

**Universidad Nacional
Escuela de Medicina Veterinaria
Facultad de Ciencias de la Salud**

**Caracterización de la diversidad genética de *Brucella ceti* aisladas
en la costa del Pacífico de Costa Rica, mediante secuenciación de
nueve genes seleccionados.**

Modalidad: Tesis

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de
Licenciatura en Medicina Veterinaria**

María Marta Piche Ovares

**Campus Benjamín Núñez
2013**

APROBACION DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Dr. Rafael Ángel Vindas Bolaños

Vicedecano de la Facultad de Ciencias de la Salud _____

Dra. Laura Castro Ramírez, DMV. PhD

Directora Escuela de Medicina Veterinaria _____

Dra. Caterina Guzmán Verri, MQC, PhD.

Tutor _____

Dr. Edgardo Moreno Robles, MQC, PhD.

Lector _____

Dr. Carlos Jiménez Sánchez, DMV, PhD.

Lector _____

Fecha: _____

AGRADECIMIENTO

El primer agradecimiento y el más grande es para mis padres y mi hermano que siempre han estado conmigo y han creído en cada uno de mis sueños, igualmente a Ale que me ha apoyado en todo momento.

También agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, que más que compañeros han sido amigos, así como a Carla Murillo y la Dra. Gabriela Hernández que me ayudaron con el procesamiento de las muestras y el análisis MLST.

Agradezco también a la Dra. Caterina Guzmán que creyó en mí y me apoyó durante todo el proyecto, junto al Dr. Edgardo Moreno.

Este proyecto se llevó a cabo gracias al apoyo económico de NeTropica y el Fondo del Sistema del Consejo Nacional de Rectores, en el marco del proyecto “Elaboración de un protocolo para identificación de bacterias de género *Brucella* que representan un riesgo para la salud pública, veterinaria y la vigilancia epidemiológica en Costa Rica” del ITCR, UNA y UCR, dentro del Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, Costa Rica.

DEDICATORIA

A “*Data*” que siempre está conmigo guiando mis pasos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACION DEL TRIBUNAL EXAMINADOR	i
AGRADECIMIENTO	ii
DEDICATORIA	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Justificación	5
1.3. Objetivos	6
1.3.1. Objetivo General.....	6
1.3.2. Objetivos Específicos	6
4. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS	7
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	22
7. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	25
Anexo 1: Protocolo de purificación de ADN a partir de aislamiento de B. ceti	30
Anexo 2: Protocolo de extracción en gel	32
Anexo 3: Protocolo de purificación de productos de PCR	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Información de los aislamientos analizados.....	8
Cuadro 2: Preparación de las mezclas de reactivos para los diferentes PCR usados en el MLST.....	9
Cuadro 3: Secuencia de los cebadores a utilizar y tamaño esperado de los amplicones generados	11
Cuadro 4: Condiciones de ciclaje para cada PCR según el fragmento de ADN interrogado ..	12
Cuadro 5: Reacción de secuenciación según recomendación del fabricante.....	13
Cuadro 6: Preparación de la mezcla de reactivos para realizar el Bruce-ladder.....	14
Cuadro 7: Secuencia de los cebadores utilizados para la realización del Bruce-ladder y tamaño esperado de los amplicones.....	14
Cuadro 8: Cebadores utilizados para diferenciar aislamientos marinos	15
Cuadro 9: Patrones de bandas y pesos moleculares esperados según la cepa correspondiente	15
Cuadro 10: Condiciones de ciclaje para la reacción de PCR que diferencia aislamientos marinos	15
Cuadro 11: SNP's identificados basados en el genoma de <i>B. abortus</i> 9-941.....	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Árbol filogenético, en el cual se muestran las relaciones entre los diferentes aislamientos de <i>B. ceti</i> aisladas de Pacífico costarricense.....	18
Figura 2: Identificación y diferencia de los aislamientos nacionales respecto a las cepas de referencia mediante Bruce-ladder.....	20
Figura 3: Identificación y diferencia del fragmento de 794 pb.....	20
Figura 4: PCR para diferenciar cepas marinas.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

MLST: Tipificación mediante secuenciación de distintos loci

MLVA-16: Repeticiones consecutivas de tamaño variable en múltiples regiones del genoma

OIE: Organización Mundial para la Salud Animal

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

SNP's: Polimorfismos de un solo nucleótido

ST: Tipo de secuencia

VNTR: Repeticiones de número variable consecutivas

RESUMEN

Trece aislamientos bacterianos provenientes de delfines *Stenella coeruleoalba* encallados en la costa Pacífica de Costa Rica, fueron sometidos a caracterización bioquímica e identificados como *Brucella ceti*. Los mismos fueron genotipificados mediante tres diferentes procedimientos: MLST, un PCR multiplex (Bruce-ladder) para identificación de especies de *Brucella* y un PCR convencional para identificar diferentes cepas marinas de *Brucella*.

Por medio del MLST se comprobó que los aislamientos pertenecen al ST26, al igual que aislamientos previamente reportados del Atlántico. Adicionalmente, los aislamientos costarricenses presentaron SNP's no reportados antes. Por su parte, el Bruce-ladder dio como resultado un patrón de bandas similar al presentado por las cepas del Atlántico. Por último el PCR convencional mostró que ninguno de los aislamientos costarricenses presenta el patrón esperado siendo el aislamiento 5 el que presentó la mayor diferencia.

Por lo tanto los aislamientos del Pacífico aunque similares, no presentan las mismas características genotípicas que los del Atlántico, lo que genera la hipótesis de la existencia de variabilidad específica restringida geográficamente en *B. ceti*.

Debido a su poder de resolución, las técnicas moleculares de genotipo bacteriano son un buen complemento de las técnicas tradicionales de identificación, capaces de distinguir diferencias sutiles entre poblaciones bacterianas. Son por lo tanto una excelente herramienta para la vigilancia epidemiológica.

ABSTRACT

Thirteen bacterial isolates from striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded on the Pacific coast of Costa Rica were subjected to biochemical characterization, and identified as *Brucella ceti*. They were genotyped by three different procedures: MLST, a multiplex PCR (Bruce-ladder) to identify the *Brucella* species, and a common PCR to identify different marine strains of *Brucella*.

The MLST analysis indicated that the isolates belong to ST26, the same as isolates from the Atlantic Ocean. In addition, Costa Rican isolates from the Pacific Ocean show SNPs that have not been previously reported. In the Bruce-ladder analysis the Costa Rican isolates showed the same band pattern as the Atlantic ones. Finally, the conventional PCR showed that the Costa Rican strains from the Pacific Ocean had a completely different pattern, with isolate 5 being the most distinct.

Therefore the Pacific isolates belong to the same MLST group as Atlantic isolates, but present unique genotype characteristics, leading to the hypothesis of the existence of geographically specific variability in *B. ceti*.

Due to their power of resolution, molecular techniques for genotyping bacteria are a good complement to traditional identification techniques, and are able to distinguish subtle differences between bacterial populations. They are therefore an excellent tool for epidemiological surveillance.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La brucelosis es causada por bacterias del género *Brucella* y afecta tanto mamíferos terrestres como marinos. Es además una de las cinco zoonosis más importantes a nivel mundial (Corbel, 1997). La falta de políticas claras, tanto a nivel internacional como local ha generado que esta zoonosis bacteriana sea clasificada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como una zoonosis reemergente, que tiene alto impacto en la salud humana y la economía. La OIE, prevé que esta situación continuará a corto y mediano plazo (Organización Mundial de la Sanidad Animal, 2009).

El género *Brucella* está constituido por 8 especies reconocidas con preferencia para sus hospederos: *Brucella abortus* (bovinos), *Brucella melitensis* (caprinos y ovinos), *Brucella ovis* (ovinos), *Brucella canis* (caninos), *Brucella suis* (porcinos), *Brucella neotomae* (roedores), *Brucella pinnipedialis* (focas), *Brucella ceti* (delfines y marsopas). Además, existe la propuesta de incluir a nivel de especie, otras cepas denominadas preliminarmente como *Brucella inopinata* aislada de un implante de seno (Scholz et al., 2010), así como de una biopsia de pulmón en un paciente con neumonía destructiva crónica (Tiller et al., 2010) y *Brucella microti*, aislada de roedores europeos y zorros (Scholz et al., 2008).

Recientemente, con el descubrimiento de nuevas especies con características epidemiológicas diferentes, crece la complejidad de la interacción con los seres humanos (Corbel, 1997). Sohn et al (2003), realiza un reporte de una aislamiento de *Brucella* en humanos el cual se relacionó con cepas de mamíferos marinos. Los pacientes presentaban afecciones de

tipo neurológico y granulomas intracraneales, por lo tanto, el potencial zoonótico de estos aislamientos se encuentra bajo investigación.

A pesar de que la descripción de *B. pinnipedialis* y *B. ceti* en mamíferos marinos es relativamente reciente, se ha encontrado una gran cantidad de aislamientos de estas especies (Foster et al., 2007). El uso de nuevas técnicas diagnósticas ha permitido demostrar mayor variabilidad de la esperada en los aislamientos de *Brucella* de mamíferos marinos, por lo que hoy en día se discute la posibilidad de separar la especie *B. ceti* en dos nuevas especies, una que afecta principalmente delfines y otra que infecta principalmente a marsopas (Maratea et al., 2003).

Desde mayo del 2006 hasta junio del 2011 se ha registrado el encallamiento de 16 delfines rayados *Stenella coeruleoalba* en las costas del Pacífico costarricense. Hernández-Mora et al. (2006), realizaron varias pruebas en estos animales para determinar la presencia o el contacto con *Brucella*. Los delfines estudiados revelaron exposición previa a la bacteria y de éstos se logró aislar *B. ceti* (Slon, 2010; Hernández-Mora et al., 2008). Este hallazgo es relevante debido a que a nivel mundial son muy pocos los reportes de delfines de esta especie infectados con *B. ceti* (Maquart et al., 2009; Whatmore et al., 2007). Es además el primer reporte a nivel mundial de aislamientos de *B. ceti* en la costa del Pacífico.

La caracterización molecular de estos aislamientos mediante el análisis de repeticiones consecutivas de tamaño variable en múltiples regiones del genoma (MLVA-16, por sus siglas en inglés), demuestra que existe una alta diversidad tanto a nivel de microsátélites como de minisátélites en el genoma de *Brucella*. Además, se observó que los aislamientos pueden ser clasificados en tres grupos que comparten muchas de las repeticiones de número variable consecutivas (VNTR por su siglas en inglés) estudiadas. Adicionalmente, se reportó un nuevo peso molecular para el locus Bruce 11, lo cual sugiere que existe heterogeneidad en la población de *Brucella* aisladas de mamíferos marinos, siendo los aislamientos del Pacífico, distintos a los del Atlántico (Murillo-Ramírez, 2011).

En los últimos años la secuenciación de alelos (usualmente, pero no exclusivamente) de genes bacterianos conservados, ha ganado aceptación como una herramienta para la caracterización de poblaciones microbianas, desde el punto de vista práctico y taxonómico (Whatmore et al., 2007; Urwin & Maiden, 2003). Este tipo de herramientas ha sido aplicado para la clasificación de especies dentro del género *Brucella*. Debido a que el porcentaje de similitud a nivel de genoma entre las diferentes especies de *Brucella* es mayor al 95%, desde el punto de vista formal taxonómico, el género debería estar constituido por una sola especie. Sin embargo, debido a que los distintos aislamientos presentan una alta especificidad por su hospedero, desde el punto de vista práctico, clínico y epidemiológico tiene mayor valor separar al género en distintas especies (Whatmore, 2009). Esta división basada en criterios biológicos más allá de los taxonómicos, representa a su vez un reto desde el punto de vista del diseño de técnicas de identificación a nivel de especie, subtipo o genotipo.

Whatmore et al (2007) utilizaron técnicas basadas en la caracterización de secuencias de distintos loci (MLST por sus siglas en inglés) para establecer la variabilidad intra e interespecie de *Brucella*. Para ello se seleccionaron 9 loci (Cuadro 3) correspondientes a 160 aislamientos de *Brucella* a nivel mundial, tanto de mamíferos terrestres como marinos. Los mismos fueron amplificados mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y posteriormente secuenciados. De los productos obtenidos se identificaron 27 tipos de secuencias, de acuerdo a la combinación de alelos seleccionados (ST por sus siglas en inglés). La relación entre los STs se examinó mediante análisis filogenético. Los ST de los aislamientos de mamíferos marinos relacionados con delfines, fueron clasificados como ST 26; en cambio, los aislamientos que fueron obtenidos de humanos y relacionados con mamíferos marinos se clasificaron como ST 27, lo que hace sospechar de que aunque relacionados, pertenecen a una rama diferente de *Brucella* (Whatmore et al., 2008).

A su vez, López-Goñi et al (2008), desarrollaron una nueva técnica de diferenciación entre especies la cual denominaron Bruce-ladder. Este es un PCR multiplex útil en la identificación de los diferentes biotipos de *B. abortus* así como del resto de especies del género *Brucella*, incluidas las especies marinas y las cepas vacunales. El PCR se basa en la amplificación de seis o siete amplicones especie-específicos, los cuales dependiendo de la especie en cuestión, generan un patrón de bandas que es único para cada especie o biotipo. Esta técnica es recomendada por la OIE como complemento a otras técnicas de identificación bacteriológicas (Manual Terrestre, Organización Mundial la Sanidad Animal, 2009). Sin embargo, la misma no logra diferenciar *B. microti* de *B. suis* y las cepas marinas *B.ceti* de *B. pinnipedialis*. Además, al momento de su desarrollo, no se contaba con el reporte de *B. inopinata* (López-Goñi et al., 2008; Scholz et al., 2010). Debido a lo anterior se modificó y mejoró la técnica, permitiendo distinguir todas las especies de *Brucella* conocidas (Mayer-Scholl et al., 2010).

En esta modificación se utilizan los 8 pares de cebadores utilizados por López-Goñi et al. (2008), y un par utilizado por Mayer-Scholl et al.(2010) para distinguir *B. microti*. En este nuevo PCR se observa una diferencia sutil entre *B. ceti* y *B. pinnipedialis* en el amplicón esperado de 794 pares de bases (pb) (Cuadro 7). En *B. ceti* hay una duplicación parcial de un segmento de 19 pb de las cuales 15 pb son idénticas a las de la una región repetitiva cercana. Por lo tanto, en *B. ceti* el amplicón es de 794 pb, mientras que en *B. pinnipedialis* es de 813 pb (Cuadro 7) (Mayer-Scholl et al., 2010).

Adicionalmente, en un esfuerzo por tratar de discriminar los aislamientos marinos, García-Yoldi, (2009), realiza un análisis bioinformático de las secuencias de ácidos nucleicos hasta ese momento reportadas de aislamientos marinos del Atlántico y diseña dos pares de cebadores para la diferenciación de las mismas (Cuadro 8). La amplificación de los fragmentos se dio mediante un PCR convencional y se obtuvieron amplicones de distintos tamaños según las diferentes cepas. En este ensayo se obtuvo una banda de 548 pb la cual era específica para *B. ceti* y una de 425 pb para *B.*

pinnipedialis, de esta manera se logra diferenciar ambas especies. Con el segundo par de cebadores, se obtiene un amplicón de 278 pb que se conserva en ambas especies pero se encuentra ausente en *B. ceti* B14/94, aislada de una marsopa.

1.2. Justificación

Tradicionalmente, el diagnóstico de la brucelosis se ha basado en hallazgos anatomopatológicos así como pruebas de laboratorio, principalmente la prueba rápida de aglutinación en placa (Rosa de Bengala) para la detección de anticuerpos contra *Brucella*. Estas pruebas son capaces de brindar información acerca de si el paciente ha estado en contacto con la bacteria pero no permiten identificar la especie de *Brucella* en cuestión. Para ello, es necesario realizar el aislamiento del agente, su posterior estudio bacteriológico e identificación bioquímica. Sin embargo debido a la gran similitud que existe entre las especies, es necesario corroborar esta identificación basándose en pruebas moleculares. Debido a los pocos aislamientos reportados a nivel mundial, se tiene poca información de la diversidad *B. ceti*. Consecuentemente, no existen herramientas validadas para la identificación, no se tiene clara su biología e interacción con el hospedero, su potencial zoonótico y potencial para infectar a otros mamíferos como por ejemplo ungulados (Quinn et al., 2011).

En este estudio se utilizará la técnica de MLST para caracterizar 14 aislamientos de *B. ceti* obtenidos de delfines rayados encallados en la costa del Pacífico de Costa Rica, así como la técnica de Bruce-ladder y el PCR propuesto por García-Yoldi (2009) para distinguir las cepas marinas. De esta forma se podrá validar el uso de dichas técnicas con aislamientos que no han sido estudiados antes y así corroborar si son capaces de distinguir e identificar aislamientos marinos del Pacífico. También se corroborará la identificación de estos aislamientos mediante la caracterización molecular, se podrán realizar comparaciones con otras especies de *Brucella*, tanto terrestres como marinas y contribuir en el entendimiento de la especiación y evolución

del género. Además se podrá establecer un mejor patrón epidemiológico de la enfermedad y de la interacción hospedero parásito, que es esencial para entender la dispersión de la brucelosis, tanto en animales silvestres como en domésticos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

1. Caracterizar mediante la técnica de MLST, catorce aislamientos de *B. ceti* obtenidos de delfines rayados encallados en la costa del Pacífico de Costa Rica entre los años 2006 a 2011 inclusive.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el ST de estos aislamientos.
2. Identificar los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)
3. Corroborar mediante otras técnicas (Bruce-ladder, PCR para diferenciación de cepas marinas), las posibles diferencias de *B. ceti* aisladas del Pacífico con otros aislamientos de distinto origen.

4. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Muestras utilizadas:

Para este estudio se utilizaron aislamientos silvestres que fueron obtenidos de delfines que encallaron en la costa Pacífica de Costa Rica. Las características particulares de cada aislamiento se indican en el Cuadro 1. Además de estos aislamientos silvestres se utilizaron cepas marinas de referencia: *B.ceti* b14/94, *B. ceti* B1/94 (Cloeckaert et al., 2011), *B. pinnipedialis* B2/94 (Audic et al., 2011).

Los aislamientos se encuentran en la bacterioteca del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria.

Cuadro 1: Información de los aislamientos analizados. Todos los aislamientos provienen de líquido cefalorraquídeo de delfines rayados (*Stenella coeruleoalba*) encallados en la costa Pacífica costarricense, con la excepción del aislamiento 8w que proviene de un nematodo del pulmón del mismo delfín de donde se obtuvo el aislamiento 8 (Hernández-Mora, 2009; Slon, 2010; Murillo-Ramírez, 2011).

Número de aislamiento	Sexo	Edad	Sitio de encallamiento	Provincia	Mes	Año	Resultado de caracterización bioquímica	Resultado del MLVA
1	Hembra	Adulto	Tambor	Puntarenas	Mayo	2006	<i>B. ceti</i>	<i>B. ceti</i> M18/96/1
2	Hembra	Juvenil	Tortuga	Puntarenas	Julio	2006	<i>B. ceti</i>	<i>B. ceti</i> M18/96/1
3	Macho	Juvenil	Matapalo	Puntarenas	Abril	2007	<i>B. ceti</i>	<i>B. ceti</i> M18/96/1
4	Hembra	Adulto	San Isidro	Puntarenas	Abril	2007	<i>B. ceti</i>	<i>B. ceti</i> M656/99/2
5	Hembra	Adulto	Guacalillo	Puntarenas	Octubre	2006	<i>B. ceti</i>	<i>B. ceti</i> M656/99/2
6	Hembra	Adulto	Quepos	Puntarenas	Agosto	2007	<i>B. ceti</i>	<i>B. ceti</i> M57/07/1
7	Macho	Juvenil	Puntarenas Centro	Puntarenas	Noviembre	2008	<i>B. ceti</i>	<i>B. ceti</i> M18/96/1
8	Macho	Adulto	Barú	Puntarenas	Mayo	2009	<i>B. ceti</i>	<i>B. ceti</i> M260/03/1
8w	Macho	Adulto	Barú	Puntarenas	Mayo	2009	<i>B. ceti</i>	<i>B. ceti</i> M260/03/1
9	Hembra	Adulto	Malpaís	Puntarenas	Agosto	2009	<i>B. ceti</i>	<i>B. ceti</i> M18/96/1
10	Macho	Adulto	Camaronal	Guanacaste	Julio	2010	<i>B. ceti</i>	<i>B. pinnipedialis</i> M194/00/1
11	Hembra	Adulto	Pochote	Puntarenas	Mayo	2011	<i>B. ceti</i>	<i>B. ceti</i> M52/07/9
12	Hembra	Juvenil	Monseñor Sanabria	Puntarenas	Mayo	2011	<i>B. ceti</i>	<i>B. ceti</i> M13/05/1
13	Macho	Juvenil	Guacalillo	Puntarenas	Junio	2011	<i>B. ceti</i>	<i>B. ceti</i> M656/99/2

4.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante un protocolo descrito por el fabricante “DNeasy Blood & tissue kit” (Qiagen, 2006) (Anexo 1).

4.3. MLST

Para el estudio mediante MLST se utilizó como base la metodología empleada por Whatmore et al (2007) y adaptada por Hernández-Mora (2009).

Concretamente, se amplificaron nueve distintos fragmentos genómicos por medio de reacciones de PCR. En el Cuadro 2 se muestran las cantidades necesarias para la realización de los diferentes PCRs, en este caso se prepararon con un volumen final de 25 μ l y no de 50 μ l como en la metodología original. Los cebadores que se utilizaron en las diferentes reacciones se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro2: Preparación de las mezclas de reactivos para los diferentes PCR usados en el MLST (Whatmore et al., 2007).

Reactivo	Cantidad
Agua estéril	18.8 μ l
10x Pfu amortiguador con MgSO ₄	2.5 μ l
Par de cebadores (30 μ M por cebador)	0.7 μ l*
dNTP's mix 10mM	0,5 μ l
Pfu ADNpolimerasa 2.5u/ μ l.	0.5 μ l
ADN (20 ng/ μ l)	2 μ l

* con excepción de cebadores trpE en el cual se utiliza 1.4 μ l de cebadores y se ajusta la cantidad de agua a 18.1 μ l.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador ABI 3100. Para cada fragmento genómico se utilizó un ciclaje según se muestra en el Cuadro 4. Los productos se separaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% (Sambrook & Russell, 2001).

Los productos obtenidos se purificaron mediante cromatografía por filtración en gel, utilizando columnas del kit para extracción en gel “QIAquick” (Qiagen, 2008) (Anexo 2), este procedimiento se realizó para asegurarse que se contaba con la banda del peso esperado, así como si se presentaban más bandas elegir la correspondiente de manera que se purificara lo más posible el producto esperado. Después de este procedimiento se lleva a cabo una segunda purificación mediante otro proceso de cromatografía por filtración en gel, utilizando columnas del kit de purificación para productos de PCR “QIAquick PCR purification” (Qiagen, 2008) (Anexo 3). Al finalizar esta segunda purificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar la concentración de los productos. La concentración se obtiene mediante comparación visual con el marcador de peso molecular #SM0403 de Fermentas®: en este caso se utilizó 5µl de ADN y 5µl de marcador y se compara con la tabla proporcionada por el fabricante (Fermentas, 2004). Para la secuenciación se utilizó el “Big Dye terminator kit 3.1” (Applied Biosystems, 2002) según las instrucciones del fabricante (cuadro 5) además de un cebador del cuadro 4 correspondiente para cada fragmento de ADN, a una concentración de 3.2 mM para *trpE* y 1.6 mM para el resto de los fragmentos. El protocolo para la reacción de secuenciación que se utilizó fue el siguiente: 96 °C por 1 minuto, seguido por 25 ciclos de 96°C 10 segundos, 50°C 5 segundos, 60°C 4 minutos. Posteriormente los productos fueron desecados para luego ser leídos en un analizador genético 3130 (Applied Biosystem®) en el centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica

Cuadro 3: Secuencia de los cebadores a utilizar y tamaño esperado de los amplicones generados (Whatmore et al., 2007).

Gen o porción del mismo amplificado	Tamaño (bp)	Secuencia de los cebadores
<i>gap</i> (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa)	589	5' YGCCAAGCGCGTCATCGT 3' 5' GCGGYTTGGAGAAGCCCCA 3'
<i>aroA</i> (3-phosphoshikimato1-carboxiviniltransferasa)	565	5' GACCATCGACGTGCCGGG 3' 5' YCATCAKGCCCATGAATTC 3'
<i>glk</i> (glucoquinasa)	475	5' TATGGAAMAGATCGGCGG 3' 5' GGGCCTTGTCCTCGAAGG 3'
<i>dnaK</i> (proteína chaperona)	470	5' CGTCTGGTCGAATATCTGG 3' 5' GCGTTTCAATGCCGAGCGA 3'
<i>gyrB</i> (ADN girasa subunidad B)	469	5' ATGATTTTCATCCGATCAGGT 3' 5' CTGTGCCGTTGCATTGTC 3'
<i>trpE</i> (antranilato sintasa)	486	5' GCGCGCMTGGTATGGCG 3' 5' CKCSCCGCCATAGGCTTC 3'
<i>cobQ</i> (ácido coróbico sintasa)	422	5' GCGGGTTTCAAATGCTTGA 3' 5' GGCGTCAATCATGCCAGC 3'
<i>omp25</i> (proteína de membrana externa de 25 kilo Dalton)	490	5' ATGCGCACTCTTAAGTCTC 3' 5' GCCSAGGATGTTGTCCGT 3'
<i>Int-hyp</i> (región corriente arriba y extremo 5' de gen que codifica una proteína hipotética en el locus BruAb1_1395 del genoma de <i>B. abortus</i> 9-941)	430	5' CAACTACTCTGTTGACCCGA 3' 5' GCAGCATCATAGCGACGGA 3'

La edición de las secuencias obtenidas se realizó en forma manual mediante el programa de computo Mega (Mega, 2011). Este mismo programa se utilizó para comparar las secuencias entre sí y con otras secuencias obtenidas a nivel mundial, se consideraron diferentes si diferían en 1 o más sitios (Whatmore, et al., 2007)

Para la comparación con otras secuencias se utilizó la base de datos pública “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (2012a), donde se publican secuencias de biomoléculas obtenidas a nivel mundial y el programa de computo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), (NCBI, 2012b).

El análisis filogenético se realizó con las secuencias concatenadas de cada uno de los aislamientos. Para determinar las distancias genéticas se utilizó el modelo Jukes-Cantor, que se basa en la suposición de que todos las sustituciones de nucleótidos son igualmente probables, además se utilizó el método de “bootstrap” para medir los niveles de confianza (Whatmore et al., 2007). Estos análisis se realizaron con el programa de computo Mega (2011).

Cuadro 4: Condiciones de ciclaje para cada PCR según el fragmento de ADN interrogado (Hernández Mora, G. 2009)

<i>cobQ</i>	<i>int-hyp</i>	<i>dnak</i>	<i>gyrB</i>	<i>glk</i>
1. 94 °C 5 min.	1. 94 °C 5min.	1. 94 °C 5min.	1. 94°C 5 min.	1. 94 °C 5 min.
2. 30 ciclos: a. 94°C 1 min.	2. 30 ciclos: a. 94°C 1 min	2. 30 ciclos: d. 94°C 1 min	2. 30 ciclos: a. 94 °C 1 min.	2. 30 ciclos: a. 94 °C 1 min.
b. 55 °C 1 min.	b. 55 °C 1 min	e. 55 °C 1 min	b. 61 °C 1 min.	b. 68 °C 1 min.
c. 72 °C 1 min.	c. 72 °C 1 min.	f. 72 °C 1 min.	c. 72 °C 1 min.	c. 72 °C 1 min.
3. 72 °C 10 min.	3. 72 °C 10 min.	3. 72 °C 10 min.	3. 72 °C 10 min.	3. 72 °C 10 min.

<i>trpE</i>	<i>omp25</i>	<i>aro A</i>	<i>gap</i>
1. 94 °C 5 min.	1. 94 °C 5 min.	1. 94 °C 5 min.	1. 94 °C 5 min.
2. 30 ciclos: a. 94 °C 1 min.	2. 30 ciclos: a. 94 °C 1 min.	2. 30 ciclos: a. 94 °C 1 min.	2. 30 ciclos: a. 94 °C 1 min.
b. 66 °C 1 min.	b. 65 °C 1 min.	b. 51 °C 1 min.	b. 68 °C 1 min.
c. 72 °C 1 min.	c. 72 °C 1 min.	c. 72 °C 1 min.	c. 72 °C 1 min.
3. 72 °C 10 min.	3. 72 °C 10 min.	4. 72 °C 10 min.	3. 72 °C 10 min.

Cuadro 5: Reacción de secuenciación según recomendación del fabricante.

Reactivo	Cantidad
Big dye terminator®	4 µl
Amortiguador	2 µl
Cebador una concentración 3.2 mM para <i>trpE</i> y 1.6 mM para el resto de los fragmentos	2 µl *
ADN	Cantidad necesaria para obtener 40ng
Agua	Se ajusta según la cantidad de ADN
Volumen final	20 µl

*para *cobQ* y *trpE* se utilizaron 4µl.

4.3. Bruce-ladder

Para la realización del Bruce-ladder se siguió la metodología propuesta por Mayer-Scholl et al (2010) con algunas modificaciones (Cuadro 6). Para ello se prepararon 3 fracciones las cuales denominaron: LMR, VMR y el ADN, una vez preparadas las fracciones se mezclan la fracción LMR y la VMR, se inicia ciclaje, cuando se alcanza una temperatura de 94°C, se le agrega el ADN. El ciclo se inicia con una desnaturalización inicial a 94°C por 15 minutos, seguidos de 25 ciclos de 94°C por 30 segundos y 90 segundos a 58°C. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 2% por 2 horas, para favorecer una buena separación de las bandas (Sambrook & Russel, 2001). Los cebadores utilizados se encuentran en el Cuadro 7. Este PCR multiplex se realizó con los catorce aislamientos más las cepas de referencia *B. cetii* 1/94, *B. cetii* B14/ 14 (Cloeckert et al., 2011), *B. pinnipedialis* B2/94 (Audic et al., 2011) y la cepa *B. abortus* 2308.

Cuadro 6: Preparación de la mezcla de reactivos para realizar el Bruce-ladder (Mayer-Scholl et al., 2010).

LMR (40 µl)	VMR (20 µl)	ADN (40 µl)
6 µl de H ₂ O	1 µl de H ₂ O	4 µl de ADN
12 µl de buffer X2	18 µl de buffer X2	36 µl de H ₂ O
8 µl de dNTP's (40µM)	1 µl de enzima (AmpliTag Gold DNA polymerase ®)	
10 µl de la mezcla de cebadores (cada uno a una concentración de 2 pmol/µl)		
4 µl de MgCl ₂ (25mM)		

Cuadro 7: Secuencia de los cebadores utilizados para la realización del Bruce-ladder y tamaño esperado de los amplicones (López-Goñi et al., 2008, Mayer-Scholl et al 2010).

Cebador	Tamaño (pares de bases)	Secuencia
BME10998f	1682	ATC CTA TTG CCC CGA TAA GG
BME10997r		GCT TCG CAT TTT CAC TGT AGC
BME10535f	450	GCG CAT TCT TCG GTT ATG AA
BME10536r		CGC AGG CGA AAA CAG CTA TAA
BME1436f	794 (<i>B. ceti</i>)	ACG CAG ACG ACC TTC GGT AT
BME11435r	813 (<i>B. pinnipedialis</i>)	TTT ATC CAT CGC CCT GTC AC
BME110428f	587	GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG
BME110428r		AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG
BR0953f	272	GGA ACA CTA CGC CAC CTT GT
BR0953r		GAT GGA GCA AAC GCT GAA G
BME10752f	218	CAG GCA AAC CCT CAG AAG C
BME10752r		GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA
BME110987f	152	CGC AGA CAG TGA CCA TCA AA
BME110987r		GTA TTC AGC CCC CGT TAC CT

4.4. PCR para distinguir aislamientos marinos.

Para diferenciar los diferentes aislamientos marinos se realizó la reacción de PCR convencional propuesta por García-Yoldi, (2009), donde se utilizaron: 25µl de PCR master mix (Fermentas®), 0.7 µl de cada cebador (concentración inicial de 30µM) (Cuadro 8), 22,3 µl de

agua, 2 µl de ADN. Las condiciones de ciclaje se muestran en el Cuadro 10. Luego del PCR, las muestras fueron analizadas mediante un gel de agarosa al 2% el cual se corrió por 2 horas para favorecer la separación de las bandas (Sambrook & Russel, 2001). El patrón de bandas reportado por García-Yoldi, (2009) se encuentra en el cuadro 9.

Cuadro 8: Cebadores utilizados para diferenciar aislamientos marinos (García-Yoldi, 2009)

Cebador	Secuencia del cebador
BMEI0205 f	CGT CAA CTC GCT GGC CAA GAG
BMEI0205 r	GCA GGA GAA CCG CAA CCT AA
BMEI1688 f	TCA ACT GCG TGA ACA ATG CT
BMEI1687 r	GCG GGC TCT ATC TCA AGG TC

Cuadro 9: Patrones de bandas y pesos moleculares esperados según la cepa correspondiente.

Cebador	<i>B. pinnipedialis</i>	<i>B. ceti</i>	
		B1/94 (delfín)	B14/94 (marsopa)
BMEI0205 f/r	425 pb	548 pb	548 pb
BMEI1688-1687 f/r	278 pb	278 pb	—

Cuadro 10: Condiciones de ciclaje para la reacción de PCR que diferencia aislamientos marinos (García-Yoldi, 2009)

95°C → 7 minutos	
95°C → 35 segundos	} 25 ciclos
64°C → 45 segundos	
72°C → 3 minutos	
72°C → 6 minutos	

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. MLST

El objetivo del experimento fue caracterizar los aislamientos de *B. cetii* y clasificarlas según su ST en ST26, ST27 o en nuevo ST, además se buscaron SNP's para corroborar si eran los mismos que Whatmore et al (2007) reportaban para *B. cetii*.

Al analizar 3636 nucleótidos de los 9 aislamientos y compararlos entre sí y con la cepa de referencia *B. abortus* 9-941 se pudo determinar que los aislamientos costarricenses corresponden al ST 26, además se pudieron identificar SNP's que no se habían reportado antes. En el cuadro 11 se muestran los SNP's identificados en los diferentes aislamientos y su posición, que en este caso es relativa porque es respecto a la secuencia concatenada obtenida, que aunque conserva el mismo orden para concatenar los diferentes genes (*gap*, *aroA*, *glk*, *dnaK*, *gyrB*, *trpE*, *cobQ*) de algunos de ellos se obtuvieron secuencias más cortas por lo cual la posición no es igual a la obtenida por Whatmore et al (2007).

En el gen *int-hyp* se pueden observar varios SNP's lo cual se puede esperar debido a que este gen codifica para una proteína hipoteca y es un gen poco conservado, por lo cual se puede esperar variabilidad y eventualmente se puede utilizar para identificar variabilidad. En el gen *cobQ* se pueden observar gran cantidad de inserciones así como SNP's. Este gen se considera un gen conservado y se espera que los cambios que se acumulen sean muy lentos, por lo cual se podría intuir por este gen que la población bacteriana se separó mucho tiempo atrás. Para el caso de *omp25* no se encontró ningún SNP, este gen codifica para una proteína de membrana de 25 kDa que potencialmente Whatmore et al (2007) propone como un marcador de superficie

que puede ser utilizado para discriminar entre las diferentes especies, al estar conservado en los aislamientos costarricenses se puede utilizar para clasificar las especies de *B. ceti*.

Cuadro 11: SNP's identificados basados en el genoma de *B. abortus* 9-941. El nucleótido original pertenece a *B. abortus* 9-941, la posición es relativa a la secuencia concatenada

Aislamiento	Nucleótido Original. Inserción o delección	SNP	Posición
Cr8 <i>gap</i>	C	Inserción	11
Cr9 <i>gap</i>	T	Inserción	40
Cr6 <i>gap</i>	A	Delección	525
Cr3 <i>aroA</i>	A	Inserción	893
Cr3 <i>aroA</i>	T	Inserción	899
Cr4 <i>glk</i>	A	Inserción	919
Cr13 <i>dnaK</i>	C	T	1369
Cr7 <i>dnaK</i>	C	T	1568
Cr8w <i>gyrB</i>	A	Inserción	1701
Cr8w <i>gyrB</i>	C	T	2086
Cr3 <i>cobQ</i>	T	C	2547
Cr3 <i>cobQ</i>	A	G	2855
Cr1 <i>cobQ</i>	A	Inserción	2858
Cr3 <i>cobQ</i>	A	Inserción	2858
Cr8w <i>omp25</i>	A	Inserción	2894
Cr7 <i>omp25</i>	C	Inserción	3274
Cr6 <i>int-hyp</i>	C	T	3300
Cr7 <i>int-hyp</i>	G	A	3342
Cr6 <i>int-hyp</i>	A	C	3392

La relación entre los diferentes aislamientos se determinó mediante un árbol filogenético utilizando el modelo de Jukes-Cantor y el método de “bootstrap”. Los porcentajes de los niveles de confianza fueron calculados con 500 iteraciones. En la figura 1 se puede apreciar que todos los aislamientos provienen de un ancestro común y todos los aislamientos costarricenses se clasifican como ST 26, al igual que el aislamiento *B. ceti* VLA05/8, proveniente de un delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) aislada en el Reino Unido. Como referencia se utilizaron el aislamiento *B. ceti* F5-02, el cual pertenece al ST 27, *B. pinnipedialis* F10/99 que pertenece a ST 25 y la cepa de *B. abortus* 9-941 que pertenece al ST 1.

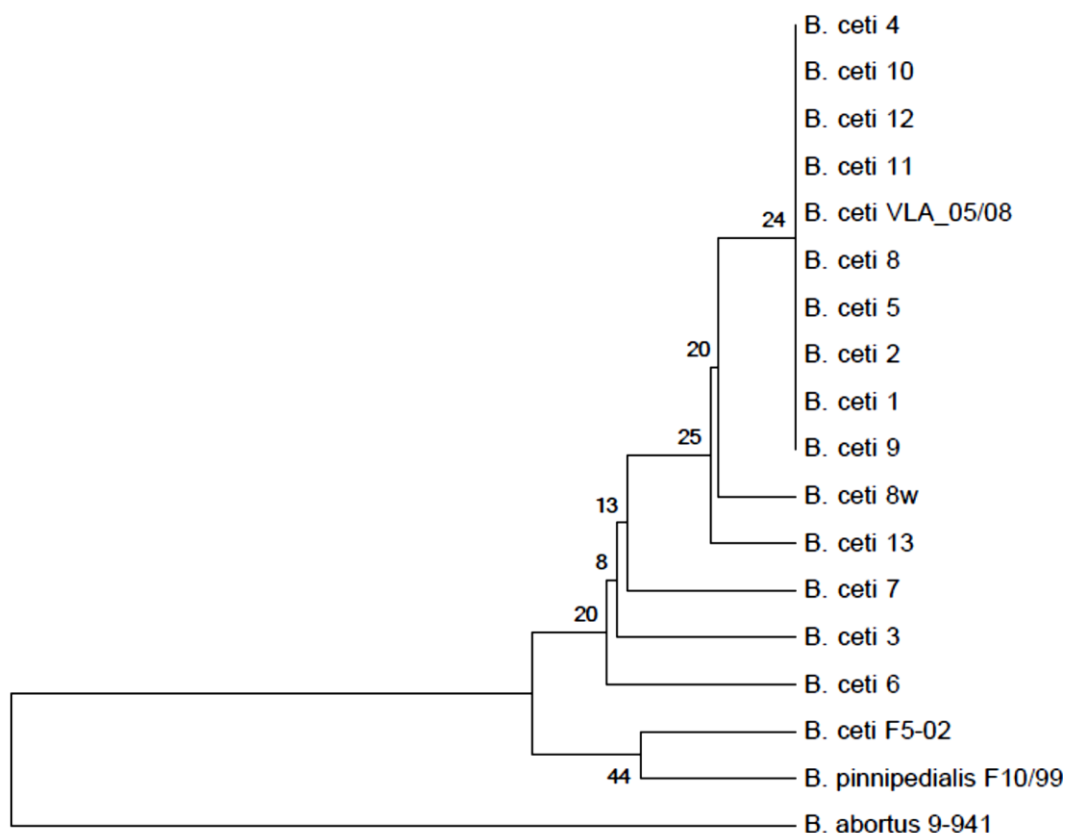


Figura 1: Árbol filogenético, en el cual se muestran las relaciones entre los diferentes aislamientos de *B. ceti* aisladas del Pacífico costarricense (1-13) con las cepas *B. ceti* F5-02 (ST 27), *B. pinnipedialis* F10-99 y *B. abortus* 9-941. Los números en cada rama representan los porcentajes de los niveles de confianza basados en 500 iteraciones.

5.2. Bruce-ladder

Este ensayo se llevó a cabo con el fin de comprobar si esta técnica era capaz de identificar correctamente a los aislamientos de *B. ceti* del Pacífico costarricense, debido a que este ensayo está recomendado por la OIE para la identificación a nivel de especie (Organización Mundial de la Sanidad Animal, 2009).

El ensayo se realizó bajo las mismas condiciones propuestas por García-Yoldi (2009) y las modificaciones de Mayer-Scholl et al (2010). Según la referencia original el patrón de bandas esperado para las cepas de *B. ceti* es un patrón de 6 bandas (1682 pb, 1071 pb, 794 pb, 587 pb, 450 pb, 152 pb). En el caso de los aislamientos costarricenses se pudo observar el mismo patrón de bandas esperado (Figura 2), así mismo se pudo comprobar la técnica tiene validez para los aislamientos de este estudio. La diferencia en la banda de 794 pb en un gel que contenga todo el patrón de bandas es muy sutil por lo cual se realizó un PCR solamente con este fragmento genómico (Figura 3). En este gel se puede ver la diferencia entre las bandas. El resultado obtenido es consistente con lo esperado para una *B. ceti* y por lo tanto confirma los datos obtenidos mediante otras técnicas utilizadas (caracterización bioquímica y MLVA). En conclusión la técnica se puede utilizar como técnica de identificación para las *Brucellas* marinas.

Cabe resaltar que para obtener un buen resultado en este ensayo hay que utilizar una enzima de alta procesividad, debido a que si se utiliza una de una procesividad estándar no se logra amplificar el fragmento de mayor tamaño (1071 bp) que se espera para los aislamientos

de *B. ceti*, así como para todas las cepas de *Brucella* a excepción de *B. ovis*.

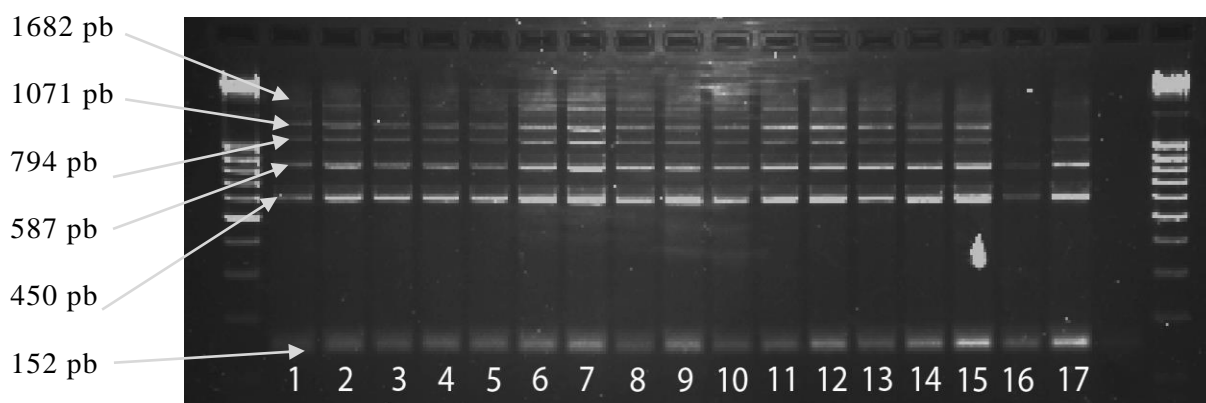


Figura 2: Identificación y diferencia de los aislamientos nacionales respecto a las cepas de referencia mediante Bruce-ladder: 1-14 Muestras nacionales, 15- *B. pinnipedialis* B2/94 (foca), 16-*B. ceti* b1/94 (marsopa), 17-*B. ceti* b14/94 (delfin).



Figura 3: Identificación y diferencia del fragmento de 794 pb correspondiente al Bruce-ladder: 1-14 Muestras nacionales, 15- *B. pinnipedialis* B2/94 (foca), 16-*B. ceti* b1/94 (marsopa), 17-*B. ceti* b14/94 (delfin) 18- *B. abortus* 23-08.

5.3. PCR para diferenciar cepas marinas

Con este experimento se trató de validar el ensayo propuesto por García-Yoldi, 2008 para diferenciar cepas marinas. Al realizar este ensayo se encontró que el patrón de bandas que

se genera es completamente distinto al reportado, dando como resultado un patrón nunca antes descrito.

Como se puede observar en la figura 3, todos los aislamientos del Pacífico costarricense presentan un patrón diferente a las cepas de referencia (carriles 16 y 17). Estas son *B. ceti* de diferentes orígenes, presentan una banda de 548 pb y en el caso de la *B. ceti* b14/94 una segunda banda con un peso de 278 pb. En el caso de las cepas costarricenses presenta un peso menor en la banda superior siendo la diferencia más evidente en el aislamiento 5. En el resto de los aislamientos costarricenses la banda superior es de aproximadamente 500 pb y la de este aislamiento 5 presenta un peso aproximadamente 350 pb. El fragmento BMEI0205 pertenece a un gen que codifica para una proteína que une inmunoglobulinas (National Center for Biotechnology Information, 2002) En el caso del fragmento perteneciente a BMEI1688 este es un gen codificante de una proteína hipotética (National Center for Biotechnology Information, 2002). El fragmento de 278 pb se conserva en todos los aislamientos.

Como se puede observar esta no es una técnica válida para clasificar los aislamientos marinos debido a que los aislamientos costarricenses presentan una gran variabilidad y no hay un patrón claro. Pero, puede ser utilizado para ver variabilidad en fragmento de 548 pb.

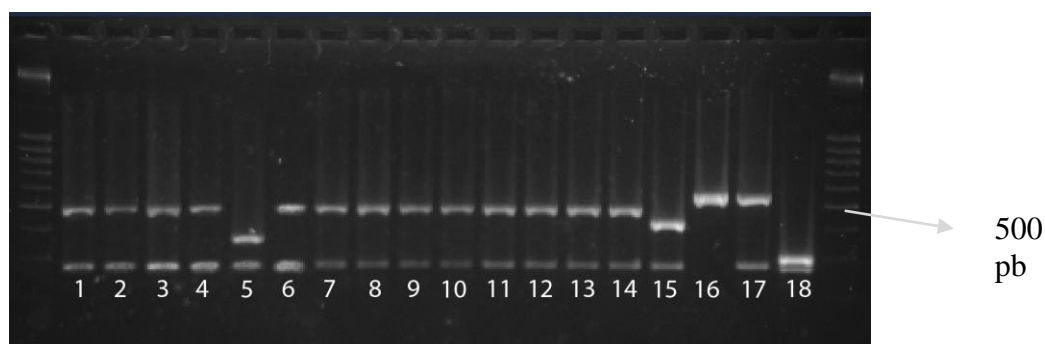


Figura 4: PCR para diferencias cepas marinas con los cebadores BMEI0205 f/r y BMEI1688 f/r: 1-14 Muestras nacionales, 15- *B. pinnipedialis* B2/94 (foca), 16-*B. ceti* b1/94 (marsopa), 17-*B. ceti* b14/94 (delfín), 18- *B. abortus*.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. MLST

Este estudio se realizó con el fin de analizar la diversidad genética de *B. ceti* con respecto al resto de las cepas reportadas a nivel mundial. Aunque muchos de los genes se consideran conservados se pudo observar que en muchos ellos se encontraron inserciones, deleciones y SNP's.

Whatmore et al (2007), plantean que los SNP's reportados pueden ser utilizados como marcadores para la identificación de las diferentes especies, pero como se pudo observar las cepas costarricenses presentan otros SNP's no reportados antes por lo cual, se crea un nuevo patrón para comparar las cepas de *B. ceti*.

Esta técnica plantea un nuevo estilo de realizar taxonomía y entender la diversidad genética especialmente en el caso de *Brucella* que es un género altamente conservado, debido a que no se basa en un solo marcador molecular sino que crea un patrón entre diversos marcadores.

Aunque la técnica plantea una de las mejores maneras de clasificación también hay que tomar en cuenta que es un proceso tedioso y que conlleva mucho tiempo para analizar toda la información generada, en el caso de este estudio en particular se tuvo el inconveniente que muchos de los SNP's planteados se encuentran al inicio de la secuencia y si las secuencias generadas son muy cortas este se pierde por lo cual, no se puede comparar secuencias de igual longitud lo que hace que se pierda información.

Cloekaert et al (2011) proponen un PCR para identificar los aislamientos que pertenecen al ST27 interrogando una región IS711, plantea que esta región solo la poseen los aislamientos pertenecientes a este tipo de secuencia, por consiguiente los aislamientos que

pertenecen al ST 26 al no poseerla no amplifican esta región. Respecto a esta técnica tiene sus reservas debido a que cuando no se obtiene un producto pueden mediar varios factores por lo cual puede dar falsos negativos. Se recomienda que si se quiere una correcta clasificación del tipo de secuencia al cual pertenece el aislamiento de *Brucella ceti* en cuestión se realice todo el procedimiento antes descrito, aunque es más tedioso da un resultado más confiable.

6.2. Bruce-ladder

El reto inicial de esta técnica es que lograra distinguir un género bacteriano tan similar como lo es *Brucella*. Las ventajas que presenta respecto a otras técnicas es que se realiza en un máximo de tres días y la información es fácil de analizar así como que distingue las cepas vacúnales, sin embargo, es importante destacar que no distingue entre biovares entre la misma especie de *Brucella* como si lo logra hacer el MLST.

En el caso de los aislamientos del pacífico costarricense, presentaron el mismo patrón de bandas que las cepas de referencia *B. ceti* b14/94, por lo cual puede ser utilizada como un medio de identificación para las cepas marinas de nuestro país. Además es importante destacar que para diferenciar el fragmento de 794 pb es necesario realizarlo en un gel aparte para poder identificar la diferencia de pesos.

Esta técnica también arroja que los fragmentos interrogados son similares en ambas cepas tanto las del Pacífico con el Atlántico por lo cual se puede asumir que son fragmentos conservados, por lo anterior son útiles como marcadores para la identificación de estas cepas.

6.3. PCR para diferenciar cepas marinas

En esta técnica se pudo observar que ninguna de las cepas de nuestro país presenta el patrón de bandas correspondiente a las cepas de referencia, las regiones interrogadas por estos genes corresponden a proteínas hipotéticas lo cual puede explicar su variabilidad.

En la cepa 5 es donde se nota una diferencia aún mayor en el patrón de bandas esta región corresponde a una proteína de unión a inmunoglobulinas (NCBI, 2002) por lo cual se puede concluir que es una región poco conservada debería ser secuenciada y comparada con las otras *B. ceti* tanto las costarricenses como las de referencia. Con este resultado se crea un nuevo patrón de bandas para los aislamientos de la costa pacífica que no había sido reportado antes por lo cual se evidencia la variabilidad genética existente entre las diferentes poblaciones de *B. ceti*.

Todas las técnicas evaluadas lograron identificar como *B. ceti* los aislamientos estudiados y por lo tanto son complemento de la caracterización bioquímica y el genotipo realizado mediante MLVA, en conjunto para una correcta y mejor clasificación de la especie de *Brucella* en cuestión. También se pudo evidenciar la heterogenicidad que existe entre las cepas de Pacífico y las de Atlántico

Este tipo de técnicas permiten una mejor vigilancia epidemiológica a nivel nacional, no solo con bacterias del género *Brucella* sino con cualquier tipo de agente debido a que este tipo de técnicas especialmente los MLST se pueden utilizar con diferentes agentes bacterianos.

7. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- Applied Biosystems, 2002. Big Dye® terminator v3.1 cycle sequencing kit [en línea]. Applied biosystems, EE. UU. http://www.ibt.lt/sc/files/BDTv3.1_Protocol_04337035.pdf (Consulta: 31 oct 2012)
- Audic, S., M. Lescot, J. M. Claverie, A. Cloeckaert & M. Zygmunt. 2011. The genome sequence of *Brucella pinnipedialis* B2/94 sheds light on the evolutionary history of genus *Brucella*. [en línea]. BMC. 11:200 <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/200>. (Consulta: 12 ago 2013)
- Cloeckaert, A., N. Bernardet, M. S. Koylass, A. Whatmore & M. S. Zygmunt. 2011. Novel IS *711* chromosomal location useful for the identification of the marine mammal *Brucella* genotype ST27 associate with zoonotic infection. J. clin. microbial. 49: 3954-3959
- Corbel, M. J. 1997. Brucellosis: an overview. Emerg. Infect. Dis. 3: 213-221
- Fermentas, 2004. MassRuler™ DNA Ladder, Mix, ready-to-use #SM0403 [en línea]. Fermentas, EE.UU. http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/FER_/SM0403.20060614.pdf (Consulta: 19 abr 2013)
- Foster, G, B. Osterman, J. Godfroid, I. Jacques & A. Cloerckaert. 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred host. Int. J. Syst. Evol. Micr. 57: 2688-2693
- Garcia-Yoldi. 2009. Tipificación molecular de *Brucella* y amplificación de la PCR para el diagnóstico de brucelosis. Tesis de doctorado, Universidad de Navarra, España.

- Hernández-Mora, G. 2006. Desarrollo y validación química y serológica de un ensayo inmunoenzimático ELISA para el diagnóstico de la brucelosis en odontocetos. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional, Heredia, C.R.
- Hernández-Mora, G. 2009. Entrevista con la Dra. Gabriela Hernández Mora, encargada del laboratorio de Bacteriología. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Heredia, nov, 15
- Hernández-Mora, G, R. González-Barrientos, J.A. Morales, E. Chavez-Olarte, C. Guzmán-Verri, E. Barquero-Calvo, M.J. De-Miguel, C.M. Marín, J.M. Blasco & E. Moreno. 2008. Neurobrucellosis in Stranded Dolphin, Costa Rica. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1430-1433
- López-Goñi, I, D. García-Yoldi, C. M. Marín, M. J. De Miguel, P. M. Muñoz, J. M. Blasco, I. Jacques, M. Grayon, A. Cloeckaert, A. C. Ferreira, R. Cardoso, M. I. Corrêa de Sá, K. Walravens, D. Albert & B. Garin-Bastuji. 2008. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J. clin microbiol.* 46: 3484-3487
- Maquart, M, P. Le Flèche, G. Foster, M. Tryland, F. Ramisse, B. Djonne, S. Al Dahouk, I. Jacques, H. Neubauer, K. Walraven, J. Godfroid, A. Cloeckaert & G. Vergnaud. 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*. [en línea]. *BioMed.* 9:145. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/145> (Consulta: 2 nov. 2011)

- Maratea, J, D.R. Ewalt, S. Frasca, J. L. Dunn, S. De Guise, L. Szkudlarek, D.J. St Aubin & R. A. French. 2003. Evidence of *Brucella* sp. infection in marine mammals stranded along the coast of southern New England. *J. zoo. Wildlife med.* 34:256-261
- Mayer-scholl, A, A. Draeger, C. Göllner, H. C. Scholz & K. Nöckler. 2010. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *J. Microbiol Meth.* 80: 112-114.
- Mega. 2011. Molecular Evolutionary Genetics Analysis [en línea] Versión 5.05. Mega, EE.UU.
- Murillo-Ramírez, C. 2011. Caracterización molecular de aislamientos de *Brucella ceti* obtenidas en la costa pacífica costarricense. Tesis de bachillerato, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, C.R.
- National Center for Biotechnology Information. 2012a. NCBI [en línea] National Center for Biotechnology Information. Maryland, EE. UU. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>(Consulta: 31 oct 2012)
- National Center for Biotechnology Information. 2012b. Blast [en línea] National Center for Biotechnology Information. Maryland, EE. UU. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Consulta: 31 oct 2012)
- Organización mundial de la Sanidad Animal. 2009. Manual Terrestre: Brucelosis. [en línea] Organización mundial de la Sanidad Animal, Paris, Francia. http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.11.3.htm (Consulta: 03 mar 2011)
- Qiagen. 2006. DNeasy® blood and tissue handbook [en línea]. Qiagen, Tex. <http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=103715> (Consulta: 31 oct 2012)

- Qiagen. 2008. QIAquick® spin handbook [en línea]. Qiagen, Tex.
<http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=103715> (Consulta: 31 oct 2012)
- Quinn P. J., B.K. Markey, F. C. Leonard, P. Hartigan, S. Fanning & E. S. FitzPatrick. 2011.
Veterinary microbiology and microbial disease. 2th ed. Wiley-Blackwell, Iowa, EE. UU.
- Sambrook, J, D. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3th ed. CSHL PRESS,
New York.
- Scholz, H. C., K. Nöckler, C. Göllner, P. Bahn, G. Vergnaud, H. Tomaso, S. Al Dahouk, P.
Kämpfer, A. Cloeckert, M. Maquart, M Zygmunt, A. Whatmore, M. Pfeffer, B. Huber,
H.J. Busse & B. Kumar De. 2010. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast
implant infection. *Int j syst evol micr*, 60: 801-808
- Scholz, H. C., Z. Hubalek, I. Sedláček, G. Vergnaud, H. Tomaso, S. Al Dahouk, F. Melzer, P.
Kämpfer, H. Neubauer, A. Cloerckaert, M. Maquart, M. Zygmunt, A. Whatmore, E.
Falsen, P. Bahn, C. Göllner, M. Pfeffer, B. Huber, H.J. Busse & K. Nöckler. 2008.
Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. j. sust.*
evol. micr. 58: 375-382
- Slon-Campos, J.L. 2010. Estandarización de un protocolo de identificación bioquímico para la
diferenciación de especies del género *Brucella*. Tesis de licenciatura, Universidad de
Costa Rica, San Pedro, C.R.
- Sohn, A., W.S. Probert, C.A. Glaser, N. Gupta, A.W. Bollen, J.D. Wong, E.M. Grace & W.C
Mc Donald. 2003. Human Neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a
marine mammal *Brucella* spp. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 485-488

- Tiller R., J. Gee, D. Lonsway, S. Gribble, S. Bell, A. Jennison, J. Bater, C. Coulter, A. Hoffmaster & B. De. 2010. Identification of an usual *Brucella* strain (B02) from a lung biopsy in a 52 year old patient with chronic destructive pneumonia. [en línea]. BMC Microbiology. 10:23.<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2180-10-23.pdf>. (Consulta: 8 ago. 2013)
- Urwin R. & M.C. Maiden. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol. 11: 479-487
- Whatmore, A. M. 2009. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Emerg. Infect. Dis. 9: 1168-1184
- Whatmore, A., C. E. Dawson, P. Groussaud, M. S. Koylass, A.C. King, S.J. Shankster, A. H. Sohn, W.S. Probert & W.L. McDonald. 2008. Marine mammal *Brucella* genotype Associated with zoonotic infection. Emerg. Infect. Dis.14: 517,518
- Whatmore A., L. Perret & A. MacMillan. 2007. Characterization of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing [en línea]. BioMed. 7:34. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/7/34>. (Consulta: 10 nov. 2011)

8. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de purificación de ADN a partir de aislamiento de *B. ceti*

El protocolo se basa en lo planteado por el protocolo del kit “DNeasy blood and tissue” de Qiagen, versión 2006, con algunas modificaciones. La manipulación de las bacterias vivas debe realizarse en una cámara de bioseguridad.

El protocolo requiere una concentración de 1×10^9 UFC

Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

El cálculo de la concentración se realiza mediante turbidimetría, para lo cual se utilizan 0.3 ml de muestra con 2.7 ml de caldo tripticasa de soya. La medición de absorbancia se realiza a una longitud de onda 420 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20D+ (Thermo Scientific®). El resultado de la medición se introduce en la siguiente ecuación para obtener los mililitros que contienen 1×10^9 UFC.

$$\text{UFC} = \frac{A_{420} - 0.0046}{2 \times 10^{-10}} \rightarrow 1 \times 10^9 \rightarrow x$$

$$2 \times 10^{-10} \quad \text{UFC} \rightarrow 1 \text{ ml}$$

Si el resultado es menor a 100 μl , llevarlo a 100 μl .

Protocolo de extracción para bacterias Gram negativas:

El máximo de colonias que soporta la columna es de 2×10^9 UFC

1. La cantidad de muestra que se requiere, se centrifuga a 7500 rpm por 10 minutos y se descarta el sobrenadante.
2. Resuspender las colonias obtenidas en 180 μl de amortiguador ALT

3. Adicionar 20 μ l de proteinasa K. Mezclar en un agitador e incubar a 56°C por 1 hora. Mezclar ocasionalmente durante la incubación. Luego adicionar 4 μ l de RNasa A (100mg/ml), mezclar en el agitador e incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Agitar por 15 segundos, luego adicionar 200 μ l de etanol (96-100%), y mezclar en el agitador. Es muy importante agitar de inmediato. En este paso se puede formar un precipitado blanco lo cual es normal.
5. Pipetear todo el contenido, incluido cualquier precipitado en una columna “DNeasy Mini spin” y colocar un tubo recolector. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto en una centrífuga de mesa. Descartar el líquido del tubo recolector al igual que el tubo recolector.
6. Luego poner la columna en un nuevo tubo recolector y adicionar 500 μ l de amortiguador AW2, centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm para secar la membrana de la columna. Es importante que la membrana quede seca y no entre en contacto nuevamente con el etanol porque esto puede interferir en las reacciones siguientes.
7. La columna se coloca en un tubo recolector de 1.5 o 2 ml y se pipetea 200 μ l de buffer AE directamente en la membrana. Se incuba a temperatura ambiente por 1 minuto y luego se centrifuga por 1 minuto a 6000 rpm para eluir.

Anexo 2: Protocolo de extracción en gel

Este protocolo se basa en el descrito para el kit QIAquick de extracción de ADN a partir de gel de agarosa, Qiagen, 2008.

En un gel de agarosa al 2% (Sambrook& Rusell 2001), se corren 25 μ l de la muestra por 1 hora, luego se inicia con el protocolo.

1. Con un escalpelo, bajo la luz UV, se corta el fragmento de ADN, previa corroboración del peso esperado. Evitar la exposición a la luz UV utilizando anteojos. Evitar la exposición del fragmento de ADN a la luz UV por no más de 1 minuto.
2. El fragmento se pesa y se le adicionan 3 volúmenes de amortiguador QG por cada volumen de gel.
3. Se incuba a 50°C por 10 minutos en baño maría, hasta que se haya disuelto completamente el fragmento. Para ayudar a disolverlo es recomendable agitarlo cada 2-3 minutos.
4. Cuando se haya disuelto completamente, hay que revisar que el color sea amarillo similar al color del amortiguador QG. Si el color es violeta o anaranjado, adicionar 10 μ l de acetato de sodio 3M.
5. Colocar una columna "QIAquick spin" en tubo recolector de 2ml.
6. Colocar toda la muestra (máximo 800 μ l) en la columna y centrifugar por 1 min a 8000rpm
7. Descartar el sobrenadante y poner la columna en el mismo tubo recolector.

8. Adicionar 0.5ml de amortiguador QG a la columna y centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm, este paso es importante para eliminar las trazas de agarosa especialmente cuando se va a utilizar para secuenciación.
9. Para lavar se le adicionan 0.75 ml de amortiguador PE a la columna y se centrifuga por 1 minuto.
10. Descartar el sobrenadante y centrifugar la columna por 1 minuto 13000 rpm, esto para eliminar los restos de etanol.
11. Colocar la columna en un tubo limpio de 1.5ml
12. Para eludir el ADN adicionar 50 μ l de amortiguador EB o agua al centro de la columna y centrifugar 1 minuto a 8000 rpm.
13. Analizar el resultado de lo obtenido en un gel de agarosa con 1 volumen de amortiguador de carga por cada 5 volúmenes de muestra de ADN purificado.

Anexo 3: Protocolo de purificación de productos de PCR

Este protocolo se basa en el descrito para el kit QIAquick purificación de productos de PCR a partir de QIAquick de extracción de ADN, Qiagen, 2008

1. Adicionar 5 volúmenes del amortiguador PBI a 1 volumen de una muestra amplificada por PCR.
2. Revisar que el color sea amarillo, similar al amortiguador PBI. Si el color es violeta o anaranjado, agregarle 10µl de acetato de sodio 3M, pH 5 y mezclar.
3. Colocar una columna “QIAquick spin” en un tubo recolector de 2 ml.
4. Colocar la muestra en la columna y centrifugar de 30 a 60 segundos a 8000 rpm.
5. Descartar el sobrenadante y colocar el mismo tubo colector.
6. Lavar con 0.75 ml de amortiguador PE y centrifugar 30 a 60 segundos a 8000 rpm.
7. Descartar el sobrenadante, colocar la columna en el mismo tubo recolector. Centrifugar por 1 minuto para eliminar residuos de etanol.
8. Colocar la columna en tubo nuevo de 1.5.
9. Para eluir el ADN, adicionar 50 µl de amortiguador EB o agua al centro de la columna y centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm.