

**UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Informe Escrito Final

**Detección de la infección por *Brucella ceti* en cetáceos mediante
PCR-Alta Resolución de Fusión: pautas para el manejo de delfines
encallados**

**Pasantía presentada como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Naturales**

Eunice Francinie Víquez Ruiz

**Campus Omar Dengo
Heredia, 2020**

Este trabajo de graduación fue Aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Manejo de Recursos Naturales

M.Sc. Catalina Viquez Murillo

Representante, Decano, quién preside

RODOLFO
UMAÑA
CASTRO
(FIRMA)

Firmado digitalmente
por RODOLFO UMAÑA
CASTRO (FIRMA)
Fecha: 2020.09.21
19:12:26 -06'00'

M.Sc. Rodolfo Umaña Castro

Representante, Unidad Académica

CATERINA
GUZMAN VERRI
(FIRMA)

Firmado digitalmente por
CATERINA GUZMAN VERRI
(FIRMA)
Fecha: 2020.09.23 09:20:23
-06'00'

Dra. Caterina Guzmán Verri

Tutora

JOSE PEREIRA
CHAVES

Firmado digitalmente por JOSE
PEREIRA CHAVES
Fecha: 2020.09.23 09:20:23
-06'00'

Dr. José Pereira Chaves, Asesor

Asesor

M.Sc. Cristina Sánchez Godínez

Invitada especial

Resumen

Este trabajo describe la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Alta Resolución de la Temperatura de Fusión (PCR-HRM) como herramienta de apoyo en la identificación de aislamientos de bacterias del género *Brucella* que causan brucelosis en delfines. Para este fin, se estandarizaron las condiciones específicas para la identificación del agente tanto a nivel de género como de especie, utilizando material genético de un banco de aislamientos de *Brucella ceti* obtenidos de encallamientos ocurridos en nuestro país entre los años 2005-2017. Además, se realiza una propuesta de pautas para el manejo de delfines que presentan el fenómeno de varamiento en las costas costarricenses, con atención en aquellos eventos que presenten infección por *Brucella* spp y representen un riesgo a la salud pública y ambiental.

Agradecimiento

Agradezco a todas las personas que de una o otra forma fueron un apoyo en el proceso de mi formación profesional y para la realización de este trabajo: el personal de la Escuela de Ciencias Biológicas, ahí a los profesores que me formaron como bióloga y las personas que siempre me apoyaron para cerrar este ciclo y en especial al Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) de la Escuela de Medicina Veterinaria, donde aprendí, puse en práctica conocimientos y se me abrieron nuevas oportunidades, ya que ahí despertó mi interés en las enfermedades zoonóticas tropicales.

Agradezco también a instituciones como SENASA y ahí a la Dra Gabriela Hernández, porque me permite seguir conociendo en este campo y participar en investigaciones aplicadas en nuestra área de trabajo.

Agradezco el apoyo económico dado por los Fondos del Sistema del Consejo Nacional de Rectores y el PIET.

Índice

Resumen.....	II
Agradecimientos.....	III
Índice.....	IV
Índice de cuadros.....	V
Índice de figuras.....	VI
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	5
2.1. Objetivo general.....	5
2.2. Objetivos específicos	6

3. Descripción de técnicas y procedimientos.....	6
3.1. Técnicas, procedimientos e instrumentos.....	6
3.2. Resultados de las extracciones de ADN realizadas.....	11
3.3. Resultados para la detección a nivel de género.....	11
3.4. Resultados para la detección a nivel de especie.....	13
3.5. Pautas para el manejo de delfines encallados.....	19
4. Consideraciones finales y recomendaciones.....	23
5. Bibliografía.....	23
6. Anexos.....	30

Índice de cuadros

Cuadro 1	Iniciadores a utilizar en el proceso de la estandarización para detección de brucelosis en delfines utilizando la técnica PCR-HRM.....	8
Cuadro 2	Perfil de amplificación de la técnica de PCR-HRM para la detección de brucelosis.....	8

Cuadro 3	Parámetros para la detección de <i>Brucella</i> a nivel de género y para especie (<i>Brucella ceti</i> y otras de origen marino) para PCR-HRM.....	12
Cuadro 4	Asignación de genotipos otorgada con el software Rotor Gene utilizando los cebadores para especies de <i>Brucella</i> de origen marino.....	17

Índice de figuras

Figura 1	Preparación de la solución de trabajo y metodología para la cuantificación de ADN utilizando dsDNA High Resolution Assay Kit para el equipo Qubit™	9
----------	--	---

Figura 2	Curva de estandarización para detección de género de <i>Brucella</i> . y perfil de Melting de género usando ADN de referencia B14/94 (<i>B. ceti</i> de Delfín Atlántico Norte)	11
Figura 3	Amplificación positiva para <i>Brucella</i> a nivel de género usando ADN de diferentes especies de origen marino y terrestre.....	13
Figura 4	Perfil de Melting de <i>Brucella</i> a nivel de género usando ADN de diferentes especies de origen marino y terrestre.....	13
Figura 5	Curva de estandarización para detección de especies de origen marino de <i>Brucella</i> y perfil de Melting usando ADN de referencia <i>B. ceti</i> CR 18 (encallamiento de CR)	14
Figura 6	Perfil del análisis de HRM para <i>Brucella</i> a nivel de especie de origen marino usando ADN de <i>B. ceti</i> de Costa Rica y de <i>B. ceti</i> de referencia.....	15
Figura 7	Perfil del análisis de HRM para <i>Brucella</i> a nivel de especie de origen marino usando ADN de <i>B. ceti</i> de Costa Rica, <i>B. ceti</i> de referencia y <i>Brucella</i> de origen terrestre.....	15
Figura 8	Resultado de electroforesis capilar para productos de PCR-HRM para ADN de <i>Brucella</i> a nivel de especie de origen marino.....	18
Figura 9	Esquema resumen de la propuesta de pautas para la creación de un protocolo para el manejo de cetáceos encallados en playas de Costa Rica.....	23

1. Introducción

Una de las enfermedades zoonóticas más comunes a nivel mundial es la brucelosis. Esta enfermedad es causada por bacterias del género *Brucella* spp., agente etiológico que se caracteriza por poseer una morfología cocobacilar pequeña no móvil. Son bacterias Gram negativas, intracelulares, extracelulares facultativos, pertenecientes a la familia *Brucellaceae*, subdivisión Alfabroteobacteria (Corbel & Brinley-Morgan, 1984; Lista *et al.*, 2011). Esta enfermedad afecta a mamíferos terrestres, incluido el ganado bovino, ovino, cerdos, perros y el ser humano, así como a mamíferos marinos como delfines, ballenas y marsopas (Ariza *et al.* 2007, Dean *et al.* 2013).

La brucelosis tiene distribución mundial e importancia en salud pública en países de América Latina, África y regiones del Mediterráneo (Lista *et al.*, 2011; Ariza *et al.* 2007, Dean *et al.* 2013). *Brucella melitensis*, provoca la enfermedad en ovejas, cabras, camellos y dromedarios, *B. suis* se encuentra habitualmente en cerdos, liebres, caribús, renos y alces, *B. ovis* afecta ovejas, *B. canis* infecta perros y *B. neotomae* se ha aislado de ratas silvestres del género *Neotomae*. Por su lado *B. abortus* es responsable de la brucelosis bovina (Whatmore *et al.*, 2007; Whatmore, 2009), *B. microti*, aislada de topillos (Gopaul *et al.*, 2008; Whatmore *et al.*, 2007; Lista *et al.*, 2011), *B. ceti* y *B. pinnipedialis*, aislada de cetáceos y pinnípedos respectivamente, de los cuales hay reportes de contagio en humanos (Marquart, 2009; Xavier *et al.*, 2010).

En Costa Rica, la brucelosis ha sido una enfermedad endémica en bovinos y humanos desde principios del siglo XX y en los últimos años se ha dado un aumento en el reporte de casos por esta infección bacteriana (Hernández-Mora *et al.*, 2017). En el caso del ser humano, al ser un hospedero accidental, la infección se da como consecuencia del contacto directo con hospederos animales infectados, los fetos, el material biológico infectado, consumo de productos lácteos sin pasteurizar, entre otros (Rhyan, 2013, Corbel, 2006). En los animales, la infección ocurre por contacto directo o ingestión de restos de placenta, fluidos fetales, fetos abortados, descargas vaginales, entre otros (Corbel, 2006).

Respecto a la infección en animales, aunque los síntomas varían según la especie, afecta principalmente su fertilidad y reproducción al generar placentitis y abortos en hembras preñadas, y orquitis y esterilidad en machos (Xavier *et al.*, 2010).

En humanos, se ha demostrado que cinco de estas especies terrestres causan enfermedad incluidas *B. melitensis* (responsable de la forma más severa), *B. suis*, *B. abortus* (infección con complicaciones moderadas), y esporádicamente *B. canis* (infecciones leves). Más recientemente se reportó infección a nivel de sistema nervioso central con *B. neotomae* (Suárez-Esquivel *et al.*, 2017, Lista *et al.*, 2011; Xavier *et al.*, 2010) y por su parte, existen reportes de humanos contagiados con brucellas marinas causando granulomas intracerebrales, pérdida de vista y osteomielitis (Maquart 2009, McDolnald *et al.*, 2006). Los síntomas incluyen fiebre, dolor articular y muscular, ganglios linfáticos inflamados, hepatomegalia y esplenomegalia. Si los pacientes no son tratados debidamente, la enfermedad tiende a ser crónica y persistente, causando granulomas capaces de afectar cualquier órgano, con graves complicaciones como endocarditis y daños neurológicos (Pappas *et al.*, 2005, Franco *et al.*, 2007, Bargaen *et al.* 2012).

En Costa Rica, se ha estudiado hace más de dieciséis años esta enfermedad en cetáceos, desde la primera detección de brucelosis en 2004 de líquido cefalorraquídeo de un delfín rayado *Stenella coeruleoalba* varado (Hernández-Mora *et al.*, 2008). Para el 2016, al menos 16 especies se habían registrado con el fenómeno de varamiento y de éstas, seis especies han reaccionado serológicamente a brucelosis. Sin embargo, solo se ha documentado la infección activa en delfines rayados *Stenella coeruleoalba* del Pacífico Tropical Oriental (Hernández-Mora *et al.*, 2017). Además de los reportes de nuestro país, existen reportes de detección serológica de brucelosis en cetáceos en otros estudios y continentes como el asiático (Ohishi *et al.*, 2020).

En los delfines, se ha descrito la enfermedad como crónica grave, con signos como abortos, neurobrucelosis (meningoencefalomielitis), cardiopatías, lesiones óseas, placentitis, abscesos subcutáneos, endometritis, entre otras, tanto en el océano Pacífico Tropical Oriental, como en el Mar Mediterráneo (Isidoro-Ayza *et al.*, 2019). Más recientemente se documenta en el Pacífico Occidental en delfín nariz de botella con osteomielitis (Ueno *et al.* 2020).

Estos animales llegan a las costas con trastornos de la natación compatibles con síndromes neurológicos que causan su muerte. La forma de transmisión de la enfermedad no ha sido determinada, sin embargo, la bacteria se ha aislado de diferentes órganos y fluidos como placenta, leche y fluidos fetales. Por lo tanto, se han sugerido

rutas como el apareamiento, lactancia materna, contacto con fetos abortados, tejidos de placenta, transmisión vertical de la madre al feto o por medio de reservorios en pescado o nemátodos (Hernández-Mora *et al.*, 2008). Se piensa que la neurobrucelosis altera el sistema ecolocalizador de los delfines, lo cual contribuye al varamiento (Hernández-Mora *et al.*, 2008, González-Barrientos *et al.*, 2010; Guzmán-Verri *et al.*, 2012). En Costa Rica el reporte de encallamiento de delfines y ballenas se da principalmente en las costas del Pacífico (Hernández-Mora *et al.*, 2008).

La gravedad de la infección en la especie conocida como delfín rayado (*S. coeruleoalba*) indica que ésta es altamente susceptible (González-Barrientos *et al.* 2010). Se ha confirmado la presencia del agente en otros miembros de este género como en *Stenella clymene* (delfín climene) pero no clara concordancia en la sintomatología con respecto a la que presenta el delfín rayado (Attademo *et al.*, 2018). En la actualidad el número de casos ha ido en aumento, así como los aislamientos de la bacteria, lo que ha permitido el estudio a nivel genético del agente, conocer el agrupamiento por genotipo y preferencia de hospederos, además de relacionar el origen geográfico de éstos (Maquart *et al.* 2009; Guzmán-Verri *et al.* 2012, Suárez *et al.*, 2017 & Hernández-Mora *et al.* 2017). Existen actualmente otros reportes de la infección en otras especies como lo es el delfín nariz de botella, presentando la sintomatología ya descrita anteriormente y originado genotipo de *B. ceti* ST27, mismo genotipo en el que hay informes de casos de contagio de brucelosis marina en humanos (Mackie *et al.*, 2020; Ueno *et al.*; 2020).

Desde el punto de vista biológico y de conservación, y dada la naturaleza de esta enfermedad en cetáceos, es importante continuar los estudios y el monitoreo de estas especies. El aislamiento, identificación y caracterización genética del agente etiológico es relevante dada la importancia ecológica de la presencia de los mamíferos marinos en mares y litorales. La presencia de mamíferos marinos es un indicador del bienestar de los océanos y una medida de dimensión de protección de recursos marinos. Incluso el estudio de este agente ha permitido la descripción de especies de mamíferos marinos (Whatmore *et al.*, 2017). Algunas de estas especies se encuentran en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como especies amenazadas. La presencia de la enfermedad en estas especies podría tener un gran impacto en la dinámica poblacional, siendo más marcado si se tiene en consideración la

baja tasa de crecimiento que ellas presentan (Van Bresse *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

Además, también es importante el riesgo a la salud humana, ante la posibilidad de contagio y transmisión de infección por *B. ceti*, teniendo en cuenta que en los últimos años el contacto entre cetáceos y humanos ha venido en aumento, ya sea por actividades recreativas y/o deportivas, turísticas, fines terapéuticos y otras. Incluso en varamientos, donde por lo general ocurre acercamiento de las personas e intervención sin medidas de precaución, principalmente con el propósito de retornarlos al mar y en algunos casos para utilizarlos como fuente de alimento (Vega & Solano, 2013).

Con respecto al diagnóstico de esta enfermedad, entre las técnicas serológicas aceptadas para la detección de la infección por *Brucella* se encuentran la aglutinación con Rosa de Bengala, prueba usada como tamiz y que tiene ventajas como rapidez, sencillez, económica y alta sensibilidad (99%) y las pruebas ELISA (enzimoimmuno análisis) que han sido evaluadas en la detección de brucelosis en odontocetos, utilizando IgG anti-odontoceto (Hernández-Mora *et al.*, 2009). También, pueden ser utilizadas variaciones de técnicas histológicas como lo es la Inmunohistoquímica (IHC) utilizando anti-*Brucella* LPS monoclonal (MAb) (Di Francesco *et al.*, 2019).

Para el diagnóstico confirmatorio es necesario la obtención del agente bacteriano, por lo que se extrae líquido cefalorraquídeo del animal y se cultiva, y posteriormente se procede a realizar técnicas como la caracterización por pruebas bioquímicas, sin embargo, estas pruebas no son de confirmación definitiva y no pueden discriminar entre especies, siendo necesario técnicas de biología molecular (OIE, 2018).

En cuanto a las técnicas moleculares, la Organización Mundial de Salud Animal (OIE por sus siglas en inglés), ha aceptado el Bruce-ladder (Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR múltiple) como una rápida y simple prueba molecular de un solo paso para la identificación y la tipificación de especies de *Brucella* (OIE, 2018; López-Goñi *et al.*, 2008; López-Goñi *et al.*, 2011). Sin embargo, presenta inconvenientes como lo es el tiempo de observación de los resultados al utilizar la PCR convencional que requiere interpretación de los productos de reacción por medio de corridas electroforéticas, y que no distingue claramente las diferencias entre *B. pinnipedialis* y *B. ceti*, ambas aislados de mamíferos marinos, focas y cetáceos respectivamente (Nymo *et al.*, 2011). Para

solventar estos inconvenientes otros estudios se han enfocado en mejorar la resolución del Bruce-ladder al proponer cambios en los sets de cebadores (Kang *et al.*, 2011).

Otras técnicas moleculares son utilizadas para distinguir claramente entre especies del género *Brucella* como el análisis del número de repeticiones en tándem o VNTR (MLVA: Multiloci VNTR análisis), herramienta usada de primera línea durante muchos años para estudios epidemiológicos moleculares y que también es muy laboriosa (Scholz & Vergnaud, 2013). Otras técnicas se han propuesto alternativamente como el PCR en tiempo real (Winchell *et al.*, 2010) y más recientemente y último en tecnología el análisis de genoma completo (Suárez-Esquivel *et al.*, 2017), aunque este último es el más costoso y requiere más especialización de quienes lo realicen, analizan e interpretan, no obstante, permite identificar variabilidad genética y correlacionar preferencia de huésped y origen oceánico de éstos.

Por ende, sigue siendo necesario enriquecer los conocimientos con respecto a la brucelosis como la identificación de marcadores relacionados con la gravedad de la enfermedad, desarrollo de mejores tratamientos y herramientas diagnósticas (Corbel, 2006). Además de la atención y vigilancia de la brucelosis en cetáceos para comprender el impacto en las poblaciones y garantizar medidas de prevención de posibles infecciones en humanos y animales (Hernández-Mora *et al.*, 2017).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar las condiciones necesarias de la técnica de PCR en Tiempo Real para la detección de brucelosis en delfines, como una alternativa útil en la toma de decisiones y el manejo de los animales encallados en Costa Rica.

2.2. Objetivos específicos

Estandarizar las condiciones para la detección de la brucelosis en cetáceos a nivel de género por medio de PCR en tiempo real, utilizando ADN bacteriano de *Brucella ceti* de referencia.

Establecer las condiciones para la detección de *Brucella ceti* por medio de PCR en tiempo real a partir de ADN de cepas bacterianas provenientes de delfines encallados en Costa Rica y de referencia.

Validar si la técnica para la detección a nivel de especie es capaz de discriminar entre *Brucella ceti* y otras especies de *Brucella*.

Proponer pautas para el manejo de delfines encallados en las costas costarricenses que presenten infección por *Brucella* spp.

3. Descripción de las técnicas y procedimientos aprendidos durante la pasantía

3.1. Técnicas, procedimientos e instrumentos

Técnica: PCR en tiempo real (PCR: reacción en cadena de la polimerasa). Esta técnica combina la amplificación y detección del ADN en un mismo paso, además, se puede medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento pues la emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN, por lo que se utilizan fluoróforos. Tiene características como alta especificidad, amplio rango de detección, y rapidez en la visualización de los resultados (Costa, 2004; Aguilera *et al.*, 2010).

El equipo consiste en un termociclador con una fuente integrada luz de excitación, un sistema de detección de fluorescencia o fluorómetro y software que muestra los datos de fluorescencia grabados como una curva de amplificación de ADN. Es necesario utilizar un colorante intercalante o dsADN marcado con fluoróforo (Navarro *et al.*, 2015). El equipo utilizado fue el Rotor-Gene Q[®] de la casa comercial QIAGEN, que fue manipulado según las recomendaciones del fabricante (Rotor Gene Q User Manual, 2018).

Se utilizó una técnica variante del PCR en tiempo real, llamada PCR-HRM. Es una tecnología relativamente nueva que permite una excelente resolución y caracterización de dianas de ácido nucleico amplificadas mediante el uso de un perfil de

temperatura de fusión regulado que ofrece excepcional sensibilidad para discernir entre diferencias menores (White & Potts, 2006).

Por su parte, el análisis HRM de amplicones depende de la fusión de ADN en presencia de saturación de unión de colorantes, a medida que aumenta la temperatura de la solución la secuencia del amplicón (principalmente el contenido GC y longitud) determina el comportamiento del punto de fusión. Cuando la señal de fluorescencia se grafica contra la temperatura, la intensidad de fluorescencia disminuye a medida que el ADN de doble hebra pasa a una sola cadena y el colorante es liberado. La temperatura de Fusión (T_m) a la que el 50% del ADN doble hebra se puede aproximar mediante la derivada de la curva de fusión, este patrón único de la curva de fusión es utilizado para el análisis del amplicón (Erali *et al.* 2008). Para esta técnica se utilizó el Type-it HRM PCR Kit de la casa comercial QIAGEN, que es la mezcla maestra para las reacciones de PCR-HRM (Type-it® HRM™ PCR Handbook, 2009).

Para evaluar las condiciones necesarias de la técnica de PCR en Tiempo Real para la detección de brucelosis en delfines se requirió de estandarizaciones para la detección de *Brucella spp.* (a nivel de género) y *B. ceti* usando el juego de cebadores propuesto por Winchel *et al.* (2010) (cuadro 1) y perfil de amplificación (cuadro 2); y adecuando de acuerdo al equipo y reactivos disponibles, a los resultados obtenidos de los experimentos de prueba y con apoyo de los protocolos recomendados por la casa fabricante del equipo. Utilizando ADN de cepas *Brucella* procedentes de la bacterioteca del Laboratorio de Bioquímica adscrito al PIET, de la Escuela de Medicina Veterinaria, tanto de cepa de referencia (cuyo genoma está publicado), así como cepas de aislamientos de Costa Rica, todos previamente identificados por caracterización bioquímica, Bruce-Ladder, MLVA análisis (Multiple Loci Variable-number Tandem Repeat Analysis) y MLST análisis (Multilocus Sequence Typing). Estas técnicas están aprobadas por la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (Ver Anexo 1: información de las cepas de *Brucella* utilizadas). El ADN de la cepa de referencia de *B. ceti* del Atlántico (B14/94) cuya secuencia del genoma fue publicada, es representante del subgrupo *B. ceti* asociado con delfines, aislado originalmente de un delfín común (*Delphinus delphis*) en el Reino Unido (Groussaud *et al.*, 2007).

Los recursos genéticos de los aislamientos costarricenses fueron accesados en nuestro país de acuerdo a la Ley de Biodiversidad #7788 y la Convención de Diversidad

Biológica, bajo los términos de respeto y distribución justa y equitativa de los beneficios con los proveedores de tales recursos, según permisos # R-028-203-OT y # R-CM-UNA-003-2019-OT-CONAGEBIO.

Cuadro 1. Iniciadores a utilizar en el proceso de la estandarización para la detección de brucelosis en delfines utilizando la técnica de PCR-HRM.

Iniciadores o cebadores	Secuencias	Identidad genética	Tamaño esperado del amplicón
Bmar F	CGCATTTCATGGGCTTCGTC	<i>IS711</i> inserción en especies marinas	69 pb
Bmar R	GCTCTAGGGCGTGTCTGCATT		
Bspp F	GTGGCGATCTTGTCGG	Plus/minus	67 pb
Bspp R	ACGGCGATGGATTCCG		

Cuadro 2. Perfil de amplificación de la técnica de PCR-HRM para la detección de brucelosis.

Paso	Temperatura	Tiempo
Hold 1	50 °C	2 min
Hold 2	95 °C	10 min
Cycling 40 ciclos	95 °C	5 s
	60 °C	30 s

El procedimiento seguido para la obtención del ADN fue de acuerdo al protocolo del kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purificación Kit de Promega, Procedimiento descrito en Anexo 2). Para la cuantificación de las extracciones realizadas y las diluciones de las mismas, se utilizó fluorómetro Qubit™ 3.0 (ThermoFisher) y los reactivos del dsDNA High Resolution Assay Kit. El procedimiento seguido para cuantificar se esquematiza en la figura 1.

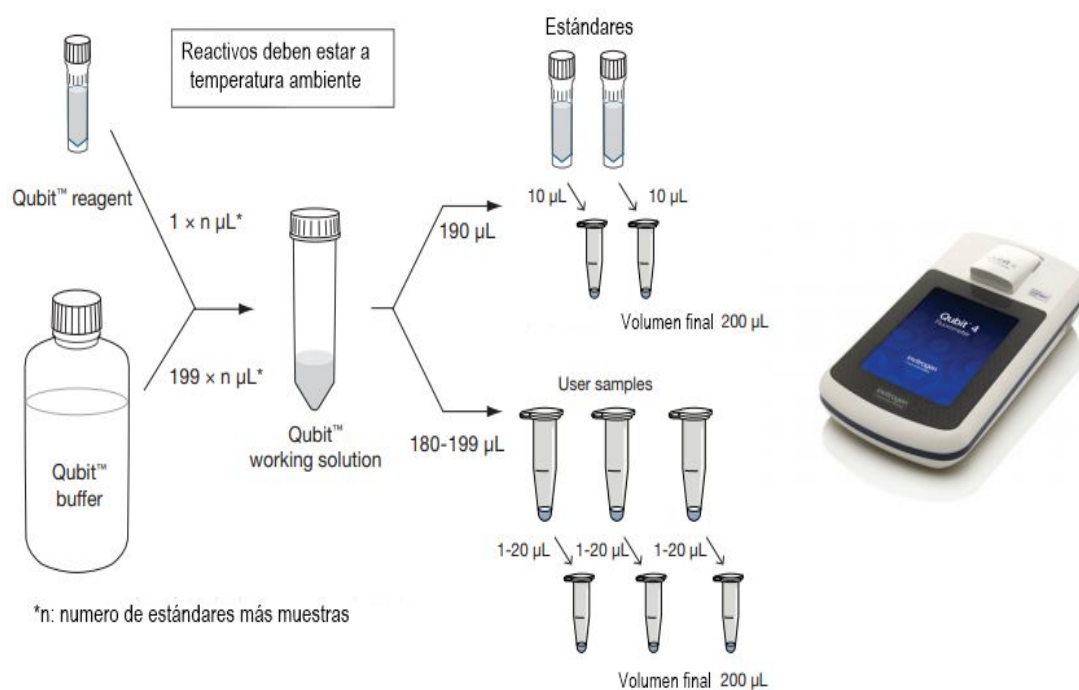


Figura 1. Preparación de la solución de trabajo y metodología para la cuantificación de ADN utilizando dsDNA High Resolution Assay Kit para el equipo Qubit™.

Para asegurar que las extracciones cumplieran con los índices de calidad y pureza se procedió a realizar mediciones de las mismas con el NanoDrop 2000, utilizando los siguientes criterios, de acuerdo con la guía de usuario del equipo NanoDrop One (Thermo Scientific, 2016).

-Proporción de absorbancia 260/280 nm: ~ 1.8*

-Proporción de absorbancia 260/230 nm: ~ 1.8- 2.2*

*Nota: La absorbancia de la muestra obtenido a los 260 nm se utiliza para estimar la concentración de ácidos nucleicos en ng/µL, la absorbancia a los 280 nm permite conocer la concentración de proteína, siendo la proporción 260/280 un indicador de pureza. La proporción 260/230 también es indicador de pureza, ya que la absorbancia a 230 nm permite conocer concentración de algunos reactivos residuales como fenol, EDTA y guanidina.

Las condiciones a optimizar para el cumplimiento de este trabajo con respecto a la técnica de HRM fueron:

- Curvas de calibración para establecer límites de detección y con esto la concentración de ADN necesaria, utilizando diluciones seriadas de las muestras de ADN.
- Determinación de los valores CT (threshold cycle values, valores umbral de ciclo) óptimos para datos confiables de HRM.
- Rango de temperatura de Melting.
- Normalización de las regiones específicas de temperatura para HRM.

Por último, para observar si el peso (pb) de los productos de PCR correspondían a lo reportado por el autor Winchell *et al.*, 2010 con respecto a la técnica HRM utilizando los primers de especie (Bmar) se realizó una electroforesis capilar con el equipo QIAxcel Advance de QIAGEN para algunas de las muestras, con las siguientes condiciones:

- Se utilizó el cartucho QIAxcel DNA High Resolution
- Se utilizó el marcador de peso molecular o size marker 25-500 pb (número de catálogo 929560)
- Se utilizó el marcador de alineamiento de 15 bp/600 bp (QX Alignment Marker, número de catálogo 929530)
- El método de inyección utilizado fue el OM800, que según fabricante brinda resolución con diferencia de 3-5 pb (QIAxcel Handbook, 2014).
- El resultado del gel virtual se obtuvo con el QIAxcel ScreenGel® Software v1.5.

Además, se analizó con BLAST genómico la región donde se alinean los cebadores específicos para las especies marinas (Bmar). Un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa de alineamiento de secuencias que permite comparar una secuencia contra otra cantidad de secuencias en bases de datos. El algoritmo permite encontrar las secuencias con mayor parecido. Esto se realizó de forma remota utilizando el servidor gratuito del Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos (NCBI), disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

3.2. Resultados de las extracciones de ADN realizadas

Los resultados de las extracciones realizadas se encuentran documentados en el Anexo 3 de este trabajo. Se aseguró que las mismas cumplieran con los criterios de calidad y pureza obteniéndose valores semejantes a los recomendados. Todas las mediciones de concentraciones de ADN realizadas con el equipo Qubit™ fueron tomadas como base para los cálculos de las diluciones de ADN usadas en las distintas corridas de HRM esto debido a que son más precisas que las obtenidas con el equipo NanoDrop.

3.3 Resultados para la detección a nivel de género

Utilizando el ADN de referencia de *B. cetii* (B14/94) se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de ADN (20, 10, 5 y 1.25 ng/reacción). En esta curva se obtuvo una eficiencia de 1.13 (equivalente a 100%) y un valor de R^2 de 0.988 (figura 2). Los parámetros estandarizados para la detección de género se resumen en el cuadro 3.

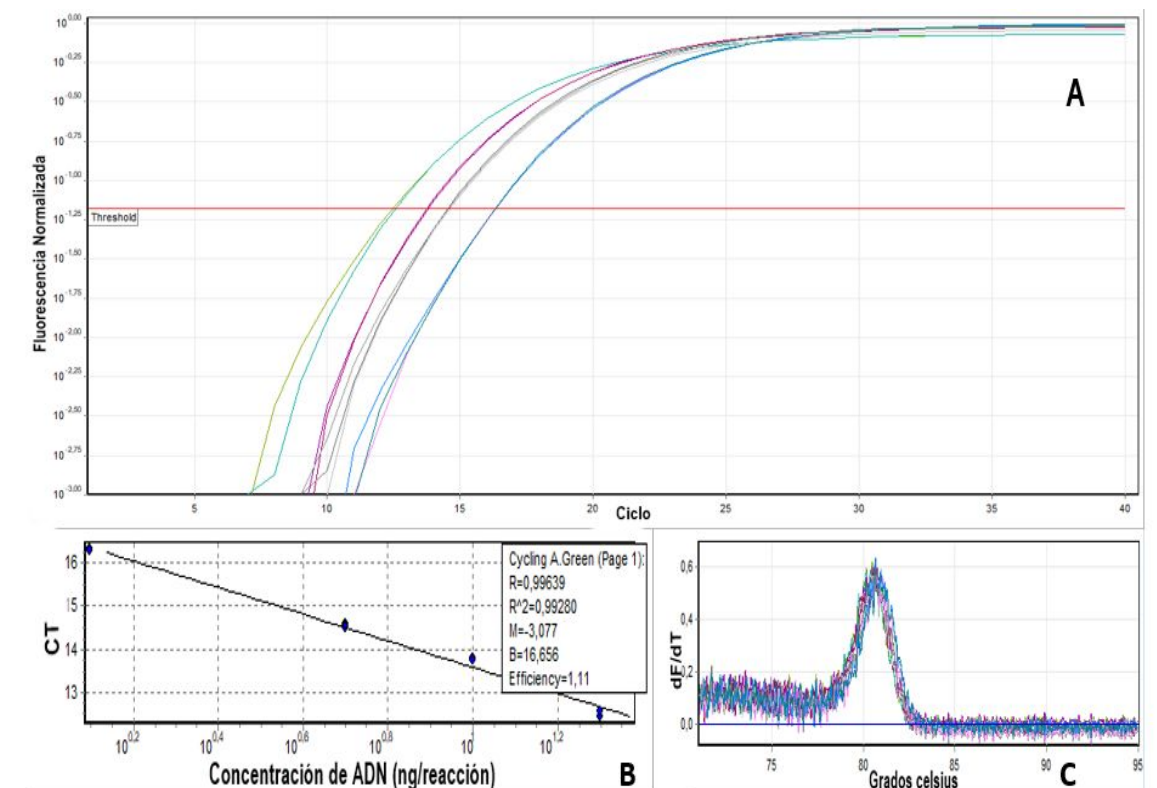


Figura 2. A y B. Curva de estandarización para detección de género de *Brucella*. C. Perfil de Melting de género usando ADN de referencia B14/94 (*B ceti* de Delfín Atlántico Norte).

Cuadro 3. Parámetros estandarizados para la detección de *Brucella* a nivel de género y para especie (*Brucella ceti* y otras de origen marino) para PCR-HRM.

Género <i>Brucella</i>	
Parámetro	Optimización
ADN (ng/reacción)	1.25
Valor CT	16
Rango Melting	75-85
<i>Brucella ceti</i>	
Parámetro	Optimización
ADN (ng/reacción)	0.1
Valor CT	18
Rango Melting	75-85
HRM (Regiones de normalización)	Izquierda (76.5-77) Derecha (85.5-86)

Además, se verificó que se cumplían estas condiciones al repetir un ensayo utilizando material genético de diferentes aislamientos de *Brucella* de origen marino de

referencia (B 14/94), de animales cetáceos encallados en Costa Rica (*B. ceti* CR 9, 15, 16, 17, 23, 24, 25, 26, 27, 28 y 30) y de *Brucella* de origen terrestre de referencia (*B. abortus* 2308, *B. suis* 1330, *B. neotomae* 5k33). Se obtuvo amplificación positiva para género en todas las muestras utilizadas (figura 3) lo que fue consistente con el mismo patrón de amplicon que se observa en el perfil de Melting (figura 4). Es importante mencionar que estas cepas de referencia son ampliamente usadas en rutinas de laboratorios de diagnóstico e investigación (Suárez-Esquivel *et al*, 2016).

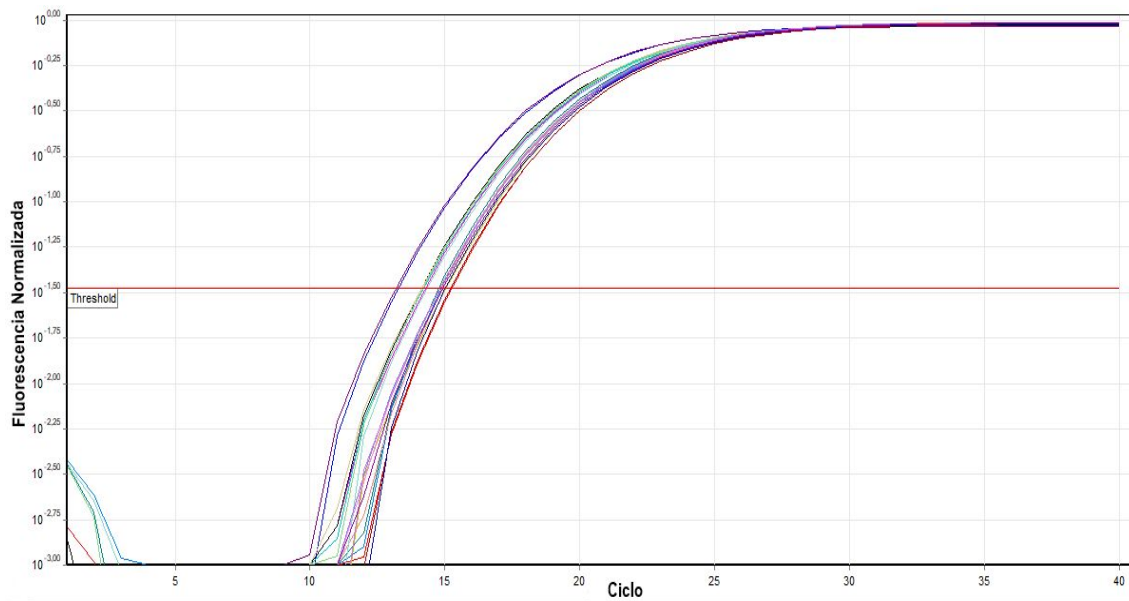


Figura 3. Amplificación positiva para *Brucella* a nivel de género usando ADN de diferentes especies de origen marino y terrestre.

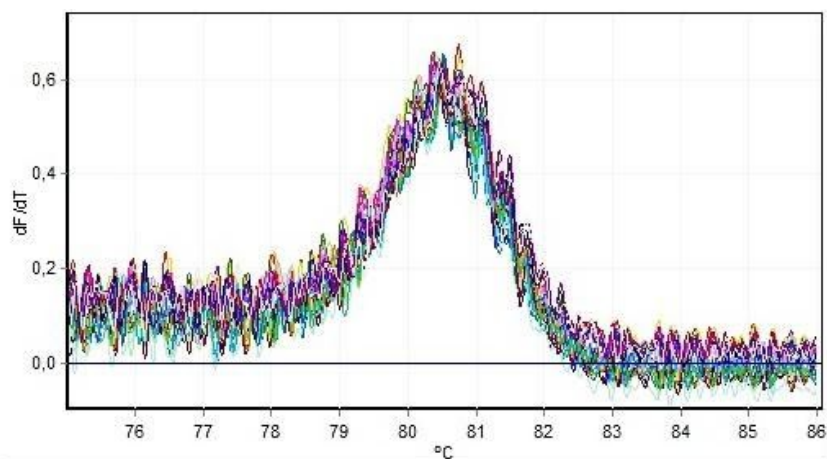


Figura 4. Perfil de Melting de *Brucella* a nivel de género usando ADN de diferentes especies de origen marino y terrestre.

3.4. Resultados para la detección a nivel de especie (*Brucella* de origen marino)

Utilizando el juego de cebadores para la detección a nivel de especies de *Brucella* de origen marino (Bmar, cuadro 1) y ADN de una cepa de *Brucella* aislada de un encallamiento en Costa Rica *B ceti* CR18 se estandarizaron las condiciones para la detección en PCR-HRM, requiriéndose entre otros parámetros, una concentración de ADN de 0.1 ng/reacción para la obtención de valores de CT aceptables (ver cuadro 3 para los parámetros estandarizados). En esta curva de calibración se obtuvo una eficiencia del 80% y un valor de R^2 de 0.991 (figura 5).

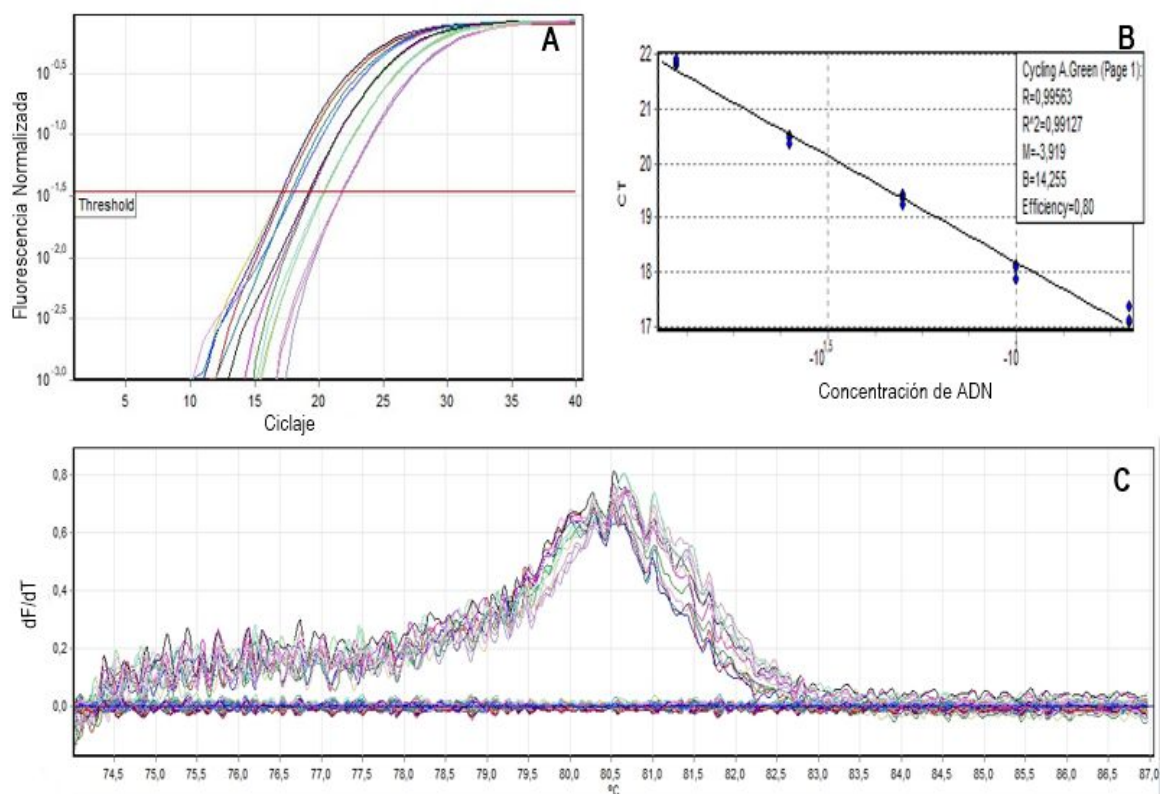


Figura 5. A y B. Curva de estandarización para detección de especies de origen marino de *Brucella*. **C.** Perfil de Melting usando ADN de referencia *B ceti* CR 18 (encallamiento de CR).

También, se analizó ADN de diferentes aislamientos de *B ceti* de CR (1-8, 11-20, 22-27) y *B ceti* de referencia (B14/94 y B2/94 conocido como Seal) con las condiciones estandarizadas usando los cebadores B mar, obteniéndose perfiles similares entre estas especies de origen marino sin permitir discriminar entre estas (Figura 6). No obstante, si se observó discriminación al realizar el análisis con especies de *Brucella* de origen terrestre (*B. neotomae* 5k33, *B. abortus* 2308) versus marino (B14/94 y *B ceti* CR 2, 4, 5, 10-13, 20, 26-27) (Figura 7).

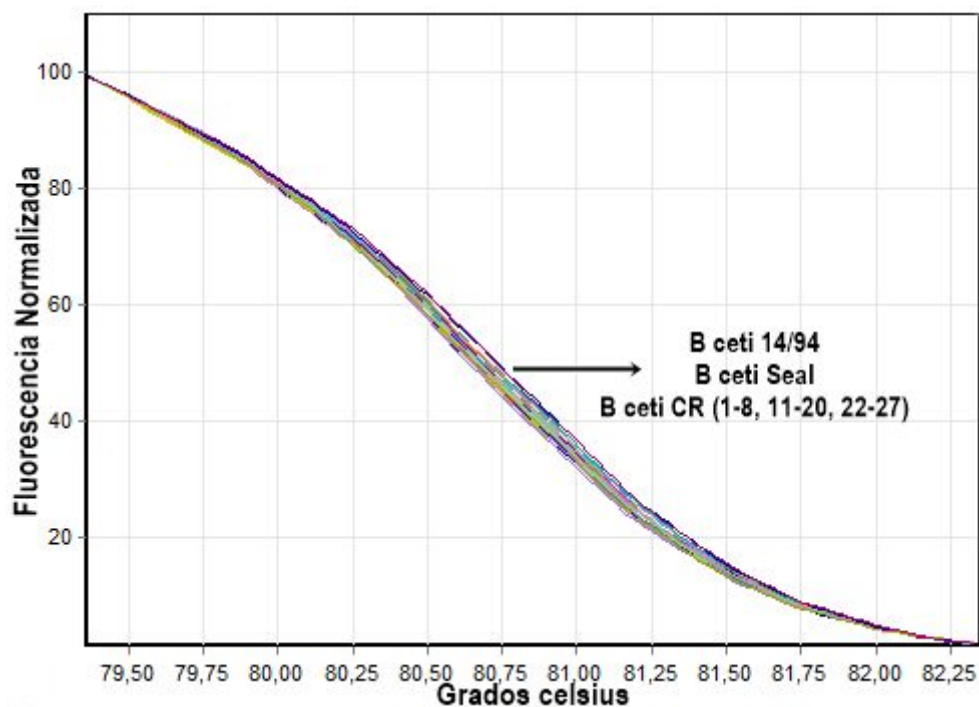


Figura 6. Perfil del análisis de HRM para *Brucella* a nivel de especie de origen marino usando ADN de *B. ceti* de Costa Rica y de *B. ceti* de referencia.

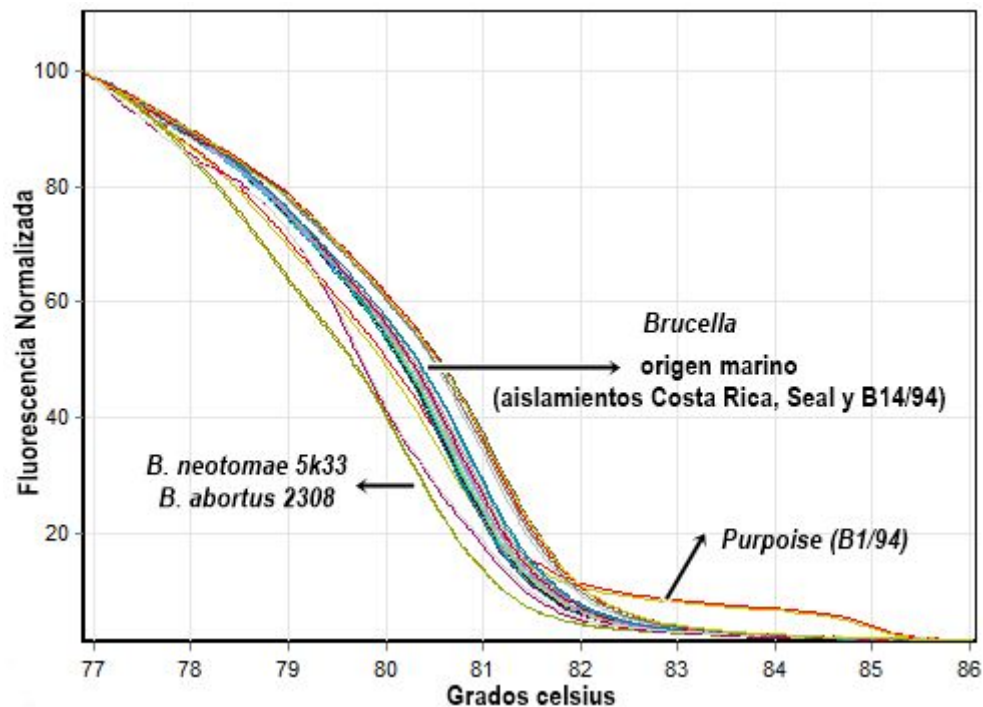


Figura 7. Perfil del análisis de HRM para *Brucella* a nivel de especie de origen marino usando ADN de *B. ceti* de Costa Rica (2, 4, 5, 10-13, 20, 26-27), de *B. ceti* de referencia (B14/94, B1/94 y Seal B2/94) y *Brucella* de origen terrestre (*B. neotomae* 5k33 y *B. abortus* 2308).

Además, el software del equipo con el análisis de HRM permite hacer un análisis asignando genotipo a los patrones obtenidos a partir de la elección de patrones representativos, sin embargo, en este caso con el juego de cebadores para las especies de *Brucella* de origen marino no fue posible identificar a todos los aislamientos de Costa Rica utilizados como genotipo de *Brucella* marina eligiendo un patrón al azar (*B. ceti* CR4). Los resultados se observan en el cuadro 4. Esto se obtuvo tanto para algunas de las cepas aisladas en nuestro país o cepas de referencia y se sugiere que ocurre ya que existen pequeñas diferencias, a lo que el software resuelve como variaciones. También, se definen como variaciones algunos perfiles de referencia (Seal y Porpoise). Si permite identificar con 100% confianza, los genotipos de *Brucella* de origen terrestre (resultados en cuadro 4). Con respecto a los genotipos por HRM obtenidos se podría sugerir que es debido a la variación entre los aislamientos provenientes de los encallamientos en el Océano Pacífico Tropical Oriental y las diferencias encontradas con otros aislamientos, considerando que estos aislamientos se han caracterizado en estudios anteriores que definen una agrupación propia concordante con el origen geográfico y preferencia de

huésped (Groussaud *et al.*, 2007, Suárez- Esquivel *et al.*, 2017). En contraste, otros estudios utilizando este enfoque de identificación por asignación de genotipo, se ha logrado identificar especies del género *Brucella* pero con juegos de cebadores para otras especies como *B. canis* y *B. melitensis* (Young *et al.*, 2015). Cabe mencionar que esta técnica de HRM ha sido utilizada en otros estudios de otras especies de *Brucella* en Costa Rica y en colaboraciones de otros países (Suárez-Esquivel *et al.*, 2017, Guzmán-Verri *et al.*, 2019 y Álvarez *et al.*, 2020).

Cuadro 4. Asignación de genotipos otorgada con el software Rotor Gene utilizando los cebadores para especies de *Brucella* de origen marino.

ID ADN Cepa <i>Brucella</i>	Asignación de Genotipo	Porcentaje e confianza
<i>B. ceti</i> CR 2	Variación	No indica
<i>B. ceti</i> CR 4	<i>Brucella</i> marina	100%
<i>B. ceti</i> CR 5	Variación	No indica
<i>B. ceti</i> CR 10	<i>Brucella</i> marina	97,21%
<i>B. ceti</i> CR 11	Variación	No indica
<i>B. ceti</i> CR 12	Variación	No indica
<i>B. ceti</i> CR 13	<i>Brucella</i> marina	96,12%
<i>B. ceti</i> CR 20	Variación	No indica
<i>B. ceti</i> CR 26	Variación	No indica
<i>B. ceti</i> CR 27	<i>Brucella</i> marina	94,84%
<i>B. ceti</i> B14/94	<i>Brucella</i> marina	95,79%
<i>B. ceti</i> B1/94	Variación	No indica
<i>B. ceti</i> Seal (B2/94)	Variación	No indica
<i>B. abortus</i> 2308	<i>Brucella</i> terrestre	100%
<i>B. neotomae</i> 5k33	<i>Brucella</i> terrestre	100%

Con los resultados anteriores se sugiere que los primers diseñados para detectar especies de *Brucella* de origen marino parecen no ser los mejores para la identificación de estas (*B. ceti* en este caso) y además limita para diferenciar entre diferentes especies de origen marino (en el caso de B2/94 es una *B. pinnipedialis*), aunque si permite observar diferencias claras con otras especies como las de origen terrestre. Otros estudios basados en esta técnica, pero utilizando juego de cebadores para otras especies de *Brucella* han permitido identificar y discriminar aislamientos en infecciones en humanos (Yong *et al.*, 2015). Incluso, existen estudios donde se confirma la presencia de *B. ceti* en odontocetos (marsopas sin aleta) a partir de tejido cerebral y liquido mamario por técnicas como PCR, seguido de secuenciación del gen diana y caracterización filogenética (Mauroo *et al.*, 2020).

Por último, se realizó una electroforesis capilar para observar si el peso de las bandas coincidía con el esperado según el autor Winchell *et al.*, 2010. Se obtuvo un peso aproximado de 75 pb, lo que coincide con el peso esperado y el rango de error en la estimación del equipo. El resultado del gel virtual se muestra en la figura 8.

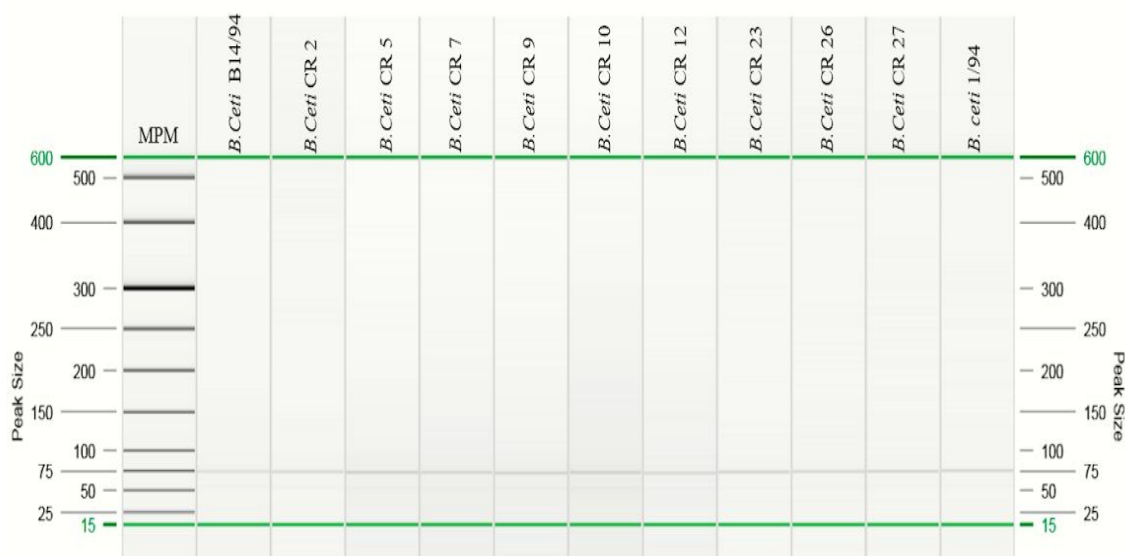


Figura 8. Resultado de electroforesis capilar para productos de PCR-HRM para ADN de *Brucella* a nivel de especie de origen marino. En orden de izquierda a derecha: MPM: marcador de peso molecular, ADN de *B. ceti* CR 2, 5, 7, 9, 10, 12, 23, 26, 27 y ADN de *B. ceti* de referencia B14/94 y B1/94).

Durante los experimentos para evaluar esta técnica se observó que la cantidad de ADN es un parámetro crítico ya que afecta al perfil de Melting. Además, al constatar con blast genómico la región donde se alinean los cebadores Bmar se evidenció que para el de sentido Forward se puede alinear en diferentes regiones por lo que estos no se unen específicamente a una región, sino que a secuencias repetidas entre 9 hasta 20 veces dentro del genoma de las cepas de *Brucella* (*Brucella ceti* cromosoma 1, *Brucella pinnipedialis* cromosoma 2) y en otras especies de origen terrestre, siendo la capacidad resolutive de la técnica afectada por la cantidad de amplicones obtenidos que a su vez estará influenciado por el número de copias de la secuencia blanco en las diferentes cepas. De acuerdo con Tong y colaboradores (2012), el análisis de HRM hace uso de la forma precisa de la curva de fusión, que es en función de la secuencia de ADN (% G C) y que en fragmentos pequeños amplificados la resolución puede ser de hasta una base nitrogenada, sin embargo, en la práctica suelen existir limitaciones como lo es detectar una única base en secuencias de 200 pb y en la reproducibilidad si hay variaciones en la concentración inicial de la plantilla inicial de ADN. Estos autores mencionan que la concentración inicial afecta la estequiometría de ADN-colorante lo que a su vez afecta las características de fusión.

3.5. Pautas para el manejo de delfines encallados

Contextualización de la situación actual en Costa Rica

Desde hace más de dieciséis años, el fenómeno de varamiento o de accidentes de mamíferos marinos que ocurren en aguas jurisdiccionales de nuestro país ha sido de atención y estudio. A partir del año 2004 se comienzan a analizar estos animales y se descubre que una posible causa de la llegada de algunas de estas especies a las costas podría ser el presentar síntomas compatibles con neurobrucelosis y se inicia las confirmaciones e investigación con la presencia del agente causal *Brucella ceti*. Dado el potencial zoonótico de este agente, así como la importancia en salud pública y el aumento del número de casos de delfines, particularmente de la especie conocida como delfín rayado que han presentado este fenómeno, se da la necesidad de atención para el manejo involucrando diferentes actores y se inicia con la educación y entrenamiento de quienes intervienen.

Actualmente, las intervenciones han sido coordinadas por personal del SENASA, Fundación Keto, Servicio Nacional de Guardacostas, Fuerza Pública, Ministerio de Ambiente, Sistema Nacional de Áreas de Conservación, Parque Marino del Pacífico y Servicio 911 y Organizaciones no Gubernamentales. También, es importante mencionar habitantes y turistas que comunican los eventos, así como voluntarios que pueden presentarse en los puntos de encallamiento a realizar colaboraciones. Al ser eventos aleatorios y debido a la diversidad de especies de mamíferos marinos que encallan en el país la logística del manejo varía considerando los individuos, condiciones geográficas y el recurso humano disponible, tanto de voluntarios como de las instituciones actoras.

Existe un protocolo para el Monitoreo Ecológico de las Agregaciones de Mamíferos Acuáticos elaborado por Sistema Nacional de Áreas de Conservación, el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo y Global Environment Facilit (SINAC, 2016). Donde se incorpora una guía de atención de primeros auxilios en caso de encontrar un animal encallado, sin embargo, si bien establece algunas formas de actuar, no contempla en su totalidad la complejidad de la atención de estos eventos, existiendo la necesidad de crear un protocolo propio para ello.

En ese contexto y considerando la complejidad para la atención de varamientos a continuación se presenta una propuesta de las pautas que pueden ser consideradas para la creación de un protocolo de manejo de cetáceos encallados.

Pautas para la creación de un protocolo para el manejo de cetáceos encallados en la playa

Consideraciones Generales

Antes de mencionar la propuesta de las pautas a considerar para el manejo, es importante considerar que se requiere que se establezcan y mejoren las vías de comunicación entre los diferentes actores para la coordinación de la atención de estos eventos. Además, se requiere de la educación constante y sensibilización de las poblaciones aledañas que pueden ser testigos de estos eventos y actores importantes, así como de disposición de rótulos de información accesibles para los turistas en caso de observación y/o acercamiento de estos eventos y particularmente a los animales que suelen ser llamativos y podrían ser portadores de enfermedades zoonóticas que pueden poner en riesgo la salud pública.

1. En caso de ser posible por las condiciones geográficas se requiere como primer paso el acercamiento cuidadoso hacia el animal e identificar si se encuentra vivo o no y comunicar a instituciones actoras en la toma de decisiones, esto en caso de que sea personas visitantes o aledañas al sitio del evento.

2. En caso que el animal este vivo, y exista la posibilidad de realizar maniobras de rescate, verificar la posición del cuerpo en que se encuentra y si esta de lado, colocarlo de forma que el pecho quede sobre la arena y cavar agujeros debajo de las aletas pectorales para que no presione al animal y verificar que puede respirar y que el espiráculo no esté obstruido. Es importante hidratar al animal colocando agua en el cuerpo con cuidado de no obstruir el espiráculo, por lo que se debe tener precaución con la cabeza. Otra opción es cubrir el cuerpo con toallas o ropa húmeda. Esperar por ayuda. No es recomendable empujar a la orilla el animal ya que es posible que regrese y muera tras varios intentos de regresarlo al mar. Se deben de tomar precauciones con el contacto del animal ya que puede ser portador de enfermedades zoonóticas que

representen riesgo a la salud humana. Además, si el animal mide más de tres metros, es preferible no moverlo.

3. Un animal que al ser rescatado y liberado lo más lejos de la orilla y que nada en círculos y regresa a la orilla varado es señal que no se puede orientar y algo no anda bien. Ante esta situación no es recomendable volver a regresarlo al mar. Se debe comunicar a autoridades para que atiendan el caso. Si hay presencia de personas en la playa, se debe procurar mantenerlas alejadas del animal y en silencio. Es de importancia apoyo de la policía local para mantener el sitio acordonado.

4. Cuando un animal se encuentre en deterioro de su estado de salud y muere o ya se encuentre muerto es necesario que exista la comunicación entre los actores que toman decisiones. Si es requerido la eutanasia del animal, y el tamaño del mismo lo permite, por ejemplo, en el caso de un delfín, esta deberá ser realizada por un médico veterinario. Para realizar la eutanasia deben respetar los principios de bienestar animal, causándole el menor sufrimiento al individuo. Para la aplicación de la eutanasia, el veterinario debe seguir las guías de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (2020) y las recomendaciones del Consejo Nacional de Médicos Veterinarios de Fauna Silvestre del Colegio de Médicos Veterinarios de Costa Rica.

5. Cuando el tamaño del cadáver del animal permita el traslado del mismo al Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE) del Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) se puede coordinar entre los diferentes actores para que sea estudiadas las causas del evento. Si el tamaño o las condiciones geográficas y otras no lo permiten, la coordinación con municipalidades es importante para el entierro adecuado del cuerpo, esto para resguardar la salud pública y ambiental.

6. En caso que sea posible, cuando se requiera realizar el entierro técnico sanitario coordinado por autoridades competentes y con la maquinaria adecuada, se requiere evidencias documentales de la especie que pueden ser registradas por diferentes personeros colaboradores y siempre que sea posible registrar datos biométricos del organismo y en la medida de posible toma de muestras realizada por médicos veterinarios o profesionales entrenados en estos casos, que puedan ser remitidas al SENASA como sangre y/o tejidos. Es importante georreferenciar la disposición final.

La recolección sistemática de datos sobre el hallazgo, proveerá de elementos a autoridades para una mejor gestión ambiental, sanitaria, y el suministro de información científica útil y de interés en las actividades de investigación, conservación y manejo.

7. Cuando los animales puedan ser trasladados al LANASEVE personal a cargo puede realizar los estudios correspondientes para tratar de conocer las causas del varamiento del animal y determinar la presencia de enfermedades con riesgo zoonótico como Brucelosis. La manipulación del cadáver se debe realizar con medidas sanitarias adecuadas como protección con guantes y cubrebocas y disposición adecuada del cuerpo en bolsas, siempre que el estado de descomposición lo permita.

8. En caso de sospecha de brucelosis, se puede realizar las confirmaciones del agente causal por medio de cultivo y aislamiento de la bacteria y de pruebas moleculares para confirmar la identidad, como la técnica PCR-HRM.

9. Para la atención de estos eventos es necesaria la asistencia humana e intervención de las Autoridades competentes, siendo necesario la creación y desarrollo de redes nacionales de varamiento que actúen bajo un protocolo y que cuenten con estrategias claras y efectivas para el manejo y la respuesta a estos eventos. Debe existir compromiso por parte de los actores involucrados.

10. Se debe trabajar en la reglamentación de las acciones de salvamento, recuperación, liberación y disposición de los restos a través de un sistema consensuado, coordinado y metódico para optimizar los recursos humanos, económicos y minimizar los accidentes emergentes en dichas operaciones de rescate, al igual que los riesgos sanitarios que implican estos eventos.

11. Designar miembros de la red para la atención de los medios de comunicación que pueden llegar a cubrir el evento de varamiento. Es importante comunicar de forma certera la información a los medios.

12. Promover desde los ministerios y autoridades gubernamentales programas de capacitación para asegurar la disponibilidad de personal técnico capacitado para la

atención de eventos de varamiento en las áreas de mayor ocurrencia del país y donde sea necesario por caso fortuito.

A continuación, se esquematiza un resumen de la propuesta:

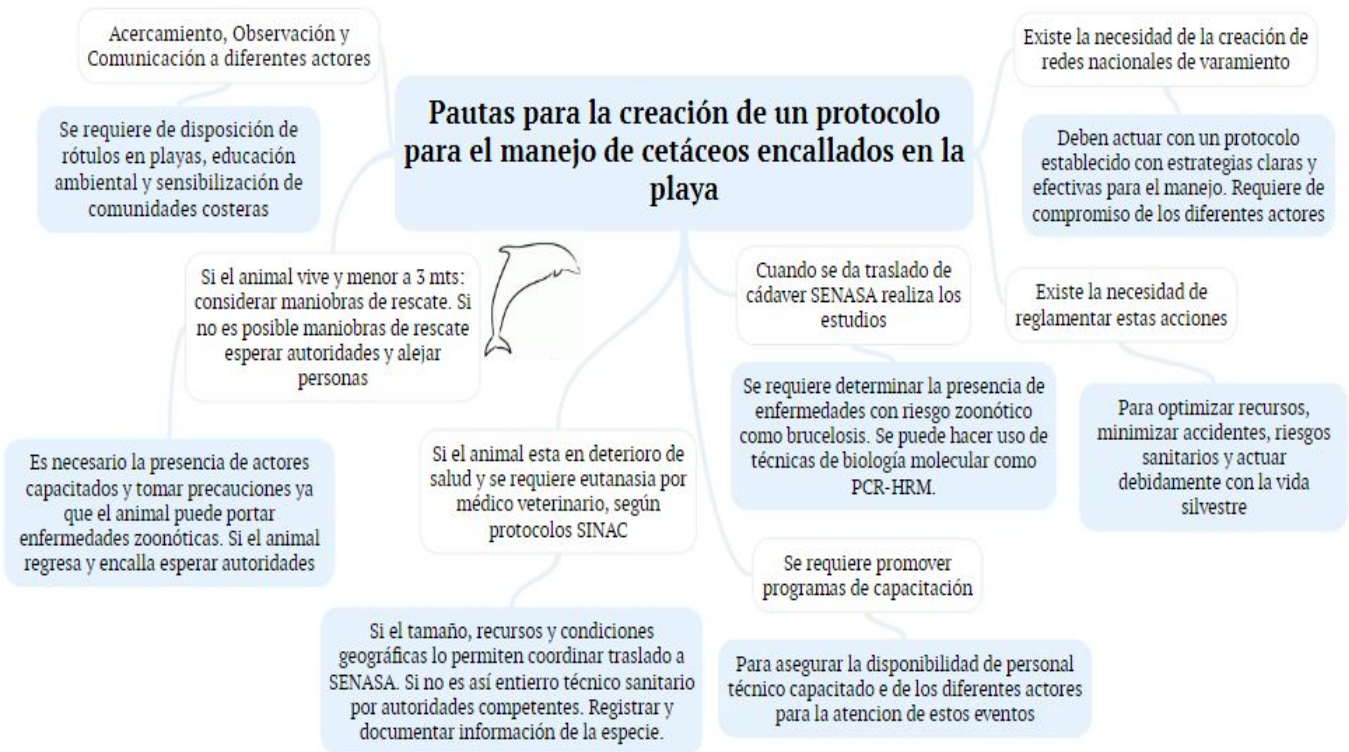


Figura 9. Esquema Resumen de la propuesta de pautas para la creación de un protocolo para el manejo de cetáceos encallados en playas de Costa Rica. Elaboración propia.

4. Consideraciones finales y recomendaciones

Con respecto a la técnica de PCR-HRM para la detección de *Brucella* se logró estandarizar las condiciones necesarias asegurando la reproducibilidad y especificidad. A nivel de género es capaz de detectar *Brucella* y a nivel de especies de origen marino permite diferenciar con respecto a otras especies origen terrestre. Sin embargo, la técnica resuelve variaciones entre las especies de *Brucella ceti* y otras de origen marino de forma que no permite diferenciarlas.

Se propone esta técnica como una herramienta más en las opciones moleculares para la identificación y discriminación del género de *Brucella*, aunque tiene sus limitantes como el control de la cantidad de ADN para asegurar que la diferencia entre los perfiles de HRM para identificar especies no se deban a esto. No obstante, a nivel de género como es un ensayo de presencia o ausencia, esta limitación no lo afecta.

Si lo que se desea es una pronta identificación de la infección en animales que encallen se recomienda estandarizar a partir de muestras directas del animal (líquido cefalorraquídeo, placenta, leche, líquidos fetales, tejido fetos abortados, u otros donde la bacteria se pueda encontrar en alta carga) usando cebadores diseñados en la región IS711 (que identifique a nivel de género y que sea de presencia-ausencia sin necesidad de un perfil de HRM).

La PCR-HRM es laboriosa y requiere de entrenamiento técnico y experiencia para controlar las condiciones. Sin embargo, por la gran similitud a nivel de genoma entre las especies de *Brucella* puede ser una herramienta útil en la discriminación siempre que se tenga un buen diseño de cebadores y validación bioinformática (*in silico*) de estos.

Con respecto a las pautas propuestas para el manejo de delfines encallados, se hace notable la necesidad que existe de la creación de un protocolo específico y reglamento para normalizar la atención de estos eventos, también de un mayor compromiso de los diferentes actores por la complejidad que eventos de este tipo presentan.

A pesar del avance en los últimos años en la atención de encallamientos y el estudio de las causas de estos eventos, sumado a los esfuerzos por parte de diferentes actores, es necesario promover un mayor apoyo en recurso humano y económico por parte de las diferentes autoridades y gobierno, así como otras instituciones que puedan involucrarse.

5. Bibliografía

- Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Munive, M. G. R., Olvera, B. P., & Cárdenas, M. E. C. 2010. PCR en tiempo real. Recuperado en línea el 10 de noviembre del 2016 de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/pertiempo.pdf>
- Alvarez, L. P., Ruiz-Villalobos, N., Suárez-Esquivel, M., Thomson, N. R., Marcellino, R., **Viquez-Ruiz, E.**, & Guzmán-Verri, C. 2020. Molecular characterization of *Brucella ovis* in Argentina. *Veterinary Microbiology*, 108703.
- Ariza, J., Cascio A., Colmenero J.D., Corbel M. y Falagas M.E. 2007. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. *PloS one* 4(12): 1872-1878.
- Attademo, F. L., Silva, J. C., Luna, F. O., Ikeda, J., Foppel, E. F., Sousa, G. P., & Keid, L. B. 2018. Retrospective survey for pathogens in stranded marine mammals in northeastern Brazil: *Brucella* Spp. infection in a Clymene dolphin (*Stenella Clymene*). *Journal of wildlife diseases*, 54(1), 151-155.
- Bargen, K., Gorvel J.P. y Salcedo S.P. 2012. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS microbiology reviews*. 36(3): 533-562.

- Camacho, E. F., & Villalobos, F. G. 2009. Brucelosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 66(590), 399-404.
- Costa, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(5), 299-305.
- Corbel MJ, & Brinley-Morgan WJ. 1984. Genus *Brucella*: En: Section 4. Gram Negative aerobic rods and coccid. Bergey's manual. Pp, 377-387.
- Corbel, M.J. 2006. *Brucellosis in humans and animals*. World Health Organization.
- Dean, A.S., Bonfoh B., Kulo A.E., Boukaya G.A., Amidou M., Hattendorf J. y Schelling E. 2013. Epidemiology of Brucellosis and Q Fever in Linked Human and Animal Populations in Northern Togo. *PloS one*. 8(8): 1-8.
- Di Francesco, G., Petrini, A., D'Angelol, A. R., Di Renzo, L., Luciani, M., Di Febo, T., & Matteucci, O. 2019. Immunohistochemical investigations on *Brucella ceti*-infected, neurobrucellosis-affected striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinaria italiana*, 55(4), 363-367.
- Erali, M., Voelkerding, K. V., & Wittwer, C. T. 2008. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and molecular pathology*, 85(1), 50-58.
- Franco M.P., Mulder M., Gilman R.H. y Smits H.L. 2007. Human brucellosis. *The Lancet infectious diseases*. 7(12): 775-786.
- González-Barrientos, R., Morales, J. A., Hernández-Mora, G., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., & Moreno, E. 2010. Pathology of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) infected with *Brucella ceti*. *Journal of comparative pathology*, 142(4), 347-352.
- Gopaul, K. K., Koylass, M. S., Smith, C. J., & Whatmore, A. M. 2008. Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC microbiology*, 8(1), 1.
- Groussaud, P., Shankster, S. J., Koylass, M. S., & Whatmore, A. M. 2007. Molecular typing divides marine mammal strains of *Brucella* into at least three groups with distinct host preferences. *Journal of medical microbiology*, 56(11), 1512-1518.
- Guzmán-Verri, C., González-Barrientos, R., Hernández-Mora, G., Morales, J. A., Baquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., & Moreno, E. 2012. *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans. *Front Cell Infect Microbiol*, 2(3), 1-22.
- Guzmán-Verri, C., Suárez-Esquivel, M., Ruíz-Villalobos, N., Zygmunt, M. S., Gonnet, M., Campos, E., **Viquez-Ruiz, E.** & Moriyón, I. 2019. Genetic and phenotypic characterization of the etiological agent of canine orchiepididymitis smooth *Brucella* sp. BCCN84. 3. *Frontiers in veterinary science*, 6, 175.

- Hernández-Mora, G., González-Barrientos, R., Morales, J. A., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Barquero-Calvo, E., De-Miguel, M., Marín, C. M. Blasco, J.M., & Moreno, E. 2008. Neurobrucellosis in stranded dolphins, Costa Rica. *Emerg Infect Dis*, 14(9), 1430-1433.
- Hernández-Mora, G., Manire, C. A., González-Barrientos, R., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Staggs, L., Thompson, R., Chaves-Olarte, E. & Moreno, E. 2009. Serological diagnosis of Brucella infections in odontocetes. *Clin. Vaccine Immunol.*, 16(6), 906-915.
- Hernández-Mora, G., Bonilla-Montoya, R., Barrantes-Granados, O., Esquivel-Suárez, A., Montero-Caballero, D., González-Barrientos, R., & Chanto, G. 2017. Brucellosis in mammals of Costa Rica: an epidemiological survey. *PLoS one*, 12(8), e0182644.
- Isidoro-Ayza, M., Ruiz-Villalobos, N., Pérez, L., Guzmán-Verri, C., Muñoz, P. M., Alegre, F., Barberán, M. Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., González-Barrientos, R., Moreno, E., Blasco, J.M. & Domingo, M. 2014. Brucella ceti infection in dolphins from the Western Mediterranean Sea. *BMC veterinary research*, 10(1), 206.
- Kang, S. I., Her, M., Kim, J. W., Kim, J. Y., Ko, K. Y., Ha, Y. M., & Jung, S. C. 2011. Advanced multiplex PCR assay for differentiation of Brucella species. *Applied and environmental microbiology*, 77(18), 6726-6728.
- Lista, F., Reubsæet, F. A., De Santis, R., Parchen, R. R., de Jong, A. L., Kieboom, J., Laaken, A., Van der Plas, J., & Paauw, A. 2011. Reliable identification at the species level of Brucella isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC microbiology*, 11(1), 267.
- Lopez-Goñi, I., Garcia-Yoldi, D., Marin, C. M., De Miguel, M. J., Munoz, P. M., Blasco, J. M., ... & Cardoso, R. 2008. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all Brucella species, including the vaccine strains. *Journal of clinical microbiology*, 46(10), 3484-3487.
- López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, C. M., de Miguel, M. J., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Albert, D. & Garin-Bastuji, B. 2011. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of Brucella suis and the discrimination of Brucella suis and Brucella canis. *Veterinary microbiology*, 154(1), 152-155.
- Maquart, M., Le Flèche, P., Foster, G., Tryland, M., Ramisse, F., Dønne, B., & Godfroid, J. 2009. MLVA-16 typing of 295 marine mammal Brucella isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within Brucella ceti and Brucella pinnipedialis. *BMC microbiology*, 9(1), 145.
- Mackie, J. T., Blyde, D., Harris, L., Roe, W. D., & Keyburn, A. L. 2020. Brucellosis associated with stillbirth in a bottlenose dolphin in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 98(3), 92-95.

- Mauroo, N. F., Poon, R. W., Beh, P. S., & Woo, P. C. 2020. Detection of *Brucella ceti* in Two Indo-Pacific Finless Porpoises (*Neophocaena phocaenoides*) Stranded in Hong Kong. *Journal of Wildlife Diseases*.
- McDonald W.L., Jamaludin R., Mackereth G., Hansen M., Humphrey S., Short P., Taylor T., Swingler J., Dawson C.E., Whatmore A.M., Stubberfeld E., Perrett L.L. & Simmons G. (2006). – Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. *J. clin. Microbiol.*, 44 (12), 4363–4370.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta*, 439, 231-250.
- Nymo, I. H., Tryland, M., & Godfroid, J. 2011. A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*). *Veterinary research*, 42(1), 1.
- OIE, 2018. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. In: Bovine Brucellosis, Office International des epizootics, Paris, Chapter 2.4.3.
- Ohishi, K., Amano, M., Nakamatsu, K., Miyazaki, N., Tajima, Y., Yamada, T. K., & Iwao, H. 2020. Serologic survey of *Brucella* infection in cetaceans inhabiting along the coast of Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 82(1), 43-46.
- Pappas G., Akritidis N., Bosilkovski M. y Tsianos E. 2005. Brucellosis. *N. Engl. J. Med.* 352: 325–336.
- QIAxcel DNA Handbook. 2014. Fifth Edition QIAGEN Sample and Assay Technologies. Disponible en www.qiagen.com
- Rhyan JC. 2013. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in wildlife. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 32, 127-136.
- Rotor Gene Q. 2018. User Manual. QIAGEN. Disponible en www.qiagen.com
- Scholz, H. C., & Vergnaud, G. 2013. Molecular characterisation of *Brucella* species. *Rev Sci Tech*, 32(1), 149-62.
- SINAC. 2016. *Protocolo PRONAMEC: Protocolo para el monitoreo ecológico de las agregaciones de mamíferos acuáticos*. Proyecto Consolidación de las Áreas Marinas Protegidas. Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) y El Fondo para el Medio Ambiente Mundial (GEF), San José, Costa Rica. 55p.
- Suárez-Esquivel, M., Ruiz-Villalobos, N., Castillo-Zeledón, A., Jiménez-Rojas, C., Roop, I. I., Martin, R., & Baker, K. S. 2016. *Brucella abortus* strain 2308 Wisconsin genome: importance of the definition of reference strains. *Frontiers in microbiology*, 7, 1557.
- Suárez-Esquivel, M., Ruiz-Villalobos, N., Jiménez-Rojas, C., Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., **Viquez-Ruiz, E.**, Rojas-Campos, N., Baker, K., Oviedo-Sánchez, G., Amuy, E., Chaves-Olarte, E., Thomson, N. Moreno, E. & Gúzman-Verri, C. 2017. *Brucella neotomae* infection in humans, Costa Rica. *Emerging infectious diseases*, 23(6), 997.

- Suárez-Esquivel, M., Baker, K. S., Ruiz-Villalobos, N., Hernández-Mora, G., Barquero-Calvo, E., González-Barrientos, R., Castillo-Zeledón, A., Jiménez-Rojas, C., Chacon-Diaz, C. Cloeckert, A., Chaves-Olarte, E., Thomson, N., Moreno, E & Gúzman-Verri, C. 2017. *Brucella* genetic variability in wildlife marine mammals populations relates to host preference and ocean distribution. *Genome biology and evolution*, 9(7), 1901-1912.
- Tong, S. Y., & Giffard, P. M. 2012. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *Journal of clinical microbiology*, 50(11), 3418-3421.
- Type-it® HRM™ PCR Handbook. 2009. QIAGEN. Disponible en www.qiagen.com
- Ueno, Y., Kumagai, M., Kanamori, H., Yanagisawa, M., Kino, S., Shigeno, S., ... & Ohishi, K. (2020). Draft Genome Sequence of *Brucella ceti* Isolated in the Western Pacific Ocean. *Microbiology Resource Announcements*, 9(39).
- Van Bresse M.F., Raga J.A., Di Guardo G.,P.D., Duignan P.J., Siebert U., Barrett T., Santos M.C.,Moreno I.B., Siciliano S., Aguilar A. & Van Waerebeek K. 2009. Emerging infectious diseases in cetaceans worldwideand the possible role of environmental stressors. *Dis. aquat.Organisms*, 86 (2), 143–157.
- Vega, C. Z., & Solano, O. R. 2013. Buscan atender problemática asociada al encallamiento de cetáceos y su relación con la brucelosis marina. *Investiga. TEC*, 15(15), 4-5.
- Villalobos-Vindas, J. M., Amuy, E., Barquero-Calvo, E., Rojas, N., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., Gúzman-Verri, C. & Moreno, E. 2017. Brucellosis caused by the wood rat pathogen *Brucella neotomae*: two case reports. *Journal of medical case reports*, 11(1), 352.
- Whatmore, A. M., Perrett, L. L., & MacMillan, A. P. 2007. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC microbiology*,7(1), 1.
- Whatmore, A. M. 2009. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1168-1184.
- White, H., and G. Potts. 2006. Mutation scanning by high resolution melt analysis: evaluation of RotorGene 6000™ (Corbett Life Science), HR1™, and 384 well LightScanner™ (Idaho Technology). National Genetics Reference Laboratory, Wessex, United Kingdom.
- Winchell, J. M., Wolff, B. J., Tiller, R., Bowen, M. D., & Hoffmaster, A. R. 2010. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time

PCR and high-resolution melt analysis. *Journal of clinical microbiology*, 48(3), 697-702.

Xavier, M., A Paixao, T., B den Hartigh, A., M Tsolis, R., & L Santos, R. 2010. Pathogenesis of *Brucella spp.* *The Open Veterinary Science Journal*, 4(1).

Yong, T. B., Hashim, R., Noor, A. M., Hamzah, S. H., & Ahmad, N. 2015. Identification of *Brucella spp.* isolated from human brucellosis in Malaysia using high-resolution melt (HRM) analysis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 81(4), 227-233.

6. Anexos

Anexo 1. Listado de aislamientos de *Brucella ceti* y otros controles utilizados en este trabajo y que pertenecen a la Bacterioteca del Programa de Investigación en enfermedades Tropicales (PIET) de la UNA.

ID de la cepa	Especie	Muestra de origen	Hospedero	Sexo	Edad estimada	ID del animal	Playa de encallamiento	Región/Lugar de procedencia y fecha origen
Bmar CR1	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Adulto	1+A	Tambor	Puntarenas Mayo 2006
Bmar CR2	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Juvenil	Media Luna	Tortuga	Puntarenas Junio 2006
Bmar CR3	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Juvenil	Felipe	Matapalo	Puntarenas Abril 2007

Bmar CR4	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Adulto	Marina	San Isidro	Puntarenas Abril 2007
Bmar CR5	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Adulto	Tormenta	Guacalillo	Puntarenas Octubre 2007
Bmar CR6	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Adulto	Estrella	Quepos	Puntarenas Agosto 2008
Bmar CR7	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Juvenil	Obama	Puntarenas	Puntarenas Noviembre 2008
Bmar CR8	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Adulto	Nessy	Barú	Puntarenas Mayo 2009
Bmar CR9	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Adulto	Esperanza	Malpais	Puntarenas Agosto 2009
Bmar CR10	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Adulto	Andrés	Camaronal	Puntarenas Julio 2010
Bmar CR11	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Adulto	Kiki	Pochote	Puntarenas Mayo 2011
Bmar CR12	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Juvenil	Monse	Puntarenas	Puntarenas Mayo 2011
Bmar CR13	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Juvenil	Sebastian	Guacalillo	Puntarenas Junio 2011
Bmar CR14	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Juvenil	Tambor	Tambor	Puntarenas Setiembre 2011
Bmar CR15	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Subadulto	Alex	Esterillos	Puntarenas Noviembre 2012
Bmar CR16	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Juvenil	N.I.	Tambor	Puntarenas Mayo 2012
Bmar CR17	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Adulto	Maya	Tambor	Puntarenas Diciembre 2012
Bmar CR18	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Juvenil	Angela	Lagarto	Guanacaste Agosto 2013
Bmar CR19	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Juvenil	Swarley	Santa Teresa	Guanacaste Agosto 2013
Bmar CR20	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Juvenil	Barú	Barú	Puntarenas Setiembre 2013
Bmar CR21	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Juvenil	Americo	Pochote	Puntarenas Abril 2014
Bmar CR22	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Juvenil	Emilia	Curú	Puntarenas Setiembre 2014
Bmar CR23	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Adulto	Yessi	Herradura	Puntarenas Octubre 2014
Bmar CR24	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	Puntarenas N.I.

Bmar CR25	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Juvenil	Diego	Bejuco	Puntarenas Junio 2015
Bmar CR26	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Juvenil	Luis	Bejuco	Puntarenas Junio 2015
Bmar CR27	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Adulto	Lily	Palo Seco	Puntarenas Junio 2015
Bmar CR28	<i>Brucella ceti</i>	Pulmón	<i>Stenella coeruleoalba</i>	M	Adulto	Walter	Playa Hermosa	Guanacaste Mayo 2016
Bmar CR30	<i>Brucella ceti</i>	LCR	<i>Stenella coeruleoalba</i>	F	Juvenil	Fernanda	Uvita, Osa	Puntarenas Enero 2018
B 1/94 (Porpoise)	<i>Brucella ceti</i>	Lesión en piel	<i>Phocoena phocoena</i>	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	Escocia 1994
B14/94	<i>Brucella ceti</i>	Lesión subcutánea	<i>Delphinus delphis</i>	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	Escocia 1994
Seal (B2/94)	<i>Brucella pinnipedialis</i>	Pulmón	<i>Phoca vitulina</i>	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	Escocia 1994
2308	<i>Brucella abortus</i>	Feto abortado	<i>Bos taurus</i>	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	Wisconsin, USA 1940
5k33	<i>Brucella neotomae</i>	N.I.	<i>Neotoma lepida</i>	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	Utah, USA 1967
1330	<i>Brucella suis</i>	N.I.	Suino o cerdo común	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	USA 1953

Anexo 2. Procedimiento extracción de ADN para los aislamientos de *Brucella ceti* y otros controles según kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification de Promega.

1. Rotular un tubo de 1.5 ml con la información de la muestra a extraer y añadir 1000 μ L del cultivo de *Brucella* spp en medio liquido (Caldo de Soya, CTS) con 48 horas de crecimiento.
2. Centrifugar los tubos a 13 000 rpm en una ultracentrífuga de mesa por 2 min para precipitar las bacterias.
3. Remover y descartar los sobrenadantes de los tubos.
4. Agregar 600 μ L de la solución de lisis de núcleos a los tubos. Pipetear suavemente varias veces hasta resuspender completamente el precipitado de bacterias.
5. Incubar a 80 ° C durante 5 minutos para lisar las células y dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Anadir 3 μ L de solución de RNasa a los lisados celulares. Invertir suavemente los tubos de 2-5 veces para mezclar.
7. Incubar a 37° C durante 15-60 min. Enfriar las muestras a temperatura ambiente.
8. Anadir 200 μ L de solución de precipitación de proteínas a cada lisado. Aplicar Vortex vigorosamente a alta velocidad durante 20 s para mezclar la solución de precipitación de proteínas con los lisados celulares.
9. Incubar las muestras en hielo durante 5 min.
10. Centrifugar a 13 000 rpm durante 3 min y transferir los sobrenadantes que contienen el ADN a tubos de 1.5 ml limpios y etiquetados conteniendo 600 μ L de isopropanol.
11. Mezclar suavemente por inversión hasta visualizar un hilo blanquecino que forman las hebras de ADN en suspensión.
12. Centrifugar a 13.000 rpm durante 2 min.
13. Descarte con cuidado el sobrenadante y seque la boca del tubo de forma invertida sobre papel absorbente limpio.
14. Anadir 600 μ L de etanol al 70% a temperatura ambiente a cada tubo e invertir suavemente varias veces para lavar el precipitado de ADN.
15. Centrifugar a 13 000 rpm durante 2 min y cuidadosamente aspirar el etanol.
16. Escurrir los tubos sobre un papel absorbente limpio y dejar que el precipitado se seque al aire durante 10-15 min.

17. Anadir 200 μL de solución de rehidratación de ADN a cada uno de los tubos y rehidratar el ADN incubando a 65°C durante 1 h. Mezclar periódicamente la solución suavemente.
18. Guardar el ADN a 4°C para usar en una semana o en congelación para mantener durante más tiempo.

Anexo 3. Datos de extracción de ADN para los aislamientos de *Brucella ceti* y otros controles utilizando el fluorómetro Qubit de Thermo Fisher Scientific y verificación del cumplimiento de índices de calidad y pureza determinados con el espectrofotómetro NanoDrop 2000.

ID de la cepa	Especie	Concentración extracción de ADN
Bmar CR1	<i>Brucella ceti</i>	48 ng/ μL
Bmar CR2	<i>Brucella ceti</i>	94 ng/ μL
Bmar CR3	<i>Brucella ceti</i>	58 ng/ μL
Bmar CR4	<i>Brucella ceti</i>	86 ng/ μL
Bmar CR5	<i>Brucella ceti</i>	94 ng/ μL
Bmar CR6	<i>Brucella ceti</i>	110 ng/ μL
Bmar CR7	<i>Brucella ceti</i>	49 ng/ μL
Bmar CR8	<i>Brucella ceti</i>	54 ng/ μL
Bmar CR9	<i>Brucella ceti</i>	29 ng/ μL
Bmar CR10	<i>Brucella ceti</i>	82 ng/ μL
Bmar CR11	<i>Brucella ceti</i>	76 ng/ μL
Bmar CR12	<i>Brucella ceti</i>	34 ng/ μL
Bmar CR13	<i>Brucella ceti</i>	48 ng/ μL
Bmar CR14	<i>Brucella ceti</i>	62 ng/ μL
Bmar CR15	<i>Brucella ceti</i>	37 ng/ μL
Bmar CR16	<i>Brucella ceti</i>	52 ng/ μL
Bmar CR17	<i>Brucella ceti</i>	47 ng/ μL
Bmar CR18	<i>Brucella ceti</i>	36 ng/ μL

Bmar CR19	<i>Brucella ceti</i>	43 ng/ μ L
Bmar CR20	<i>Brucella ceti</i>	74 ng/ μ L
Bmar CR21	<i>Brucella ceti</i>	63 ng/ μ L
Bmar CR22	<i>Brucella ceti</i>	58 ng/ μ L
Bmar CR23	<i>Brucella ceti</i>	72 ng/ μ L
Bmar CR24	<i>Brucella ceti</i>	69 ng/ μ L
Bmar CR25	<i>Brucella ceti</i>	89 ng/ μ L
Bmar CR26	<i>Brucella ceti</i>	102 ng/ μ L
Bmar CR27	<i>Brucella ceti</i>	59 ng/ μ L
Bmar CR28	<i>Brucella ceti</i>	61 ng/ μ L
Bmar CR30	<i>Brucella ceti</i>	94 ng/ μ L
B 1/94 (Porpoise)	<i>Brucella ceti</i>	38 ng/ μ L
B14/94	<i>Brucella ceti</i>	26 ng/ μ L
Seal (B2/94)	<i>Brucella pinnipedialis</i>	67 ng/ μ L
2308	<i>Brucella abortus</i>	114 ng/ μ L
5k33	<i>Brucella neotomae</i>	58 ng/ μ L
1330	<i>Brucella suis</i>	73 ng/ μ L