los portaobjetos se sometieron a una corrida electroforética durante 150 min. con un máximo de 210 volts y 7,5 miliamperios por cada portaobjeto. Una vez finalizada la corrida, los portaobjetos fueron situados en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 18 horas y, posteriormente, fueron sometidos a una inmersión en Citrato de Sodio al 5% durante treinta minutos, para eliminar así bandas de precipitación inespecíficas. La lectura e interpretación de los resultados se realizó utilizando una fuente lumínica bajo el portaobjetos, con el fin de visualizar las líneas de precipitación (reacción positiva) entre el antígeno y los sueros y antisueros (anexo 2). Como control positivo se utilizó un suero (antisuero) obtenido de una perra experimentalmente infectada con la cepa *B. canis* RM-6/66 (Laboratorio de Bacteriología) y como control negativo se utilizó suero de un perro clínicamente sano.

Detección de anticuerpos contra *Leptospira* spp.

La técnica utilizada fue la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) tanto cualitativa como cuantitativa, realizada en el Instituto de Salud Pública (ISP) bajo el protocolo de la OIE (2008a). Para MAT cualitativa se utilizaron cultivos previamente incubados en medio EMJH (Difco) a 30°C durante siete días. Luego, en tubos estériles, un volumen de cultivo de cada uno de los 19 serovares de *Leptospira* spp. (anexo 3) fue diluido en proporción de 1:1 en solución fisiológica tamponada estéril pH 7,6 (Solución de NaCl y Tampón Sörensen). Adicionalmente, se traspasaron 200 µL de cada suero en estudio a tubos de vidrio, los cuales fueron rotulados y calentados a 56°C durante treinta minutos, dejándose enfriar por 10 minutos. A continuación, cada muestra se diluyó en proporción de 1:25 de solución fisiológica estéril.

En placas de microtitulación de poliestireno, se depositaron 50 µL de solución fisiológica tamponada estéril en la primera fila (antígeno control) y 50 µL de cada muestra diluida en

las filas restantes. Se adicionaron 50 μ L de cada antígeno diluido en cada columna, incluyendo el antígeno control (figura 1). Luego, las placas fueron cubiertas con papel aluminio, para posteriormente ser colocadas en una bandeja y agitadas a 100 rpm durante un minuto. Posteriormente, las placas fueron incubadas en una estufa de cultivo (28°C) entre dos y cuatro horas. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se utilizó una pipeta multicanal para depositar entre 1 y 3 μ L de cada serie de muestras en un portaobjeto.

La lectura de cada una de las muestras se realizó en relación a la aglutinación del antígeno control correspondiente, utilizando para ello un microscopio de campo oscuro con aumento 10x. La interpretación se hizo por medio de la observación de la aglutinación a través de cruces (anexo 4), la que indicó si la reacción era o no positiva. En caso de las muestras que presentaron reacción positiva se realizó MAT cuantitativa.

Figura 1: Prueba de aglutinación microscópica cualitativa: Distribución de muestras y serovares de *Leptospira* spp. en placas de microtitulación

		Serovares					
Muestras	T + Ag 1	T + Ag 2	T + Ag 3	T + Ag 4	T + Ag 5	T + Ag n	
	S 1 + Ag 1	S 1 + Ag 2	S 1 + Ag 3	S 1 + Ag 4	S 1 + Ag 5	S 1 + Ag n	
	S 2 + Ag 1	S 2 + Ag 2	S 2 + Ag 3	S 2 + Ag 4	S 2 + Ag 5	S 2 + Ag n	
	S 3 + Ag 1	S 3 + Ag 2	S 3 + Ag 3	S 3 + Ag 4	S 3 + Ag 5	S 3 + Ag n	
	S n + Ag 1	S n + Ag 2	S n + Ag 3	S n + Ag 4	S n + Ag 5	S n + Ag n	

T: Solución fisiológica tamponada estéril, S: Suero, Ag: Antígeno (serovar)

La MAT cuantitativa se realizó utilizando el mismo procedimiento inicial de la MAT cualitativa, y en el caso que este se haya realizado en un periodo menor o igual a 24 hrs, sólo se procedió a recalentar el suero a 56° C por 10 minutos. Luego, las placas de microtitulación se organizaron conforme a la figura 2. Se depositaron 50 μ L de solución fisiológica tamponada estéril (antígeno control) en la primera columna, una titulación de 1:50 de la muestra en la segunda columna, y titulaciones seriadas de la muestra en solución fisiológica estéril hasta la titulación 1:3200 para las siguientes columnas. A su vez, cada antígeno diluido se puso en cada fila, incluyendo el antígeno control. La lectura se realizó de la misma forma que en MAT cualitativa.

Figura 2: Prueba de aglutinación microscópica cuantitativa: Distribución de titulaciones de la muestra y serovares de *Leptospira* spp. en placas de microtitulación

Muestra A (Titulaciones)						
Serovares	T + Ag 1	1/50 + Ag 1	1/100 + Ag 1	1/200 + Ag 1	1/n + Ag 1	1/3200 + Ag 1
	T + Ag 2	1/50 + Ag 2	1/100 + Ag 2	1/200 + Ag 2	1/n + Ag 2	1/3200 + Ag 2
	T + Ag 3	1/50 + Ag 3	1/100 + Ag 3	1/200 + Ag 3	1/n + Ag 3	1/3200 + Ag 3
	T + Ag 4	1/50 + Ag 4	1/100 + Ag 4	1/200 + Ag 4	1/n + Ag 4	1/3200 + Ag 4
	T + Ag n	1/50 + Ag n	1/100 + Ag n	1/200 + Ag n	1/n + Ag n	1/3200 + Ag n
T: Solución fisiológica tamponada estéril, Ag: Antígeno (serovar)						

Bioseguridad para la detección de anticuerpos contra *Leptospira* spp.

Se trabajó bajo la tutela del Tecnólogo Médico Sr. Roberto Flores, encargado del Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos del Instituto de Salud Pública (ISP), lugar donde se realizó la detección de anticuerpos contra *Leptospira* spp. Este patógeno debió ser manipulado de acuerdo al nivel II de bioseguridad correspondiente a la clasificación internacional de riesgo (anexo 5). Dentro de este nivel se encuentran medidas como el contar con puertas con señaléticas de advertencia de riesgo biológico, gabinetes de bioseguridad, autoclaves, áreas de primeros auxilios, entre otros. Además, estipula que sólo puede ingresar personal autorizado, quienes deben llevar protección personal consistente en delantal, guantes, gafas de seguridad y viseras; quedando estrictamente prohibido el egreso de cualquier elemento del recinto, incluido delantales.

Análisis de datos y procedimiento estadístico

Los resultados de las muestras estudiadas fueron analizados mediante estadística descriptiva, la que determinó la frecuencia de las reacciones positivas para *Leptospira* spp. en zorros culpeo, zorros chilla y perros domésticos de la Isla Grande de Tierra del Fuego.

RESULTADOS

Brucelosis canina

La contraelectroforesis (CIEF) al ser utilizada para la detección de anticuerpos contra *Brucella canis*, entregó resultados negativos para la totalidad de las muestras de cánidos de la Isla Grande de Tierra del Fuego (tabla 1).

Tabla 1: Resultados de la detección de anticuerpos contra <i>Brucella canis</i> mediante contraelectroforesis en muestras de cánidos silvestres y domésticos de la Isla Grande de Tierra del Fuego			
Especie Animal	Nº de muestras	Positivos	Negativos
Zorros culpeo	15	0	15
Zorros chilla	11	0	11
Perros domésticos	29	0	29

Leptospirosis

La prueba de aglutinación microscópica (MAT) cualitativa y cuantitativa al ser utilizada para la detección de anticuerpos contra *Leptospira* spp., entregó resultados positivos para tres muestras de zorro culpeo (20%), una de zorro chilla (8,3%) y una de perro doméstico (3,4%), de la totalidad de las muestras de cánidos de la Isla Grande de Tierra del Fuego, siendo considerado un hallazgo en estos animales (tabla 2). A su vez, estos individuos presentaron reactividad a distintos serovares. Para zorro culpeo se halló la presencia del serovar Ballum en una muestra, del serovar Australis en una muestra y de los serovares Antumnalis, Borincana e Icterohaemorrhagiae en una muestra; para zorro chilla sólo se detectó la presencia del serovar Antumnalis en una muestra; y finalmente para perro doméstico se detectó la presencia de los serovares Antumnalis y Georgia en una muestra (tabla 2).

Tabla 2: Prevalencia de animales seropositivos a los diferentes serovares de <i>Leptospira</i> spp. mediante la prueba de aglutinación microscópica en muestras de cánidos silvestres y domésticos de la Isla Grande de Tierra del Fuego			
Especie Animal	N° de la muestra	Serovar de <i>Leptospira</i> spp.	Prevalencia de seropositivos según la especie animal
Zorros culpeo	2	Ballum	20%
	5	Australis	
	9	Autumnalis Borincana Icterohaemorrhagiae	
Zorros chilla	2	Autumnalis	8,3%
Perros domésticos	27	Autumnalis Georgia	3,4%

Los resultados de MAT cualitativa (título 1:25) y cuantitativa (títulos 1:50 – 1:3200) se detallan en las tablas 3A, 3B y 3C.

Tabla 3A: Resultados de las aglutinaciones a las distintas titulaciones de la prueba de aglutinación microscópica para cada serovar de *Leptospira* spp. en muestras de zorros culpeo (*Pseudalopex culpaeus*) de la Isla Grande de Tierra del Fuego

N° de la muestra	Serovar	Control	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
1	Australis	-	++	+	+/-	-	-	-	-	-
	Ballum	-	+++	+	+/-	-	-	-	-	-
2	Ballum	-	+++	++	+	-	-	-	-	-
4	Australis	-	++	+	+/-	-	-	-	-	-
5	Australis	-	++	++	+	+	-	-	-	-
8	Australis	-	++	+	+/-	-	-	-	-	-
	Antumnalis	-	++	+	+/-	+/-	-	-	-	-
9	Australis	-	++	+	+	-	-	-	-	-
	Antumnalis	-	++	++	+	+/-	-	-	-	-
	Bataviae	-	++	+	+/-	-	-	-	-	-
	Borincana	-	+++	++	+	+/-	+/-	-	-	-
	Icterohaemorrhagiae	-	+++	++	+/-	-	-	-	-	-

Tabla 3B: Resultados de las aglutinaciones a las distintas titulaciones de la prueba de aglutinación microscópica para cada serovar de *Leptospira* spp. en muestras de zorros chilla (*Pseudalopex griseus*) de la Isla Grande de Tierra del Fuego

N° de la muestra	Serovar	Control	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
2	Antumnalis	-	++	++	+	+	+/-	-	-	-
	Ballum	-	++	+	+/-	-	-	-	-	-
6	Australis	-	+	+	+/-	-	+/-	-	-	-
	Antumnalis	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-

Tabla 3C: Resultados de las aglutinaciones a las distintas titulaciones de la prueba de aglutinación microscópica para cada serovar de <i>Leptospira</i> spp. en muestras de perros domésticos (<i>Canis lupus familiaris</i>) de la Isla Grande de Tierra del Fuego										
Nº de la muestra	Serovar	Control	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
16	Australis	-	++	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
	Autumnalis	-	++	+	+	+/-	-	-	-	-
	Ballum	-	+	+/-	-	-	-	-	-	-
	Bataviae	-	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-
	Georgia	-	++	+	+	+/-	-	-	-	-
19	Australis	-	+	+	+/-	-	-	-	-	-
	Ballum	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
27	Autumnalis	-	+++	+++	+	+	+/-	-	-	-
	Georgia	-	+++	+++	++	+/-	-	-	-	-
29	Autumnalis	-	++	+	+/-	-	-	-	-	-
	Bataviae	-	+++	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
30	Autumnalis	-	++	+	-	-	-	-	-	-

Los resultados con cruces en las diferentes titulaciones se basan en la interpretación de la aglutinación de cada reacción, tal como lo señala el anexo 4. Siendo el punto de corte entregado por el ISP, para seres humanos, aquellas muestras cuya titulación sea igual o superior a la titulación 1:200 con un 50% de aglutinación (++)

DISCUSIÓN

En la presente Memoria de Título se analizaron en total 55 muestras para *Brucella canis* de las 56 inicialmente contempladas (15 zorros culpeo fueguino, 11 zorros chilla y 30 perros). Esto debido a que una de ellas, procedente de un perro doméstico, contuvo una escasa cantidad de suero para ser analizada. Por otro lado, para *Leptospira* spp., se sumó una muestra de zorro chilla inicialmente no contemplada a la cantidad anteriormente señalada, analizando en total 56 muestras.

Los resultados obtenidos en las pruebas realizados a estas muestras, tanto la ausencia de anticuerpos contra *B. canis* como la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp., pudieron ser producto de la conservación de las mismas, sobre todo si estas fueron analizadas tres años posteriores a su recolección. Debido a que estas muestras fueron conservadas a -20°C, temperatura a la cual se describe que pueden deteriorarse y no ser apropiadas por la potencial pérdida de propiedades inmunológicas y bioquímicas, más aún si se almacena durante largos períodos de tiempo. Así, la temperatura óptima de almacenamiento a largo plazo para muestras serológicas animales, que sugiere la Organización Mundial de Sanidad Animal, debiese ser menor a los -60°C (OIE, 2008b). Situación similar se describe para muestras de seres humanos, debiendo ser conservadas a -70°C (Prats, 2005). Aunque esto se contradice con lo observado en la práctica, en la cual se ha visto que algunas muestras serológicas continúan reaccionando al ser utilizadas por largos periodos de tiempo. Por ejemplo, esto ocurre con el antígeno LPS-R de *Brucella ovis* y sueros controles utilizados para *B. canis* en este estudio, los cuáles superan los diez años de vigencia. Ello, aun cuando se describe que el congelamiento y descongelamiento reiterado de los reactivos puede afectar su calidad, ante lo cual existe como solución el realizar alícuotas de ellos¹. Por lo tanto, a pesar de estos antecedentes, se asumirá que los resultados obtenidos son fidedignos a los análisis realizados, tanto para la brucelosis canina como para la leptospirosis.

Para brucelosis canina, la totalidad de las muestras entregó resultados negativos para la detección de anticuerpos contra *B. canis* utilizando CIEF. Estos resultados se pueden explicar

¹ Comunicación personal: Cristóbal Briceño, Consuelo Borie y Pedro Abalos, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

debido a que los anticuerpos contra *B. canis* pueden estar ausentes durante las primeras etapas de la infección, así como en infecciones crónicas, o porque los individuos no hayan estado expuestos a la bacteria (CFSPH, 2012); pudiendo ser detectados en perros entre los 7 a 14 días post infección, alcanzando altos niveles entre los 21 a 35 días post infección (Lee *et al.*, 2010).

El diagnóstico definitivo de *B. canis* se realiza mediante cultivo, pudiendo ser aislada en diversos medios, aunque su detección es difícil. Esto, debido a su lento crecimiento y al riesgo de contaminación con otras bacterias en muestras no estériles (CFSPH, 2012). Sin embargo, para su diagnóstico directo se puede utilizar la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) y como diagnóstico indirecto, pruebas serológicas tales como CIEF, AGID (Inmunodifusión en Gel de Agar) y ELISA (CFSPH, 2012).

Son estas mismas pruebas serológicas las que han ayudado a documentar la presencia y tasas de infección de brucelosis canina en otros países latinoamericanos y cuyos resultados contradicen a los de la presente investigación, específicamente en perros. Un ejemplo de ello son las pruebas realizadas en Patos, Estado de Paraíba, Brasil, por Fonseca *et al.* (2011). Ellos estudiaron un total de 193 sueros de perros que se obtuvieron bajo consentimiento de sus dueños en el Centro Médico Veterinario del Dr. Leonardo Torres y en la Clínica de Pequeños Animales del Hospital Veterinario de Universidad Federal de Campina Grande. En este caso se obtuvo un 3,11% de seropositivos a *B. canis* por medio de AGID con posterior confirmación por PCR. De la misma forma en Buenos Aires, Argentina, Boeri *et al.* (2008) realizaron un estudio bajo un programa del Instituto de Zoonosis Luis Pasteur. Para ello utilizaron como técnica serológica AGID, señalando que de 219 perros (184 hembras y 35 machos) el 7,3% (9 hembras y 7 machos) fue serológicamente positivo a *B. canis*. De los positivos, fue posible recolectar muestras sanguíneas en trece de ellos para hemocultivo, de los cuales se logró el aislamiento de *B. canis* en tres. Finalmente, en Ciudad de Río Grande, Tierra del Fuego, Argentina, se señala una prevalencia de un 28,1% en un muestro serológico realizado a 97 perros para *B. canis* (DEIS, 2013).

Por otro lado, existen estudios que dan a conocer distintas prevalencias para *B. canis* en diferentes especies de cánidos silvestres. Por ejemplo, en Serbia, Cirović *et al.* (2014) analizaron muestras de bazo de un total de 216 chacales dorados (*Canis aureus*), de los cuales

se obtuvo una prevalencia de un 1,9% a través de PCR. En otro estudio, realizado en los estados de Pernambuco y Paraíba en tres zoológicos al noreste de Brasil, Oliveira *et al.* (2012) estudiaron sueros de 17 coatis (*Nasua nasua*), 3 zorros Hoary (*Lycalopex vetulus*), 2 leopardos tigre (*Leopardus tigrinus*) y 5 tayras (*Eira barbara*) con la prueba AGID. Los resultados se detallan en la figura 3.

Figura 3: Prevalencia de seropositivos a *Brucella canis* en coatis, zorros Hoary, leopardos tigre y tayras, por medio de inmunodifusión en gel de agar

Agente	Coatis	Zorros Hoary	Leopardos Tigre	Tayras
<i>Brucella canis</i>	18%	33%	50%	40%

Fuente: Oliveira *et al.*, 2012

Esta investigación se suma al estudio realizado en Argentina, a unos 275 km al norte de la Isla Grande de Tierra del Fuego. En el cual Martino *et al.* (2004) analizaron el suero de 28 zorros culpeo y 56 zorros chilla de vida libre. Obteniéndose para *Brucella* spp. un 17,8% de seropositividad (ocho culpeos y siete chillas respectivamente) a través de ELISA. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta memoria difieren de otros estudios realizados tanto en otros cánidos silvestres como en las mismas especies silvestres estudiadas.

Así, dadas las investigaciones anteriores y, apoyadas por otras realizadas en Chile, Argentina, Rusia y Estados Unidos ya presentadas, se consideró posible la seropositividad para *B. canis* en la Isla Grande de Tierra del Fuego. Sin embargo, los análisis llevados a cabo en este estudio descartaron la presencia de anticuerpos contra *B. canis* en los cánidos muestreados. Esto puede deberse a que no hayan estado expuestos a la bacteria, las particularidades de la infección de *B. canis* en el organismo y/o por la ubicación de los animales analizados, a pesar de los antecedentes que acreditan su presencia en el lugar.

Para leptospirosis, los resultados se pueden explicar por diversas razones, tales como las relacionadas a las características de *Leptospira* spp. en el organismo y/o la ubicación de los animales analizados, al igual que se plantea con brucelosis canina más arriba.

En el caso de leptospirosis, los anticuerpos contra *Leptospira* spp. pueden no estar presentes a comienzos de la enfermedad, ser indetectables en algunos animales infectados crónicamente o no encontrarse debido a que los animales no se infectaron con el patógeno (CFSPH, 2013); pudiendo ser detectados entre los 6 a 12 días post infección, alcanzando altos niveles entre los 22 a 28 días post infección (Luna *et al.*, 2008). Además, debemos considerar el estado de vacunación en que se encontraban los animales, específicamente los perros domésticos (CFSPH, 2013), ya que en Chile existen vacunas que contienen los serovares Canicola e Icterohaemorrhagiae de *Leptospira* spp. inactivados, como la vacuna Recombitek C6/CV. De hecho, en el presente estudio sólo tres ejemplares de perros domésticos habían sido vacunados, obteniéndose resultados negativos para ellos. Aquello, se puede explicar debido principalmente a que estos ejemplares habían sido vacunados tan sólo una vez en la vida, por lo que los anticuerpos circulantes podrían haber sido prácticamente nulos.

El diagnóstico definitivo de *Leptospira* spp. es el cultivo. Esta espiroqueta puede aislarse por diversos medios, pero es una bacteria delicada y de crecimiento lento; y dependiendo del serovar pueden tardarse aún más (CFSPH, 2013), variando entre los 2 a 20 días, siendo el promedio 7 días (Zunino y Pizarro, 2007). De esta forma, las pruebas serológicas más comunes en animales son MAT y ELISA. De hecho, en este estudio con el fin de pesquisar indirectamente *Leptospira* spp. se utilizó MAT, el cual detecta anticuerpos contra una selección de serovares de *Leptospira* (CFSPH, 2013). Se utilizaron 19 serovares de *Leptospira* spp., existiendo así la posibilidad de que hubiese algún otro serovar presente.

Así, se debe recordar que en el ISP se realizó MAT cualitativa y cuantitativa. Para MAT cualitativa hubo muestras que denotaron una titulación 1:25 con dos o más cruces a la lectura. Mientras que, por otro lado, para MAT cuantitativa hubieron seis muestras de zorros culpeo, dos de zorros chilla y cinco de perros domésticos que entregaron titulaciones que no sobrepasaron la titulación 1:100 con un 50% de aglutinación (++), esto en perros domésticos, siendo consideradas así negativas para el ISP. Lo anterior dado que el ISP considera en seres humanos como casos positivos aquellas muestras cuya titulación sea igual o superior a la

titulación 1:200 con un 50% de aglutinación (++)². Según la OIE (2008a), se considera como positiva aquella muestra que presenta una titulación 1:100 con un 50% de aglutinación, ello en general para las distintas especies animales. Este último es el criterio en el cual se basa el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), el cual, utiliza una selección de cinco serovares principalmente para el ganado, los cuales son: Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona y Hardjo. Esto, dado los estudios de prevalencia realizados a nivel nacional³. De esta forma, la selección de serovares utilizada por el SAG coincide con la manejada por el ISP, y en consecuencia con la utilizada en el presente estudio.

Por otro lado, Roqueplo *et al.* (2013) señalan en carnívoros títulos de corte de 1:40, para perros y gatos analizados en su estudio. Este punto de corte coincide con el trabajo realizado por Senthil *et al.* (2013) en perros, quienes definen como muestras positivas a las que presenten títulos mínimos de 1:40 en áreas donde *Leptospira* spp. es endémica. Por otra parte, existen investigadores como Silva y Riedemann (2007) quienes estipulan como positivas a aquellas muestras cuyos títulos son iguales o mayores a 1:100. Situación similar expone Tuemmers *et al.* (2013b), quienes definen a muestras con títulos de 1:100 o 1:200 como positividad baja, títulos de 1:400 como positividad moderada y títulos sobre 1:400 como positividad alta. Incluso, hay investigadores que señalan como casos positivos a aquellas muestras cuya titulación sea igual o superior a 1:1600, como Gautam *et al.* (2010). Para zorros culpeo y zorros chilla, Martino *et al.* (2004) también señalan como positivas a aquellas muestras cuyos títulos son iguales o superiores a la titulación 1:100.

Leptospirosis es considerada a nivel nacional como una enfermedad endémica, siendo catalogada a partir del año 2004 como una enfermedad de notificación obligatoria inmediata (MINSAL, 2004). Así, se tendrá presente aquello debido a que no existen antecedentes que describan la situación epidemiológica actual de *Leptospira* spp. en la Isla Grande de Tierra del Fuego.

² Comunicación personal: Roberto Flores, Laboratorio de Agentes Emergentes y Zoonóticos, Instituto de Salud Pública.

³ Comunicación personal: Alexa Pessoa, Unidad de Bacteriología Pecuaria, Servicio Agrícola Ganadero.

Por lo tanto, ante los antecedentes expuestos, se consideró como casos positivos aquellas muestras que para MAT cuantitativa presentaron una titulación 1:50 con un 50% de aglutinación (++). Ello, tomando como corte mínimo documentado la titulación 1:40 para caninos pertenecientes a áreas endémicas de la enfermedad.

Por otro lado, se cuestiona el criterio utilizado por los diferentes autores al momento de definir sus puntos de corte, ya que se desconoce si estos consideran o no variables como el factor endémico del patógeno. Pudiendo existir así casos de leptospirosis no detectados y en consecuencia, un mayor impacto de esta enfermedad en las distintas poblaciones animales.

En el presente estudio se logró determinar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* a través de MAT. Otros estudios que han hallado anticuerpos contra la espiroqueta, han encontrado tasas de infección diferentes. En Curitiba, Estado de Paraná, Brasil, bajo el apoyo del Centro de Control de Zoonosis de la Ciudad de Pinhais, se realizó un muestreo serológico a través de MAT con una titulación 1:100 como título de corte. Para el año 2009, el 14,4% de 228 perros fue seropositivo a *Leptospira* spp., mientras que en el año 2010, el 38,9% de 90 fue seropositivo. Los serovares más prevalentes fueron Canicola (33,4%) e Icterohemorragia (51,4%) para los años 2009 y 2010 respectivamente (Marinelli *et al.*, 2013). Más al sur, en Rosario, Argentina, se realizó una investigación desarrollada en el Instituto Municipal de Sanidad Animal (IMUSA). Se llevó a cabo con 156 muestras de perros que fueron analizadas mediante MAT con una titulación 1:100 como punto de corte. Del total de muestras, 14,10% resultaron positivas, de éstas se hallaron un 54,54% positivas al serovar Castellonis, 31,81% a Canicola, 4,54% a Pyrogenes, 4,54% a Pomona y 4,54% a Icterohaemorrhagiae (Seghesso *et al.*, 2013).

Los resultados de los autores anteriores, más otros como Tuemmers *et al.* (2013a), Silva y Riedemann (2007), Martino *et al.* (2004) y Goldstein *et al.* (2011) ya descritos, concuerdan con los casos positivos obtenidos en la Isla Grande de Tierra del Fuego para *Leptospira* spp. Describiéndose en el presente estudio la presencia del serovar Antumnalis para las tres especies estudiadas en común. Para zorro culpeo se halló la presencia del serovar Ballum en una muestra, del serovar Australis en una muestra y de los serovares Antumnalis, Borincana e Icterohaemorrhagiae en una muestra; para zorro chilla sólo se detectó la presencia del serovar Antumnalis en una muestra; y finalmente para perro doméstico se halló la presencia de los

serovares *Autumnalis* y *Georgia* en una muestra. Sin embargo, es posible que en las pruebas realizadas haya existido reacción cruzada entre los serovares utilizados; reacción cruzada que también pudo haber ocurrido con algún otro serovar no utilizado (OIE, 2008a). Aun así, este estudio da nuevos antecedentes sobre cuáles son los posibles serovares circulantes entre estas tres especies. Situación que difiere de lo entregado por Martino *et al.* (2004) para zorros culpeo y zorros chilla, quienes señalan que trece sueros presentaron reactividad a un único serovar, mientras que quince exhibieron anticuerpos a múltiples serovares. Así, en diez muestras se obtuvieron los serovares *Sejroe* y *Grippothyphosa*, en ocho el serovar *Icterohaemorrhagiae*, en cinco los serovares *Canicola* y *Hardjo*, y en tres los serovares *Tarassovi* y *Ballum*. Teniendo como coincidencia con el presente estudio la presencia de los serovares *Icterohaemorrhagiae* y *Ballum*. Por lo tanto, se sugiere realizar nuevas indagaciones que expliquen este fenómeno de mejor manera.

Finalmente, en relación a otras especies animales, se debe recordar los trabajos mencionados anteriormente por Stuart *et al.* (1978) y Paul *et al.* (1972) realizados en el hemisferio norte, y por Núñez (2013) realizado en Tierra del Fuego. En ellos, se mencionan a los serovares *Australis*, *Autumnalis* y *Pomona* para el castor canadiense, *Grippotyphosa* y *Ballum* para la rata almizclera y *Lai*, *Hardjo* y *Copenhageni* para el visón americano; coincidiendo en los serovares *Australis*, *Autumnalis* y *Ballum* con los resultados del presente estudio. En tanto que en Valdivia también existen antecedentes sobre *Leptospira* spp. en roedores, describiéndose la presencia de los serovares *Pomona*, *Hardjo*, *Javanica*, *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* (Riedemann *et al.*, 1994), habiendo coincidencia con los resultados del presente estudio en el serovar *Icterohaemorrhagiae*.

Dado los antecedentes de potenciales hospedadores presentes en el archipiélago fueguino y la posible transmisión horizontal de *Leptospira* spp. entre ellos, se esperaba tener un mayor número de animales positivos. De hecho, existen antecedentes de que el castor canadiense, la rata almizclera y el visón americano efectivamente presentan un alto grado de interacción. Por un lado, se señala una asociación positiva entre la presencia de la rata almizclera y los hábitats modificados por el castor canadiense, indicando una preferencia por esta hacia los ecosistemas modificados, no así hacia las corrientes naturales (Crego *et al.*, 2016). En tanto que el visón americano tiene una dieta que consiste principalmente en mamíferos (37%), aves

(36%) y peces (24%), de los primeros la rata almizclera es su principal presa, junto al roedor endémico *Abrothrix xanthorhinus* (Schuttler *et al.*, 2008). Por lo tanto, el castor canadiense desempeña un rol importante en la existencia de la rata almizclera, la cual a su vez sostiene a la población del visón americano (Crego *et al.*, 2016). Siendo estas interacciones importantes debido a la posible transmisión horizontal de *Leptospira* spp., en particular de los serovares Australis, Autumnalis, Pomona, Grippytyphosa, Ballum, Lai, Hardjo y Copenhageni (Paul *et al.*, 1972; Stuart *et al.*, 1978; Núñez, 2013). Además se sugiere profundizar en futuras investigaciones si, producto de la orina liberada por estos mamíferos acuáticos en las cuencas hidrográficas donde habitan, esta bacteria pudiese dispersarse río abajo e infectar a otras especies animales.

Los cánidos presentados en este estudio tienen una dieta variada, pudiendo incorporar a ciertos mamíferos acuáticos en ella. Así, por ejemplo, en Tierra del Fuego la dieta del zorro culpeo está compuesta principalmente por pequeños mamíferos e insectos (Jaksic *et al.*, 1983). En tanto que en Argentina, la dieta del zorro chilla es abundante en insectos, leguminosas y cactáceas, además de roedores, aves, escorpiones y gramíneas (Núñez y Bozzolo, 2006). Por lo tanto efectivamente existe la posibilidad de que estos cánidos puedan depredar especies mamíferas acuáticas como las expuestas anteriormente, sumadas a otras especies animales como roedores, pudiendo ser infectados con *Leptospira* spp.

Así, existen indagaciones que entregan datos sobre la posible importancia de los roedores silvestres en la circulación de *Leptospira* spp. entre las especies animales con las que comparten su hábitat. En el Municipio de Villa Soto la Marina, Tamaulipas, México, Méndez *et al.* (2013) estudiaron un total de 24 roedores, 6 caninos, 220 bovinos y 24 equinos con la prueba MAT, empleando 12 serovariedades de *Leptospira* spp.; a excepción de los roedores los que se evaluaron contra siete. Los resultados se detallan en la figura 4.

Figura 4: Prevalencia de serovares de *Leptospira* spp. en roedores, caninos, bovinos y equinos, por medio de la prueba de aglutinación microscópica

Serovar	Roedores	Caninos	Bovinos	Equinos
Icterohaemorrhagiae	37%	66%	0%	0%
Grippotyphosa	14%	16%	0,4%	4%
Tarassovi	12%	0%	9%	41%
Canicola	4%	66%	25%	0%

Fuente: Méndez *et al.*, 2013

Esta investigación se suma a un estudio realizado al sur de Chile, desde Ñuble hasta Llanquihue, en el cual señalan la existencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. en varias especies animales domésticas, como perros (41,98%) con presencia de los serovares Canicola y Copenhageni; ovinos (7,14%) con el serovar Copenhageni; bovinos (59,15%) con los serovares Hebdomadis y Pomona; equinos (48,53%) con los serovares Copenhageni, Canicola y Poi; caprinos (24,85%) con el serovar Canicola; y porcinos (69,92%) con los serovares Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola y Sentot (Zamora *et al.*, 1975). Reportes más recientes, desde Los Ángeles hasta Valdivia, indican prevalencias para *Leptospira* spp. de un 37% para perros, 24,9% para ovinos, 88,7% para bovinos, 7,1% para equinos y 69,9% para porcinos (Zunino y Pizarro, 2007). Lo que podría indicar también una posible transmisión horizontal de enfermedades infecciosas entre la fauna silvestre y la fauna doméstica, situación similar podría ocurrir entre especies animales domésticas, sumado a los ataques efectuados por el perro hacia el ganado ovino.

Por lo tanto, debido a que perros domésticos, zorros culpeo y zorros chilla comparten hábitat con otros individuos, es posible la transmisión de enfermedades infecciosas entre ellos. Situación que se ve favorecida dada la interacción del zorro fueguino con el perro doméstico o asilvestrado por la depredación de éste en algunas áreas, y con el zorro chilla por la competencia con él desde que fue introducido; siendo ambas causales de la disminución de su población (CONAMA, 2009). Por esto, se manifiesta la necesidad de estudiar si

efectivamente existe una transmisión efectiva de estos patógenos entre estos animales en el archipiélago fueguino, en este caso de *Leptospira* spp. Para esto, el método ideal sería el aislamiento para así, caracterizar molecularmente las cepas, con el fin de trazar su origen e indagar que rol desempeñan sus hospedadores en la interacción con otras especies animales.

En la actualidad no existen estimaciones sobre la población total del zorro fueguino, sin embargo, se lo considera escaso y presente casi exclusivamente en ambientes boscosos densos del sur de Tierra del Fuego. Dejando a ésta subespecie en categoría de conservación “Vulnerable” en el Reglamento para la Clasificación de Especies Silvestres, clasificada como “En Peligro” por el Simposio de Vertebrados Terrestres (Libro Rojo de CONAF) y por el Reglamento de la Ley de Caza, y estar en el Apéndice II de CITES (CONAMA, 2009). Así, surge la necesidad de continuar con futuros estudios que evalúen amenazas silenciosas como lo son las enfermedades infecciosas (brucelosis canina, leptospirosis, entre otras), teniendo como objetivo final la preservación de especies endémicas como el *P. c. lycoides*, las que podrían estar bajo una amenaza mayor a la proyectada actualmente.

CONCLUSIÓN

El análisis de las muestras provenientes de zorros culpeo (*Pseudalopex culpaeus*), zorros chilla (*Pseudalopex griseus*) y perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) de la Isla Grande de Tierra del Fuego, Región de Magallanes y Antártica Chilena, arrojó ausencia de anticuerpos contra *Brucella canis*, al utilizar CIEF, y bajas tasas de infección para *Leptospira* spp, al utilizar MAT, siendo consideradas un hallazgo.

Por lo tanto, la presente Memoria de Título entrega por primera vez antecedentes sobre la ausencia de anticuerpos contra *B. canis* y la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. en una población de cánidos silvestres y domésticos en la Isla Grande de Tierra del Fuego, Región de Magallanes y Antártica Chilena. Entregando recomendaciones y sugerencias para futuras investigaciones, teniendo como fin la preservación de especies endémicas. Encontrándose estas últimas en un estado aún más vulnerable al creído, producto principalmente de la intervención humana, la cual ha generado que algunas enfermedades infecciosas, como leptospirosis, comiencen a afectarlas.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON, C.; GRIFFITH, C.; ROSEMOND, A.; ROZZI, R.; DOLLENZ, O.** 2006. The effects of invasive North American beavers on riparian plant communities in Cape Horn, Chile: do exotic beavers engineer differently in Sub-Antarctic ecosystems?. *Biol Conserv.* 128: 467-474.
- ANÓNIMO.** 2016. Fauna de Tierra del Fuego. [en línea]. <http://gef-educacion.ambiente.gov.ar/archivos/web/GEF_educacion/File/TDF/Fauna%20de%20Tierra%20del%20Fuego.pdf>. [consulta: 24-04-2016].
- ATALAH, A.; SIELFELD, W.; VENEGAS, C.** 1980. Antecedentes sobre el nicho trófico de *Canis G. Griseus* Gray 1936 en Tierra del Fuego. *Ans Inst Pat.* 11: 259-271.
- BOERI, E.; ESCOBAR, G.; AYALA, S.; SOSA, S.; LUCERO, N.** 2008. Brucelosis canina en perros de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina.* 68(4): 291-297.
- CFSPH (THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH).** 2009. Brucelosis. [en línea]. <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucelosis.pdf>>. [consulta: 28-06-2015].
- CFSPH (THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH).** 2012. Canine Brucellosis: *Brucella canis*. [en línea]. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf>. [consulta: 28-06-2015].
- CFSPH (THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH).** 2013. Leptospirosis. [en línea]. <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leptospirosis.pdf>>. [consulta: 24-05-2015].
- CHAPMAN, A.** 1977. Economía de los Selk'nam de Tierra del Fuego. *J Soc Am.* 64: 135-148.
- CIROVIĆ, D.; CHOCHLAKIS, D.; TOMANOVIĆ, S.; SUKARA, R.; PENEZIĆ, A.; TSELENTIS, Y.; PSAROULAKI, A.** 2014. Presence of *Leishmania* and *Brucella* species in the golden jackal *Canis aureus* in Serbia. *Biomed Res Int.* 6 pp.
- CONAMA (COMISIÓN NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE).** 2009. Especies Amenazadas de Chile, Protejámoslas y evitemos su extinción. Santiago, Chile. 120 pp.
- CREGO, R.; JIMÉNEZ, J.; ROZZI, R.** 2016. A synergistic trio of invasive mammals? Facilitative interactions among beavers, muskrats, and mink at the southern end of the Americas. *Biol Invasions.* 16 pp.
- DEIS (DIRECCIÓN DE EPIDEMIOLOGÍA E INFORMACIÓN DE LA SALUD).** 2013. Resumen Ejecutivo. Brucelosis: puntualizaciones respecto de población expuesta a *B. canis*. Informe Técnico 03/2013. Ministerio de Salud de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur.

- DÍAZ, R.; BOSSERAY, N.** 1973. Identification d'un composé antigénique spécifique de la phase rugueuse (R) des *Brucella*. Ann Rech Vet. 4: 283–292.
- DURAN, J.; CATTAN, P.; YANEZ, J.** 1985. The grey fox *Canis griseus* (Gray) in chilean patagonia (Southern Chile). Biol Conserv. 34(2): 141-148.
- EBANI, V.; CERRI, D.; FRATINI, F.; BEY, R.; ANDREANI, E.** 2003. Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis*. New Microbiol. 26: 65-73.
- FABRO, E.** 2015. Mamíferos de Tierra del Fuego. [en línea]. <<http://www2.medioambiente.gov.ar/sian/TFUEGO/fauna.htm>>. [consulta: 24-05-2015].
- FONSECA, A.; SANTOS, S.; PIATTI, R.; SCARCELLI, E.; ELIDE, M.; SANTOS, A.; AMERICO, C.; ALVES, C.** 2011. *Brucella canis* infection in dogs attended in veterinary clinics from Patos, Paraíba State, Brazil. Braz J Microbiol. 42: 1405-1408.
- GALLO, E.; LENCINAS, M.; PASTUR, G.** 2005. Modificación de la biodiversidad por el manejo forestal: plantas, aves e insectos. Mamíferos. Módulo Lengua, Subproyecto 4. 29 pp.
- GAUTAM, R.; GUPTILL, L.; WU, C.; POTTER, A.; MOORE, G.** 2010. Spatial and spatio-temporal clustering of overall and serovar-specific *Leptospira* microscopic agglutination test (MAT) seropositivity among dogs in the United States from 2000 through 2007. Prev Vet Med 96: 122–131.
- GOBERNACIÓN DE TIERRA DEL FUEGO.** 2015. Provincia de Tierra del Fuego. [en línea]. <http://www.gobernaciontierradelfuego.gov.cl/media/2015/05/infromacion_geografica_2.pdf>. [consulta: 24-05-2015].
- GOLDSTEIN, T.; GILL, V.; TUOMI, P.; MONSON, D.; BURDIN, A.; CONRAD, P.; DUNN, J.; FIELD, C.; JOHNSON, C.; JESSUP, D.; BODKIN, J.; DOROFF, A.** 2011. Assessment of clinical pathology and pathogen exposure in sea otters (*Enhydra lutris*) bordering the threatened population in Alaska. J Wildlife Dis. 47(3): 579-592.
- INE (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA).** 2010. Encuesta de Ganado Ovino, 2010. [en línea]. <http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/230611/o_vino_10220611.pdf>. [consulta: 04-03-2016].
- IRIARTE, A.** 2008. Mamíferos de Chile. Lynx Edicions. Barcelona, España. 420 pp.
- JAKSIC, F.; YÁÑEZ, J.; RAU, J.** 1983. Trophic relations of the southernmost populations of *Dusicyon* in Chile. J Mammal. 64: 693-697.
- JAKSIC, F.; IRIARTE, J.; JIMENEZ, J.; MARTÍNEZ, D.** 2002. Invaders without frontiers: cross-border invasions of exotic mammals. Biol Invasions. 4: 157-173.
- JONES, K.; PATEL, N.; LEVY, M.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J.; DASZAK, P.** 2008. Global trends in emerging infectious diseases. Nature. 451: 990-994.

- LEE, S.; ISLAM, M.; KHATUN, M.; CHOI, G.; JUNG, J.; BAEK, B.; KAKOMA, I.** 2010. Immunoglobulin profiles in acute Brucellosis experimentally induced by *Brucella canis* in BALB/c mice. Vector Borne Zoonotic Dis. 10: 927-930.
- LIZARRALDE, M.** 1993. Current status of the beaver (*Castor canadensis*) introduced in Tierra del Fuego (Argentina). J Hum Behav Soc Environ. 22: 351-358.
- LIZARRALDE, M.; ESCOBAR, J.** 2000. Mamíferos exóticos en la Tierra del Fuego. Ciencia Hoy. Argentina. 10: 52-63.
- LUNA, A.; MOLES, C.; GAVALDÓN, R.; NAVA, V.; SALAZAR, G.** 2008. La leptospirosis canina y su problemática en México. Rev Salud Anim. 30: 1-11.
- MARINELLI, C.; DA CONCEIÇÃO, C.; MARTINS, C.; KIKUTI, M.; ULLMANN, L.; DOS SANTOS, R.; LEÔNIDAS, J.; LANGONI, H.; FERREIRA, F.; BELTRÃO, M.; WELKER, A.** 2013. Incidence of canine leptospirosis in the metropolitan area of Curitiba, State of Paraná, Southern Brazil. SBMT. 46(6):772-775.
- MARTINIC, M.** 2009. Documentos inéditos para la historia de Magallanes, Diario de vida de William Blain ovejero en Tierra del Fuego (1891-1898). Magallania. 37(1): 199-221.
- MARTINO, P.; MONTENEGRO, J.; PREZIOSI, J.; VENTURINI, C.; BACIGALUPE, D.; STANCHI, N.; BAUTISTA, E.** 2004. Serological survey of selected pathogens of free-ranging foxes in southern Argentina, 1998-2001. Rev Sci Tech. 23(3):801-806.
- MASSOIA, E.; CHÉBEZ, J.** 1993. Mamíferos silvestres del archipiélago fueguino. Ediciones Literature of Latin America. Buenos Aires, Argentina. 261 pp.
- MÉNDEZ, C.; BENAVIDES, L.; ESQUIVEL, A.; ALDAMA, A.; TORRES, J.; GAVALDÓN, D.; MELÉNDEZ, P.; MOLES, L.** 2013. Pesquisa serológica de *Leptospira* en roedores silvestres, bovinos, equinos y caninos en el noreste de México. Rev Salud Anim. 35: 25-32.
- MINSAL (MINISTERIO DE SALUD).** 2004. Decreto Supremo N°158 Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria. 22 de octubre 2004.
- MOTT, C.; NIELSEN, C.; BLOOMQUIST, C.** 2013. Within lodge interactions between two ecosystem engineers, beavers (*Castor canadensis*) and muskrats (*Ondatra zibethicus*). Behaviour. 150: 1325-1344.
- MYERS, D.; JONES, L.; VARELA, V.** 1972. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. Appl Microbiol. 23: 894-902.
- NÚÑEZ, C.** 2013. Detección de *Leptospira* spp. en muestras de riñón y sangre del mustélido *Neovison vison*. Tesis Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 23 pp.

NÚÑEZ, M.; BOZZOLO, L. 2006. Diet analysis of gray fox, *Pseudalopex griseus* (Canidae) (Gray, 1869), in Sierra de las Quijadas National Park, San Luis, Argentina. *Gayana*. 70(2): 163-167.

OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH). 2008a. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Leptospirosis. [en línea]. <http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.01.09.%20Leptospirosis.pdf>. [consulta: 04-03-2016].

OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH). 2008b. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Información General. [en línea]. <http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/1.01.01.%20Recogida%20y%20env%20C3%ADo%20de%20muestras.pdf>. [consulta: 04-03-2016].

OLIVEIRA, E.; PINHEIRO, J.; SOUZA, M.; SANTANA, V.; SILVA, J.; MOTA, R.; SÁ, F. 2012. Serologic survey of brucellosis in captive neotropical wild carnivores in northeast Brazil. *J Zoo Wildl Med*. 43(2): 384-387.

PACHECO, L.; GALLARDO, G.; NUÑEZ, A. 2004. Diseño de un programa de monitoreo para puma y zorro en el Altiplano. *Ecología en Bolivia*. 39(2): 21-32.

PAUL, J.; HANSON, L.; SCHNURRENBERGER, P.; MARTIN, R. 1972. *Leptospira interrogans* serotypes *Ballum* and *Grippotyphosa* isolated from the muskrat. *J Wildl Dis*. 8: 54-56.

PRATS, G. 2005. Diagnóstico etiológico. **In:** Microbiología Clínica. Panamericana. Madrid, España. pp: 231-238.

PREVOSTI, F.; SEGURA, V.; CASSINI, G.; MARTIN, G. 2013. Revision of the systematic status of patagonian and pampean gray foxes (Canidae: *Lycalopex griseus* and *L. gymnocercus*) using 3d geometric morphometrics. *Mastozool Neotrop*. 20(2):289-300.

PROENCA, L.; SILVA, J.; GALERA, P.; LION, M.; MARINHO, J.; RAGOZO, A.; GENNARI, S.; DUBEY, J.; VASCONCELLOS, S.; SOUZA, G.; PINHEIRO, J.; SANTANA, V.; FRANCA, G.; RODRIGUES, F. 2014. Serologic survey of infectious diseases in populations of maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Aguas Emendadas Ecological Station, Brazil. *J Zoo Wildl Med*. 44: 152-155.

RHYAN, J.; SPRAKER, T. 2010. Emergence of Diseases From Wildlife Reservoirs. *Vet Pathol*. 47: 34-39.

RIEDEMANN, S.; CABEZAS, X.; ZAMORA, J. 1994. Detección de aglutininas antileptospira en sueros de roedores silvestres del área rural de Valdivia, Chile. *Av Cs Vet*. 9: 1-3.

ROQUEPLO, C.; CABRE, O.; DAVOUST, B.; KODJO, A. 2013. Epidemiological Study of Animal Leptospirosis in New Caledonia. *Vet Med Int*. 6 pp.

- SANDOVAL, R.** 1994. Estudio ecológico del visón asilvestrado (*Mustela vison*) en la XI Región. Tesis para optar al grado de Licenciado en Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile. 74 pp.
- SCHIAVINI, A.; NARBAIZA, C.** 2015. Estado de situación de los conflictos derivados de las poblaciones caninas en Tierra del Fuego. Comité de Emergencia Agroganadero y de Alerta Sanitaria de Tierra del Fuego. 37 pp.
- SCHUTTLER, E.; CÁRCAMO, J.; ROZZI, R.** 2008. Diet of the American mink *Mustela vison* and its potential impact on the native fauna of Navarino Island, Cape Horn Biosphere Reserve, Chile. *Rev Chil Hist Nat.* 81: 585-598.
- SEGHESSO, A.; ANTHONY, L.; POLI, G.; FRANCOIS, S.** 2013. Seropositivity of *Leptospira interrogans* found in dogs from the city of Rosario, Argentina. *Rev Cubana Med Trop.* 65(2): 185-190.
- SENTHIL, N.; PALANIVEL, K.; RISHIKESAVAN, R.** 2013. Seroprevalence of Leptospiral Antibodies in Canine Population in and around Namakkal. *J Vet Med.* 4 pp.
- SHIER, C.; BOYCE, M.** 2009. Mink prey diversity correlates with mink muskrat dynamics. *J Mammal.* 90: 897-905.
- SILLERO, C.; HOFFMANN, M.; MACDONALD, D.** 2004. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status survey and conservation action plan. IUCN. 430 pp.
- SILVA, R.; RIEDEMANN, S.** 2007. Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. *Arch Med Vet.* 39(3): 269-274.
- SILVA, E.; ORTEGA, G.; JIMÉNEZ, J.** 2010a. Conservation and ecological implications of the use of space by chilla foxes and free-ranging dogs in a human-dominated landscape in southern Chile. *Austral Ecol.* 35:765-777.
- SILVA, C.; SAAVEDRA, B.; MENVIELLE, F.; SCHIAVINI, A.; SOTO, N.; MALMIERCA, L.; RAMADORI, D.** 2010b. Erradicación de castores en la Patagonia austral: un modelo de cooperación para la conservación en Chile. *Actas del Seminario Taller: Vertebrados dañinos en Chile: Desafíos y Perspectivas.* Santiago, Chile. 52-68.
- SKEWES, O.; GONZÁLEZ, F.; OLAVE, R.; ÁVILA, A.; VARGAS, V.; PAULSEN, P.; KÖNIG, H.** 2006. Abundance and distribution of american beaver, *Castor canadensis*, in Tierra del Fuego and Navarino islands, Chile. *Eur J Wildl Res.* 52: 292-296.
- SORIANO, A.; PARUELO, J.** 1990. El pastoreo ovino. *Ciencia Hoy.* 2(7): 44-53.
- STUART, B.; CROWELL, W.; ADAMS, W.; MORROW, D.** 1978. Spontaneous renal disease in beaver in Louisiana. *J Wildl Dis.* 14: 250-253.
- TUEMMERS, C.; LÜDERS, C.; ROJAS, C.; SERRI, M.; CASTILLO, C.; ESPINOZA, R.** 2013a. Detección de *Brucella canis* por método de inmunocromatografía en perros vagos capturados en la Ciudad de Temuco, Chile, 2011. *Rev Chil Infectol.* 30(4):395-401.

TUEMMERS, C.; LÜDERS, C.; ROJAS, C.; SERRI, M.; ESPINOZA, R.; CASTILLO, C. 2013b. Prevalencia de leptospirosis en perros vagos capturados en la ciudad de Temuco, 2011. *Rev Chil Infectol.* 30(3): 252-257.

VILJUGREIN, H.; LINGJÆRDE, O.; STENSETH, N.; BOYCE, M. 2001. Spatio temporal patterns of mink and muskrat in Canada during a quarter century. *J Anim Ecol.* 70: 671-682.

ZAMORA, J.; KRUZE, J.; RIEDEMANN, S. 1975. Leptospirosis de los Animales Domésticos en el Sur de Chile. Estudio Serológico. *Zentralbl Veterinarmed B.* 22(7): 544-555.

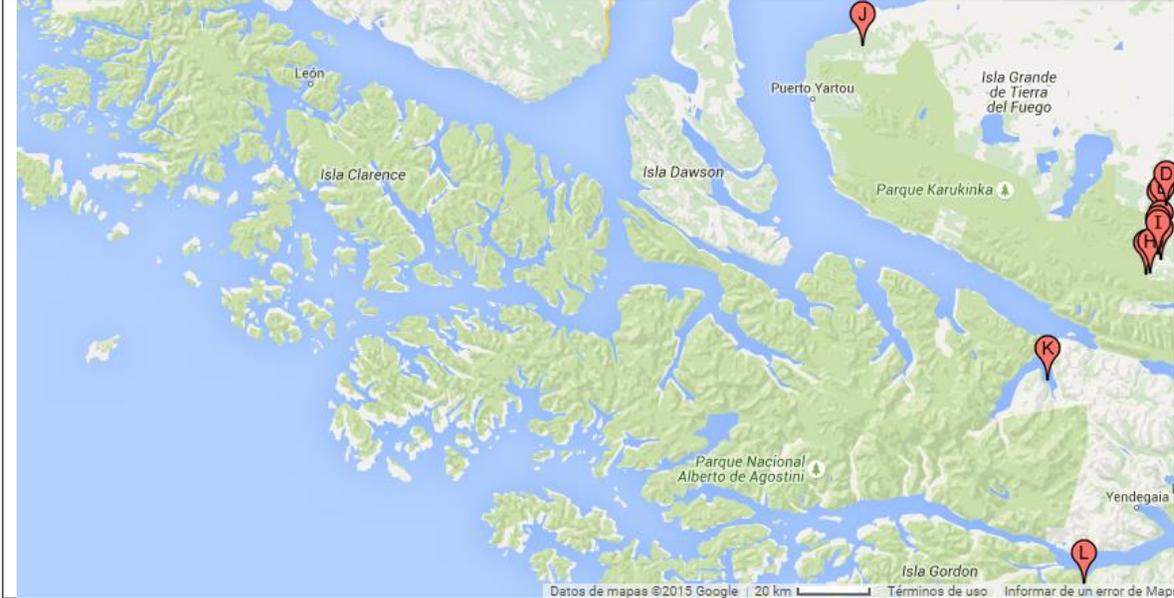
ZANINI, F.; LEIVA, D.; CABEZA, S.; ELISSONDO, C.; OLMEDO, E.; PÉREZ, H. 2008. Poblaciones caninas asilvestradas: Impacto en la producción Pecuaria de Tierra del Fuego, Argentina. *Ley Ovina de Tierra del Fuego.* 28 pp.

ZUNINO, E.; PIZARRO, R. 2007. Leptospirosis. Puesta al día. *Rev Chil Infectol.* 24: 220-226.

ANEXOS

Anexo 1

Mapa A: Distribución de muestras obtenidas a partir de zorros culpeos fueguinos (*Pseudalopex culpaeus lycoides*) en la Isla Grande de Tierra del Fuego



A-L: Puntos geográficos obtenidos de coordenadas UTM (Universal Transversal Mercator) del lugar de origen de las muestras de zorros culpeos fueguinos. Fuente: Google Maps

Mapa B: Distribución de muestras obtenidas a partir de zorros chillas (*Pseudalopex griseus*) en la Isla Grande de Tierra del Fuego



A-F: Puntos geográficos obtenidos de coordenadas UTM (Universal Transversal Mercator) del lugar de origen de las muestras de zorros chillas. Fuente: Google Maps

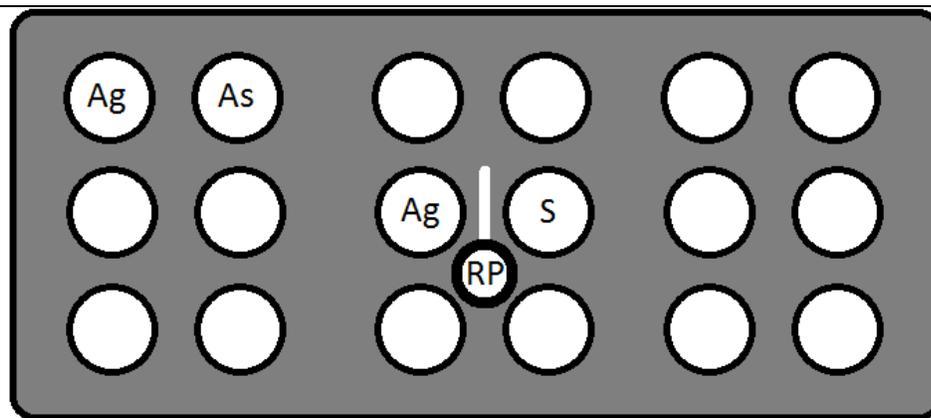
Mapa C: Distribución de muestras obtenidas desde perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) en la Isla Grande de Tierra del Fuego



A-L: Puntos geográficos obtenidos de coordenadas UTM (Universal Transversal Mercator) del lugar de origen de las muestras de perros domésticos. Fuente: Google Maps

Anexo 2

Figura A: Portaobjeto con perforaciones para antígeno y sueros y antisueros



Ag: Antígeno, S: Suero, As: Antisuero, RP: Reacción Positiva

Anexo 3

Tabla A: Clasificación de serovares utilizados en el Instituto de Salud Pública			
Nº	Especie	Serovar	Cepa
01	<i>L. biflexa</i>	Andamana	CH11
02	<i>L. interrogans</i>	Australis	Ballico
03	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Akiyami A
04	<i>L. borgepetersenii</i>	Ballum	Mus 125
05	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Van Tienen
06	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Hond Utrecht IV
07	<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni
08	<i>L. kischneri</i>	Cynopteri	3522 C
09	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman
10	<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	Moskva V
11	<i>L. santarosai</i>	Borincana	HS 622
12	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	RGA
13	<i>L. borgepetersenii</i>	Javanica	Veldrat Batavia 46
14	<i>L. santarosai</i>	Georgia	LT117
15	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona
16	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Salinem
17	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Ruebush
18	<i>L. interrogans</i>	Copenhageni	M20
19	<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Hardjoprajitno

Fuente: Instituto de Salud Pública

Anexo 4

Tabla B: Interpretación de aglutinación por medio de cruces		
Aglutinación	Observación	Interpretación
-	Sin aglutinación	Negativo
+/-	< 25% de aglutinación	Negativo
+	25% de aglutinación	Negativo
++	50% de aglutinación	MAT cuantitativa
+++	≥75% de aglutinación	MAT cuantitativa

Fuente: Instituto de Salud Pública



CERTIFICADO N° 57

Santiago 9 de septiembre del 2015

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto de memoria titulado: "Detección de anticuerpos contra *Brucella canis* y *Leptospira* spp., en cánidos silvestres y domésticos de la isla grande de tierra del fuego, Región de Magallanes y Antártica Chilena", del alumno Sr., Sebastián Moya D., y que corresponde a su proyecto para optar al grado de Médico Veterinario. Profesor Guía Dr. Cristóbal Briceño.

En el proyecto se estipulan entre otras, las siguientes medidas de Bioseguridad:

- 1.- El Personal recibirá una inducción en normas de bioseguridad y entrenamiento en el trabajo de laboratorio. Se utilizará vestimenta y equipos adecuados para realizar el trabajo en el laboratorio.
- 2.- En este caso para ambos patógenos se trabajará con técnicas inmunológicas que requieren como medidas de bioseguridad buenas prácticas de laboratorio.
- 3.- Específicamente para el trabajo con el género *Leptospira* spp., obtención de las cepas para realizar la técnica de MAT, esto se realizará en el Instituto de Salud pública de Chile por personal capacitado y siguiendo las normas de bioseguridad de dicha institución, que corresponden a las de laboratorio nivel clase 2.

El proyecto de memoria de título fue revisado por el comité en base a las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas de Bioseguridad" editado por CONICYT versión 2008 y que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

Coordinadora
Comité de Bioseguridad

