

UNIVERSIDAD NACIONAL

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela de Medicina Veterinaria

Caracterización bioquímica de aislamientos bacterianos obtenidos a partir de rumiantes positivos a la prueba de Rosa de Bengala para detección de brucelosis

Modalidad: Proyecto de graduación

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

Nicole Alvarado Rivera

Campus Pbro. Benjamín Núñez

2025

TRIBUNAL EVALUADOR

—

Laura Bouza Mora, M.Sc.
Vicedecana, Facultad de Ciencias de la Salud

Enrique Capella Molina, M.Sc.
Director, Escuela de Medicina Veterinaria

Caterina Guzmán Verri, PhD.
Tutor

Elías Barquero Calvo, PhD.
Lector

Gabriela Hernández Mora, PhD.
Lectora

Fecha: _____

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO

A mi mamá Gaudy y a mi papá Fernando, la persona y profesional que soy hoy y todo lo que he logrado, es gracias a ellos. Les agradezco por estar en cada paso y en cada etapa, por siempre creer en mí y por impulsarme en todo momento; sin ustedes nada habría sido posible.

A mis hermanos, Fernando y Melanie, por tolerarme todos estos años de carrera. Gracias por llevarme café cuando estaba cansada y por recordarme que sí podía, incluso cuando ya quería darme por vencida. Los amo mucho, son mis pilares.

Le agradezco a toda la Escuela de Medicina Veterinaria, quienes ayudaron a formarme en mi proceso universitario. Quiero agradecer especialmente a la Dra. Caterina Guzmán, por creer en mí desde muy temprano en la carrera, por ayudarme a descubrir el amor por la bioquímica, la docencia y la investigación. La admiro siempre como profesional y como persona. Al Dr. Elías Barquero, por todo el apoyo durante el proceso laboratorial, su paciencia y pasión por la bacteriología hacen que sea un gusto trabajar y aprender de él. Sin su ayuda y guía, seguiría intentando sacar el proyecto adelante.

A todo el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la UNA y especialmente a Naza, en el Laboratorio de Inmunología, les agradezco toda la colaboración en el proyecto. A Naza le agradezco no solo su colaboración, sino su apoyo, guía y amistad que me ayudaron a sobrellevar los largos días de pipeteos. A la Dra. Marcela Suárez, genio de la bioinformática, que sin sus aportes este trabajo seguiría a medias. Muchas gracias por toda la asesoría, guía, consejos y comprensión que siempre me brindó. De todo corazón gracias por siempre tener una palabra amiga, especialmente en momentos difíciles. A la Dra. Gabriela Hernández, por sus vitales aportes al enfoque del proyecto desde el punto de vista de vigilancia epidemiológica y contexto de la situación país.

Finalmente, a mis compañeros de carrera e Internado Tati, Mau, José, José David, Dani, Lu y Vero, porque los considero mis hermanos, por tantos buenos momentos a lo largo de todos estos años, los admiro y quiero mucho y es un orgullo poder llamarlos colegas.

Esta investigación fue financiada con fondos de la Vicerrectoría de Investigación (VI) de la UNA, en el marco de la actividad UNA-SIA 0039-24 “Detección de patógenos zoonóticos emergentes en Costa Rica: hacia un enfoque UNA SALUD para la vigilancia epidemiológica de patógenos emergentes” y FOCAES UNA. Estos recursos genéticos se accedieron en Costa Rica de acuerdo con la Ley de Biodiversidad # 7788 y el Convenio sobre la Diversidad Biológica, bajo los términos de respeto a la distribución equitativa y justa de beneficios entre quienes proporcionaron dichos recursos, según permiso de acceso CONAGEBIO: R-CM-UNA-005-2022-OT-CONAGEBIO.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|----|
| TRIBUNAL EXAMINADOR..... | 2 |
| DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO..... | 3 |
| ÍNDICE DE CUADROS | 6 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 7 |
| LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS..... | 8 |
| RESUMEN | 10 |
| ABSTRACT | 12 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 14 |
| 1.1. ANTECEDENTES | 14 |
| 1.2. JUSTIFICACIÓN..... | 21 |
| 1.3. OBJETIVOS | 22 |
| 2. METODOLOGÍA..... | 23 |
| 2.1 AISLAMIENTOS PARA ESTUDIO..... | 23 |
| 2.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO..... | 23 |
| 2.3 EVALUACIÓN DE CRECIMIENTOS EN MEDIOS SELECTIVOS DE BRUCELLA | 24 |
| 2.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS..... | 24 |
| 2.5 CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL BIOQUÍMICO MEDIANTE EL SISTEMA VITEK®2. | 29 |
| 2.6 PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO PARA INFECCIÓN IN VIVO | 30 |
| 2.7 INFECCIÓN EN RATONES..... | 30 |
| 2.8 RECUENTO BACTERIANO..... | 32 |
| 2.9 SEROLOGÍA (iELISA Y ROSA BENGALA)..... | 32 |
| 2.10 EXTRACCIÓN DE ADN..... | 34 |
| 2.11 SECUENCIACIÓN GENÓMICA | 34 |
| 2.12 ANÁLISIS GENÓMICO | 35 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 37 |
| 3.1 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA..... | 37 |
| 3.2 RECUENTO BACTERIANO POST INFECCIÓN | 45 |
| 3.3 SEROLOGÍA | 46 |
| 3.4 ANÁLISIS GENÓMICO | 48 |
| 4. CONCLUSIONES..... | 53 |
| 5. RECOMENDACIONES | 54 |
| 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1 Aislamientos seleccionados para la caracterización..... | 23 |
| Cuadro 2 Categorías de reacción a la prueba de reacción ureasa..... | 27 |
| Cuadro 3 Escala de interpretación del iELISA según porcentajes de seropositividad.. | 33 |
| Cuadro 4 Especies similares en rARN16s a los aislamientos en estudio utilizadas en la alineación de genoma completo | 36 |
| Cuadro 5 Descripción morfológica de los aislamientos..... | 37 |
| Cuadro 6 Caracterización bioquímica de los aislamientos baboCR63, baboCR64 y baboCR67, incluyendo las cepas de referencia | 39 |
| Cuadro 7 Tiempos de reacción de prueba ureasa..... | 41 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1 Crecimiento de los aislamientos baboCR63, baboCR64 y baboCR67 inoculados en agar sangre | 38 |
| Figura 2 Crecimiento de los tres aislamientos y la cepa de referencia en medio CITA y Farrel..... | 40 |
| Figura 3 Resultados del perfil bioquímico mediante el uso del sistema VITEK® 2 ... | 45. |
| Figura 4 Capacidad de replicación y persistencia de los aislamientos en estudio y <i>B.abortus</i> 2308W en bazo de ratón | 46. |
| Figura 5 Capacidad de los sueros de ratón de generar un resultado positivo en el Rosa de Bengala | 46. |
| Figura 6 Capacidad de los sueros de ratón de generar un resultado positivo en iELISA | 46 |
| Figura 7 Resultado de nucleotide BLAST (rARN16s) realizado para baboCR67 | 49 |
| Figura 8 Resultado de nucleotide BLAST (rARN16s) realizado para baboCR64 | 50 |
| Figura 9 Resultado de nucleotide BLAST (rARN16s) realizado para baboCR63 | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

16S rRNA: ácido ribonucleico ribosomal 16s

Abs: Absorbancia

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATS: Agar Tripticasa de Soya

BAP: Agar Sangre

CCSS: Caja Costarricense de Seguro Social

cELISA: Enzimoinmunoanálisis de adsorción competitivo

CITA: Agar de tioglicolato con infusión de cisteína

CR: Costa Rica

Ctrl -: Control negativo

Ctrl +: Control positivo

CTS: Caldo Tripticasa Soya

FAO: Food and Agriculture Organization

FOCAES: Fondo Concursable para el Fortalecimiento de las Capacidades Estudiantiles

g: Gramos

i.p.: intraperitoneal

IgG: Inmunoglobulina G

INCIENSA: Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud

ISO: Organización Internacional de Normalización

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería

mg: Miligramo

mL: Mililitro

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

mm: Milímetro

nm: nanometro

OIE: Oficina Internacional de Epizootias

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: reacción en cadena polimerasa

RBT: Rose Bengal Test

rpm: revoluciones por minuto

rRNA: ácido ribonucleico

SENASA: Servicio Nacional de Salud Animal

UCR: Universidad de Costa Rica

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UNA: Universidad Nacional de Costa Rica

Zn: Zinc

° C: Grados Celsius

RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica causada por las bacterias del género *Brucella* spp. Las brucelas causan problemas reproductivos en animales domésticos e infecciones crónicas y debilitantes en los humanos, además de pérdidas económicas significativas en el mercado ganadero. Entre los años 2012 y 2013 se obtuvieron varios aislamientos bacterianos (denominados baboCR63, baboCR64 y baboCR67) a partir de hatos bovinos y bufalinos costarricenses seropositivos a *Brucella* spp. A pesar de que estos aislamientos presentaron características fenotípicas similares a bacterias del género *Brucella* spp., esto se descartó después de hacer un análisis de secuenciación de genoma completo en estos aislamientos. Este estudio se enfocó en la caracterización fenotípica y bioquímica de estos aislamientos, para evaluar su posible interferencia en el diagnóstico de la brucelosis. Los aislamientos fueron sometidos a pruebas bioquímicas como la actividad ureasa, reducción de nitratos y actividad catalasa. Se evidencia que, aunque comparten ciertas características bioquímicas con *Brucella* spp., también poseen diferencias. Los aislamientos crecieron en medios de cultivo selectivos específicos para brucelas como CITA y Farrell; sin embargo, presentaron reacciones variables en pruebas como absorción de cristal violeta y aglutinación con naranja acridina, lo que sugiere diferencias en su membrana. Para evaluar su patogenicidad y capacidad de generar una respuesta inmune detectable, se inocularon ratones con estas bacterias. Solo baboCR64 mostró permanencia transitoria en el bazo. Ninguno de los aislamientos indujo respuesta de anticuerpos significativa detectable por Rosa de Bengala o iELISA, al indicar que no existe interferencia con estas pruebas serológicas en el modelo de ratón. La secuenciación genómica evidenció que los aislamientos tienen similitudes con los géneros *Microvirga* spp. Y *Camelimonas* spp.; este último relacionado con abortos en bovinos.

Este proyecto de graduación resalta la importancia de la vigilancia continua, la utilización de rutina de métodos de tamizaje y diagnósticos adecuados para distinguir entre *Brucella* spp. y otras bacterias fenotípicamente similares; se brinda una mejora en las estrategias de control y prevención de la brucelosis.

Palabras clave: *Brucella*, aislamientos bacterianos, caracterización fenotípica, interferencia diagnóstica, secuenciación genómica.

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Brucella* spp. These bacteria can cause reproductive problems in domestic animals, chronic, debilitating infections in humans, and significant economic losses in the livestock market.

Between 2012 and 2013, several bacterial isolates (designated baboCR63, baboCR64, and baboCR67) were obtained from *Brucella*-seropositive cattle and buffalo herds in Costa Rica. Although these isolates presented phenotypic characteristics similar to *Brucella*, it was ruled out that they belonged to the genus after whole-genome sequencing analysis.

This study focused on these isolates' phenotypic and biochemical characterization to evaluate their potential interference in brucellosis diagnosis. The isolates were subjected to biochemical tests such as urease activity, nitrate reduction, and catalase activity, showing that although they share specific biochemical characteristics with *Brucella* spp., they also have key differences. The isolates grew in selective culture media specific for *Brucella* spp. growth, such as CITA and Farrell; however, they exhibited variable reactions in tests such as crystal violet absorption and acridine orange agglutination, suggesting differences at the membrane level. To evaluate their pathogenicity and ability to generate a detectable immune response, mice were inoculated with these bacteria. Only baboCR64 showed transient persistence in the spleen. None of the isolates induced a significant antibody response detectable by the Rose Bengal test or iELISA, indicating no interference with these serological tests in the mouse model.

Genomic sequencing revealed that the isolates have similarities with the genus *Microvirga* spp. and *Camelimonas* spp., the latter being recently associated with abortions in cattle.

This research highlights the importance of continuous surveillance and appropriate diagnostic methods to distinguish between *Brucella* spp. and other phenotypically similar bacteria, improving brucellosis control and prevention strategies.

Keywords: *Brucella*, bacterial isolates, phenotypic characterization, diagnostic interference, genomic sequencing.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1 Brucelosis en animales y humanos

La brucelosis se define como la infección producida por cualquier bacteria del género *Brucella* spp., ya sea en animales o en humanos (OIE, 2018). Las bacterias de este género están compuestas por cocobacilos Gramnegativos, patógenos intracelulares facultativos que forman parte de la familia *Brucellaceae*, orden Rhizobiales y clase Alphaproteobacteria. Como parte del género se encuentran diez especies reconocidas: *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. inopinata*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. microti* y *B. melitensis* (Lui, 2015).

Estas bacterias tienen tropismo por los órganos reproductores de los animales y en los humanos provocan la enfermedad conocida como fiebre ondulante. De manera clínica, la enfermedad en humanos puede ser inespecífica, con episodios febriles e incluso cursar con un desarrollo crónico. En los hospedadores animales es posible observar aborto, retenciones de placenta, orquitis, epididimitis, artritis e incluso meningitis. La presentación de los signos va a depender de la especie de *Brucella* spp. que esté provocando la infección. De manera general, *B. melitensis* y *B. abortus* son altamente patógenos para el ser humano y representan una amenaza a la salud pública, ya que son zoonosis importantes que requieren de un control adecuado desde producción primaria (OIE, 2018).

La brucelosis es una enfermedad zoonótica, es decir, es transmitida de los animales hacia los humanos. Por lo que el contacto directo con un animal infectado o el consumo de subproductos contaminados representa un riesgo para la población humana (Olsen y Palmer, 2014). Leche de vaca, oveja o cabra contaminada puede ser fuente de infección, ya que se consume en grandes volúmenes. Los quesos frescos son una alta fuente de

infección, ya que el proceso de producción del queso puede incluso concentrar a las brucelas que pueden sobrevivir hasta varios meses en esta matriz (Corbel et al. 2006).

A nivel de diagnóstico, los casos de brucelosis humana son detectados de manera tardía y en su fase crónica, debido a que esta bacteria no causa respuestas inflamatorias ni interrumpe los ciclos de las células de su hospedador. A esto se le llama una “estrategia furtiva”, que le permite pasar desapercibida por el sistema inmune y establece su nicho de reproducción en el hospedador, de manera exitosa (Barquero-Calvo et al., 2007). Debido a lo exitosa que es *Brucella* spp. para establecerse en el organismo y que pocas veces se detecta la infección de forma temprana, es de suma importancia la prevención de su transmisión.

1.1.2 Impacto socioeconómico de la brucelosis en Costa Rica y el contexto mundial

La brucelosis es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la zoonosis con mayor distribución a nivel mundial. Según datos del INCIENSA, entre 2011 y julio de 2022, se diagnosticaron 254 pacientes por brucelosis. Las provincias más afectadas son Alajuela, seguida por Limón y luego Puntarenas. Los grupos más expuestos son veterinarios, técnicos de laboratorio, ganaderos, empleados de finca o de plantas de proceso (Chinchilla, 2022). También es posible afirmar que el grado de prevalencia de la infección animal, el nivel socioeconómico y los hábitos alimenticios, afectan directamente la incidencia en los humanos (Pappas et al. 2006). Con la excepción de dos aislamientos de *B. neotomae*, todos los demás casos de brucelosis humana en el país correspondieron a *B. abortus* (Hernández-Mora et al, 2017b).

Además de las repercusiones directas en salud animal y pública, las pérdidas económicas a nivel centroamericano, calculadas por la FAO, alcanzan hasta los 450 millones de dólares (SENASA, 2019). La brucelosis también tiene impactos directos sobre la economía costarricense, relacionados con la pérdida de animales por sacrificio, la baja de

productividad (aumento de días abiertos, disminución de tasas de fertilidad, disminución de producción láctea) y abortos. También se experimenta una disminución en la comercialización de animales y aumento de costos de programas nacionales (costos de vacunación, muestreo y seguimiento de hatos positivos) (SENASA, 2019). El impacto en la salud pública se observa al tener que destinar fondos públicos para atender a los pacientes que presentan condiciones crónicas de salud incluso después del tratamiento, al aumento del pago de incapacidades y una reducción en la fuerza laboral del país (SENASA, 2019).

1.1.3 Diagnóstico de brucelosis

Debido a que a nivel clínico la enfermedad es poco específica, el diagnóstico de la brucelosis debe apoyarse con pruebas laboratoriales suplementarias (Corbel, 2006). A nivel laboratorial no existe una sola prueba que permita detectar la enfermedad, por lo que es necesario combinar métodos para tener un diagnóstico certero (Alton et al. 1988). Como la brucelosis en los animales de producción en el país actualmente no se encuentra controlada y tampoco se cuenta con un programa de vacunación robusto a lo largo del país, la prueba de Rosa Bengala (RBT) así como el ELISA indirecto (iELISA) se consideran adecuadas para el control de la enfermedad a nivel nacional (OIE 2018).

La prueba Rosa Bengala es una prueba sencilla de aglutinación que utiliza antígeno coloreado con rosa bengala (Morgan et al. 1969). Este antígeno está hecho de una suspensión al 8% de cepas lisas de *B. abortus* 99 (Weybridge) o 1119-3 (USDA) las cuales se suspenden en un medio caliente con rosa bengala y un buffer de pH. 3.6 (OIE 2022). Estas cepas deben ser totalmente lisas y no deben auto-aglutinar en salina ni acriflavina al 0.1%. También deben ser cultivos puros, independientes del CO₂ como *B. abortus* bv.1 o *B. melitensis* bv.1 (OIE, 2022). Esta prueba se fundamenta en la reacción de aglutinación entre la presencia de anticuerpos en las muestras de suero analizadas con

un antígeno en alta concentración (específicamente el S- lipopolisacárido). Si se observan grumos o sedimento, al realizar la prueba, se confirma la presencia de anticuerpos y por lo tanto el resultado es positivo (Cernyseva et al, 1977).

La legislación de Costa Rica se apega al Manual Terrestre de la OIE y utiliza la prueba Rosa Bengala como método de tamizaje a nivel de finca, ya que es fácil y rápida de realizar, no necesita conocimiento especializado ni equipos de alta tecnología, es de bajo costo y es posible implementarla a nivel de finca (Díaz et al, 2011; SENASA-CR, 2020). Posee una sensibilidad y especificidad del 99 %, valores que son respaldados por distintos autores (Omer et al, 2001; Mert et al, 2003; Hernández-Mora et al, 2017a). Sin embargo, como toda prueba serológica, es posible que haya reacciones cruzadas (falsos-positivos) debido a infecciones con otras bacterias como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis* y *Escherichia coli* O:157 (Liu, 2015) o debido a vacunación con la cepa S19 (la cual está registrada en nuestro país) (Chacón-Díaz et al, 2021). Precisamente por esto, se deben confirmar las reacciones positivas con otras pruebas laboratoriales como el iELISA (OIE, 2018).

Por otra parte, las pruebas de iELISA se fundamentan en la unión de complejos antígeno-anticuerpo. El marcaje del anticuerpo con una molécula específica permite la cuantificación de los complejos. En el iELISA se utilizan dos anticuerpos, uno primario y uno secundario, el último es el que va conjugado con la enzima y se une al anticuerpo primario. Esto permite amplificar la señal obtenida como resultado (Abyntek, 2019).

Para el diagnóstico de brucelosis esta prueba detecta anticuerpos IgG específicos contra el antígeno de *Brucella* spp. que es el polisacárido O del lipopolisacárido. La muestra utilizada es expuesta a dicho antígeno que se encuentra depositado en un pozo en una placa de ensayos; si la muestra contiene anticuerpos anti-polisacárido O, se unen al pozo. Posteriormente se añade otra sustancia que está conjugada con moléculas que brindan

color a la reacción; la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra que reaccionan con el antígeno. Finalmente, la lectura de los resultados se realiza a través de un espectrofotómetro que permite darle un valor numérico a la intensidad de color (Chemtest, 2021). Sin embargo, las pruebas de iELISA tampoco son infalibles y también se encuentra reportado en la literatura reacciones cruzadas (falsos-positivos), debido a infecciones con otras bacterias, como *Yersinia enterocolítica* O:9. La razón de estas reacciones cruzadas se debe, en gran parte, a que los dos microorganismos comparten determinantes antigénicos en la molécula del polisacárido O (Nielsen et al, 2005).

A pesar de que las pruebas serológicas son importantes en el diagnóstico, la prueba que se considera como “estándar de oro” para así confirmar un caso de brucelosis es el aislamiento de *Brucella* spp.

Los medios de cultivo selectivos contienen antibióticos apropiados para inhibir el crecimiento de microorganismos distintos a *Brucella* spp. El medio Farrell contiene sulfato de polimixina B, bacitracina, natamicina, ácido nalidíxico, nistatina y vancomicina (OIE, 2018). El medio de cultivo CITA utiliza vancomicina, colistina, nitrofurantoína, nistatina y anfotericina B. Este medio de cultivo inhibe la mayoría de los microorganismos contaminantes, pero al mismo tiempo permite el crecimiento de todas las especies de *Brucella* spp. y es más sensible que el medio de Farrell para el aislamiento de todas las especies lisas y rugosas de *Brucella* spp. de las muestras de campo, de tal forma que se convierte en el medio selectivo de elección para el aislamiento de *Brucella* spp. en términos generales (OIE, 2018).

En medios sólidos adecuados, pueden observarse colonias claramente visibles de *Brucella*, después de tres o cuatro días de incubación. Tras cuatro días de incubación, las colonias de *Brucella* spp. son redondas, de 1-2 mm de diámetro, con los bordes lisos. Son

translúcidas y de color miel pálido (OIE, 2018). Sin embargo, aún con las mejores técnicas laboratoriales, la pericia del operador influye en la eficiencia de este método diagnóstico, ya que si en el crecimiento inicial se selecciona una colonia inadecuada se podría concluir erróneamente que el animal no estaba infectado, cuando en realidad la selección de la colonia a crecer no fue la adecuada (Moreno et al, 2022).

1.1.4 Legislación a nivel nacional

Según el marco legislativo de Costa Rica, cualquier animal positivo a la prueba de tamizaje Rosa Bengala y la prueba confirmatoria de iELISA debe ser enviado a planta de proceso en un plazo de 15 días (MAG, 2000; MAG, 2008). La ley dicta que la ejecución de las actividades de vigilancia, control y erradicación de la brucelosis bovina se deberá realizar mediante esfuerzo y aportación conjunta de recursos económicos entre el sector público y privado. En el “Reglamento para la Intervención de la Brucelosis Bovina” N° 34858-MAG se menciona que no existirá ninguna responsabilidad indemnizatoria por parte del SENASA hacia los propietarios de hatos positivos (MAG, 2018).

La vigilancia se realiza de dos formas: vigilancia pasiva y vigilancia activa. La vigilancia pasiva depende de la notificación por parte de la población de casos sospechosos (abortos, retención de placenta, muerte perinatal, entre otros signos). Con base en la información que recibe, define los pasos por seguir de la mano con los médicos veterinarios oficializados, de la zona. La vigilancia activa se realizará en aquellos hatos que están en proceso de saneamiento o en declaratoria de hato libre. También se llevará a cabo en fincas, subastas ganaderas y plantas de sacrificio, con el objetivo de detectar animales o fincas positivas. Se toman muestras sanguíneas, de leche y tejidos y dependiendo de los resultados se definen los pasos que pueden involucrar procesos de cuarentena y saneamiento hasta la erradicación de la enfermedad en el hato. (SENASA, 2020).

1.1.5 Situación epidemiológica del país y posible problemática

Entre el 2012 y el 2013 se estimó una prevalencia de la brucelosis bovina en un rango de 10.5-11.4 %, al utilizar la prueba Rosa Bengala; esta prevalencia utiliza iELISA baja a 4.1-6.0 % (Hernández-Mora et al, 2017a). Luego de este trabajo se realiza un estudio de filogenética con un total de 188 aislamientos costarricenses caracterizados bioquímicamente como *B. abortus* y recolectados entre el 2003 y el 2018 (Suárez-Esquivel et al, 2020). Para este estudio se secuenció el genoma completo de los aislamientos y se obtuvo que tres de estos aislamientos de animales serológicamente positivos, no correspondían el género *Brucella* spp. A pesar de la búsqueda en bancos de genomas a nivel mundial, estos aislamientos no presentaron similitud alguna con los genomas reportados de ninguna especie bacteriana. Dos de los aislamientos se obtuvieron de dos bovinos diferentes en Llano Grande de Cartago en el 2012 (baboCR63 y baboCR64) a partir de muestras de leche y la tercera muestra se tomó de una búfala en el cantón de Upala en el 2013 (baboCR67) a partir de una muestra de placenta. Este dato toma relevancia ya que originalmente los animales de donde provenían estos aislamientos se categorizaron como positivos al RBT. Por lo tanto, es necesario indagar más a fondo sobre estos aislamientos y evaluar si la presencia de estas bacterias en los animales podría ser un obstáculo en el diagnóstico y entorpecer el adecuado aislamiento de *Brucella* spp. en las muestras de campo.

Además, estos aislamientos representan una oportunidad para probar la selectividad en los nuevos medios de cultivo tales como medio CITA y Farrell altamente sensibles y específicos, recomendados actualmente por la OIE y que recientemente fueron incorporados y acreditados según normas ISO 17025 en los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios del SENASA. Estos medios de cultivo no estaban disponibles para las fechas cuando se obtuvieron dichos aislamientos y, por lo tanto, es una mejora

diagnóstica disponible actualmente que será analizada dentro de este trabajo. Cabe destacar que a los aislamientos se les realizaron pruebas moleculares como el Brucellader (Garcia-Yoldi et al, 2006) y el MLVA-16 (Maquart et al, 2009), herramientas diagnósticas que no son obligatorias dentro de la legislación del país, pero se realizan en los laboratorios de referencia, para la identificación de diferentes especies de *Brucella* spp., que brindaron resultados inconclusos.

1.2.Justificación

1.2.1. Importancia

Debido a las pérdidas económicas y el impacto que genera la brucelosis, tanto a nivel productivo como a nivel de la salud pública en el país, su vigilancia y estrategias de control se encuentran bajo la tutela de un ente regulador que establece medidas de diagnóstico y planes de acción a nivel país para limitar la diseminación del patógeno. Es por esto que es necesario conocer los posibles escenarios donde los métodos diagnósticos puedan presentar limitaciones.

Los aislamientos en cuestión inicialmente fueron categorizados como *Brucella* spp. Y a la fecha, no se encuentran registros sobre genomas similares en las bases de datos mundiales. Esto genera la incógnita de si estas especies son realmente desconocidas y si juegan algún papel en el desarrollo de una respuesta inmune contra *Brucella* spp.

A raíz de estas incógnitas surge la necesidad de realizar una caracterización bacteriológica completa, basada en sus características fenotípicas que permita describir sus diferencias y similitudes entre ellas y *Brucella abortus*. También se propone indagar sobre su comportamiento en un modelo animal y determinar si provoca una respuesta serológica que pueda interferir con el diagnóstico de la brucelosis, al utilizar los métodos actuales.

1.3.Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar si los aislamientos bacterianos baboCR63, baboCR64 y baboCR67 tienen la capacidad de interferir con las pruebas serológicas para detección de anticuerpos contra *Brucella* spp., como lo son el Rosa Bengala y el iELISA.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar fenotípicamente a los aislamientos bacterianos baboCR63, baboCR64 y baboCR67.
2. Establecer el perfil de crecimiento de los aislamientos bacterianos baboCR63, baboCR64 y baboCR67.
3. Evaluar la capacidad de los medios CITA y Farrel de permitir el crecimiento de otras bacterias ajenas al género *Brucella* spp.
4. Evaluar muestras serológicas de ratones inoculados con cada uno de los aislamientos bacterianos baboCR63, baboCR64 y baboCR67, mediante la prueba Rosa Bengala.
5. Evaluar muestras serológicas de ratones inoculados con cada uno de los aislamientos bacterianos baboCR63, baboCR64 y baboCR67 mediante la prueba iELISA para *Brucella*.
6. Obtener el genoma completo de los aislamientos bacterianos baboCR63, baboCR64 y baboCR67 y compararlos con cepas de referencia de *Brucella* spp.

2. METODOLOGÍA

2.1 Aislamientos para estudio

Los aislamientos detallados en el Cuadro 1 se encuentran en la bacterioteca del Laboratorio de Bioquímica, referidos por los laboratorios de Bacteriología de la Facultad de Microbiología de la UCR y la Escuela de Medicina Veterinaria, obtenidos según (Suárez-Esquivel et al, 2020).

Cuadro 1

Aislamientos seleccionados para la caracterización

| Identificación del aislamiento | Muestra obtenida de: | Especie de la cual se obtuvo: | Zona geográfica | Año del aislamiento |
|---------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| baboCR63 | Leche | Bovino | Llano Grande | 2012 |
| baboCR64 | Leche | Bovino | Llano Grande | 2012 |
| baboCR67 | Placenta | Búfalo | Upala | 2013 |

Las cepas de referencia *Brucella abortus* 2308W (Suárez-Esquivel et al, 2016) y *B. canis* bcanCR12 (Chacón-Díaz et al, 2015) fueron utilizadas para efectos comparativos y de control. Las mismas se mantienen en la bacterioteca del Laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

2.2 Condiciones de crecimiento bacteriano

Para el estudio del perfil de crecimiento de los aislamientos baboCR63, baboCR64 y baboCR67 se generaron alícuotas a partir de los stocks conservados en la bacterioteca del Laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Medicina Veterinaria. Las mismas se almacenaron en Caldo Tripticasa Soya (CTS) con glicerol al 20% a -80°C en la bacterioteca. Para su crecimiento y mantenimiento, se utilizó Agar Tripticasa Soya (ATS) y de Agar Sangre (BAP), en presencia de 5% de CO₂. El crecimiento en cultivo líquido

se realizó en 20 mL de CTS en un tubo cónico de 50 mL a una agitación constante de 170 rpm en presencia de CO₂.

2.3 Evaluación de crecimientos en medios selectivos de *Brucella*

Para evaluar la capacidad de los medios CITA y Farrel de permitir el crecimiento de otras bacterias ajenas al género *Brucella* spp., se realizó un pasaje de las colonias crecidas en placa de ATS a los medios de cultivo CITA y Farell. De manera paralela se utilizó una colonia de *B. abortus* 2308W como control de calidad del medio de cultivo que estaba siendo evaluado. Los platos de agar se incubaron en presencia de 5% de CO₂ y a una temperatura de 37 °C por 72 horas.

2.4 Caracterización fenotípica de los aislamientos bacterianos

Para caracterizar fenotípicamente a los aislamientos bacterianos baboCR63, baboCR64 y baboCR67, estos fueron sometidos a las siguientes pruebas utilizadas comúnmente para identificar brucelas: tinción de Gram, actividad oxidasa, utilización de citrato, reducción de nitrato, requerimiento de CO₂, producción de H₂S, actividad de ureasa, absorción de cristal violeta, crecimiento en presencia de tionina (20 µg/mL), fucsina básica (20 µg/mL) y agar McConkey, aglutinación en naranja de acridina (1:1000) y reacción de catalasa mediante metodologías previamente descritas (Alton et al, 1988; Rodríguez, Gamboa et al. 2005;). Los cultivos bacterianos utilizados eran frescos (entre 48 y 72 horas de incubación) y crecidos en ATS o en BAP. A continuación, se describen los procedimientos brevemente:

2.4.1 Tinción de Gram

Para realizar esta tinción, se utilizó la modificación de Kopeloff y Baermann (Rodríguez, Gamboa et al. 2005), al aumentar el tiempo de contra tinción con safranina a dos minutos.

2.4.2 Determinación de actividad oxidasa

En este estudio se utilizaron tiras reactivas para la determinación de actividad oxidasa (Oxoid®), con las instrucciones del fabricante. Se colocaron de tres a cinco colonias del cultivo en plato a partir del agar. Dentro de 15 s, y a temperatura ambiente se detectaron los resultados positivos; los resultados posteriores se consideraron negativos. Se interpretó como positivo la observación de color púrpura en el disco, mientras que, si el disco permaneció sin cambio de color, se consideró negativo.

2.4.3 Utilización de citrato

Para llevar a cabo esta prueba se utilizó Agar Citrato de Simmons (Scott Laboratories®), al seguir las instrucciones descritas previamente (Rodríguez, Gamboa et al. 2005). Se colocaron de tres a cinco colonias del cultivo en plato a partir del agar. Los tubos fueron incubados a 37°C por 48-72 horas; posterior al tiempo de incubación, se hizo la lectura de los resultados. Un resultado positivo fue el cambio de color del agar a azul; un resultado negativo se indicó cuando el agar permanecía de color verde.

2.4.5 Reducción de nitratos

Para llevar a cabo esta prueba se utilizaron tubos con caldo Nitrato (Merk®), al seguir las instrucciones descritas previamente (Rodríguez, Gamboa et al. 2005). Primero se inoculó el microorganismo en el caldo Nitrato, mediante la técnica de agitación; se incubó a 37°C por 48-72 horas, se añadió 1 mL del reactivo α -Naftilamina al 0.5% y se agregó 1 mL de

ácido sulfanílico al 0.8 %. Al formar un color rojo, o rosado, antes de treinta segundos se determinó que había nitritos (Resultado: nitrato positivo); en caso contrario, se añadieron 20 mg de polvo de Zn al medio. Al formar un color rosa se determinó que había nitratos que no se habían reducido (Resultado: Nitrato negativo).

2.4.6 Requerimiento de CO₂

Las bacterias de interés se rayaron simultáneamente en dos platos de BAP. Uno de los platos de agar se incubó en una atmósfera enriquecida de 5 % CO₂ y el otro en una incubadora sin enriquecimiento de CO₂, a 37 °C por 48-72 horas; posterior al tiempo de incubación se valoraron los crecimientos. Se considera que una bacteria es dependiente de CO₂ cuando solo se observa crecimiento en el plato incubado en presencia de CO₂.

2.4.7 Producción de H₂S

Se inocularon tubos de ATS inclinados con dos o tres colonias de la bacteria por analizar. Se colocaron tirillas de papel filtro impregnadas con 12 % m/v de acetato de plomo de manera que quedaban suspendidas en la cara interna, del tubo, contraria al “slant” del medio. La tapa del tubo se colocó de tal manera que sujetaba la tira de reacción para que esta no se moviera durante la incubación. Se incubaron a 37 °C por 48-72 horas. Posterior al tiempo de incubación se valoraron los resultados. Un resultado positivo se determinó cuando hubo crecimiento de la bacteria en el medio acompañado de un oscurecimiento significativo de la tirilla de detección, mientras que el crecimiento de la bacteria en el medio, sin oscurecimiento de la tira reactiva, se interpretó como negativo.

2.4.8 Actividad ureasa

Se inoculó un tubo con Agar Urea de Christensen con cinco a diez colonias de la bacteria por analizar. Una vez que se inoculó el medio de reacción se comenzó a tomar el tiempo; los tubos se revisaron cada cinco minutos durante 40 minutos; después de este periodo se revisaron cada 15 minutos durante 2.5 horas. Si después de este tiempo no hubo resultado positivo, se incubaron a 37°C en capnofilia por 24h para confirmar el resultado negativo. La prueba se consideró positiva en el momento en el que se comenzó a ver el cambio de color (de color amarillo a rojo) en el indicador del medio. Los resultados de esta prueba deben reportarse en categorías definidas por el tiempo en el que se observa la reacción, las categorías se definen de la manera descrita en el Cuadro 2.

Cuadro 2

Categorías de reacción a la prueba de reacción ureasa

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

2.4.9 Absorción de cristal violeta

Se utilizó la solución madre de cristal violeta, preparada, al seguir la metodología previamente descrita (Rodríguez Gamboa et al., 2005). Inmediatamente antes de emplearla se diluyó a 1:40 en agua destilada. Se utilizaron colonias crecidas en placas de ATS. Las placas se cubrieron con la dilución del colorante durante 15 a 20 segundos y se examinaron inmediatamente con una lupa, después de verter el sobrante de la dilución en

un desinfectante mediante una pipeta de Pasteur. Las colonias lisas no tomaron el colorante; las disociadas (rugosas) se tiñeron en distintos tonos de rojo y violeta y en su superficie se apreciaban grietas radiales. Se utilizó la cepa *B. abortus* 2308W como control de una colonia lisa y la cepa *B. canis* bcanCR12 como control de una colonia rugosa.

2.4.10 Crecimiento en presencia de tionina, fucsina básica y McConkey

Se preparó una suspensión bacteriana en solución salina (0,85%) estéril con una concentración correspondiente al estándar 1,00 de MacFarland para cada uno de los aislamientos por estudiar. Se inocularon, por estría, cada uno de los aislamientos en la superficie de las placas, al utilizar torundas de algodón estériles.

Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C y la lectura se hizo a las 48-72 horas de incubación, al evaluar el crecimiento de la bacteria contra una superficie clara y con luz oblicua, para eliminar la interferencia de la marca de inoculación dejada por la torunda. Un resultado positivo se determinó cuando hubo un crecimiento homogéneo y significativo de la bacteria. Los resultados dudosos (débilmente positivos) o negativos se incubaron por 24-36 h más para confirmar. Se utilizó la cepa *B. abortus* 2308W como control de una cepa fucsina positiva y MacConkey negativa y la cepa *B. canis* bcanCR12, como control de una cepa tionina positiva.

2.4.11. Aglutinación en naranja de acridina

Para llevar a cabo esta prueba se utilizaron cultivos bacterianos frescos (entre 48 y 72 horas de incubación) crecidos en ATS o en BAP bajo las condiciones de crecimiento antes descritas. Se depositó una gota de colorante de naranja de acridina (Sigma®) en un

portaobjetos. Al utilizar un asa bacteriológica estéril, se suspendió una colonia del cultivo bacteriológico en la solución y se mezcló bien.

El portaobjetos se agitó suavemente en forma circular y se determinó inmediatamente la formación de grumos: si se formaron grumos, el aislamiento en estudio se clasificó como “rugoso”; si no se formaron grumos y la suspensión permaneció lechosa, el aislamiento en estudio se clasificó como “liso”. Se utilizó la cepa *B. abortus* 2308W como control de una colonia lisa y la cepa *B. canis* bcanCR12, como control de una colonia rugosa.

2.4.12. Reacción de catalasa

Se colocó una gota de H₂O₂ al 3% sobre un portaobjetos y luego se transfirió, al utilizar un asa bacteriológica estéril, una porción de colonia sobre el H₂O₂ y realizar una emulsión. Se tomó la colonia a partir de un medio sin sangre, ya que los eritrocitos tienen actividad de catalasa y podían provocar un falso positivo en los resultados. Inmediatamente posterior a la generación de la emulsión se interpretaron los resultados. El desprendimiento de burbujas se consideró una prueba positiva. Se utilizó la cepa *B. abortus* 2308W como control de una cepa catalasa positiva.

2.5 Caracterización del perfil bioquímico mediante el sistema VITEK®2

Para determinar el perfil bioquímico de las bacterias se utilizó el sistema de identificación VITEK® 2 (Biomériux) para bacterias Gram negativas con la tarjeta GN. Para este ensayo se utilizaron los aislamientos de *B. abortus* 2308W, baboCR63, baboCR64 y baboCR67. De acuerdo con las recomendaciones del fabricante del equipo, se dispensaron 3 mL de solución salina al 0.45 % en un tubo transparente de 12 x 75 mm de plástico. Al usar una torunda estéril, se tomaron de tres a cinco colonias y se suspendieron en el tubo con la solución salina. Usando un turbidímetro (DensiChek plus®), se preparó una suspensión

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

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

2.6 Preparación del inóculo bacteriano para infección *in vivo*

Dos días antes de las infecciones en los ratones seleccionados, se realizó un pre-cultivo de los aislamientos bacterianos por utilizar. Se usaron 20 mL de CTS y un stock de cada bacteria de interés, se dejó en agitación a 200 rpm y 37°C por 72 horas. Posterior al tiempo de incubación se midió la absorbancia a 420 nm y se utilizó la fórmula $(A_{420nm} - 0,0103) / 5 \times 10^{-11}$, con el fin de determinar la concentración bacteriana óptima por utilizar en los inóculos (Alton et al., 1988). Una vez confirmadas las concentraciones óptimas se tomó una alícuota de cada caldo de infección y se colocó en un plato de Agar Tripticasa de Soya (ATS) para confirmar la pureza del cultivo y luego poder cuantificar la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFCs) que fueron inoculadas.

2.7 Infección en ratones

Para determinar si los aislamientos baboCR63, baboCR64 y baboCR67 tienen la capacidad de producir anticuerpos que generen un resultado positivo a la prueba Rosa Bengala y a la prueba de iELISA, se realizaron ensayos en ratones. En estos animales se evaluaron dos elementos: (i) la capacidad de replicación y persistencia de cada uno de los

aislamientos en el bazo del ratón (mediante la cuantificación de la bacteria inoculada) posterior a un tiempo de incubación determinado y, (ii) la capacidad de los sueros de estos ratones para generar resultados positivos a la prueba Rosa Bengala y un iELISA para *Brucella* spp.

Para realizar estos ensayos, se utilizaron grupos de seis ratones para cada tiempo de incubación. Para cada aislamiento bacteriano se analizaron dos tiempos de incubación (siete y 30 días). En total se utilizaron 36 ratones para todo el proyecto. Los ratones eran hembras de la cepa Swiss (CD-1) con un peso entre 18-22 g (aproximadamente cuatro y seis semanas de edad). Estos animales se mantuvieron en el Bioterio de la Escuela de Medicina Veterinaria. Los ratones se infectaron por la ruta intraperitoneal (i.p.) con 1×10^8 UFC. A los siete y 30 días post-infección, los ratones se sacrificaron utilizando el método físico de dislocación cervical (National Research Council 2011), se extrajeron los bazos y se realizaron los recuentos bacterianos tal y como se ha descrito anteriormente (Barquero-Calvo et al., 2013). El tiempo total en el que los ratones permanecieron en el experimento fue de un mes.

La experimentación en ratones se realizó siguiendo las recomendaciones del “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (National Research Council, 2011), de conformidad con la Ley de Bienestar Animal de Costa Rica correspondiente (Ley 9458) y bajo consentimiento del Comité de Bienestar Animal de la Escuela de Medicina Veterinaria. Todos los animales se mantuvieron en jaulas con iluminación de luz blanca LED, reciclaje de aire a través de un sistema extracción, temperatura ambiente, humedad ambiental y en jaulas con un tamaño acorde con su densidad y tamaño de 60 x 40 x 20 cm. La frecuencia del aseo fue de día de por medio de acuerdo con las prácticas rutinarias del Bioterio de la Escuela. Los ratones se mantuvieron con alimentación y agua *ad libitum*. El alimento utilizado es balanceado y diseñado específicamente para dietas de

roedores (suministrado por el Bioterio). El agua es del tubo, clorada y se cambió cada dos días. Los animales se observaron todos los días y se mantuvieron en condiciones de aislamiento en un cuarto destinado para experimentación.

2.8 Recuento bacteriano

Para realizar el adecuado conteo de las colonias bacterianas que persistieron en el bazo de los ratones se adaptó el procedimiento previamente mencionado (Barquero-Calvo et al., 2013). Se maceraron los bazos con solución Tween 20 PBS en una relación 1:10 según el peso individual de cada órgano. Posterior a esto se realizaron diluciones seriadas 1:10 en una placa de 24 pozos para luego platear en placas de ATS por duplicado. Los platos se incubaron en una atmósfera enriquecida con 5 % CO₂ a 37 °C y la lectura se hizo a las 48-72 horas de incubación. Un resultado positivo correspondió a observar crecimiento bacteriano en la zona donde se depositó la gota en el plato de agar y que este crecimiento coincidiera morfológica y microscópicamente con los aislamientos en investigación. El conteo se realizó en la dilución donde se pudo observar de 10-50 colonias separadas y para hacer el cálculo de UFC/g se multiplicó por el factor de dilución utilizado.

2.9 Serología (iELISA y Rosa Bengala)

Para cumplir con los objetivos de determinar si las muestras serológicas de ratones inoculados con los aislamientos bacterianos baboCR63, baboCR64 y baboCR67 generan un resultado positivo a la prueba Rosa Bengala y a la prueba iELISA para *Brucella* se realizaron los ensayos de ambas pruebas serológicas.

2.9.1 iELISA

Para realizar el iELISA se siguió el protocolo descrito en el kit ID Screen Brucellosis Serum Indirect Multi-species (ID.vet Diagnostics®). Se agregaron los diluyentes,

controles negativos y positivos que brinda el kit, y 10 μ L de suero de cada uno de los ratones utilizados en el estudio, en las placas de 96 pozos que brinda el fabricante y que están recubiertas con lipopolisacárido (LPS) de *Brucella abortus*. Se realizaron varias incubaciones y lavados con las soluciones que brinda el kit, con el propósito de formar complejos antígeno-anticuerpo. Finalmente se realiza la adición del conjugado anti-anticuerpo, que permite fijar los anticuerpos contra *Brucella* spp. y así mantenerlos en los pozos. Se determina la presencia del complejo antígeno-anticuerpo con un cambio de coloración azul a amarillo; en la ausencia de anticuerpos, no se observa coloración. Se realizó una lectura a 450 nm en el equipo de espectrofotometría Multiscan Ascent (Thermo Scientific®) y luego se calculó el porcentaje de seropositividad (S/P), según los estándares del kit utilizado. Se utilizó la escala indicada en el Cuadro 3 para determinar los resultados de las muestras (ID Screen® Brucellosis Serum Indirect Multi-species, ID.vet Diagnostics).

Cuadro 3

Escala de interpretación del iELISA según porcentajes de seropositividad.

| Resultado | INTERPRETACIÓN |
|----------------------------------|-----------------------|
| S/P % < 110% | Negativo |
| 110% < S/P % < 120% | Dudoso |
| S/P % > 120% | Positivo |

2.9.2 Rosa Bengala

Para realizar la prueba de Rosa Bengala se siguió el protocolo descrito en el kit ID Rose Bengal Test (IDvet Diagnostics®). Los sueros de los ratones fueron diluidos en PBS, así como los sueros de control positivo y control negativo. Posteriormente se realizó una dilución del reactivo de Rosa Bengala proporcionado por el fabricante y se agregaron 50 μ L de reactivo a cada pozo con suero. Finalmente se realizaron diluciones seriadas en cada fila de la placa y se incubó en oscuridad por 24 horas. Se realizó la lectura al día

siguiente y se realizó la titulación de anticuerpos para cada ratón, dependiendo de la presencia o ausencia de precipitado en las muestras.

2.10 Extracción de ADN

Las extracciones de ADN genómico se realizaron con el Wizard Genomic DNA Purification Ki de Promega®, al seguir las instrucciones del fabricante. Se realizó un pre-cultivo de los aislamientos bacterianos por utilizar, 72 horas antes de la extracción, como ya se describió previamente. Para proceder con la extracción se realizaron varios ciclos de centrifugado junto con soluciones de lisado celular para poder acceder al ADN. Una vez removidos los sobrenadantes y realizados los lavados de los precipitados de ADN, se rehidrata el ADN y se incubó a 65 °C por una hora. Los ADN se mantuvieron en congelación a -80 °C hasta que se enviaron al exterior para el proceso de secuenciación.

2.11 Secuenciación genómica

La secuenciación genómica de los aislamientos en estudio se realizó mediante dos estrategias a través de servicios tercerizados de laboratorios internacionales: (i) obtención de fragmentos cortos (“short reads”) de ADN con la plataforma Illumina NovaSeq a través de microbesNG, y (ii) obtención de “long reads” por Oxford Nanopore Technology (ONT), a través de genXone. El corte de los adaptadores de secuenciación y el control de calidad fueron realizados con bcl2fastq y porechop (v0.2.4) para los datos producidos por Illumina y ONT, respectivamente. El ensamblaje híbrido de las secuencias (Illumina y ONT) se realizó con el programa Unicycler (<https://github.com/rrwick/Unicycler>). Las estadísticas de los ensamblajes fueron evaluadas por QUAST (Gurevich et al., 2023). Los criterios de calidad utilizados para evaluar los ensamblajes híbridos fueron los descritos previamente en la literatura para análisis de este tipo (Molina-Mora et al, 2020).

2.12 Análisis genómico

El análisis de las secuencias genómicas fue realizado mediante varias estrategias. Inicialmente, los “reads” crudos se compararon con las bases de datos de KRAKEN, mediante un algoritmo de estimación de cardinalidad eficiente basado en k-meros, llamado HyperLogLog, que asigna un posible taxón según la coincidencia exacta de dichos k-meros (Breitwieser et al, 2018). Un k-mero es una secuencia de nucleótidos de cierta longitud determinada para delimitar el análisis.

Otra estrategia incluyó la identificación de las secuencias de rARN16s en los genomas analizados a través de mapeo contra el rARN16s de *E. coli* (accession ID NC_000913.3); una vez extraídas estas secuencias, se les realizó un Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) con el fin de identificar especies similares a los aislamientos evaluados con base en la similitud de las secuencias ya reportadas y su significancia estadística. El Evaluate y el %Ident son dos métricas importantes que ayudan a interpretar la significancia y la similitud de las alineaciones obtenidas. El Evaluate se define como la probabilidad de encontrar una alineación con una similitud de esa magnitud o mayor dado el tamaño de la base de datos utilizada; cuanto menor sea el Evaluate, más significativa es la alineación. Un Evaluate pequeño sugiere una mayor similitud biológica, por lo general, se considera que un valor menor que 0.01 es significativo (Madden, 2003).

El % Ident indica el porcentaje de nucleótidos que son idénticos entre las secuencias alineadas, es una medida directa de la identidad entre las secuencias. Un alto porcentaje de identidad sugiere que las secuencias son idénticas en términos de composición (Madden, 2003).

Una vez identificadas las especies similares, se recuperaron las secuencias de la base de datos NCBI, que se alinearon mediante bwa y muscle, y se generó un árbol filogenético basado en rARN16S mediante máxima verosimilitud con la herramienta RAxML.

Finalmente, se intentó escalar esta estrategia para realizar una alineación y filogenia de genoma completo con las especies similares en rARN16s y para las cuales existe genoma reportado en las bases de datos, detalladas en el Cuadro 4, al utilizar el genoma de baboCR64 como referencia.

Cuadro 4

Especies similares en rARN16s a los aislamientos en estudio utilizadas en la alineación de genoma completo.

| Strain | Especie |
|---------------|--|
| ERR3223707 | <i>Methylocella tundrae</i> T4 |
| SRR11022393 | <i>Rhizobium etli</i> SEMIA 4062 |
| SRR11135749 | <i>Rhizobium tropici</i> strain A12 |
| SRR13637654 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SZCCT0401 |
| SRR13805582 | <i>Chelatococcus daeguensis</i> M38T9 |
| SRR29648674 | <i>Brucella (Ochrobactrum) anthropi</i> Colony-249 |
| SRR3741278 | <i>Methylosinus</i> sp. PW1 |
| SRR3943982 | <i>Mesorhizobium ciceri</i> CMG6 |
| SRR4051944 | <i>Beijerinckia mobilis</i> DSM 2326 |
| SRR4136513 | <i>Bosea thiooxidans</i> DSM 9653 |
| SRR4147270 | <i>Chelatococcus sambhunathii</i> DSM 18167 |
| SRR7081653 | <i>Chelatococcus asaccharovorans</i> DSM 6462 |
| SRR7168680 | <i>Microvirga subterranea</i> DSM 14364 |
| SRR8552809 | <i>Camelimonas lactis</i> DSM 22958 |

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización bioquímica

Al evaluar los crecimientos bacterianos de las colonias baboCR64, baboCR67 y baboCR63 en medio de cultivo sólido (ATS y BAP) se observaron las siguientes características macroscópicas, descritas en el Cuadro 5.

Cuadro 5

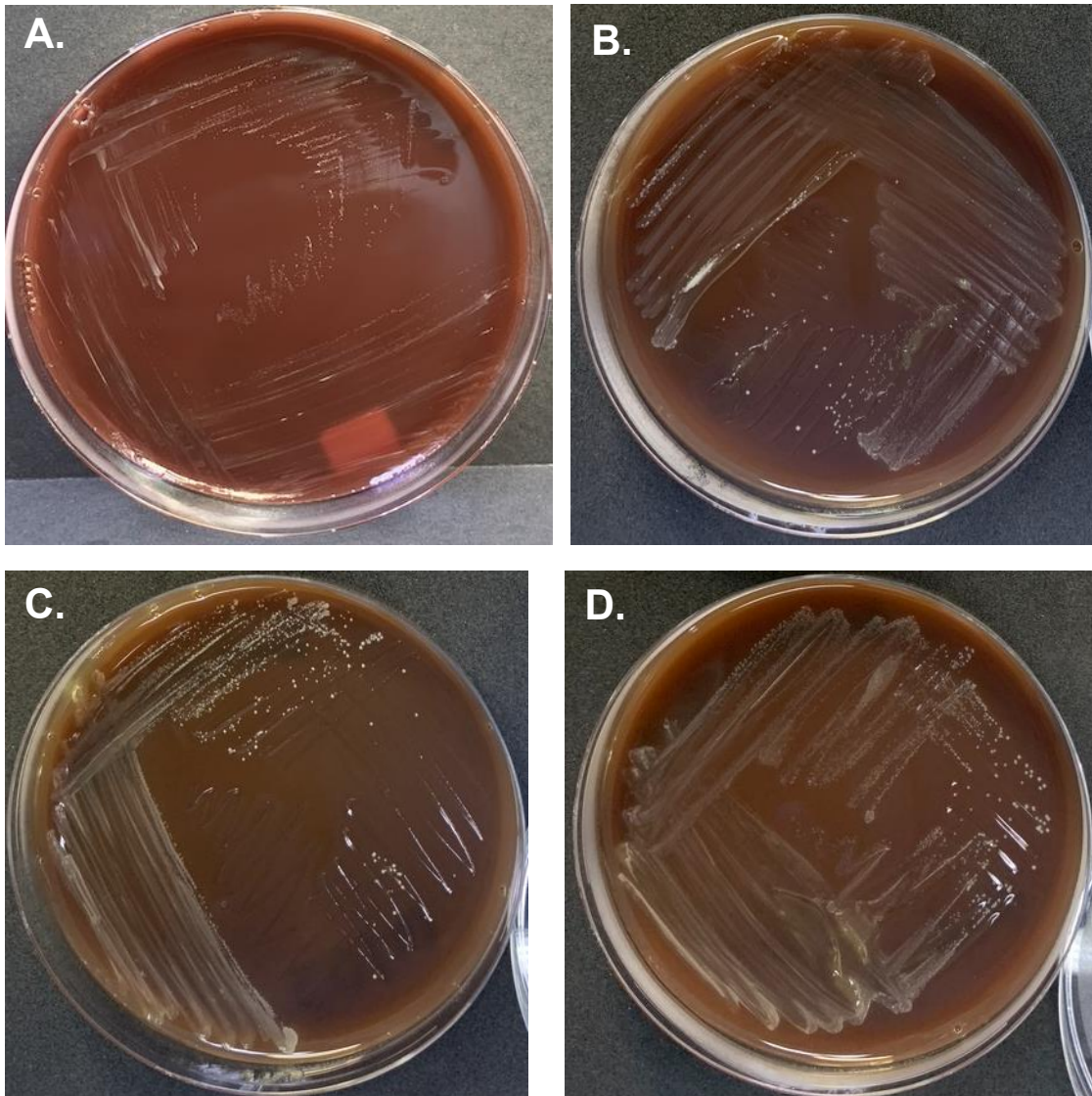
Descripción morfológica de los aislamientos

| Aislamiento | Tiempo de incubación para obtener crecimiento significativo | Descripción de la colonia | Tamaño macroscópico de la colonia | Tinción de Gram | Tamaño microscópico de la bacteria |
|-------------|---|--|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| baboCR63 | 72-96 horas | Colonias redondas, color crema, convexas | 0.03 mm | Cocobacilo Gram negativo | 1 x 2 μm |
| baboCR64 | 72 horas | Colonias redondas, color crema, convexas | 0.05 mm | Cocobacilo Gram negativo | 1.5 x 2.5 μm |
| baboCR67 | 72-96 horas | Colonias redondas, color crema, convexas | 0.04 mm | Cocobacilo Gram negativo | 1 x 1.5 μm |

En comparación con la morfología macro y microscópica de *B. abortus* 2308W, los tres aislamientos son compatibles con el género. Sin embargo, toman más tiempo en incubación (entre 72 y 96 horas más) para obtener crecimientos de un tamaño significativo, que permiten una evaluación adecuada de la morfología macroscópica. (OIE, 2018). A simple vista, y a la observación microscópica, es posible confundir las bacterias en estudio con una bacteria del género *Brucella*. En la Figura 1 se observan crecimientos de los aislamientos y de *B. abortus* 2308W en agar sangre.

Figura 1

Crecimiento de los aislamientos baboCR63(A), baboCR64(B) y baboCR67(C) inoculados en agar sangre. Se muestra la cepa *B.abortus* 2308W(D) como control.



En el cuadro 6 se detallan los resultados de la caracterización bioquímica realizada, al utilizar las pruebas clásicas descritas en la literatura para la identificación de un organismo como parte del género *Brucella* spp. (Alton et al., 1988; Rodríguez, Gamboa et al. 2005). Con respecto a las pruebas realizadas, los aislamientos en estudio mostraron resultados similares a *Brucella* spp. En ciertos ensayos, mientras que en otras pruebas presentaron particularidades específicas.

Cuadro 6

Caracterización bioquímica de los aislamientos baboCR63, baboCR64 y baboCR67, incluyendo las cepas de referencia.

| Pruebas | Aislamientos | | | |
|---|--------------|----------|----------|------------------------|
| | baboCR63 | baboCR64 | baboCR67 | <i>B. abortus</i> 2308 |
| Requerimiento de CO ₂ . | + | - | + | - |
| Reducción de nitratos. | - | - | - | - |
| Oxidación. | + | + | + | + |
| Actividad ureasa (min.). | ≤20 | ≥120 | ≥120 | ≤20 |
| Utilización de citrato. | - | - | - | - |
| Tinción de colonias con cristal violeta. | Inc. | Inc. | Inc. | - |
| Aglutinación en presencia de naranja de acridina. | Inc. | Inc. | Inc. | - |
| Producción H ₂ S. | + | + | + | + |
| Actividad catalasa. | + | + | + | + |
| Crecimiento en presencia de tinciones de: | | | | |
| Tionina (20µg/ml) | + | + | + | - |
| Fucsina básica (20µg/ml). | - | - | - | + |
| Crecimiento en agar selectivo McConkey. | + | + | + | - |
| Crecimiento en agar selectivo CITA. | + | + | + | + |
| Crecimiento en agar selectivo Farrel. | + | + | + | + |

Los tres aislamientos en estudio crecieron en los medios selectivos tanto CITA como Farrel, de manera paralela con la colonia control de *B. abortus* 2308W, como es posible observar en la figura 2. La literatura reporta que estos medios inhiben la mayoría microorganismos contaminantes, pero al mismo tiempo permiten el crecimiento de todas las especies de *Brucella* spp. (De Miguel et al., 2011). Si bien son medios que se consideran aptos para apoyar en el diagnóstico microbiológico de *Brucella* spp., no se establece con certeza en la literatura cuáles microorganismos contaminantes muestran

crecimiento en los medios selectivos y, cabe resaltar, que es importante conocer sus posibles limitantes como herramienta laboratorial.

Figura 1

Crecimiento de los tres aislamientos y la cepa de referencia en medio CITA (izquierda) y Farrel (derecha).



Los tres aislamientos evaluados también fueron positivos a los ensayos de ureasa y oxidasa, que son pruebas rápidas y clásicas para orientar el diagnóstico e identificación provisional de un aislamiento desconocido en estudio como posible *Brucella* (OIE, 2018). Durante la prueba de ureasa se observaron resultados variables del tiempo de reacción entre un aislamiento y otro, que se detallan en el cuadro 7.

Cuadro 7

Tiempos de reacción de prueba ureasa

| Aislamiento | Tiempo y categoría de reacción |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| baboCR63 | 20 minutos – reacción rápida |
| baboCR64 | 24 horas – reacción lenta |
| baboCR67 | 2 horas – reacción lenta |
| <i>B. abortus</i> 2308W | 20 minutos – reacción rápida |

La actividad ureasa ha sido observada en bacterias patógenas a través de la literatura. Algunas especies que presentan esta característica, aparte de *Brucella* spp., son: *Staphylococcus* spp., *Helicobacter* spp., *Mycobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *E. coli* enterohemorrágica, entre otras (Lee y Calhoun, 1997). También se considera un importante factor de virulencia, por lo que toma relevancia que los tres aislamientos en estudio no solo sean positivos, sino que baboCR63 posea la característica particular de ser de reacción rápida; cualidad que poseen pocos microorganismos aparte de *Brucella* spp. (Konieczna et al, 2012).

La producción de H₂S es otra cualidad evaluada en la caracterización e identificación de bacterias relevantes en cuadros clínicos. Aparte de *Brucella* spp., otras bacterias clínicamente significativas que son positivas a la prueba son *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Campylobacter* spp. y *Erysipelothrix* spp. (Thakur et al, 2021). Ha sido posible relacionar la producción de H₂S con características de tolerancia antibiótica; por ello es una característica relevante en el contexto mundial de la resistencia antibacteriana. (Belenky y Collins, 2011), al ser positivos a la prueba, sugieren que los aislamientos poseen características importantes de vigilar a nivel microbiológico.

Otra cualidad relevante en cuadros clínicos es la actividad catalasa. Bacterias que son positivas a esta prueba son más resistentes al estrés oxidativo; es una de las herramientas

que utiliza el cuerpo como defensa (Eason y Fan, 2014). Aparte de *Brucella* spp., otras bacterias clínicamente significativas que son positivas a la prueba son *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides fragilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. (Sharon et al, 1978). Los tres aislamientos en estudio fueron positivos a la prueba, con la particularidad que baboCR67 brindó un resultado muy débil, con una producción de burbujas escasa; se diferencia de los resultados rápidos y marcados de baboCR63, baboCR64 y la cepa control *B. abortus* 2308W.

El crecimiento o carencia de este de los aislamientos incógnitos en medios selectivos como la fucsina básica y la tionina es otra de las pruebas estándares que se utiliza para identificar especies de *Brucella* spp. La cepa *B. canis* beanCR12 creció en el medio con tionina, pero no con fucsina básica. De manera inversa, *B. abortus* 2308W no creció en el medio con tionina, pero si con fucsina básica. Ambos resultados coinciden con lo reportado en la literatura en cuanto a las cepas de referencia (WOAH, 2022). Los tres aislamientos en estudio crecieron en el medio con tionina, pero no con fucsina básica, al distinguirlas de *B. abortus* 2308W.

El agar MacConkey es un medio selectivo que solo crece bacterias Gram negativas (Jung y Hoilat, 2022). La cepa *B. abortus* 2308W posee la particularidad que no crece en este medio, a pesar de ser Gram negativa. Esta característica la comparte con otras especies del género *Brucella* como *Brucella melitensis* y la bacteria *Ochrobactrum anthropi* (Elsaghir y James, 2003; Miller et al, 1999). Al sembrar los aislamientos baboCR63, baboCR64 y baboCR67 en agar MacConkey se observa crecimiento a las 36 horas, lo que las diferencia de la cepa control *B. abortus* 2308W que no presentó crecimiento en el mismo rango de tiempo.

Las pruebas de absorción de cristal violeta y la prueba de aglutinación con el colorante naranja de acridina son dos ensayos típicos utilizados para determinar si una bacteria del

género *Brucella* spp. tiene un perfil liso o rugoso. Si bien los aislamientos en estudio no son *Brucella* spp., de igual forma se realizaron los ensayos para observar su comportamiento. Los resultados de los aislamientos en estudio a las pruebas de cristal violeta y de naranja acridina se determinan inconclusos, ya que no poseen las características específicas para ser clasificadas como rugosas o lisas.

Adicionalmente, para mejorar el poder de resolución entre los aislamientos estudiados, se analizó el perfil bioquímico por medio del sistema automatizado VITEK® 2 (se utilizó la tarjeta para Gram negativos “GN”), ya que aumenta significativamente el número de pruebas bioquímicas utilizadas. Para este análisis se utilizó *B. abortus* 2308W como cepa de referencia.

Al analizar los resultados brindados por el VITEK, presentados en la Figura 3, se observan porcentajes de similitud del 91.5 % entre el perfil bioquímico de los aislamientos y *B. abortus* 2308W. Esto refuerza la teoría que estos microorganismos podrían presentar confusión al momento de realizar el diagnóstico preliminar. Vale la pena resaltar las similitudes en pruebas clave para la definición de un microorganismo dentro del género *Brucella* spp., como lo es un resultado positivo a la prueba ureasa. Esta prueba es utilizada como método de tamizaje, siendo una de las primeras pruebas que se realizan en laboratorio cuando se sospecha de la presencia de *Brucella* spp., ya que su resultado es muy constante en el género y no se observa tanta variación entre diferentes especies (Lopardo et al, 2016).

Figura 2

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

| ANÁLISIS | <i>B. abortus</i> | | | |
|---------------------------------|-------------------|----------|----------|----------|
| | 2308 | BaboCR63 | BaboCR64 | BaboCR67 |
| Ala-Fe-Pro-ARILAMIDASA | | | | |
| ADONITOL | | | | |
| L-PirrolidoniL-ARILAMIDASA | | | | |
| L-ARABITOL | | | | |
| D-CELOBIOSA | | | | |
| BETA-GALACTOSIDASA | | | | |
| PRODUCCIÓN DE H ₂ S | | | | |
| BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASA | | | | |
| Glutamil Aramidasa pNA | | | | |
| D-GLUCOSA | | | | |
| GAMMA-GLUTAMIL-TRANSFERASA | | | | |
| FERMENTACIÓN/GLUCOSA | | | | |
| BETA-GLUCOSIDASA | | | | |
| D-MALTOSA | | | | |
| D-MANITOL | | | | |
| D-MANOSA | | | | |
| BETA-ZILOSIDASA | | | | |
| BETA-Alanina arilamidasa pNA | | | | |
| L-Prolina-ARILAMIDASA | | | | |
| LIPASA | | | | |
| PALATINOSA | | | | |
| Tirosna ARILAMIDASA | | | | |
| UREASA | | | | |
| D-SORBITOL | | | | |
| SACAROSA | | | | |
| D-TAGATOSA | | | | |
| D-TREALOSA | | | | |
| CITRATO (SODIO) | | | | |
| MALONATO | | | | |
| 5-KETO-D-GLUCONATO | | | | |
| Alcalinización de L-lactato | | | | |
| ALFA-GLUCOSIDADA | | | | |
| ALCALINIACIÓN DE SUCCINATO | | | | |
| BETA-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASA | | | | |
| ALFA-GALACTOSIDASA | | | | |
| FOSFATASA | | | | |
| GLICINA ARILAMIDASA | | | | |
| ORNITINA DESCARBOXILASA | | | | |
| LISINA DESCARBOXILASA | | | | |
| Asimilación de L-HISTIDINA | | | | |
| CUMARATO | | | | |
| BETA-GLUCORONIDASA | | | | |
| RESISTENCIA O/129 (Comp.vibrio) | | | | |
| Glu-Gly-Arg-ARILAMIDASA | | | | |
| Asimilación de L-MALATO | | | | |
| ELLMAN | | | | |
| Asimilación de L-LACTATO | | | | |

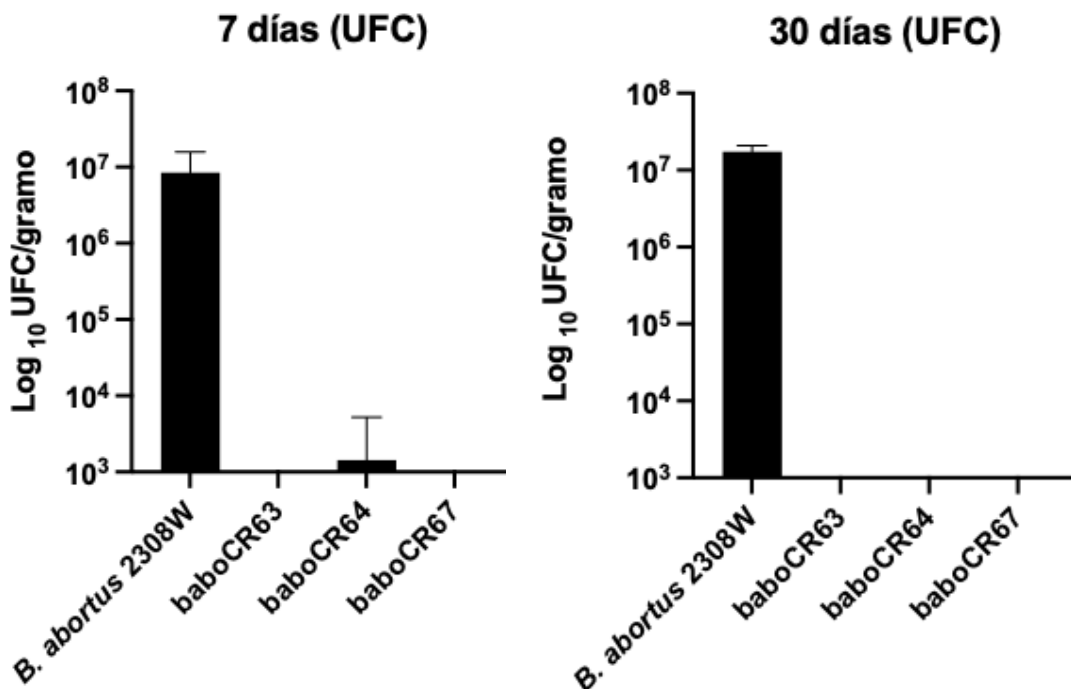
En las pruebas de oxidación de glucosa y la utilización de adonitol, *B. abortus* 2308W resulta positivo y los tres aislamientos incógnitos son negativos. Esto cobra relevancia ya que la mayoría de las especies de *Brucella* spp. oxidan glucosa y utilizan adonitol. Esto permite considerarlas como otro criterio de relativo bajo costo y de fácil reproducción en los laboratorios para el diagnóstico inicial del género (Essenberg et al, 2002).

3.2 Recuento bacteriano post-infección

Con el objetivo de evaluar si los aislamientos presentan algún tipo de capacidad de infección y permanencia en los órganos diana del hospedador, una vez cumplidos los primeros siete días post inoculación, se realizó el primer sacrificio de los ratones y el posterior cultivo de los bazos. Al realizar la lectura de los platos solo se observó crecimiento bacteriano de la cepa control *B. abortus* 2308W y del aislamiento baboCR64. Estas colonias coincidían en descripción macro y microscópica con los inóculos originales de ambas bacterias y, al repetir las pruebas bioquímicas, también coincidieron en todos los resultados, al brindar mayor certeza de que los crecimientos que observamos provenientes de los bazos de ratón coinciden con las bacterias inoculadas. Es posible analizar de manera cuantitativa el crecimiento de ambos microorganismos en la Figura 4.

Figura 3

Capacidad de replicación y persistencia de los aislamientos en estudio y B.abortus 2308W en bazo de ratón.



Nota: Se inocularon ratones de la cepa CD-1 vía intraperitoneal con 1×10^8 UFC de cada uno de los aislamientos en estudio y de la cepa de referencia *B. abortus* 2308W. Luego de 7 y 30 días post infección se determinó la cantidad de bacterias en el bazo según se describe en la sección de metodología.

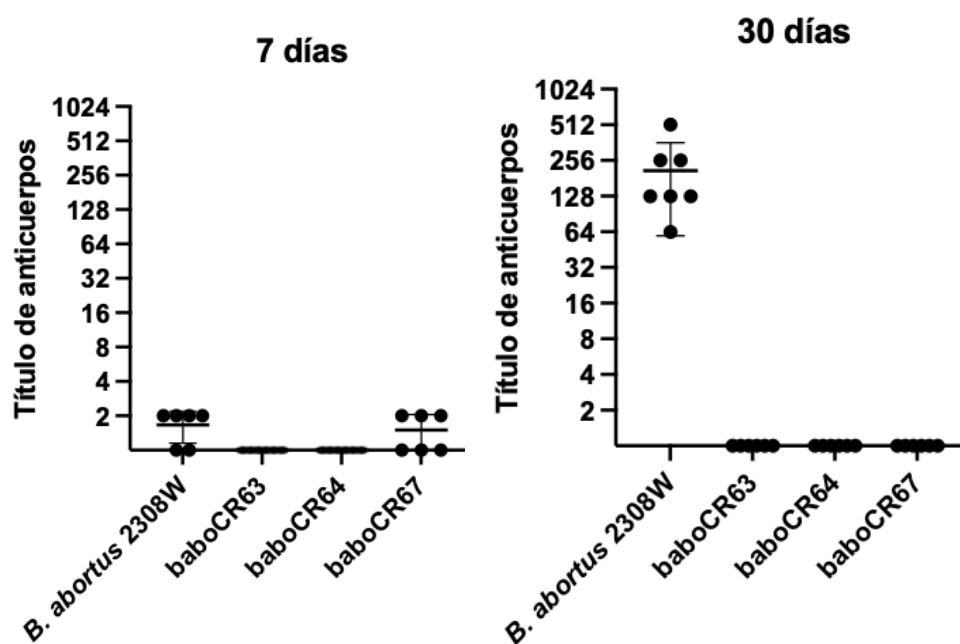
El segundo sacrificio de los ratones se realizó a los 30 días post inoculación. En esta ocasión únicamente se observó crecimiento de la cepa control *B. abortus* 2308W. Coincidió así con los datos experimentales reportados en otros modelos murinos publicados en la literatura (Grillo et al., 2012). Aunque se observa un crecimiento de pocas UFC en los bazos de los ratones inoculados con baboCR64 a los siete días post infección, no hubo crecimiento a los 30 días. Se concluyó que los aislamientos en evaluación no son capaces de replicarse y persistir por más de 30 días en órganos diana como el bazo en el modelo evaluado.

3.3 Serología

De manera paralela, con el cultivo de los bazos, se realizaron pruebas serológicas con la sangre muestreada a los siete días y 30 días post infección. En las Figuras 5 y 6 se detallan los resultados para las pruebas de iELISA y Rosa Bengala.

Figura 4

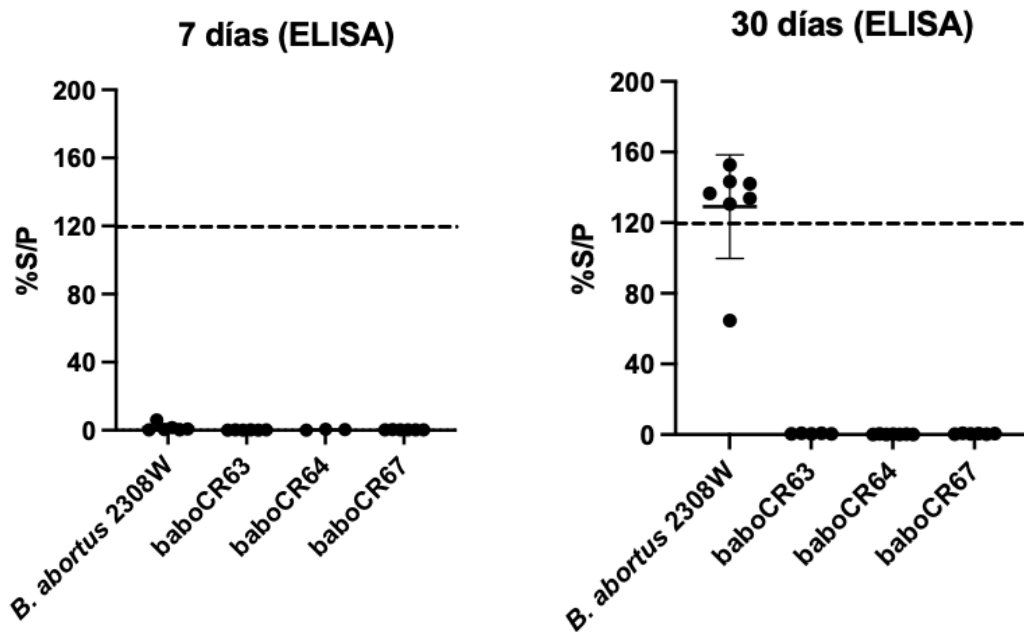
Capacidad de los sueros de ratón de generar un resultado positivo en el RBT



Nota: Se utilizaron los sueros obtenidos durante los dos diferentes tiempos de sacrificio para realizar una titulación de anticuerpos por medio de la prueba Rosa Bengala. Se realiza la medición de estos a los 7 días y a los 30 días post infección.

Figura 5

Capacidad de los sueros de ratón de generar un resultado positivo en iELISA



Nota: Se utilizaron los sueros obtenidos durante los dos diferentes tiempos de sacrificio para realizar un iELISA para la detección de anticuerpos contra los aislamientos inoculados. Se realiza la medición de estos a los 7 días y a los 30 días post infección, obteniendo los porcentajes de seropositividad (%S/P) y utilizando el valor de 120 como punto de corte, indicado en el kit de serología.

En la prueba de Rosa Bengala realizada a los siete días post infección es posible observar un título pequeño de anticuerpos (1:2), tanto para la cepa control *B. abortus* 2308W como para el aislamiento baboCR67. Esto coincide con lo reportado en la literatura, donde, por su lento crecimiento, el diagnóstico serológico temprano de las infecciones es difícil para *Brucella* spp. Al analizar los resultados del sacrificio a los 30 días, podemos observar cómo los títulos de anticuerpos para la cepa control *B. abortus* 2308W aumentaron exponencialmente, como era de esperar y como está reportado previamente (Grillo et al, 2012). Ninguno de los aislamientos experimentales generó respuesta serológica en los tiempos evaluados y coincidió con los resultados obtenidos del recuento de bacterias en

bazo, que indican que estas bacterias no poseen capacidad para replicarse en este modelo animal.

De la misma forma y, como se observa en la Figura 6, la cepa control *B. abortus* 2308W provocó una respuesta humoral hasta los 30 días, consecuente con otros ensayos reportados en la literatura, que indican que la producción de anticuerpos es exponencial desde el momento del inóculo y es posible comenzar a detectarlos después de dos semanas post inoculación a las dosis de infección que se utilizaron en el ensayo (Stranahan et al, 2019). Los aislamientos evaluados no generaron una respuesta humoral eficaz en los dos tiempos de sacrificio utilizados.

3.4 Análisis genómico

El análisis de las secuencias de Illumina y de ONT coincidieron entre ellas para cada aislamiento evaluado; se brindan porcentajes de similitud de hasta un 97.8 %. Los criterios de calidad de los ensamblajes fueron evaluados según la literatura previamente descrita (Molina-Mora et al., 2020), que permiten considerarlos confiables, según las referencias consultadas.

El análisis en KRAKEN brindó los siguientes porcentajes en el rubro de “clado no clasificado”: baboCR63 87.9 %, baboCR64 88.7 % y baboCR67 88.0 % (Anexo 1). Los clados engloban un antepasado común y todos los descendientes (vivos y extintos) de ese antepasado. Esto indica que más del 87 % de los tres genomas de los aislamientos estudiados no se encuentran en ninguna de las clasificaciones de los clados que se encuentran reportados en dicha base de datos. El análisis en KRAKEN suele ser altamente preciso, pero depende críticamente de la base de datos de genomas con la que se compara cada “read” (Breitwieser et al, 2018).

Al mapear estas secuencias en estudio con el genoma de la cepa de referencia (*B. suis* bv 1 st. 1330, accession ID NC_004310.3 y NC_004311.2) se obtuvieron los siguientes

porcentajes de cobertura genómica: baboCR63 19.8 %, baboCR64 18.8 % y baboCR67 20.7 %. Estos valores indican que los aislamientos no pertenecen al género *Brucella*.

Mediante el análisis nucleotide BLAST, basado específicamente en las secuencias de rARN16s de los aislamientos, con los parámetros, por defecto, optimizados para secuencias ligeramente similares (% Ident. Y Evalue), su similitud en rARN16s las identifica cercanas a los géneros bacterianos *Microvirga* spp. y *Camelimonas* spp, como se observa en las figuras 7, 8 y 9.

Figura 7

Resultado de nucleotide BLAST (rARN16s) realizado para baboCR67

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident |
|--|------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|
| Uncultured bacterium clone C58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | uncultured bact... | 2639 | 2639 | 97% | 0.0 | 99.72% |
| Uncultured Microvirga sp. clone 228 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | uncultured Micr... | 2586 | 2586 | 100% | 0.0 | 98.18% |
| Alpha proteobacterium 'M 1878 SK2' partial 16S rRNA gene, strain M 1878 SK2 | Camelimonas la... | 2577 | 2577 | 97% | 0.0 | 98.89% |
| Camelimonas fluminis strain XZ2 16S ribosomal RNA, partial sequence | Camelimonas fl... | 2567 | 2567 | 97% | 0.0 | 98.69% |
| Camelimonas lactis strain M 2040 16S ribosomal RNA, partial sequence | Camelimonas la... | 2556 | 2556 | 96% | 0.0 | 98.82% |
| Camelimonas sp. VDI5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Camelimonas s... | 2518 | 2518 | 95% | 0.0 | 98.73% |
| Camelimonas sp. NR 4-09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Camelimonas s... | 2422 | 2422 | 92% | 0.0 | 98.47% |
| Camelimonas lactis strain CB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Camelimonas la... | 2412 | 2412 | 93% | 0.0 | 98.12% |
| Uncultured bacterium clone 13/1/8F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | uncultured bact... | 2405 | 2405 | 93% | 0.0 | 97.85% |
| Uncultured Alphaproteobacteria bacterium 16S rRNA gene from clone QEDN2AF04 | uncultured bact... | 2396 | 2396 | 88% | 0.0 | 99.69% |
| Chelatococcus reniformis strain B2974 16S ribosomal RNA, partial sequence | Chelatococcus r... | 2355 | 2355 | 97% | 0.0 | 96.00% |
| Camelimonas abortus strain UK34/07-5 16S ribosomal RNA, partial sequence | Camelimonas a... | 2355 | 2355 | 97% | 0.0 | 96.06% |

Figura 8

Búsqueda de nucleotide BLAST (rARN16s) realizada para baboCR64

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident |
|---|------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|
| Camelimonas sp. VDI5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Camelimonas s... | 2612 | 2612 | 95% | 0.0 | 99.93% |
| Camelimonas sp. NR 4-09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Camelimonas s... | 2516 | 2516 | 92% | 0.0 | 99.71% |
| Uncultured bacterium clone ncd2782e03c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | uncultured bact... | 2392 | 2392 | 88% | 0.0 | 99.69% |
| Camelimonas fluminis strain XZ2 16S ribosomal RNA, partial sequence | Camelimonas fl... | 2645 | 2645 | 97% | 0.0 | 99.65% |
| Alpha proteobacterium 'M 1878 SK2' partial 16S rRNA gene, strain M 1878 SK2 | Camelimonas la... | 2599 | 2599 | 97% | 0.0 | 99.17% |
| Camelimonas lactis strain M 2040 16S ribosomal RNA, partial sequence | Camelimonas la... | 2579 | 2579 | 96% | 0.0 | 99.09% |
| Camelimonas lactis strain CCM 7696 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Camelimonas la... | 2359 | 2359 | 88% | 0.0 | 99.09% |
| Uncultured bacterium clone C58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | uncultured bact... | 2579 | 2579 | 97% | 0.0 | 98.96% |
| Uncultured Alphaproteobacteria bacterium 16S rRNA gene from clone QEDN2AF04 | uncultured bact... | 2335 | 2335 | 88% | 0.0 | 98.85% |
| Camelimonas lactis strain CB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Camelimonas la... | 2435 | 2435 | 93% | 0.0 | 98.41% |
| Uncultured alpha proteobacterium clone L15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | uncultured Alph... | 2361 | 2361 | 91% | 0.0 | 98.15% |
| Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SIHA978_N9D0_16S_B | uncultured bact... | 2274 | 2274 | 89% | 0.0 | 97.73% |
| Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SIHA1006_N9D0_16S_B | uncultured bact... | 2268 | 2268 | 89% | 0.0 | 97.66% |
| Uncultured Microvirga sp. clone 228 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | uncultured Micr... | 2536 | 2536 | 100% | 0.0 | 97.57% |

Figura 9

Búsqueda de nucleotide BLAST (rARN16s) realizada para baboCR63

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident |
|---|------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|
| Camelimonas sp. VDI5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Camelimonas s... | 2612 | 2612 | 95% | 0.0 | 99.93% |
| Camelimonas sp. NR 4-09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Camelimonas s... | 2516 | 2516 | 92% | 0.0 | 99.71% |
| Uncultured bacterium clone ncd2782e03c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | uncultured bact... | 2392 | 2392 | 88% | 0.0 | 99.69% |
| Camelimonas fluminis strain XZ2 16S ribosomal RNA, partial sequence | Camelimonas fl... | 2645 | 2645 | 97% | 0.0 | 99.65% |
| Alpha proteobacterium 'M 1878 SK2' partial 16S rRNA gene, strain M 1878 SK2 | Camelimonas la... | 2599 | 2599 | 97% | 0.0 | 99.17% |
| Camelimonas lactis strain M 2040 16S ribosomal RNA, partial sequence | Camelimonas la... | 2579 | 2579 | 96% | 0.0 | 99.09% |
| Camelimonas lactis strain CCM 7696 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Camelimonas la... | 2359 | 2359 | 88% | 0.0 | 99.09% |
| Uncultured bacterium clone C58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | uncultured bact... | 2579 | 2579 | 97% | 0.0 | 98.96% |
| Uncultured Alphaproteobacteria bacterium 16S rRNA gene from clone QEDN2AF04 | uncultured bact... | 2335 | 2335 | 88% | 0.0 | 98.85% |
| Camelimonas lactis strain CB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Camelimonas la... | 2435 | 2435 | 93% | 0.0 | 98.41% |
| Uncultured alpha proteobacterium clone L15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | uncultured Alph... | 2361 | 2361 | 91% | 0.0 | 98.15% |
| Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SIHA978_N9D0_16S_B | uncultured bact... | 2274 | 2274 | 89% | 0.0 | 97.73% |
| Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SIHA1006_N9D0_16S_B | uncultured bact... | 2268 | 2268 | 89% | 0.0 | 97.66% |
| Uncultured Microvirga sp. clone 228 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | uncultured Micr... | 2536 | 2536 | 100% | 0.0 | 97.57% |

La literatura disponible sobre los géneros *Camelimonas* spp. y *Microvirga* spp. es limitada, especialmente en el contexto veterinario. Han sido descritos de manera general dentro de la microbiota ruminal y en glándula mamaria y forman parte de ciclos de fijación del nitrógeno y descomposición de materia orgánica (Garbini et al, 2021; Gryaznova et al, 2021; Zhao et al, 2022). También fue propuesta una especie aislada de una placenta de vaca después de un aborto, *Camelimonas abortus* sp. nov. Para ello no fue posible hallar su información genómica para hacer una comparación específica con los aislamientos al momento de finalizar el estudio (Kampfer et al, 2012).

La relevancia de *Camelimonas* spp. y *Microvirga* spp, en estos animales, requiere de más investigación para entender sus roles y sus interacciones con el resto del microbiota, así como su posible patogenicidad.

El análisis filogenético, con base en rARN16s (Anexo 2), proporciona información sobre las posibles relaciones evolutivas de los aislamientos, comparados con especies bacterianas. Los resultados de este análisis y la alineación de genoma completo muestran una mayor similitud genómica entre baboCR64 y baboCR67 (98.37 %), no tanto así con baboCR63 (81 %) y una cercanía con *Camelimonas lactis* de 73.9 %.

En el anexo 3 es posible observar el árbol filogenético propuesto, al ubicar la cercanía de baboCR64 y baboCR67 a *Camelimonas* spp y coincidir con las alineaciones previamente mencionadas. Estos análisis son contradictorios con respecto a lo hallado en el “nucleotide blast” para baboCR63, puesto que en el “nucleotide blast” es posible observar que, el % Ident brinda más del 99 % de similitud con el género *Camelimonas* spp; sin embargo, el análisis filogenético lo ubica más cercano a *Rhodopseudomonas*. Las diferencias entre un BLAST de nucleótidos y una alineación de genoma completo pueden surgir debido a la cobertura parcial del genoma o incluso la alineación de este.

Los resultados acá indicados permiten aseverar que la información genómica descarta que estos aislamientos correspondan a microorganismos del género *Brucella* spp., ya que no se obtienen porcentajes de similitud relevantes entre ellas.

4. CONCLUSIONES

1. La caracterización fenotípica básica de los aislamientos bacterianos baboCR64, baboCR67 y baboCR63, obtenidos en distintas fincas bovinas y bufalinas ubicadas en Cartago y Upala en Costa Rica en los años 2012-2013, indica que macroscópicamente es posible confundir los aislamientos con una especie de *Brucella* spp, en los medios agar sangre, CITA y Farrell. (ver figuras 1 y 2).
2. El perfil bioquímico obtenido con pruebas típicamente utilizadas para la caracterización de las especies del género *Brucella* spp. demostró que los aislamientos bacterianos baboCR64, baboCR67 y baboCR63 no pertenecen al género *Brucella* spp. y poseen suficientes diferencias bioquímicas como para diferenciarlas a nivel de diagnóstico primario del género *Brucella* spp.
3. Los medios CITA y Farrell permiten el crecimiento de otras bacterias acompañantes, resistentes a los antibióticos y antifúngicos presentes en estos medios, altamente selectivos para la mayoría de bacterias contaminantes.
4. La escasa generación de respuesta serológica mediante las pruebas de tamizaje utilizadas en bovinos para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus*, indica que, al profundizar en pruebas más específicas de caracterización y secuenciación molecular, estos aislamientos no coinciden con el perfil típico de las brucelas.
5. Se confirmó que la información genómica de las especies evaluadas no coincide con los perfiles de *Brucella* spp.
6. Se identificaron dos géneros bacterianos cuyas colonias podrían confundirse en medios de cultivo con *Brucella* spp., pero que al realizar el tamizaje bioquímico y molecular básico como Bruceladder, se evita que estos interferentes causen confusiones en la recuperación el agente etiológico *Brucella* spp.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda al personal de laboratorio realizar de manera rutinaria el tamizaje bioquímico a bacterias compatibles, morfológicamente, con *Brucella* spp provenientes de medios no selectivos y selectivos, antes de realizar pruebas moleculares, para aumentar la probabilidad de la correcta recuperación del agente de interés.
- Si la colonia sospechosa se comporta bioquímicamente compatible con bacterias del género *Brucella* spp., se recomienda al personal de laboratorio considerar realizar pruebas moleculares como lo es la secuenciación genómica, para determinar la pertenencia al género *Brucellae*.
- Se recomienda al personal de laboratorio realizar paso a paso el protocolo para el cultivo de *Brucella* spp, según las guías de la OMSA y el marco legal de SENASA y, si existe alguna duda, mantener presentes los géneros de bacterias como *Microvirga* spp. y *Camelimonas* spp, que pueden presentarse como un factor de confusión en la identificación macroscópica de rutina de *Brucella* spp.
- Se recomienda capacitar al personal y estudiantes que realizan cultivo bacteriológico de *Brucella* spp, para que adquieran la experiencia necesaria, en la correcta recuperación de estas bacterias y evitar confusiones.
- Se requiere más investigación para comprender mejor el rol de las bacterias del género *Microvirga* spp. y *Camelimonas* spp en el ganado bovino y bufalino del país, particularmente si existe o no relevancia clínica.
- Se brinda como recomendación a los profesionales de salud encargados de la vigilancia que, en casos donde las pruebas no sean 100% concluyentes, indagar con diagnósticos más específicos y tener presente la existencia de géneros que

podrían generar problemática, sin disminuir confiabilidad de las pruebas actualmente utilizadas.

- Dado que *Brucella* spp es un género en expansión, con una similitud de genoma de cerca del 97%, es necesario considerar que se requieren técnicas de alta resolución (WGS, MALDI TOFF) para resolver casos en los cuales las técnicas convencionales pueden no brindar resultados 100% específicos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D., & Verger, J. M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).
2. Arias-Gómez, B., Fonseca-Muñoz, R., Alfaro-Alarcón, A., Chacón-Díaz, C., Moreno, E., Rucavado, A., & Barquero-Calvo, E. (2022). Platelet depletion does not alter the course of *Brucella abortus* infection in vivo. *Microbial Pathogenesis*, 164, 105458. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105458>
3. Atluri, V. L., Xavier, M. N., de Jong, M. F., den Hartigh, A. B., & Tsolis, R. (2011). Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annual Review of Microbiology*, 65, 523–541.
4. Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D., Guzmán-Verri, C., Chacón-Díaz, C., Rucavada, A., Moriyón, I., & Moreno, E. (2007). *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS ONE*, 2(7), e631.
5. Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., & Moreno, E. (2013). Bacterial counts in spleen. *Bio-protocol*, 3, 1–6.
6. Illumina. (2023). *bcl2fastq Conversion Software*. https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/bcl2fastq-conversion-software.html
7. BioTechne. (2022). What is an ELISA? R&D Systems. <https://www.rndsystems.com/resources/what-is-an-elisa-and-elisa-types>
8. Breitwieser, F. P., Baker, D. N., & Salzberg, S. L. (2018). KrakenUniq: Confident and fast metagenomics classification using unique k-mer counts. *Genome Biology*, 19, 198. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1568-0>

9. Byndloss, M., & Tsolis, R. (2016). *Brucella* spp. virulence factors and immunity. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 9.1–9.17.
10. CDC. (2017). *Brucellosis reference guide: Exposures, testing, and prevention*. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. <https://www.cdc.gov/brucellosis/pdf/brucellosi-reference-guide.pdf>
11. Cernyseva, M. I., Knjazeva, E. N., & Egorova, L. S. (1977). Study of the plate agglutination test with rose bengal antigen for the diagnosis of human brucellosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 55(6), 669–674.
12. Chacón-Díaz, C., Altamirano-Silva, P., González-Espinoza, G., Medina, M. C., Alfaro-Alarcón, A., Bouza-Mora, L., Jiménez-Rojas, C., Wong, M., Barquero-Calvo, E., Rojas, N., Guzmán-Verri, C., Moreno, E., & Chaves-Olarte, E. (2015). *Brucella canis* is an intracellular pathogen that induces a lower proinflammatory response than smooth zoonotic counterparts. *Infection and Immunity*, 83(12), 4861–4870. <https://doi.org/10.1128/IAI.00995-15>
13. Chacón-Díaz, C., Zabalza-Barangua, A., San Román, B., Blasco, J. M., Iriarte, M., Salas-Alfaro, D., Hernández-Mora, G., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Grillo, M. J., & Moreno, E. (2021). *Brucella abortus* S19 GFP-tagged vaccine allows the serological identification of vaccinated cattle. *PLoS ONE*, 16(11), e0260288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260288>
14. Chemtest. (2021). *VETLIS Bovinos Manual*. Argentina: VETLIS. <https://www.chemtest.net/docs/vetlis-bovinos-manual.pdf>
15. Chinchilla, D. (2022). *Datos de vigilancia basada en laboratorio de la brucelosis humana, Costa Rica, 2011-2022*. INCIENSA.

16. Corbel, M. J., World Health Organization., Food and Agriculture Organization of the United Nations., & International Office of Epizootics. (2006). *Brucellosis in humans and animals*. World Health Organization.
17. Croucher, N. J., Page, A. J., Connor, T. R., Delaney, A. J., Keane, J. A., Bentley, S. D., Parkhill, J., & Harris, S. R. (2015). Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using gubbins. *Nucleic Acids Research*, 43(3), e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1196>
18. Dahouk, S., Sprague, L. D., & Neubauer, H. (2013). New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 32(1), 177–188.
19. Dean, A. S., Crump, L., Greter, H., Schelling, E., & Zinsstag, J. (2012). Global burden of human brucellosis: A systematic review of disease frequency. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10), e1865. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001865>
20. Díaz, R., Casanova, A., Ariza, J., & Moriyón, I. (2011). The Rose Bengal test in human brucellosis: A neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4), e950. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000950>
21. Duran, P. (2012). *Epidemiología de la discapacidad y salud pública. AVAD y EVAD: ¿Cuál es su utilidad?* Centro Latinoamericano de Perinatología. <https://www.sap.org.ar/docs/congresos/2012/disca/ppt/Jueves/duranepidemiologia.pdf>
22. Eason, M. M., & Fan, X. (2014). The role and regulation of catalase in respiratory tract opportunistic bacterial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 74, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.07>

23. Elsaghir, A. A. F., & James, E. A. (2003). Misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by API 20NE. *Journal of Medical Microbiology*, 52(5), 441–442. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05153-0>
24. Freer, E., & Castro-Arce, R. (2001). *Brucella*: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 22(1-2). https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29482001000100008
25. Garcia-Yoldi, D., Marín, C., de Miguel, M. J., Muñoz, P., Vizmanos, J. L., & López-Goñi, I. (2006). Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clinical Chemistry*, 52, 779–781.
26. Garofolo, G., Ancora, M., & Di Giannatale, E. (2013). MLVA-16 loci panel on *Brucella* spp. using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 92(2), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.11.007>
27. Grillo, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., Moriyón, I., & Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Veterinary Research*, 43(1), 29. <http://www.veterinaryresearch.org/content/43/1/29>
28. Gryaznova, M. V., Syromyatnikov, M. Y., Dvoretzkaya, Y. D., Solodskikh, S. A., Klimov, N. T., Mikhalev, V. I., Zimnikov, V. I., Mikhaylov, E. V., & Popov, V. N. (2021). Microbiota of cow's milk with udder pathologies. *Microorganisms*, 9(1974). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091974>
29. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29, 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>

30. Guzmán-Verri, C., Suárez-Esquivel, M., Ruíz-Villalobos, N., Zygmunt, M. S., Gonnet, M., Campos, E., Víquez-Ruiz, E., Chacón-Díaz, C., Aragón-Aranda, B., Conde-Álvarez, R., Moriyón, I., Blasco, J. M., Muñoz, P. M., Baker, K. S., Thomson, N. R., Cloeckert, A., & Moreno, E. (2019). Genetic and phenotypic characterization of the etiological agent of canine orchiepididymitis smooth *Brucella* sp. BCCN84.3. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 253. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00253>
31. Hadfield, J., Croucher, N. J., Goater, R. J., Abudahab, K., Aanensen, D. M., & Harris, S. R. (2018). Phandango: An interactive viewer for bacterial population genomics. *Bioinformatics*, 34(2), 292–293. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx610>
32. Hernández-Mora, G., Bonilla-Montoya, R., Barrantes-Granados, O., Esquivel-Suárez, A., Montero-Caballero, D., González-Barrientos, R., Fallas-Monge, Z., Palacios-Alfaro, J. D., Baldi, M., Campos, E., Chanto, G., Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Romero-Zúñiga, J. J., & Moreno, E. (2017b). Brucellosis in mammals of Costa Rica: An epidemiological survey. *PLoS ONE*, 12(8), e0182644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182644>
33. Hernández-Mora, G., Ruiz-Villalobos, N., Bonilla-Montoya, R., Romero-Zúñiga, J. J., Jiménez-Arias, J., González-Barrientos, R., Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., Rojas, N., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., & Moreno, E. (2017a). Epidemiology of bovine brucellosis in Costa Rica: Lessons learned from failures in the control of the disease. *PLoS ONE*, 12(8), e0182380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182380>

34. Isidoro-Ayza, M., Ruiz-Villalobos, N., Pérez, L., Guzmán-Verri, C., Muñoz, P. M., Alegre, F., Barberán, M., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., González-Barrientos, R., Moreno, E., Blasco, J. M., & Domingo, M. (2014). *Brucella ceti* infection in dolphins from the Western Mediterranean Sea. *BMC Veterinary Research*, 10, 206. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0206-7>
35. Jung, B., & Hoilat, G. J. (2022). MacConkey medium. In StatPearls. Retrieved November 2023, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557394/>
36. Kittelberger, R., Bundensen, P. G., Cloeckaert, A., Greiser-Wilke, I., & Letesson, J. J. (1998). Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9: IV. Evaluation of the M- and C-epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infections. *Veterinary Microbiology*, 60, 45–57.
37. Konieczna, I., Zarnowiec, P., Kwinkowski, M., Kolesinska, B., Fraczyk, J., Kaminski, Z., & Kaca, W. (2012). Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases. *Current Protein & Peptide Science*, 13(8), 789–806. <https://doi.org/10.2174/138920312804871094>
38. Lee, S. G., & Calhoun, D. H. (1997). Urease from a potentially pathogenic coccoid isolate: Purification, characterization, and comparison to other microbial ureases. *Infection and Immunity*, 65(10), 3991–3996. <https://doi.org/10.1128/iai.65.10.3991-3996>
39. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>

40. Liu, D. (2015). Brucella. In Y. Tang, D. Liu, J. Schwartzman, M. Sussman, & I. Poxton (Eds.), *Molecular Medical Microbiology: Volume 3* [Internet]. Elsevier. Retrieved February 18, 2022, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123971692001013?via%3Dihub>
41. Lopardo, H. A. (2016). Bacterias de importancia clínica. In *Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología* (pp. 11–73).
42. Lukambagire, A., Mendes, A., Bodenham, R., McGiven, J., Mkenda, N., Mathew, C., Rubach, M., Sakasaka, P., Shayo, D., Maro, V., Shirima, G., Thomas, K., Kasanga, C., Kazwala, R., Halliday, J., & Mmbaga, B. (2021). Performance characteristics and costs of serological tests for brucellosis in a pastoralist community of northern Tanzania. *Scientific Reports*, 11(5480). Retrieved September 29, 2022, from <https://www.nature.com/articles/s41598-021-82906-w#citeas>
43. Madden, T. (2003). The BLAST sequence analysis tool. In J. McEntyre & J. Ostell (Eds.), *The NCBI Handbook* (pp. 16-1–16-10). National Center for Biotechnology Information (US).
44. Manogo, M., Thys, E., Achi, Y. L., Fretin, D., Michel, P., Abatih, E., Berkvens, D., & Saegerman, C. (2013). Bayesian estimation of the true prevalence, sensitivity, and specificity of the Rose Bengal and indirect ELISA tests in the diagnosis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal*, 195, 114–120.
45. Mert, A., Ozaras, R., Tabak, F., Bilir, M., Yilmaz, M., Kurt, C., Ongoren, S., Tanriverdi, M., & Ozturk, R. (2003). The sensitivity and specificity of Brucella agglutination tests. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46, 241–243.

46. Miller, W. G., Adams, L. G., Ficht, T. A., Cheville, N. F., Payeur, J. P., Harley, D. R., House, C., & Ridgway, S. H. (1999). Brucella-induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 30(1), 100–110. Retrieved November 2023, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10367651/>
47. Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2018). Reglamento para la intervención de la brucelosis bovina. Decreto 34858-MAG-2008. La Gaceta, N° 230, San José, Costa Rica. http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=64425&nValor3=74734&strTipM=TC
48. Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2018). Reforma reglamento para la prevención, el control y erradicación de la tuberculosis en los bovinos y reglamento para la intervención de la brucelosis bovina. Decreto N° 41219-MAG. La Gaceta, N° 230, San José, Costa Rica. http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=87100&nValor3=113292&strTipM=TC
49. Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2000). Reglamento sobre el control de la brucelosis en los animales. Decreto N° 28514-MAG. La Gaceta, N° 53, San José, Costa Rica. <http://www.ecolex.org/fr/details/legislation/decreto-no-27946mag-reglamento-sobre-el-control-de-la-brucelosis-en-los-animales-lex-faoc017344/>

50. Corbel, M. J. (2006). Brucellosis in humans and animals [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Retrieved February 18, 2022, from <https://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>
51. Mobley, H. L., & Hausinger, R. P. (1989). Microbial ureases: Significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews*, 53(1), 85–108. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372718/>. <https://doi.org/10.1128/mr.53.1.85-108.1989>
52. Mobley, H. L. T. (2001). Urease. In H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, & S. L. Hazell (Eds.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics* [Internet]. ASM Press. Available from <https://doi.org/10.1128/9781555818005.ch16>
53. Moreno, E., Blasco, J. M., & Moriyon, I. (2022). Facing the human and animal brucellosis conundrums: The forgotten lessons. *Microorganisms*, 10(942). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050942>
54. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed.). Washington, DC: National Academies Press (US). PMID: 21595115
55. Nielsen, K., Smith, P., Yu, W., Nicoletti, P., Jungersen, G., Stack, J., & Godfroid, J. (2006). Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* sp. and *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109, 69–78.
56. Ochoa-Azze, R. F. (2012). Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos [Internet]. La Habana, Cuba: PAHO. Retrieved September 25, 2022, from

<https://www.paho.org/cub/dmdocuments/PubFINLAY-LIBROTecInmunoParaEClinVacunas2012.pdf>

57. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2018). Manual Terrestre de la OIE: Brucelosis [Internet]. Retrieved February 26, 2022, from <https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/>
58. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2022). Brucellosis (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) [Internet]. Retrieved February 26, 2022, from https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLOSIS.pdf
59. Olsen, S., & Palmer, M. (2014). Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years. *Veterinary Pathology*, 51(6), 1076–1089. <https://doi.org/10.1177/0300985814540545>
60. Omer MK, Skjerve E, MacMillan AP, Woldehiwet Z. 2001. Comparison of three serological tests in the diagnosis of *Brucella* infection in unvaccinated cattle in Eritrea. *Prev Vet Med*. 48:215-222. PMID: 11182464
61. Page AJ, Taylor B, Delaney AJ, Soares J, Seemann T, Keane JA, Harris SR. 2016. SNP-Sites: rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments. *Microb Genom* 2: e000056. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000056>
62. Pappas G, Papadimitriou P, Aktridis N, Christou L, Tsianos EV. 2006. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2006(6): 91-99.
63. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. 2014. Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25: 1043-1055.

64. Porechop. [Internet]. c2022. University of Melbourne: Bio21 Molecular Science & Biotechnology Institute; [cited 2023 Nov 10]. Available from <https://github.com/rrwick/Porechop>
65. QUAST [Internet]. c2022. Center for Algorithmic Biotechnology; [cited 2023 Nov 10]. Available from <https://quast.sourceforge.net>.
66. SENASA. [Internet]. 2019. Programa Nacional de Brucelosis. Costa Rica: SENASA. [citado 29 de setiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.senasa.go.cr/informacion/centro-de-informacion/informacion/sgc/pnbrucelosis>
67. SENASA. [Internet]. 2020. Protocolo de Vigilancia de Brucelosis. Costa Rica: SENASA; [citado 29 de setiembre de 2022]. Disponible en: <http://www.senasa.go.cr/informacion/centro-de-informacion/informacion/sgc/pnbrucelosis/procedimientos-2/pn-b-pg-001-vigilancia-epidemiologica-de-brucelosis>
68. SENASA. [Internet]. 2022. Vacunación contra Brucelosis Bovina. Costa Rica: SENASA. [citado 29 de setiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.senasa.go.cr/informacion/centro-de-informacion/informacion/sgc/pnbrucelosis/procedimientos-2/8133-pn-b-pg-005-v02-vacunacion-contrabrucelosis-bovina-6/file>
69. Sharon L, Hansen MS, Barbara JS. 1978. Slide Catalase: A Reliable Test for Differentiation and Presumptive Identification of Certain Clinically Significant Anaerobes. American Journal of Clinical Pathology. [Internet]. [cited 2023 Nov]; 69(1): 36-40. Available from: <https://doi.org/10.1093/ajcp/69.1.36>

70. Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
71. Stranahan LW, Khalaf OH, Garcia- Gonzalez DG, Arenas-Gamboa AM (2019) Characterization of *Brucella canis* infection in mice. *PLoS ONE* 14(6): e0218809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218809>
72. Suárez-Esquivel M, Hernández-Mora G, Ruiz-Villalobos N, Barquero-Calvo E, Chacón-Díaz C, Ladner JT, et al. (2020) Persistence of *Brucella abortus* lineages revealed by genomic characterization and phylodynamic analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 14(4): e0008235. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008235>
73. Suárez-Esquivel M, Olarte-Chaves E, Moreno E, Guzmán-Verri C. 2020. *Brucella* Genomics: Macro and Micro Evolution. *Int. J. Mol. Sci* 21(7749): 1-23.
74. Suárez-Esquivel M, Ruiz-Villalobos N, Castillo-Zeledón A, Jiménez-Rojas C, Roop II RM, Comerci DJ, Barquero-Calvo E, Chacón-Díaz C, Caswell CC, Baker KS, Chaves-Olarte E, Thomson NR, Moreno E, Letesson JJ, De Bolle X and Guzmán-Verri C. 2016. *Brucella abortus* Strain 2308 Wisconsin Genome: Importance of the Definition of Reference Strains *Front. Microbiol.* [Internet]. [citado el 18 de junio de 2024]; 7:1557. doi: 10.3389/fmicb.2016.01557
75. Suárez-Esquivel M, Ruiz-Villalobos N, Jiménez-Rojas C, Barquero-Calvo E, Chacón-Díaz C, Viquez-Ruiz E, Rojas-Campos N, Baker KS, Oviedo-Sánchez G, Amuy E, Chaves-Olarte E, Thomson NR, Moreno E, Guzmán-Verri C. 2017. *Brucella neotomae* infection in humans, Costa Rica. *Emerg Infect Dis* 23:997-1000. <https://doi.org/10.3201/eid2306.162018>
76. Thakur, Swagata & Anokhe, Archana & Kalia, Vinay. (2021). Biochemical Test for Detecting Hydrogen Sulphide (H₂S) Producing Bacteria. 2. 53-56. (PDF)

Biochemical Test for Detecting Hydrogen Sulphide (H₂S) Producing Bacteria
(researchgate.net)

77. Unicycler. [Internet]. c2022. University of Melbourne: Bio21 Molecular Science & Biotechnology Institute; [cited 2023 Nov 10]. Available from <https://github.com/rrwick/Unicycler>.
78. Urease Test Protocol [Internet]. 2010. American Society for Microbiology; [updated 2016; cited 2023 Nov]. Available from: <https://asm.org/getattachment/ac4fe214-106d-407c-b6c6-e3bb49ac6ffb/urease-test-protocol-3223.pdf>
79. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. 2017. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13:e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
80. WOAH. (2022). Terrestrial Animal Health Code 2022 Chapter 3.1.4. - Brucellosis (infection with *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). 1-48. https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLOSIS.pdf
81. Yagupsky P, Morata P, Colmenero J. 2019. Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Clinical Microbiology Reviews*. [Internet]. [citado 29 de setiembre de 2022]. Disponible en <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/CMR.00073-19>
82. Zhao, Y.; Yu, S.; Zhang, S.; Li, Y.; Tu, Y.; Liu, M.; Jiang, L. Microbiome-Metabolomics Insights into the Milk of Lactating Dairy Cows to Reveal the Health-Promoting Effects of Dietary Citrus Peel Extracts on the Mammary Metabolism. *Foods* 2022, 11, 4119. <https://doi.org/10.3390/foods11244119>

7. ANEXOS

Anexo 1

Análisis realizado en el software *KRAKEN* para los aislamientos

```

kraken version: kraken-0.10.6-a2d113dc8f
tabase: /lustre/scratch108/pathogen/pathpipe/kraken/pi_qc_2015521
87,88 1655017 1655017 U      0 unclassified
12,12 228212    738 -      1 root
12    226042    281 -    131567 cellular organisms
11,95 224991    6094 D      2 Bacteria
11,25 211854    9943 P     1224 Proteobacteria
9,41 177178   16106 C    28211 Alphaproteobacteria
6,93 130600   13471 O     356 Rhizobiales
1,66 31312    4131 F    41294 Bradyrhizobiaceae
0,74 13919     0 G     1073 Rhodopseudomonas
0,74 13919    3528 S    1076 Rhodopseudomonas palustris
0,13 2410     2410 -   316055 Rhodopseudomonas palustris BisA53
0,11 2026     2026 -   316058 Rhodopseudomonas palustris HaA2
0,09 1772     1772 -   652103 Rhodopseudomonas palustris DX-1
0,09 1701     1701 -   316057 Rhodopseudomonas palustris BisB5
0,07 1340     1340 -   316056 Rhodopseudomonas palustris BisB18
0,04 807      807 -   395960 Rhodopseudomonas palustris TIE-1
0,02 335      335 -   258594 Rhodopseudomonas palustris CGA009
0,51 9623    2222 G     374 Bradyrhizobium
0,09 1627    1627 S   114615 Bradyrhizobium sp. ORS 278
0,07 1293    1293 S   335659 Bradyrhizobium sp. S23321
0,07 1269     0 S      375 Bradyrhizobium japonicum
0,07 1269    1269 -  1037409 Bradyrhizobium japonicum USDA 6
0,07 1252    1252 S   288000 Bradyrhizobium sp. BTai1
0,06 1153     0 S   1355477 Bradyrhizobium diazoefficiens

0,06 1153    1153 -  224911 Bradyrhizobium diazoefficiens USDA 110
0,04 807      0 S    44255 Bradyrhizobium oligotrophicum
0,04 807      807 -  1245469 Bradyrhizobium oligotrophicum S58
0,11 2160    250 G     911 Nitrobacter
0,07 1248     0 S     913 Nitrobacter winogradskyi
0,07 1248    1248 -  323098 Nitrobacter winogradskyi Nb-255
0,04 662      0 S     912 Nitrobacter hamburgensis
0,04 662      662 -  323097 Nitrobacter hamburgensis X14
0,08 1479     0 G    40136 Oligotropha
0,08 1479    1479 S   40137 Oligotropha carboxidovorans
1,42 26777    137 F    69277 Phyllobacteriaceae
1,12 21101     0 G   449972 Chelativorans
1,12 21101   21101 S  266779 Chelativorans sp. BNC1
0,29 5539    1578 G   68287 Mesorhizobium
0,08 1542     0 S     381 Mesorhizobium loti

```

ID baboCR63
Host Bovine
Geographic location Llano Grande

#Kraken version: kraken-0.10.6-a2d113dc8f

#Database: /lustre/scratch108/pathogen/pathpipe/kraken/pi_qc_2015521

| | | | | | | | | |
|-------|---------|---------|---|---------|--|---------------------|--|----------|
| 88,71 | 2230357 | 2230357 | U | 0 | unclassified | | | |
| 11,29 | 283876 | 425 | - | 1 | root | | | |
| 11,26 | 283171 | 390 | - | 131567 | cellular organisms | | | |
| 11,15 | 280313 | 7786 | D | 2 | Bacteria | | | |
| 10,38 | 260938 | 12580 | P | 1224 | Proteobacteria | | | |
| 8,67 | 217865 | 20313 | C | 28211 | Alphaproteobacteria | | | |
| 6,36 | 159787 | 17170 | O | 356 | Rhizobiales | | | |
| 1,54 | 38700 | 5099 | F | 41294 | Bradyrhizobiaceae | | | |
| 0,68 | 17011 | 0 | G | 1073 | Rhodopseudomonas | | | |
| 0,68 | 17011 | 4450 | S | 1076 | Rhodopseudomonas palustris | | | |
| 0,11 | 2800 | 2800 | - | 316055 | R. palustris BisA53 | | | |
| 0,09 | 2373 | 2373 | - | 316058 | R. palustris HaA2 | | | |
| 0,09 | 2334 | 2334 | - | 652103 | R. palustris DX-1 | | | |
| 0,08 | 1968 | 1968 | - | 316057 | R. palustris BisB5 | | | |
| 0,07 | 1794 | 1794 | - | 316056 | R. palustris BisB18 | | | |
| 0,04 | 895 | 895 | - | 395960 | R. palustris TIE-1 | | | |
| 0,02 | 397 | 397 | - | 258594 | R. palustris CGA009 | | | |
| 0,48 | 12021 | 2786 | G | 374 | Bradyrhizobium | | | |
| 0,08 | 2021 | 2021 | S | 114615 | Bradyrhizobium sp. ORS 278 | | | |
| 0,07 | 1642 | 1642 | S | 288000 | Bradyrhizobium sp. BTAi1 | | | |
| 0,06 | 1560 | 0 | S | 375 | Bradyrhizobium japonicum | | | |
| 0,06 | 1560 | 1560 | - | 1037409 | Bradyrhizobium japonicum USDA 6 | | | |
| 0,06 | 1558 | 1558 | S | 335659 | Bradyrhizobium sp. S23321 | | | |
| 0,06 | 1491 | 0 | S | 1355477 | Bradyrhizobium diazoefficiens | | | |
| 0,06 | 1491 | 1491 | - | 224911 | Bradyrhizobium diazoefficiens USDA 110 | | | |
| 0,04 | 963 | 0 | S | 44255 | Bradyrhizobium oligotrophicum | | | |
| 0,04 | 963 | 963 | - | 1245469 | Bradyrhizobium oligotrophicum S58 | | | |
| 0,11 | 2684 | 261 | G | 911 | Nitrobacter | | | |
| 0,06 | 1552 | 0 | S | 913 | Nitrobacter winogradskyi | | | |
| 0,06 | 1552 | 1552 | - | 323098 | Nitrobacter winogradskyi Nb-255 | | | |
| 0,03 | 871 | 0 | S | 912 | Nitrobacter hamburgensis | | | |
| 0,03 | 871 | 871 | - | 323097 | Nitrobacter hamburgensis X14 | | | |
| 0,07 | 1885 | 0 | G | 40136 | Oligotropha | | | |
| 0,07 | 1885 | 1885 | S | 40137 | Oligotropha carboxidovorans | | | |
| 1,31 | 32960 | 199 | F | 69277 | Phyllobacteriaceae | | | |
| 1,03 | 25830 | 0 | G | 449972 | Chelativorans | | | |
| 1,03 | 25830 | 25830 | S | 266779 | Chelativorans sp. BNC1 | | | |
| 0,28 | 6931 | 2004 | G | 68287 | Mesorhizobium | ID | | baboCR64 |
| | | | | | Host | | | Bovine |
| | | | | | | | | Llano |
| | | | | | | Geographic location | | Grande |

#Kraken version: kraken-0.10.6-a2d113dc8f

#Database: /lustre/scratch108/pathogen/pathpipe/kraken/pi_qc_2015521

| | | | | | |
|-------|---------|---------|---|---------|--|
| 88 | 1629165 | 1629165 | U | 0 | unclassified |
| 12 | 222168 | 543 | - | 1 | root |
| 11.92 | 220621 | 125 | - | 131567 | cellular organisms |
| 11.88 | 219963 | 5564 | D | 2 | Bacteria |
| 11.09 | 205340 | 11831 | P | 1224 | Proteobacteria |
| 9.09 | 168360 | 16013 | C | 28211 | Alphaproteobacteria |
| 6.49 | 120154 | 15136 | O | 356 | Rhizobiales |
| 1.78 | 33034 | 4219 | F | 41294 | Bradyrhizobiaceae |
| 0.73 | 13563 | 0 | G | 1073 | Rhodopseudomonas |
| 0.73 | 13563 | 4236 | S | 1076 | R.palustris |
| 0.1 | 1901 | 1901 | - | 316058 | R. palustris HaA2 |
| 0.1 | 1824 | 1824 | - | 652103 | R. palustris DX-1 |
| 0.08 | 1561 | 1561 | - | 316057 | R. palustris BisB5 |
| 0.08 | 1542 | 1542 | - | 316056 | R. palustris BisB18 |
| 0.07 | 1356 | 1356 | - | 316055 | R. palustris BisA53 |
| 0.04 | 663 | 663 | - | 395960 | R. palustris TIE-1 |
| 0.03 | 480 | 480 | - | 258594 | R. palustris CGA009 |
| 0.61 | 11357 | 3166 | G | 374 | Bradyrhizobium |
| 0.1 | 1930 | 1930 | S | 288000 | Bradyrhizobium sp. BTAi1 |
| 0.08 | 1440 | 0 | S | 44255 | Bradyrhizobium oligotrophicum |
| 0.08 | 1440 | 1440 | - | 1245469 | Bradyrhizobium oligotrophicum S58 |
| 0.07 | 1366 | 1366 | S | 335659 | Bradyrhizobium sp. S23321 |
| 0.07 | 1318 | 1318 | S | 114615 | Bradyrhizobium sp. ORS 278 |
| 0.07 | 1265 | 0 | S | 1355477 | Bradyrhizobium diazoefficiens |
| 0.07 | 1265 | 1265 | - | 224911 | Bradyrhizobium diazoefficiens USDA 110 |
| 0.05 | 872 | 0 | S | 375 | Bradyrhizobium japonicum |
| 0.05 | 872 | 872 | - | 1037409 | Bradyrhizobium japonicum USDA 6 |
| 0.12 | 2223 | 168 | G | 911 | Nitrobacter |
| 0.07 | 1307 | 0 | S | 913 | Nitrobacter winogradskyi |
| 0.07 | 1307 | 1307 | - | 323098 | Nitrobacter winogradskyi Nb-255 |
| 0.04 | 748 | 0 | S | 912 | Nitrobacter hamburgensis |
| 0.04 | 748 | 748 | - | 323097 | Nitrobacter hamburgensis X14 |
| 0.09 | 1672 | 0 | G | 40136 | Oligotropha |
| 0.09 | 1672 | 1672 | S | 40137 | Oligotropha carboxidovorans |
| 1.12 | 20662 | 0 | F | 119045 | Methylobacteriaceae |
| 1.12 | 20662 | 5956 | G | 407 | Methylobacterium |
| 0.19 | 3610 | 0 | - | 578822 | Methylobacterium extorquens group |
| 0.19 | 3610 | 1910 | S | 408 | Methylobacterium extorquens |

| | |
|---------------------|----------|
| ID | baboCR67 |
| Host | Buffalo |
| Geographic location | Upala |

Anexo 3

Árbol filogenético propuesto basado en rARN16s

Wolbachia pipientis
Rickettsia prowazekii
Rickettsia conori
Bartonella henselae
Bartonella quintana
Mesorhizobium loti

Bradyrhizobium japonicum
Chelatococcus reniformis st. B2974
Camelimonas abortus st.UK34/07-5T1
baboCR67
Camelimonas lactis st.M2040
Camelimonas fluminis st.XZ21
baboCR64
Camelimonas sp. NR4-09
Chelatococcus caeni st. EBR-4-1
Chelatococcus daeguensis st. K106
Microvirga zambiensis WSM3693
Microvirga aerilata st.5420S-16
Microvirga arabica st.SV2184P
Microvirga lotononidis st.WSM3557
Microvirga aerophila st.5420S-12
Advenella mimigardefordensis DPN7
Advenella kashmirensis sub.methylica st.PK1
Agrobacterium tumefaciens
Sinorhizobium meliloti
B. abortus st. 2308
B. suis st. 1330
Ochrobactrum antropi
Pusillimonas caeni st. EBR-8-1
Pusillimonas noertemannii
Pusillimonas harenae st. B201
Brucella sp. 10RB9215
Pusillimonas soli st.MJ07
Pusillimonas ginsengisoli st.DCY25
Ralstonia solanacearum
Geobacter sulfurreducens
E. coli
B. inopinata BO1

Rhodopseudomonas palustris
Caulobacter crescentus
baboCR63