

Universidad Nacional

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela de Medicina Veterinaria

**Pasantía en la Unidad de Microbiología Médico
Veterinaria del Laboratorio Nacional de Servicios
Veterinarios del SENASA**

Modalidad: Pasantía

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

María José Villalobos Solís

Campus Pbro. Benjamín Núñez, Heredia

2023

TRIBUNAL EXAMINADOR

Laura Bouza Mora, MSc.

Vicedecana, Facultad Ciencias de la Salud _____

Enrique Cappella Molina, MSc.

Director Escuela de Medicina Veterinaria _____

Gabriela Hernández Mora, PhD.

Tutora _____

Julia Rodríguez Barahona, PhD.

Lectora _____

Elías Barquero Calvo, PhD.

Lector _____

Fecha: _____

DEDICATORIA

A mis papás, Hilda y Juan Carlos, por haberme apoyado incondicionalmente en este arduo camino universitario, por creer en mí cuando yo misma dejaba de hacerlo.

A mis dos hermanos, Alonso y Juan Carlos, por estar a mi lado en los momentos de dificultad y por ayudarme a cumplir mis sueños.

A mi abuela Antonia, por enseñarme de respeto y valentía a los animales.

A mis amigos, que fueron mi ancla en los momentos difíciles de la carrera y permanecieron a mi lado hasta el final.

A mis compañeros de apartamento, Darío y Ana, por haber crecido a mi lado y por todas las conversaciones de apoyo y empatía.

A mi perro Jackie, por haberme acompañado desde hace 18 años, y enseñarme de lealtad y de amor sincero.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional, y por haber caminado a mi lado durante todos estos años de carrera universitaria.

A mis compañeros de la universidad, que vivieron conmigo todos los retos universitarios y se convirtieron en mi segunda familia.

A mi comité asesor, mi tutora, la Dra. Gabriela Hernández por despertar mi pasión hacia el área de investigación y laboratorio, y por guiarme arduamente y con paciencia durante todo el proceso de aprendizaje. Y mis lectores, el Dr. Elías Barquero y la Dra. Julia Rodríguez, por sus recomendaciones y consejos para la realización de este trabajo. Un especial agradecimiento a la Dra. Julia Rodríguez por todo el apoyo brindado desde el primer año de carrera.

A todo el equipo de la Unidad de Microbiología Médico Veterinaria del LANASEVE, a Francinie, Adrián, Eunice, Juan, la Dra. Evans y el Dr. Osvaldo, por su paciencia y por estar siempre anuentes a ayudarme en lo que necesitara. Por todo el conocimiento y consejos que compartieron conmigo durante los meses de pasantía.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación.....	4
1.2.1. <i>Importancia</i>	4
1.3. Objetivos.....	6
1.3.1. <i>Objetivo general</i>	6
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	6
2. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
2.1. Área y materiales de trabajo.....	7
2.2. Horario de trabajo y periodo de tiempo destinado.....	8
2.3. Registro y análisis de datos recolectados.....	8

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
3.1.	Casuística del laboratorio durante los meses de enero a marzo.....	9
3.2.	Cultivos para <i>Brucella</i> spp. del banco de leches positivas por serología y muestras de tejidos de bovinos.....	16
3.3.	Inventario y reorganización de muestras de cetáceos.	23
3.3.1.	<i>Información recopilada de las muestras por individuo (ver anexo 2).</i>	24
3.3.2.	<i>Resultados de los ensayos inmunocromatográficos o pruebas rápidas.</i>	29
3.3.3.	<i>Resultados de los cultivos en medios selectivos de CITA y Farrell. ...</i>	31
4.	CONCLUSIONES.....	33
5.	RECOMENDACIONES	34
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	35
7.	ANEXOS.....	40
7.1.	Anexo 1: Cultivos para <i>Brucella</i> spp. del banco de leches positivas a serología y muestras de tejidos de bovinos.	40
7.2.	Anexo 2: Inventario del banco de cetáceos.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de la casuística de las muestras recibidas en la Unidad de MMV durante los meses de enero-marzo del 2023.....	09
Figura 2: Medio de aislamiento selectivo agar XLT4 para la detección de <i>Salmonella</i>	10
Figura 3: Prueba de MAT para <i>Leptospira</i> en un equino para serovariedad Javanica.....	12
Figura 4: Distribución de las muestras procesadas para la prueba de MAT según la especie.....	13
Figura 5: Cultivos de Tuberculosis incubados a 37 °C durante al menos tres meses y Tinción de Ziehl-Neelsen	14
Figura 6: Electroforesis capilar del producto de amplificación esperado para especies de <i>Mycobacterium bovis</i>	14
Figura 7: Distribución de las muestras procesadas para la prueba de cultivo, tinción y PCR convencional de Tuberculosis según la especie.....	15
Figura 8: Distribución de las muestras inventariadas de leches, sueros y otros (orinas y fluidos) ubicadas en el congelador a -30 °C; y las muestras de tejidos y órganos de bovinos del congelador a -80 °C.....	17
Figura 9: Resultados para los cultivos de <i>Brucella</i> spp. provenientes de ambas matrices (tejidos y leches).....	18
Figura 10: Cultivo bacteriano positivo para <i>Brucella</i> spp. en medio CITA después de 5 días de incubación a 37 °C en jarras de anaerobiosis.....	18

Figura 11: Comparación de los resultados positivos y negativos de las diferentes matrices (leches y tejidos) de bovinos.....	19
Figura 12: Caracterización de bioquímica básica para los cultivos bacterianos positivos a <i>Brucella</i> spp.....	20
Figura 13: Electroforesis capilar del producto de amplificación esperado para especies de <i>Brucella abortus</i>	21
Figura 14: Electroforesis capilar del producto de amplificación esperado para especies de <i>Brucella abortus</i>	23
Figura 15: Distribución de la cantidad de individuos por especie.....	24
Figura 16: Distribución anual del número de delfines desde el 2010 hasta el 2020.....	25
Figura 17: Distribución de los individuos procesados según el sexo.....	26
Figura 18: Clasificación de los principales órganos del banco de delfines.....	27
Figura 19: Distribución del grado de conservación de los tejidos.....	28
Figura 20: Test rápido del kit comercial “ <i>B. brucella</i> AB Test Kit”.....	29
Figura 21: Resultados de la prueba rápida o ensayos inmunocromatográficos para la especie <i>Stenella coeruleoalba</i>	31
Figura 22: Electroforesis capilar del producto de amplificación esperado para especie de <i>Brucella ceti</i>	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

CTS: Caldo Tripticasa Soya

DMSO: Dimetilsulfóxido

DV: Departamento Veterinario

ELISA: Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas

ELISAI: Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas Indirecto

LANASEVE: Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería

MAT: Prueba de Microaglutinación

MMV: Microbiología Médico Veterinaria

MPM: Marcador de Peso Molecular

NCTC: National Collection of Type Cultures

OMSA: Organización Mundial de Sanidad Animal (anteriormente llamado OIE)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PPD: Derivado Proteico Purificado

SENASA: Servicio Nacional de Salud Animal

RESUMEN

El presente trabajo de pasantía se realizó durante los meses de enero a marzo del 2023, en la Unidad de Microbiología Médico Veterinaria (MMV) del LANASEVE en el Campus Benjamín Núñez, Lagunilla, Ulloa, Heredia, para un total de 12 semanas. El objetivo principal fue fortalecer las habilidades en el laboratorio diagnóstico mediante el desarrollo de técnicas bacteriológicas y moleculares para bacterias zoonóticas.

Se procesaron un total de 450 muestras para las pruebas rutinarias del laboratorio, siendo la determinación de *Salmonella Gallinarum* y *S. Enteritidis* (193/450) la más común, seguida del diagnóstico de *Mycobacterium bovis* por Interferón Gamma (150/450).

Asimismo, durante la pasantía se colaboró con la reorganización y cultivo de muestras del banco de leches positivas anteriormente por serología para brucelosis, tejidos bovinos y especímenes del banco de cetáceos.

Del banco de leches y los tejidos bovinos de los años 2011 al 2016, se realizaron 275 cultivos para *Brucella* spp. en los medios CITA y Farrell. Estas mismas muestras habían sido cultivadas anteriormente en Agar Sangre y Agar *Brucella* utilizando el suplemento SR0209 de Oxoid, obteniendo resultados negativos en el 100% de los casos y con el cambio de medios de cultivo realizado durante el 2023 se obtuvo cultivos positivos en el 50% (6/12) de los tejidos y en el 4% (9/263) de las leches. Para los 15 cultivos positivos, se aplicó el PCR múltiple Bruce-ladder para confirmar *Brucella abortus*.

De los 51 cetáceos trabajados (2010 al 2020), se determinó que la especie predominante fue *Stenella coeruleoalba* en un 73% (37/51) y no hubo una diferencia significativa en cuanto al sexo de los individuos. A pesar de su antigüedad, los tejidos se encontraron en un nivel dos de descomposición en el 78% (40/51) de los casos. Se realizaron ensayos inmunocromatográficos usando un kit comercial para el diagnóstico de *Brucella* spp., obteniendo un 71% (36/51) de positividad en las pruebas, correspondiendo el 92% (33/36) de las mismas a la especie *Stenella coeruleoalba*. Se cultivaron muestras de 15 animales que anteriormente ya se habían cultivado, pero en este nuevo análisis en el 2023, sólo una muestra resultó nuevamente positiva, y se clasificó como *B. ceti* en Bruce-ladder.

En conclusión, la pasantía representó una oportunidad para el crecimiento profesional en el área de laboratorio diagnóstico al trabajar con diversos agentes que tienen un rol fundamental en la salud pública. Además de laborar con equipos y muestras que no habían sido abordados anteriormente durante la carrera.

Palabras clave: laboratorio diagnóstico, salud pública, bacterias zoonóticas.

ABSTRACT

This internship was conducted from January to March 2023 at the Veterinary Medical Microbiology Unit (MMV) of LANASEVE in Campus Benjamín Núñez, Lagunilla, Ulloa, Heredia, for a total of 12 weeks. The main objective was to improve skills in the diagnostic laboratory through the development of bacteriological and molecular techniques for zoonotic bacteria.

A total of 450 samples were processed for routine laboratory diagnostic tests, with the determination of *Salmonella Gallinarum* and *S. Enteritidis* being the most common (193/450), followed by the diagnosis of *Mycobacterium bovis* by Interferon Gamma (150/450).

Likewise, during the internship, was reorganized and culture samples from the bank of milks previously diagnosed as serologically positive for brucellosis, bovine tissues, and specimens from the cetacean bank.

From the milk bank and bovine tissues from 2011 to 2016, 275 were cultured for *Brucella* spp. in CITA and Farrell media. These same samples had previously been cultured on Blood Agar and Brucella Agar using Oxoid's SR0209 supplement, obtaining negative results in 100% of the cases. With the change of culture media carried out during 2023, positive cultures were obtained in 50% (6/12) of the cases of tissues and in 4% (9/263) of milks. For the 15 positive cultures, multiplex Bruce-ladder PCR was applied to confirm *Brucella abortus*.

Of the 51 cetaceans (from 2010 to 2020) worked, it was determined that the predominant species was *Stenella coeruleoalba* in 73% (37/51) and there was no significant difference regarding the sex of the individuals. Despite their age, the

degree of tissue decomposition was found at a level two in 78% (40/51) of cases. Immunochromatographic assays were performed using a commercial kit for the diagnosis of *Brucella* spp., obtaining 71% (36/51) positivity in the tests, 92% (33/36) of which corresponded to the species *Stenella coeruleoalba*. Samples from 15 previously cultured animals were reanalyzed, but only one sample was again positive in 2023, and it was classified as *B. ceti* on the Bruce-ladder.

In conclusion, the internship provided an opportunity for professional growth in the diagnostic laboratory area by working with various agents that play a fundamental role in public health. It also involved working with equipment and samples that had not been previously addressed during the degree.

Keywords: diagnostic laboratory, public health, zoonotic bacteria.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Antecedentes.

Cada día se reconoce aún más el rol fundamental del médico veterinario en el área de la Salud Pública; esta última consiste en actividades relacionadas con la salud y enfermedad de una población, el estado sanitario y ecológico del entorno de vida, la organización y funcionamiento de los servicios de salud y enfermedad, la planificación y gestión de los mismos, y la educación para la salud (Ortega et al. 2005).

Asimismo, el área de la Salud Pública Veterinaria es aquella dedicada a la aplicación del conocimiento aportado por las Ciencias Veterinarias a la protección de la salud humana mediante la sanidad, la producción y el bienestar animal, la biotecnología aplicada, la seguridad alimentaria, la protección medioambiental y la sostenibilidad (Briones et al. 2018).

La relación intrínseca que existe entre la salud pública y los animales se ve respaldada por el hecho de que un 60% de las enfermedades humanas infecciosas conocidas son de origen animal, al igual que un 75% de las enfermedades humanas emergentes (Taylor et al. 2001).

Según los datos anteriores, se visualiza que las interacciones diarias de humanos, animales y el medio ambiente tienen un impacto dramático en la salud pública. Algunos factores que aumentan estas amenazas incluyen el movimiento internacional de personas, animales y productos de origen animal; globalización; los cambios ambientales que afectan a las poblaciones de vida silvestre y sus interacciones; la seguridad nacional y mundial. Enfrentar estos desafíos de manera efectiva requiere fuertes vínculos entre los médicos, investigadores, laboratoristas y funcionarios de salud pública (King y Khabbaz 2003).

Esto ha llevado a que los profesionales médicos veterinarios en el área de laboratorio diagnóstico y salud pública, por ejemplo, tengan una gran responsabilidad reconociendo la presencia de enfermedades con un riesgo zoonótico significativo para la sociedad. Las enfermedades zoonóticas son infecciones que pasan de los animales a los seres humanos y los patógenos involucrados pueden ser bacterias, virus, parásitos o agentes no convencionales y propagarse a los humanos por contacto directo o indirecto en los alimentos, el agua o el medio ambiente (OMS 2020).

Igualmente, el trabajo de diagnóstico veterinario, también se aplica a enfermedades emergentes, reemergentes y enfermedades de declaración obligatoria. Las enfermedades emergentes designan una nueva aparición de una enfermedad en un animal que causa un importante impacto en la sanidad animal y la salud humana. Esto es consecutivo a una modificación de un agente patógeno conocido, a la propagación de este a una zona geográfica, o a una especie de la que antes estaba ausente. También se define como un agente patógeno no identificado anteriormente o una enfermedad diagnosticada por primera vez (OMSA 2022).

Las enfermedades reemergentes responden a un resurgimiento o incremento de la incidencia de enfermedades infecciosas que se consideraba que ya estaban controladas (OMSA 2022).

Del mismo modo, se designa enfermedad de declaración obligatoria a aquellas incluidas en una lista por la autoridad veterinaria y cuya presencia debe ser señalada a esta última en cuanto se detecta o se sospecha, de conformidad con la reglamentación nacional (MAG 2008). A nivel de Costa Rica el reporte se realiza al Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA).

En el país, el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE) del SENASA, según el artículo 13.2 del Reglamento de la Estructura Organizativa del Servicio Nacional de Salud Animal, N° 37917-MAG, se encarga de brindar el apoyo de laboratorio necesario para usuarios externos y para los órganos internos que ejecutan, analizan o evalúan acciones en salud animal y salud pública veterinaria. Se ofrece la constatación de calidad de medicamentos veterinarios, oficialización de laboratorios, determinación de inocuidad, residuos en alimentos y diagnóstico (MAG 2013).

Esta última acción es efectuada por el Departamento de Diagnóstico Veterinario, que dentro de su estructura se encuentra la Unidad de Microbiología Médico Veterinaria (MMV), sitio donde se llevó a cabo la pasantía, y que es la encargada de hacer el diagnóstico de diversas enfermedades bacterianas zoonóticas. Cabe mencionar, que también hay laboratorios oficializados que realizan dicha labor. Dentro de las funciones de la unidad de MMV se destaca el apoyo diagnóstico, clínico y epidemiológico de las diferentes enfermedades bacterianas que se encuentran bajo programas nacionales, de interés en el intercambio comercial o las que determine la Dirección mediante la utilización de diferentes pruebas inmunológicas, bacteriológicas y moleculares, bajo un enfoque de calidad (MAG 2013; SENASA 2020).

Las técnicas utilizadas para este fin incluyen pruebas de aglutinación, microaglutinación, pruebas flagelares, tinciones y pruebas bioquímicas convencionales, Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas Indirecto (ELISAI) y ELISA competitivo, cultivos bacterianos, Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y tiempo real. Además, en este laboratorio se realizan técnicas histológicas para muestras sospechosas de tuberculosis y necropsias de animales

provenientes de mortalidad inusuales y compatibles con cuadros bacterianos (SENASA 2020).

1.2. Justificación.

1.2.1. Importancia.

Actualmente, se comprende que las distintas perspectivas de las ciencias veterinarias no definen la esencia misma de la profesión, ya que esta responde a las necesidades y cambios constantes de la sociedad, por lo tanto, se encuentra diversificando constantemente sus áreas de estudio. Al presente, el área de laboratorio diagnóstico juega un rol fundamental en el ejercicio de ONE HEALTH o UNA SALUD, la cual viene a ser un cambio de paradigma para expandir las colaboraciones interdisciplinarias y las comunicaciones entre la salud animal, humana y ambiental (Monath et al. 2010; Vela 2012).

Las enfermedades zoonóticas pueden afectar tanto a los animales como a los humanos, por lo que las comunidades médica y veterinaria deben trabajar en estrecha colaboración en entornos clínicos, de salud pública y de investigación (Kahn 2006). En la salud pública, los sistemas de vigilancia de enfermedades humanas y animales son importantes para rastrear y controlar zoonosis y los patógenos transmitidos por los alimentos.

Del mismo modo, se recalca la relevancia de promover y alentar equipos de investigación de medicina comparativa de médicos humanos y veterinarios para que se estudien las interacciones agente-huésped zoonótico. Esto aumentaría la comprensión de cómo las zoonosis expanden su gama de huéspedes y, en última instancia, mejorarían las estrategias de prevención y control (Kahn 2006).

Igualmente, alrededor del mundo los servicios veterinarios nacionales deben contar cada vez con más tecnología y técnicas disponibles, por ejemplo,

moleculares, para abordar diversas necesidades de protección de la salud animal y seguridad alimentaria, ya que la vigilancia y el diagnóstico de enfermedades animales son necesarias para determinar la existencia o introducción de una enfermedad; y las pruebas de laboratorio son una parte crucial de estos programas de vigilancia. Es por esto, que los laboratorios de diagnóstico veterinario son considerados la columna vertebral de los programas de control de enfermedades administrados por los servicios veterinarios de un país; que a nivel de Costa Rica vendría siendo el SENASA en conjunto con el LANASEVE y sus diversos departamentos y unidades (Lazarus et al. 2011).

Por lo tanto, a nivel profesional, es fundamental integrar los diversos conocimientos adquiridos durante la carrera, y por esto la importancia de realizar la pasantía en un laboratorio oficial de servicios veterinarios para Costa Rica, que permita la aplicación de las técnicas estudiadas y el aprendizaje de nuevas pruebas laboratoriales, además de participar activamente del diagnóstico y control de enfermedades bacterianas zoonóticas de importancia para el país y reguladas por el SENASA. Igualmente, el acompañamiento de profesionales capacitados y el uso de equipo técnico de alta tecnología son un eje fundamental para el crecimiento profesional y la formación como médico veterinario. Finalmente, el integrarse de manera activa en el área de laboratorio y salud pública, también es un aprendizaje valioso para comprender el rol creciente del profesional de veterinaria englobado en el término de One Health.

1.3. Objetivos.

1.3.1. Objetivo general.

1.3.1.1. Fortalecer las destrezas en el área de laboratorio diagnóstico mediante la realización de una pasantía en la Unidad de Microbiología Médico Veterinaria del LANASEVE que permita mejorar los conocimientos adquiridos durante la carrera.

1.3.2. Objetivos específicos.

1.3.2.1. Perfeccionar las habilidades técnicas en la realización de ensayos de laboratorio mediante la ejecución de diversas técnicas bacteriológicas, histológicas y moleculares utilizadas para el diagnóstico de enfermedades bacterianas zoonóticas.

1.3.2.2. Fortalecer el conocimiento diagnóstico de agentes infecciosos mediante técnicas laboratoriales con la participación activa en las actividades rutinarias de la Unidad de Microbiología Médico Veterinaria.

1.3.2.3. Concientizar sobre la importancia de la participación de los médicos veterinarios en el diagnóstico microbiológico y su rol en la salud pública englobada en el término de One Health.

2. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área y materiales de trabajo.

El sitio de trabajo estuvo constituido por el laboratorio oficial de la Unidad de MMV del Departamento de Diagnóstico Veterinario del LANASEVE ubicado en Lagunilla, Ulloa, Heredia, el cual, según especificaciones del documento SEG-PE-001-RE-004, realiza la prueba de tamiz y prueba confirmatoria para Brucelosis, Microaglutinación para Leptospirosis y PCR convencional, el diagnóstico de Ántrax por tinción, cultivo y PCR; *Brucella* spp. por serología, cultivo y PCR convencional de cepas aisladas; *Campylobacter* por tinción, *Listeria* spp. por cultivo y PCR tiempo real; *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Gallinarum por cultivo, PCR convencional y tiempo real; Paratuberculosis por ELISAI; Fiebre Q por ELISAI; Tuberculosis por tinción, cultivo y PCR convencional de cepas aisladas y tiempo real de tejido; *Edwardsiella tarda*, *Francisella noatunensis*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae* por PCR tiempo real; *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio alginolyticus* por cultivo y PCR.

Adicionalmente, se llevó a cabo la reorganización y el cultivo de leches y tejidos bovinos provenientes de animales diagnosticados anteriormente como positivos para brucelosis por serología, así como el inventario de las muestras del banco de cetáceos encallados.

Los materiales de trabajo estuvieron compuestos por el equipo de laboratorio diagnóstico de la Unidad de MMV y los documentos oficiales respectivos de la Unidad (DV-MMV-PT-001, DV-MMV-PT-002, (DV-MMV-PT-004, DV-MMV-PT-006, DV-MMV-PT-007, DV-MMV-PT-009, DV-MMV-PT-011 DV-MMV-PT-012, DV-

MMV-PT-016, DV-MMV-PO-002), en los cuales se detallan el fundamento teórico de las pruebas, los materiales, reactivos y equipos necesarios, así como el debido procedimiento diagnóstico y la interpretación de los resultados.

2.2. Horario de trabajo y periodo de tiempo destinado.

El horario correspondió al itinerario de trabajo del laboratorio de la Unidad de MMV, que es de 7:30 a 15:30, de lunes a viernes (ocho horas diarias). Se empezó el día nueve de enero de 2023 y se finalizó el 31 de marzo de 2023, para un total de 480 horas (12 semanas).

2.3. Registro y análisis de datos recolectados.

El registro de los datos se llevó a cabo por medio de la bitácora en la cual se incluía la información de las muestras recibidas, sus respectivos ensayos y resultados obtenidos, no obstante, estos últimos no se describen por motivos de confidencialidad. Asimismo, los datos de las muestras que ingresaron y las actividades e inventarios realizados con el banco de cetáceos y el banco de leches se integraron a herramientas digitales como Word y Excel; y por medio de gráficos y estadística descriptiva cualitativa se reportaron los resultados en el informe final.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Casuística del laboratorio durante los meses de enero a marzo.

Con base en la casuística de la Unidad de MMV durante los tres meses de pasantía, se procesó un total de 450 muestras para las diferentes pruebas diagnósticas de rutina del laboratorio. En la figura 1 se puede visualizar la distribución de las mismas.

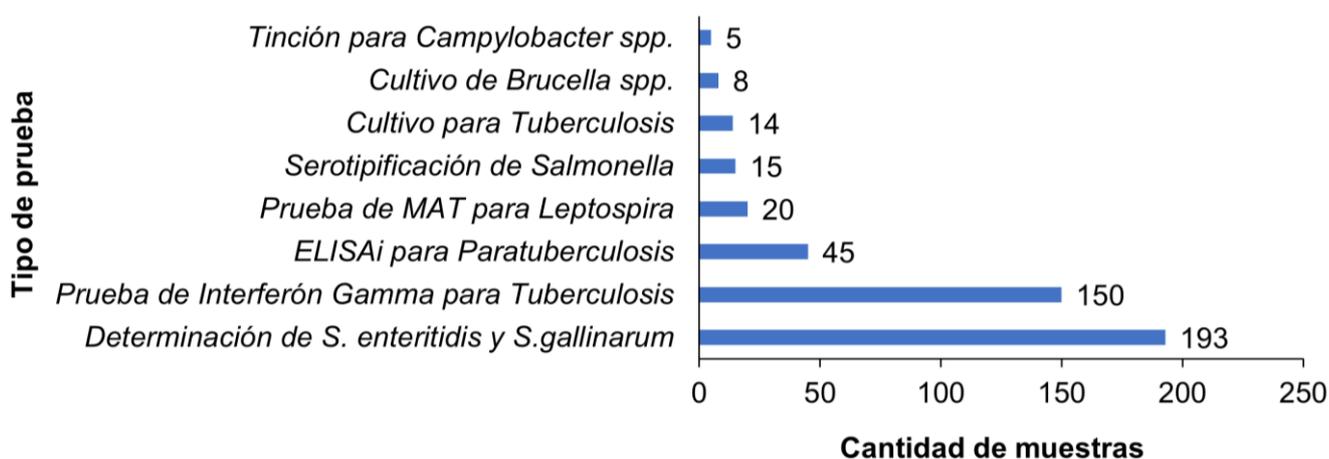


Figura 1.

Distribución de la casuística de las muestras recibidas en la Unidad de MMV durante los meses de enero-marzo del 2023.

Un 43% (193/450) correspondió a la determinación de *Salmonella* Gallinarum y *S. Enteritidis*. Según el SENASA (2021), el diagnóstico de la vigilancia activa de estos agentes se realiza mediante las técnicas de cultivo bacteriano, serotipificación y biología molecular a partir de muestras de las plantas de incubación, muestras de las granjas avícolas y muestras de aves de un día de edad y de huevo fértil importados remitidas al LANASEVE. El procedimiento diagnóstico de cultivo y serotipificación se detallan en los protocolos del SENASA (2016): DV-MMV-PT- 004 y DV-MMV-PT-005, que, asimismo, se fundamentan en las técnicas

diagnósticas que plantea la OMSA (2021) y USDA de pre-enriquecimiento, enriquecimiento, medios selectivos con agar en placa (Figura 2) y posterior confirmación con pruebas serológicas y bioquímicas.



Figura 2.

Medio de aislamiento selectivo agar XLT4 para la detección de Salmonella.

Fuente: propia. A. Cultivo bacteriano con un crecimiento negativo. **B.** *Salmonella* Abaetetuba H₂S positiva como control positivo. Colonias redondas color negro.

Por otra parte, un 3% (15/450) de las muestras de *Salmonella*, procedentes del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la UNA, se procesaron para su debida serotipificación y pruebas bioquímicas respectivas.

En la mayoría de las pruebas para determinación de *Salmonella*, no se participó activamente de la totalidad del procedimiento de manera continua; sin embargo, sí se realizó cada uno de los pasos descritos por la OMSA de manera intermitente durante los meses de la pasantía.

En orden decreciente, un 33% de las muestras (150/450) correspondió al diagnóstico de Tuberculosis en rumiantes (bovinos) por medio del Ensayo de

liberación de Interferón Gamma, siguiendo las directrices del Protocolo Técnico DV-MMV-PT-007, que describe la sensibilización de los linfocitos con antígenos específicos (un derivado proteico purificado (PPD) de *Mycobacterium bovis*) durante un período de incubación de 16 a 24 horas. Esta prueba, por su capacidad de detectar infecciones tempranas, y en conjunto con las pruebas cutáneas en paralelo, permite la detección de un mayor número de animales infectados tempranamente evitando ser fuente de infección para otros animales, así como en una fuente de contaminación del medio ambiente (Gormley et al. 2006; SENASA 2022).

Posteriormente, un 10% de las muestras (45/450) perteneció al diagnóstico de Paratuberculosis o enfermedad de Johne por medio de ELISAI. Según la OMSA (2021), su procedimiento diagnóstico se divide en dos partes: el diagnóstico de la enfermedad clínica y la detección de la infección subclínica mediante pruebas serológicas de anticuerpos específicos, como la técnica de enzimoimmunoanálisis descrita en el protocolo DV-MMV-PT-009 (SENASA 2020). Para esta prueba, solamente una muestra (2%) del total provenía de búfalos y el otro 98% a bovinos.

Continuando con la casuística obtenida, un 5% (20/450) correspondió a la prueba de oro por serología para el diagnóstico de Leptospirosis, la Prueba de Microaglutinación (MAT) (Figura 3).

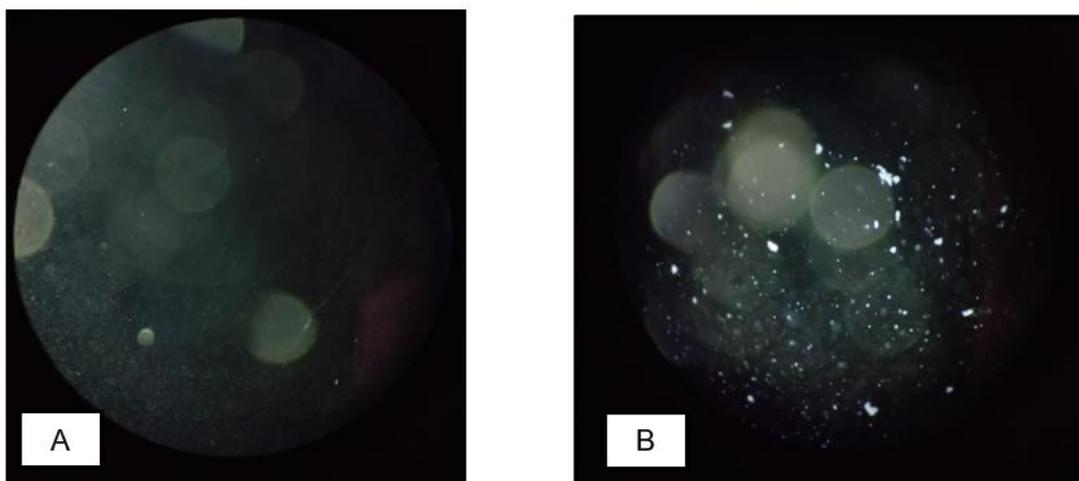


Figura 3.

Prueba de MAT para Leptospira en un equino. Fuente: propia. A. Control negativo. *B.* Suero reactivo positivo. Se observa la microaglutinación en una dilución de 1/200 para serovariedad Javanica.

La prueba de MAT se describe ampliamente en el protocolo DV-MMV-PT-001, y se especifican las cepas que son utilizadas por el Laboratorio de Bacteriología del SENASA, obtenidas previamente del Laboratorio de Bacteriología del INCIENSA. Estos antígenos utilizados en SENASA son los más frecuentes reportados en humanos en Costa Rica. Lo anterior se basa en que, para obtenerse una sensibilidad óptima de la prueba, deben emplearse antígenos representativos de todos los serogrupos conocidos que existen en la región en la que se han encontrado los animales (Picardeau 2013; SENASA 2020; OMSA 2021).

De estas pruebas, un 50% (10/20) perteneció a equinos, un 30% (6/20) a caninos y un 20% (4/20) a bovinos (Figura 4).

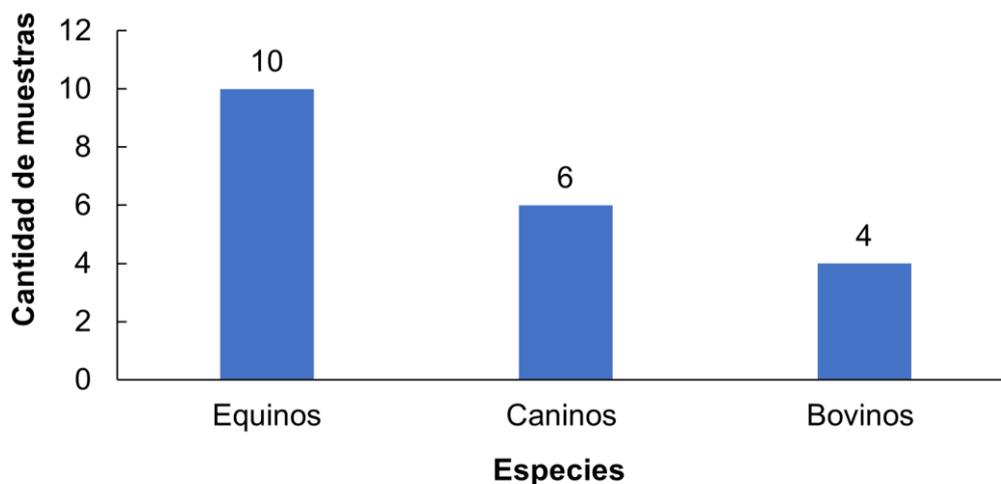


Figura 4.

Distribución de las muestras procesadas para la prueba de MAT según la especie.

De manera descendiente en la casuística, se recibió un 3% (14/450 muestras) para cultivo, tinción y PCR convencional de cepas aisladas para Tuberculosis. El procedimiento de cultivo y tinción se detallan en el protocolo DV-MMV-PT-012 y el PCR convencional en el protocolo DV-MMV-PT-016 (SENASA 2020; SENASA 2023).

Según la OMSA (2021), las pruebas de confirmación para Tuberculosis son el aislamiento de micobacterias en medios de cultivo selectivos (como el medio StoneBrink y 7H11P) y su posterior identificación mediante cultivos y pruebas bioquímicas o técnicas de ADN (Figuras 5 y 6).

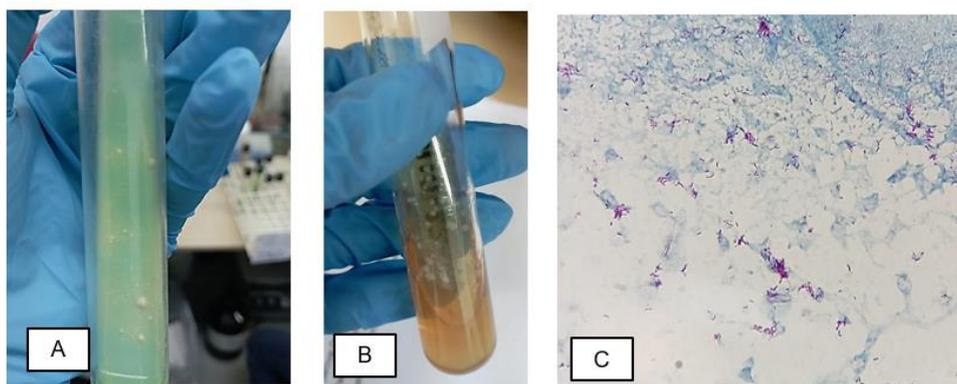


Figura 5.

Cultivos de tuberculosis incubados a 37 °C durante al menos tres meses y Tinción de Ziehl-Neelsen. Fuente: propia. A. Crecimiento positivo para *Mycobacterium* spp. en el medio de StoneBrink con presencia de colonias cremosas y color amarillo claro. **B.** Crecimiento positivo para *Mycobacterium* spp. en el medio 7H11P con presencia de colonias rugosas y blanquecinas de la misma muestra descrita en A. **C.** Tinción de Ziehl-Neelsen para *Mycobacterium bovis* a partir de colonias aisladas de un medio selectivo.

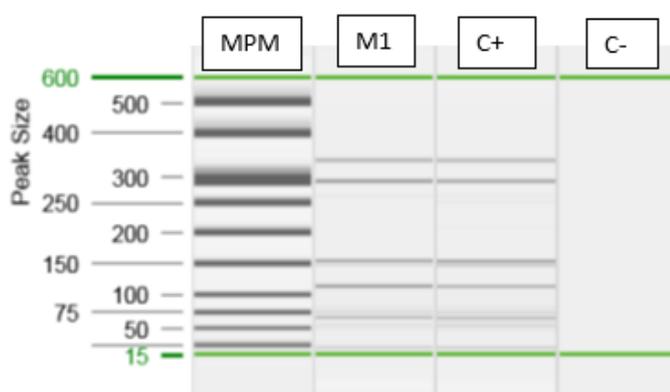


Figura 6.

*Electroforesis capilar del producto de amplificación esperado para especies de *Mycobacterium bovis*. Fuente: propia. MPM:* Marcador de peso molecular. **M1:** Muestra positiva para *Mycobacterium bovis* proveniente de una cosecha de

micobacterias en medio sólido StoneBrink. **C+**: Control positivo de *M. bovis* NCTC 10772. **C-**: Control negativo (agua de grado molecular).

Con respecto a la especie, las muestras de Tuberculosis para cultivo, tinción y PCR convencional correspondió en un 57% (8/14) a la especie bovina, un 29% (4/14 muestras) a especies exóticas (tortugas marinas) y un 14% (2/14 muestras) a ovinos (Figura 7).

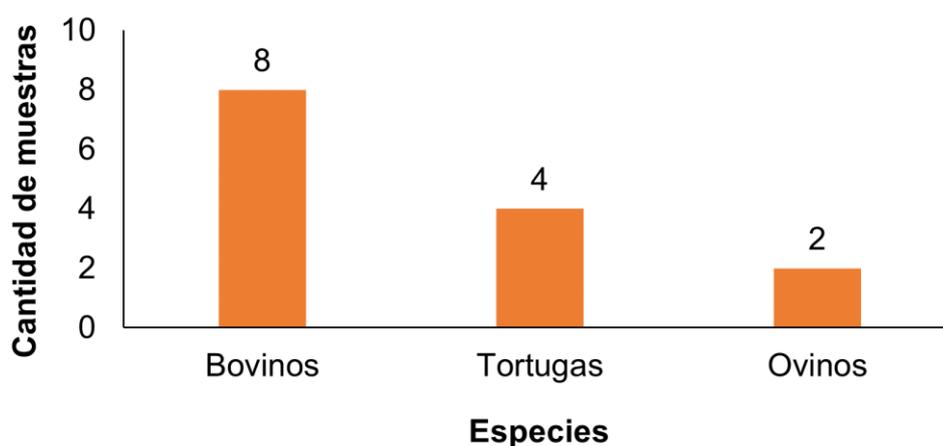


Figura 7.

Distribución de las muestras procesadas para la prueba de cultivo, tinción y PCR convencional de Tuberculosis según la especie.

Finalmente, en menor grado en la casuística observada, se encontró el cultivo de *Brucella* spp. con un 2% (8/450) y la Tinción para *Campylobacter* spp. con un 1% (5/450). Ambos procedimientos diagnósticos se describen en los documentos oficiales: DM-MMV-PT-002 y DM-MMV-PT-011, respectivamente (SENASA 2020; SENASA 2021)

Es importante mencionar que en los datos de casuística mencionados no se encuentran incluidos los resultados para la prueba de Rosa de Bengala como prueba tamiz y el ELISAI como prueba confirmatoria para *Brucella* spp., ya que no

se intervino en las mismas. Tampoco están incluidas las pruebas que no ingresaron al laboratorio durante los meses de pasantía (ej. diagnóstico de Fiebre Q, Listeria y/o Ántrax).

3.2. Cultivos para *Brucella* spp. del banco de leches positivas por serología y muestras de tejidos de bovinos.

Del mismo modo, dentro de las labores realizadas durante los meses de enero a marzo, estuvo la elaboración de un inventario para las muestras almacenadas en el banco de leches positivas a *Brucella* spp. por serología, así como su respectivo cultivo en medios selectivos de CITA y Farrell, y la reorganización de las mismas en contramuestras en viales libres de ADNAsas y ARNAsas para estudios moleculares posteriores. Igualmente, también se cultivaron en medios selectivos para *Brucella* spp. muestras provenientes de tejidos y órganos de bovinos (Anexo 1).

Se utiliza una combinación de los medios selectivos CITA y Medio Farrell (MF), ya que se ha visto que la máxima sensibilidad y especificidad diagnóstica se logra empleando de forma simultánea ambos medios. El medio CITA es más sensible que MF y es el medio selectivo de elección, ya que este último a pesar de inhibir la mayoría de los microorganismos contaminantes, algunas veces también inhibe el crecimiento de *Brucella ovis* y algunas cepas de *B. melitensis* y *B. abortus* (De Miguel 2011; OMSA 2021). Esta técnica realizada en el LANASEVE con ambos medios se encuentra acreditada por el Ente Costarricense de Acreditación (ECA) desde 2020.

Con respecto al inventario (Figura 8), se registró un total de 677 muestras, un 76% de las mismas (516/677) correspondió al banco de leches, y en menor

medida, el 18% (121/677) a sueros y el 4% (28/677) a orinas u otros fluidos. El 2% (12/677) estuvo determinado por las muestras de tejidos y órganos pertenecientes a bovinos almacenadas en el congelador a -80°C .

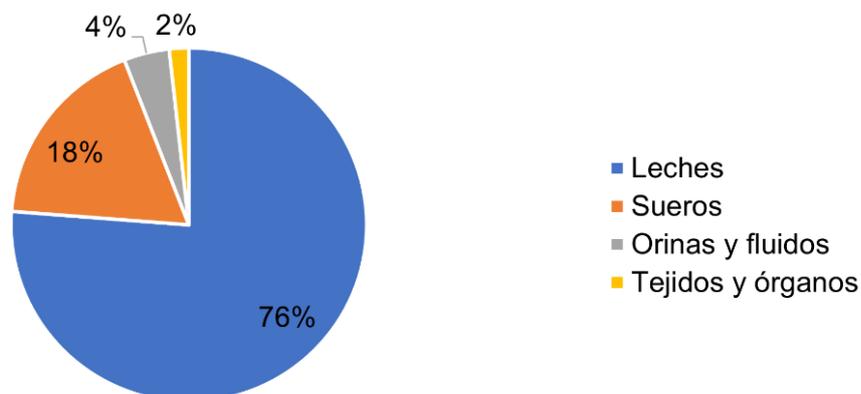
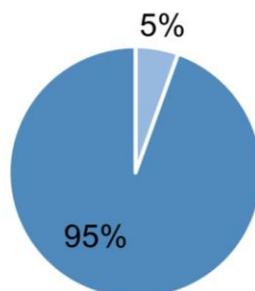


Figura 8.

Distribución de las muestras inventariadas de leches, sueros y otros (orinas y fluidos) ubicadas en el congelador a -30°C ; y las muestras de tejidos y órganos de bovinos del congelador a -80°C .

De las muestras de leche registradas, el 51% (263/516) se sometió a cultivo en medios selectivos de CITA y Farrell, ya que el resto de las muestras ya contaban con las pruebas de cultivo para *Brucella* spp. Además, se cultivaron las 12 muestras de tejidos y órganos, lo que dio como resultado un total de 275 cultivos de *Brucella* spp. realizados durante el transcurso de la pasantía.

Por lo que se refiere a los resultados de los cultivos bacterianos, solo el 5% (15/275) dio positivo para *Brucella* spp., como se muestra en la Figura 9.



■ Cultivos positivos de las leches y los tejidos ■ Cultivos negativos

Figura 9.

Resultados para los cultivos de Brucella spp. provenientes de ambas matrices (tejidos y leches).

En el 95% (260/275) restante de los casos, no hubo crecimiento o se observó un crecimiento morfológicamente incompatible, que no coincidía con las características esperadas de *Brucella* spp. (Figura 10).

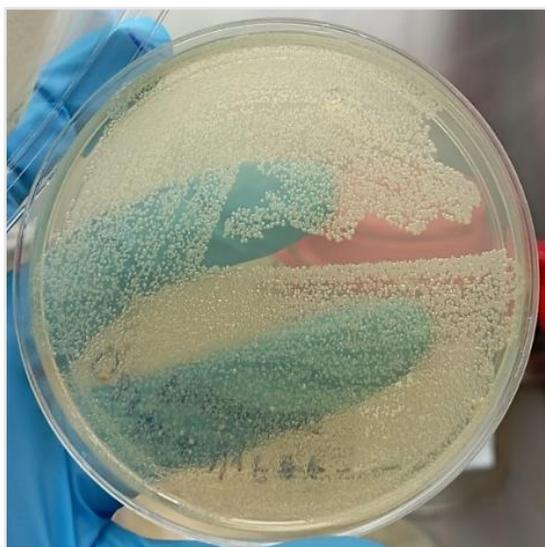


Figura 10.

Cultivo bacteriano positivo para Brucella spp. en medio CITA después de 5 días de incubación a 37 °C en jarras de anaerobiosis. Morfología de colonias redondas y traslucidas color miel pálido. Muestra de placentoma bovino recolectado en 2011 y cultivado, nuevamente, durante el 2023. Fuente: propia.

Los resultados podrían estar determinados por la longevidad de las muestras, que en el caso de las leches fueron recolectadas entre los años 2014 y 2016, y los tejidos correspondían al año 2011. Sin embargo, resulta interesante que de estas muestras congeladas a -30°C desde hace siete y hasta 13 años todavía se puedan seguir obteniendo cultivos positivos de *Brucella* spp lo que evidencia la gran carga bacteriana de estas muestras, la estabilidad del patógeno y de los equipos de congelación durante estos años, ya que se ha evitado ciclos de congelamiento y descongelamiento de estos, y la gran sensibilidad de los medios de cultivo CITA y Farrell.

No obstante, la Figura 11 proporciona una perspectiva diferente de los hallazgos.

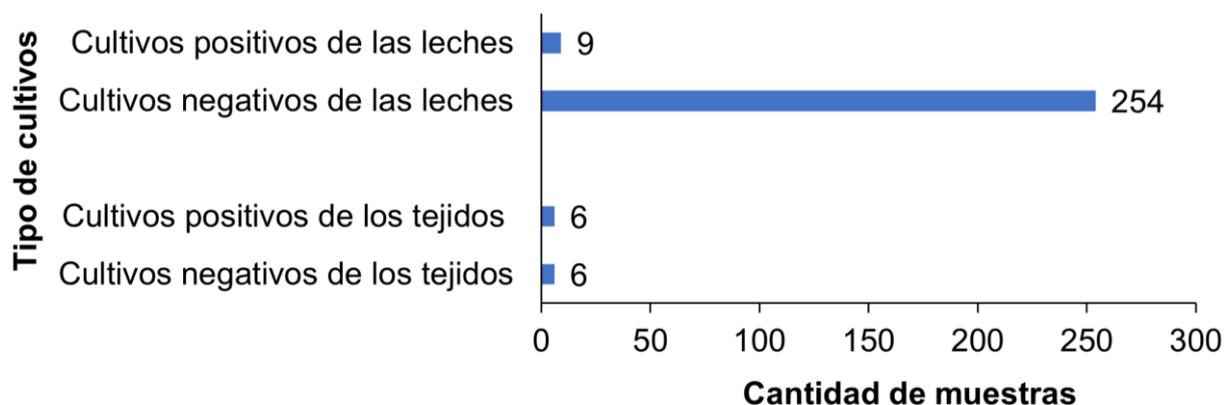


Figura 11.

Comparación de los resultados positivos y negativos de las diferentes matrices (leches y tejidos) de bovinos.

A pesar de que las muestras de tejido (incluyendo placentomas, ovarios, útero y/o líquido amniótico) fueron recolectadas de bovinos en el año 2011, se observaron cultivos positivos en el 50% (6/12) de estas muestras. Esto contrasta marcadamente con las muestras de leche, de las cuales solo el 4% (9/263) dio

positivo, a pesar de que la mayoría de estas eran relativamente más recientes (del año 2014 al 2016). Esta discrepancia resalta la importancia de considerar el tipo específico de muestra al interpretar los resultados del cultivo bacteriano. Ya que, según la OMSA (2021) el número de microorganismos de *Brucella* en la leche, el calostro y en algunas muestras tisulares puede ser menor que en materiales de aborto.

De acuerdo con el protocolo DV-MMV-PT-002 del SENASA (2021), a los cultivos bacterianos positivos y puros obtenidos de las placas de medio CITA y Farrell se les realizó la caracterización morfológica y bioquímica después de una incubación de cinco a 15 días. Los 15 cultivos que dieron positivos fueron sometidos a la prueba de oxidasa y a la prueba de urea, que dieron positivas en todos los casos (Figura 12), resultados compatibles con *Brucella* spp.

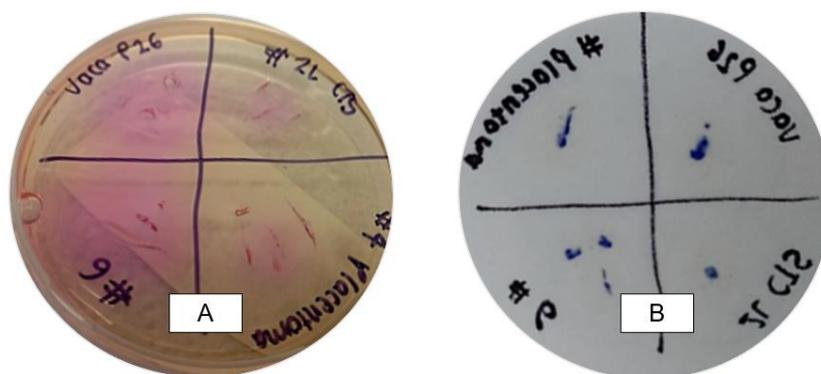


Figura 12.

Caracterización de bioquímica básica para los cultivos bacterianos positivos a *Brucella* spp. Fuente: propia. **A.** Prueba de urea positiva para cuatro muestras diferentes. Las cepas positivas a la ureasa hacen que el medio urea cambie de color naranja a rosa púrpura. **B.** Prueba de oxidasa positiva para cuatro muestras

distintas. La reacción positiva a la oxidasa es inmediata y se observa un cambio de color a azul oscuro.

Finalmente, como paso adicional se realizó la identificación de las cepas aisladas mediante el PCR múltiple o Bruce-ladder descrito en el protocolo DV-MMV-PT-006 (SENASA 2023). El PCR Bruce-ladder es una técnica de biología molecular que consiste en una variación del PCR convencional; una de las principales ventajas de esta técnica sobre las pruebas de PCR multiplex descritas anteriormente, es que puede identificar y diferenciar todas las especies de *Brucella* y las cepas vacunales en la misma prueba; por ejemplo, puede detectar ADN de *B. canis*, *B. neotomae*, aislamientos de *Brucella* de mamíferos marinos, *B. abortus* biovariedades 3, 5, 6, 7 y 9 y *B. suis*, biovares 2, 3, 4 y 5. Adicionalmente, tiene otras ventajas como la velocidad de la técnica y la preparación mínima de la muestra (López-Goñi et al. 2008).

De los 15 cultivos bacterianos positivos, a todos se les realizó el PCR Bruce-ladder, obteniéndose como resultado la identificación de *Brucella abortus* en cada una de las muestras (Figura 13 y 14).

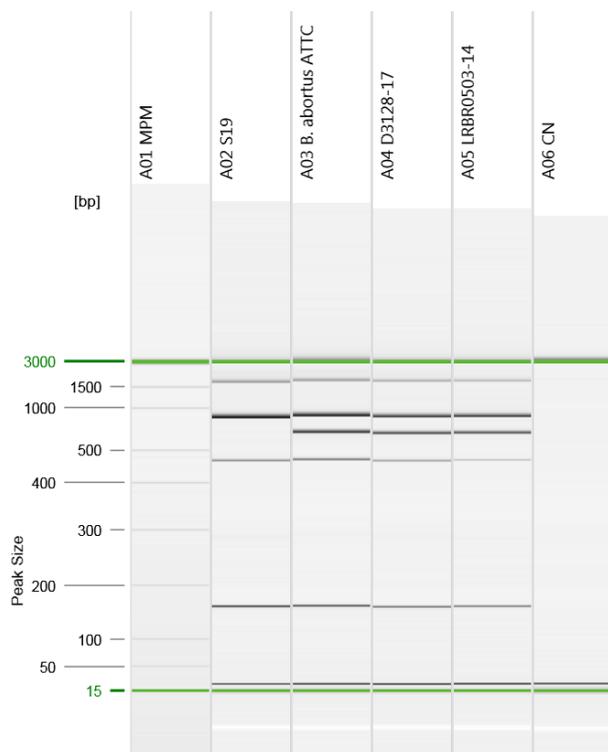


Figura 13.

Electroforesis capilar del producto de amplificación esperado para especies de Brucella abortus. Fuente: propia. A01: Marcador de peso molecular. **A02:** Control positivo de *Brucella abortus* S19 (cepa vacunal, NCTC 8038). **A03:** Control positivo de *Brucella abortus* Bv6 (NCTC 10505). **A04:** Muestra del banco de leches D3128-14 positiva para *Brucella abortus* **A05:** Muestra del banco de leches LRBR0503-14 positiva para *Brucella abortus* **A06:** Control negativo (agua de grado molecular).

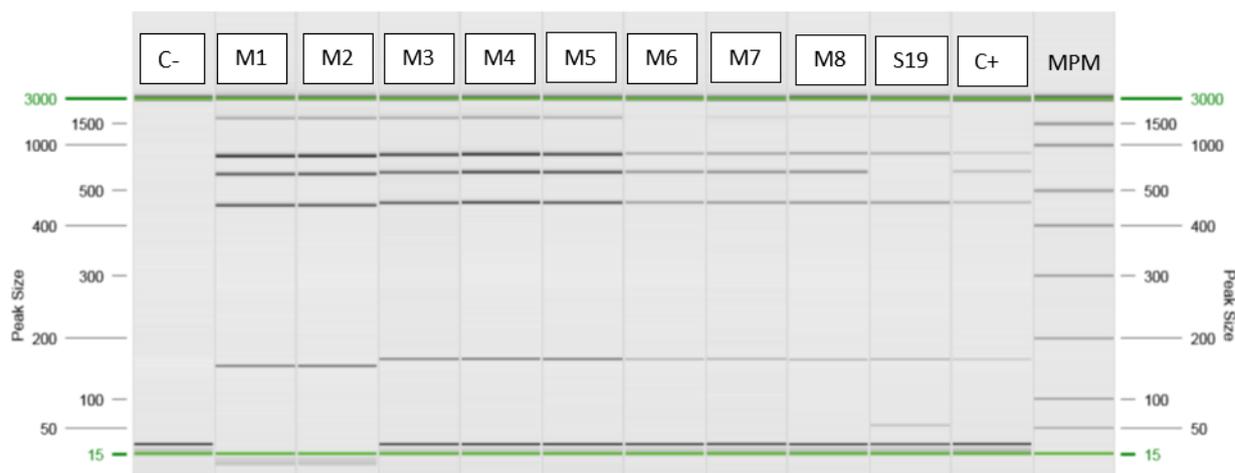


Figura 14.

*Electroforesis capilar del producto de amplificación esperado para especies de *Brucella abortus*. Fuente: propia. C-:* Control negativo (agua de grado molecular). **M:** muestras positivas para *Brucella abortus* **M1:** Muestra del banco de leches D0532-15 (#2) **M2:** Muestra del banco de leches D0532-15 (#4). **M3:** Muestra del banco de leches D0532-15 (#5) **M4:** Muestra de tejidos D0610-12 (placentoma bovino) **M5:** Muestra de tejidos D3349-11 #4 (placentoma bovino). **M6:** Muestra de tejidos D3349-11 #6 (ovarios y útero bovino). **M7:** Muestra de tejidos D3349-11 #9 (líquido amniótico). **M8:** Muestra de tejidos D3349-11 #11 (líquido amniótico). **S19:** Control positivo de *Brucella abortus* S19 (cepa vacunal, NCTC 8038). **C+:** Control positivo de *Brucella abortus* Bv6 (NCTC 10505). **MPM:** Marcador de peso molecular.

3.3. Inventario y reorganización de muestras de cetáceos.

Adicionalmente, una parte de las tareas estuvo dirigida a la reorganización de muestras de órganos y tejidos de cetáceos, de los cuales se llevó a cabo un inventario exhaustivo de los materiales presentes por individuo. Asimismo, se realizó la disección de la totalidad de los órganos en varios segmentos de medio

centímetro para el almacenaje de contramuestras en tubos libre de ADNAsas y ARNAsas. Del líquido cerebral y/o sangre entera se realizaron ensayos inmunocromatográficos mediante un kit comercial para detectar la presencia de anticuerpos contra *Bruceas* lisas. Además, las muestras de cetáceos que no se habían cultivado previamente para detectar *Brucella* spp. en medios selectivos de CITA y Farrel, se realizaron de acuerdo con los procedimientos establecidos. Finalmente, se extrajeron contramuestras de los tejidos cerebrales para estudios de hibridación, y de tejidos epiteliales o blubber para futuros estudios de toxicología.

3.3.1. Información recopilada de las muestras por individuo (Anexo 2).

Con relación a la cantidad de cetáceos registrados, el total fue de 51 individuos. La distribución de especies (Figura 15) estuvo dada en su mayor parte por *Stenella coeruleoalba* (delfín rayado) en un 73% (37/51).

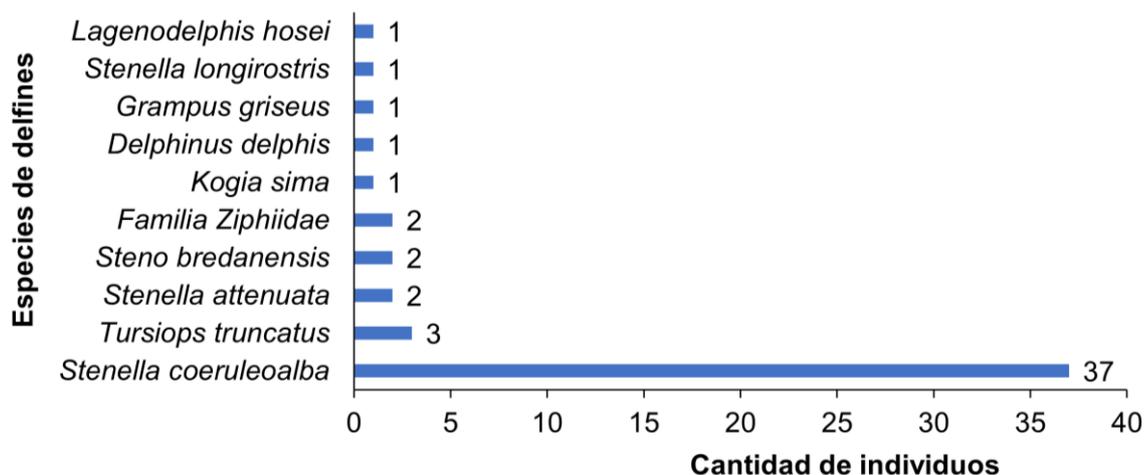


Figura 15.

Distribución de la cantidad de individuos por especie.

De igual forma, la fecha de los individuos analizados se registró entre los años 2010 y 2020. Sin embargo, por limitaciones de tiempo, no fue factible reorganizar los ejemplares de los últimos años, y tampoco se tienen los datos del año 2019. Asimismo, es importante señalar que los datos presentados en este documento solo se refieren a los especímenes con los que se trabajó durante la pasantía y no reflejan los registros oficiales que mantiene la Unidad de MMV con respecto al número total de encallamientos de delfines por año. La mayor parte de individuos estuvo registrada en el año 2011 y 2014 (Figura 16).

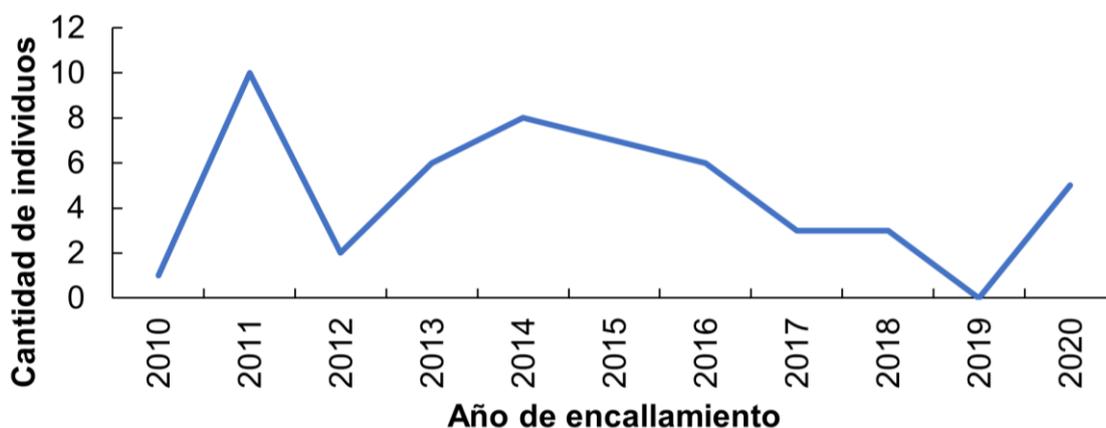


Figura 16.

Distribución anual del número de delfines desde el 2010 hasta el 2020.

Asimismo, con respecto al sexo de los delfines, la Figura 17 ilustra que no hubo una diferencia marcada entre el número de machos ($n=29$) y hembras ($n=22$). Al menos en la brucelosis de odontocetos, que es el agente responsable del encallamiento en la mayoría de dichos especímenes, las diferencias de género o edad no parecen ser relevantes, como se ha reportado anteriormente (Hernández-Mora et al. 2009).

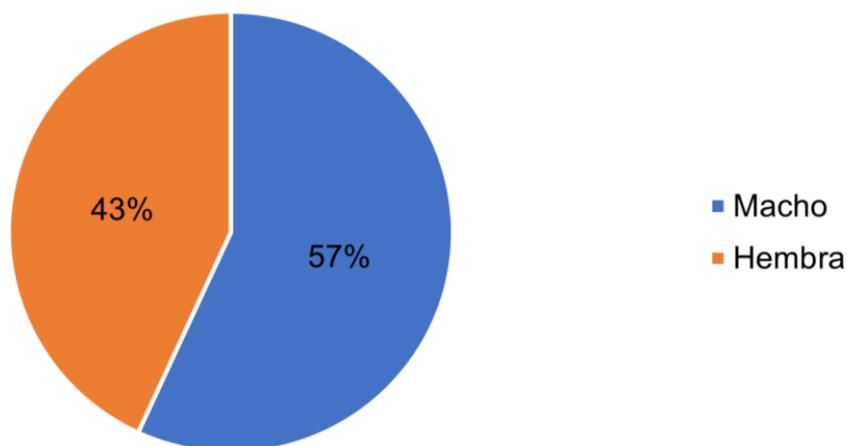


Figura 17.

Distribución de los individuos procesados según el sexo.

Las muestras de los especímenes comprendían segmentos de varios órganos o tejidos del organismo del delfín. Ocasionalmente, también se disponía de órganos completos. Cada muestra fue debidamente empaquetada y etiquetada con la información necesaria del individuo, y de cada tejido se extrajeron de una a tres réplicas de medio centímetro para almacenar en viales libres de DNAsas y ARNAsas. En total, se procesaron aproximadamente 1500 órganos y/o tejidos, y se produjeron y clasificaron 2000 contramuestras. La Figura 18 muestra la clasificación y cantidad de los órganos más relevantes, excluyendo aquellos que estaban repetidos o eran demasiado específicos para ser incluidos.

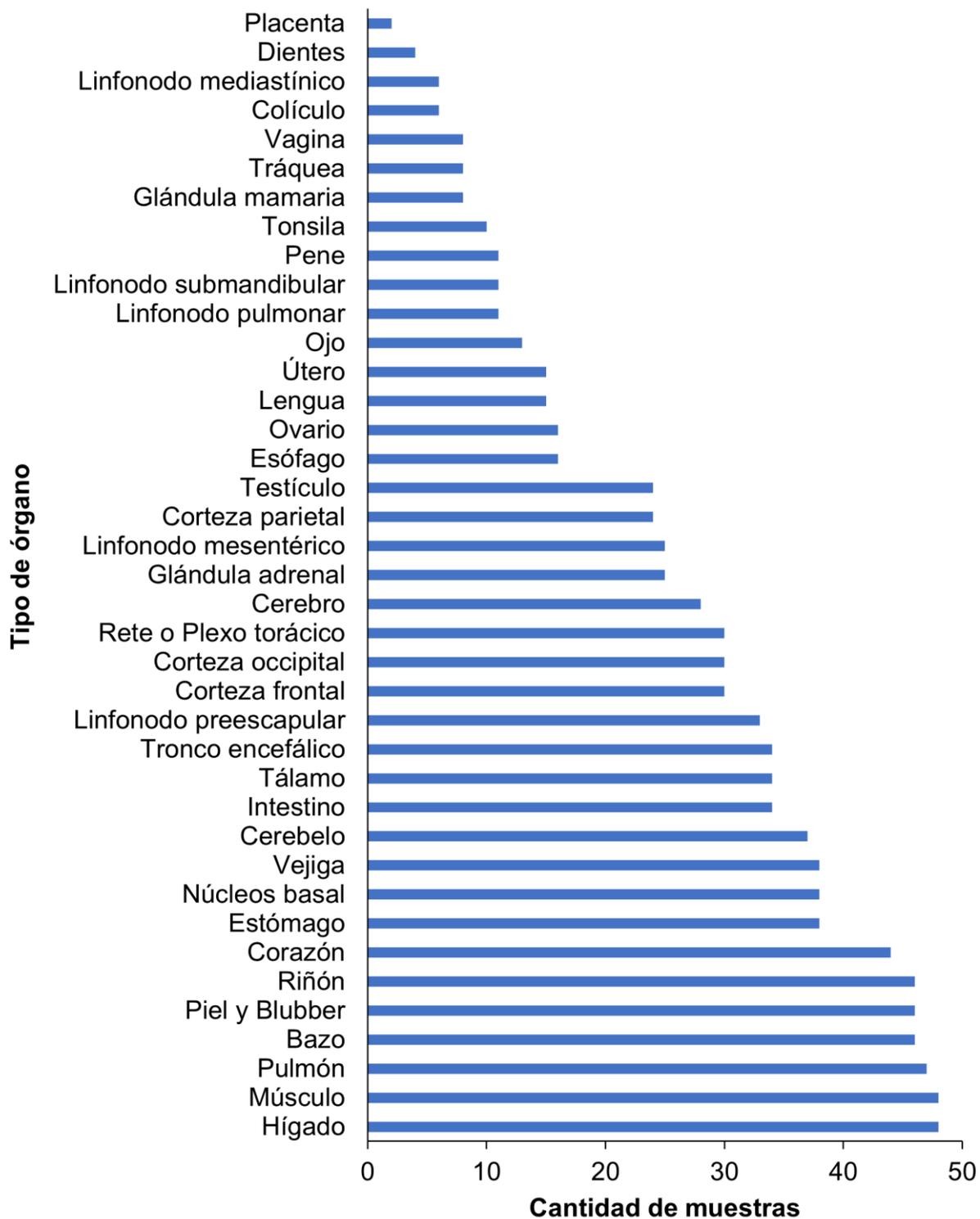


Figura 18.

Clasificación de los principales órganos del banco de delfines.

Asimismo, los tejidos se clasifican en una escala del uno al cinco, donde uno denota un tejido de un animal vivo y cinco denota uno altamente descompuesto. De los tejidos analizados, se encontró que el 78% (40/51) fue grado dos, el 18% (9/51) grado tres y solo el 4% (2/51) grado cuatro, como se detalla en la Figura 19.

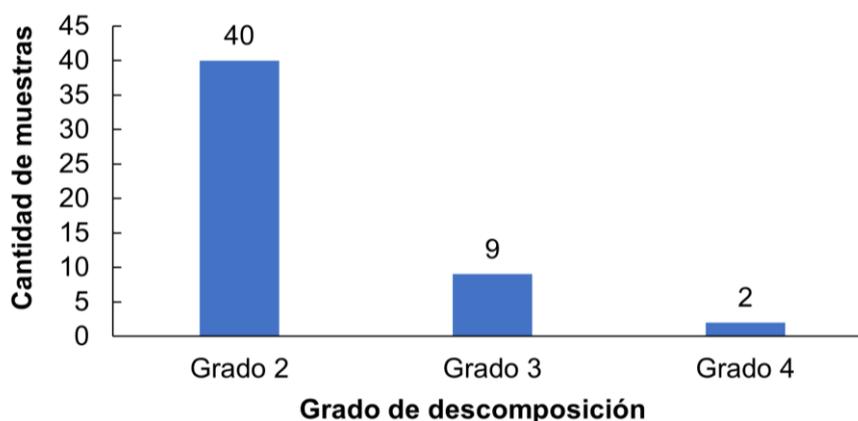


Figura 19.

Distribución del grado de conservación de los tejidos.

Esto demuestra que la congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o criopreservación favorece la adecuada conservación de los tejidos. En efecto, los objetivos de este aspecto aplicado de la criobiología, es frenar los procesos de envejecimiento y degeneración celular, procurando minimizar el daño de las bajas temperaturas a los materiales biológicos, incluyendo células de mamíferos, bacterias, hongos y virus (Gil-Loyzaga 2011).

Finalmente, en conjunto a la información recopilada se encuentra la cantidad de contramuestras extraídas y reorganizadas para estudios de hibridación *in situ* para la identificación de secuencias de nucleótidos específicas de bacterias como *Brucella ceti* en células o secciones de tejido (McNicol y Farquharson 1997).

Se logró separar un total de 192 muestras diferentes, que incluyen secciones de cerebro, corteza frontal, corteza parietal, corteza occipital, cerebelo, tálamo, tronco y/o núcleos basales de los diferentes individuos. Asimismo, para los estudios posteriores en toxicología, se logró aislar un total de 97 muestras de piel y blubber, principalmente.

3.3.2. Resultados de los ensayos inmunocromatográficos o pruebas rápidas.

Para realizar los ensayos inmunocromatográficos se utilizó el kit comercial de BIONOTE “B.Brucella AB Test Kit” (Figura 20), que está diseñado para el diagnóstico de *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*. Sin embargo, no se encontró literatura previa en la que se utilice esta prueba en delfines para la detección de *Brucella ceti*. A pesar de esto, se observaron resultados confiables para el diagnóstico de dichas especies.

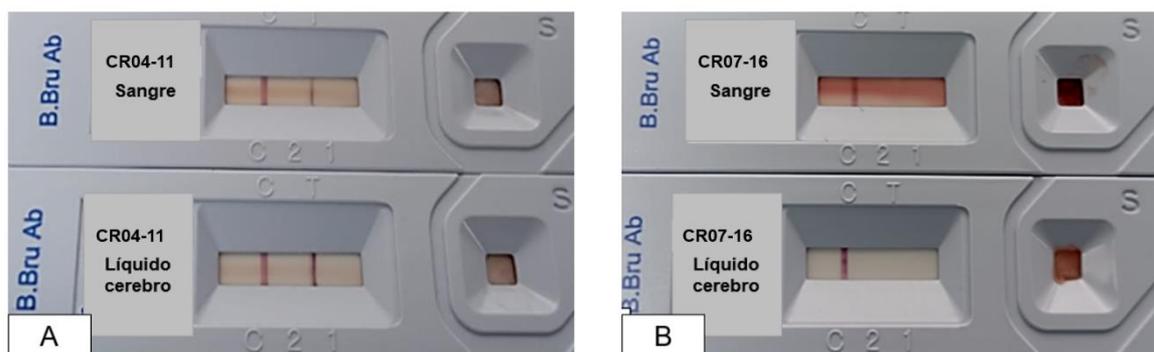


Figura 20.

Test rápido del kit comercial “B. brucella AB Test Kit”. Fuente: propia. A. Pruebas positivas para delfín CR04-11 (*Stenella coeruleoalba*) de sangre completa y líquido cerebral. **B.** Pruebas negativas para delfín CR07-16 (*Stenella coeruleoalba*) de sangre completa y líquido cerebral.

Del total de las pruebas realizadas un 71% (36/51) resultó positivas y un 29% (15/51) negativas. No obstante, un dato relevante es que solamente tres muestras de las 36 positivas correspondieron a la especie *Steno bredanensis*, *Stenella attenuata* y *Tursiops truncatus*; las 33 restantes (el 92% de las pruebas) estuvo dada por la especie *Stenella coeruleoalba*. En estudios como el de Guzmán-Verri y colaboradores (2012), los análisis comparativos han sugerido que algunas especies de cetáceos son más susceptibles a las infecciones por *Brucella* que otras. Entre los odontocetos, por ejemplo, se encuentran *S. coeruleoalba*, *Phocoena phocoena*, *Lagenorhynchus acutus*, *Tursiops truncatus* y *Delphinus delphis*.

La infección por *B. ceti* en cetáceos está asociada a meningoencefalomielitis, aborto, discospondilitis, abscesos subcutáneos, endocarditis, endometritis y una amplia gama de otras condiciones patológicas. Sin embargo, con la excepción del delfín rayado (*Stenella coeruleoalba*) la proporción de otras especies de cetáceos que muestran signos clinicopatológicos asociados con la brucelosis es baja (Isodoro-Ayza et al. 2014). Igualmente, Hernández-Mora y colaboradores (2008), también revelaron una mayor susceptibilidad de esta especie a la neurobrucelosis. Y en efecto, como se muestra en la Figura 21, de la especie *S. coeruleoalba*, prácticamente el 90% (33/37) dio positivo a la prueba rápida.

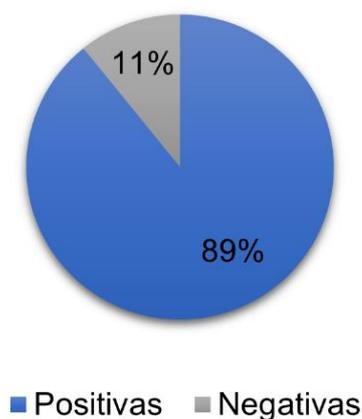


Figura 21.

*Resultados de la prueba rápida o ensayos inmunocromatográficos para la especie *Stenella coeruleoalba*.*

3.3.3. Resultados de los cultivos en medios selectivos de CITA y Farrell.

Como se mencionó previamente, se realizaron cultivos en medios selectivos de CITA y Farrell a partir de matrices como el cerebro o líquido cerebral para los delfines que no presentaban cultivos bacterianos previos en los medios CITA y Farrell (13 especímenes). Sin embargo, a diferencia de los hallazgos obtenidos para las muestras de tejidos de abortos bovinos, solamente se obtuvo un individuo positivo de la especie *S. coeruleoalba* (CR03-15) de los 13 analizados. Cabe mencionar, que el mismo ya contaba previamente con un cultivo positivo en el año 2015 cuando encalló. No obstante, igualmente se le realizó la caracterización bioquímica, mediante las pruebas de ureasa y oxidasa, que arrojaron resultados positivos. Posteriormente, una vez obtenido el cultivo puro se procedió a la identificación de la especie mediante PCR convencional (Figura 22).

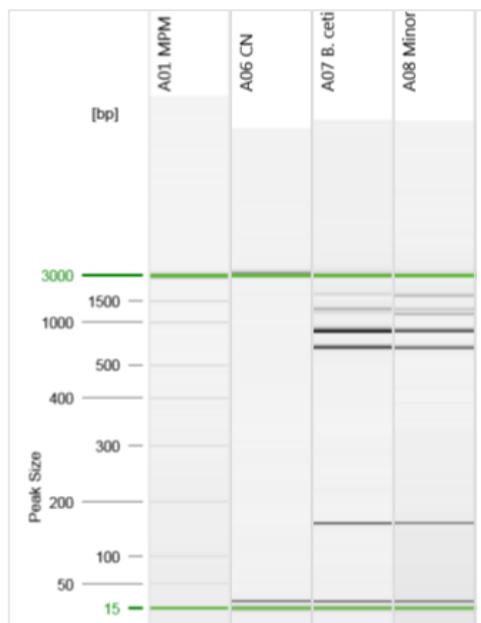


Figura 22.

Electroforesis capilar del producto de amplificación esperado para especie de *Brucella ceti*. Fuente: propia. **A01**: Marcador de peso molecular (MPM). **A06**: Control negativo (agua de grado molecular). **A07**: Control positivo para *Brucella ceti*. ATCC: 23365 **A08**: muestras positivas para *Brucella ceti* del Delfín CR03-15 (*Stenella coeruleoalba*).

4. CONCLUSIONES

- 4.1. Se fortalecieron las destrezas en el área de laboratorio diagnóstico mediante la pasantía realizada en la Unidad de MMV, mejorando los aprendizajes adquiridos a lo largo de la carrera e integrando los nuevos conocimientos obtenidos durante la pasantía.
- 4.2. Se perfeccionaron las habilidades técnicas y el conocimiento en el diagnóstico de agentes bacterianos zoonóticos mediante las distintas pruebas bacteriológicas y moleculares realizadas, incluyendo, además, la organización de información y el desarrollo de inventarios que posibilitan la realización de futuras investigaciones en diversos campos científicos.
- 4.3. Se concientizó sobre el rol fundamental de los médicos veterinario en el diagnóstico preciso y oportuno de agentes bacterianos zoonóticos que tienen un impacto fundamental sobre la salud pública del país y la importancia del profesional en veterinaria para determinar la existencia o introducción de enfermedades que afectan tanto la salud humana, como la salud animal.
- 4.4. Se confirmó la importancia del laboratorio diagnóstico en el contexto de One Health para la vigilancia activa de enfermedades que involucran interacciones entre humanos, animales y el medio ambiente. Contribuyendo a una mejor comprensión de la dinámica de las enfermedades y al diseño de estrategias de prevención y control más efectivas.

5. RECOMENDACIONES

- 5.1. Los profesionales médicos veterinarios deben involucrarse activamente en el proceso de diagnóstico de enfermedades bacterianas zoonóticas en conjunto con los laboratorios oficializados del país para prevenir la aparición o reaparición de enfermedades que son un riesgo en la salud pública.
- 5.2. Es importante que el médico veterinario se mantenga actualizado acerca de las diferentes pruebas diagnósticas existentes para los agentes bacterianos zoonóticos y asesorarse en conjunto con los laboratorios oficializados en la forma correcta del envío y toma de muestras para garantizar una mayor eficiencia en el diagnóstico.
- 5.3. Se pueden impulsar más investigaciones por parte de estudiantes o profesionales en medicina veterinaria con la información recopilada del banco de cetáceos en el campo de toxicología, hibridación *in-situ*, diagnóstico molecular, entre otros.
- 5.4. Los médicos veterinarios involucrados en el laboratorio diagnóstico y salud pública deben asumir su papel como comunicadores de información destinada a los propietarios de animales y la sociedad, para que los mismos reconozcan la clara interrelación que existe entre la salud humana, animal y ambiental englobada en el término de una salud.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Belák S, Karisson O, Leijon M, Granberg F. 2013. Secuenciación de alto rendimiento en la biología y el diagnóstico de las infecciones veterinarias [Internet]. Suiza (Ginebra): [OMSA] Organización Mundial de Sanidad Animal; [citado el de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.woah.org>
- Briones V, Bezos J, Álvarez J. 2018. Concepto y contenidos actuales de Salud Pública y Política Sanitaria Veterinarias. Rev. Esp. Salud Publica. 92.
- De Miguel MJ, Marín CM, Muñoz PM, Dieste L, Grilló MJ, Blasco JM. 2011. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. J Clin Microbiol. 49 (4): 1458-1463.
- Gil-Loyzaga E. 2011. Criopreservación de células y tejidos. In: Vara E y Gil-Loyzaga P, editores. Cultivo de células animales y humanas: aplicaciones en medicina regenerativa. Madrid: Visión Libros.400p.
- Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. Vet Microbiol. 112 (2-4): 171-179
- Guzmán-Verri C, González-Barrientos R, Hernández-Mora G, Arberto-Morales J, Barquero-Calvo E, Chave-Olarte E, Moreno E. 2012. *Brucella ceti* and Brucellosis in Cetaceans. Front Cell Infect Microbiol. 2: 3.
- Hernández-Mora G, González-Barrientos R, Morales JA, Chaves-Olarte E, Guzmán-Verri C, Barquero-Calvo E, De Miguel MJ, Marín CM, Blasco JM, Moreno E. 2008. Neurobrucellosis in Stranded Dolphins, Costa Rica. Emerg Infect Dis. 14(9): 1430-1433.

- Hernández-Mora G, Manire C, Gonzáles-Barrientos R, Barquero-Calvo E, Guzmán-Verri C, Staggs L, Thomson R, Chaves-Olarte E, Moreno E. 2009. Serological diagnosis of *Brucella* Infections in Odontocetos. *Clin Vaccine Immunol.* 16 (6): 906-915.
- Isodoro-Ayza M, Ruiz-Villalobos N, Pérez L, Guzmán-Verri C, Muñoz P, Alegre F, Barberán M, Chacón-Días C, Chavez-Olarte E, González-Barrientos R, Moreno E, Blasco JM, Domingo M. 2014. *Brucella ceti* infection in dolphins from the Western Mediterranean Sea. *BMC Vet Res.* 10: 206.
- Kahn L. 2006. Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. *Emerg Infect Dis.*12(4): 556–561.
- King L, Khabbaz R. 2003. Converging issues in veterinary and public health. 9(4): 510–511.
- Lazarus D, Woma T, Fasina F. 2011. Veterinary Diagnostic Laboratories and their role in Transboundary animal disease control. *Vom Journal of Veterinary Science.* 8 (2).
- López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckeaert A, Ferreira AC, Cardoso R, Correa MI, Walravens K, Albert D, Garin B. 2008. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol.* 46(10):3484-7
- [MAG] Ministerio de Agricultura y Ganadería. 2008. Listado de enfermedades animales de declaración obligatoria: N° 34669-MAG. [Internet]. Costa Rica: [PGR] Procuraduría General de la República de Costa Rica; [citado el 11 de agosto de 2022]. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/>

[MAG] Ministerio de Agricultura y Ganadería. 2013. Reglamento de la Estructura Organizativa del Servicio Nacional de Salud Animal: N° 37917-MAG. [Internet]. Costa Rica: [PGR] Procuraduría General de la República de Costa Rica; [citado el 11 de agosto de 2022]. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/>

McNicol AM y Faquharson MA. 1997. In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. *J Pathol.* 182 (3): 250-261

Monath T, Kahn L, Kaplan B. 2010. One health perspective. *ILAR Journal.* 53 (3): 193-198.

[OMSA] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2022. Código Sanitario para los Animales Terrestres: Glosario. [Internet]. Paris, Francia: OMSA; [citado el 11 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.woah.org>

[OMSA] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2021. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021. [Internet]. Paris, Francia: OMSA; [citado el de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.woah.org>

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2020. Zoonosis. [Internet]. Ginebra, Suiza: OMS; [citado el 11 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int>

LM, Daborn CJ. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.* 1:1-46.

Ortega C, Villamil LC, Cediell N, Rosenfeld C, Meneghi D, Rosa M, Estol L, Lleguia G, Fonseca-Poveda A, Torres M, Caballero-Castillo, Balogh K. 2005. Las redes SAPUVET y SPVet: un modelo de integración en materia

de salud pública veterinaria entre Europa y América Latina. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health. 17(1).

Picardeau M. 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Med Mal Infect. 43 (1):1-9.

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2020. Catálogo de servicios y criterios de aceptación de muestra: SEG-PE -001-RE- 004. [Internet]. Costa Rica: SENASA; [citado el 5 de junio de 2022]. Disponible en: <https://www.senasa.go.cr/>

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2016. Determinación de *Salmonella* Gallinarum y *S. Pullorum*: DV-MMV-PT-004. Costa Rica: SENASA.

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2020. Diagnóstico de Leptospirosis por microaglutinación (MAT): DV-MMV-PT-001. Costa Rica: SENASA.

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2020. Diagnóstico de Paratuberculosis por la técnica de ELISA: DV-MMV-PT-009. Costa Rica: SENASA.

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2020. Identificación bacteriana de *Campylobacter* por tinción de Gram: DV-MMV-PT-011. Costa Rica: SENASA.

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2020. Cultivo de *Mycobacterium bovis*: DV-MMV-PT-012. Costa Rica: SENASA.

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2021. Cultivo de *Brucella* spp.: DV-MMV-PT-002. Costa Rica: SENASA.

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2020. Informe sobre la situación sanitaria de Costa Rica [Internet]. Costa Rica: SENASA; [citado el 15 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.senasa.go.cr/>

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2022. Diagnóstico de *Mycobacterium bovis* por Interferón Gamma: DV-MMV-PT-007. Costa Rica: SENASA.

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2023. Identificación de especie de *Brucella* por PCR múltiple: DV-MMV-PT-006. Costa Rica: SENASA.

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2023. Confirmación de identidad genética de aislamientos de *Mycobacterium* género *bovis*: DV-MMV-PT-016. Costa Rica: SENASA.

Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356 (1411): 983-9.

Vallat B. 2013. Las nuevas tecnologías ofrecen novedosas herramientas de diagnóstico y terapéuticas para combatir las enfermedades [Internet]. Suiza (Ginebra): [OMSA] Organización Mundial de Sanidad Animal; [citado el de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.woah.org>

Vela JF. 2012. Medicina Veterinaria: pasado, presente y futuro. *Rev.Med.Vet.* 24.

7. ANEXOS

7.1. Anexo 1: Cultivos para *Brucella* spp. del banco de leches positivas a serología y muestras de tejidos de bovinos.

Fecha	Número de protocolo o identificación	Resultados del cultivo en CITA y Farrell	Prueba de Oxidasa	Prueba de Urea	Conservación de los aislamientos
Muestras del banco de leches					
Jueves 12 de enero del 2023	D2656-16 #1	Negativo	NA	NA	NA
	D2656-16 #2	Positivo	Positivo	Positivo	CTS (21-01-23)
	D2656-16 #3-9	Negativo	NA	NA	NA
Viernes 13 de enero del 2023	Chorotega #1-5	Negativo	NA	NA	NA
	D2844-14 #1-6				
	LRBR1332-14 #1-7				
	D3129-14 #1-2				
Lunes 16 de enero del 2023	D1292-14	Negativo	NA	NA	NA
	Finca Clachar #1-20				
	D2961-15 #18				
	D2961-15 #35				
	D2531-15 #1				
Martes 17 de enero del 2023	D2786-16 #1	Negativo	NA	NA	NA
	D3226-15 #2-5				
	D2351-15 #84-87				
Miércoles 18 de enero del 2023	D2525-15 #49-55	Negativo	NA	NA	NA
	D2525-15/#68	Positiva	Positiva	Positiva	CTS (31-01-23)
	LRBR370-15/#65	Negativo	NA	NA	NA
	LRBR370-15/#69				
	LRBR370-15/#73				
	LRBR370-15/#74				
	LRBR370-15 #75	Positiva	Positiva	Positiva	CTS (31-01-23)
D3116-15 #26	Negativo	NA	NA	NA	

	D3116-15 #28					
Jueves 19 de enero del 2023	D1030-14/#1-2	Negativo	NA	NA	NA	
	D1208-15/#1-4					
	Cambronero #1-5					
	27-4-15/ 5Porfirio					
	27-4-15/ 3Lizanía					
	D2861-15 #1-3					
	24-4-15/HN Mely #1-7					
Jueves 26 de enero del 2023	24897 #1-3	Negativo	NA	NA	NA	
	24898 #1-2					
	24899 #1-3					
	24921 #1-2					
	24923 #1-2					
	24922 #1					
	24916 #1-2					
	24911 #1-3					
	24915 #1-3					
	24897 #1-3					
	24898 #1-2					
Viernes 27 de enero del 2023	D1214-16 #1-7	Negativo	NA	NA	NA	
	Feb-mar 2016 #1-3					
	1611-16 #1-3					
	D0532-16 #1					
	D0532-16 #2	Positiva	Positiva	Positiva	CTS (15-02-23)	
	D0532-16 #3	Negativo	NA	NA	NA	
	D0532-16 #4	Positiva	Positiva	Positiva	CTS (15-02-23)	
	D0532-16 #5					
	Viernes 27 de enero del 2023	15-01-16 #1-2				
		ID: 25360 #1-3				
ID: 25363 #1-3						
D0813-16 #15						
D1360-16						

	D391-16 #1	Negativo	NA	NA	NA
	D0827-16 #1				
	D0827-16 #4				
	D1390-16 #1				
	D1390-16 #1.1				
	I2AI-16/11-5-16				
	D0749-16 #1				
Martes 21 de febrero del 2023	D1126-16 #1-3	Negativo	NA	NA	NA
	D1127-16 #1-3				
	D1128-16 #1-3				
	D1129-16 #1-3				
	D1130-16 #1-3				
	D1131-16				
	D2936-16 #1-3				
	D2937-16 #1-3				
D2938-16 #1-3					
Lunes 27 de febrero del 2023	D3123-14 #1-23	Negativo	NA	NA	NA
	D3341-15				
	D3128-14 #15	Positivo	Positivo	Positivo	CTS (13-03-23)
	D0469-16	Negativo	NA	NA	NA
	LRH0757-14				
LRHN1871-15 #3-4					
Martes 28 de febrero del 2023	D3135-14	Negativo	NA	NA	NA
	D3134-14				
	LRBR563-14 #1				
	LRBR563-14 #2				
	LRBR563-14 Vaca #14				
	LRBR563-14 Vaca #18	Positivo	Positivo	Positivo	CTS (20-03-23)
	LRBR563-14 Vaca #46	Negativo	NA	NA	NA
LRHN0880-14 #24					
	D0652-15 #1-11	Negativo	NA	NA	NA
	D1202-15 #1-6				

Lunes 06 de marzo del 2023	D1202-15 #7	Positivo	Positivo	Positivo	CTS (23-03-23)
	Búfalos/15-04-16/#1-3	Negativo	NA	NA	NA
	D1298-15 #1-8				
	D1016-16 #1-2				
	D1017-16 #1-2				
	D1018-16 #1-2				
	D0298-15 #1-3				
	D0625-15 #1-5				
	LRHN2125-14 #1-2				
Fecha	Número de protocolo o identificación	Resultados del cultivo en CITA y Farrell	Prueba de Oxidasa	Prueba de Urea	Conservación de los aislamientos
Muestras de tejidos y órganos de bovinos					
Viernes 10 de febrero del 2023	Vaca y Feto San Carlos/ 6-2-14 (placentoma)	Negativo	NA	NA	NA
	D0610-12 (placenta)	Positivo	Positivo	Positivo	CTS y DMSO (17-02-23)
	D3349-11 #1 (bazo)	Negativo	NA	NA	NA
	D3349-11 #4 (placentoma)	Positivo	Positivo	Positivo	CTS y DMSO (17-02-23)
	D3349-11 #4 (Líquido amniótico)				
	D3349-11 #6 (ovario y útero)				
	D3349-11 #7 (Líquido amniótico)	Negativo	NA	NA	NA
	D3349-11 #8 (placentoma)				
	D3349-11 #8 (Líquido amniótico)				

	D3349-11 #9 (Líquido amniótico)	Positivo	Positivo	Positivo	CTS y DMSO (17-02-23)
	D3349-11 #10 (ovario y útero)				
	D3349-11 #11 (Líquido amniótico)	Negativo	NA	NA	NA

NA: no aplica. **CTS:** caldo tripticasa soya. **DMSO:** dimetilsulfóxido.

7.2. Anexo 2: Inventario del banco de cetáceos.

Código de encallamiento	Especie	Sexo	Resultado de la prueba rápida 2023	Estado de descomposición de los tejidos 2023
CR05-10	<i>Tursiops truncatus</i>	Hembra	Positivo	3
CR13-11	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR09-11	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR12-11	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	3
CR08-11	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR06-11	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	3
CR11-11	<i>Stenella attenuata</i>	Macho	Positivo	3
CR10-11	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	3
CR05-11	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	2
CR 07-11	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR04-11	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	3
CR04-12	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	2
CR03-12	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	2
CR05-13	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	2
CR04-13	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR11-13	<i>Delphinus delphis</i>	Hembra	Negativo	2
CR07-13	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR10-13	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR13-13	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	2
CR09-14	<i>Steno bredanensis</i>	Macho	Positivo	2

CR07-14	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR08-14	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	2
CR11-14	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	2
CR04-14	<i>Grampus griseus</i>	Hembra	Negativo	4
CR15-14	<i>Tursiops truncatus</i>	Hembra	Negativo	3
CR13-14	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	2
CR02-14	Familia Ziphiidae	Macho	Negativo	3
CR09-15	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR03-15	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR11-15	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	2
CR08-15	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	2
CR10-15	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR15-15	<i>Stenella attenuata</i>	Hembra	Negativo	2
CR16-15	Familia Ziphiidae	Macho	Negativo	4
CR11-16	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	2
CR09-16	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Negativo	2
CR16-16	<i>Tursiops truncatus</i>	Hembra	Negativo	2
CR02-16	<i>Steno bredanensis</i>	Macho	Negativo	3
CR03-16	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR07-16	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Negativo	2
CR22-17	<i>Stenella longirostris</i>	Macho	Negativo	2
CR16-17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR06-17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR 03-18	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR15-18	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	2
CR06-18	<i>Kogia sima</i>	Hembra	Negativo	2
CR09-20	<i>Lagenodelphis hosei</i>	Macho	Negativo	2
CR05-20	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Negativo	2
CR04-20	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Positivo	2
CR10-20	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Positivo	2
CR03-20	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Negativo	2