

Universidad Nacional
Facultad Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria

**Caracterización fenotípica de aislamientos de *Brucella* sp.
obtenidos a partir de murciélagos (*Desmodus rotundus*) en
Piedras Blancas, Puntarenas, Costa Rica**

Modalidad: Proyecto de graduación

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

Daniela Hidalgo Montealegre

Campus Pbro. Benjamín Núñez

2024

TRIBUNAL EVALUADOR

Laura Bouza Mora, M.Sc.

Vicedecana, Facultad de Ciencias de la Salud

Julia Rodríguez Barahona, PhD.

Subdirectora, Escuela de Medicina Veterinaria

Elías Barquero Calvo, PhD.

Tutor

Gabriela Hernández Mora, PhD.

Lectora

Edgardo Moreno Robles, PhD.

Lector

Fecha: _____

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO

A mi mamá Aurora, por siempre creer en mí y nunca dudar de mis capacidades. Aunque no esté físicamente, su amor y apoyo continúan iluminando mi camino y su legado perdurará en cada logro de mi vida. A mi papá Edgar, por sus infinitos consejos, por siempre estar para mí y apoyarme incondicionalmente. Este es uno de los frutos del esfuerzo de ambos.

A mis hermanas, Mari y Juli, por ser mis compañeras de vida y apoyarme en todo momento. A Esteban, por estar conmigo durante todo este proceso, y ayudarme a salir adelante, especialmente en los momentos más difíciles.

También quiero agradecer a la escuela, a todas las personas que fueron parte de mi proceso de formación universitaria. Especialmente al Dr. Elías Barquero, por introducirme al mundo de la bacteriología veterinaria y de la investigación, su pasión, ejemplo y dedicación siempre van a ser una inspiración en mi vida profesional, y siempre le estaré profundamente agradecida. A todos los que forman parte del laboratorio, Xindy, Dyl, Dione, Lau, Nikky, Vero y Darío, por siempre estar dispuestos a ayudarme y hacer de mis días de laboratorios tan agradables.

Al Dr. Edgardo Moreno y la Dra. Gabriela Hernández, por permitirme ser parte de este proyecto, por todos sus aportes y recomendaciones en la realización de este trabajo.

A la Dra. Dubraska Díaz, por recibirme en su laboratorio, por siempre estar dispuesta a compartir conmigo sus conocimientos y experiencia, sus consejos y orientación han sido y seguirán siendo invaluableles tanto para mi desarrollo académico como personal.

A mis compañeros de internado, Majo, Ari, Ale, Naty y Ricardo, por tantas risas y lindos momentos que siempre voy a recordar con mucho cariño, sin duda no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| TRIBUNAL EVALUADOR..... | i |
| DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO | ii |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS..... | iv |
| ÍNDICE DE CUADROS | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | ix |
| RESUMEN..... | xi |
| ABSTRACT..... | xiii |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Antecedentes..... | 1 |
| 1.1.1. Características y patogénesis de <i>Brucella</i> | 1 |
| 1.1.2. Especies del género <i>Brucella</i> reportadas | 3 |
| 1.1.3. Determinantes antigénicos de la membrana | 5 |
| 1.1.4. Propagación de brucelosis en la fauna silvestre y animales domésticos | 6 |
| 1.1.5. Características de los murciélagos <i>Desmodus rotundus</i> | 6 |
| 1.1.6. Hallazgos de <i>Brucella</i> en el orden de murciélagos (Chiroptera) | 8 |
| 1.1.7. Situación en Costa Rica | 9 |
| 1.2. Justificación | 12 |
| 1.3. Objetivos..... | 13 |

| | | |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.3.1. | Objetivo general | 13 |
| 1.3.2. | Objetivos específicos | 14 |
| 2. | METODOLOGÍA | 15 |
| 2.1. | Aislamientos para estudio..... | 15 |
| 2.2. | Caracterización fenotípica de los aislamientos de <i>Brucella</i> sp. | 16 |
| 2.2.1. | Tinción de Gram..... | 17 |
| 2.2.2. | Determinación de actividad oxidasa | 17 |
| 2.2.3. | Utilización de citrato | 18 |
| 2.2.4. | Reducción de nitratos..... | 18 |
| 2.2.5. | Requerimiento de CO ₂ | 18 |
| 2.2.6. | Producción de H ₂ S..... | 19 |
| 2.2.7. | Actividad ureasa | 19 |
| 2.2.8. | Absorción de cristal violeta | 20 |
| 2.2.9. | Crecimiento en presencia de tionina o fucsina básica..... | 21 |
| 2.2.10. | Aglutinación con naranja de acridina..... | 22 |
| 2.2.11. | Caracterización del perfil bioquímico mediante el uso del sistema VITEK® 2..... | 22 |
| 2.3. | Curvas de crecimiento de aislamientos <i>in vitro</i> | 23 |
| 2.4. | Caracterización fenotípica de la membrana de <i>Brucella</i> sp. como elemento de virulencia | 24 |
| 2.4.1. | Ensayo lítico para el estudio de la acción bactericida del suero..... | 24 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por microdilución en placa para la Polimixina B..... | 26 |
| 3. Resultados y Discusión..... | 28 |
| 3.1. Caracterización bioquímica de los aislamientos..... | 28 |
| 3.2. Perfil de las curvas de crecimiento bacteriano | 34 |
| 3.3. Resistencia de la membrana de los aislamientos | 36 |
| 4. CONCLUSIONES..... | 43 |
| 5. RECOMENDACIONES | 44 |
| 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 46 |
| 7. ANEXOS | 58 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Resultados de los aislamientos y serología (BRT/cELISA) de <i>Brucella</i> sp. en murciélagos. | 11 |
| Cuadro 2. Aislamientos seleccionados para la caracterización fenotípica..... | 16 |
| Cuadro 3. Categoría de reacción según las observaciones experimentales en la prueba de actividad ureasa..... | 20 |
| Cuadro 4. Caracterización bioquímica de los aislamientos de <i>Brucella</i> sp. obtenidos de los murciélagos <i>Desmodus rotundus</i> , incluyendo las cepas de referencia..... | 31 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Mapa de la región oriental del Parque Nacional Piedras Blancas, reservas naturales y los alrededores rurales y suburbanos. | 9 |
| Figura 2. Resultados del perfil bioquímico mediante el uso del sistema VITEK® 2..... | 33 |
| Figura 3. Gráfico de las curvas de crecimiento de <i>B. nosferati</i> (bbatCR03 y bbatCR06) y las cepas de referencia, <i>B. abortus</i> 2308W y <i>Brucella nosferati</i> BCCN 84.3 durante las 48 h de incubación en caldo. | 35 |
| Figura 4. Porcentaje de sobrevivencia ante la acción bactericida del suero de <i>B. nosferati</i> (bbatCR03 y bbatCR06) y las cepas de referencia <i>B. canis</i> bcanCR12, <i>B. nosferati</i> BCCN 84.3 y <i>B. abortus</i> 2.13..... | 37 |
| Figura 5. Concentración mínima inhibitoria de polimixina B para inhibir el crecimiento bacteriano en los aislamientos de <i>B. nosferati</i> (bbatCR03 y bbatCR06) y las cepas de referencia <i>B. canis</i> bcanCR12, <i>B. nosferati</i> BCCN 84.3 y <i>B. abortus</i> 2.13..... | 39 |

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

16S rRNA: del inglés: Del inglés: 16S ribosomal ribonucleic acid

Abs: Absorbancia

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATS: Agar Tripticasa de Soya

BRT: Del inglés: Bengal rose test

BvrR: *Brucella* virulence related Receptor

BvrS: *Brucella* virulence related Sensor

CCSS: Caja Costarricense de Seguro Social

cELISA: Competitive Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CONAGEBIO: Comisión Nacional para Gestión de la Biodiversidad

CR: Costa Rica

CR-NAHS: Programa Nacional de Vigilancia de Vida Silvestre y Control de Rabia del Servicio Nacional de Salud Animal de Costa Rica

Ctrl -: Control negativo

Ctrl +: Control positivo

CTS: Caldo Tripticasa de Soya

g: Gramos

GN: Gram negativo

h: Horas

Km: Kilómetros

LPS: Lipopolisacárido

m/v: Masa en volumen

MALDI-TOF: Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrophotometry

min: Minuto

mL: Mililitro

MLVA-16: Multiple Locus-number Tandem Repeat Analysis-16

mg: Miligramo

mm: Milímetro

Nº: Número

nm: Nanómetros

PCR: Polymerase Chain Reaction

rpm: Revoluciones por minuto

rRNA: Ribosomal Ribonucleic Acid

SENASA: Servicio Nacional de Salud Animal

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UNA: Universidad Nacional

WOAH: World Organization for Animal Health

Zn: Zinc

α : Alpha

μ g: Microgramos

μ L: Microlitros

° C: Grados centígrados

RESUMEN

Brucella es un género de bacterias responsable de causar brucelosis, una enfermedad zoonótica distribuida en el mundo. Las brucelas causan problemas reproductivos en animales domésticos y silvestres e infecciones debilitantes en los seres humanos. En el año 2023 se describió una nueva especie llamada *Brucella nosferati*, cuyo nombre es reminiscente de la leyenda del vampiro Nosferatu de Transilvania, aislada de murciélagos vampiro de la especie *Desmodus rotundus* (Hernández-Mora et al. 2023). Estos murciélagos mostraron lesiones en la placenta, colonización bacteriana de las glándulas salivales y mamaria, orquiepididimitis, otros órganos, muerte fetal y momificaciones (Hernández-Mora et al. 2023). Ante este hallazgo se planteó la necesidad de realizar una caracterización bacteriológica y fenotípica de los aislamientos de *B. nosferati*. Para ello, se emplearon pruebas bioquímicas y bacteriológicas validadas para el género *Brucella*, y métodos de identificación automatizados como el VITEK® 2. Todos los aislamientos evaluados fueron positivos a la prueba de oxidasa, no utilizaron citrato ni requirieron de CO₂ para su crecimiento. Además, presentaron variabilidad en la capacidad de reducir nitratos, presentaron una actividad de ureasa muy rápida, fueron capaces de producir H₂S, crecieron en presencia de tionina y fucsina, y se clasificaron como bacterias lisas. Con respecto a los análisis del VITEK® 2, todos los aislamientos resultaron bioquímicamente idénticos entre sí. Al comparar los resultados bioquímicos con las cepas de referencia *B. abortus* 2308W, *Brucella nosferati* BCCN 84.3 y *B. canis* BcanCR12, los porcentajes de similitud fueron de 82.97%, 91.49% y 93.62% respectivamente. Adicionalmente, se evaluaron las curvas crecimiento bacteriano en medios de cultivo líquido. Tanto *Brucella nosferati* BCCN 84.3 como *B. nosferati*

alcanzaron la fase estacionaria después de 48 horas y presentaron una fase exponencial más prolongada, alcanzando mayor densidad bacteriana en comparación con *B. abortus*. Se determinó que tanto *Brucella nosferati* BCCN 84.3 como *Brucella nosferati* presentaron un alto nivel de resistencia a polimixina B y a la acción bactericida del suero. Esta caracterización sienta las bases para estudios comparativos sobre la genética y virulencia de esta nueva especie de *Brucella*.

Palabras claves: *Brucella*, *Desmodus rotundus*, caracterización fenotípica, resistencia, curva de crecimiento.

ABSTRACT

Brucella is a genus of bacteria responsible for causing brucellosis, a worldwide zoonotic disease. This illness leads to reproductive issues in domesticated animals and wildlife, and imposes a debilitating infection on humans. In 2023, a new species named *Brucella nosferati* was described, with a name reminiscent of the Transylvanian vampire legend Nosferatu, isolated from vampire bats of the species *Desmodus rotundus* (Hernández-Mora et al. 2023). These bats exhibited placental lesions, bacterial colonization of salivary and mammary glands, orchiepididymitis, other organs, mummifications and fetal death (Hernández-Mora et al. 2023). This finding prompted the need for a bacteriological and phenotypic characterization of *B. nosferati* isolates. To achieve this, validated biochemical and bacteriological tests for the *Brucella* genus were employed, along with automated identification methods such as VITEK® 2. All evaluated isolates tested positive for the oxidase test, did not utilize citrate, and did not require CO₂ for growth. Moreover, they showed variability in nitrate reduction capability, exhibited very rapid urease activity, produced H₂S, grew in the presence of thionine and fuchsin, and were classified as smooth bacteria. In terms of VITEK® 2 analysis, all isolates were found to be biochemically identical to each other. When comparing the biochemical results with reference strains *B. abortus* 2308W, *Brucella nosferati* BCCN 84.3, and *B. canis* BcanCR12, the similarity percentages were 82.97%, 91.49%, and 93.62%, respectively. Additionally, bacterial growth curves in broth culture media were evaluated. Both *Brucella nosferati* BCCN 84.3 and *B. nosferati* reached the stationary phase after 48 hours and exhibited a more extended exponential phase, attaining a higher bacterial density compared to *B. abortus*. It was determined that both *Brucella nosferati* BCCN 84.3 and

Brucella nosferati displayed a high level of resistance to polymyxin B and resistance to the bactericidal action of serum. This characterization lays the groundwork for comparative studies on the genetics and virulence of this new *Brucella* species.

Keywords: *Brucella*, *Desmodus rotundus*, phenotypic characterization, resistance, growth curve.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. Características y patogénesis de *Brucella*

Las bacterias del género *Brucella* son cocobacilos Gram negativos del orden Rhizobiales y pertenecientes a la clase de Alphaproteobacteria (Leclercq et al. 2020; Moreno 2021). Estos microorganismos se caracterizan por ser parásitos intracelulares extracelulares facultativos (González-Espinoza et al. 2021; Moreno et al. 2002). Además, tienen un metabolismo oxidativo, no utilizan el citrato, son catalasa y ureasa positivas (a excepción de *B. ovis*, *B. neotomae* y ocasionalmente algunas cepas de *B. abortus*) y reducen los nitratos (a excepción de *B. ovis*) (Alton et al. 1988). Los miembros del género *Brucella* son los agentes causantes de la brucelosis, una de las enfermedades zoonóticas más extendidas en el mundo, que provoca abortos en animales domésticos y una infección debilitante en los seres humanos (Moreno 2014; Moreno & Moriyón 2006). Entre los animales, *Brucella* se transmite horizontalmente mediante contacto directo de los hospedadores por medio de secreciones del tracto reproductivo, sexo y el lamido de fetos abortados (Moreno 2014; Moreno & Moriyón 2006). También se transmite verticalmente de la madre al feto, lo que generalmente causa aborto en el último trimestre de la preñez (Moreno & Moriyón 2006). Los humanos son hospedadores accidentales que generalmente adquieren la bacteria por consumo de productos o subproductos lácteos de animales infectados sin pasteurizar (Robertson 1961). Esta enfermedad, conocida tradicionalmente como brucelosis, se puede encontrar en todos los continentes, especialmente en países de bajos ingresos (Moriyón et al. 2023).

Las infecciones por *Brucella* ocurren cuando estas bacterias atraviesan las barreras mucosas del hospedero y colonizan sus órganos internos (Fiebig et al. 2021; González-Espinoza et al. 2021). Al igual que otros patógenos intracelulares, *Brucella* altera la respuesta de la inmunidad innata, con el fin de replicarse y lograr una persistencia a largo plazo (Barquero-Calvo et al. 2007). Los neutrófilos representan la primera línea de defensa contra la presencia de *Brucella* y aunque tienen alguna capacidad de eliminarlas, estas bacterias resisten a su actividad microbicida (Moreno & Barquero-Calvo 2020). Los macrófagos son la segunda línea de defensa y uno de los tipos celulares en donde ocurre la replicación de las brucelas (Roop et al. 2021). Adicionalmente, se ha descrito que tiene la capacidad de replicarse en una amplia variedad de células, como los trofoblastos, fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales (González-Espinoza et al. 2021) y los elementos de virulencia de *Brucella* son aquellos determinantes moleculares que le permiten invadir, resistir la destrucción intracelular y llegar a su nicho de replicación en fagocitos profesionales y no profesionales (Roop et al. 2021).

En los ratones, la infección experimental por las brucelas se suele dividir tres fases: (i) la fase de incubación (antes de que haya síntomas evidentes), (ii) la fase aguda (durante la cual la bacteria invade y se disemina en el tejido del hospedador) y (iii) la fase crónica (que eventualmente puede provocar un daño severo en los órganos e inclusive la muerte en el individuo) (Grilló et al. 2012). En humanos, el curso de la brucelosis es difícil de describir, ya que el periodo de incubación generalmente es muy largo (de semanas a meses), y si no se trata, el curso de la enfermedad es prolongado, por lo que

en general se considera siempre una enfermedad de carácter crónico (Moreno et al. 2022).

1.1.2. Especies del género *Brucella* reportadas

Las primeras especies de *Brucella* descritas fueron detectadas en animales productivos; *B. melitensis* en ovejas y cabras, *B. abortus* en el ganado y *B. suis* en cerdos. En estos animales *Brucella* puede ocasionar enfermedades reproductivas, especialmente abortos y epididimitis (Moreno 2021). Mas adelante en los años 1950s, se descubrió *B. ovis* (Moreno 2021). Posteriormente en 1966, hubo un incremento en la incidencia de abortos, epididimitis, y fallos reproductivos en un criadero canino comercial en Estados Unidos (Carmichael & Bruner 1968). De la placenta y de los tejidos de los fetos abortados se aisló *B. canis*, aunque previamente se pensaba que era un biotipo de *B. suis* por sus propiedades bioquímicas (Carmichael & Bruner 1968). En 1994, se aisló una bacteria Gram negativa con características metabólicas, bioquímicas y bacteriológicas de un feto abortado de un delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), que coincidían con el género *Brucella* (Ewalt et al. 1994). En el año 2007 se realizaron estudios que condujeron a la descripción de dos especies nuevas en mamíferos marinos; *B. ceti* (predominantemente marsopas y delfines) y *B. pinnipedialis* (principalmente focas) (Foster et al. 2007).

En el 2008 se aisló una bacteria de una infección en un implante mamario de una mujer de 71 años con sintomatología compatible con brucelosis, nombrada como *Brucella innopinata* sp. nov. (De et al. 2008; Scholz et al. 2010). También en el 2008 se describieron y clasificaron como una nueva especie del género *Brucella* dos aislamientos

obtenidos a partir de ratones de campo silvestres (*Microtus arvalis*) en República Checa bajo el nombre *Brucella microti* (Hubálek et al. 2007).

Posteriormente, otros aislamientos obtenidos a partir de animales silvestres han sido clasificando dentro del género *Brucella*. En el 2014, se describió la clasificación de *Brucella papionis* sp. nov. provenientes de unos aislamientos que se habían obtenido de unos babuinos con casos de mortinatos y placenta retenida en Texas, EE. UU. (Schlabritz-Loutsevitch et al. 2009; Whatmore et al. 2014). Recientemente, en el 2016, se caracterizaron dos aislamientos obtenidos a partir de los linfonodos mandibulares de dos zorros rojos cazados en un distrito de Baja Austria (Scholz et al. 2016). Otros animales de vida libre en donde se ha aislado bacterias pertenecientes al género *Brucella* son: de tres roedores nativos en Australia (Tiller et al. 2010), peces (Eisenberg et al. 2017) y reptiles (Eisenberg et al. 2020). Por último, en el 2023, se describió una especie nueva llamada *Brucella amazoniensis* en la Guayana Francesa, infectando humanos (About et al. 2023) y *B. nosferati* en murciélagos vampiros en Costa Rica (Hernández-Mora et al. 2023).

Actualmente, el género *Brucella* está compuesto por 24 especies con genomas cerrados con un pangenoma relativamente reducido (Moreno et al. 2022). Las brucelas suelen clasificarse en clásicas o atípicas (Moreno 2021). Mientras las clásicas forman un cluster filogenético compacto que infecta mamíferos, las atípicas son más diversas, y filogenéticamente más cercanas a los miembros del género *Ochrobactrum* (Scholz et al. 2016) que infectan varios tipos de vertebrados, incluyendo reptiles y peces (Moreno 2021; Scholz et al. 2016).

1.1.3. Determinantes antigénicos de la membrana

La membrana externa de *Brucella* contiene un lipopolisacárido (LPS) que es considerado uno de sus principales factores de virulencia (Lapaque et al. 2006). Existen dos formas antigénicas de LPS, A y M. El antígeno A es más predominante en *B. abortus* y *B. suis*, mientras que el antígeno M predomina en *B. melitensis* (Martínez-Gómez et al. 2018).

Según la superficie celular y la estructura del LPS, *Brucella* se puede presentar como una especie lisa o una rugosa (Mancilla 2016). Las especies lisas se caracterizan por expresar una molécula de LPS completa que se compone de un lípido A, el núcleo de polisacárido y la cadena lateral O (Freer et al. 1995). Entre las especies lisas se encuentran *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* y *B. microti* (Mancilla 2016). Por el contrario, *B. ovis* y *B. canis* son especies rugosas, estas expresan LPS rugosos que carecen de antígeno-O, característica asociada a una virulencia reducida (Mancilla 2016).

En 1984 en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, Costa Rica, se aisló una *Brucella* lisa de un perro de raza San Bernardo con una orquiepididimitis (Guzmán-Verri et al. 2019; Sequeira et al. 1984; Verger et al. 1985). Inicialmente fue catalogada como una cepa atípica de *B. melitensis* biovar 2, pero en el 2019 se describieron sus propiedades fenotípicas y genotípicas y se catalogó como una nueva *Brucella* sp. lisa (Guzmán-Verri et al. 2019; Sequeira et al. 1984; Verger et al. 1985). Aunque no se conoce el origen de esta bacteria, se especula que podría venir de una fuente silvestre.

1.1.4. Propagación de brucelosis en la fauna silvestre y animales domésticos

Recientemente se caracterizaron dos aislamientos bacterianos del género *Brucella* con potencial de ser una nueva especie (Pastre et al. 2023). Estos aislamientos provenían de dos trabajadores de la Guyana Francesa, ambos eran ciudadanos de Brasil, que trabajaban como mineros clandestinos de oro en la selva amazónica (Pastre et al. 2023). Aunque en este caso tampoco se conoce el origen de la bacteria, también se especula que podría venir de una fuente silvestre.

No existen estimaciones precisas sobre la prevalencia de brucelosis en la fauna silvestre ni en animales domésticos. Sin embargo, algunos estudios aislados indican que es alta, en particular en animales domésticos (Moriyón et al. 2023). Aunque la brucelosis en el ganado ha sido erradicada satisfactoriamente en algunos pocos países desarrollados, el control de la misma en vida libre continúa siendo un desafío alrededor del mundo. Al igual que otros países de Iberoamérica, en Costa Rica la brucelosis bovina es un problema significativo de salud animal y una zoonosis (Hernández-Mora et al. 2017).

1.1.5. Características de los murciélagos *Desmodus rotundus*

El orden Chiroptera, comúnmente conocido como murciélagos, es uno de los grupos de mamíferos más abundante y el único con capacidad de volar. Los murciélagos además de tener una expectativa de vida larga (pueden llegar a vivir un poco más de 30 años), migran y ocupan una variedad grande de nichos ecológicos. Aunque hay algunos pocos murciélagos con características solitarias, la mayoría de ellos son sociables y

viven en grupos de apenas unos pocos hasta miles de individuos (Aguilar-Setién & Aréchiga-Ceballos 2011; Bai et al. 2017).

Los murciélagos hematófagos conforman la familia Phyllostomidae, subfamilia Desmodontinae e incluye tres especies, siendo la más abundante *D. rotundus* (Scheffer et al. 2022). Esta especie posee una amplia distribución geográfica, desde el sur de Estados Unidos hasta el centro de Chile, generalmente a una altura inferior a los 1500 metros del nivel del mar, aunque en ocasiones puede llegar hasta los 2000 metros (Arellano-Sota 1988; Scheffer et al. 2022). Una de las características distintivas de *D. rotundus* es la variedad de animales de los que se alimenta, que va desde animales domésticos como bovinos, caballos, cabras, porcinos, aves, perros, hasta seres humanos y en ocasiones reptiles y anfibios (Paradiso et al. 1961; Scheffer et al. 2022). No obstante, en las regiones tropicales su principal fuente de alimentación es ganado bovino. Por esta razón, con el aumento de la ganadería la población de murciélagos *Desmodus rotundus* también ha aumentado considerablemente (Scheffer et al. 2022).

Con el fin de localizar y seleccionar a su presa, normalmente recorren distancias de cinco a ocho Km alrededor de sus refugios diurnos, sin embargo, pueden llegar a alcanzar hasta los 16 Km (Malaga 1954). En esta especie, el contacto social es necesario, especialmente entre las hembras. Los murciélagos vampiros comparten su alimento con las crías y otros miembros del grupo mediante la regurgitación de sangre (Scheffer et al. 2022; Wilkinson 1990). Los machos generalmente migran a otras colonias entre los 12-18 meses ubicándose siempre cerca del lugar en donde nacieron (Wilkinson 1988). En cuanto al comportamiento reproductivo, no tienen un periodo establecido de reproducción (Alencar 1994). Las hembras de la especie *Desmodus rotundus* tienen una

gestación de aproximadamente 205 días, con intervalos de nacimientos de 350 días y usualmente tienen una cría por parto (Lord 1992; Paradiso et al. 1961; Scheffer et al. 2022; Schmidt 1973).

1.1.6. Hallazgos de *Brucella* en el orden de murciélagos (Chiroptera)

En la región centro oriental de Brasil en 1976, se capturaron 55 murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) y dos omnívoros (*Diphylla* y *Phyllostomus hastatus*). Cinco de los 55 sueros de *Desmodus rotundus* dieron una aglutinación positiva por el método de aglutinación lenta en tubo para *Brucella* en una dilución de 1:80 o más (Ricciardi et al. 1976). En Georgia (país euroasiático), en el 2017, se capturaron 218 murciélagos de ocho especies diferentes en busca de la presencia de *Brucella*, *Bartonella*, *Leptospira* y *Yersinia*. Utilizando técnicas moleculares, en este estudio se detectó la presencia de ADN de *Brucella* en cuatro murciélagos (dos en *Miniopterus schreibersii* y dos en *Myotis blythii*) para la secuencia de inserción IS711 (Bai et al. 2017).

En Brasil, recientemente se publicó el hallazgo de seis murciélagos con orquiepididimitis, dos de ellos fueron diagnosticados con *Brucella* sp. mediante PCR (del inglés: Polymerase Chain Reaction) e inmunohistoquímica (Silva et al. 2023). Los murciélagos eran frugívoros y nectarívoros, (pertenecientes a las especies *Artibeus lituratus* y *Glossophaga soricina*) (Silva et al. 2023).

1.1.7. Situación en Costa Rica

En marzo 2020 se remitieron al SENASA 71 murciélagos (43 hembras y 28 machos) de una cueva de una reserva privada cerca del Parque Nacional Piedras Blancas, en Puntarenas de Costa Rica (Hernández-Mora et al. 2023). La cueva de donde estaban estos murciélagos es una zona de bosque lluvioso tropical premontano (Hernández-Mora et al. 2023). En un radio de aproximadamente 4 Km, se encuentran actividades ganaderas que incluyen ganado bovino, caballos, ovejas y avicultura de carácter comercial (Hernández-Mora et al. 2023). Además, en los alrededores hay presencia de pollos, patos, perros y gatos (Hernández-Mora et al. 2023). En el territorio del parque hay cerca de 100 especies de animales de vida libre y más de 400 especies de aves (Figura 1) (Hernández-Mora et al. 2023).

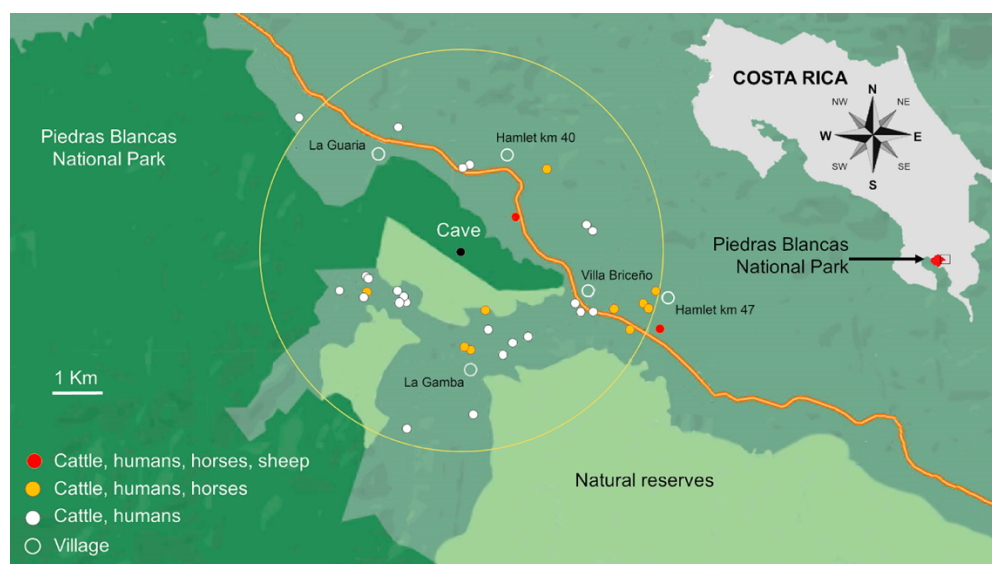


Figura 1.

Mapa de la región oriental del Parque Nacional Piedras Blancas, reservas naturales y los alrededores rurales y suburbanos (Hernández-Mora et al. 2023).

En la parte superior derecha del esquema se encuentra el mapa de Costa Rica, que indica la ubicación del Parque en rojo; el cuadro negro inserto representa la zona de estudio ampliada a la izquierda del mapa. El parque (en verde esmeralda profundo a la izquierda del mapa) y el límite de las reservas naturales (en verde limón). La región más oriental del parque está rodeada de extensas plantaciones de palma aceitera, fincas, algunos pueblos pequeños y bosques secundarios (en color pistacho, principalmente en el centro y la zona derecha del mapa). El resto del parque (138 km²) se extiende hacia el oeste (parcialmente mostrado). La ubicación de la cueva con la colonia de *D. rotundus* estudiada se encuentra cerca del parque y está indicada por un círculo negro completo en el centro de un círculo más grande que representa un radio de 4 km. Los círculos abiertos indican los pueblos, mientras que los círculos blancos, amarillos y rojos muestran las ubicaciones de las fincas ganaderas dentro del rango de forrajeo de los murciélagos vampiro, que es de aproximadamente 4 km de la cueva. La vida silvestre habita principalmente en el parque y las reservas naturales, con intrusiones esporádicas en áreas semi-rurales. Los animales domésticos rara vez ingresan al parque o las reservas naturales. Una línea amarilla gruesa indica la Carretera Interamericana. Las coordenadas de la cueva son 8°43'40.1"N y 83°11'15.2"O. Reproducido de Hernández-Mora et al. (2023). Reproducido con permiso del autor.

Dado que los murciélagos se alimentan principalmente de ganado bovino y la brucelosis bovina es altamente prevalente en el país, se presupuso que los murciélagos podrían estar infectados con *B. abortus* (Hernández-Mora et al. 2023). El 33.80% (24/71) de los animales fueron positivos a la prueba de Rosa de Bengala y cELISA (Cuadro 1) (Hernández-Mora et al., 2023).

Cuadro 1.

Resultados de los aislamientos y serología (BRT/cELISA) de Brucella sp. en murciélagos.

Modificado de Hernández-Mora et al. (2023). Modificado con permiso del autor.

| | Número de individuos | Serología | Cultivo | Prevalencia (%) |
|-------------------------------|-----------------------------|--------------------|----------------|------------------------|
| | 6 | Positivos | Positivos | 8.46 |
| | 17 | Positivos | Negativos | 5.60 |
| | 4 | Negativos | Positivos | 23.95 |
| | 7 | Suero insuficiente | Positivos | 9.89 |
| | 22 | Suero insuficiente | Negativos | |
| | 15 | Negativos | Negativos | |
| N° total de individuos | 71 | | | |
| Prevalencia acumulada | | | | 47.9 |

También se realizó un cultivo de *Brucella* spp. de diferentes órganos y tejidos en los medios selectivos de CITA y FARREL (Cuadro 1) (Hernández-Mora et al. 2023), en donde se aislaron brucelas de seis machos y 11 hembras, de *D. rotundus*, uno de ellos neonato y un macho juvenil (Hernández-Mora et al. 2023).

Dentro de los órganos se incluyó: placenta, líquidos fetales, glándulas mamarias, leche, útero y glándulas salivales (Hernández-Mora et al. 2023). Inicialmente se obtuvieron ocho aislamientos compatibles con *Brucella* spp. Un año después durante el 2021, se analizaron los murciélagos restantes mantenidos a -80° C en el SENASA y se

sumaron 34 nuevos aislamientos compatibles con *Brucella* spp. a partir de diferentes órganos como tracto respiratorio, sistema digestivo y sistema nervioso central entre otros (Hernández-Mora et al. 2023).

A estos aislamientos se les realizaron análisis genéticos y moleculares mediante las técnicas de MLVA-16 (Multiple Locus-number Tandem Repeat Analysis-16), Brucella-ladder y análisis de proteínas mediante MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrofotometry) (Hernández-Mora et al. 2023). Por medio de estos análisis se observó que, la cepa filogenéticamente más cercana a los aislamientos de los murciélagos, era la *Brucella* sp. BCCN84.3 aislada en 1984 en Costa Rica de un perro San Bernardo con orquiepididimitis y las cepas de *B. amazoniensis* aisladas de mineros de la selva amazónica (Hernández-Mora et al. 2023). Esta nueva especie aislada de murciélagos vampiros se nombró como *B. nosferati*.

1.2. Justificación

La literatura científica sugiere la presencia de bacterias del género *Brucella* spp en *D. rotundus*, sin embargo, al día hoy no se había logrado realizar aislamientos. De acuerdo con los reportes de Hernández-Mora y colaboradores (2023), además de la presencia de *B. nosferati* en los murciélagos *Desmodus rotundus*, también se confirmó con estudios histopatológicos, que esta bacteria causa placentitis (Hernández-Mora et al. 2023). Esto demuestra que *B. nosferati* es un microorganismo patógeno en estos animales. Este último aspecto es particularmente relevante porque los murciélagos se caracterizan por ser animales altamente resistentes a muchas enfermedades.

A los aislamientos de *B. nosferati* se les realizó la secuenciación completa de su genoma. Desde el punto de vista filogenético y bacteriológico la cepa de *Brucella* BCNN84.3, se estimó como de la misma especie, por lo que se le llamó *B. nosferati* BCNN84.3, considerándola la cepa tipo debido a que fue el primer aislamiento (Hernández-Mora et al. 2023). La similitud genética con la *Brucella* BCNN84.3, y *Brucella amazoniensis* ponen en discusión la capacidad infecciosa, zoonótica y patogénica que podrían tener estas bacterias aisladas a partir de murciélagos ante otros animales y los seres humanos.

Ante el descubrimiento de estos aislamientos de *Brucella* a partir de un nuevo reservorio y el desconocimiento de sus características básicas, surge la necesidad de realizar una caracterización bacteriológica completa. El propósito de este proyecto fue describir las principales características fenotípicas de *B. nosferati* obtenida de murciélagos utilizando pruebas validadas en la caracterización de las bacterias del género *Brucella*. Este trabajo buscó contribuir a sentar las bases del conocimiento necesarios para realizar estudios posteriores y que permitan entender el papel patogénico de estas bacterias en los murciélagos *Desmodus rotundus*, tan comunes en el territorio nacional, y su posible transmisión a otros animales (de compañía, productivas o silvestres) o inclusive los seres humanos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Caracterizar mediante pruebas fenotípicas, los aislamientos de *Brucella* sp. obtenidos a partir de los murciélagos (*Desmodus rotundus*).

1.3.2. Objetivos específicos

1.3.2.1. Describir las características bioquímicas de los aislamientos de *Brucella* sp. mediante la realización de pruebas fenotípicas típicamente utilizadas y validadas en la caracterización de las bacterias del género *Brucella*.

1.3.2.2. Establecer el perfil de las curvas de crecimiento bacteriano de los aislamientos de *Brucella* sp. mediante la realización de cultivos en caldo en condiciones *in vitro*.

1.3.2.3. Cuantificar el nivel de resistencia de la membrana de los aislamientos de *Brucella* sp. mediante la realización de pruebas de resistencia al suero y a la polimixina B.

2. METODOLOGÍA

2.1. Aislamientos para estudio

El muestreo en murciélagos realizado por el SENASA, se hizo como parte del Programa Nacional de Vigilancia de Vida Silvestre y Control de Rabia del Servicio Nacional de Salud Animal de Costa Rica (CR-NAHS) y de acuerdo con la Ley de Bienestar de los Animales correspondiente (Ley N° 7451 1994) y a la Convención Internacional para la Protección de los Animales refrendada por la Ley Veterinaria General de Costa Rica sobre la CR-NAHS (Ley N° 8495 2006). Todos los procedimientos que involucraron la manipulación de los aislamientos de *Brucella* viva en el SENASA se hicieron bajo el “Reglamento de Bioseguridad de la CCSS 39,975– 0, 2012”, luego del “Decreto Ejecutivo #30,965-S”, del año 2002. De acuerdo con la Ley de Biodiversidad #7788 de Costa Rica y el Convenio sobre la Diversidad Biológica, se accedió a los recursos genéticos bajo los términos de respeto a una distribución equitativa y justa de beneficios a quienes proporcionaron recursos bajo CONAGEBIO, Costa Rica, permiso #R-CM-UNA-003–2019-OT-CONAGEBIO (Anexo 1).

Todas las muestras de tejido analizadas se sometieron a procedimientos de aislamiento bacteriano mediante el uso de medios selectivos y no selectivos, incluidos el medio CITA y medio de Farrell, bajo atmósfera de CO₂ al 10%, a 37° C durante 15 días (De Miguel et al. 2011). Todas las colonias bacterianas similares a las del género *Brucella* se criopreservaron para los posteriores análisis de caracterización. De los aislamientos criopreservados por el SENASA para este estudio se incluirán 14 aislamientos obtenidos de 11 animales diferentes, los cuales se detallan en el Cuadro 2. Se adjunta carta de donación de los aislamientos por parte del SENASA (Anexo 2).

Cuadro 2.

Aislamientos seleccionados para la caracterización fenotípica.

| Identificación del animal: | Identificación de la cepa: | Muestra obtenida de: |
|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 195 | bbatCR01 | Feto |
| 189 | bbatCR02 | Glándula salival |
| 190 | bbatCR03 | Placenta |
| 176 | bbatCR04 | Placenta |
| 187 | bbatCR06 | Glándula mamaria y leche |
| 190 | bbatCR08 | Glándula salival |
| 161 | bbatCR09 | Cerebro |
| 194 | bbatCR13 | Cerebro |
| 190 | bbatCR21 | Intestinos |
| 183 | bbatCR23 | Cerebro |
| 186 | bbatCR24 | Cerebro |
| 191 | bbatCR27 | Cerebro |
| 191 | bbatCR29 | Contenido intestinal |
| 216 | bbatCR33 | Cerebro |

Adicional a las muestras obtenidas a partir de los murciélagos, se utilizaron para efectos comparativos y como control de las pruebas, las cepas de referencia *Brucella abortus* 2308W, *B. nosferati* BCNN 84.3, *B. canis* bcanCR12, y *Brucella abortus* 2.13, las cuales están crioconservadas en la bacterioteca del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

2.2. Caracterización fenotípica de los aislamientos de *Brucella* sp.

Todos los aislamientos fueron sometidos a las siguientes pruebas fenotípicas: tinción de Gram, actividad oxidasa, utilización de citrato, reducción de nitrato,

requerimiento de CO₂, producción de H₂S, actividad de ureasa, absorción de cristal violeta, crecimiento en presencia de tionina (20 µg/mL) y fucsina básica (20 µg/mL) mediante pruebas previamente descritas (Alton et al. 1988; Rodríguez-Cavallini et al. 2005). Para estos ensayos se utilizaron aislamientos de *B. abortus* 2308W, *B. canis* bcanCR12, *B. nosferati* BCCN 84.3 y los 14 aislamientos *Brucella nosferati*. A continuación, se describen cada uno de los procedimientos a realizar:

2.2.1. Tinción de Gram

Para realizar esta tinción, se utilizó la técnica modificada de Kopeloff y Baermann (Rodríguez-Cavallini et al., 2005) que incluye, cristal violeta y bicarbonato de sodio (un minuto), lugol (dos minutos), alcohol-acetona (tres a cinco segundos) y se aumentó el tiempo de contratinción con safranina a dos minutos.

2.2.2. Determinación de actividad oxidasa

Se utilizaron tiras reactivas para la determinación de actividad oxidasa (Oxoid) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se colocaron de tres a cinco colonias del cultivo a partir del agar tripticasa de soya (ATS) en las tiras reactivas. Un cambio de color de blanco a púrpura se ve reflejado en menos de 15 segundos en resultados positivos. De lo contrario, si no hay cambio o estos son posteriores a los 15 segundos, el resultado es negativo.

2.2.3. Utilización de citrato

Se inocularon de 3-5 colonias en el Agar Citrato de Simmons (Merck) siguiendo las instrucciones descritas previamente (Rodríguez-Cavallini et al. 2005). Posteriormente se incubó a 37° C durante 48-72 horas. Si el Agar Citrato de Simmons cambia a color azul, es indicativo de un resultado positivo. De lo contrario, si el agar permanece de color verde, el resultado es negativo.

2.2.4. Reducción de nitratos

Se utilizaron tubos con caldo Nitrato (Merck) siguiendo las instrucciones descritas previamente (Rodríguez-Cavallini et al. 2005). Se inoculó el microorganismo en el caldo nitrato, mediante la técnica de agitación. Se incubó a 37° C durante 72 horas. Seguidamente, se añadió 1 mL del reactivo α -Naftilamina al 0.50% (Merck). Y se añadió 1 mL de ácido sulfanílico (Merck) al 0.80%. Si se forma un color rojo, o rosado, antes de treinta segundos es que había nitritos (Nitrato positivo). En caso contrario, se le añaden 20 mg de polvo de Zn al medio. Si aparece color rosa es que había nitratos que no se habían reducido (Nitrato negativo), y si aparece el mismo color es que se habían reducido los nitratos, pero no a nitritos. Esta prueba se realizó por triplicado con cada una de las cepas a analizar.

2.2.5. Requerimiento de CO₂

Las bacterias se sembraron simultáneamente en dos placas de ATS (Liofilchem Diagnostic). Una de ellas se incubó en una atmósfera enriquecida de 5% CO₂ y la otra placa se colocó en una incubadora sin enriquecimiento de CO₂. Se incubaron a 37°C por

72 horas. Se considera que una bacteria es dependiente de CO_2 cuando solo se observa crecimiento en el plato incubado con en presencia de CO_2 .

2.2.6. Producción de H_2S

En tubos con ATS inclinado se inocularon de dos a tres colonias de la bacteria a analizar. Posteriormente, se colocaron tirillas de papel filtro impregnadas con 12% m/v de acetato de plomo. Estas se deben colocar suspendidas en la cara interna del tubo contraria al “slant” del medio. La tapa del tubo se colocó de tal manera que sujeta la tira de reacción para que esta no se mueva durante la incubación. Los tubos se incubaron a 37°C por 72 horas. Un resultado positivo se presenta cuando hay crecimiento de la bacteria en el medio acompañado de un oscurecimiento significativo de la tirilla de detección, mientras que el crecimiento de la bacteria en el medio sin oscurecimiento de la tira reactiva se interpreta como negativo.

2.2.7. Actividad ureasa

En tubos con Agar Urea inclinado (Acumedia) se inocularon de cinco a diez colonias de cada bacteria, en caso de que las colonias más pequeñas se tomó mayor cantidad de inóculo. Una vez inoculado en el medio de reacción se comenzó a tomar el tiempo. Los tubos se revisaron cada cinco minutos durante 40 minutos; después de este periodo se revisaron cada 15 minutos durante 2.5 horas. Si después de este tiempo no hay resultado positivo, se deben incubar los tubos a 37°C en capnofilia por 24h para confirmar el resultado negativo. La prueba se considera positiva en el momento en el que se comience a ver el cambio de color (rojo) en el indicador del medio. Los resultados de

esta prueba deben reportarse en categorías definidas por el tiempo en el que se observa la reacción, las categorías se definen de la siguiente manera (Cuadro 3).

Cuadro 3.

Categoría de reacción según las observaciones experimentales en la prueba de actividad ureasa.

| Observaciones experimentales | Categoría de reacción |
|-------------------------------------------------------|-----------------------|
| Prueba negativa luego de 24 h de incubación | No reactivo |
| Prueba positiva luego de 120 minutos de incubación | Reacción lenta |
| Prueba positiva entre 50-90 minutos de incubación | Reacción intermedia |
| Prueba positiva antes de los 20 minutos de incubación | Reacción rápida |

2.2.8. Absorción de cristal violeta

La solución madre se preparó disolviendo 2 g de cristal violeta (Fisher Scientific) en 20 mL de alcohol absoluto y 0.8 g de oxalato amónico (Merck) en 80 mL de agua destilada. Una vez disueltas por completo ambas soluciones, se mezclaron para formar la solución madre. La solución se conservó en un frasco herméticamente cerrado. Esta solución madre tiene una duración de aproximadamente tres meses. Inmediatamente antes de emplearla se diluyó a 1:40 en agua destilada. Las placas se cubrieron con 1

mL, usando una micropipeta 1000 μ L, con la dilución del colorante durante 15 a 20 segundos.

Posteriormente, se descartó el sobrenadante en un recipiente con una solución clorada. Seguidamente se examinaron inmediatamente con una lupa. Las colonias lisas no toman el colorante; las disociadas (rugosas) se tiñen en distintos tonos de rojo y violeta y en su superficie pueden presentarse grietas radiales. En ocasiones, de una colonia disociada se desliza una película superficial teñida que aparece al lado de la colonia no teñida. Cuando en la placa de petri hay un alto grado de humedad, las colonias pueden separarse del agar al cubrir este con el colorante.

2.2.9. Crecimiento en presencia de tionina o fucsina básica

Usando un turbidímetro (DensiChek plus), se preparó una suspensión bacteriana en solución salina (0.85%) estéril con una concentración correspondiente al estándar 1 de MacFarland para cada uno de los aislamientos a estudiar. Se inocularon por estría cada uno de los aislamientos en la superficie de las placas utilizando torundas de algodón estériles (tratando de marcar lo menos posible el agar).

Las placas inoculadas fueron incubadas a 37°C, y la lectura se llevó a cabo después de 72 horas de incubación. Para la evaluación, se observó el crecimiento de la bacteria contra una superficie clara (y preferiblemente con luz oblicua para eliminar la interferencia de la marca de inoculación dejada por la torunda). Un resultado positivo se presenta cuando hay un crecimiento homogéneo y significativo de la bacteria. Los resultados dudosos (débilmente positivos) o negativos se incuban por 24-36 h más para confirmar.

2.2.10. Aglutinación con naranja de acridina

Para llevar a cabo esta prueba se utilizaron cultivos bacterianos frescos (entre 48 y 72 horas de incubación) crecidos en ATS bajo las condiciones de crecimiento antes descritas. Se depositó una gota de agua en un portaobjetos. Utilizando un asa bacteriológica estéril, se resuspendió una colonia del cultivo del aislamiento (dos a tres en el caso de las colonias más pequeñas) y se mezcló bien. Una vez suspendida la bacteria se le agregó una gota de naranja de acridina 0.10% (m/v) y se volvió a mezclar. El portaobjetos se agitó suavemente en forma circular y se determinó inmediatamente la formación de grumos. Si se forman grumos la cepa en estudio se clasifica como “rugosa”; si no se forman grumos y la suspensión permanece lechosa, la cepa en estudio se clasifica como “lisa”.

2.2.11. Caracterización del perfil bioquímico mediante el uso del sistema

VITEK® 2.

Para determinar el perfil bioquímico de las bacterias se utilizó el sistema de identificación VITEK® 2 (Biomériux) para bacterias Gram negativas con la tarjeta GN. Para este ensayo se utilizaron los aislamientos de *B. abortus* 2308W *B. canis* bcanCR12, *B. nosferati* BCCN 84.3, *B. nosferati* bbatCR03 y *B. nosferati* bbatCR06.

De acuerdo con las recomendaciones del fabricante del equipo, se dispensaron 3 mL de solución salina al 0.45% en un tubo transparente de 12 x 75 mm de plástico, usando una torunda estéril se tomaron de tres a cinco colonias y se suspendieron en el tubo con la solución salina. Usando un turbidímetro (DensiChek plus), se preparó una

suspensión de 0.5-0.63 McFarland. Seguidamente, el tubo de transferencia de la tarjeta de identificación se colocó en el tubo de suspensión en la gradilla correspondiente.

Después de haber colocado las tarjetas de identificación y las suspensiones en la gradilla, esta se ingresó en el equipo VITEK® 2. En este punto, la suspensión llenó todas las pruebas contenidas en las tarjetas. Posteriormente, las tarjetas junto con las suspensiones, se incubaron durante 24 h a 37° C en una atmósfera enriquecida de 5% CO₂. Después de la incubación se colocó la gradilla con las tarjetas y las suspensiones nuevamente en el VITEK® 2 para realizar una incubación adicional (por un tiempo definido por el equipo) y la lectura de cada una de las pruebas.

2.3. Curvas de crecimiento de aislamientos *in vitro*

Para conocer el comportamiento de crecimiento de las bacterias en condiciones *in vitro* de laboratorio, se realizaron curvas de crecimiento. Para este ensayo se utilizaron aislamientos de *B. abortus* 2308W, *B. nosferati* BCCN 84.3, *B. nosferati* bbatCR03 y *B. nosferati* bbatCR06. A partir de los cultivos en plato se realizaron pre-cultivos de cada cepa de *Brucella* a analizar. En un Erlenmeyer se agregaron 20 mL de Caldo Tripticasa de Soya (CTS), en los cuales se inocularon de tres a cinco colonias de la bacteria de interés. Se dejó incubado en agitación a 200 rpm y 37°C toda la noche hasta que la bacteria alcanzara la fase estacionaria. Posteriormente, se guardaron alícuotas de 900 uL del precultivo con 20% de glicerol a -80°C.

Para realizar las curvas se inocularon 900 µL del precultivo congelado en 30 mL de CTS y se hicieron mediciones de absorbancia a 600 nm cada tres horas durante 48 horas. Para evitar mediciones después de las 4:00 PM, se realizaron dos cultivos por bacteria

con horas de inicio distintas. Durante las 48 horas las bacterias permanecieron en incubación a 200 rpm y a 37°C.

Para cada medición se tomaron 3 mL de CTS sin inóculo (blanco) y 3 mL del CTS con inóculo. En caso de que las lecturas de absorbancia fueran mayores a 2.0, se realizaron diluciones 1/10, ya que después de que la bacteria alcanza cierto crecimiento se imposibilita la lectura del espectrofotómetro. En estos casos se tomó 2700 µL de CTS sin bacteria y 300 µL de CTS con bacteria. Por el uso de esta dilución se realizó una corrección matemática a la hora de hacer la gráfica de estas curvas.

2.4. Caracterización fenotípica de la membrana de *Brucella* sp. como elemento de virulencia

Con el objetivo de cuantificar el nivel de resistencia de las membranas de las cepas aisladas en los murciélagos, se evaluó su resistencia frente a agentes bactericidas como la polimixina B, y a la acción bactericida del suero de acuerdo a lo descrito por (Alton et al. 1988). Para estos ensayos se utilizaron *B. abortus* 2308W, *B. nosferati* BCCN 84.3, *B. abortus* 2.13, *B. nosferati* bbatCR03 y *B. nosferati* bbatCR06.

2.4.1. Ensayo lítico para el estudio de la acción bactericida del suero

2.4.1.1. Obtención del suero control y preparación del suero sin complemento:

Se sangró a un donante y se recolectaron aproximadamente cinco tubos de tapa de roja (sin anticoagulante). Los tubos se dejaron durante media hora a temperatura ambiente para que coagulara. Posteriormente se centrifugó durante 10 min a 4500 rpm

y se traspasaron los sueros a un tubo cónico de 50 mL. Este último procedimiento se repitió hasta lograr un suero sin eritrocitos. El suero que se obtuvo se dividió en dos, suero control con complemento (Ctrl+) y el suero al que posteriormente se le elimina el complemento (Ctrl-).

El suero Ctrl+, únicamente se dividió en alícuotas de 420 µL, se colocaron en Eppendorfs de 1 mL y se congelaron a - 80° C. A la otra mitad del total del suero (Ctrl-) se le agregó una punta de espátula de levadura deshidratada de *Saccharomyces cerevisiae* y se incubó durante 30 min a 56°C en baño maría, con el fin de que al final de esta incubación se consumiera todo el complemento disponible en el suero. Seguidamente se centrifugó a 14000 rpm durante cinco minutos para separar la levadura. Este último paso se repitió hasta que quedó translúcido, ya que no deben quedar restos de levadura en el suero. Seguidamente, se filtró usando una jeringa y un filtro bacteriano. Para finalizar, se dividió en alícuotas de 420 µl, se colocaron en Eppendorfs de 1.50 mL y se congelaron a - 80° C.

2.4.1.2. Preparación de la bacteria:

A partir de cultivos frescos en ATS, se tomaron de tres a cinco colonias de la bacteria de interés y se colocaron en 20 mL de CTS, se incubó en agitación a 200 rpm y a 37°C durante 18 h. Con respecto a *Brucella abortus* 2.13, esta se incubó en un recipiente enriquecido con CO₂ usando una candela encendida, además necesitó 24 horas de incubación. A partir de este precultivo se preparó una suspensión de 1x10⁴ UFC/mL de la bacteria de interés en PBS utilizando la siguiente fórmula: $\text{UFC/mL} = (\text{Abs} \times 1.2 \times 10^9 \text{ UFC/mL}) / 1.7$.

2.4.1.3. Montaje del ensayo:

Se colocaron 100 μ L de la suspensión bacteriana con 200 μ L del suero Ctrl+ (previamente en congelación a -80°) y 100 μ L de la suspensión bacteriana con 200 μ L del suero Ctrl+ (previamente en congelación a -80°). Se incubaron por 90 min a 37° C. Para determinar la viabilidad bacteriana, una vez finalizada la incubación, se utilizó un asa Drigalsky para esparcir 100 μ L en ATS, tanto para el Ctrl+ como para el suero Ctrl-. Por último, se incubó durante 72 h y se realizó el recuento bacteriano. Para determinar el porcentaje de sobrevida, se comparó las UFC/mL del suero Ctrl+ contra el suero Ctrl- utilizando la siguiente fórmula: % sobrevida = $(\text{UFC [suero Ctrl-]} \times 100) / \text{UFC [suero Ctrl+]}$.

2.4.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por microdilución en placa para la Polimixina B.

La Polimixina B es un antibiótico que actúa de manera similar a otros péptidos policatiónicos naturales del sistema inmune innato (ej. defensinas), provocando alteraciones morfológicas en la membrana celular de las bacterias. Los estudios realizados con Polimixina B en brucelas terrestres demuestran que existe una resistencia a estos compuestos policatiónicos, y evidencian el papel que juega la composición de su membrana en el proceso de infección (De Tejada et al. 1995).

Para esto se preparó una suspensión bacteriana de 1 MacFarland de cada bacteria (aproximadamente 5 mL por cada bacteria), usando un turbidímetro (DensiChek). Se adicionó 100 μ L de la suspensión bacteriana en cada pozo con la bacteria respectiva de cada fila. Las diluciones seriadas del antibiótico Polimixina B (Sigma) se realizaron

previamente en diez tubos, con una concentración inicial de 500 µg/mL de CTS. Seguidamente se distribuyó el CTS con el antibiótico por columna, de mayor concentración a menor concentración (de izquierda a derecha). A excepción de la última columna, donde se añadieron 200 µL de únicamente CTS (control negativo) y de la primera donde se agregó 100 µL de bacteria y 100 µL de únicamente CTS (Control positivo). Luego, se incubó entre 24 y 48 horas a 37°C, sellando la placa con papel parafilm. El valor de CMI se determinó como la mayor dilución del antibiótico que inhibió completamente el crecimiento bacteriano a las 24 h de incubación.

3. Resultados y Discusión

3.1. Caracterización bioquímica de los aislamientos

Con respecto a las características macroscópicas de las colonias de *B. nosferati* en medio de cultivo sólido, se observó que después de tres días de incubación en CO₂, los aislamientos formaron colonias redondas, convexas, color crema, con un diámetro aproximado de 0.50 - 1 mm. En las tinciones de Gram, todos los aislamientos presentaron una coloración Gram negativa. Una diferencia respecto a la morfología microscópica, es que los aislamientos de *B. nosferati* presentaron una forma más alargada, con respecto a las cepas de referencia utilizadas. Tanto las características, macroscópicas como microscópicas observadas, fueron compatibles con bacterias del género *Brucella*.

Con respecto a las pruebas bioquímicas realizadas de rutina para la identificación de las bacterias del género *Brucella*, todas las cepas de *B. nosferati* mostraron resultados idénticos entre ellas. Todos los resultados son compatibles con género *Brucella*, con algunas particularidades específicas de esta nueva especie que se indican a continuación.

Todas las cepas evaluadas (incluyendo las cepas de referencia) resultaron positivas a la prueba de oxidasa. De acuerdo con la literatura, solo *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. papionis*, *B. vulpis* y algunas cepas de *B. abortus* son oxidasas negativas (Schlabritz-Loutsevitch et al. 2009; WOA 2022).

Otra de las pruebas utilizadas para la identificación del género es su actividad ureasa positiva (a excepción de *B. ovis* y ocasionalmente algunas cepas de *B. abortus*) (WOA 2022). Con respecto a esta prueba, los aislamientos de *B. nosferati* tuvieron una mayor similitud con *B. canis*, ya que ambas tuvieron una reacción bastante rápida. *B.*

nosferati BCCN 84.3 y *B. abortus* 2308W tardaron más de 120 minutos en cambiar de coloración, por lo tanto, ambas tienen una reacción lenta. Otras especies que tienen una reacción rápida (menos de 20 min) son *B. suis*, *B. neotomae*, *B. canis*, *B. innopinanta* y *B. papionis* (Scholz et al. 2010). Al igual que todos los reportes de especies del género *Brucella*, *B. nosferati* también fue negativa a la prueba de citrato de Simmons.

Todas las muestras, tanto las obtenidas de los murciélagos como las cepas de referencia, crecieron en ambos ambientes (en ausencia y presencia de CO₂). A excepción de *B. ovis* y algunas cepas de *B. abortus*, estos aislamientos no dependen del CO₂ para crecer (Pérez-Etayo et al. 2018). De forma similar, al igual que muchas bacterias del género *Brucella* (algunos biovares de *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae* y *B. inopinata*) (Guzmán-Verri et al. 2019; WOA 2022) que producen H₂S, todas las cepas de *Brucella nosferati* y la cepa *B. nosferati* BCCN 84.3 mostraron producción de H₂S.

En cuanto a la capacidad de reducir nitratos, *B. canis* bcanCR12 presentó un resultado positivo y *B. abortus* 2308W un resultado negativo. Sin embargo, en los aislamientos de *Brucella nosferati* y *B. nosferati* BCCN 84.3 se obtuvieron resultados variables. Esto quiere decir que hubo resultados tanto positivos como negativos para una misma muestra. No se conoce con certeza a qué se debe la variabilidad detectada en la prueba de reducción de nitratos para *Brucella nosferati* y *B. nosferati* BCCN 84.3 ya que se utilizaron las mismas condiciones. Sin embargo, esta prueba presenta algunas limitaciones, por ejemplo: poder verificar si la bacteria ha crecido de forma satisfactoria en el medio, lo cual podría generar falsos negativos.

Con respecto al crecimiento en presencia de fucsina básica y tionina, *B. nosferati* y *B. nosferati* BCCN 84.3 crecieron en ambos colorantes. *B. canis* bcanCR12 creció en

el medio con tionina, pero no con fucsina básica. Por el contrario, *B. abortus* 2308W no creció en el medio con tionina, pero si con fucsina básica. Esto coincide con lo reportado en la literatura en cuanto a las cepas de referencia. Otras bacterias donde se ha reportado crecimiento en ambas tinciones, al igual que *Brucella nosferati* son algunas cepas de *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata* y *B. vulpis* (WOAH 2022).

Para determinar si las bacterias evaluadas tenían un perfil liso o rugoso, se realizaron las pruebas de absorción de cristal violeta y la prueba de aglutinación con el colorante naranja de acridina. *B. canis* bcanCR12 es una bacteria rugosa, por lo cual se tiñó completamente en la prueba de la absorción de cristal violeta y aglutinó con el naranja de acridina. De lo contrario, *Brucella nosferati*, *B. nosferati* BCCN 84.3 y *B. abortus* 2308W no absorbieron la tinción del cristal violeta, ni aglutinaron con naranja de acridina. Al igual que la mayor parte de colonias del género *Brucella* (a excepción de *B. canis* y *B. ovis*) los aislamientos de *B. nosferati* se comportaron como bacterias lisas (Mancilla 2016; WOA 2022).

En el Cuadro 4 se pueden observar los resultados de la caracterización bioquímica descrita anteriormente.

Cuadro 4.

Caracterización bioquímica de los aislamientos de Brucella sp. obtenidos de los murciélagos Desmodus rotundus, incluyendo las cepas de referencia.

| Pruebas | Cepas | | | |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| | <i>Brucella nosferati</i> ^a | <i>Brucella nosferati</i> ^b | <i>Brucella canis</i> ^c | <i>Brucella abortus</i> ^d |
| Oxidación | + | + | + | + |
| Reducción de nitrato | v | v | + | - |
| Utilización de citrato | - | - | - | - |
| Requerimiento de CO ₂ | - | - | - | - |
| Actividad ureasa (min.) | ≤20 | ≥120 | ≤20 | ≥120 |
| Producción H ₂ S | + | + | + | + |
| Crecimiento en presencia de tinciones de: | | | | |
| Tionina (20 ug/mL) | + | + | + | - |
| Fucsina básica (20 ug/mL) | + | + | - | + |
| Tinción de colonias con cristal violeta | - | - | + | - |
| Aglutinación en presencia de naranja de acridina | - | - | + | - |

^a Aislamientos (n=14)

^b Cepa BCCN84.3

^c Cepa CR12

^d Cepa 2308W

v: variable

Con el objetivo incrementar el número de pruebas bioquímicas y por ende mejorar poder de resolución entre las cepas estudiadas, se analizó el perfil bioquímico por medio del sistema automatizado VITEK® 2 (utilizando la tarjeta para Gram negativos GN). Para este análisis se utilizaron las mismas cepas de referencia, y se seleccionaron dos de los aislamientos obtenidos de los murciélagos, *Brucella nosferati* bbatCR03 y *Brucella nosferati* bbatCR06, provenientes de placenta y glándula mamaria (leche) respectivamente.

A partir de los 47 sustratos evaluados, los dos aislamientos de *B. nosferati* mostraron un perfil bioquímico idéntico entre ellos. Con respecto a *B. abortus* 2308W se obtuvo el porcentaje de similitud con una coincidencia en su perfil del 82.97%. Al comparar *B. nosferati* con *B. nosferati* BCCN 84.3 y *B. canis* la similitud fue de 91.49% y 93.62% respectivamente (Figura 2).

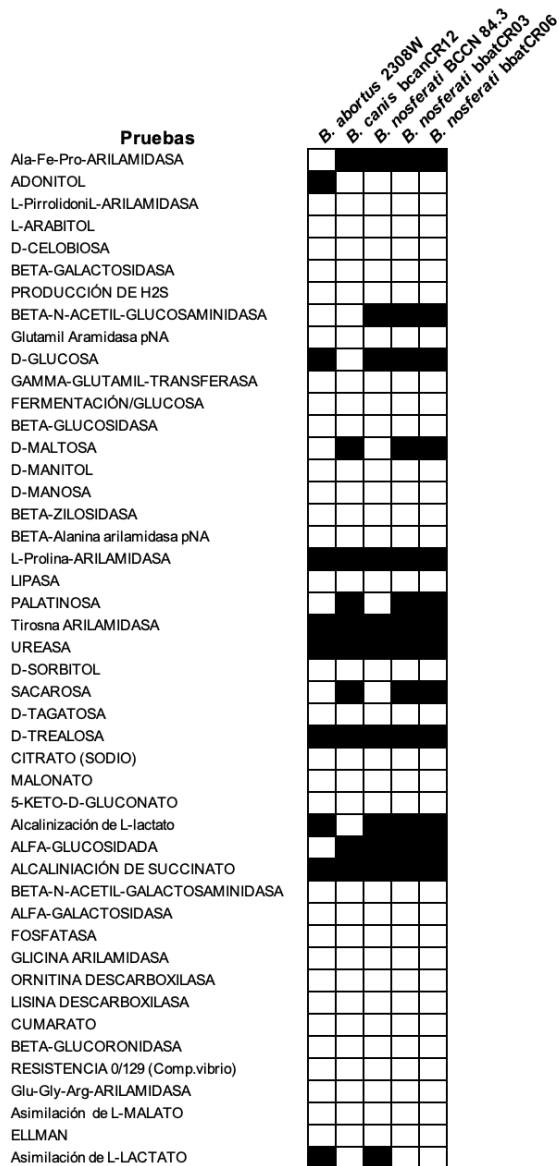


Figura 2.

Resultados del perfil bioquímico mediante el uso del sistema VITEK® 2.

Al igual que la mayoría de especies del género *Brucella*, *B. nosferati* oxida la glucosa (Foster et al. 2007). Por el contrario, la capacidad de *B. nosferati* de acidificar la sacarosa, no es un comportamiento tan común del género. Entre las especies que se han reportado capaces de oxidar la sacarosa se encuentran: *B. microti*, *B. inopinata*, *B.*

suis, *B. canis*, *B. neotomae* y *B. pinnipedialis* (Ewalt et al. 1994; Foster et al. 2007; Scholz et al. 2008, 2010).

El resultado negativo en la producción de H₂S en VITEK® 2, es un resultado esperable a pesar de que muchas bacterias del género *Brucella* los producen. Esto es debido a que *Brucella* produce H₂S en condiciones aerobias, lo cual no se favorece en las tarjetas del VITEK® 2. Para este ensayo, *Brucella* requiere la prueba de acetato de plomo utilizando el agar tripticasa de soya que contiene peptona de soya el cual posee cisteína (aminoácido azufrado) (Lopardo 2016). Las bacterias del género *Brucella* que producen H₂S, lo hacen por medio de aminoácidos azufrados contenidos en el medio. El sistema VITEK® 2 no provee estos requerimientos necesarios para la producción de H₂S de *Brucella*.

3.2. Perfil de las curvas de crecimiento bacteriano

Durante las primeras 27 horas de incubación las cuatro muestras analizadas mantuvieron un crecimiento muy similar. La fase de latencia de las cuatro bacterias fue aproximadamente de tres horas. Como se puede observar en la Figura 3, *B. abortus* 2308W tardó aproximadamente 24 horas en alcanzar la fase estacionaria y alcanzó una menor densidad de crecimiento bacteriano.

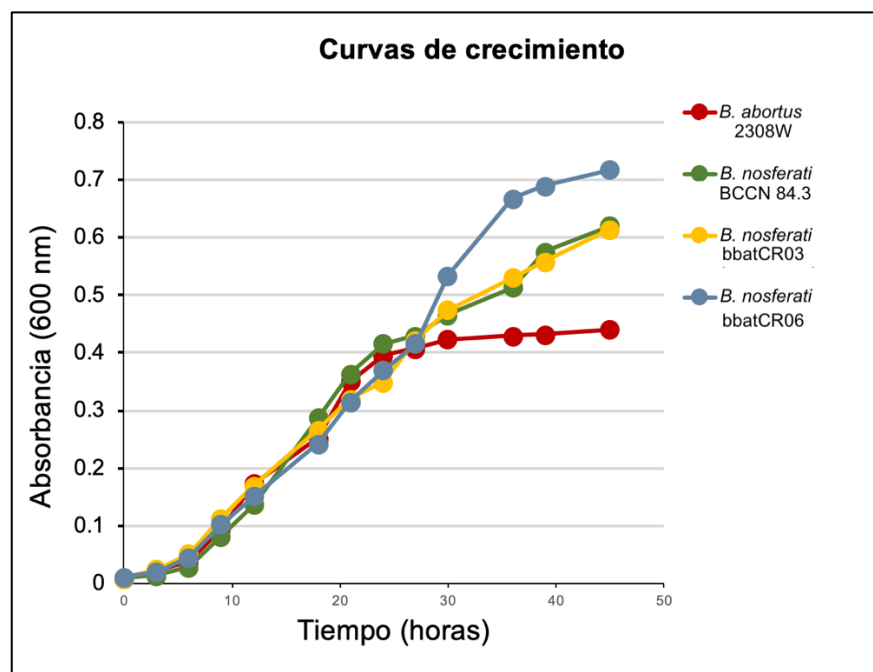


Figura 3.

Gráfico de las curvas de crecimiento de *Brucella nosferati* (bbatCR03 y bbatCR06) y las cepas de referencia, *B. abortus* 2308W y *B. nosferati* BCCN 84.3 durante las 48 h de incubación en caldo.

B. nosferati BCCN 84.3 tuvo un comportamiento muy similar a *B. nosferati* bbatCR03 y *B. nosferati* bbatCR06, principalmente con *B. nosferati* bbatCR03.

Durante las 48 horas en las que se realizó la curva de crecimiento tanto *B. nosferati* BCCN 84.3 como *B. nosferati* bbatCR03 y *B. nosferati* bbatCR06 no alcanzaron la fase estacionaria, tuvieron una fase exponencial más prolongada. *B. nosferati* bbatCR06 fue la que alcanzó una mayor densidad bacteriana en comparación con la de demás.

En la literatura se reporta que *B. abortus* tiene un crecimiento de rapidez intermedia (Occhialini et al. 2022). Al comparar las curvas de *B. abortus* 2308W con las

demás cepas, se observa que tienen una fase de latencia y una fase de crecimiento exponencial muy similar. Sin embargo, *B. abortus* 2308W no alcanza los niveles de densidad bacteriana que las otras cepas que mantienen su replicación aún después de a las 48 horas. Estos resultados coinciden con lo observado en crecimiento en plato para estas cepas en las cuales *B. nosferati* BCCN 84.3 y *Brucella nosferati* generaron colonias de mayor tamaño y más rápido en comparación con *B. abortus* 2308W en ATS.

3.3. Resistencia de la membrana de los aislamientos: Ensayo lítico para el estudio de la acción bactericida del suero y resistencia a la polimixina B

El sistema inmune innato juega un papel fundamental en la defensa contra los microorganismos (Conde-Álvarez et al. 2012). La efectividad de este sistema recae en los receptores de reconocimiento de los patógenos y el sistema del complemento, que rápidamente perciben la presencia de agentes extraños (Conde-Álvarez et al. 2012; Parkin & Cohen 2001). El sistema del complemento está conformado por un gran número de proteínas plasmáticas que reaccionan entre sí para opsonizar a los patógenos e inducir una respuesta inflamatoria que ayuda a combatir las infecciones (Conde-Álvarez et al. 2012).

La activación del complemento se desencadena mediante el reconocimiento de moléculas que se encuentran en las superficies microbianas pero que no están presentes en las células propias (Díaz Martín et al. 2017). Ejemplos de estas moléculas conocidas como PAMPs (patrones moleculares asociados al daño), son los LPS que se encuentran en las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas (Conde-Álvarez et al. 2012). El fin del ensayo lítico para el estudio de la acción bactericida del suero fue evaluar la

capacidad lítica que tiene el complemento del suero para inducir la muerte de *B. nosferati* y compararlo con las demás cepas de referencia.

B. canis bcanCR12, *B. nosferati* BCCN 84.3 y *B. nosferati* presentaron una alta resistencia a la acción bactericida del suero. *B. abortus* 2.13 fue muy susceptible a la acción bactericida del suero, obteniendo porcentajes de sobrevivencia sumamente bajos, con un promedio de 0.42% (figura 4).

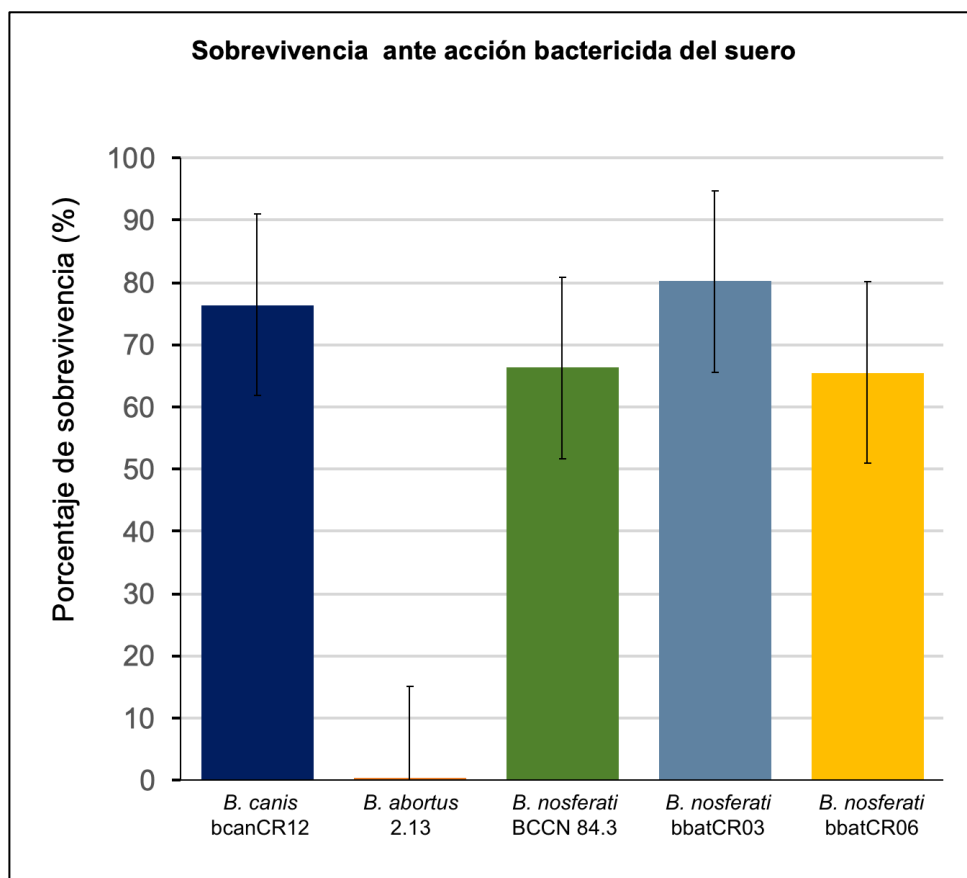


Figura 4.

Porcentaje de sobrevivencia ante la acción bactericida del suero de *B. nosferati* (bbatCR03 y bbatCR06) y las cepas de referencia *B. canis* bcanCR12, *B. nosferati* BCCN 84.3 y *B. abortus* 2.13. Las líneas negras representan la desviación estándar.

Las polimixinas tienen una estructura molecular con una forma típica de anillo conformado por un péptido policatiónico, y una cadena tripeptídica unida con ácidos grasos (Mohapatra et al. 2021). El anillo peptídico catiónico es hidrofílico y los ácidos grasos hidrofóbicos. Esta característica estructural es la que permite a las polimixinas insertarse en las membranas celulares bacterianas, lo que lleva a su desintegración, de una manera similar a otros polipéptidos catiónicos presentes de forma natural, como las defensinas o el complemento del sistema inmune innato (Jensen & Halling 2010). Una forma de evaluar la resistencia de las membranas bacterianas es mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a la polimixina B.

En el caso de *B. canis* bcan CR12 y *B. nosferati* BCCN 84.3 y *B. nosferati* bbatCR03 y bbatCR06 presentaron una CMI altas y muy parecidas en comparación con *B. abortus* 2.13 que tuvo una CMI muy inferior (Figura 5). Esta prueba se realizó por triplicado y no presentó desviación estándar.

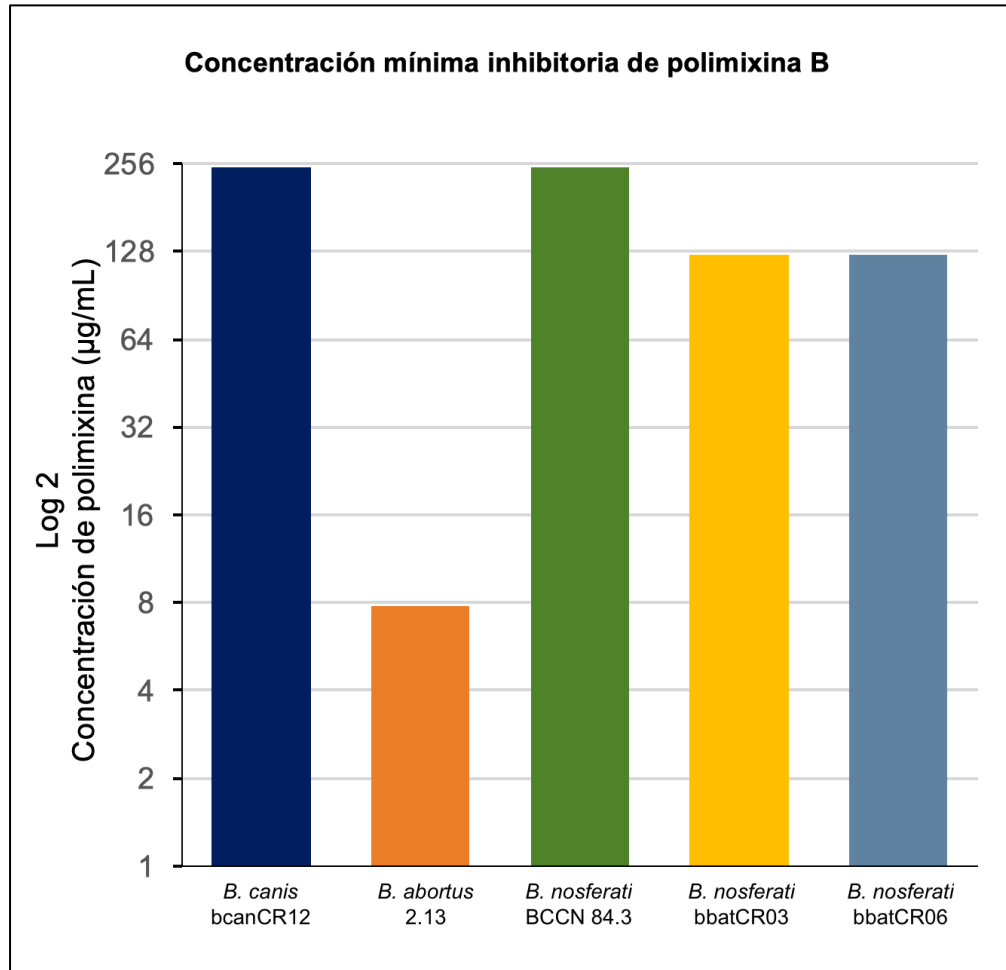


Figura 5.

Concentración mínima inhibitoria de polimixina B para inhibir el crecimiento bacteriano en los aislamientos de B. nosferati (bbatCR03 y bbatCR06) y las cepas de referencia B. canis bcanCR12, B. nosferati BCCN 84.3 y B. abortus 2.13.

A diferencia de otras bacterias Gram negativas, los LPS en la pared celular de *Brucella* presentan algunas particularidades que impiden a los receptores de reconocimiento de patógenos detectar a *Brucella* durante las etapas iniciales de la infección (Conde-Álvarez et al. 2012). El LPS de *Brucella* está compuesto por cadenas hidrocarbonadas alifáticas muy largas, y tanto el lípido A como el oligopolisacárido central

del LPS de *Brucella* tienen un número reducido de azúcares con carga negativa (Martirosyan et al. 2011). El fosfato y el ácido 2-ceto-3-deoxioctónico (KDO) se consideran los sitios de unión del lipopolisacárido con afinidad por los cationes, como la polimixina B (Vaara 1992). El lípido A y el núcleo del LPS de *Brucella* contiene cantidades reducidas de KDO, en comparación con otras bacterias Gram negativas (Moreno et al. 1990). Además, se ha sugerido que los lípidos de ornitina catiónicos que recubren los grupos aniónicos de los lipopolisacáridos, podrían ser un factor adicional de resistencia (De Tejada et al. 1995; Vaara 1992)

Todas estas características contribuyen a la reducción general de cargas negativas en la superficie de la bacteria (Martirosyan et al. 2011). Por lo tanto, el lipopolisacárido de *Brucella* confiere un fenotipo altamente resistente a los péptidos catiónicos bactericidas y hace que *Brucella* sea un pobre activador del sistema de complemento (Barquero-Calvo et al. 2007).

En el caso de *B. nosferati* y *B. nosferati* BCCN 84.3, la cadena O (presente en las *Brucellas* lisas) y los polisacáridos relacionados están formados por homopolímeros de azúcares de perosamina no reductora (Martirosyan et al. 2011). Esta otra característica también contribuye a la reducción de cargas negativas en la superficie de la bacteria. Sin embargo, mientras *B. nosferati* BCCN84.3 es predominantemente del serotipo A>M las *B. nosferati* aisladas de murciélago son predominantemente M>A (Hernández-Mora et al. 2023)

En el caso de *B. canis* bcanCR12, a pesar de que es una bacteria rugosa y carece de la cadena O del lipopolisacárido (característica asociada a una virulencia reducida), se ha visto que es una de las cepas más resistentes a los péptidos catiónicos (Mancilla

2016; Martín-Martín et al. 2011). Se cree que presenta algunas características particulares relacionadas con su membrana externa que podrían contribuir a una mayor resistencia (Martín-Martín et al. 2011). Además de la composición del lípido A y el núcleo, también puede verse aumentada por la distribución de varias proteínas de la membrana externa, como las proteínas porinas del grupo 2, proteínas de la familia Omp25/Omp31, o algunas identificadas mediante secuenciación (Cloeckaert et al. 2002; Martín-Martín et al. 2009, 2011). También se han visto diferencias en la secuencia de aminoácidos de algunas proteínas de la membrana externa que podrían resultar en modificaciones antigénicas (Cloeckaert et al. 2002; Martín-Martín et al. 2011). Se cree que alguna de estas diferencias de la membrana externa son la que le confieren una estabilidad particular a la membrana externa de *B. canis* (Martín-Martín et al. 2011).

Por otro lado, se observó que *B. abortus* 2.13 mostró una mayor sensibilidad al complemento y a la presencia de la Polimixina B. Para investigar las características únicas de la membrana externa relacionadas con la virulencia, Sola-Landa y colaboradores (1998) llevaron a cabo mutaciones en *B. abortus* que las volvieron sensibles a la Polimixina B, lo que dio origen a la cepa *B. abortus* 2.13. Estas mutaciones condujeron a la identificación de un sistema de regulación de dos componentes llamado BvrR/BvrS (del inglés: Brucella virulence relatad). Este sistema BvrR/BvrS consta de un componente de membrana y un regulador citoplasmático conocido como BvrR (Martínez-Núñez et al. 2010; Sola-Landa et al. 1998)

Los resultados del estudio de Sola-Landa y colaboradores (1998) indicaron que el mal funcionamiento del sistema BvrR/BvrS ocasionaba alteraciones en las propiedades de la membrana externa. Este sistema desempeña una función crucial en el

mantenimiento de la homeostasis de la membrana externa, controlando la estructura del lipopolisacárido y la expresión de proteínas periplasmáticas de la membrana externa (Martínez-Núñez et al. 2010). Esto a su vez provoca cambios en las propiedades de la membrana externa que afectan la susceptibilidad a sustancias policatiónicas, como la polimixina B y el complemento.

En los análisis filogenéticos realizados se pudo evidenciar que la cepa *B. nosferati* BCCN 84.3 aislada en un perro San Bernardo en 1984 en Costa Rica pertenece a la misma especie de *Brucella nosferati* aislada recientemente (Guzmán-Verri et al. 2019; Hernández-Mora et al. 2023). Esto respalda la teoría de la capacidad de *Brucella nosferati* de infectar diferentes animales y posiblemente humanos. A partir de los resultados de este estudio se pudo observar como a pesar de ser la misma especie y compartir muchas características fenotípicas y de resistencia, tienen algunas diferencias, sobre todo de tipo metabólico. Estas alteraciones afectan la susceptibilidad de la bacteria a sustancias bactericidas policatiónicas, como la Polimixina B y la acción del complemento. Esto, a su vez, tiene un impacto significativo en la virulencia de la bacteria (Martínez-Núñez et al. 2010; Sola-Landa et al. 1998).

También, posterior al análisis filogenético, se pudo observar que el parentesco más cercano de esta especie fueron dos aislamientos de dos mineros en Guyana Francesa (*B. amazoniensis*) (Hernández-Mora et al. 2023; Pastre et al. 2023). Estos hallazgos refuerzan de que hay un creciente interés por estudiar y caracterizar nuevas brucelas obtenidas a partir de animales silvestres con potencial patogénico para los seres humanos y otros animales domésticos y silvestres.

4. CONCLUSIONES

1. Mediante las pruebas realizadas, se logró la caracterización fenotípica básica los aislamientos de los murciélagos (*Desmodus rotundus*) obtenidos en una reserva privada cerca del Parque Nacional, Piedras Blancas en Puntarenas, Costa Rica.
2. Se logró describir el perfil bioquímico de los aislamientos mediante la realización de las pruebas típicamente utilizadas para la caracterización de las especies del género *Brucella*.
3. Se establecieron las curvas de crecimiento de los aislamientos, mediante la realización de cultivos en caldo en condiciones in vitro, demostrando algunas diferencias respecto a la densidad óptica que logran alcanzar las distintas cepas.
4. Se cuantificó el nivel de resistencia de la membrana, mediante la cuantificación de la concentración mínima de polimixina B para inhibir el crecimiento de los de los aislamientos y la acción bactericida del suero.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda al SENASA establecer un programa de vigilancia en las fincas vecinas, con un perímetro aproximado 20 Km, tomar muestras de todos los bovinos y realizar la prueba Rosa de Bengala como prueba de tamizaje. Si el caso es confirmado con cELISA y se aísla, se recomienda hacer identificación de la especie, para saber si estos casos pertenecen a *B. abortus* como se ha asumido anteriormente o son casos positivos por *B. nosferati*.
- También se recomienda al SENASA establecer una comunicación con los propietarios de las fincas cercanas, para que notifiquen cualquier caso de aborto, y de esta manera realizar las mismas pruebas descritas en el punto anterior.
- Se insta a los productores de estas áreas mantener un registro de los bovinos que lleguen con mordeduras de murciélagos, esto con el fin de dar un mayor seguimiento a estos animales en caso de que presenten síntomas compatibles con brucelosis.
- Se sugiere al SENASA ampliar el muestreo a otras poblaciones de murciélagos en otras áreas del país, sobre todo en áreas con una mayor prevalencia de brucelosis bovina o donde se presenten brotes.
- Para mejorar el entendimiento de la contribución que tiene la presencia de *Brucella* en vida silvestre en la propagación de la enfermedad, se recomienda al SENASA conservar sueros sanguíneos positivos o aislamientos provenientes de animales positivos en todo el país, independientemente del animal que se aisle. Esto con el fin de tener a disposición las cepas para que puedan ser usados y comparadas en un futuro con aislamientos de vida silvestre.

- Se recomienda a los médicos y microbiólogos de áreas cercanas considerar a *Brucella nosferati* como un diagnóstico diferencial en casos de pacientes con pirexias que no hayan recibido un diagnóstico.
- Considerando el alto potencial de los murciélagos como portadores de enfermedades y al potencial patogénico de *Brucella nosferati*, es crucial continuar investigando el rol de esta nueva especie en la epidemiología de la brucelosis, que podría afectar no solo a los murciélagos, sino también a especies domésticas, silvestres y potencialmente representar un riesgo de zoonosis.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- About, F., Pastre, T., Boutrou, M., Martinez, A. Y., Melzani, A., Peugny, S., Michaud, C., Zouaoui, S., Carage, T., Rose, V. S., Demar, M., Lavigne, J.-P., Djossou, F., O'Callaghan, D., Epelboin, L., & Keriél, A. (2023). Novel species of brucella causing human brucellosis, French Guiana. *Emerging Infectious Diseases*, 29(2), 333–340. <https://doi.org/10.3201/eid2902.220725>
- Aguilar-Setién, A., & Aréchiga-Ceballos, N. (2011). Los murciélagos: ¿héroes o villanos? *Ciencia*, 62(2), 76–83. https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/62_2/PDF/13_Muercielagos.pdf
- Alencar, O. A. (1994). Aspectos biológicos y ecológicos de *Desmodus Rotundus* (Chiroptera). *Peaq. Vet. Bras*, 14, 95–103.
- Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D., & Verger, J. M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. *INRA publications*.
- Arellano-Sota, C. (1988). Biology, ecology, and control of the vampire bat. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(December), S615–S619. https://doi.org/10.1093/clinids/10.Supplement_4.S615
- Bai, Y., Urushadze, L., Osikowicz, L., McKee, C., Kuzmin, I., Kandaurov, A., Babuadze, G., Natradze, I., Imnadze, P., & Kosoy, M. (2017). Molecular survey of bacterial zoonotic agents in bats from the country of Georgia (caucasus). *Plos One*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171175>
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D. S., Guzmán-Verri, C., Chacón-Díaz, C., Rucavado, A., Moriyón, I., & Moreno, E. (2007). *Brucella abortus* uses a stealthy

strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection.

Plos One, 2(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000631>

Carmichael, L., & Bruner, D. (1968). Characteristics of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Veterinarian*, 58, 579–592.

Cloekaert, A., Vizcaíno, N., Paquet, J. Y., Bowden, R. A., & Elzer, P. H. (2002). Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: Past, present and future. *Veterinary Microbiology*, 90(1–4), 229–247. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00211-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00211-0)

Conde-Álvarez, R., Arce-Gorvel, V., Iriarte, M., Manček-Keber, M., Barquero-Calvo, E., Palacios-Chaves, L., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., Martirosyan, A., von Bargen, K., Grilló, M. J., Jerala, R., Brandenburg, K., Llobet, E., Bengoechea, J. A., Moreno, E., Moriyón, I., & Gorvel, J. P. (2012). The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition. *PLoS Pathogens*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002675>

De, B. K., Stauffer, L., Koylass, M. S., Sharp, S. E., Gee, J. E., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Vega, R., Clark, T. A., Daneshvar, M. I., & Wilkins, P. P. (2008). Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *Clinical Microbiology*, 46, 43–49.

De Miguel, M. J., Marín, C. M., Muñoz, P. M., Dieste, L., Grilló, M. J., & Blasco, J. M. (2011). Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1458–1463. <https://doi.org/10.1128/jcm.02301-10>

De Tejada, G. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., & Moriyon, I. (1995). The outer

- membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infection and Immunity*, 63(8), 3054–3061. <https://doi.org/10.1128/iai.63.8.3054-3061.1995>
- Díaz Martín, D., Úbeda Cantera, M., López Suárez, A., & Álvarez de Mon Soto, M. (2017). Respuesta inmune innata y sus implicaciones fisiopatológicas. *Medicine (Spain)*, 12(24), 1388–1397. <https://doi.org/10.1016/j.med.2016.12.009>
- Eisenberg, T., Riße, K., Schauerte, N., Geiger, C., Blom, J., & Scholz, H. C. (2017). Isolation of a novel 'atypical' *Brucella* strain from a bluespotted ribbontail ray (*Taeniura lymma*). *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(2), 221–234. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0792-4>
- Eisenberg, T., Schlez, K., Fawzy, A., Völker, I., Hechinger, S., Curić, M., Schauerte, N., Geiger, C., Blom, J., & Scholz, H. C. (2020). Expanding the host range: infection of a reptilian host (*Furcifer pardalis*) by an atypical *Brucella* strain. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(10), 1531–1537. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01448-9>
- Ewalt, D. R., Payeur, J. B., Martin, B. M., Cummins, D. R., & Miller, W. G. (1994). Characteristics of a *Brucella* Species from a Bottlenose Dolphin (*Tursiops Truncatus*). En *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (Vol. 6, Número 4). <https://doi.org/10.1177/104063879400600408>
- Fiebig, A., Vrentas, C. E., Le, T., Huebner, M., Boggiatto, P. M., Olsen, S. C., & Crosson, S. (2021). Quantification of *Brucella abortus* population structure in a natural host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(11). <https://doi.org/10.1073/pnas.2023500118>
- Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I., & Cloeckert, A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and

- seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(11), 2688–2693. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65269-0>
- Freer, E., Rojas, N., Weintraub, A., Lindberg, A. A., & Moreno, E. (1995). Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Research in Microbiology*, 146(7), 569–578. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)80563-8](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)80563-8)
- González-Espinoza, G., Arce-Gorvel, V., Mémet, S., & Gorvel, J. P. (2021). *Brucella*: Reservoirs and niches in animals and humans. *Pathogens*, 10(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020186>
- Grilló, M.-J., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., Moriyón, I., & Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in The mouse model? *Veterinary Research*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-29>
- Guzmán-Verri, C., Suárez-Esquivel, M., Ruíz-Villalobos, N., Zygmunt, M. S., Gonnet, M., Campos, E., Viquez-Ruiz, E., Chacón-Díaz, C., Aragón-Aranda, B., Conde-Álvarez, R., Moriyón, I., Blasco, J. M., Muñoz, P. M., Baker, K. S., Thomson, N. R., Cloeckeaert, A., & Moreno, E. (2019). Genetic and phenotypic characterization of the etiological agent of canine orchiepididymitis smooth *Brucella* sp. BCCN84.3. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(JUN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00175>
- Hernández-Mora, G., Chacón-Díaz, C., Moreira-Soto, A., Barrantes-Granados, O., Suárez-Esquivel, M., Viquez-Ruiz, E., Barquero-Calvo, E., Ruiz-Villalobos, N., Hidalgo-Montealegre, D., González-Barrientos, R., Demeter, E. A., Estrella-Morales, J., Zúñiga-Pereira, A.-M., Quesada-Gómez, C., Chaves-Olarte, E., Lomonte, B., Guzmán-Verri, C., Drexler, J. F., & Moreno, E. (2023). Virulent *Brucella nosferati* infecting *Desmodus rotundus* has emerging potential due to the broad foraging range

- of its bat host for humans and wild and domestic animals. *mSphere*, 8(4).
<https://doi.org/10.1128/msphere.00061-23>
- Hernández-Mora, G., Ruiz-Villalobos, N., Bonilla-Montoya, R., Romero-Zúniga, J. J., Jiménez-Arias, J., González-Barrientos, R., Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., Rojas, N., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., & Moreno, E. (2017). Epidemiology of bovine brucellosis in Costa Rica: Lessons learned from failures in the control of the disease. *Plos one*, 12(8), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182380>
- Hubálek, Z., Scholz, H. C., Sedláček, I., Melzer, F., Sanogo, Y. O., & Nesvadbová, J. (2007). Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(4), 679–687. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0143>
- Jensen, A. E., & Halling, S. M. (2010). Effect of polymyxin B and environmental conditions on isolation of *Brucella* species and the vaccine strain RB51. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 33(2), 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2008.08.005>
- Lapaque, N., Forquet, F., de Chastellier, C., Mishal, Z., Jolly, G., Moreno, E., Moriyon, I., Heuser, J. E., He, H.-T., & Gorvel, J.-P. (2006). Characterization of brucella abortus lipopolysaccharide macrodomains as Mega Rafts. *Cellular Microbiology*, 8(2), 197–206. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00609.x>
- Leclercq, S. O., Cloeckert, A., & Zygmunt, M. S. (2020). Taxonomic Organization of the Family Brucellaceae Based on a Phylogenomic Approach. *Frontiers in Microbiology*, 10(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03083>
- Lopardo, H. A. (2016). Bacterias de Importancia Clínica. *Manual De Microbiología Clínica De La Asociación Argentina De Microbiología*, 1, 11–73.

- Lord, R. D. (1992). Seasonal reproduction of vampire bats and its relation to seasonality of bovine rabies. *Journal of wildlife diseases*, 28(2), 292–294. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-28.2.292>
- Malaga, A. (1954). Vampire bat as a carrier of rabies. *American journal of public health*, 44(7), 909–918. <https://doi.org/10.2105/ajph.44.7.909>
- Mancilla, M. (2016). Smooth to Rough Dissociation in Brucella: The Missing Link to Virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(January), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00098>
- Martínez-Gómez, E., Stähle, J., Gil-Ramírez, Y., Zúñiga-Ripa, A., Zaccheus, M., Moriyón, I., Iriarte, M., Widmalm, G., & Conde-Álvarez, R. (2018). Genomic insertion of a heterologous acetyltransferase generates a new lipopolysaccharide antigenic structure in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01092>
- Martín-Martín, A. I., Caro-Hernández, P., Sancho, P., Tejedor, C., Cloeckert, A., Fernández-Lago, L., & Vizcaíno, N. (2009). Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. *Veterinary Microbiology*, 137(1–2), 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.003>
- Martín-Martín, A. I., Sancho, P., Tejedor, C., Fernández-Lago, L., & Vizcaíno, N. (2011). Differences in the outer membrane-related properties of the six classical *Brucella* species. *Veterinary Journal*, 189(1), 103–105.
- Martínez-Núñez, C., Altamirano-Silva, P., Alvarado-Guillén, F., Moreno, E., Guzmán-Verri, C., & Chaves-Olarte, E. (2010). The two-component system BvrR/BvrS

- regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *Journal of Bacteriology*, 192(21), 5603–5608. <https://doi.org/10.1128/JB.00567-10>
- Martirosyan, A., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunological Reviews*, 240(1), 211–234. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x>
- Mohapatra, S. S., Dwibedy, S. K., & Padhy, I. (2021). Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. *Journal of Biosciences*, 46(3). <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00209-8>
- Moreno, E. (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAY), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00213>
- Moreno, E. (2021). The one hundred year journey of the genus *Brucella* (Meyer and Shaw 1920). *FEMS Microbiology Reviews*, 45(1). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa045>
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.05.021>
- Moreno, E., & Barquero-Calvo, E. (2020). The role of neutrophils in brucellosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(4). <https://doi.org/10.1128/mnbr.00048-20>
- Moreno, E., & Moriyón, I. (2006). The genus *Brucella*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The prokaryotes: A handbook on the biology of Bacteria* (Vol. 5, pp. 315–456). essay, Springer.
- Moreno, E., Blasco, J.-M., & Moriyón, I. (2022). Facing the human and animal brucellosis conundrums: The forgotten lessons. *Microorganisms*, 10(5), 942. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050942>

- Moreno, E., Cloeckert, A., & Moriyón, I. (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology*, *90*(1–4), 209–227. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00210-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00210-9)
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., & Mayer, H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *Journal of Bacteriology*, *172*(7), 3569–3576. <https://doi.org/10.1128/jb.172.7.3569-3576.1990>
- Moriyón, I., Blasco, J. M., Letesson, J. J., De Massis, F., & Moreno, E. (2023). Brucellosis and one health: Inherited and future challenges. *Microorganisms*, *11*(8), 2070. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082070>
- Occhialini, A., Hofreuter, D., Ufermann, C. M., Al Dahouk, S., & Köhler, S. (2022). The Retrospective on Atypical *Brucella* Species Leads to Novel Definitions. *Microorganisms*, *10*(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040813>
- Paradiso, J. L., Goodwin, G. G., & Greenhall, A. M. (1961). A Review of the Bats of Trinidad and Tobago: Descriptions, Rabies Infection, and Ecology. *Journal of Mammalogy*, *42*(4), 559. <https://doi.org/10.2307/1377397>
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, *357*(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Pastre, T., Boutrou, M., Martinez, A. Y., Melzani, A., Peugny, S., Michaud, C., Zouaoui, S., Carage, T., Rose, V. Sainte, Demar, M., Lavigne, J., Djossou, F., Callaghan, D. O., Epelboin, L., & Keriél, A. (2023). Novel Species of *Brucella* Causing. *Emerging Infectious Diseases*, *29*(2), 333–340.
- Pérez-Etayo, L., De Miguel, M. J., Conde-Álvarez, R., Muñoz, P. M., Khames, M., Iriarte,

- M., Moriyón, I., & Zúñiga-Ripa, A. (2018). The CO₂-dependence of *Brucella ovis* and *Brucella abortus* biovars is caused by defective carbonic anhydrases. *Veterinary Research*, 49(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0583-1>
- Ricciardi, I. D., Nunes, M. P., Andrade, C. M., & Da Silva, A. G. (1976). Anti-brucella agglutinins in bats and “Callithrix” monkeys. *Journal of wildlife diseases*, 12(1), 52–54. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-12.1.52>
- Robertson, L. (1961). *Brucella* organisms in milk. *Royal Society of Health Journal*, 81(1), 46–50. <https://doi.org/10.1177/146642406108100165>
- Rodríguez-Cavallini, E., Coronado-Gamboa, M. del M., López-Ureña, D., Sánchez-Rodríguez, C., & Rodríguez, C. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio* (1. ed.). Editorial UCR.
- Roop, R. M., Barton, I. S., Hoppersberger, D., & Martin, D. W. (2021). Uncovering the hidden credentials of *brucellavirulence*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(1). <https://doi.org/10.1128/membr.00021-19>
- Scheffer, K. C., Barros, R. F., Iamamoto, K., Mori, E., Asano, K. M., Lima, J. Y. O., Garcia, A. I. E., Cunha Neto, R. S., & Fahl, W. O. (2022). *Desmodus Rotundus* – Biología Y Comportamiento. *Open Science Research III*, 505–529. <https://doi.org/10.37885/220308371>
- Schlabritz-Loutsevitch, N. E., Whatmore, A. M., Quance, C. R., Koylass, M. S., Cummins, L. B., Dick, E. J., Snider, C. L., Cappelli, D., Ebersole, J. L., Nathanielsz, P. W., & Hubbard, G. B. (2009). A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - First report. *Journal of Medical Primatology*, 38(1), 70–73. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2008.00314.x>

- Schmidt, U. (1973). The gestation period of the vampire bat (*Desmodus rotundus*). *Journal for mammals*, 38, 14–33.
- Scholz, H. C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Heubauer, H., Cloeckeaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H. J., & Nöckler, K. (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(2), 375–382. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65356-0>
- Scholz, H. C., Mühldorfer, K., Shilton, C., Benedict, S., Whatmore, A. M., Blom, J., & Eisenberg, T. (2016). The change of a medically important genus: Worldwide occurrence of genetically diverse novel brucella species in exotic frogs. *Plos one*, 11(12), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168872>
- Scholz, H. C., Nöckler, K., Ller, C. G., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Kämpfer, P., Cloeckeaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H. J., & De, B. K. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(4), 801–808. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.011148-0>
- Scholz, H. C., Revilla-Fernández, S., Dahouk, S. Al, Hammerl, J. A., Zygmunt, M. S., Cloeckeaert, A., Koylass, M., Whatmore, A. M., Blom, J., Vergnaud, G., Witte, A., Aistleitner, K., & Hofer, E. (2016). *Brucella vulpis* sp. Nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*vulpes vulpes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(5), 2090–2098. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000998>

- Sequeira, A., Campos, E., Mendoza, L., San-Román, M., & Moreno, E. (1984). Identificación de especies y biotipos de *Brucella* aisladas en Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 34(526), 6.
- Silva, L. A., Souza, M. F. S., Torquetti, C. G., Freitas, D. C. O., Moreira, L. G. A., Carvalho, T. P., Santana, C. H., Thompson, J. R., Rosa, D. C. O., Jesus, T. R., Paixão, T. A., & Santos, R. L. (2023). Antigenic and molecular evidence of *Brucella* sp.-associated epididymo-orchitis in frugivorous (*Artibeus lituratus*) and nectarivorous (*Glossophaga soricina*) bats in Brazil. *Frontiers in Veterinary Science*, 10(1). <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1235299>
- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerdá, J., Grilló, M. J., Moreno, E., Moriyón, I., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., & López-Goñi, I. (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Molecular Microbiology*, 29(1), 125–138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00913.x>
- Tiller, R. V., Gee, J. E., Frace, M. A., Taylor, T. K., Setubal, J. C., Hoffmaster, A. R., & De, B. K. (2010). Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17), 5837–5845. <https://doi.org/10.1128/AEM.00620-10>
- Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, 56(3), 395–411. <https://doi.org/10.1128/membr.56.3.395-411.1992>
- Verger, J.-M., Grimont, F., Grimont, P. A. D., & Grayon, M. (1985). *Brucella*, a

Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35(3), 292–295.

<https://doi.org/10.1099/00207713-35-3-292>

Whatmore, A. M., Davison, N., Cloeckaert, A., Al Dahouk, S., Zygmunt, M. S., Brew, S. D., Perrett, L. L., Koylass, M. S., Vergnaud, G., Quance, C., Scholz, H. C., Dick, E. J., Hubbard, G., & Schlabritz-Loutsevitch, N. E. (2014). *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 4120–4128. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.065482-0>

Wilkinson, G. (1990). Food sharing in vampire bats. *Scientific American*, 262(2), 76–82. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0290-76>

Wilkinson, G. (1988). Reciprocal altruism in bats and other mammals. *Ethology and Sociobiology*, 9(2–4), 85–100. [https://doi.org/10.1016/0162-3095\(88\)90015-5](https://doi.org/10.1016/0162-3095(88)90015-5)

WOAH. (2022). *Terrestrial Animal Health Code 2022 Chapter 3.1.4. – Brucellosis (infection with *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*)*. 1–48. <https://www.woah.org/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/disease-data-collection/>

7. ANEXOS

Anexo 1.

R-CM-UNA-005-2022-OT-CONAGEBIO



MINISTERIO DE AMBIENTE Y ENERGÍA

COMISION NACIONAL PARA LA GESTION DE LA BIODIVERSIDAD
OFICINA TECNICA

SAN JOSE, COSTA RICA

R-CM-UNA-005-2022-OT-CONAGEBIO

Expediente: CM-UNA-012-2021

COMISION NACIONAL PARA LA GESTION DE LA BIODIVERSIDAD, OFICINA TÉCNICA.
San José, a las 12:00 horas del 7 de abril de 2022.

Se conoce solicitud de modificación para el permiso de acceso a elementos y recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad, gestionado por Universidad Nacional, cédula jurídica 4000042150, representada legalmente por Jorge Herrera Murillo con cédula 205330454 en adelante conocido como el Interesado, para el proyecto de Investigación Básica denominado "**Comprendiendo la filogeografía de Brucella: un camino para herramientas de diagnóstico específicas.**", en adelante conocido como el Proyecto.

RESULTANDO

PRIMERO: Que el día 8 de setiembre del 2013, la señora Ana Lorena Guevara Fernández, con cédula de identidad 1-0538-0559 en representación de la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad, en adelante CONAGEBIO; y la señora Sandra León Coto, con cédula de identidad 4-0097-0835, en representación de la Universidad Nacional con cédula jurídica 4-000-042150, firmaron el Convenio Marco.

SEGUNDO: El día 8 de setiembre del 2015, el señor Alberto Salom Echeverría, con cédula de identidad 1-0443-0578 en representación de la Universidad Nacional con cédula jurídica 4-000-042150, presentó en la Oficina Técnica de CONAGEBIO el formulario para el Registro de interesados para el permiso de Acceso a los Elementos y Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad o al Conocimiento Tradicional Asociado, Código de Conducta, Declaración Jurada y certificaciones legales de conformidad con el Convenio Marco.

TERCERO: Qué el día 23 de octubre del 2018, la señora Enid Georgina Chaverri Tapia con cédula de identidad número 1-0720-0996, en calidad de Presidenta a.i. y Representante Legal con facultades suficientes de la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad, en adelante CONAGEBIO y el señor Alberto Salom Echeverría, con cédula de identidad 1-

0443-0578 en representación de la Universidad Nacional con cédula jurídica 4-000-042150, firmaron una Prórroga del Convenio Marco por 5 años.

CUARTO: Que el día 30 de setiembre de 2021, el interesado presentó en la Oficina Técnica de CONAGEBIO el formulario solicitud y guía técnica para realizar el proyecto de Investigación Básica.

QUINTO: Que al ser las 14:00 horas del 28 de octubre de 2021, la Oficina Técnica emitió la resolución R-CM-UNA-015-2021-OT de aprobación de la solicitud de acceso para el Proyecto, por el plazo de 36 meses contados a partir de su notificación.

SEXTO: Que el día 29 de octubre de 2021 se notificó al Interesado, la resolución R-CM-UNA-015-2021-OT para el Proyecto.

SETIMO: Que el día 8 de febrero de 2022, el Interesado solicitó la modificación / prórroga para el proyecto.

OCTAVO: Que en cumplimiento de lo establecido en el artículo 18 Bis de la Ley para mejorar la lucha contra el fraude fiscal, Ley No. 9416, el día 05 de abril de 2022 se llevó a cabo la consulta de acceso público en el Sistema que el Ministerio de Hacienda ha dispuesto para tales efectos, con el fin de verificar la situación tributaria de los sujetos obligados ante la Dirección General de Tributación, obteniendo como información que las partes (Interesado y Proveedor) se encuentran al día en sus obligaciones tributarias, o no se encuentran registrados en dichas plataformas.

NOVENO: Que el día 05 de abril de 2022 se consultó acerca de la morosidad ante la Caja Costarricense de Seguro Social, obteniendo como información que tanto Interesado como Proveedores se encuentran al día en sus obligaciones o no se encuentran registrados en dichas plataformas.

CONSIDERANDO:

Primero: Que el artículo 6 de la Ley de Biodiversidad N° 7788, publicada en La Gaceta el 27 mayo de 1998, dispone que las propiedades bioquímicas y genéticas de los elementos de la Biodiversidad silvestres y domesticados son de dominio público. El Estado autorizará la exploración, investigación, bioprospección, uso y aprovechamiento de los elementos de la biodiversidad que constituyen bienes de dominio público, así como la utilización de todos los recursos genéticos y bioquímicos, por medio de las normas generales de acceso.

Segundo: Que con fundamento en los artículos 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 de la Ley de Biodiversidad, se establece que, para cumplir los objetivos, el Ministerio del Ambiente y Energía, coordinará la organización administrativa encargada del manejo y la conservación de la biodiversidad, integradas por la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad y el Sistema Nacional de Áreas de Conservación.

Tercero: Que los artículos del 62 al 85 del Capítulo V de la Ley supracitada, declaran a la CONAGEBIO como la organización responsable de regular el acceso a los elementos o recursos genéticos y bioquímicos de la Biodiversidad y a la Protección del conocimiento asociado.

Cuarto: Que de conformidad con la Ley de Protección al ciudadano del exceso de requisitos y trámites administrativos N° 8220, en relación a la presentación única de documentos, la Ley de Biodiversidad N° 7788, artículos 1, 10, siguientes y concordantes y la Ley General de la Administración Pública N° 6227, artículos 4,8,10,16, 225 y 269 siguientes y concordantes, la información necesaria para el trámite de esta solicitud, se completó con la documentación utilizada en la Resolución R-CM-UNA-015-2021-OT, cumpliendo el Interesado con el procedimiento y los requisitos necesarios para obtener la prórroga al permiso de acceso de conformidad con las "Normas Generales para el Acceso a los elementos o Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad, Decreto Ejecutivo N° 31514-MINAE" y al Decreto Ejecutivo N° 33697-MINAE.

Quinto: Que la presente solicitud de prórroga se ha valorado de conformidad con los criterios establecidos en los artículos 14, 23 y 24 de las Normas Generales para el Acceso a los Elementos y Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad y se concluye que cumple con lo establecido en dichos artículos.

POR TANTO,

LA DIRECTORA EJECUTIVA DE LA OFICINA TECNICA

RESUELVE:

PRIMERO: Aprobar a la Universidad Nacional, con cédula jurídica 4000042150, representada legalmente por Jorge Herrera Murillo con cédula de identidad 205330454, la modificación del permiso de acceso autorizado en la Resolución R-CM-UNA-015-2021-OT, para el Proyecto denominado "**Comprendiendo *la filogeografía de Brucella: un camino para herramientas de diagnóstico específicas***", de conformidad con los siguientes términos:

1. Autorizar de conformidad con la solicitud la siguientes modificaciones:

A. Resuelve Primero, Punto 1:

La Oficina Técnica autoriza de conformidad con el contrato para el otorgamiento del consentimiento previamente informado y el formulario de Guía Técnica, el acceso *in situ* al siguiente material biológico:

Muestras de aislamientos bacterianos de Brucella, almacenados en el Laboratorio Bacteriología, Laboratorio Bioquímica, Escuela de Medicina Veterinaria, UNA:

| Código de Muestra | Género y especies |
|-------------------|-------------------|
| bcanCR1 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR2 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR3 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR4 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR5 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR6 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR7 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR8A | <i>B. canis</i> |
| bcanCR9A | <i>B. canis</i> |
| bcanCR10 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR11 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR12 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR13B | <i>B. canis</i> |
| bcanCR14B | <i>B. canis</i> |
| bcanCR15 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR16 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR17C | <i>B. canis</i> |
| bcanCR18D | <i>B. canis</i> |
| bcanCR19 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR20C | <i>B. canis</i> |
| bcanCR21D | <i>B. canis</i> |
| bcanCR22 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR23 | <i>B. canis</i> |
| bruCR0 | <i>Brucella</i> |
| bcanCR24 | <i>B. canis</i> |
| bcanCR25 | <i>B. canis</i> |

| Código de Muestra | Género y especies |
|-------------------|-------------------|
| bcanCR26-E | <i>B. canis</i> |
| bcanCR27-E | <i>B. canis</i> |
| bcanCR28-F | <i>B. canis</i> |
| bcanCR29-F | <i>B. canis</i> |
| bcanCR30 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR1 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR2 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR3 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR4 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR5 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR6 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR7 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR8 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR8w alias 8a | <i>B. canis</i> |
| bmarCR9 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR10 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR11 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR12 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR13 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR14 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR15 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR16 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR17 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR18 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR19 | <i>B. canis</i> |
| bmarCR20 | <i>B. canis</i> |

| | |
|---------------|-------------------|
| bmarCR20w | B. cefi |
| bmarCR20lung | B. cefi |
| bmarCR21 | B. cefi |
| bmarCR22 | B. cefi |
| bmarCR23LCR | B. cefi |
| bmarCR23Milk | B. cefi |
| bmarCR24 | B. cefi |
| bmarCR25 | B. cefi |
| bmarCR26 | B. cefi |
| bmarCR27 | B. cefi |
| bmarCR28 | B. cefi |
| bmarCR29LCR | B. cefi |
| bmarCR29SF | B. cefi |
| bmarCR29Blood | B. cefi |
| bmarCR30 | B. cefi |
| bmarCR31A | B. cefi |
| bmarCR32A | B. cefi |
| bmarCR33A | B. cefi |
| bmarCR34A | B. cefi |
| bmarCR35B | Brucella |
| bmarCR36B | Brucella |
| bmarCR37B | Brucella |
| bmarCR38B | Brucella |
| bmarCR39B | Brucella |
| bmarCR40B | Brucella |
| bmarCR41B | Brucella |
| bmarCR42B | Brucella |
| bmarCR43B | Brucella |
| bmarCR44B | Brucella |
| bmarCR45B | Brucella |
| babohCR65 | <i>B. abortus</i> |
| babohCR66 | <i>B. abortus</i> |

| | |
|----------|-------------------|
| baboCR11 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR4 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR63 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR58 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR60 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR59 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR57 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR31 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR40 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR41 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR42 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR43 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR44 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR45 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR46 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR47 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR48 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR32 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR49 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR50 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR51 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR52 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR53 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR54 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR55 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR56 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR22 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR23 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR33 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR24 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR25 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR26 | <i>B. abortus</i> |

| | |
|------------------------------|--------------------------|
| baboCR27 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR28 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR29 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR30 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR9 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR16 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR8 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR34 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR1 | <i>B. abortus</i> |
| bneohCR02 previously baboCR2 | <i>Brucella neotomae</i> |
| baboCR6 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR18 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR10 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR7 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR19 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR20 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR12 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR5 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR35 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR15 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR13 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR14 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR17 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR64 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR36 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR37 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR38 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR39 | <i>B. abortus</i> |
| babohCR62 NOW bneohCR1 | <i>B. neotomae</i> |
| babohCR61 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR67 | <i>B. abortus?</i> |
| baboCR68 | <i>B. abortus</i> |

| | |
|-----------|-------------------------|
| baboCR69A | <i>B. abortus</i> |
| baboCR70A | <i>B. abortus</i> |
| babohCR71 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR72 | <i>B. abortus</i> |
| baboCR74 | <i>B. abortus</i> |
| bruCR1 | <i>Brucella</i> |
| bruCR2 | <i>Brucella</i> |
| bruCR3 | <i>Brucella</i> |
| bruCR4 | <i>Brucella</i> |
| bruCR5 | <i>Brucella</i> |
| baboCR75 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR76 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR84 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR77B | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR78B | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR79B | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR80B | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR85B | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR81 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR82 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR83 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR86 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR87 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR88 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR89 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR90 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR91 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR92 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR93 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR94 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR95 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR96 | <i>Brucella abortus</i> |

| | |
|-----------|-------------------------|
| baboCR97 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR98 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR99 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR100 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR101 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR102 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR103 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR104 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR105 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR106 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR107 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR108 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR109 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR110 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR111 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR112 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR113 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR114 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR115 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR116 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR117 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR118 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR119 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR120 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR121 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR122 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR123 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR124 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR125 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR126 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR127 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR128 | <i>Brucella abortus</i> |

| | |
|-----------|-------------------------|
| baboCR129 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR130 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR131 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR132 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR133 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR134 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR135 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR136 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR137 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR138 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR139 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR140 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR141 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR142 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR143 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR144 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR145 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR146 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR147 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR148 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR149 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR150 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR151 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR152 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR153 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR154 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR155 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR156 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR157 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR158 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR159 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR160 | <i>Brucella abortus</i> |

| | |
|------------|-------------------------|
| baboCR161 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR162 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR163 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR164 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR165 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR166 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR167 | <i>Brucella abortus</i> |
| babohCR168 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR169 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR170 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR171 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR172 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR173 | <i>Brucella abortus</i> |
| babohCR174 | <i>Brucella abortus</i> |
| babohCR175 | <i>Brucella abortus</i> |
| babohCR176 | <i>Brucella abortus</i> |
| babohCR177 | <i>Brucella abortus</i> |
| babohCR179 | <i>Brucella abortus</i> |
| babohCR180 | <i>Brucella abortus</i> |
| babohCR181 | <i>Brucella abortus</i> |
| babohCR182 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR183 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR184 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR185 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR186 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR187 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR188 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR189 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR190 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR191 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR192 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR193 | <i>Brucella abortus</i> |

| | |
|------------|-------------------------|
| baboCR194 | <i>Brucella abortus</i> |
| babohCR178 | <i>Brucella abortus</i> |
| babohCR195 | <i>Brucella abortus</i> |
| babohCR196 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR198 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR199 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR200 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR201 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR202 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR203 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR204 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR205 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR206 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR207 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR211 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR212 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR213 | <i>Brucella abortus</i> |
| baboCR214 | <i>Brucella abortus</i> |
| bbatCR09 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR10 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR11 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR34 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR12 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR04 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR20 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR19 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR18 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR21 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR23 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR22 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR24 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR25 | <i>Brucella sp</i> |

| | |
|----------|--------------------|
| bbatCR28 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR26 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR15 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR06 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR27 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR14 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR02 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR07 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR05 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR08 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR35 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR03 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR31 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR29 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR30 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR13 | <i>Brucella sp</i> |

| | |
|----------|--------------------|
| bbatCR17 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR16 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR36 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR01 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR33 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR32 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR37 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR38 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR39 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR40 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR41 | <i>Brucella sp</i> |
| bbatCR42 | <i>Brucella sp</i> |

B. Resuelve Primero, Punto 5

Este permiso es válido en lo que refiere al acceso a la colección de microorganismos que se mantienen en condiciones ex situ en el Laboratorio Bacteriología, Laboratorio Bioquímica, Escuela de Medicina Veterinaria, UNA, que fueron obtenidos bajo los permisos R-028-2013-OT y las donaciones emitidas por el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) SENASA-LANASEVE-DV-MMV-011-2018 y SENASA-LANASEVE-MMV-073-2021.

SEGUNDO: En todo lo demás, aplíquese las indicaciones, señalamientos y apercibimientos legales indicados en la Resolución: R-CM-UNA-015-2021-OT, emitida por esta Oficina Técnica de la CONAGEBIO, a las 14:00 horas del 28 de octubre de 2021.

TERCERO: En el caso de disconformidad, contra esta resolución tienen lugar los recursos ordinarios de Revocatoria ante la Oficina Técnica y de Apelación ante la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad, dentro de los tres días hábiles siguientes a su notificación.

NOTIFÍQUESE.

**ANGELA
GONZALEZ
GRAU (FIRMA)**

Firmado digitalmente
por ANGELA GONZALEZ
GRAU (FIRMA)
Fecha: 2022.04.08
11:49:26 -06'00'

**MSc. Angela González Grau
Directora Ejecutiva
Oficina Técnica, CONAGEBIO**

R-CM-UNA-005-2022-OT-CONAGEBIO. San José, a las 12:00 horas del 7 de abril de 2022.

**GRETTEL
CESPEDES ARIAS
(FIRMA)**

Firmado digitalmente por
GRETTEL CESPEDES ARIAS
(FIRMA)
Fecha: 2022.04.08 09:55:08
-06'00'

Anexo 2.*Carta de donación de los aislamientos por parte del SENASA.*

Página 1 de 3

Heredia, 23 de noviembre de 2021
 SENASA-LANASEVE-MMV-73-21

Dra. Caterina Guzmán
 Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales
 Escuela de Medicina Veterinaria

Estimado Doctora,

Las cepas de *Brucella* spp. que se describen a continuación en el anexo 1, serán donadas a la colección del Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) y el Laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional para su utilización en proyectos de investigación básica y su uso no se encuentra restringido. Lo anterior debido al alto interés para el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) de la información generada con estas cepas tal y como lo indica el oficio SENASA-DG-AJ-0153-2015 (adjunto).

Cordialmente,

MARIA GABRIELA HERNANDEZ MORA (FIRMA) Firmado digitalmente por
MARIA GABRIELA HERNANDEZ MORA (FIRMA)
 Fecha: 2021.11.23 11:18:59
 -06'00'

María Gabriela Hernández Mora
 Jefatura- Área de Bacteriología
 LANASEVE-SENASA

Anexo 1. Cepas donadas del SENASA al PIET.

| Cepa | Especie animal | Origen |
|----------------------------|-------------------------|------------------------|
| 161 cerebro | <i>Demodus rotundus</i> | cerebro |
| 161 pulmón | <i>Demodus rotundus</i> | pulmón |
| 161 intestino | <i>Demodus rotundus</i> | intestino |
| 165 riñón | <i>Demodus rotundus</i> | riñón |
| 172 riñón | <i>Demodus rotundus</i> | riñón |
| 176 placenta | <i>Demodus rotundus</i> | Placenta |
| 182 pulmón | <i>Demodus rotundus</i> | pulmón |
| 182 hígado | <i>Demodus rotundus</i> | hígado |
| 182 hisopado general | <i>Demodus rotundus</i> | hisopado general |
| 182 intestino | <i>Demodus rotundus</i> | intestino |
| 183 cerebro | <i>Demodus rotundus</i> | cerebro |
| 183 hisopado general | <i>Demodus rotundus</i> | hisopado general |
| 186 cerebro | <i>Demodus rotundus</i> | cerebro |
| 186 pulmón | <i>Demodus rotundus</i> | pulmón |
| 186 hígado | <i>Demodus rotundus</i> | hígado |
| 186 intestino | <i>Demodus rotundus</i> | intestino |
| 186 hisopado general | <i>Demodus rotundus</i> | hisopado general |
| 187 glándula mamaria-leche | <i>Demodus rotundus</i> | Glándula mamaria-leche |
| 188 cerebro | <i>Demodus rotundus</i> | cerebro |
| 188 hisopado general | <i>Demodus rotundus</i> | hisopado general |
| 189 glándula salival | <i>Demodus rotundus</i> | Glandula salival |
| 190 útero | <i>Demodus rotundus</i> | útero |
| 190 momia | <i>Demodus rotundus</i> | momia |
| 190 glándula salival | <i>Demodus rotundus</i> | glándula salival |
| 190 líquido de la momia | <i>Demodus rotundus</i> | líquido de la momia |
| 190 placenta | <i>Demodus rotundus</i> | placenta |
| 191 hígado | <i>Demodus rotundus</i> | hígado |
| 191 intestino | <i>Demodus rotundus</i> | intestino |
| 191 hisopado general | <i>Demodus rotundus</i> | Hisopado general |
| 194 cerebro | <i>Demodus rotundus</i> | cerebro |
| 194 hígado | <i>Demodus rotundus</i> | hígado |
| 194 intestino | <i>Demodus rotundus</i> | intestino |
| 194 hisopado general | <i>Demodus rotundus</i> | hisopado general |
| 195 feto | <i>Demodus rotundus</i> | feto |
| 204 cerebro | <i>Demodus rotundus</i> | cerebro |
| 204 hisopado general | <i>Demodus rotundus</i> | hisopado general |
| 218 intestino | <i>Demodus rotundus</i> | intestino |
| 221 hígado | <i>Demodus rotundus</i> | hígado |
| 221 intestino | <i>Demodus rotundus</i> | intestino |
| 221 hisopado general | <i>Demodus rotundus</i> | hisopado general |
| 224 pulmón | <i>Demodus rotundus</i> | pulmón |
| 224 hígado | <i>Demodus rotundus</i> | hígado |



12 de mayo de 2015
SENASA-DG-AJ-0153-2015


Doctora
Gabriela Hernández Mora
Unidad de Parasitología Área de Bacteriología
LANASEVE - SENASA
Presente

Estimada Doctora:

En atención a su Oficio N°SENASA-LANASEVE-DV-MMV-005-15 del 14 de abril último, me permito señalarle que es dable acceder al traslado de cepas de Brucella que han sido aisladas en Costa Rica al PIET de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional la cual ha logrado la coordinación de un proyecto con el Laboratorio de Genómica de Patógenos Bacterianos del Instituto Sanger , para la secuenciación del genoma de la Brucella en distintos países del mundo para descubrir variaciones de dicho género así como su evolución en distintos hospederos.

Siendo lo anterior de alto interés para este Servicio Nacional, deberá disponer lo necesario a los efectos de que se realicen los reconocimientos a este Servicio Nacional y se garantice el acceso a la información que se obtenga.

De usted con toda consideración.


Lic. Antonio Vander Lucht Leal
Director Asesoría Jurídica
SENASA

