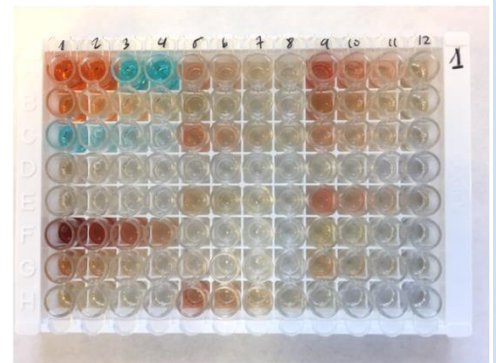
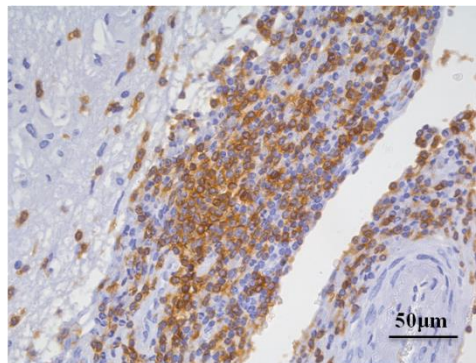


TRABAJO
FINAL DE
MÁSTER
2017/2018

CARACTERIZACIÓN PATOLÓGICA Y
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y
MICROBIOLÓGICO DE CASOS DE
NEUROBRUCELOSIS EN CETÁCEOS DEL
MAR MEDITERRÁNEO



Autor: Albert Perlas Puente | Director: Dr. Mariano Domingo

Caracterización patológica y diagnóstico serológico y microbiológico de casos de Neurobrucelosis en cetáceos del Mar Mediterráneo.

Máster universitario en zoonosis y una salud.

Curso 2017/2018

Autor: Albert Perlas Puente

Director: Dr. Mariano Domingo

Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda de Sarah Wilkinson, María Cuvertoret y Blanca Pérez en la realización de las pruebas serológicas y en la obtención de las fotos de inmunohistoquímica, sin la ayuda del Dr. Alberto Allepuz e indudablemente sin la inestimable ayuda de mi director el Dr. Mariano Domingo. Por todo ello quiero agradecerles su colaboración y disposición en todo momento.

Índice

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
3.	OBJETIVOS.....	6
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
4.1.	CASOS INVESTIGADOS Y PROCEDIMIENTO DE NECROPSIA.....	7
4.2.	SEROLOGÍA PARA <i>BRUCELLA</i>	7
4.3.	AISLAMIENTO DE <i>BRUCELLA</i>	9
4.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS DIFERENTES PRUEBAS	9
4.5.	TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA	10
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
5.1.	DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y MICROBIOLÓGICO.....	11
5.2.	CARACTERIZACIÓN DE LA NEUROBRUCELOSIS	13
5.3.	EPIDEMIOLOGÍA	15
6.	CONCLUSIONES.....	16
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	17
8.	ANEXOS	25
8.1.	ANEXO I.....	25

1. Resumen

La brucelosis en cetáceos, causada por *Brucella Ceti*, se considera una amenaza emergente para los cetáceos, pero supone también una amenaza para la salud humana (zoonosis reemergente) y podría también serlo para las especies domésticas. La enfermedad, cuya transmisión y prevalencia no están aún determinadas, se caracteriza por afectaciones reproductivas, del sistema nervioso y en las articulaciones. La neurobrucelosis, cursando como una meningoencefalitis, es una afectación común en delfín listado (*Stenella coeruleoalba*). La mayoría de pruebas diagnósticas no han sido estandarizadas ni validadas para el diagnóstico de infecciones por *Brucella* en mamíferos marinos. Este estudio resumió y analizó la información extraída de las necropsias, la histología, la microbiología y la serología de 63 cetáceos varados en la costa catalana y de las muestras obtenidas de 12 cetáceos de la costa de la Comunidad Valenciana. Además, se realizó una caracterización patológica con una prueba inmunohistoquímica con marcadores linfoides (CD3 y CD20) de los casos confirmados de neurobrucelosis. La prueba serológica con una especificidad y una sensibilidad más elevada para el diagnóstico de *Brucella ceti* fue el ELISA de bloqueo a una dilución 1/40 y con el punto de corte a un 50% de inhibición, evitando además el problema de las muestras hemolíticas, imposibles de analizar mediante la técnica de Rosa de Bengala (RB). La caracterización patológica de la neurobrucelosis muestra que las células implicadas en el infiltrado inflamatorio son mayoritariamente células T y células B pero con un porcentaje significativo de otras células aún por caracterizar. Este estudio refuerza la idea de que *Stenella coeruleoalba* (delfín listado) es una especie de cetáceo con una susceptibilidad mayor a neurobrucelosis. En referencia a la prevalencia de infección, en la situación más conservada posible, se detectó un 26,2% de animales seropositivos. Los riesgos sanitarios de esta enfermedad para los propios cetáceos, los animales domésticos y para las personas, justifican la aplicación de un programa de vigilancia para esta patología.

2. Introducción

La brucelosis en los cetáceos se describió por primera vez en 1994 (Ewalt *et al.*, 1994), asociada a una nueva especie de *Brucella*, denominada *Brucella ceti* (Cloeckaert *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2007). Desde entonces, la brucelosis de cetáceos ha demostrado una distribución general alarmante y un espectro cada vez mayor de hospedadores vulnerables (Sánchez-Sarmiento *et al.*, 2018). La infección y la enfermedad asociada a *B. ceti* se ha reconocido en cada vez más especies de cetáceos en todo el mundo (Nymo, Tryland and Godfroid, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012). Concretamente se ha identificado (por cultivo o por técnicas moleculares) en al menos 12 especies de cetáceos de 6 familias diferentes (Hernández-Mora, Palacios-Alfaro and González-Barrientos, 2013; West *et al.*, 2015; McAloose *et al.*, 2016) y en 35 especies se ha detectado seropositividad (Hernández-Mora, Palacios-Alfaro and González-Barrientos, 2013; Sánchez-Sarmiento *et al.*, 2018). Se considera una amenaza emergente para los cetáceos (Van Bresseem *et al.* 2009).

En los humanos, la brucelosis es una enfermedad zoonótica y contagiosa importante (reemergente), causada principalmente por *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* y ocasionalmente por cepas de *Brucella canis* y *Brucella ceti* (Nymo, Tryland and Godfroid, 2011; Moreno, 2014; Olsen and Palmer, 2014; Kroese *et al.*, 2018). Se han identificado 3 casos de *Brucella ceti* adquirida naturalmente en humanos, en todos estos casos, las personas afectadas consumieron o manipularon productos del mar crudos (Sohn *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2006). Dos de estos pacientes, procedentes de Perú, no tenían contacto con mamíferos marinos; sin embargo, ambos individuos consumieron marisco crudo. El tercer caso, de Nueva Zelanda, tampoco tuvo exposición directa a los mamíferos marinos, pero participó regularmente en actividades pesqueras, y manejó y consumió pescado crudo (McDonald *et al.*, 2006; Norman *et al.*, 2017). El caso de Nueva Zelanda estuvo asociado a osteomielitis espinal y los dos de Perú a neurobrucelosis humana (Sohn *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2006). Dado que los mamíferos marinos pueden ser vectores de agentes zoonóticos, representan un problema emergente de salud pública. Además, se ubican en la parte superior de la red alimentaria y se consideran especies centinela, que actúan como indicadores biológicos del estado de la salud del mar y del entorno (Pintore *et al.*, 2018).

La *Brucella* de procedencia marina (en este caso *B. pinnipedialis*, originaria de pinnípedos) también puede causar enfermedad en animales domésticos. De forma experimental se ha demostrado que puede causar abortos y seroconversión en el ganado (Rhyan *et al.*, 2001), infección y seroconversión sin aborto en ovejas y una infección fulminante en conejillos de indias (Perrett *et al.* 2004). Se necesita más información acerca de la vía de transmisión de *B. ceti* para valorar el riesgo que presenta para los animales domésticos. (Lambourn *et al.*, 2013)

Desde un punto de vista de la conservación, *B. ceti* podría suponer una amenaza para especies de cetáceos en peligro, ocasionando brotes que puedan afectar la reproducción y la supervivencia de las especies (Bossart, 2011; Attademo *et al.*, 2017).

La brucelosis de cetáceos ha sido detectada recientemente en el Mar Mediterráneo (Alba *et al.*, 2013; Garofolo *et al.*, 2014; Isidoro-Ayza *et al.*, 2014; Cvetnić *et al.*, 2016), pero la evidencia serológica de la infección proviene ya del 2001 (Van Bressem *et al.* 2001), lo que sugiere que la brucelosis es probablemente una infección endémica en los cetáceos en esta área. Sin embargo tanto la transmisión como la prevalencia de la enfermedad son poco conocidas (Norman *et al.*, 2017).

El modo de transmisión de la brucelosis en los mamíferos marinos aún no está establecido, pero se ha sugerido que, en los cetáceos, la infección podría propagarse horizontalmente entre individuos a través del contacto sexual o por contacto con fetos abortados o tejidos placentarios (Hernández-Mora *et al.*, 2008; Guzmán-Verri *et al.*, 2012). Además, la infección puede transmitirse verticalmente desde la madre al feto o al recién nacido (Miller *et al.*, 1999; Hernández-Mora *et al.*, 2008; Goldstein *et al.*, 2009; Maquart, Zygmunt and Cloeckaert, 2009; González-Barrientos *et al.*, 2010; Nymo, Tryland and Godfroid, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012). Los parásitos se han propuesto como posibles vectores de la brucelosis en ambientes marinos. En los cetáceos, se ha detectado antígeno de *Brucella* en el útero de un nematodo pulmonar (*Pseudalius inflexus*) en las vías respiratorias de una marsopa común varada. El ciclo de vida de este parásito es desconocido (Perrett, Dawson, *et al.*, 2004; Dawson *et al.*, 2008; Hernández-Mora, Palacios-Alfaro and González-Barrientos, 2013).

Las infecciones por *B. ceti* en los cetáceos se han asociado con diversas patologías que incluyen abortos y mortalidad neonatal (Miller *et al.*, 1999), epididimitis en los machos (Dagleish *et al.*, 2008), meningoencefalitis (González *et al.*, 2002; Jauniaux *et al.*, 2010; Alba *et al.*, 2013; Garofolo *et al.*, 2014), abscesos (Foster *et al.*, 1996, 2002), endocarditis (González-Barrientos *et al.*, 2010), mastitis, neumonía, peritonitis, osteomielitis y discoespondilitis espinal (Foster *et al.*, 2002). En otros casos, *B. ceti* se ha aislado de numerosos cetáceos sin evidencia de patología inducida por *Brucella* (Olsen and Palmer, 2014) y se ha obtenido evidencia de infección por técnicas serológicas en animales aparentemente normales, lo que sugiere que muchos animales infectados con *Brucella* superan la infección inicial, eventualmente quedando como portadores de *Brucella* (Nymo, Tryland and Godfroid, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Isidoro-Ayza *et al.*, 2014).

La neurobrucelosis es una de las manifestaciones de esta enfermedad en cetáceos, cursando como una meningoencefalitis (Pintore *et al.*, 2018). Es importante comentar que *B. ceti* ha sido aislada del sistema nervioso central de varias especies de cetáceos, con un importante número de casos en delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) en Europa y América del Sur, cursando con opistótonos, temblores, convulsiones, desorientación y la incapacidad para mantener la flotabilidad (González *et al.*, 2002; Hernández-Mora *et al.*, 2008; Davison *et al.*, 2009; Isidoro-Ayza *et al.*, 2014). Todo ello sugiere que esta especie de delfín podría presentar una susceptibilidad mayor a la neurobrucelosis (González-Barrientos *et al.*, 2010; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Attademo *et al.*, 2017).

La evaluación de la salud de las poblaciones de cetáceos silvestres se realiza usualmente por necropsia de individuos varados e investigación de laboratorio. Desde la primera descripción de la enfermedad asociada a *B. ceti* en el litoral mediterráneo catalán (Isidoro-Ayza *et al.*, 2014) y en otros lugares de la misma zona (Alba *et al.*, 2013; Grattarola *et al.*, 2016), se han intensificado los esfuerzos para detectar esta infección durante la investigación patológica y de laboratorio rutinaria realizada sobre cetáceos varados. Aunque la brucelosis en animales marinos de vida libre no se registra de manera rutinaria (Hernández-Mora, Palacios-Alfaro and González-Barrientos, 2013), el reconocimiento precoz de animales seropositivos podría lograrse utilizando simples

pruebas de detección, como la prueba de aglutinación de Rosa de Bengala (RB), en condiciones de campo (Hernández-Mora *et al.*, 2008, 2009).

En relación a las pruebas serológicas, al menos en 53 especies de mamíferos marinos se ha descrito seropositividad para *Brucella* utilizando pruebas de diagnóstico de brucelosis convencionales, como los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), diseñados principalmente para rumiantes (Jepson *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 2001; van Bresseem, 2001; Tryland, Sørensen and Godfroid, 2005; Tachibana *et al.*, 2006; Nymo, Tryland and Godfroid, 2011; Guzmán-Verri *et al.*, 2012). Se ha desarrollado un ELISA competitivo especialmente para cetáceos y pinnípedos (Meegan *et al.*, 2010) y un ELISA indirecto para odontocetos (Hernández-Mora *et al.*, 2009). A diferencia de estos dos últimos ensayos, los ensayos convencionales no han sido estandarizados y validados para el diagnóstico de infecciones por *Brucella* en mamíferos marinos, lo que lleva a tener precaución al interpretar los resultados serológicos (Hernández-Mora *et al.*, 2009; Guzmán-Verri *et al.*, 2012). Además, los resultados seropositivos, pueden deberse a reacciones inmunológicas cruzadas, en particular a *Yersinia enterocolitica* serotipo O9, aunque esta cepa no se ha recuperado de mamíferos marinos hasta la fecha (G. Foster obs. pers.), o a una bacteria de un género diferente; por lo tanto, el aislamiento de *Brucella* por cultivo sigue siendo el estándar de oro, la prueba definitiva de infección en diferentes hospedadores y poblaciones de mamíferos marinos (Foster *et al.*, 2018).

3. Objetivos

Los objetivos de este trabajo de final de máster son:

- Resumir la casuística de la que disponemos, sobre la infección por *Brucella* durante 6 años (2012-2017) en la costa mediterránea occidental, utilizando la información extraída de 63 cetáceos varados en la costa catalana y de las muestras obtenidas de 12 cetáceos de la costa de la Comunidad Valenciana.
- Comparar las necropsias y los hallazgos histopatológicos con los resultados de diferentes técnicas de laboratorio para el diagnóstico de *Brucella*.
- Caracterizar histopatológicamente la neurobrucelosis en cetáceos
- Proporcionar información sobre la epidemiología de la infección por *B. ceti* y así determinar su impacto en las especies de cetáceos en el área.

4. Material y métodos

4.1. Casos investigados y procedimiento de necropsia

Durante el período 2012-2017, un total de 63 cetáceos quedaron varados en la costa catalana. Las necropsias se realizaron mediante un convenio con la Generalitat de Catalunya, en la sala de necropsia de la Universitat Autònoma de Barcelona, de acuerdo con los procedimientos establecidos (Kuiken, 1991) por patólogos certificados. El código de conservación varió de 1 a 3 (los animales en autólisis incipiente no fueron transportados para la necropsia). En primer lugar, se obtuvo muestra de sangre por punción cardíaca, que se centrifugó inmediatamente para obtener suero. La prueba de RB se realizó de forma rutinaria. La recolección de muestras de suero fue posible a partir de 30 individuos, comprendiendo 24 delfines listados (*Stenella coeruleoalba*), 4 calderones grises (*Grampus griseus*), 1 delfín mular (*Tursiops truncatus*) y 1 delfín común (*Delphinus delphis*). La recolección de líquido cefalorraquídeo (LCR) se intentó rutinariamente desde la articulación atlanto-occipital. Se recogieron en fresco, muestras e hisopos de diferentes órganos para investigaciones bacteriológicas y moleculares, así como un conjunto completo de órganos para histopatología, que se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% y se procesaron rutinariamente.

Además, se obtuvieron muestras de sangre congelada de 12 cetáceos, concretamente 11 delfines listados y 1 delfín común de la región de Valencia. Se dispuso de muestras fijadas de formalina de 11 de estos animales.

4.2. Serología para *Brucella*

El suero de los cetáceos necropsiados se recogió mediante punción cardíaca en la recepción del cadáver con una aguja para inyección epidural equina, y se dividió en porciones en tubos sin anticoagulante vacutainer. La sangre se centrifugó a 3500 rpm (2,465 x g), y el suero se introdujo en criotubos, que se congelaron a -80 °C hasta su uso.

Las muestras de suero sin diluir se investigaron mediante la prueba de aglutinación en placa (RB) siguiendo los procedimientos establecidos (OIE 2013) inmediatamente después de la recolección de la muestra de suero. Sin embargo, para este estudio, todas las muestras de suero fueron nuevamente examinadas mediante RB por un laboratorio acreditado (CITA, Zaragoza) para armonizar los resultados. De los animales varados en la región de Valencia, solo se dispuso de sangre congelada. Dado que no se recomienda el análisis de estas muestras de sangre hemolizada mediante RB, ya que puede arrojar resultados no concluyentes o falsos positivos, no se dispone de este resultado en estas muestras.

También se usó un ELISA comercial de bloqueo (INgezim Brucella Compac, INGENASA, Madrid, España) para analizar los sueros disponibles en busca de anticuerpos contra lipopolisacárido (LPS) de *Brucella*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta prueba ELISA es un kit multiespecífico preparado para la detección de anticuerpos bloqueantes contra LPS de *Brucella abortus* en el suero de muestra, utilizando un anticuerpo monoclonal secundario dirigido al LPS de *B. abortus*, conjugado con peroxidasa. La dilución a emplear para los sueros de cetáceos no está establecida para la prueba y, por lo tanto, los sueros se diluyeron según lo recomendado por el fabricante para sueros ovinos y caprinos (1:5), bovino y porcino (1:10) y adicionalmente a 1:20 y 1:40. Las muestras de sangre congelada de la Comunidad Valenciana se descongelaron y se clarificaron mediante centrifugación a alta velocidad en una centrífuga Eppendorf, y se diluyeron como si fueran muestras de suero.

Los valores de densidad óptica (DO) se midieron a 450 nm, máximo 5 min. después de la adición de la solución de parada usando un espectrofotómetro. Los valores de DO se usaron para calcular los resultados finales, leídos como un porcentaje de inhibición en comparación con los sueros de control positivo y negativo incluidos en la prueba, con la fórmula $PI = 100 \times [1 - (\text{muestra de DO} / \text{control negativo de DO})]$, donde PI = porcentaje de inhibición y DO = densidad óptica. Siguiendo los procedimientos de la prueba, una muestra se clasificó como positiva si la inhibición en el pocillo era igual o superior al 40%.

Se investigó la posible asociación entre el nivel de hemólisis y el resultado de ELISA. El nivel de hemólisis se clasificó visualmente en la primera dilución de muestras cuando se dispensó en la placa de ELISA en el grupo 1 (suero no hemolizado o ligeramente hemolizado) y el grupo 2 (suero hemolizado y sangre hemolizada). Una comparación de resultados positivos y negativos en ELISA (para diluciones 1:20 y diluciones 1:40) con la puntuación de hemólisis se realizó con un Test Wilcoxon Two-Sample.

4.3. Aislamiento de *Brucella*

El aislamiento de *Brucella*, como comentado anteriormente, está considerado como la prueba de referencia para el diagnóstico de brucelosis. Se intentó en cualquier animal con una prueba RB positiva, o con un resultado positivo de *Brucella*-ELISA (dilución 1:20) o en animales que mostraban lesiones atribuibles a la infección por *B. ceti*. En total se realizó el cultivo a partir de muestras de 15 animales. El conjunto de muestras y tejidos para el cultivo de *Brucella* fueron: hisopos del ventrículo cerebral lateral, tejido cerebral alrededor del ventrículo lateral, médula espinal cervical, bazo y ganglio linfático mesentérico. En algunos animales, el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el ganglio linfático cervical también estaban disponibles. El aislamiento bacteriano se realizó como se describió previamente (Isidoro-Ayza *et al.*, 2014). Las muestras de cetáceos varados en Valencia no estuvieron disponibles para el cultivo de *Brucella*.

4.4. Análisis estadístico de las diferentes pruebas

Para determinar si la técnica de ELISA de bloqueo puede ser equivalente a la prueba de RB, se realizó un test de concordancia usando el estadístico de kappa, mediante el uso del paquete epiR implementado en R (Stevenson, 2013), entre estas dos pruebas y usando todas las diluciones usadas en la ELISA. Las interpretaciones comunes para el estadístico kappa son las siguientes: inferior a 0.2 concordancia baja, de 0.2 a 0.4 concordancia leve, de 0.4 a 0.6 concordancia moderada, de 0.6 a 0.8 concordancia sustancial y mayor a 0.8 concordancia casi perfecta (Stevenson, 2013). Teniendo en cuenta que el porcentaje de inhibición para determinar positivos indicado por el fabricante está ideado para especies domésticas, se decidió calcular uno nuevo con el objetivo de aumentar la concordancia entre el RB y el test de ELISA, evitando así el

problema de la hemólisis en el caso de las muestras congeladas. Se determinó, en consecuencia, un nuevo punto de corte para la dilución de ELISA con una concordancia más elevada con el RB. Para ello se calculó la sensibilidad y especificidad (Tabla 1) usando diferentes porcentajes de inhibición como puntos de corte y el RB como prueba de referencia. Finalmente, con el nuevo punto de corte, se comparó la sensibilidad y la especificidad de la prueba de ELISA a la dilución más concordante con el RB y usando, en este caso, el cultivo como prueba de referencia.

4.5. Técnicas de Inmunohistoquímica

Se realizó de forma rutinaria un estudio histológico completo de todos los animales necropsiados y una detección inmunohistoquímica para morbillivirus de cetáceos (CeMV) usando una técnica ya descrita (Soto *et al.*, 2011). Adicionalmente, en los casos con neurobrucelosis (meningoencefalitis mononuclear con cultivo positivo de *B. ceti*), se realizaron tinciones de inmunohistoquímica para CD3 y CD20, para detectar linfocitos T y linfocitos B respectivamente, siguiendo métodos ya estandarizados.

Se realizó el conteo visual de células marcadas con cada uno de los anticuerpos sobre fotografías obtenidas en un microscopio mediante un objetivo de 40x (Figura 1).

5. Resultados y discusión

5.1. Diagnóstico serológico y microbiológico

Los resultados obtenidos del total de animales, a partir del RB, el ELISA de bloqueo y el cultivo, quedan resumidos en el anexo I. Se realizó el RB a los animales con sangre no hemolizada por lo que no se pudo realizar en los animales procedentes de Valencia. De un total de 30 animales, 12 dieron positivo a la prueba de RB (40% positivos). La prueba de ELISA de bloqueo se realizó a todos los animales (n=42). Los resultados positivos y negativos se compararon mediante un Test de Wilcoxon Two-Sample (para diluciones 1:20 y diluciones 1:40) con la puntuación de hemólisis de las muestras, y se observó que ni en la dilución 1:20 (Pvalor=0.91) ni en la dilución 1:40 (Pvalor=0.71), existía influencia de la hemólisis en el resultado de ELISA. Utilizando el punto de corte recomendado por el fabricante se clasificó una muestra como positiva si la inhibición en el pocillo era igual o superior al 40%. En este caso obtenemos 25 muestras positivas (59,5% positivas) en la dilución 1:5, 19 muestras positivas (45,2%) en la dilución 1:10, 15 muestras positivas (35,7%) en la dilución 1:20 y 11 muestras positivas (26,2%) en la dilución 1:40. Finalmente el cultivo bacteriológico se realizó en cualquier animal con una prueba RB positiva, con un resultado positivo de *Brucella*-ELISA (a dilución 1:20) o en animales que mostraban lesiones atribuibles a la infección por *B. ceti*. De estos animales (n=15) se cultivó *Brucella ceti* en 4 de ellos (26,7%), todos de la especie *Stenella coeruleoalba*.

El valor kappa más elevado se obtuvo con la dilución 1:40 (kappa=0.64), lo que podría sugerir que la técnica de ELISA de bloqueo, usada en este estudio, es equivalente a la prueba de RB. Se determinó (Tabla 1) que el punto de corte con mayor sensibilidad y especificidad era el 50% de inhibición (sensibilidad= 0.67 y especificidad=1) en lugar del 40% indicado por el fabricante. A partir de este resultado, se realizó de nuevo un análisis kappa entre RB y ELISA a una dilución 1:40 y con 50% como nuevo punto de corte. El resultado fue un valor kappa mayor a los anteriores (kappa=0.71) por lo que usando este nuevo punto de corte la concordancia entre ambas pruebas aumentó ligeramente. Finalmente, el resultado del cultivo se usó para determinar la sensibilidad y especificidad de estas dos pruebas (ELISA y RB). Tanto con RB como con ELISA se

obtuvo una sensibilidad del 100% (todos los animales de los que se cultivó *B. ceti* fueron positivos a las dos técnicas), mientras que la especificidad con la prueba de ELISA fue de un 64%, y de una 36% con RB. Con estos resultados podríamos concluir que la mejor estrategia diagnóstica por serología es usar el ELISA de bloqueo a una dilución 1:40 y un punto de corte en 50% para obtener una mayor especificidad, y evitar al mismo tiempo el problema con las muestras hemolíticas. Hay que tener en cuenta que la muestra de la que disponemos no es demasiado alta, que tampoco se dispone de un número suficiente de sueros clasificados como verdaderos negativos o positivos, y que no tenemos suficiente información para descartar que otro patógeno este interfiriendo en los resultados positivos de estas muestras de suero. Por otro lado, esta es una situación habitual cuando se trabaja con fauna salvaje y concretamente con cetáceos. Es difícil validar las pruebas diagnósticas por lo que hay que seguir investigando para estandarizar y validar estas técnicas y seguir avanzando con las herramientas de las que disponemos. Como hemos hecho en este estudio.

% Inhibición	RB positivos	RB negativos	Sensibilidad	Especificidad	(1- esp)
0	4	15	1,00	0,00	1,00
10	0	1	0,67	0,83	0,17
20	0	1	0,67	0,89	0,11
30	0	0	0,67	0,94	0,06
40	0	1	0,67	0,94	0,06
50	0	0	0,67	1,00	0,00
60	0	0	0,67	1,00	0,00
70	1	0	0,67	1,00	0,00
80	1	0	0,58	1,00	0,00
90	6	0	0,50	1,00	0,00
100	0	0	0,00	1,00	0,00

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad usando diferentes porcentajes de inhibición como puntos de corte y el RB como prueba de referencia.

5.2. Caracterización de la neurobrucelosis

En los 4 casos con un cultivo positivo de *Brucella ceti*, la bacteria se cultivó a partir de muestras de tejido nervioso y/o LCR, y mediante histopatología se observaron lesiones de meningoencefalitis, siendo por ello casos de neurobrucelosis (N-260/16, N-301/12, N, 319/16, N-168/17). Los hallazgos histopatológicos más comunes y relevantes fueron los infiltrados inflamatorios perivasculares en meninges compuestos por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, como descrito con anterioridad en casos de neurobrucelosis (Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Isidoro-Ayza *et al.*, 2014).

En el caso del animal N-319/16 se detectó también infección y lesiones sistémicas por CeMV, tratándose de un caso sistémico de morbillivirus. Aunque CeMV y *B. ceti* pueden contribuir a las lesiones nerviosas, en este animal se observó una meningoencefalitis más parecida a las causadas por CeMV, con menor lesión en meninges (Van Bresseem *et al.*, 2014). La inmunosupresión causada por el morbillivirus podría ser responsable del crecimiento de *Brucella* en una infección latente. En cualquier caso, no es posible separar con nitidez la contribución a las lesiones de uno y otro patógeno cuando ambos coexisten en el sistema nervioso central (SNC).

Para caracterizar las poblaciones celulares en el SNC se realizaron tinciones de inmunohistoquímica para CD3 y CD20, para detectar linfocitos T y linfocitos B respectivamente, como se ha descrito anteriormente (Figura 1), en los animales en los que no había duda de que el infiltrado inflamatorio era causado por *Brucella* (N-260/16, N-301/12, N-168/17). A partir de estas tinciones se realizaron a continuación una serie de contajes visuales de células. Los resultados de este contaje quedan expuestos en la Tabla 2. En el animal N-260/16 la media del porcentaje de linfocitos T fue de un 37%, la de linfocitos B de un 19% y la de otras células de un 44%. En el N-301/16 la media del porcentaje de células de linfocitos T fue de un 43%, la de linfocitos B de un 24% y la de otras células de un 33%. En el N-168/17 la media del porcentaje de células de linfocitos T fue de un 38%, la de linfocitos B de un 26% y la de otras células de un 36%. Finalmente, la media total de células de linfocitos T fue de un 39%, la de linfocitos B de un 23% y la de otras células de un 38%. Esta es la primera vez que se realiza una caracterización del tipo de células implicadas en la meningoencefalitis por neurobrucelosis. Futuros estudios en esta línea deberían realizarse para categorizar y

numerar las otras células implicadas, de las que sospechamos que se tratan de células plasmáticas y macrófagos de la glía.

Procedencia muestra	CD3	Total	CD20	Total	%CD3	%CD20	% Otras
N-260/16							
Médula espinal 01	263	557	177	557	47,22	31,78	21,01
Médula espinal 02	328	612	186	580	53,59	32,07	14,34
Tálamo 01	255	525	95	645	48,57	14,73	36,70
Tálamo 02	259	670	170	720	38,66	23,61	37,73
Tálamo 03	34	214	16	220	15,89	7,27	76,84
Médula oblonga	103	517	34	571	19,92	5,95	74,12
N-301/12							
Cerebelo 01	284	725	159	721	39,17	22,05	38,77
Cerebelo 02	301	757	64	698	39,76	9,17	51,07
Médula espinal 01	229	757	207	707	30,25	29,28	40,47
Médula espinal 02	286	672	94	624	42,56	15,06	42,38
Tronco 01	532	962	374	1034	55,30	36,17	8,53
Tronco 02	277	559	196	597	49,55	32,83	17,62
N-168/17							
Tálamo 01	95	420	175	375	22,62	46,67	30,71
Tálamo 02	207	483	59	399	42,86	14,79	42,36
Cerebelo 01	231	689	193	763	33,53	25,29	41,18
Cerebelo 02	194	536	96	619	36,19	15,51	48,30
Medula oblonga 01	219	477	35	435	45,91	8,05	46,04
Medula oblonga 02	189	447	138	453	42,28	30,46	27,25
Médula espinal 02	232	581	206	514	39,93	40,08	19,99

Tabla 2: Resultado conteo visual de células.

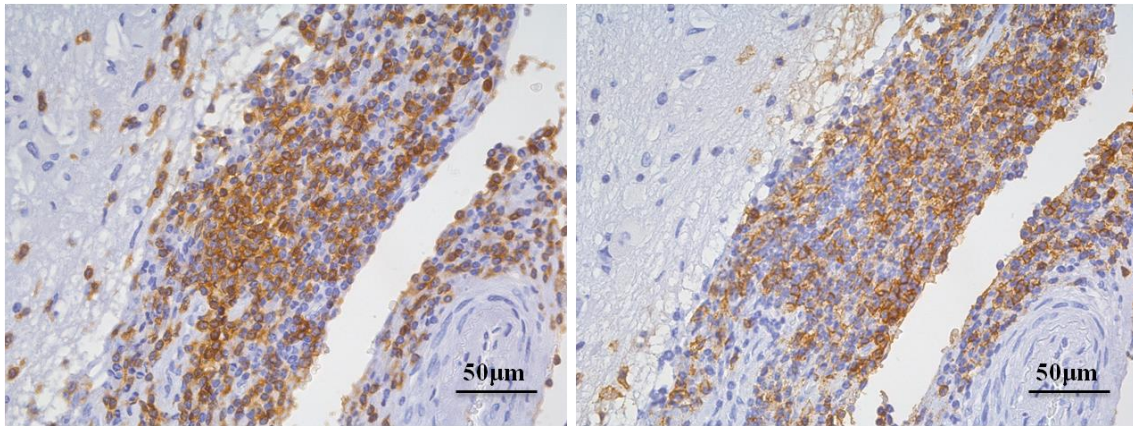


Figura 1: Tinción IHQ de la zona del tálamo del individuo N-260/16, para CD3 en la imagen de la izquierda y para CD20 en la imagen de la derecha.

5.3. Epidemiología

Del 2012 al 2017, los tres únicos casos de neurobrucelosis “pura” en los animales estudiados se han detectado en *Stenella coeruleoalba*, esto vendría a reforzar la idea suscitada con anterioridad (Hernández-Mora *et al.*, 2008; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Isidoro-Ayza *et al.*, 2014; Attademo *et al.*, 2017) de que esta especie tiene una susceptibilidad mayor a neurobrucelosis.

Respecto a la zona de Valencia y Catalunya, siendo lo más conservadores posibles (usando resultados de la ELISA de bloqueo a 1/40 y con el punto de corte del fabricante), se obtuvo una prevalencia de los sueros estudiados de un 26,2%. No se puede decir que esta positividad sea debida en exclusiva por antígenos de *Brucella ceti* ya que otros patógenos podrían estar ocasionando reacciones cruzadas en nuestros test de serología. Tampoco podemos decir que la muestra sea representativa de la población, ya que solo se dispuso de muestras de los animales varados. Es difícil por tanto determinar la prevalencia en la zona estudiada. En cualquier caso, aunque se diera como válida una prevalencia algo inferior, seguiría siendo muy elevada y sugeriría que probablemente sea una enfermedad endémica en la zona. Teniendo en cuenta el riesgo que puede suponer esta enfermedad zoonótica para los humanos y para las especies domésticas sería justificado un sistema de vigilancia para monitorear esta patología, tanto en animales varados como en animales vivos en libertad. Sería una herramienta importante para proteger la salud humana y animal, como ya se ha comentado con anterioridad (Pintore *et al.*, 2018).

6. Conclusiones

- Con los resultados obtenidos a partir de nuestras muestras, se puede decir que la prueba serológica con una especificidad y una sensibilidad más elevada para el diagnóstico de *Brucella ceti* es la ELISA de bloqueo a una dilución 1/40 y con el punto de corte a un 50% de inhibición. Evitando además el problema de las muestras hemolíticas, imposibles de analizar mediante un RB.
- La caracterización patológica de la neurobrucelosis muestra que las células implicadas en el infiltrado inflamatorio son de un 37% a un 43% células T, de un 19% a un 24% células B y de un 33% a un 44% otras células no caracterizadas.
- Este estudio refuerza la idea de que *Stenella coeruleoalba* (delfín listado) es una especie de delfín con una susceptibilidad mayor a neurobrucelosis.
- Con la muestra de la que se dispone es difícil determinar una prevalencia, pero siendo lo más conservadores posibles se obtuvieron un 26,2% de animales positivos. Lo que sugiere una prevalencia alta en la zona del mediterráneo occidental.
- Los riesgos sanitarios de esta enfermedad para los propios cetáceos, los animales domésticos y para las personas, justifican la aplicación de un sistema de vigilancia para monitorear esta patología.

7. Bibliografía

- Alba, P., Terracciano, G., Franco, A., Lorenzetti, S., Cocumelli, C., Fichi, G., Eleni, C., Zygmunt, M. S., Cloeckert, A. and Battisti, A. (2013) ‘The presence of *Brucella ceti* ST26 in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) with meningoencephalitis from the Mediterranean Sea’, *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 164(1–2), pp. 158–163. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.01.023.
- Attademo, F. L. N., Silva, J. C. R., Luna, F. O., Ikeda, J., Foppel, E. F. C., Sousa, G. P., Bôaviagem-Freire, A. C., Soares, R. M., Faita, T., Batinga, M. C. A. and Keid, L. B. (2017) ‘Retrospective Survey for Pathogens in Stranded Marine Mammals in Northeastern Brazil: *Brucella* spp. infection in a Clymene Dolphin (*Stenella clymene*)’, *Journal of Wildlife Diseases*, pp. 2017-03–050. doi: 10.7589/2017-03-050.
- Bossart, G. D. (2011) ‘Marine mammals as sentinel species for oceans and human health’, *Veterinary Pathology*, 48(3), pp. 676–690. doi: 10.1177/0300985810388525.
- Van Bresseem, M.-F., Duignan, P. J., Banyard, A., Barbieri, M., Colegrove, K. M., De Guise, S., Di Guardo, G., Dobson, A., Domingo, M., Fauquier, D., Fernandez, A., Goldstein, T., Grenfell, B., Groch, K. R., Gulland, F., Jensen, B. A., Jepson, P. D., Hall, A., Kuiken, T., Mazzariol, S., Morris, S. E., Nielsen, O., Raga, J. A., Rowles, T. K., Saliki, J., Sierra, E., Stephens, N., Stone, B., Tomo, I., Wang, J., Waltzek, T. and Wellehan, J. F. X. (2014) ‘Cetacean morbillivirus: current knowledge and future directions.’, *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 6(12), pp. 5145–81. doi: 10.3390/v6125145.
- Van Bresseem, M. (2001) ‘Serological evidence of *Brucella* species infection in odontocetes from the south Pacific and the Mediterranean’, *Veterinary Record*, 148, pp. 657–661.
- Van Bresseem, M., Raga, A., Di Guardo, G., Jepson, P., Duignan, P., Siebert, U., Barrett, T., Santos, Mc., Moreno, I., Siciliano, S., Aguilar, A. and Van Waerebeek, K. (2009) ‘Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors’, *Diseases of Aquatic Organisms*, 86, pp. 143–157. doi: 10.3354/dao02101.

- Cloeckaert, A., Verger, J. M., Grayon, M., Paquet, J. Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G. and Godfroid, J. (2001) 'Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus', *Microbes and Infection*, 3(9), pp. 729–738. doi: 10.1016/s1286-4579(01)01427-7.
- Cvetnić, Ž., Duvnjak, S., Đuras, M., Gomerčić, T., Reil, I., Zdelar-Tuk, M. and Špičić, S. (2016) 'Evidence of *Brucella* strain ST27 in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in Europe', *Veterinary Microbiology*, 196(August 2015), pp. 93–97. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.10.013.
- Dagleish, M. P., Barley, J., Finlayson, J., Reid, R. J. and Foster, G. (2008) 'Brucella ceti Associated Pathology in the Testicle of a Harbour Porpoise (*Phocoena phocoena*)', *Journal of Comparative Pathology*, 139(1), pp. 54–59. doi: 10.1016/j.jcpa.2008.03.004.
- Davison, N. J., Cranwell, M. P., Perrett, L. L., Dawson, C. E., R. Deaville, Stubberfield, E. J., Jarvis, D. S. and Jepson, P. D. (2009) 'Meningoencephalitis associated with *Brucella* species in a live-stranded striped dolphin (*Stenella coeruleoolba*) in south-west England', *Veterinary Record*. British Medical Journal Publishing Group, 165(3), pp. 86–89. doi: 10.1136/vetrec.165.3.86.
- Dawson, C. E., Perrett, L. L., Stubberfield, E. J., Stack, J. a, Farrelly, S. S. J., Cooley, W. a, Davison, N. J. and Quinney, S. (2008) 'Isolation and characterization of *Brucella* from the lungworms of a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*).', *Journal of wildlife diseases*, 44(2), pp. 237–46. doi: 10.7589/0090-3558-44.2.237.
- Ewalt, D. R., Payeur, J. B., Martin, B. M., Cummins, D. R. and Miller, W. G. (1994) 'Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*)', 452, pp. 448–452.
- Foster, G., Jahans, K. L., Reid, R. J. and Ross, H. M. (1996) 'Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter.', *The Veterinary record*, 138(24), pp. 583–6.
- Foster, G., MacMillan, A. P., Godfroid, J., Howie, F., Ross, H. M., Cloeckaert, A., Reid, R. J., Brew, S. and Patterson, I. A. P. (2002) 'A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland', *Veterinary Microbiology*, 90(1–4), pp. 563–580. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00236-5.

- Foster, G., Nymo, I. H., Kovacs, K. M., Beckmen, K. B., Brownlow, A. C., Baily, J. L., Dagleish, M. P., Muchowski, J., Perrett, L. L., Tryland, M., Lydersen, C., Godfroid, J., McGovern, B. and Whatmore, A. M. (2018) 'First isolation of *Brucella pinnipedialis* and detection of *Brucella* antibodies from bearded seals *Erignathus barbatus*', *Diseases of Aquatic Organisms*, 128(1), pp. 13–20. doi: 10.3354/dao03211.
- Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I. and Cloeckert, A. (2007) 'Brucella ceti sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(11), pp. 2688–2693. doi: 10.1099/ijs.0.65269-0.
- Garofolo, G., Zilli, K., Troiano, P., Petrella, A., Marotta, F., Di Serafino, G., Ancora, M. and Di Giannatale, E. (2014) 'Brucella ceti from two striped dolphins stranded on the Apulia coastline, Italy', *Journal of Medical Microbiology*, 63(PART 2), pp. 325–329. doi: 10.1099/jmm.0.065672-0.
- Goldstein, T., Zabka, T. S., DeLong, R. L., Wheeler, E. A., Ylitalo, G., Bargu, S., Silver, M., Leighfield, T., Dolah, F. Van, Langlois, G., Sidor, I., Dunn, J. L. and Gulland, F. M. D. (2009) 'The role of domoic acid in abortion and premature parturition of california sea lions (*zalophus californianus*) on san miguel island, california', *Journal of Wildlife Diseases*. Wildlife Disease Association , 45(1), pp. 91–108. doi: 10.7589/0090-3558-45.1.91.
- González-Barrientos, R., Morales, J. A., Hernández-Mora, G., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E. and Moreno, E. (2010) 'Pathology of Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*) Infected with *Brucella ceti*', *Journal of Comparative Pathology*, 142(4), pp. 347–352. doi: 10.1016/j.jcpa.2009.10.017.
- González, L., Patterson, I. A., Reid, R. J., Foster, G., Barberán, M., Blasco, J. M., Kennedy, S., Howie, F. E., Godfroid, J., MacMillan, A. P., Schock, A. and Buxton, D. (2002) 'Chronic meningoencephalitis associated with *Brucella* sp. infection in live-stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*)', *Journal of Comparative Pathology*, 126(2–3), pp. 147–152. doi: 10.1053/jcpa.2001.0535.

- Grattarola, C., Giorda, F., Iulini, B., Pintore, M. D., Pautasso, A., Zoppi, S., Gorla, M., Romano, A., Peletto, S., Varello, K., Garibaldi, F., Garofolo, G., Di Francesco, C. E., Marsili, L., Bozzetta, E., Di Guardo, G., Dondo, A., Mignone, W. and Casalone, C. (2016) ‘Meningoencephalitis and *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* spp. coinfection in a dolphin in Italy’, *Diseases of Aquatic Organisms*, 118(2), pp. 169–174. doi: 10.3354/dao02957.
- Guzmán-Verri, C., González-Barrientos, R., Hernández-Mora, G., Morales, J.-A., Baquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E. and Moreno, E. (2012) ‘*Brucella ceti* and Brucellosis in Cetaceans’, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(February), pp. 1–22. doi: 10.3389/fcimb.2012.00003.
- Hernández-Mora, G., González-Barrientos, R., Morales, J. A., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Baquero-Calvo, E., De-Miguel, M. J., Marín, C. M., Blasco, J. M. and Moreno, E. (2008) ‘Neurobrucellosis in stranded dolphins, Costa Rica’, *Emerging Infectious Diseases*, 14(9), pp. 1430–1433. doi: 10.3201/eid1409.071056.
- Hernández-Mora, G., Manire, C. A., González-Barrientos, R., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Staggs, L., Thompson, R., Chaves-Olarte, E. and Moreno, E. (2009) ‘Serological diagnosis of *Brucella* infections in odontocetes’, *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(6), pp. 906–915. doi: 10.1128/CVI.00413-08.
- Hernández-Mora, G., Palacios-Alfaro, J. D. and González-Barrientos, R. (2013) ‘Wildlife reservoirs of brucellosis: *Brucella* in aquatic environments’, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 32(1), pp. 89–103.
- 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. and Domingo, M. (2014) ‘*Brucella ceti* infection in dolphins from the Western Mediterranean sea’, *BMC Veterinary Research*, 10(1), p. 206. doi: 10.1186/s12917-014-0206-7.
- Jauniaux, T. P., Brenez, C., Fretin, D., Godfroid, J., Haelters, J., Jacques, T., Kerckhof, F., Mast, J., Sarlet, M. and Coignoul, F. L. (2010) ‘*Brucella ceti* infection in harbor porpoise (*Phocoena phocoena*)’, *Emerging Infectious Diseases*, 16(12), pp. 1966–1968. doi: 10.3201/eid1612.101008.

- Jepson, P. D., Brew, S., MacMillan, A. P., Baker, J. R., Barnett, J., Kirkwood, J. K., Kuiken, T., Robinson, I. R. and Simpson, V. R. (1997) 'Antibodies to Brucella in marine mammals around the coast of England and Wales.', *The Veterinary record*, 141(20), pp. 513–5.
- Kroese, M. V., Beckers, L., Bisselink, Y. J. W. M., Brasseur, S., van Tulden, P. W., Koene, M. G. J., Roest, H. I. J., Ruuls, R. C., Backer, J. A., IJzer, J., van der Giessen, J. W. B. and Willemsen, P. T. J. (2018) 'Brucella pinnipedialis in Grey Seals (*Halichoerus grypus*) and Harbor Seals (*Phoca vitulina*) in the Netherlands.', *Journal of Wildlife Diseases*, 54(3), pp. 2017-05–097. doi: 10.7589/2017-05-097.
- Kuiken, T. (1991) *Proceedings of the First European Cetacean Society Workshop on Cetacean Pathology: Dissection Techniques and Tissue Sampling, Leiden, the Netherlands, 13-14 September 1991*. European Cetacean Society (ECS newsletter).
- Lambourn, D. M., Garner, M., Ewalt, D., Raverty, S., Sidor, I., Jeffries, S. J., Rhyan, J. and Gaydos, J. K. (2013) 'Brucella pinnipedialis infections in pacific harbor seals (*phoca vitulina richardsi*) from washington state, usa', *Journal of Wildlife Diseases*, 49(4), pp. 802–815. doi: 10.7589/2012-05-137.
- Maquart, M., Zygmunt, M. S. and Cloeckert, A. (2009) 'Marine mammal Brucella isolates with different genomic characteristics display a differential response when infecting human macrophages in culture', *Microbes and Infection*. Elsevier Masson SAS, 11(3), pp. 361–366. doi: 10.1016/j.micinf.2008.12.012.
- McAloose, D., Rago, M. V., Di Martino, M., Chirife, A., Olson, S. H., Beltramino, L., Pozzi, L. M., Musmeci, L., La Sala, L., Mohamed, N., Sala, J. E., Bandieri, L., Andrejuk, J., Tomaszewicz, A., Seimon, T., Sironi, M., Samartino, L. E., Rowntree, V. and Uhart, M. M. (2016) 'Post-mortem findings in southern right whales *Eubalaena australis* at Península Valdés, Argentina, 2003-2012', *Diseases of Aquatic Organisms*, 119(1), pp. 17–36. doi: 10.3354/dao02986.

- McDonald, W. L., Jamaludin, R., Mackereth, G., Hansen, M., Humphrey, S., Short, P., Taylor, T., Swingler, J., Dawson, C. E., Whatmore, A. M., Stubberfield, E., Perrett, L. L. and Simmons, G. (2006) 'Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand', *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), pp. 4363–4370. doi: 10.1128/JCM.00680-06.
- Meegan, J., Field, C., Sidor, I., Romano, T., Casinghino, S., Smith, C. R., Kashinsky, L., Fair, P. A., Bossart, G., Wells, R. and Dunn, J. L. (2010) 'Development, validation, and utilization of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Brucella* species in marine mammals', *J.Vet.Diagn.Invest*, 22(6), pp. 856–862.
- Miller, W. G., Adams, L. G., Ficht, T. A., Cheville, N. F., Payeur, J. P., Harley, D. R., House, C. and Ridgway, S. H. (1999) 'Brucella-induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*).', *Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 30(1), pp. 100–10.
- Moreno, E. (2014) 'Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis', *Frontiers in Microbiology*, 5(MAY), pp. 1–18. doi: 10.3389/fmicb.2014.00213.
- Nielsen, O., Stewart, R. E., Nielsen, K. H., Measures, L. and Duignan, P. (2001) 'Serologic survey of *Brucella* spp. antibodies in some marine mammals of North America', *J.Wildl.Dis.*, 37(1), pp. 89–100.
- Norman, S. A., Delaney, M. A., Haman, K. H., Thomas, A. C., Godfroid, J., Larsen, A. K., Nymo, I. H., Robbe-Austerman, S., Quance, C., Rhyan, J. C., Lambourn, D. M., Jeffries, S. J. and Rabinowitz, P. (2017) 'Application of real-time quantitative PCR assays for detecting marine *Brucella* spp. in fish', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, p. 104063871773302. doi: 10.1177/1040638717733024.
- Nymo, I. H., Tryland, M. and Godfroid, J. (2011) 'A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*)', *Veterinary Research*. BioMed Central Ltd, 42(1), p. 93. doi: 10.1186/1297-9716-42-93.

- OIE (2013) World Organization for Animal Health Bovine Brucellosis. Paris, France: Office International des Epizooties; World Organization for Animal Health website.
- Olsen, S. C. and Palmer, M. V. (2014) ‘Advancement of Knowledge of *Brucella* Over the Past 50 Years’, *Veterinary Pathology*, 51(6), pp. 1076–1089. doi: 10.1177/0300985814540545.
- Perrett, L. L., Brew, S. D., Stack, J. A., Macmillan, A. P. and Bashiruddin, J. B. (2004) ‘Experimental assessment of the pathogenicity of *Brucella* strains from marine mammals for pregnant sheep’, *Small Ruminant Research*, 51, pp. 221–228. doi: 10.1016/S0921-4488(03)00233-5.
- Perrett, L. L., Dawson, C. E., Davison, N. and Quinney, S. (2004) ‘*Brucella* infection of lungworms from a harbour porpoise.’, *The Veterinary record*, 154(25), p. 800.
- Pintore, M. D., Mignone, W., Di Guardo, G., Mazzariol, S., Ballardini, M., Florio, C. L., Gorla, M., Romano, A., Caracappa, S., Giorda, F., Serracca, L., Pautasso, A., Tittarelli, C., Petrella, A., Lucifora, G., Di Nocera, F., Uberti, B. D., Corona, C., Casalone, C. and Iulini, B. (2018) ‘Neuropathologic Findings in Cetaceans Stranded in Italy (2002–2014)’, *Journal of Wildlife Diseases*, pp. 2017-02–035. doi: 10.7589/2017-02-035.
- Rhyan, J. C., Gidlewski, T., Ewalt, D. R., Hennager, S. G., Lambourne, D. M. and Olsen, S. C. (2001) ‘Seroconversion and abortion in cattle experimentally infected with *Brucella* sp. isolated from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*)’, *J Vet Diagn Invest*, 13, pp. 379–382.
- Sánchez-Sarmiento, A. M., Carvalho, V. L., Sacristán, C., Groch, K. R., Ressio, R. A., Fernandes, N. C. C. A., Guerra, J. M., Costa-Silva, S., Díaz-Delgado, J., Favero, C. M., Silva, N. S., Ferreira Neto, J. S., Meirelles, A. C. O. and Catão-Dias, J. L. (2018) ‘Brucellosis in a Clymene dolphin (*Stenella clymene*) stranded in Brazil’, *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(1), pp. 289–291. doi: 10.1111/tbed.12696.
- Sohn, A. H., Probert, W. S., Glaser, C. A., Gupta, N., Bollen, A. W., Wong, J. D., Grace, E. M. and McDonald, W. C. (2003) ‘Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp.’, *Emerging Infectious Diseases*, 9(4), pp. 485–488. doi: 10.3201/eid0904.020576.

- Soto, S., Marco, A., Domingo, M., Raga, J. A., González, R., Alegre, F., González, B. and Medina, P. (2011) ‘Epizootic of dolphin morbillivirus on the Catalanian Mediterranean coast in 2007’, *Veterinary Record*, 169. doi: 10.1136/vr.d1686.
- Stevenson, M. (2013) ‘Epir: An R Package for the Analysis of Epidemiological Data’, *R package version*, pp. 9–43.
- Tachibana, M., Watanabe, K., Kim, S., Omata, Y., Murata, K., Hammond, T. and Watarai, M. (2006) ‘Antibodies to *Brucella* spp. in Pacific bottlenose dolphins from the Solomon Islands.’, *Journal of wildlife diseases*, 42(2), pp. 412–414. doi: 10.7589/0090-3558-42.2.412.
- Tryland, M., Sørensen, K. K. and Godfroid, J. (2005) ‘Prevalence of *Brucella pinnipediae* in healthy hooded seals (*Cystophora cristata*) from the North Atlantic Ocean and ringed seals (*Phoca hispida*) from Svalbard’, *Veterinary Microbiology*. Elsevier, 105(2), pp. 103–111. doi: 10.1016/J.VETMIC.2004.11.001.
- West, K. L., Levine, G., Jacob, J., Jensen, B., Sanchez, S., Colegrove, K. and Rotstein, D. (2015) ‘Coinfection and Vertical Transmission of *Brucella* and *Morbillivirus* in a Neonatal Sperm Whale (*Physeter macrocephalus*) in Hawaii, USA’, *Journal of Wildlife Diseases*, 51(1), pp. 227–232. doi: 10.7589/2014-04-092.

8. Anexos

8.1. Anexo I

Id Suero	Especie	Año	CA	RB	Cultivo	1:5	1:10	1:20	1:40
N-301/12	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2012	Cat	Pos	Pos	97	97	97	97
N-541/12	<i>Grampus griseus</i>	2012	Cat	Pos	N	97	97	95	90
N-556/12	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2012	Cat	N	N	95	95	82	48
N-567/12	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2012	Cat	Pos	N	97	97	97	97
N-255/13	<i>Grampus griseus</i>	2013	Cat	N	-	0	0	0	1
N-9/14	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2014	Cat	N	-	3	0	0	0
N-197/14	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2014	Cat	N	-	56	10	8	4
N-29/15	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2015	Cat	N	-	81	18	0	4
N-49/15	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2015	Cat	N	-	6	0	0	0
N-68/15	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2015	Cat	N	-	75	11	0	0
N-286/15	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2015	Cat	N	-	53	5	0	0
N-5/16	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2016	Cat	N	-	94	72	36	8
N-75/16	<i>Grampus griseus</i>	2016	Cat	N	N	96	91	58	19
N-109/16	<i>Grampus griseus</i>	2016	Cat	Pos	N	0	0	0	0
N-143/16	<i>Tursiops truncatus</i>	2016	Cat	N	-	0	0	0	0
N-260/16	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2016	Cat	Pos	Pos	97	97	97	97
N-319/16	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2016	Cat	Pos	Pos	97	97	96	97
N-419/16	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2016	Cat	N	-	0	0	0	0
N-44/17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2017	Cat	N	-	1	0	0	0
N-45/17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2017	Cat	N	-	0	0	0	0
N-77/17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2017	Cat	N	-	0	0	0	0
N-129/17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2017	Cat	N	-	8	0	0	2
N-168/17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2017	Cat	Pos	Pos	97	95	91	85
N-169/17	<i>Delphinus delphis</i>	2017	Cat	N	N	95	85	50	21
N-454/17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2017	Cat	Pos	N	0	0	0	0
N-488/17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2017	Cat	N	-	13	2	0	0
N-497/17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2017	Cat	Pos	N	30	8	0	0
N-557/17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2017	Cat	Pos	N	97	97	97	97
N-604/17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2017	Cat	Pos	N	13	7	2	0
N-620/17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2017	Cat	Pos	N	96	95	90	71
Sc120907 (38)	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2012	Val	-	-	0	0	0	0
Sc130512 (44)	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2013	Val	-	-	96	96	96	96
Sc130602 (45)	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2013	Val	-	-	75	43	17	4
Sc140209 (52)	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2014	Val	-	-	27	13	2	0
Sc150218 (59)	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2015	Val	-	-	63	8	0	0
Sc150317 (61)	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2015	Val	-	-	0	0	0	0
Sc150320 (62)	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2015	Val	-	-	70	39	15	5
Sc150819A (63)	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2015	Val	-	-	95	90	73	51
Sc160217 (70)	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2016	Val	-	-	92	64	28	10
Sc160709 (71)	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2016	Val	-	-	94	87	58	26
Sc160731 (72)	<i>Stenella coeruleoalba</i>	2016	Val	-	-	90	80	54	31
Dd160621 (83)	<i>Delphinus delphis</i>	2016	Val	-	-	89	69	34	16