

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

**Desarrollo y validación química y serológica de un ensayo
inmunoenzimático ELISA para el diagnóstico
de la brucelosis en odontocetos**

Modalidad: Tesis

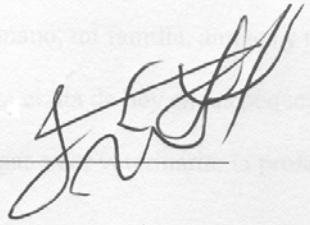
**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado
Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

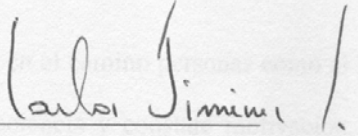
María Gabriela Hernández Mora

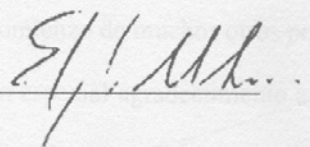
Campus Presbítero Benjamín Núñez

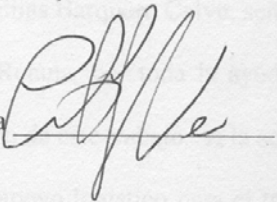
2006

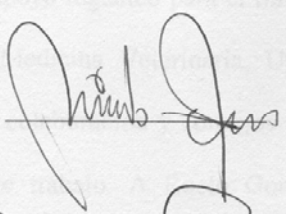
Tribunal examinador:

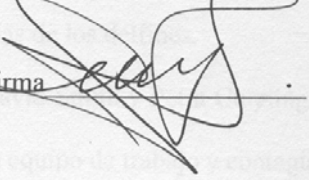
Dr. Jorge Quirós (Decano) Firma 

Dr. Carlos Fco. Jiménez Sánchez (Director) Firma 

Dr. Edgardo Moreno Robles (Tutor) Firma 

Dra. Caterina Guzmán Verri. (Lectora) Firma 

Dr. Esteban Chaves Olarte (Lector) Firma 

Dr. Mario Baldi Salas (Lector) Firma 

Fecha:

A la Fundación PROMAR por la oportunidad de colaborar con ellos y darles asistencia a la Red Costarricense de Rescate de Mamíferos Marinos (RECOMAR) - A Andrés Montoya

DEDICATORIA y AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo especialmente a mi madre, mi hermano, mi familia, amigos y todas aquellas personas que con su apoyo lograron impulsarme hasta el día de hoy en las pequeñas y grandes cosas que la vida me ha puesto en el camino para llegar a ser veterinaria, la profesión que desde niña siempre soñé.

Le agradezco a Dios y a la vida el haberme puesto en el camino personas como el Dr. Edgardo Moreno Robles, que con su consejo, apoyo, paciencia y constata motivación, ha permitido finalizar este trabajo de tesis que a la vez es el comienzo de muchos otros proyectos en investigación de mamíferos marino en nuestro país. Un especial agradecimiento a Caterina Guzmán Verri, Esteban Chaves Olarte, Elías Barquero Calvo, Daphne Garita Vargas, Mario Baldi Salas, Fernando Retana, por toda la ayuda brindada, además del conocimiento y apoyo a través de la realización de este trabajo. A Mayra Bolaños Quijano y Adrián Zamora Arce por el apoyo logístico para el transporte de delfines del lugar de encallamiento a la Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. A todos los miembros del PIET por su ayuda colaboración y consejos durante la preparación de los seminarios y la realización de este trabajo. A Rocío Gonzáles por acompañarme y colaborar en el estudio de las patologías de los delfines.

Al Dr. Charles y Ruth Manire, Lynne Byrd, David Smith y Petra Cunningam-Smith, y al Dr. Jim Gelsleichter por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y contagiarme de este maravilloso mundo de medicina en mamíferos marinos y permitirme tener acceso al valioso banco de sueros de su colección.

A la Fundación PROMAR por la oportunidad de colaborar con ellos y darles asistencia a la Red Costarricense de Rescate de Mamíferos Marinos (RECORMA). A Andrea Montero,

José Damián Martínez, José David Palacios, Frank Garita (Fundación KETO) por el apoyo logístico brindado para poder dar asistencia a encallamientos durante el año 2006.

Al Dr. Juan José Romero Zúñiga por su colaboración al facilitarnos el programa estadístico que se utilizó en este trabajo, además de sus múltiples consejos al respecto. Al Dr. Juan Alberto Morales Acuña por colaborar durante los últimos tres años con las necropsias e interpretación de las mismas de los delfines traídos. A Bernal Valerio Alfaro y Laura Alvarado Guzmán por la ayuda brindada durante este mismo proceso.

A la Comisión de Trabajos Finales de Graduación y al Dr. Carlos Jiménez por su ayuda y asesoramiento para perfeccionar este manuscrito. A CSI (Cetacean Society Internacional) por el apoyo financiero que permitió procesar las muestras del banco de sueros del Mote Marine Laboratory. Así como al Fondo Estatal de Enseñanza Superior (FEES) por financiar el proyecto de investigación: “Evaluación del impacto de la neurobrucelosis en el fenómeno de encallamiento de delfines” que se desarrollará a partir del 2007 utilizando como base esta tesis.

INDICE DE CONTENIDOS

	Páginas
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	III
INDICE DE CONTENIDOS	V
INDICE DE CUADROS	VI
INDICE DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	20
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	25
ANEXOS	42

INDICE DE CUADROS

	Páginas
Cuadro 1: Metodología de la preparación de soluciones para el ELISA i	29
Cuadro 2: Distribución de los resultados de la prueba ELISAI según el sexo, edad, procedencia y patologías presentes en los animales analizados	30
Cuadro 3: Distribución de los resultados de la prueba ELISAI según la especie de odontoceto.	31
Cuadro 4: Comparación de los resultados según la densidad óptica, en el ELISA, INF y RB.	32

INDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1: Fundamento de la prueba ELISAI	33
Figura 2: Prueba de SDS PAGE e inmunodifusión en gel de Ac de conejo anti IgG de delfín	34
Figura 3: Inmunodifusiones de los diferentes sueros de odontocetos contra IgG de conejo anti IgG de <i>Steno bredanensis</i>	35
Figura 4: Diluciones y distribución de sueros y conjugado para la estandarización del ELISAI, así como la distribución de controles y muestras utilizados.	36
Figura 5: Proporcionalidad del ensayo ELISAI en diluciones seriadas de sueros positivos y ajuste de los controles.	37
Figura 6: Variabilidad durante las repeticiones del ELISAI de los controles y límites de confianza de variación del ensayo.	38
Figura 7: Distribución de sueros positivos y negativos según resultado en las pruebas de RB, INF y ELISAI	39
Figura 8: Distribución de sueros positivos y negativos usando la INF con respecto al ELISAI.	40
Figura 9: Distribución de sueros positivos y negativos usando el RB con respecto al ELISAI.	41

ABREVIATURAS

ABTS: 2,2': Azino-bis (3- Ethylbenz-thiazoline-6- Sulfonic Acid)

Ac: Anticuerpos

DdH₂O: Agua desionizada y destilada estéril

DMSO: Dimetil sulfóxido

D.O. : Densidad óptica

ELISAI: Indirect Enzyme linked immunoabsorbent assay

FITC: Isiotiocianato de fluoresceína

HRPO: Peroxidasas

INF: Inmunofluorescencia indirecta

LPS: Lipopolisacárido

PB: Buffer fosfatos

PBS: Solución búfer 0.1M de fosfatos con salina pH 7.2

PBS-T: PBS con 0.05% de Tween 20

PBS-T-BSA: PBS-T con 1% albúmina sérica bovina

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

RB: Antígeno de aglutinación Rosa de Bengala

RESUMEN

Miembros del género *Brucella*, conocidos como “*Brucella cetaceae*” son patógenos de marsopas, delfines y ballenas. La experiencia clínica y el conocimiento de la patobiología de este microorganismo son limitados; sin embargo, se han descrito desórdenes reproductivos y neurológicos que podrían causar la muerte del hospedador. El diagnóstico de la brucelosis en odontocetos es difícil, ya que no existen técnicas específicamente diseñadas para la detección de anticuerpos (Ac) contra *Brucella* en estos animales. Aquí describimos el desarrollo y estandarización de una prueba ELISA indirecta (ELISAI) con alta sensibilidad y especificidad química y tentativamente serológica para la detección de Ac contra *Brucella* en odontocetos.

La prueba es sencilla y tiene valor predictivo. Ésta se basa en la utilización del lipopolisacárido de *Brucella* altamente purificado y de un conjugado que reconoce los Ac de por lo menos dieciséis especies de odontocetos. La prueba demostró linealidad en las reacciones, en relación con las diluciones de los sueros positivos y un bajo ruido de fondo.

De acuerdo con el análisis estadístico se usaron 147 sueros (138 procedentes Florida y nueve de Costa Rica), se estableció un valor kappa de 0.9, una sensibilidad máxima de 93.75% y una especificidad de 97.06%, cuando el ELISAI se compara con pruebas combinadas de inmunofluorescencia y Rosa de Bengala. De un total de 108 animales de dieciséis especies diferentes de odontocetos, 36 (33.33%) de ellos resultaron positivos, independientemente de su edad, sexo, o estado reproductivo. Nueve de los odontocetos provenían del Pacífico de Costa Rica, de los cuales siete resultaron positivos con tres aislamientos de *Brucella*. De quince casos con meningoencefalitis, doce poseían Ac contra *Brucella*. Se discuten las implicaciones de la infección por “*Brucella cetaceae*” en delfines haciendo énfasis en los problemas zoonóticos que podría acarrear esta bacteria.

ABSTRACT

Members of the *Brucella* genus, tentatively assigned as “*Brucella cetaceae*”, are pathogens of porpoises, dolphins and whales. Clinical experiences and knowledge on the pathobiology of this microorganism are limited; however, there are descriptions of reproductive and neurological disorders that may cause the animal’s death. The presumptive diagnosis of the brucellosis in odontocetes is difficult since techniques specifically designed to detect antibodies against *Brucella* in these animals are not readily available. This work describes the development and standardization of an indirect ELISA with high chemical as well as serological sensibility and specificity for the detection of antibodies against *Brucella* in odontocetes. Moreover, the indirect ELISA is simple and has predictive value for the isolation of *Brucella* spp. The assay is based on the detection of antibodies against *Brucella* lipopolysaccharide and development with a specific conjugate against odontocetes IgGs. The conjugate reactions were proportional in relation to the positive serum dilutions and the background noise maintained to levels approaching the blank. According to the statistical analysis performed on 147 sera (138 from Florida, nine from Costa Rica), a sensibility of 93.75%, a specificity of a 97.06% and a kappa value of 0.9 were obtained, when the indirect ELISA was compared to both, indirect immunofluorescence and Rose Bengala tests. From a total of 108 odontocetes analyzed corresponding to 16 different species, 36 (33.33%) were positive in the assay, disregarding of age, sex or reproductive status. Nine odontocetes were from the Pacific coast of Costa Rica; from these, seven out of nine were ELISA positive and in three animals *Brucella* spp. was isolated. Twelve out of fifteen meningoencephalitis cases showed high titer of antibodies against *Brucella*. The zoonotic risks of *Brucella* infected dolphins are discussed within the frame of our findings.

INTRODUCCIÓN

Los cetáceos tienen gran valor ecológico y comercial, ya que son parte fundamental de la cadena alimenticia de los océanos y una fuente importante de proteína y grasas en muchas latitudes. También constituyen una atracción turística importante, tanto en acuarios como en mar abierto, asimismo los delfines son utilizados en terapias, como la estimulación de niños con autismo, síndrome de Down o paraplejía. En los últimos años estas acciones se han incrementado a nivel mundial, por lo que el contacto directo con estos animales silvestres marinos aumenta el riesgo de contagio de enfermedades infecciosas para seres humanos (<http://www.delfinoterapia.cuprum.pl/english> y Anexo I).

En las costas de Costa Rica al igual que en otras costas del mundo, ocurren encallamientos los cuales consisten en un comportamiento errático de un delfín, ballena o marsopa, que llega vivo a la playa o bien se mantiene a flote cerca de la costa o en aguas poco profundas y es incapaz de regresar mar adentro por sus propios medios. Nuestro país posee abundantes litorales en donde habitan por lo menos veintiocho especies de cetáceos de las ochenta y cinco existentes a nivel mundial (Sáenz et al., 2004 y Anexo II). Este fenómeno representa una oportunidad para investigar las enfermedades que generan este tipo de conductas en las poblaciones silvestres marinas. Diversas hipótesis se han propuesto para explicar el encallamiento de cetáceos. Por ejemplo cambios bruscos en las condiciones oceánicas, interacción con pesquerías artesanales, contaminación con pesticidas y enfermedades de origen viral, parasitario o bacteriano. Entre éstas últimas la brucelosis es una de las enfermedades que se ha documentado como causa de encallamiento de los mamíferos marinos (Foster et al. 1996; Muñoz et al. 2006).

La brucelosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Brucella* que afectan a mamíferos terrestres y marinos, así como al ser humano (Moreno y Moriyón, 2002). Hasta el momento se han reconocido seis especies que atacan a los animales terrestres: *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Brucella canis*, *Brucella ovis* y *Brucella neotomae*, afectando a bovinos, suinos, caprinos, perros, ovinos y ratas del desierto, respectivamente (Anexo III). De estas especies sólo tres se han aislado en Costa Rica: *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* (Moreno, 2002). Los mamíferos terrestres más susceptibles a la infección por esta bacteria son las hembras preñadas sometidas a explotación intensiva que comúnmente abortan durante el último trimestre de la preñez, resultando en retención de placenta, infección del útero y raramente infertilidad (Anexo IV). En machos la bacteria se localiza principalmente en los testículos y genera infertilidad, reducción de libido y en algunos casos la muerte (Moreno y Moriyón 2002). La brucelosis en humanos es contraída directamente de los animales infectados o sus productos como leche y quesos, y por lo tanto es una zoonosis con gran impacto en salud pública (Anexo IV) En humanos la brucelosis se caracteriza por fiebres recurrentes, con manifestaciones múltiples que van desde dolores articulares, anorexia, pérdida de peso, hasta meningitis, que usualmente es mortal (Sohn et al., 2003). El principal agente zoonótico del género *Brucella* en el mundo es *B. melitensis*, seguido de *B. abortus* y *B. suis*.

Por su parte *B. canis* raramente afecta a humanos, aún en países donde la infección es común en perros (Godfroid et al., 2005). A la fecha *B. ovis* y *B. neotomae* no se han reportado como patógenos de humanos (Lopez-Goñi y Moriyón, 2004).

En la última década se detectó la presencia de anticuerpos (Ac) contra esta bacteria, así como aislamiento de la misma, en varios mamíferos marinos, principalmente en delfines, ballenas y focas, en las costas del Reino Unido, Estados Unidos, Canadá, Noruega y Escocia.

(Ewalt et al., 1994.; Ross et al., 1994.; Foster et al., 1996.; Ross et al., 1996 .; Garner et al., 1997.; Jepson et al., 1997.; Clavareau et al., 1998.; Forbes et al., 2000.; Van Bresseem et al., 2001.; Foster et al., 2002). Debido a la naturaleza particular de estas brucelas marinas, la comunidad científica internacional ha propuesto que adquieran el estatus taxonómico de especie (Moreno et al., 2002a). La primera de ellas, *Brucella pinnipediae*, es fundamentalmente parásito de focas y nutrias, mientras que la segunda, *Brucella cetaceae* afecta marsopas, delfines y ballenas (Ewalt et al.; 1994; Jahans et al., 1997; Jensen et al., 1999; Tryland et al., 1999; Bricker et al., 2000; Foster et al., 2002; Godfroid et al., 2005). La exposición a *Brucella* ha sido descrita en marsopas de Harbor (*Phocoena phocoena*), delfín nariz de botella, delfín común (*Delphinus delphis*), delfín oscuro (*Lagenorhynchus obscurus*), delfín común de pico largo (*Delphinus capensis*), orcas (*Orcinus orca*), ballenas pilotos (*Globicephala melas*) y delfín listado (*Stenella coeruleoalba*). Muestras de ballenas también han sido obtenidas y analizadas, de éstas se han reportado seropositivas la ballena Minke (*Balaenoptera acutorostrata*), Fin (*Balaenoptera physalus*) y Sei (*Balaenoptera borealis*). El microorganismo ha sido aislado de ballena Minke (Tryland et al., 1999); marsopas de Harbor, delfines comunes, delfín rayado blanco del Atlántico (*Lagenorhynchus acutus*); delfines nariz de botella (Clavareau et al., 1998) y delfín listado (Muñoz et al., 2006).

El potencial zoonótico de las brucelas marinas merece mayor investigación, ya que en 1999 se reportó el primer caso humano por exposición ocupacional, enfermedad, seroconversión y recuperación eventual con *B. cetaceae* (Brew et al., 1999). Luego, Sohn et al. (2003), describieron la infección con *B. pinnipediae*, en dos pacientes provenientes de Perú, que presentaban neurobrucelosis y granulomas intracerebrales. No se determinó la fuente de infección. Recientemente, una cepa de *Brucella* marina fue aislada de un paciente con

osteomielitis en la espina dorsal (McDonald et al., 2006). También se ha descrito que las brucelas marinas producen seroconversión y aborto en ganado experimentalmente infectado con *Brucella* spp. aislada de focas Harbor del Pacífico (*Phoca vitulina-richardsi*) (Rhyan et al., 2001). Por lo tanto, se justifican estudios adicionales para conocer la distribución, prevalencia, virulencia y el impacto de esta enfermedad en mamíferos marinos y en humanos.

La experiencia clínica y el conocimiento de la patobiología de este microorganismo marino en su huésped natural es limitado, sin embargo, se han documentado desórdenes reproductivos y patologías relacionadas que podrían causar eventualmente la muerte del animal. Por ejemplo se ha descrito placentitis brucelar, que causó aborto en dos hembras nariz de botella (*Tursiops truncatus*) en cautiverio (Miller et al., 1999 y Anexo V). También resultados de necropsias en otros casos han mostrado absedación del sub-blubber (capa de grasa que recubre su cuerpo), necrosis esplénica y hepática, epididimitis, discoespondilitis espinal y meningitis (Foster et al., 2002; Gonzáles et al., 2002; Muñoz et al., 2006). Lo anterior podría generar un impacto adverso en los esfuerzos para aumentar la diversidad genética en poblaciones cautivas de algunos mamíferos marinos y reducir la reproducción en poblaciones silvestres (Harwood y Hall, 1990). Esto constituye un factor determinante en el futuro de estas especies, ya que muchas se encuentran en vías de extinción y aunque inicialmente se consideró que podía ser una enfermedad emergente, actualmente se propone que es endémica en estos mamíferos marinos.

El diagnóstico directo de la brucelosis en los mamíferos marinos es difícil, principalmente por su condición de vida en el mar que los hace poco accesibles al muestreo.

Además el aislamiento y cultivo de brucelas marinas no está claramente definido y no se sabe si tienen los mismos requerimientos nutritivos que las brucelas terrestres durante el aislamiento primario.

El diagnóstico serológico de la brucelosis en mamíferos marinos se ha basado hasta el momento, en el uso de las técnicas clásicas para detectar Ac en animales terrestres infectados y por lo tanto no son directamente aplicables a delfines, ballenas y focas, lo que puede traducirse en un número relativamente alto de falsos positivos (Miller et al., 1999 y Anexo VI A). En este sentido existe controversia entre el grado de concordancia de los ensayos inmunoenzimáticos como el “Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay” (ELISA) y algunas de las técnicas de aglutinación o precipitación como el Rosa de Bengala (RB) o la inmunodifusión radial con hapteno nativo usadas en las especies agrícolas, como vacas, cerdos, cabras u ovejas.

Por ejemplo, se ha determinado que la aglutinación en tubo y el test de Rivanol demuestran una sensibilidad variable para detectar Ac contra brucelas en el suero de mamíferos marinos (Miller et al., 1999). Por otro lado, estos ensayos son poco versátiles y generalmente no tienen la sensibilidad ni especificidad que poseen las pruebas de inmunofluorescencia y de ELISA, las que podrían ser de gran ayuda para el diagnóstico de la brucelosis en mamíferos marinos (Gall et al., 2000). Dierauf y Gulland (2001) consideran que es fundamental realizar investigaciones adicionales que ayuden a mejorar la interpretación así como el desarrollo de ensayos específicos para la detección de Ac en mamíferos marinos. Por todas las razones antes expuestas, el objetivo principal de este trabajo fue el desarrollar y estandarizar una prueba de ELISAI con alta sensibilidad y especificidad diagnóstica para la brucelosis en odontocetos.

La prueba de ELISAI para el diagnóstico de la brucelosis (Gall et al., 1998) se basa en la detección de Ac, en particular de la clase IgG 1 contra el lipopolisacárido (LPS) de brucelas

lisas (Anexo VII), el cual se usa como antígeno (Figura 1). Esta molécula situada en la membrana externa de las bacterias Gram negativas es uno de los antígenos más poderosos. En el caso de las brucelas existe un epitopo común muy abundante en el LPS de las especies lisas, por lo que el LPS de *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis*, se puede utilizar para el diagnóstico de cualquier infección causada por las diferentes especies de brucelas lisas, incluyendo las marinas, ya sea "*B. cetaceae*" o "*B. pinnipediae*" (Gall et al., 1998), pero no infecciones causadas por *B. ovis* o *B. canis* que son especies rugosas. El LPS es altamente inmunogénico y constituye el antígeno más importante de las brucelas, generándose gran cantidad de Ac contra esta molécula durante las infecciones (Moreno, 2004). Esta molécula es anfipática y está constituida por tres secciones: la cadena O de carácter hidrofílico, que es la porción que posee los epitopos comunes de N-formil perosamina con los que reaccionan los Ac, el oligosacárido central de ketosas y aminoazúcares, y el lípido A hidrofóbico (Anexo VII) Esta última sección es la que permite que el LPS se adhiera sin dificultad a los platos de ELISA, para ser detectado luego por Ac (Moreno, 2004).

Debido a la complejidad de la enfermedad y la imposibilidad de muestreos sistemáticos en animales marinos, no había sido posible hasta el momento desarrollar una prueba diagnóstica que sirviera de referencia, para el diagnóstico de la brucelosis en estos animales.

En esta tesis se describe el desarrollo y estandarización de una prueba de ELISAi la que demuestra una alta sensibilidad y especificidad química y presuntamente una alta sensibilidad serológica con potencial diagnóstico y alto valor predictivo.

METODOLOGÍA

1. Obtención de los sueros control

La sangre de delfín se recolectó sin anticoagulante por punción del pedúnculo o aleta caudal de delfines encallados en asépticas. Los sueros se obtuvieron a partir de sangre fresca coagulada tomada en un período no mayor de 8 horas o bien de sangre coagulada, la que se mantuvo en refrigeración a temperaturas entre 4 a 8 °C por un período no mayor de 24 horas. La cantidad mínima de suero que se recolectó fue de 0.25 ml, el cual no debió presentar células, coágulos o contaminación.

Los sueros de delfín control negativo fueron donados por el Mote Marine Laboratory, Sarasota, Florida, USA, pertenecientes a animales sanos sin ninguna sintomatología y por medio de reacciones negativas repetidas en aglutinación con antígeno de RB para la detección de Ac contra *Brucella*. Los sueros de delfín control positivo se obtuvieron de tres delfines *S. coeruleoalba*, que encallaron durante el mes de mayo a octubre del 2006 en costas del Pacífico costarricense, y de los cuáles se aisló e identificó *Brucella* spp. en los laboratorios del Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (EMV-UNA). En todos los casos se les realizó pruebas de laboratorio tradicionales (tinción Gram y pruebas bioquímicas) así como inmunofluorescencia directa e indirecta para *Brucella* spp (Anexo VIII). También se logró determinar que las bacterias aisladas pertenecían a este género gracias a la utilización de imprimadores específicos para el gen L12 ribosomal (L12.3 5' GGC TGA TCT CGC AAA GAT 3', L12.5 5' CCA GGT CCT TGG CTT CCT TGA G 3') que se utilizó en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El gen L12 ribosomal es específico del género *Brucella* spp.

2. Obtención de los sueros muestra.

Para la creación y evaluación de la prueba, se utilizaron nueve sueros de delfines encallados en costas costarricenses durante los años 2004 al 2006, que se mantienen en el banco de sueros del Laboratorio de Inmunología de la EMV- UNA. Además se obtuvieron 138 sueros pertenecientes a dieciséis especies diferentes de odontocetos, los que se recolectaron, en su mayoría, de delfines encallados alrededor de las costas de Florida, USA desde 1993 hasta la fecha. Estos sueros forman parte del banco de sueros del Mote Marine Laboratory, Sarasota, Florida, USA. El total de individuos muestreados corresponde a 108 odontocetos. El número total de sueros que se analizaron fue de 147 pertenecientes a muestreos repetidos de algunos delfines en diferentes épocas.

3. Purificación de Ac (IgG) de delfín

Para la preparación inicial de la prueba ELISA_i fue necesario la purificación de IgG de delfín negativo para *Brucella* spp. Para este fin se utilizó el método de precipitación de IgG descrito por Mackinney et al. (1987) y Reik (1987). Inicialmente un suero de delfín *Steno bredanensis* de la familia Delphinidae se diluyó en un amortiguador de acetato de sodio pH 4.0 (100mM) y ácido acético 0.1 M, en relación 1:4. El pH se ajustó a 4.2. Luego se le agregó lentamente el ácido caprílico a razón de 25 μ l por cada mililitro de suero diluido, esto con el fin de precipitar la mayoría de proteínas plasmáticas sin afectar las IgG. Se dejó incubando a temperatura ambiente por treinta minutos y con agitación constante.

Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 30 minutos, se recogió el sobrenadante y se eliminó el precipitado.

Se ajustó el pH del sobrenadante a 7.0 mediante la adición de una parte de un amortiguador de fosfatos salinos 10X (80.0 gr. NaCl, 2.0 gr KCL, 11.5 gr. Na₂HPO₄, 2.0 gr. KH₂PO₄) (PBS) por cada nueve partes de sobrenadante. Luego se precipitó la fracción de IgG, mediante la adición cuidadosa de solución saturada de sulfato de amonio (concentración final del 40%).

Se dejó incubando por treinta minutos a temperatura ambiente bajo una leve agitación.

Se centrifugó nuevamente a 10000 rpm durante treinta minutos a 4 C°. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en PBS 1X (punto A Cuadro 1). La fracción de inmunoglobulinas se dejó dializando la fracción de inmunoglobulinas a 4 °C contra varios cambios de PBS durante la noche y al día siguiente se calculó espectrofotométricamente la concentración final de éstas.

Se evaluó la pureza y presencia de los Ac por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (Lane y Harlow 1999) (Figura 2 A).

4. Producción del antisuero anti-delfín

El antisuero se obtuvo por medio de la inmunización de un conejo de raza Nueva Zelanda con un inmunógeno que se aplicó por vía subcutánea, que consistió inicialmente en una emulsión de las IgG purificadas de delfín (500 µl en una concentración final de 5.3 mg/ml) más 500 µl de adyuvante de Freud completo (Sigma), que consiste en una mezcla de aceite mineral y un emulsificador además de bacilos de *Mycobacterium* sp. muertos en suspensión. Este tipo de adyuvante forma un depósito en el sitio de inyección, del cual se libera gradualmente el inmunógeno, dando así un estímulo prolongado y de dosis bajas que es conveniente para inducir la producción de Ac de alta afinidad según Lomonte (2000). Luego

se inmunizó el conejo en dos ocasiones con 15 días de diferencia, pero se utilizaron IgG purificadas de delfín más adyuvante de Freud incompleto (Sigma), que es una mezcla de aceite mineral y un emulsificador. La cantidad de IgG que se usó fue 1.4 ml a una concentración de 5.3 mg/ml, combinados con igual cantidad de adyuvante incompleto. Esta mezcla se inyectó en diferentes puntos igualmente por vía subcutánea. Finalmente se recolectó el suero del conejo y se purificaron los Ac (IgG) obtenidos contra Ac de delfín por medio de cromatografía de afinidad con proteína A- Sepharosa, según la técnica descrita por Pharmacia LKB Biotechnology.

5. Prueba de Inmunodifusión en gel

La fuerza de la reactividad de la IgG de conejo anti-IgG de delfín se evaluó utilizando la prueba de inmunodifusión en gel (Hudson y Hay 1976). Para confeccionar las placas se utilizó 1 g de agarosa tipo I (Sigma), disuelto en 200 ml de PBS 1X. Posteriormente, se vertieron 7.5 ml en cada una de las placas de plástico de 3 cm de diámetro y se dejaron gelificar por 24 horas a 4 °C. Una vez hechas las placas se procedió a perforar seis pocillos equidistantes (0.5 cm), con uno en el centro. Se procedió a depositar 23 µl IgG de delfín el centro y 23 µl de diferentes diluciones de IgG de conejo antidelfín en los pocillos periféricos. En otra placa se depositó suero de vaca en el pozo del centro como control negativo. Estas se dejaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente y la lectura se realizó 24 horas después con la ayuda de una cámara oscura para detectar la formación de bandas producto de la reacción antígeno-Ac. El título de anticuerpo fue satisfactorio. Para asegurarse que los Ac purificados de conejo anti IgG de *S. bredanensis* reconocerían y reaccionarían cruzadamente

con otros miembros de la familia Delphinidae y otras familias de odontocetos, se utilizó esta misma prueba, de inmunodifusión poniendo como antígeno los sueros (Figura 3).

6. Preparación de conjugados anti IgG de delfín con peroxidasa y con isotiocianato de fluoresceína.

Para este procedimiento se utilizaron 10 mg de peroxidasa de rábano (HRPO, Sigma) diluidos en 0.5 ml de una solución de 1.25% de glutaraldehído en 100 mM de amortiguador de fosfatos de sodio pH 6.8, 1.15 g de Na_2HPO_4 , 0.96 g de $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua bidestilada (ddH_2O) y se dejó incubando por 18 horas en un frasco protegido de la luz.

Posteriormente la HRPO activada se dializó protegiéndola de la luz, contra un amortiguador de 100 mM de carbonato-bicarbonato de sodio pH 9.5. Al mismo tiempo se dializó 0.5 ml de la IgG de conejo antidelfín la que se ajustó a una concentración de 2 mg/ml en el mismo buffer de carbonato-bicarbonato. Después, se mezcló el anticuerpo con la HRPO y se dejó incubando a 4 °C toda la noche. Al día siguiente se le agregó 0.1 ml de 0.2 M de etanolamina (pH 7) y se puso a incubar a 4 °C por dos horas para finalmente dializar contra PBS durante la noche.

El conjugado de IgG de conejo anti IgG de delfín se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) de acuerdo a la técnica descrita por Lane y Harlow (1999).

Brevemente, la IgG de conejo antidelfín se dializó contra 500 volúmenes de un amortiguador carbonato-bicarbonato pH 9.0, 0.25 M toda la noche. Al día siguiente los Ac dializados se conjugaron con FITC a una concentración de 0.075 mg de FITC por cada mg de anticuerpo, en una botella ámbar con agitación leve durante 30 minutos y luego una incubación a 4 °C toda la noche. Posteriormente, el conjugado se filtró en una columna de

Sephadex G25 (1 g de Sephadex G25 en 5 ml de PBS), y se recogió la fracción de Ac conjugados en tubos envueltos con papel aluminio. A esta fracción se le adicionó 1% de albúmina y 50% de glicerol. Las alícuotas se guardaron a -20 °C protegidas de la luz.

7. Pruebas de inmunofluorescencia y de aglutinación con antígeno de rosa de bengala.

7.1. Inmunofluorescencia Indirecta

Para la inmunofluorescencia indirecta, se colocó 15 µl de ddH₂O en un cubreobjeto y una azada de bacterias tomada de un cultivo de *Brucella* S19 que se dejó secar a 37 °C. Una vez secas, se fijaron con 500 µl de paraformaldehído al 3.5%, y luego de 15 minutos a temperatura ambiente, se eliminó éste para adicionarle 500 µl de una solución de NH₄Cl (50 mM). El cubreobjetos se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, e inmediatamente se colocó sobre 50 µl de los sueros de cetáceos diluidos 1:50 en PBS conteniendo 10% de suero fetal de caballo y se incubó por media hora. Posteriormente los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS y una vez con PBS-Tritón al 0.1%. Seguidamente se colocó el cubreobjetos sobre 50 µl de conjugado antidelphin-FITC en una dilución de 1:50 en PBS con 10% suero fetal de caballo y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se lavó nuevamente con las mismas soluciones antes usadas y el cubreobjetos se colocó sobre 10 µl de Mowiol (Merck) en un portaobjetos y se dejó secar durante la noche. Los resultados se evaluaron bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus BH-2) al día siguiente.

7.2 Prueba de Rosa de Bengala

El antígeno de RB consiste en una suspensión de *B. abortus* S19 muerta y teñida con rosa de bengala en presencia de un amortiguador a pH 3.6 (Moreno y Moriyón, 2002). La

prueba de aglutinación con antígeno RB se realizó mezclando 25 µl de suero de cetáceo en diluciones de 1:1 a 1:16 con 25 µl del antígeno RB. Ambos se mezclaron con un palillo de dientes y después de 2 minutos se observó si ocurría aglutinación de las partículas bacterianas con la ayuda de una fuente de luz.

8. Desarrollo de la prueba de ELISAI

Todos los reactivos que se usaron para el desarrollo del ELISAI para el diagnóstico presuntivo de la brucelosis en odontocetos se indican en el Cuadro 1. Para la sensibilización de placas y estandarización del ELISAI se probaron dos LPS diferentes: el primero de *B. abortus* 2308 y el segundo de *B. melitensis* 16M. Los LPS se extrajeron y caracterizaron anteriormente según los protocolos descritos por Moreno et al., (1979) y Aragón et al., (1995). Ambos antígenos se obtuvieron del Laboratorio de Inmunología del PIET de la EMV- UNA. El LPS, se mantiene liofilizado a temperatura ambiente y se preparó para la prueba de ELISAI tal y como se describe en el punto G del Cuadro 1.

Una alícuota (100 µl) de LPS de *B. melitensis* (1 mg/ml) se diluyó en 10 ml de PBS, usando un recipiente de vidrio estéril. La solución se agitó fuertemente y se vertió en un recipiente. Con la ayuda de una micropipeta multicanal de 8 puntas se agregó 0.1 ml por pozo en placas de 96 pozos (Nunc, Immunolon II). Se dejó incubando por 18 horas a temperatura ambiente. Luego de este periodo se sellaron las placas con cinta plástica adherente y se guardaron a -20 °C hasta usarse.

Para realizar la prueba de ELISAI se sacó del congelador una placa sensibilizada con antígeno de LPS, se lavó cuatro veces a temperatura ambiente, usando 200 µl de PBS-T (punto B y D Cuadro 1) por pozo. Se sacudió y se secó sobre servilletas limpias. Tanto los

sueros control como muestra se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos, antes de diluirse para asegurar su limpieza. Luego se diluyeron en 50% glicerol y se mantuvieron en alícuotas a -20 °C hasta usarse. Todos los sueros se diluyeron con PBS-T-BSA (Punto C Cuadro1) dentro de la primera hora antes de usarse y se mantuvieron a 4 °C. En todos los pozos se depositaron 100 µl por duplicado, siguiendo el esquema que se indica en el Figura 4A. Los blancos que consistían en PBS, se montaron por cuadruplicado. Los platos se incubaron a 37 °C por una hora en un agitador orbital, se lavaron 4 veces con un volumen aproximado de 200 µl de PBS-T por pozo, se sacudieron y se secaron sobre servilletas limpias. Con una micropipeta multicanal se depositaron 0.1 ml de la diluciones del conjugado (punto H Cuadro 1) por pozo, de acuerdo a las filas y como se indica en la Figura 4A. Se incubó a 37 °C por una hora agitando y al cabo de este tiempo los platos se lavaron 4 veces con un volumen de 200 µl de PBS-T por pozo, se sacudió y se secó con servilletas limpias. Con la pipeta multicanal se agregó 100 µl del amortiguador sustrato (punto E e I del Cuadro 1) en cada pozo del plato, se incubó por 60 minutos en un lugar oscuro y se detuvo la reacción agregando con una micropipeta multicanal 50 µl de solución stop (punto F del Cuadro 1). Los platos se leyeron a una densidad óptica de 405 nm.

9. Pruebas estadísticas

Para el análisis de los resultados se usó el paquete estadístico Win Episcopo 2.0 (Thrusfield et al., 2001), el que se trabaja en ambiente Microsoft Windows e incluye módulos para pruebas de concordancia, evaluación de resultados, valor umbral y ensayos múltiples.

Para la interpretación de debajo de las áreas de la curvas ROC (receiver operating characteristic curves) se uso el trabajo de Hanley y McNeil (1983). Los parámetros que se

usaron para establecer los valores cortes y la interpretación para el diagnóstico de la brucelosis fueron los establecidos por Gall et al. (1998). y Moreno et al. (1998).

RESULTADOS

En general las pruebas de ELISAI para el diagnóstico de brucelosis poseen una limitante potencial debido a la versatilidad de especies que *Brucella* es capaz de infectar, restringiendo el uso del conjugado. Sin embargo, en el caso de los artiodáctilos (e. g. bovinos, caprinos, ovinos, camélidos) existe amplia reacción cruzada entre las inmunoglobulinas, principalmente de la subclase IgG1, y especialmente entre los bóvidos (Curatin y Fundenberg 1973), por lo que conjugados contra una especie sirven para el diagnóstico de la brucelosis en varios bóvidos (Gall et al., 1998). Tomando en cuenta lo anterior y la cercanía filogenética de los cetáceos (Milinkovitch et al., 1994 y anexo IX), fue que se probó la especificidad del anticuerpo creado contra IgG de delfín de *S. bredanensis*, con el suero de las 16 especies de odontocetos usados para este trabajo. Para este fin se utilizó la inmunodifusión en gel. Como se muestra en la Figura 3 una línea de precipitación común se formó contra las inmunoglobulinas de todas las 16 especies. Una reacción parcial de identidad y una precipitación un poco más débil fue observada contra las especies de *Kogia* spp. Sin embargo, los Ac anti IgG de delfín de *S. bredanensis* reconocieron las inmunoglobulinas de *Kogia* spp. a diluciones mayores de 1/128. No se observó reacción cruzada contra inmunoglobulinas bovinas en inmunodifusión en gel.

Una vez que la especificidad del conjugado se determinó, se escogieron las diluciones óptimas del suero y conjugado así como del LPS de *Brucella* que se utilizó como antígeno. Esta molécula es común para todas las especies lisas, por lo que existe reacción cruzada entre el LPS de *B. abortus* y *B. melitensis* y las especies de brucelas marinas (Baucheron, et al., 2002). Consecuentemente, se probaron diferentes concentraciones de estos dos tipos de antígeno de *Brucella* y se evaluó su reacción ante diferentes diluciones de suero positivo y

negativo así como de conjugado. Se determinó que las condiciones óptimas correspondían a una concentración de 10 µg/ml de LPS purificado de *B. melitensis*, y la dilución más adecuada de conjugado, suero positivo y negativo correspondían a 1/1000 (Figura 3B y Anexo X).

Para determinar la linealidad de la reacción del ELISAI se probaron diluciones seriadas de sueros de tres individuos *S. coeruleoalba* con aislamiento de *Brucella* spp., hasta que la D.O. no variara significativamente de los valores establecidos como blanco. Un promedio de $7.03 \pm 6 \times 10^{-6}$ se obtuvo de los valores de las 3 pendientes (Figura 5B), la que se consideró dentro de los límites de reactividad del ELISAI. Se procedió a seleccionar 4 odontocetos con lecturas de densidad óptica alta, mediana, baja y negativa y valores asignados correspondientes a las diluciones de acuerdo a la pendiente experimental (Figura 5 A). Estos sueros fueron usados en todos los experimentos de ELISAI y fueron clasificados como controles positivo fuerte (+++), positivo (++), positivo débil (+) y negativo. Luego se procedió a determinar si estos valores se repetían en un periodo de un mes usando los mismos reactivos y parámetros establecidos para la pendiente. Como se muestra en la Figura 6A, las lecturas de densidad ópticas del suero positivo y negativo no variaron significativamente del promedio y no hubo traslape en los límites de variación. Mientras que el suero negativo varía menos de 0.02 de unidad de absorbancia en diluciones 1/1000 a 1/15000, los valores del suero positivo decrecieron de manera linear. Tomando en cuenta un nivel de confianza de 95%, los límites superiores e inferiores de la variación del ELISAI fueron cercanas al 11% (Figura 6B). Las lecturas según la D.O de las muestras fueron aceptadas si y solo si los controles estaban dentro del rango de variación de los parámetros antes mencionados.

Se procedió entonces a evaluar el valor diagnóstico de la prueba ELISAI usando sueros de 108 animales. En algunos casos, el suero del mismo animal obtenido semanas o meses después de su primera sangría, fueron tomados en cuenta para la determinación de la sensibilidad y especificidad con respecto a INF o aglutinación con RB (Cuadro 4 y Anexo VI) Como se muestra en la Figura 7 la sensibilidad y la especificidad del ELISAI indirecto se determinó usando como referencia la aglutinación del RB, la INF o la combinación de ambos ensayos. El desempeño del ELISAI es muy bueno cuando el ensayo se comparó con ambas pruebas de INF y RB, teniendo una alta sensibilidad (cercana al 94%) y una especificidad (cercana a 97%) con un valor kappa cercano a 1. Cuando el ELISAI se comparó con la INF, la sensibilidad bajó a un 82%, pero la especificidad se mantuvo buena (93%) con un valor kappa cercano a 0.8 (Figura 8). Finalmente, cuando el ELISAI se comparó con la aglutinación de RB, tanto la sensibilidad como la especificidad disminuyeron (76% y cerca de 89% respectivamente), con un valor kappa cercano a 0.7 (Figura 9). El punto de corte de estos tres análisis estuvo en un rango de D.O de 0.2 y 0.10. El anexo XI muestra los resultados de los análisis serológicos de los 108 odontocetos, de los cuales 36 se consideraron positivos en el ELISAI, 35 positivos en INF y 34 positivos en RB. De los 108 animales 15 presentaron meningoencefalitis, doce fueron considerados positivos en el ELISA (Cuadro 2), los casos de meningoencefalitis fueron mayormente en *S. coeruleoalba*, tres de los cuales con aislamiento de *Brucella* de líquido cefalorraquídeo. El patrón observado en geles de agarosa correspondió exactamente al patrón esperado para las brucelas y acorde con la cepa de *B. abortus* 2308 que se usó como control (Anexo VIII H).

No existe correlación clara entre afección según sexo aunque se ve una predisposición de los odontocetos juveniles. La frecuencia de las reacciones positivas según la especie de

odontoceto se muestra en el Cuadro 3. La reacción serológica más frecuente encontrada fue en los miembros del género *Stenella*, *Steno* y *Tursiops*. Un aislamiento de *Brucella* fue hecho de tejido congelado. El respectivo suero presentó en el ELISAi una lectura positiva fuerte, demostrando su valor predictivo (Anexo VIII).

DISCUSIÓN

Desde 1966 existen reportes de encallamientos de mamíferos marinos en nuestro país, sin embargo, no es hasta 1999 que se empiezan a hacer estudios más especializados para buscar una explicación de las muertes de estos animales. En años recientes se ha informado que para nuestro país la especie que con mayor frecuencia encalla, es el delfín rayado (*S. coeruleoalba*). Algunos de estos animales han sido analizados en la EMV-UNA describiéndose un patrón de meningoencefalitis y patologías relacionadas con el sistema nervioso central (SNC). Con el fin de determinar la causa de la sintomatología y los hallazgos histopatológicos se investigaron diferentes agentes causales que podían producir el patrón antes descrito, por ejemplo Morbilivirus. Sin embargo, todas estas pruebas resultaron negativas. (Morales J.A, EMV-UNA, CR comunicación personal). La neurobrucelosis en esta especie de delfín ya ha sido reportada en España por González et al. (2002), aislándose el microorganismo de tejido nervioso, causando patrones y cuadro clínicos similares a los que se tienen en Costa Rica. La identificación de *Brucella* spp. se realizó en tres individuos de delfín rayado en la EMV y representan el primer reporte de este tipo a nivel latinoamericano. Dichos aislamientos se lograron a partir de líquido cefalorraquídeo y de diferentes órganos del sistema retículo endotelial. Surge a partir de estas observaciones, la certeza de que la invasión del SNC por parte de este parásito bacteriano intracelular, causa meningoencefalitis y posterior encallamiento en cetáceos debido a la sintomatología nerviosa desarrollada, como falta de flotabilidad, opistotonos, temores y convulsiones que de manera aguda causa la muerte del animal. Dicho patrón de virulencia sugiere un comportamiento más agresivo en esta especie de delfines, que puede ser el hospedero natural o bien accidental. En general la invasión del SNC es rara en los hospederos naturales de las brucelas, reportándose

principalmente en los fetos. Sin embargo, en hospederos secundarios accidentales como los seres humanos, la encefalitis es un episodio que puede ocurrir en los individuos no tratados con antibióticos (Godfroid et al., 2005). De los 108 animales analizados, 15 presentaban meningoencefalitis, de los cuales 12 (80%) resultaron positivos en el ELISAi, los restantes 3 (20%) resultaron negativos y la causa de la meningitis fue tentativamente de origen parasitario (*Nasitrema* spp.) o fúngica (*Zygomycetes* spp). Por lo que la incidencia de la meningitis en delfines, especialmente en *S. coeruleoalba*, debida a *Brucella* pareciera ser alta. Sin embargo, hasta no estudiar poblaciones abiertas en su hábitat marino, no se puede determinar esto con certeza.

En términos generales de los 108 animales analizados, un total de 36 (33.33%), resultaron positivos (Anexo XIII). Si bien es cierto, no existen datos en la literatura con los que se pueda comparar la prevalencia y predisposición de sexo o edad, con base en los resultados que aquí se describen, pareciera que no existe una preferencia de sexo, aunque se ve una predisposición de los odontocetos juveniles (Anexo XII-XVI). Debido a que los delfines comienzan su actividad sexual cuando son juveniles, éste podría ser un factor predisponente para la transmisión de la enfermedad en el ambiente marino. Es importante señalar que las muestras accesibles para este trabajo pertenecen en su mayoría a animales que han encallado, por lo tanto son sesgadas. En este sentido se desconoce la verdadera incidencia de la meningitis brucelar y de otras patologías que esta infección bacteriana pueda causar, así como la verdadera prevalencia que la infección posee en poblaciones naturales en el mar. Aunque se han descrito abortos en delfines (Miller et al., 1999), no se sabe el impacto que tiene en condiciones naturales. Lo que sin lugar a duda llama la atención es el elevado número de odontocetos con Ac contra *Brucella* y el número relativamente alto de

aislamientos que se logran, especialmente en Costa Rica, lo que sugiere que aún en condiciones naturales, esta infección es importante en estos mamíferos. (Anexo XVI). Existe por lo tanto un serio riesgo de zoonosis al entrar en contacto con delfines encallados que son rodeados y tocados por personas o bien por medio de “delfinoterapia”, en la cual estos animales marinos se ponen en contacto con personas sanas o bien inmunológicamente comprometidas como mujeres embarazadas o niños con problemas neurológicos. Estas son actividades cada vez más frecuentes a nivel mundial, por lo que resalta la importancia de contar con herramientas diagnósticas para la brucelosis.

Dentro de los objetivos específicos de este trabajo se propuso desarrollar una prueba de ELISAI con alta sensibilidad y especificidad química y serológica. El primer aspecto se desarrolló usando sueros positivos provenientes de animales infectados con aislamientos certificados, el empleo de antígeno purificado (LPS) y creación del conjugado de peroxidasa anti-IgG de delfín específico contra inmunoglobulinas de odontocetos. El segundo aspecto se estimó mediante el ensayo de un número significativo de sueros de odontocetos provenientes de encallamientos, en el banco de sueros del Mote Marine Laboratory, Sarasota, USA, además de los obtenidos en costas costarricenses. Posteriormente se usaron algoritmos matemáticos desarrollados para estimar la sensibilidad y especificidad, aún cuando no existía un patrón de referencia previamente definido (patrón dorado). En conclusión, el ELISAI desarrollado aquí parece poseer una excelente precisión diagnóstica al mostrar una alta sensibilidad y especificidad química y tentativamente serológica, además de un valor predictivo por arriba de las pruebas convencionales, lo que permite trabajar sobre una base confiable y estándar de diagnóstico de brucelosis en delfines, actualmente no se cuenta con pruebas similares a nivel mundial. Por otro lado, es importante señalar que el ELISAI es más

simple de realizar e interpretar que la prueba de ELISA competitivo, ya que no depende de la variación de los reactivos biológicos como los Ac monoclonales y un segundo conjugado (Moreno 2004). Aunque el ELISAI requiere un lector de densidades ópticas, este puede adaptarse para leerse simplemente con un patrón de color. Las muestras se pueden procesar en conjunto o individualmente, y por lo tanto es adecuado para muestras independientes o un número grande de ellas. El costo es relativamente bajo, lo que permite su uso en varios laboratorios de diagnóstico. Tiene la ventaja que al utilizar el LPS de *B. melitensis* como antígeno y las reacciones cruzadas se limitan a bacterias que poseen dentro de su LPS el azúcar perosamina. Algunos ejemplos de bacterias que podría causar reacción cruzada son: *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholera* O1, *E. coli* O:157, *Citrobacter youngae* O:9, *Caulobacter crescentus*, *Citrobacter gilleni* O:9, *Vibrio fluviales* O 09, *Pseudomonas stutzeri* O:1, *Campylobacter yeyuni*. Sin embargo, la mayoría de estas bacterias dan una reacción cruzada leve, por lo que en general no complican el diagnóstico, además de que en su mayoría son parásitos o comensales de animales terrestres.

A nivel práctico el ELISAI desarrollado ha demostrado tener un alto valor predictivo y a manera de ejemplo se puede mencionar que los tejidos congelados de por lo menos uno de los animales analizados en el Mote Marine Laboratory con D.O. elevadas en ELISAI, estaban infectados con *Brucella* spp. El animal había mostrado sintomatología nerviosa y murió pocas horas después de haber llegado a este centro de rehabilitación. De este animal se conservaba un segmento de cerebro congelado a 80 C°. Se sugirió hacer el cultivo para *Brucella* spp. basado en las condiciones utilizadas para los aislamientos logrados en Costa Rica. Luego de aproximadamente 5 días se logró aislar la bacteria, por lo que confiamos que este ELISAI contribuirá en un futuro cercano a responder a incógnitas epidemiológicas como

prevalencia, virulencia, transmisión en poblaciones cautivas y de vida libre, ya que actualmente podría estarse subestimando como causa de encallamientos, enfermedad y mortalidad en estos animales. Además este trabajo logró promover la investigación en aspectos de salud mamíferos marinos a nivel nacional y como consecuencia atrajo la atención de diferentes investigadores tanto a nivel nacional como internacional, dando pie para el desarrollo de proyectos que favorecerán el enriquecimiento del conocimiento con respecto a las patologías que afectan a mamíferos marinos a nivel mundial.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aragón, V., R. Díaz, E. Moreno, & I. Moriyón. 1995. Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from smooth lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 178: 1070-1079.
- Baucheron, S., M. Grayon, M. Zygmunt, & A. Cloeckaert. 2002. Lipopolysaccharide heterogeneity in *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Res. microbiol.* 153: 277-280.
- Brew, S. D., L. L. Perrett, J. A. Stack, & A. P. MacMillan. 1999. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Vet. Rec.* 144: 483.
- Bricker, B. J., D. R. Ewalt, A. P. MacMillan, G. Foster, & S. Brew. 2000. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1258-1262.
- Clavareau, C., V. Wellemans, K. Walravens, M. Tryland, J. M. Verger, M. Grayon, A. Cloeckaert, J. J. Letesson, & J. Godfroid. 1998. Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Microbiol.* 144: 3267-3273.
- Curtain, C. C. & H. H. Fudenberg. 1973. Evolution of the immunoglobulin antigens in the ruminantia. *Biochem. Genet.* 8:301-308.
- Dierauf, L., & F. Gulland. 2001. *CRC Handbook of marine mammal medicine*. 2nd ed. CRC, US.
- Ewalt, D. R., J. B. Payeur, B. M. Martin, D. R. Cummins, & W. G. Miller. 1994. Characterization of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 448-452.
- Forbes, L. B., O. Nielsen, L. Measures, & D. R. Ewalt. 2000. Brucellosis in ringed seals and harp seals from Canada. *J. Wildl. Dis.* 36: 595-598.
- Foster, G., K. L. Jahans, R. J. Reid, & R. M. Ross. 1996. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *Vet. Rec.* 138: 583-586.
- Foster, G., A. P. MacMillan, J. Godfroid, F. Howie, H. M. Ross, A. Cloeckaert, R. J. Reid, S. Brew, & I. A. Patterson. 2002. A review of *Brucella* spp. infection of sea mammals with particular emphasis on insulates from Scotland. *Vet. Microbiol.* 90: 563-580.
- Gall, D., A. Colling, O. Mariño, E. Moreno, K. Nielsen, B. Pérez, & L. Samartino. 1998. Enzyme immunoassays for the serological diagnosis of bovine brucellosis. Trial in Latin America. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 5: 654-661.

- Gall, D., K. Nielsen, L. Forbes, D. Davis, P. Elzer, S. Olsen, S. Balsevicius, L. Kelly, P. Smith, S. Tan, & D. Joly. 2000. Validation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in bison. *J. Wildl. Dis.* 36: 469-476.
- Garner, M. M., D. M. Lambourn, S. J. Jeffries, P. B. Hall, J. C. Rhyan, D. R. Ewalt, L. M. Polzin, & N. F. Cheville. 1997. Evidence of *Brucella* infection in Parafilaroides lungworms in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 298-303.
- Godfroid, J., A. Cloeckert, J. P. Liautard, S. Kohler, D. Fretin, K. Walravens, B. Garin-Bastujl & J. J. Letesson. 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* 36: 313–326.
- González, L., I. A. Patterson, R. J. Reid, G. Foster, M. Barberán, J. M. Blasco, S. Kennedy, F. E. Howie, J. Godfroid, A. P. MacMillan, A. Schock & D. Buxton. 2002. Chronic meningoencephalitis associated with *Brucella sp.* infection in live-stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *J. Comp. Pathol.* 126: 147-152.
- Hanley, J. A., & B. J. McNeil. 1983. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology.* 148: 839-843.
- Harwood, J., & A. Hall. 1990. Mass mortality in marine mammals: its implications for population dynamics and genetics. *Trends. Ecol. Evol.* 5: 254-257.
- Hudson, L., & F. C. Hay. 1976. *Practical immunology.* Blackwell, Oxford, England.
- Jahans, K. L., G. Foster, & E. S. Broughton. 1997. The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet. Microbiol.* 57: 373-382.
- Jensen, A. E., N. F. Cheville, C. O. Thoen, A. P. MacMillan, & G. W. Miller. 1999. Genomic fingerprinting and development of a dendrogram for *Brucella* spp. insolated from seals, porpoises and dolphins. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 152-157.
- Jepson, P. D., S. Brew, A. P. MacMillan, J. R. Baker, J. Barnett, J. K. Kirkwood, T. Kuiken, I. R. Robinson, & V. R. Simpson. 1997. Antibodies to *Brucella* in marine mammals around the coast of England and Wales. *Vet. Rec.* 141: 513-515.
- Lane, D., & E. Harlow. 1999. *Using antibodies : a laboratory manual.* 1st. ed. Cold Spring Harbor, Laboratory, N. Y.
- Lomonte, B. 2000. *Manual de laboratorio de inmunología general.* 2a. ed. Universidad de Costa Rica, San José, C.R.

- López-Goñi I. & I. Morriyón. 2004. *Brucella* molecular and cellular biology. 1st. ed. Horizon bioscience, England.
- McDonald W. L., R. Jamaludin, G. Mackereth, M. Hansen, S. Humphrey, P. Short, T. Taylor, J. Swingle, C. E. Dawson, A. M. Whatmore, E. Stubberfield, L. L. Perrett, & G. Simmons. 2006. Characterization of a *Brucella* sp. as a marine mammal type isolated from a New Zealand patient with spinal osteomyelitis. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.00680-06
- MacKinney M. M., & A. Parkinson. 1987. A simple non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Meth.* 96: 271-278.
- Miller, W. G., L. G. Adams, T. A. Ficht, N. F. Cheville, J. P. Payeur, D. R. Harley, C. House, & S. H. Ridgway. 1999. *Brucella*-induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 30: 100-110.
- Milinkovitch, M. C., A. Meyer, & J. R. Powell. 1994. Phylogeny of all major groups of cetaceans based on DNA sequences from three mitochondrial genes. *Mol. Biol. Evol.* 11:939-948
- Moreno, E. 2002. Brucellosis in Central America. *Vet. Microbiol.* 90:31-38.
- Moreno, E. 2004. Desarrollo y validación de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico de la brucelosis. Manual, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, CONICIT, San José, C R.
- Moreno, E., & I. Morriyón. 2002. The genus *Brucella*. in Dworkin, M., et al., (eds), *The prokaryotes : an evolving electronic resource for the microbiological community*. 3 rd. ed. Springer-Verlag, New York. <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>. (Consulta: 15 ago. 2005).
- Moreno, E., A. Cloeckert, & I. Morriyón. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.* 90: 209-227.
- Moreno, E., N. Rojas, K. Nielsen & D. Gall. 1998. Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America : comparison of different serological assay for the differential diagnosis of brucellosis. Nov 1998. International Atomic Energy Agency, Viena, Austria.
- Moreno, E., M. W. Pitt, L. M. Jones, G. G. Schuring & D. T. Berman. 1979. Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.* 138: 361-369.

- Muñoz, P. M., G. García-Castrillo, P. López-García, J. C. González-Cueli, M. J. De Miguel, C. M. Marín, M. Barberán, & J. M. Blasco. 2006. Isolation of *Brucella* species from a live-stranded striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in Spain. *Vet. Rec.* 158: 450-451.
- Reik, L. M. 1987. A simple non-chromatographic purification procedure for monoclonal antibodies. *J. Immunol. Meth.* 100: 123-130.
- Rhyan J. C., T. Gidlewski, D. R. Ewalt, S. G. Hennager, D. M. Lambourne & S. C. Olsen. 2001. Seroconversion and abortion in cattle experimentally infected with *Brucella* sp. isolated from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 13: 379-382.
- Ross, H. M., G. Foster, R. J. Reid, K. L. Jahans, & A. P. MacMillan. 1994. *Brucella* species infection in sea- mammals. *Vet. Rec.* 134: 359.
- Ross, H. M., K. L. Jahans, A. P. MacMillan, R. J. Reid, P. M. Thompson, & G. Foster. 1996. *Brucella* species infection in North Sea seal and cetacean populations. *Vet. Rec.* 138: 647-648.
- Sáenz, J., G. Wong, & E. Carrillo. 2004. Ballenas y delfines de América Central : descripción de los subórdenes de los cetáceos. 1a. ed. INBio, Heredia, C.R.
- Sohn, A. H., W. S. Probert, C. A. Glaser, N. Gupta, A. W. Bollen, J. D. Wong, E. M. Grace, & W. C. Mc Donald. 2003. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 485-488.
- Thrusfield M., C. Ortega, I. de Blas, J.P. Noordhuizen & K Frankena. 2001. Win Episcopo 2.0 : improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* 148:567-572.
- Tryland, M., L. Kleivane, A. Alfredsson, M. Kjeld, A. Arnason, S. Stuen & J. Godfroid. 1999. Evidence of *Brucella* infection in marine mammals in the North Atlantic Ocean. *Vet. Rec.* 144: 588-592.
- Van Bresseem, M. F., K. Van Waerebeek, J. A. Raga, J. Godfroid, S. D. Brew & A. P. Mac Millan. 2001. Serological evidence of *Brucella* species infection in odontocetes from the South Pacific and the Mediterranean. *Vet. Rec.* 148: 657-661.

Cuadro 1. Metodología para la preparación de las soluciones utilizadas el ELISAI.

Solución	Metodología	Almacenamiento
A. PBS 1 X	Amortiguador de fosfatos salino 0.01 M pH 7.2 En 1 litro de ddH ₂ O se diluyó 8 gr NaCl 7, 1.4 gr. Na ₂ HPO ₄ , 0.2 gr. KCl, 0.2 gr K ₂ H ₂ PO ₄ , y se ajusta el pH a 7.2	4 C°.
B. PBS-T	PBS-Tween-20 0.05%: En 1 litro de PBS se agregó 0.5 ml de Tween 20	4 C°.
C. Buffer dilución	PBS-T-BSA 0.1%: En un 1 litro de PBS-T se disuelve 1g de BSA a temperatura ambiente (T.A.)	No se almacena
D. Buffer lavado	PBS-T: Se mezcló 125 ml de PBS- Tween 20 0.05%, con 500 ml de ddH ₂ O y se le adicionó 250 ul de Tween 20	4 C°.
E. Buffer sustrato	Buffer de acetato de sodio y ácido cítrico 0.05 M pH 4.5): Se disolvieron 7.3g de ácido cítrico y 7.3g de acetato de sodio en 500 ml de ddH ₂ O. Se reguló el pH a 4.5.	4 C°.
F. Solución Stop	Solución 2M de H ₂ SO ₄ : Se tomó 1.1 ml de H ₂ SO ₄ 98% y se disolvió gota a gota en 8 ml de ddH ₂ O. Se ajustó a 10 ml con ddH ₂ O.	Temperatura ambiente
G. Antígeno	LPS de <i>B. melitensis</i> 16M y de <i>B. abortus</i> 2308: 1mg/ml de LPS en ddH ₂ O, se sonicó y se alicuotó en volúmenes de 0.1ml.	-20 C° en condiciones estériles.
H. Conjugado	IgG antidelfín-HRPO: La preparación se hizo 15 minutos antes de usarse. El conjugado se sacó del congelador a -20 C° protegido de la luz. Posteriormente se diluyó en PBS-T-BSA	No se almacena
I. Sustrato	Se mezcló 12 ml de buffer sustrato (sección E) con 300 µl de ABTS y 60 µl de H ₂ O ₂ al 3%.	No se almacena

Cuadro 2. Distribución de los resultados de la prueba ELISAI según el sexo, edad, procedencia y patología de 108 odontocetos

	ELISA + (%)	ELISA - (%)	Total (%)
Sexo			
Hembra	19 (17.59)	30 (27.78)	49 (45.37)
Macho	17 (15.74)	42 (38.89)	59 (54.63)
Edad			
Cría	3 (2.78)	12 (11.11)	15 (13.89)
Juvenil	11 (10.19)	12 (11.11)	23 (21.30)
Adulto	16 (14.81)	32 (29.63)	48 (44.44)
No definido	6 (5.56)	16 (14.81)	22 (20.37)
Procedencia			
Costa Rica			
Pacífico Norte	1 (0.93)	1 (0.93)	2 (1.85)
Pacífico Central	2 (1.85)	0 (0.00)	2 (1.85)
Pacífico Sur	4 (3.70)	1 (0.93)	5 (4.63)
Florida (USA)	27 (25.00)	72 (66.67)	99 (91.67)
Patología			
Meningoencefalitis	13 (12.04)	2 (1.85)	15 (13.89)
Otras patologías	23 (21.30)	70 (64.81)	93 (86.11)

Cuadro 3. Distribución de los resultados de la prueba ELISAI según la especie de 108 odontocetos.

Espece	ELISA + (%)	ELISA – (%)	Total (%)
<i>Delphinus delphis</i>	0 (0.00)	1 (0.92)	1 (0.92)
<i>Feresa attenuata</i>	1 (0.92)	2 (1.85)	3 (2.78)
<i>Grampus griseus</i>	1 (0.92)	1 (0.92)	2 (1.85)
<i>Kogia simus</i>	0 (0.00)	5 (4.63)	5 (4.63)
<i>Kogia breviceps</i>	2 (1.85)	10 (9.26)	12 (11.11)
<i>Mesoplodon eurapeus</i>	0 (0.00)	1 (0.92)	1 (0.92)
<i>Lagenodelphis hosei</i>	5 (4.63)	19 (17.5)	24 (22.22)
<i>Peponocephala electra</i>	0 (0.00)	1 (0.92)	1 (0.92)
<i>Physeter macrocephalus</i>	0 (0.00)	1 (0.92)	1 (0.92)
<i>Stenella attenuata</i>	0 (0.00)	1 (0.92)	1 (0.92)
<i>Stenella clymene</i>	0 (0.00)	6 (5.55)	6 (5.55)
<i>Stenella coeruleoalba</i>	8 (7.40)	1 (0.92)	9 (8.33)
<i>Stenella frontalis</i>	1 (0.92)	0 (0.00)	1 (0.92)
<i>Stenella longirostris</i>	1 (0.92)	0 (0.00)	1 (0.92)
<i>Steno bredanensis</i>	8 (7.40)	6 (5.55)	14 (12.96)
<i>Tursiops truncatus</i>	9 (8.33)	17 (15.74)	26 (24.07)
Total	36 (33.33)	72 (66.67)	108 (100)

Cuadro 4. Comparación de los resultados según la densidad óptica en el ELISAi, inmunofluorescencia indirecta y Rosa de Bengala en el suero de 108 odontocetos.

Densidad óptica a 405 nm	ELISA (%)	Inmunofluorescencia			Rosa de Bengala	
		Pos (%)	Neg (%)	NA(%) ^a	Pos (%)	Neg (%)
>0.70	13 (12.03)	11 (10.18)	0 (0.00)	2 (1.85)	12 (11.11)	1 (0.92)
0.69 - 0.30	9 (8.33)	6 (5.55)	0 (0.00)	3 (2.78)	7 (6.48)	2 (1.85)
0.29 - 0.175	14 (12.96)	7 (6.48)	3 (2.78)	4 (3.70)	6 (5.55)	8 (7.40)
<0.174	72 (66.67)	11 (10.18)	53 (49.07)	8 (7.40)	9 (8.33)	63 (58.33)

^a No analizado

ELISA Indirecto

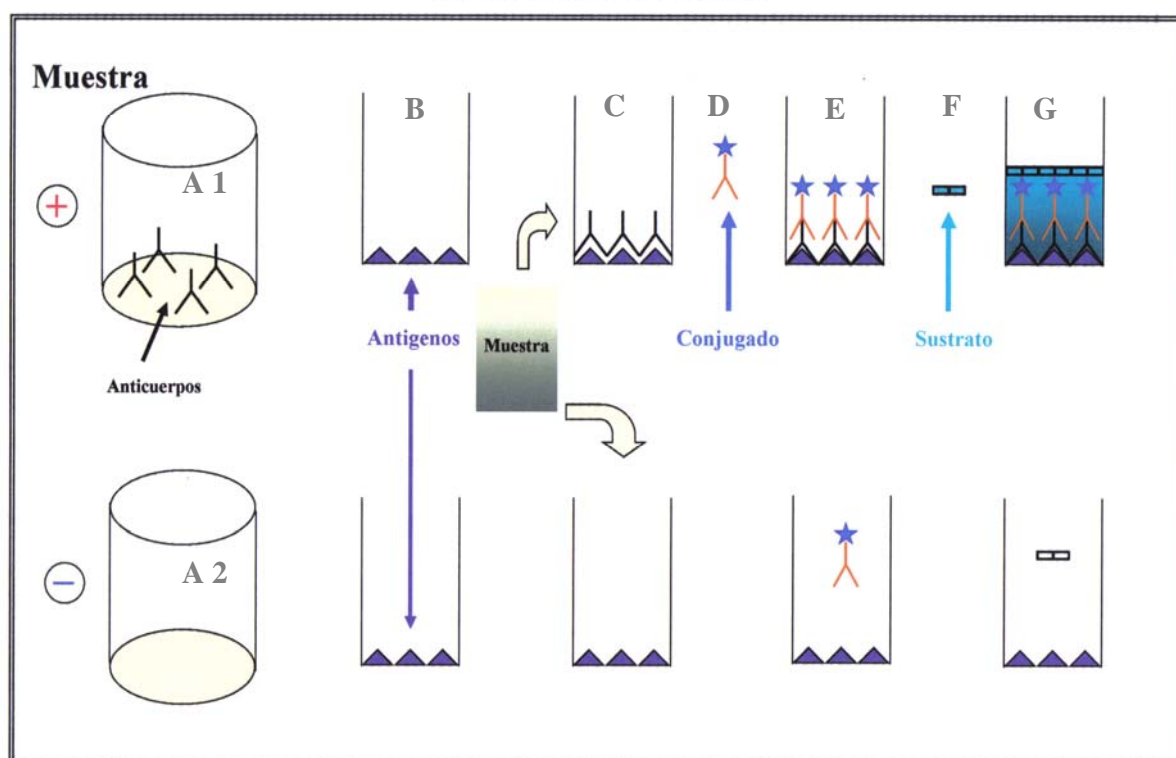


Figura 1. Ensayo de ELISAI para el diagnóstico de brucelosis en delfines. El antígeno LPS de *B. melitensis* (B) se agrega a cada uno de los pozos de las placas. La placa se lava y se agregan los sueros sospechosos de poseer anticuerpos anti-*Brucella* (A1 y A2). En caso que exista anticuerpos, estos se unen al antígeno que reacciona cruzadamente con todos los odontocetos (C). Después de lavar, se agrega el conjugado de anti-delfín-HRPO (D). Se incubaba para que haya reacción con el primer anticuerpo (E). Se procede a lavar, para luego agregar el sustrato incoloro (F) que al reaccionar con el conjugado se transforma en una sustancia coloreada. Una reacción positiva es aquella que da color (G) Las reacciones pueden ir desde fuertemente positivas hasta negativas. La intensidad de color es proporcional a la concentración de anticuerpos contra el LPS en el suero.

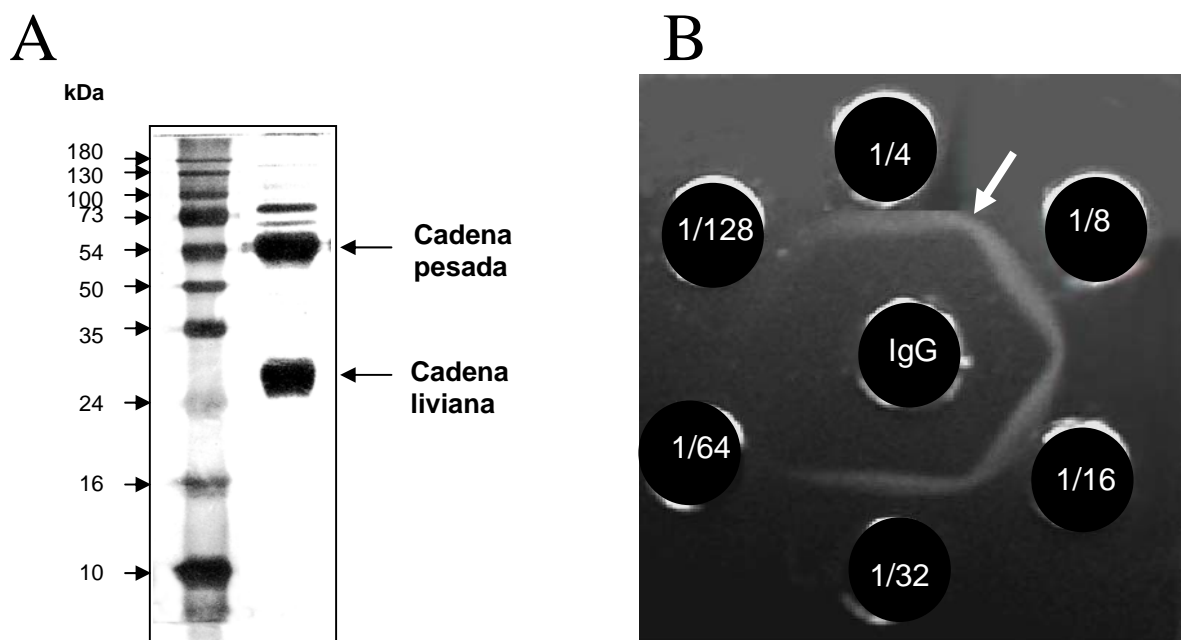


Figura 2. Prueba de SDS-PAGE e inmunodifusión en gel. IgG purificada de *S. bredanensis* (IgG) se corrió en SDS-PAGE y se tiñó con plata (A) o bien se colocó en un el pozo central y se probó contra diluciones seriadas de 1/4 a 1/128 (en la periferia) de anticuerpo de conejo anti IgG de delfín (B). En (A), se pudo ver la cadena pesada (~50 kD) y liviana (25 kD). En (B) se muestra la reacción positiva, la que forma una línea de precipitación (flecha).

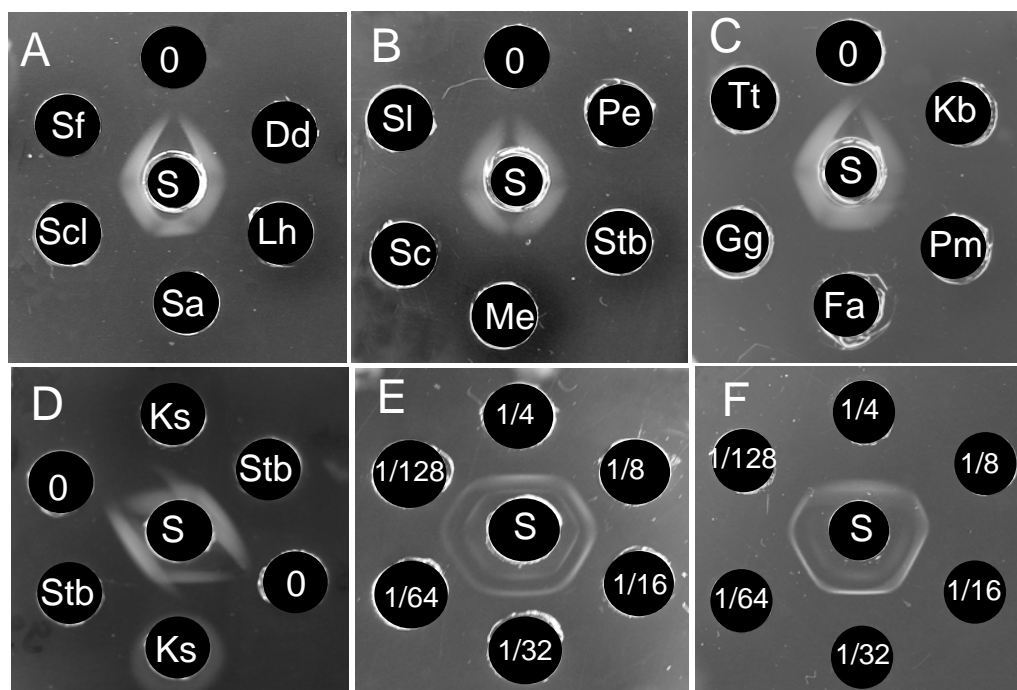


Figura-3. Inmunodifusiones de los diferentes sueros de odontocetos contra IgG de conejo anti IgG de *Steno bredanensis* (S). A favor de las manecillas del reloj: (A) 0, PBS; Dd, *Delphinus delphis*; Lh, *Lagenodelphis hosei*; Sa, *Stenella attenuata*; Scl, *S. clymene*; Sf, *S. frontalis*. (B) 0, PBS; Pe, *Peponocephala electra*; Stb, *S. bredanensis*; Me, *Mesoplodon eurapeus*; Sc, *S. coeruleoalba*; Sl, *S. longirostris*. (C) 0, PBS; Kb, *Kogia breviceps*; Pm, *Physeter macrocephalus*; Fa, *Feresa attenuata*; Gg, *Grampus griseus*; Tt, *Tursiops truncatus*. (D) Ks, *Kogia sima*; Stb, *S. bredanensis*, 0, PBS. (E) diluciones seriadas de suero de *K. sima*; (F) diluciones seriadas de suero de *S. bredanensis*.

A

Conjugado		1/100	1/100	1/250	1/250	1/500	1/500	1/1000	1/1000	1/2500	1/2500	-	1/500
Suero		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/250	A	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P5	X	C-
1/500	B	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P5	X	C-
1/1000	C	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P5	X	C-
1/2000	D	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P5	X	C-
1/5000	E	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P5	X	C-
1/7500	F	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P5	X	C-
1/10000	G	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P5	X	C-
1/20000	H	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P5	X	C-

P1-P5: Sueros control positivo; X: blanco de PBS; C-: Suero control negativo

B

Conjugado	Suero	<i>B. abortus</i> LPS 10µg/ml						<i>B. melitensis</i> LPS 10µg/ml					
		1/1000	1/1000	1/2500	1/2500	1/4000	1/4000	1/1000	1/1000	1/2500	1/2500	1/4000	1/4000
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/500	A	1.054	1.052	0.498	0.496	0.238	0.229	1.044	1.910	0.907	0.907	0.377	0.375
1/1000	B	0.779	0.801	0.369	0.371	0.132	0.162	1.238	1.443	0.689	0.687	0.276	0.290
1/1500	C	0.451	0.493	0.252	0.257	0.129	0.126	0.1143	0.1069	0.497	0.496	0.210	0.215
1/2000	D	0.435	0.466	0.249	0.246	0.123	0.117	0.968	0.933	0.469	0.459	0.190	0.211
1/500	E	0.290	0.294	0.161	0.171	0.089	0.093	0.235	0.230	0.122	0.114	0.083	0.082
1/1000	F	0.185	0.182	0.107	0.109	0.072	0.065	0.140	0.141	0.096	0.089	0.064	0.064
1/1500	G	0.147	0.150	0.095	0.097	0.065	0.069	0.131	0.127	0.088	0.087	0.064	0.063
1/2000	H	0.043	0.045	0.052	0.051	0.053	0.049	0.041	0.043	0.050	0.048	0.051	0.048

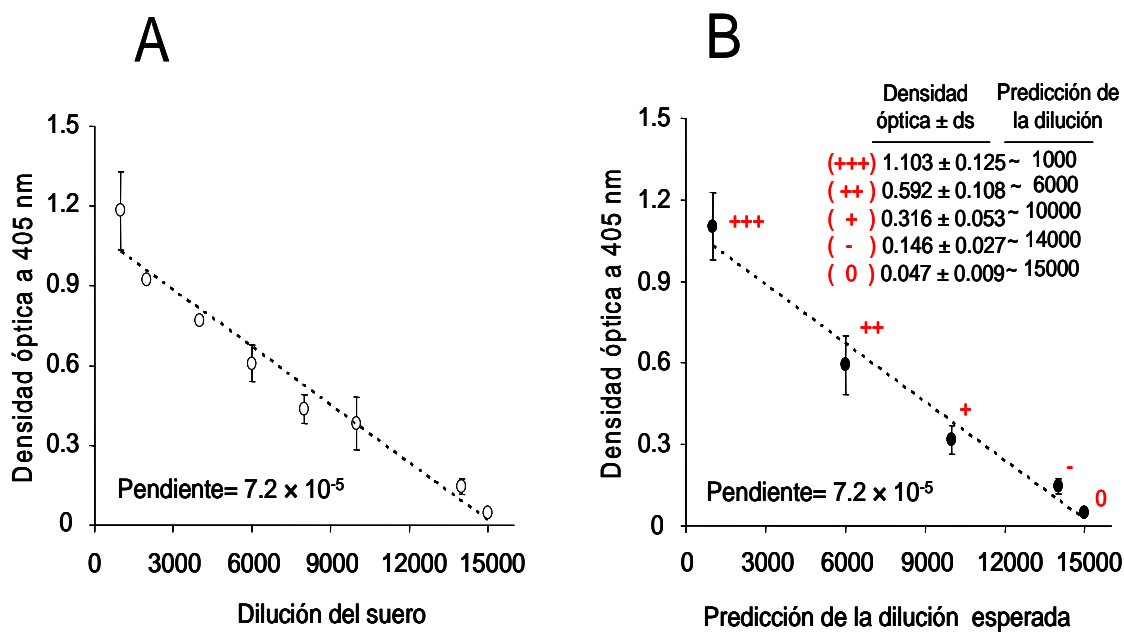
De A-D suero positivo (aislamiento de *Brucella sp.*), E-H suero negativo (animal sano, RB negativo, INF negativo)

C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+++	-	M1	M1	M5	M5	M9	M9	M13	M13	M17	M17
B	+++	-	M1	M1	M5	M5	M9	M9	M13	M13	M17	M17
C	++	+	M2	M2	M6	M6	M10	M10	M14	M14	M18	M18
D	++	+	M2	M2	M6	M6	M10	M10	M14	M14	M18	M18
E	+	++	M3	M3	M7	M7	M11	M11	M15	M15	M19	M19
F	+	++	M3	M3	M7	M7	M11	M11	M15	M15	M19	M19
G	-	+++	M4	M4	M8	M8	M12	M12	M16	M16	M20	M20
H	-	+++	M4	M4	M8	M8	M12	M12	M16	M16	M20	M20

++ (D.O.=1.103 ± 0.125), ++ (D.O.=0.592 ± 0.108), + (D.O.=0.316 ± 0.053), - (0.146 ± 0.027), -/- (D.O.=0.047 ± 0.009),
muestras M1-M20

Figura 4 Estandarización de sueros y conjugado para la prueba ELISAi. (A) Distribución de las diluciones seriadas de los sueros positivos en filas (A a la H) y del conjugado en columnas (1-10). (B) D.O. obtenidas según la distribución de sueros y conjugados. Para esta prueba se utilizaron rangos de dilución más próximos, pues ya se había establecido anteriormente los valores aproximados según el conjugado y sustrato para esta prueba. En este caso se hizo la comparación entre LPS de *B. abortus* y *B. melitensis* obteniéndose mejores resultados con *B. melitensis* En negrita se resalta las diluciones escogidas para su uso en el ELISA debidos a los factores establecidos en el apartado 2.7.3. (C) Esquema de la distribución de controles y muestras utilizados en el ELISA.



Pendiente de la curva en el ensayo = $7.03 \pm 0.6 \times 10^{-5}$
 n = 3 sueros positivos

Figura 5. Diluciones experimentales de un suero control positivo (aislamiento de *Brucella* positivo) hasta alcanzar los niveles basales del blanco (A). Proporcionalidad del ensayo de ELISAi en diluciones seriadas de sueros positivos y ajuste de controles (B).

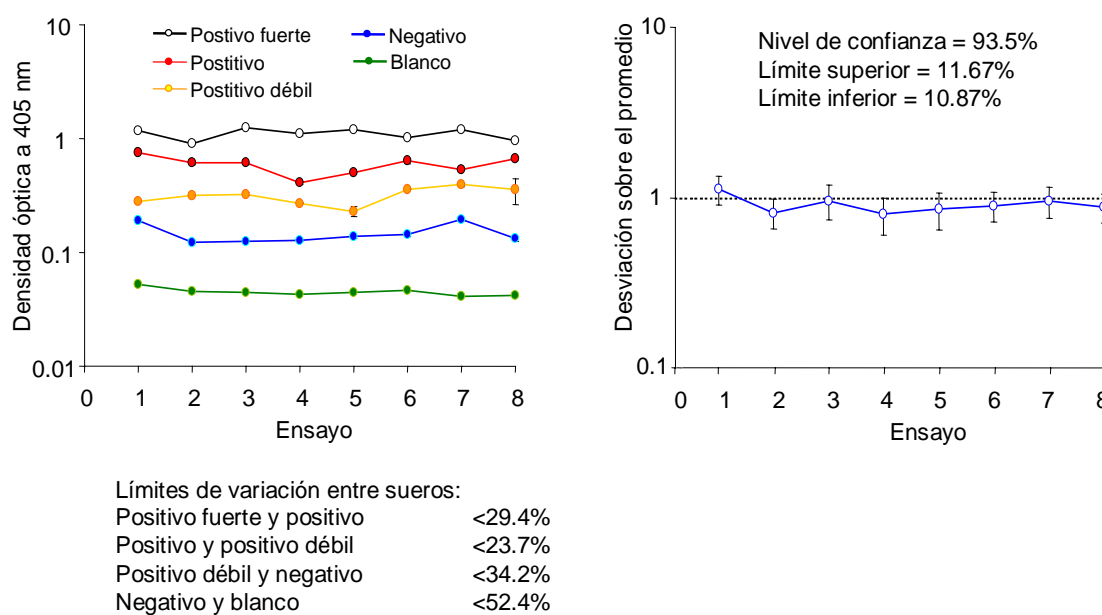


Figura. 6. Evaluación de la variabilidad durante las repeticiones del ELISAI de los controles y los límites de confianza de variación de este ensayo. (A) Se determinó que la variación durante 8 ensayos diferentes hechos durante el transcurso de un mes (dos por semana) entre los controles positivos, negativo y el blanco. (B), Variación del promedio de los controles en cada punto (ensayo) con respecto al promedio general (promedio de todos los puntos). Los límites de variación se indican en figura.

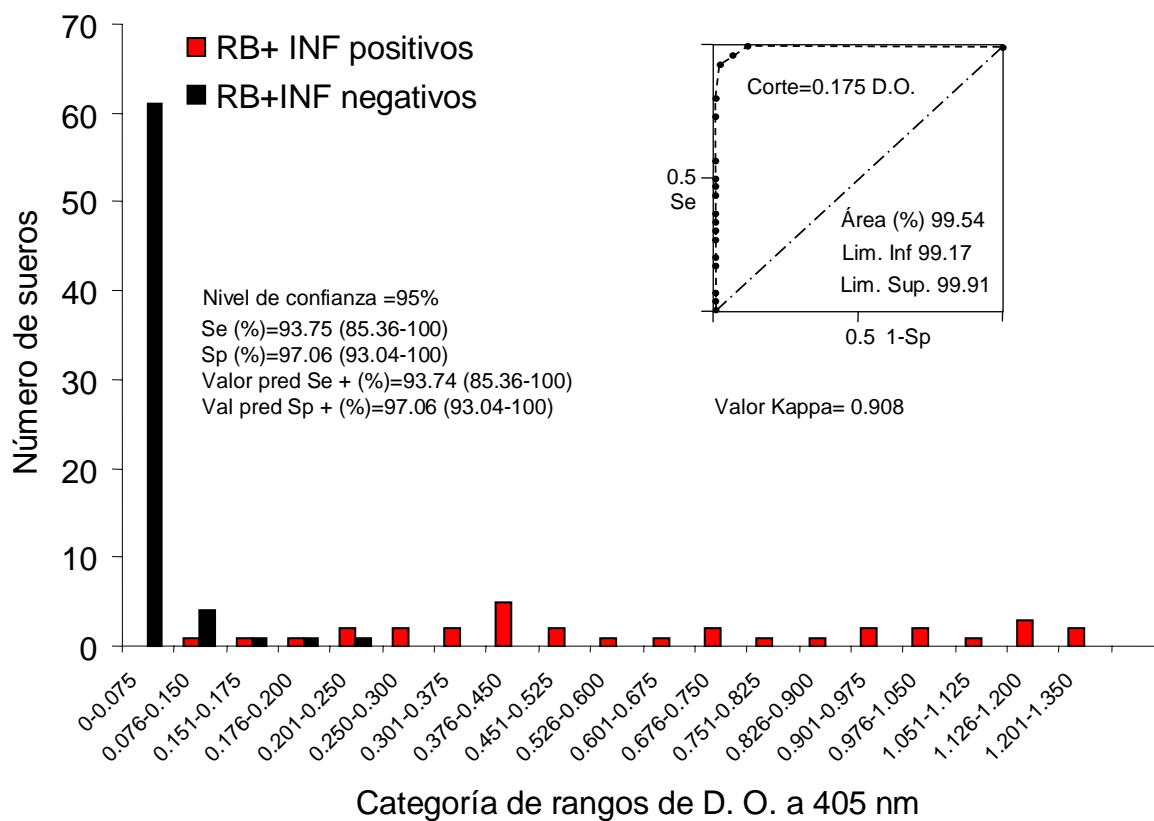


Figura 7. Distribución de las D. O. de los sueros según resultados del ELISAI respecto a las pruebas conjuntas de INF y RB. Barras negras los sueros negativos por INF y RB, barras rojas los sueros positivos en ambas pruebas. Los valores de sensibilidad (Se) y especificidad (Sp), punto de corte, así como los rangos y el valor kappa se indican en la figura.

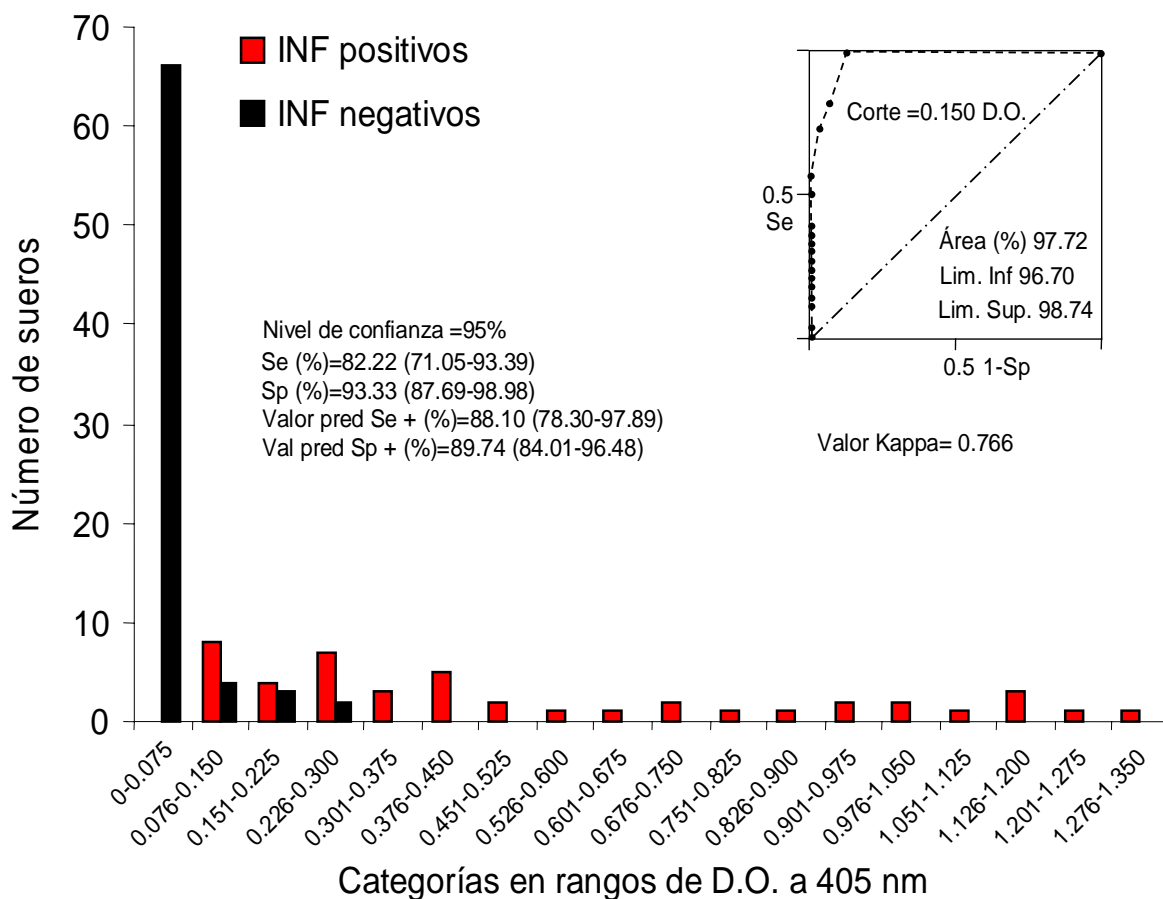


Figura 8. Distribución de las D. O. de los sueros según resultados del ELISAI respecto a las prueba de INF. Barras negras los sueros negativos por INF y RB, barras rojas los sueros positivos en INF. Los valores de sensibilidad (Se) y especificidad (Sp), punto de corte, así como los rangos y el valor kappa se indican en la figura.

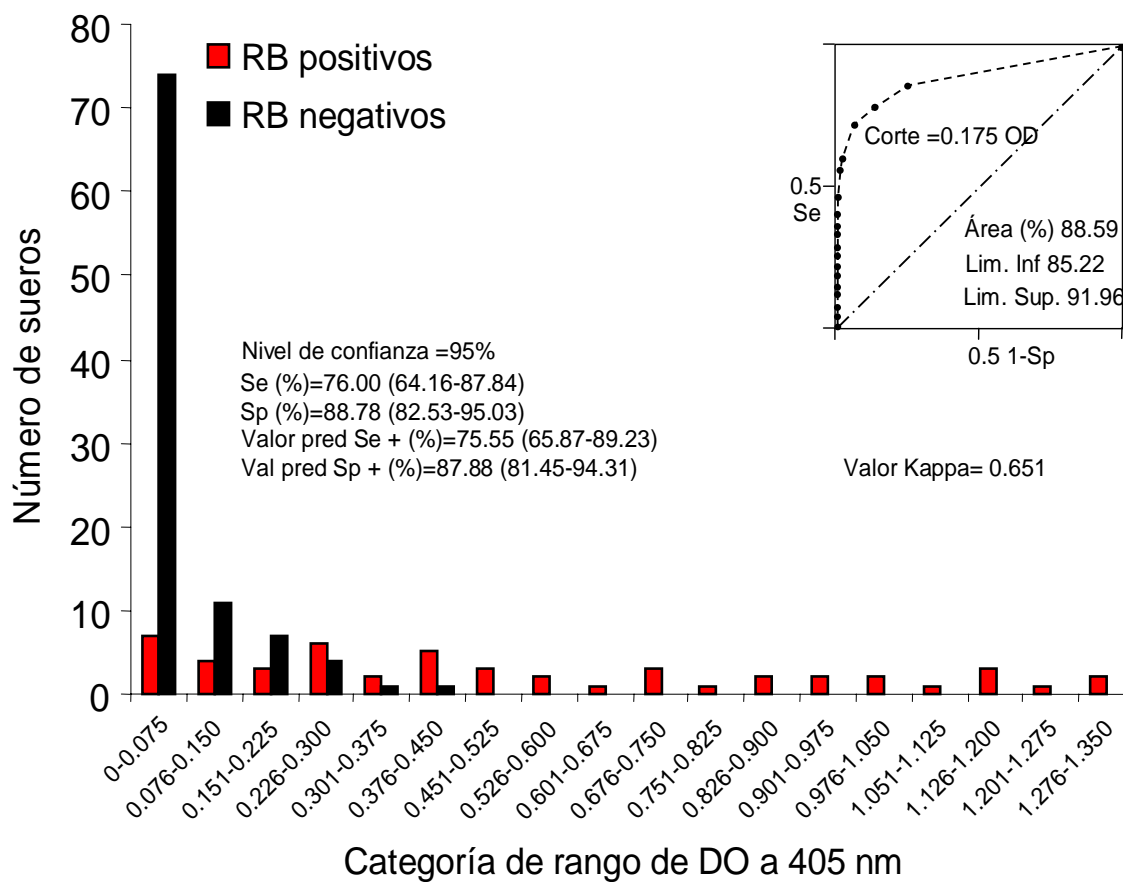


Figura 9 . Distribución de las D. O. de los sueros según resultados del ELISAi respecto a las prueba de RB. Barras negras los sueros negativos por INF y RB, barras rojas los sueros positivos en RB. Los valores de sensibilidad (Se) y especificidad (Sp), punto de corte, así como los rangos y el valor kappa se indican en la figura.

Anexos

I. Actividades en donde los delfines de vida libre o provenientes de cautiverio se ponen en contacto con personas sanas e inmunológicamente comprometidas, mujeres embarazadas, niños e individuos con problemas neurológicos.

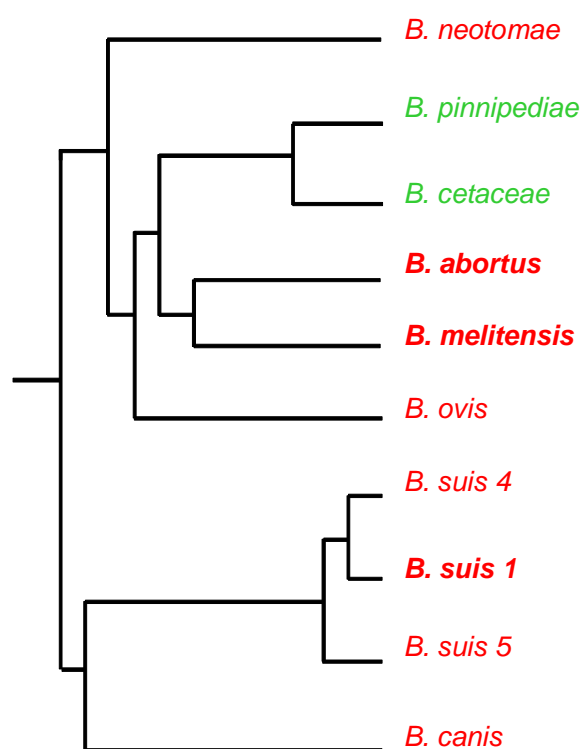


II. Ubicación geográfica de los sueros recolectados en Costa Rica durante los años 2004, 2005 y 2006. Pacífico Norte (Playa Tambor,) Pacífico Central (Playa Esterillos y Playa Guacalillo), Pacífico Sur (Playa Matapalo y Playa Tortuga).

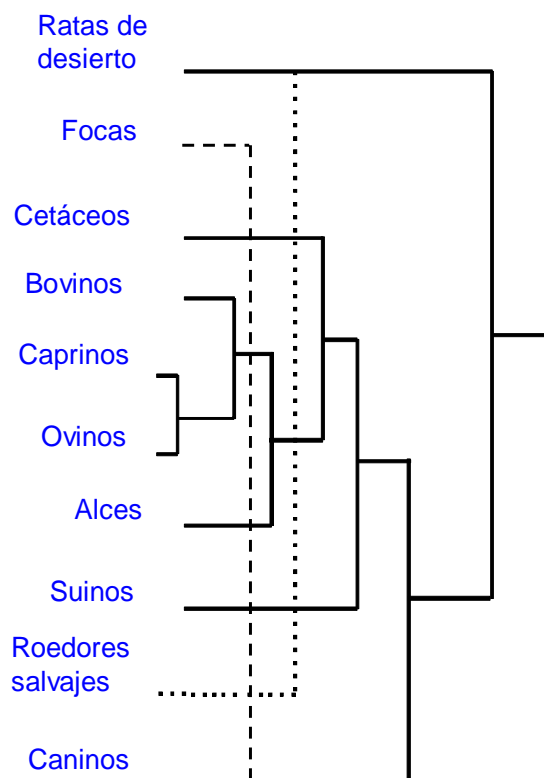


III. Relación filogenética de las especies de *Brucella* y sus hospedadores. Nótese la cercanía evolutiva entre *B. abortus* y *B. melitensis* con *B. cetaceae* y *B. pinnipediae*. Esto concuerda con la evolución de sus hospedadores ya que tanto los cetáceos y ungulados tiene un ancestro en común que se separó hace unos 50 millones de años.

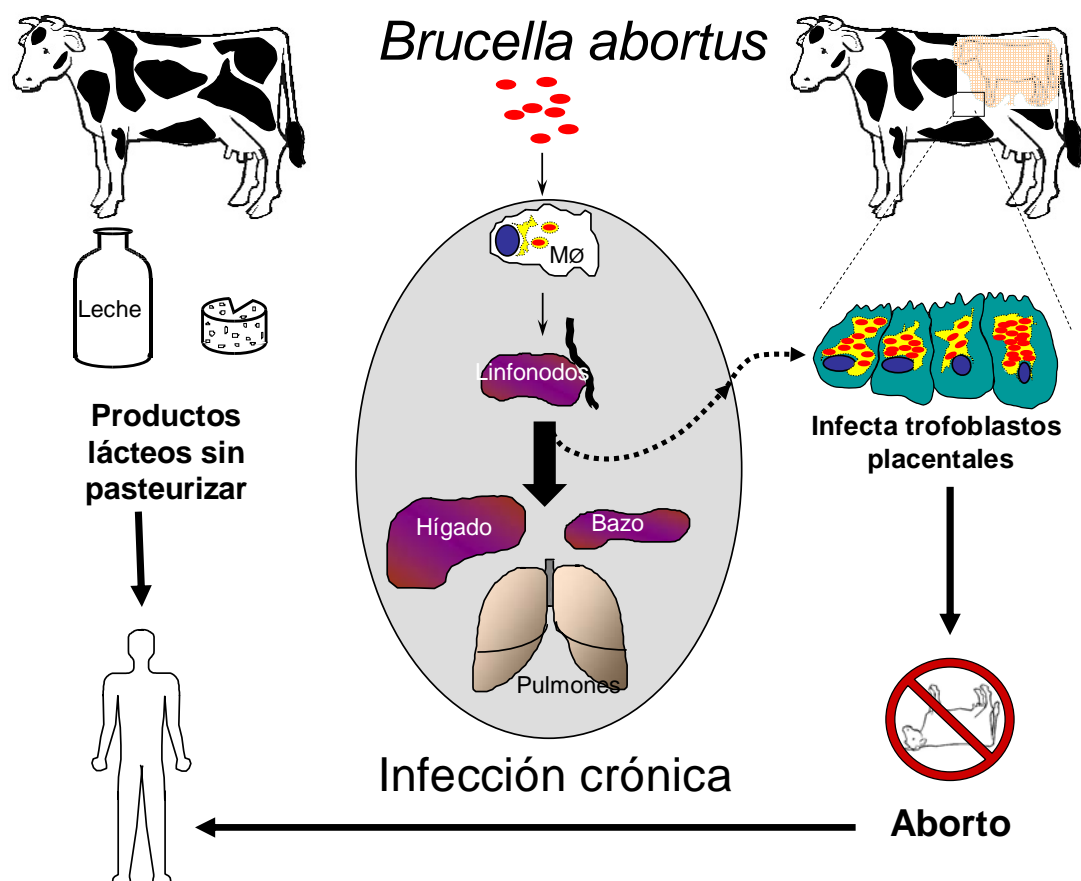
Especiación de *Brucella*



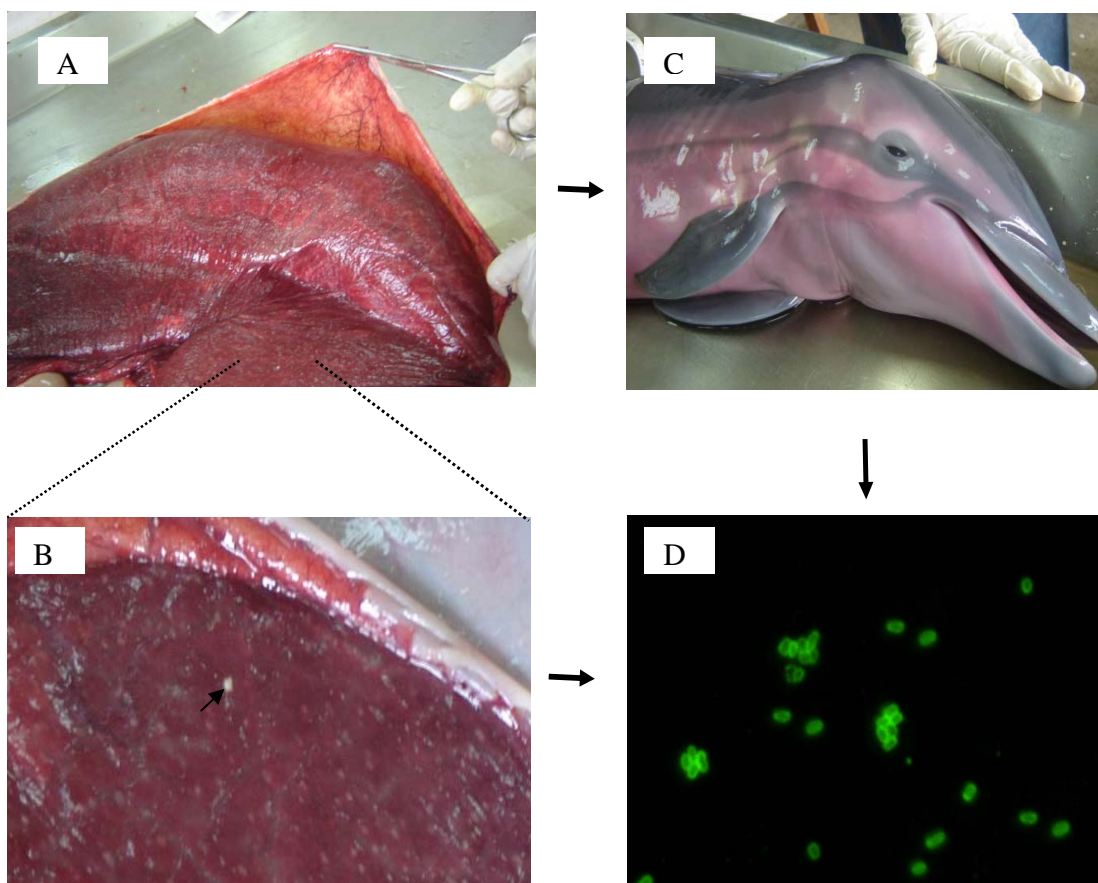
Especiación del hospedero



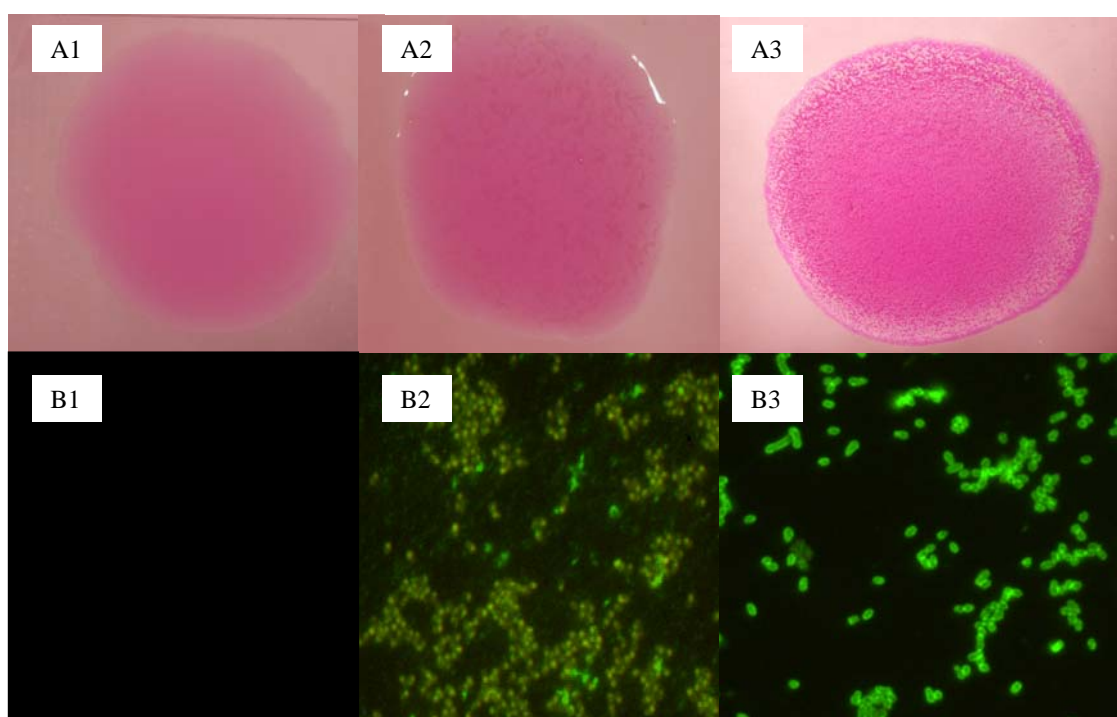
IV. Patogénesis de *Brucella abortus*. La bacteria ingresa por mucosas y es transportado por macrófagos a linfonodos y órganos como hígado, bazo y pulmones, cuando el animal esta en la última parte de la gestación infecta trofoblastos y causa aborto. Los humanos se pueden contagiar directamente con abortos o por medio de productos lácteos sin pasteurizar.



V. Placentitis causada por *Brucella* spp. en delfín rayado (*S. coeruleoalba*). Al igual que en mamíferos terrestres *Brucella* es causante de problemas reproductivos en cetáceos. (A) Placenta de delfín rayado. (B) Placentitis, nótese los focos de infección (flecha). (C) Feto. (D) Inmunofluorescencia directa para la detección de *Brucella* spp de improntas de placenta.

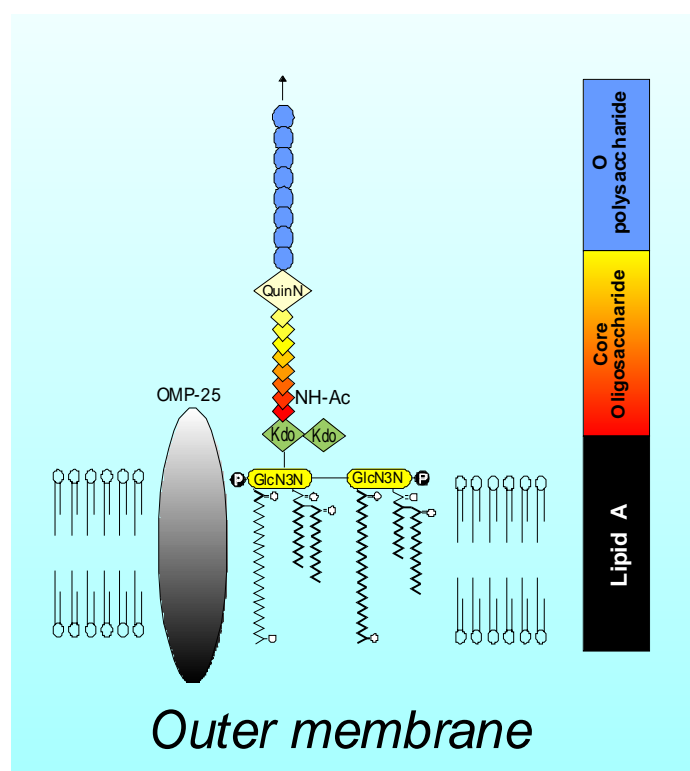


VI. Clasificación de los sueros de odontocetos de acuerdo con las reacciones observadas en (A) RB e (B) INF (A 1) Reacción negativa. (A 2) Falsos positivo, las aglutinaciones no son homogéneas. (A 3) Reacción positiva de una animal con aislamiento de *Brucella* spp. (B 1) Reacción negativa.(B 2) Falsos positivos, la señal no es homogénea (B3) Reacción positiva de un animal con aislamiento de *Brucella* spp.

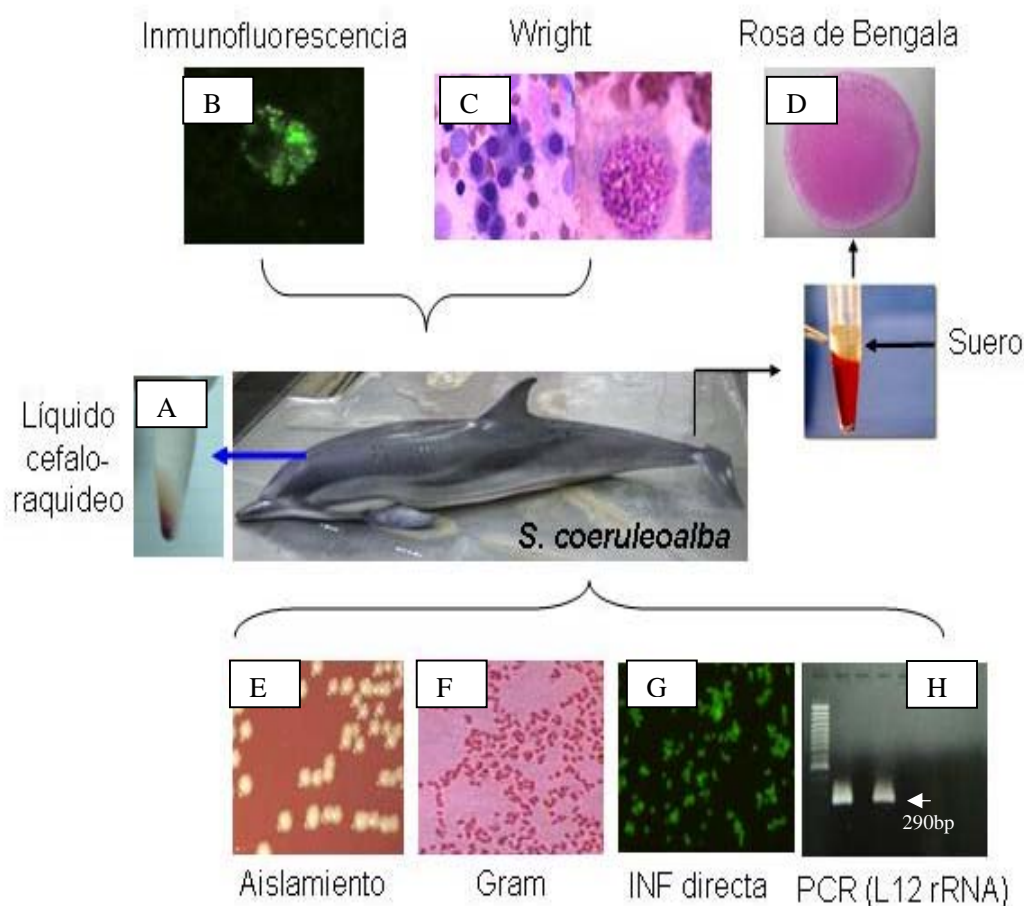


VII. Esquema del LPS de *Brucella* spp. El LPS es altamente inmunogénico y constituye el antígeno más importante de las brucelas, generándose gran cantidad de anticuerpos contra esta molécula durante las infecciones sobre todo de la clase IgG1. EL LPS es una molécula anfipática y está constituida por tres secciones: la cadena O de carácter hidrofílico, que es la porción que posee los epitopos comunes de N-formil perosamina con los que reaccionan los anticuerpos, el oligosacárido central de ketosas y aminoazúcares, y el lípido A hidrofóbico

LPS de *B. melitensis*



VIII. Aislamiento de *Brucella* spp. de delfín rayado (*S. coeruleoalba*). (A) Se recolectó líquido cefalorraquídeo (LCR), se centrifugó y se observó la presencia de un “buffy coat” inusual en éste. (B) Por medio de INF para la detección de *Brucella*, se confirmó la presencia de esta bacteria en macrófagos presentes en LCR. (C) Por medio de Tinción Wright se determinó que el infiltrado en LCR era de tipo mononuclear. (D) En RB mostró un título de 1:8 (E) El cultivo mostró colonias pequeñas y redondas típicas *Brucella* spp. (F) Bajo tinción de Gram se mostraron como Gram negativas (G) La inmunofluorescencia indirecta mostró una reacción positiva (H) Se determinó por medio de PCR que las bacterias aisladas pertenecían al género *Brucella* gracias a la utilización de imprimadores para L12 ribosomal específica del género *Brucella* spp. El patrón observado en geles de agarosa correspondió exactamente al patrón esperado para las brucelas y acorde con la cepa de *B. abortus* 2308 que se usó como control.



IX . Densidades ópticas del ELISA, aglutinación con antígeno RB, prueba de INF y disposición final o causa de muerte

Código*	Densidad	Óptica	RB	INF	Disposición final/Causa de muerte
Me M USA 16	0,041 ± 0,005		N	NA	Cardiomiopatía
Ks H USA 30.2	0,042 ± 0,002		N	N	Impactación colónica
Kb M USA 26.2	0,042 ± 0,002		N	N	Bloqueo intestinal
Tt M USA 36.1	0,043 ± 0,002		N	N	Liberado
Kb H USA 8.1	0,044 ± 0,009		N	N	Fallo renal
Kb H USA 27.3	0,045 ± 0,002		P 1:1	NA	Cardiomiopatía
Lh H USA 74	0,045 ± 0,001		N	N	Liberado
Tt M USA 36.2	0,045 ± 0,002		N	N	Liberado
Kb H USA 8.2	0,045 ± 0,005		N	N	Fallo renal
Ks M USA 56	0,046 ± 0,001		N	N	Cardiomiopatía
Stb H USA 29.1	0,046 ± 0,002		N	N	Saludable residente
Lh M USA 100	0,047 ± 0,001		N	N	Liberado
Pm H USA 58	0,047 ± 0,003		N	N	Eutanaziado
Sc M USA 65	0,047 ± 0,001		P 1:1	N	ND
Tt M USA 35	0,047 ± 0,003		N	N	Liberado
Lh H USA 90	0,047 ± 0,004		N	N	Liberado
Tt M USA 40.2	0,047 ± 0,009		N	NA	Saludable residente
Kb M USA 26.1	0,047 ± 0,002		N	N	Bloqueo intestinal
Stb M USA 44.1	0,047 ± 0,002		N	N	Encefalitis fúngica
Sc1 M USA 68	0,047 ± 0,003		N	N	ND
Tt M USA 62	0,047 ± 0,002		P 1:1	N	Trauma
Kb H USA 28.2	0,047 ± 0,004		N	NA	RGI
Fa M USA 17	0,048 ± 0,001		N	N	Meningitis parasitaria
Lh H USA 99	0,048 ± 0,005		N	N	Liberado
Lh H USA 75	0,048 ± 0,001		N	N	Liberado
Tt M USA 63	0,048 ± 0,001		N	N	Edema pulmonar
Kb H USA 28.3	0,048 ± 0,001		N	NA	RGI
Kb H USA 28.4	0,049 ± 0,004		N	NA	RGI
Lh H USA 80	0,049 ± 0,002		N	N	Liberado
Sc1 M USA 71	0,049 ± 0,002		N	N	ND
Sc1 M USA 69	0,049 ± 0,002		N	NA	ND
Kb H USA 3	0,049 ± 0,008		N	N	RGI
Lh M USA 57	0,049 ± 0,003		P 1:1	NA	ND
Kb M USA 22.1	0,049 ± 0,001		N	NA	Cardiomiopatía
Tt M USA 37.1	0,049 ± 0,001		N	N	Liberado
Kb M USA 33.1	0,050 ± 0,003		N	N	RGI

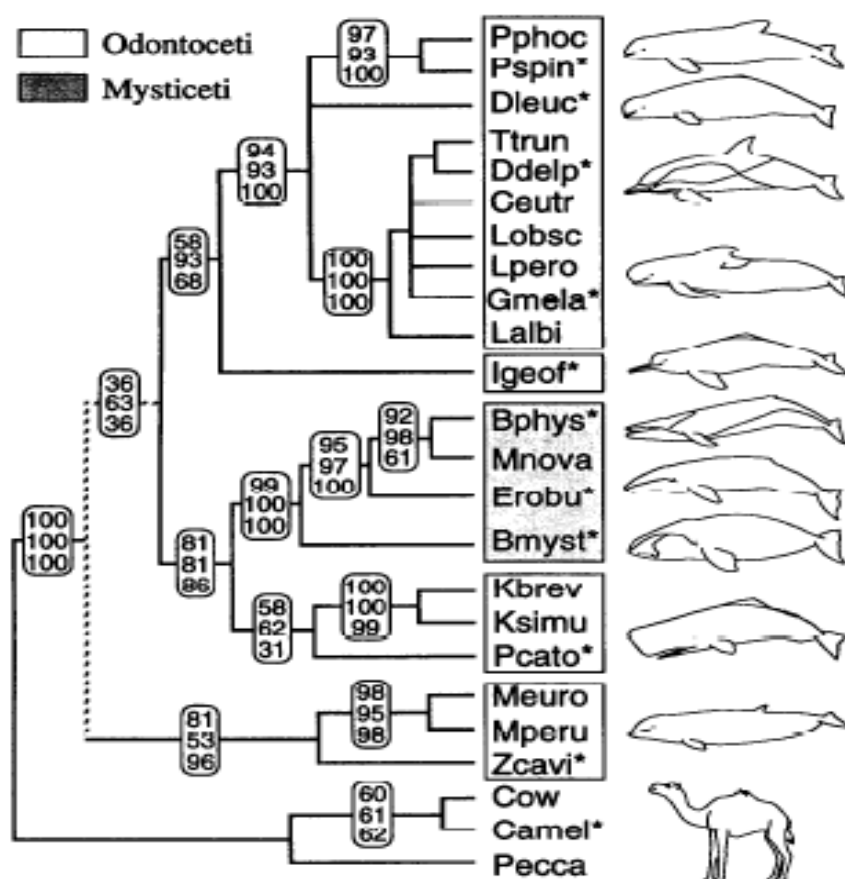
Código*	Densidad	Óptica	RB	INF	Disposición final/Causa de muerte
Scl M USA 72	0,050	± 0,005	N	N	ND
Lh M USA 86	0,050	± 0,003	N	N	Liberado
Scl H USA 70	0,051	± 0,003	N	N	ND
Pe M USA 59	0,051	± 0,002	N	N	Fallo generalizado
Fa M USA 2	0,051	± 0,006	N	N	Meningoencefalitis parasitaria
Tt M USA 5.2	0,052	± 0,003	N	N	Infartación colónica
Tt M USA 37.2	0,052	± 0,001	N	N	Liberado
Kb M USA 33.2	0,052	± 0,005	N	NA	RGI
Stb M USA 44.2	0,053	± 0,005	N	N	Encefalitis fúngica
Ks H USA 30.1	0,053	± 0,006	N	NA	Impactación colónica
Lh M USA 82	0,053	± 0,003	N	N	Liberado
Kb M USA 21	0,054	± 0,012	N	N	RGI
Tt M USA 11	0,054	± 0,001	P 1:1	N	ND
Scl M USA 67	0,055	± 0,003	N	N	Shock por varamiento
Sa M USA 52.3	0,055	± 0,004	N	N	Saludable residente
Sa M USA 52.1	0,055	± 0,001	N	N	Saludable residente
Tt M USA 5.1	0,056	± 0,003	P	N	Infartación colónica
Gg M USA 47.1	0,057	± 0,004	N	NA	Liberado
Gg M USA 47.2	0,059	± 0,003	N	N	Liberado
Ks M USA 54	0,061	± 0,005	N	N	Eutanaziado,
Dd H USA 24	0,061	± 0,001	N	N	TE pulmonar
Lh H USA 88	0,061	± 0,002	N	N	Liberado
Lh H USA 97	0,062	± 0,001	N	N	Liberado
Kb M USA 33.3	0,062	± 0,010	P 1:1	NA	RGI
Tt M USA 55	0,062	± 0,007	N	N	Eutanaziado
Kb M USA 1	0,063	± 0,002	N	NA	Colitis ulcerativa
Ks H CR 108	0,063	± 0,004	N	N	Huerfana
Sb M USA 78	0,063	± 0,006	N	P	Shock por encallamiento
Gg M USA 47.3	0,063	± 0,003	N	N	Liberado
Lh H USA 93	0,063	± 0,001	N	N	Morbilivirus
Lh H USA 91	0,065	± 0,001	N	P	Morbilivirus
Kb H USA 66	0,066	± 0,001	P 1:1	N	Cardiomiopatía
Kb H USA 51	0,067	± 0,018	N	N	Cardiomiopatía
Ks H USA 31	0,068	± 0,003	N	N	Cardiomiopatía
Stb M USA 13	0,068	± 0,003	N	N	Liberado
Stb M USA 38.1	0,069	± 0,005	N	N	Liberado
Sa M USA 52.2	0,069	± 0,033	N	NA	Saludable residente
Lh H USA 92	0,072	± 0,002	N	N	Liberado
Tt H USA 61	0,072	± 0,002	N	P	Fallo hepático
Stb M USA 41.1	0,072	± 0,005	N	N	Encefalitis fúngica
Tt M USA 79	0,075	± 0,005	N	N	Pneumonia parasitaria

Código*	Densidad	Óptica	RB	INF	Disposición final/Causa de muerte
Tt M USA 34.2	0,075 ± 0,005		N	N	Liberado
Tt M USA 20	0,082 ± 0,004		N	N	Liberado
Kb H USA 28.1	0,083 ± 0,006		P 1:1	P	RGI
Tt H USA 64	0,084 ± 0,004		N	N	Asfixia por línea de nylon
Lh H USA 73	0,084 ± 0,004		N	N	Liberado
Lh H USA 95	0,100 ± 0,005		N	P	Liberado
Stb M USA 14	0,102 ± 0,003		P 1:1		Liberado
Tt H USA 49.1	0,103 ± 0,030		N	P	Liberada
Tt M USA 9	0,109 ± 0,008		P 1:1	P	Liberado
Kb H USA 27.2	0,112 ± 0,004		P 1:1		Cardiomiopatía
Tt M USA 4.2	0,115 ± 0,007		N	P	Liberado
Lh H USA 89	0,127 ± 0,001		N	P	Liberado
Lh H USA 83	0,139 ± 0,024		N	N	Liberado
Tt M USA 34.1	0,145 ± 0,006		N	P	Liberado
Tt M USA 6	0,145 ± 0,007		N	P	Septicemia, neumonía
Tt H USA 49.2	0,149 ± 0,034		N	P	Liberada
Stb M USA 41.2	0,160 ± 0,006		N	P	Encefalitis fúngica
Tt M USA 23	0,172 ± 0,011		N	N	Cardiomiopatía
Stb M USA 43	0,175 ± 0,005		P 1:1	P	Encefalitis y neumonía
Kb H USA 27.1	0,177 ± 0,006		P 1:1		Cardiomiopatía
Lh H USA 96	0,178 ± 0,004		N	P	Liberado
Sc H CR 105	0,189 ± 0,006		N		Huerfana
Tt H USA 60	0,192 ± 0,021		N	N	Sepsis por aspergilosis
Tt M USA 4.1	0,196 ± 0,006		N	P	Liberado
Tt H USA 32	0,214 ± 0,005		P 1:1		Meningitis fúngica
Stb M USA 39	0,218 ± 0,010		N	P	Liberado
Tt M USA 77	0,228 ± 0,021		N	P	Liberado
Stb M USA 38.1	0,233 ± 0,010		N	P	Liberado
Stb M USA 38.1	0,238 ± 0,013		N	N	Liberado
Gg H USA 48.3	0,240 ± 0,018		P 1:1	P	Fallo multisistémico, BA
Lh M USA 85	0,245 ± 0,009		P 1:2	N	ND
Lh H USA 98	0,248 ± 0,003		P	P	Liberado
Kb M USA 25	0,266 ± 0,006		P 1:1		Cardiomiopatía
Gg H USA 48.8	0,271 ± 0,009		P 1:1	P	Fallo multisistémico BA
Tt H USA 84	0,275 ± 0,024		N	P	ND
Gg H USA 48.7	0,290 ± 0,010		P 1:1	P	Fallo multisistémico BA
Stb H USA 46.1	0,302 ± 0,007		P 1:1	P	Liberado
Gg H USA 48.4	0,332 ± 0,008		P 1:1	P	Fallo multisistémico BA
Sf M USA 76	0,353 ± 0,030		N	P	ND
Stb H USA 46.2	0,379 ± 0,029		P 1:1	P	Liberado
Tt M USA 40.1	0,382 ± 0,008		N		Saludable residente

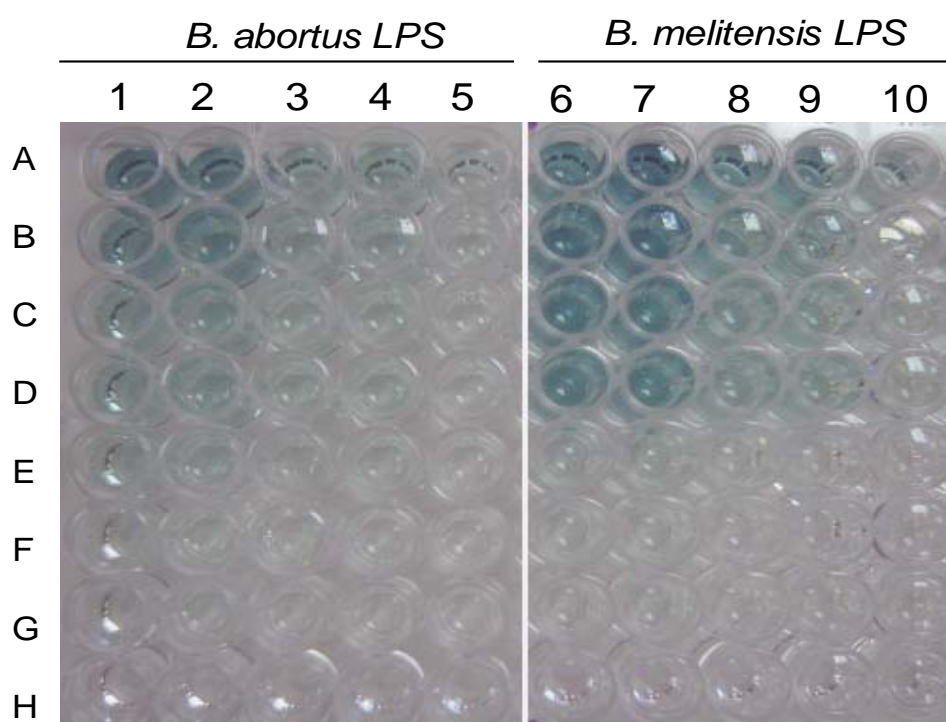
Código*	Densidad	Óptica	RB	INF	Disposición final/Causa de muerte
Gg H USA 48.5	0,399 ± 0,018		P 1:1	P	Fallo multisistémico BA
Lh H USA 81	0,444 ± 0,023		P	P	Liberado
Gg H USA 48.1	0,447 ± 0,033		P 1:1	P	Fallo multisistémico, BA
Stb M USA 42	0,458 ± 0,017		P 1:1		Causa desconocida
Stb M USA 10	0,477 ± 0,016		P 1:1	P	Meningoencefalitis parasitaria
Gg H USA 48.2	0,522 ± 0,044		P 1:1	P	Fallo multisistémico , BA
Gg H USA 48.6	0,559 ± 0,064		P 1:1	P	Fallo multisistémico BA
Fa M USA 15	0,589 ± 0,025		P		Cardiomiopatía
SI H USA 53.2	0,607 ± 0,014		P 1:1	P	Saludable residente
SI H USA 53.3	0,685 ± 0,094		P 1:1		Saludable residente
Tt H USA 7	0,707 ± 0,011		N	P	Meningoencefalitis de OD
Sc M CR 102	0,738 ± 0,024		P < 1:8	P	Meningoencefalitis
SI H USA 53.1	0,761 ± 0,004		P 1:1	P	Saludable residente
Tt M USA 45.2	0,855 ± 0,038		P 1:2		Liberado
Stb H USA 18	0,896 ± 0,031		P 1:8	P	Engrosamiento GI
Tt H USA 50	0,908 ± 0,013		P 1:8	P	Meningoencefalitis**
Sc H CR 101	0,976 ± 0,023		P < 1:8	P	Meningoencefalitis
Tt M USA 45.1	1,016 ± 0,019		P 1:2	P	Liberado
Stb M USA 19.1	1,060 ± 0,008		P 1:1	P	Fallo sistémico
Stb M USA 19.2	1,132 ± 0,015		P 1:1		Fallo sistémico
Sc M CR 107	1,151 ± 0,136		P	P	Meningoencefalitis
Sc H CR 105	1,178 ± 0,002		P 1:4	P	Meningoencefalitis **
Sc M CR 103	1,199 ± 0,094		P 1:8	P	Meningoencefalitis
Sc H CR 109	1,201 ± 0,004		P 1:8	P	Meningoencefalitis
Sc H CR 106	1,313 ± 0,028		P 1:32	P	Meningoencefalitis**

Dd	<i>Delphinus delphis</i>		H	Hembra
Fa	<i>Feresa attenuata</i>		M	Macho
Gg	<i>Grampus griseus</i>		P	Positivo
Ks	<i>Kogia simus</i>		N	Negativo
Kb	<i>Kogia breviceps</i>		INF	Inmunofluorescencia
Me	<i>Mesoplodon eurapeus</i>		D. O.	Densidad óptica
Lh	<i>Lagenodelphis hosei</i>		D.S	Desviación estándar
Pe	<i>Peponocephala electra</i>		RB	Rosa de Bengala
Pm	<i>Physeter macrocephalus</i>		USA	Florida, USA
Sa	<i>Stenella attenuata</i>		CR	Costa Rica
Scl	<i>Stenella clymene</i>		TE	Tromboembolismo
Sc	<i>Stenella coeruleoalba</i>		RGI	Ruptura Gastro intestinal
Sf	<i>Stenella frontalis</i>		BA	Bacteremia
Sf	<i>Stenella longirostris</i>		OD	Origen desconocido
Stb	<i>Steno bredanensis</i>		ND	No determinada
Tt	<i>Tursiops truncatus</i>		**	Aislamiento de <i>Brucella</i> spp

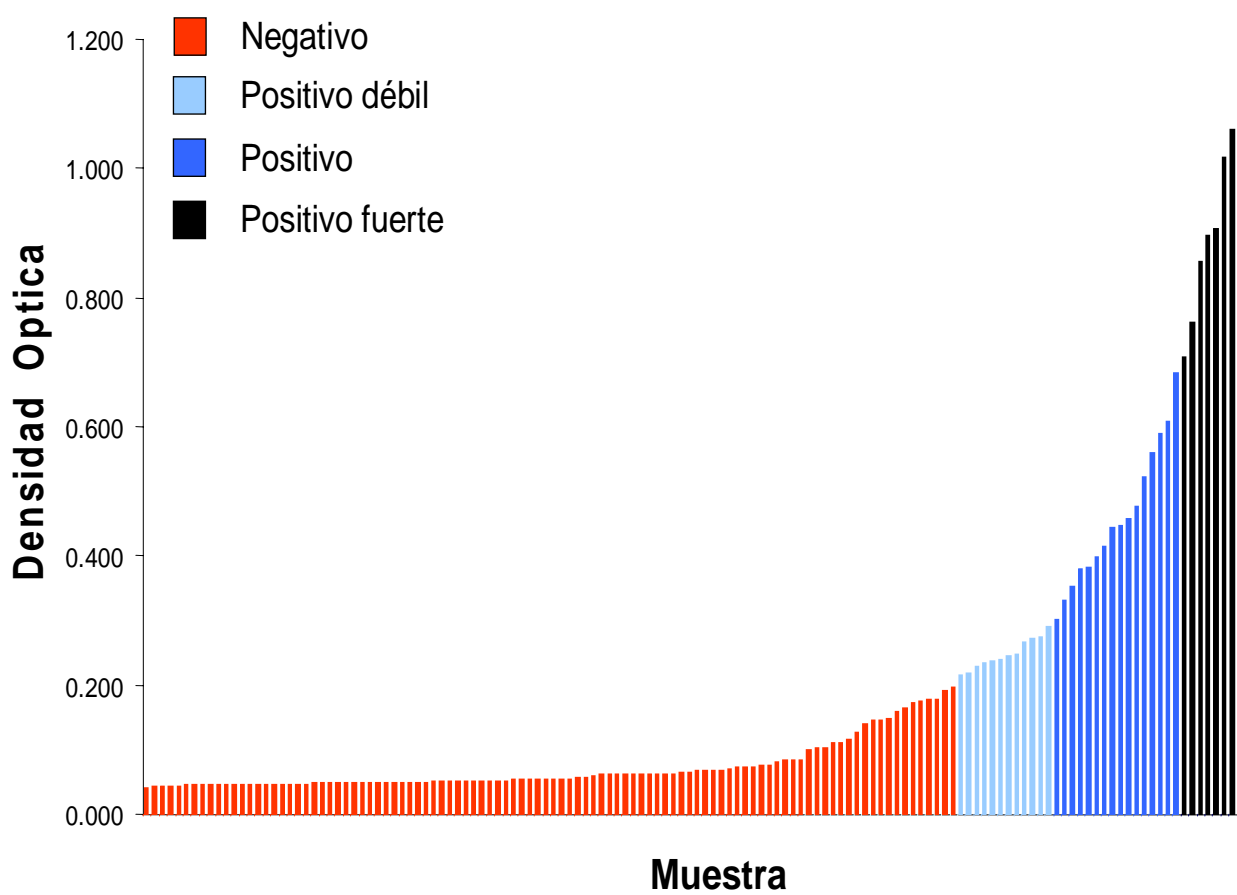
X. Filogenia de los mayores grupos de cetáceos basados en secuencias de ADN de tres genes mitocondriales, según Milinkovitch et al. 1994. Se describe la relación entre 21 especies de cetáceos y tres grupos externos de artiodáctilos.



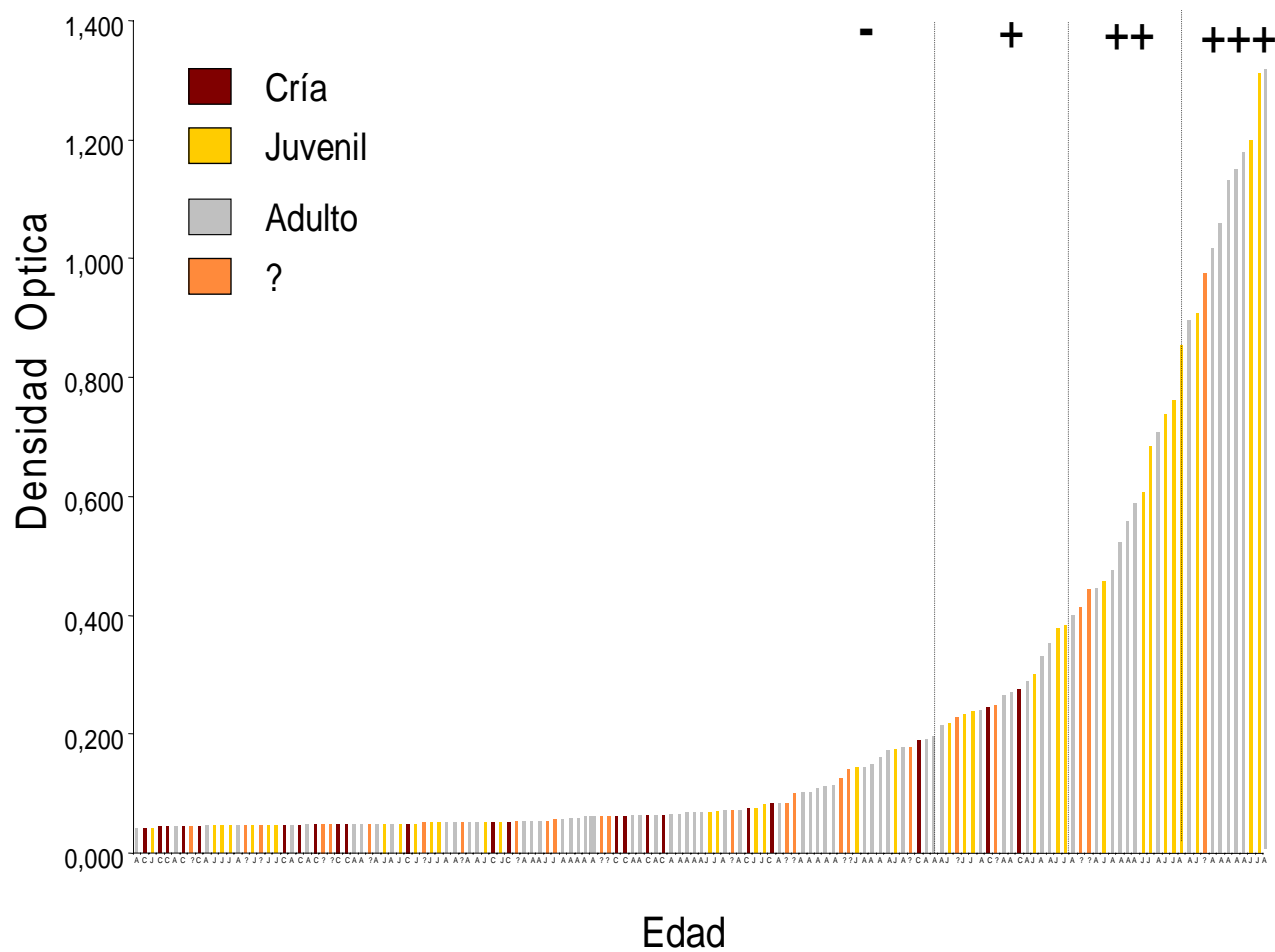
Abreviación	Especie/Nombre común	Abreviación	Especie/ Nombre común
Pphoc	<i>Phocoena Phocoena</i> / Marsopa de Harbor	Mnova	<i>Megaptera novaeangliae</i> / Ballena. Jorobada
Pspin	<i>Phocoena spinipinnis</i> / M. de Burmeister's	Erobu	<i>Eschrichtius robustus</i> / Ballena. Gris
Dleuc	<i>Delphinapterus leucas</i> /Beluga	Bmyst	<i>Balaena mysticetus</i> / B. Franca
Ttrun	<i>Tursiops truncatus</i> / Delfín nariz de botella	Kbrev	<i>Kogia breviceps</i> / Cachalote pigmeo
Ddelp	<i>Delphinus delphis</i> / D. común	Ksimu	<i>K. simus</i> / Cachalote enano
Ceutr	<i>Cephalorhynchus eutropia</i> / D. negro	Pcato	<i>Physeter catodon</i> / Cachalote
Lobsc	<i>Lagenorhynchus obscurus</i> / D. dusky	Meuro	<i>Mesoplodon europaeus</i> / B. picuda de Gervai's
Lpero	<i>Lissodelphis peronii</i> / D. liso austral	Mperu	<i>M. peruvianus</i> / B. picuda peruana
Gmela	<i>Globicephala melas</i> / D. Calderón	Zcavi	<i>Ziphius cavirostris</i> / B. picuda de Cuvier's
Lalbi	<i>Lagenorhynchus. Albirostris</i> / D. pico blanco	Cow	<i>Bos tauru</i> / Vaca
Igeof	<i>Inia geoffensis</i> / D.del río Amazonas	Camel,	<i>Camelus dromedarios</i> / Camello
Bphys	<i>Balaenoptera physalus</i> / Ballena Fin	Pecca	<i>Tuyussu tujucu</i> / Paca

XI. Reactividad del antígeno versus conjugado en la prueba de ELISAi.

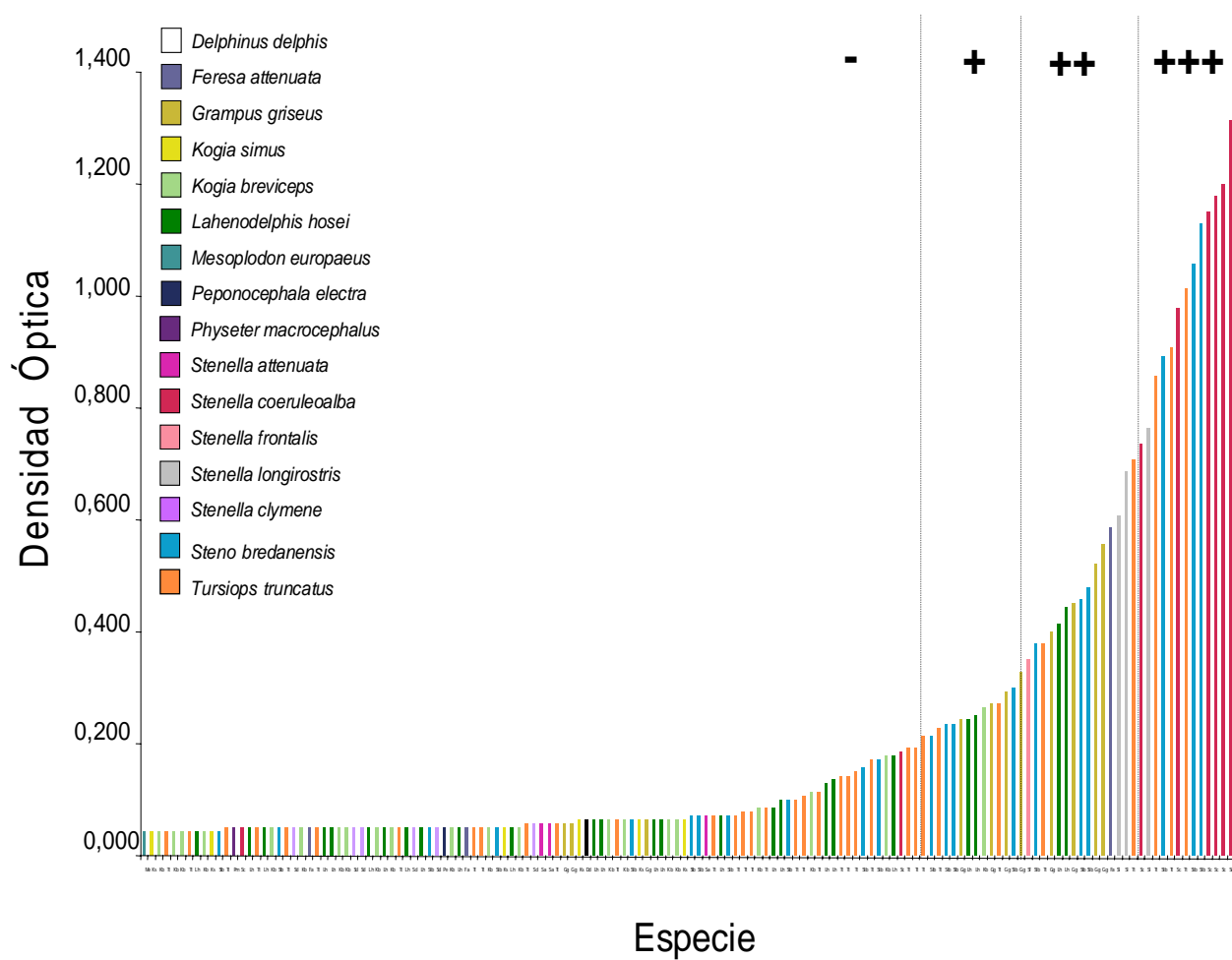
XII. Distribución de los resultados en el ELISAI de los sueros pertenecientes a odontocetos, según densidad óptica.



XIV. Distribución de los resultados en el ELISAi de los sueros pertenecientes a odontocetos según la edad. Negativo (-); Positivo débil (+); Positivo (++) ; Positivo fuerte (+++).



XV. Distribución de los resultados en el ELISAI de los sueros pertenecientes a odontocetos según la especie. Negativo (-); Positivo débil (+); Positivo (++) ; Positivo fuerte (+++).



XVI. Distribución de los resultados en el ELISAI de los sueros pertenecientes a odontocetos según su procedencia. Negativo (-); Positivo débil (+); Positivo (++) ; Positivo fuerte (+++).

