

REFLEXIONES SOBRE LA BRUCELOSIS DE LA OVEJA.

Lorenzo Álvarez-Del-Castillo¹, María Victoria Latre-Cequiel², Fulgencio Garrido⁵⁻⁶, Clara Yustes-Miranda³, Jordi Vendrell-Cedó⁴, Belén Gómez⁵, María Jesús García-López⁵, Eduardo Ruiz-Villamor⁶, Carolina Gutiérrez-Repiso⁵ y Manuel Durán-Ferrer⁵⁻⁶.

Introducción

La Brucelosis es una antropozoonosis vinculada sin excepción con los animales domésticos y silvestres (Nicoletti, 1989), y de amplio impacto socioeconómico a nivel mundial, pese a las campañas de control y erradicación desarrolladas durante la segunda mitad del siglo XX. La enfermedad persiste, en ocasiones con virulencia, desafiando el trabajo de los sistemas de salud pública de multitud de países, tanto desarrollados y como en vías de desarrollo (Corbel, 1989; Acha y Szyfres, 2001; Nicoletti, 2002). Aunque otras especies del género *Brucella* son también patógenas para el ser humano, la infección por *B. melitensis* es, incuestionablemente, responsable del mayor número de casos, y con frecuencia de los casos más graves de la Brucelosis humana (Orduña-Domingo y col., 2001).

La Brucelosis ovina, causada por *B. melitensis*, es esencialmente una enfermedad infectocontagiosa aguda de las hembras preñadas, que se manifiesta por abortos a finales de gestación, casi único síntoma apreciable (Alton, 1985). La infección puede afectar sin embargo, con relevancia epidemiológica diversa, a una notable proporción de los individuos del rebaño, con independencia de su edad, sexo, o estado productivo. La enfermedad no suele recidivar (Alton, 1985; 1990), aunque la infección sí puede hacerse crónica, y el patógeno a persistir en el rebaño en una proporción no bien definida de portadores asintomáticos (Alton, 1990). Aunque este perfil de infección es similar en la cabra, la Brucelosis cursa en esta especie con particularidades (Alton, 1990; Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal, 2001), que no serán tratadas aquí.

En este trabajo se comentan algunos de los aspectos más relevantes de la Brucelosis de la oveja que pueden resultar de interés a los profesionales sanitarios con responsabilidades en el control y la erradicación de esta zoonosis.

¹ Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología. Universidad Politécnica de Cataluña.

² Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

³ Laboratorio de Sanidad Animal de Reus. Generalitat de Catalunya.

⁴ Passeig Sunyer 41. 43202-Reus.

⁵ Laboratorio Central de Sanidad Animal. Santa Fe. Granada.

⁶ Académico Numerario de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.

Brucella melitensis.

La primera denominación del germen fue *Micrococcus melitensis* en atención a su morfología y al lugar de su descubrimiento en 1887, la isla de Malta (*melita*, miel). Su denominación actual hace honor también a su descubridor, Sir David Bruce (Corbel y Morgan, 1984).

Aunque se han formulado numerosas propuestas de bajas y nuevas incorporaciones en el género *Brucella*, se siguen clasificando las especies en función del hospedador principal: *B. melitensis* en ganado ovino y caprino (3 biovariedades), *B. abortus* en bovino (7 biovariedades), *B. suis* en porcino (5 biovariedades), *B. ovis* en ganado ovino; *B. neotomae* en la rata del desierto, y *B. canis* en perros. A nivel genético existe una elevada homología entre las especies del género, incluso se ha propuesto citarla como especie única (Verger y col., 1985). Los progresos en genómica mantienen este género abierto a nuevas adscripciones y modificaciones.

Las características morfológicas del género son las de coco, cocobacilo o bacilo corto con un tamaño de 0,5-0,7 por 0,6-1,5 micrómetros. Se visualizan aislados o en parejas, y excepcionalmente en pequeños grupos, con respuesta negativa a la tinción de Gram, pero positiva a la de Stamp. Son inmóviles y sin cápsula. En el manual de referencia de Alton y col. (1988) podemos encontrar una amplia descripción de sus características microbiológicas. Aún siendo aerobias muchas cepas requieren 10% CO₂ suplementario para su crecimiento especialmente en los aislamientos primarios. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C aunque también se multiplica en un rango de 20 °C a 40 °C. En medio sólido las colonias requieren de 48 a 72 horas para ser visibles, y alcanzan su máximo desarrollo a los 4 – 5 días de incubación.

Una característica peculiar de este género, especialmente en *B. melitensis*, es su capacidad, en determinadas condiciones disgenéticas de conservación o cultivo, de disociación o transformación de colonias de superficie S (smooth o lisas) -estado normal de las especies *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*- a cepas R (rough o rugosas) – estado normal de *B. ovis* y *B. canis*-. Estos cambios se asocian generalmente con variaciones de la virulencia, características serológicas y de sensibilidad a los fagos.

La estructura antigénica es básica para el desarrollo de pruebas de diagnóstico serológico, puesto que incluye los determinantes que inducen la respuesta inmune durante la infección. Como especie bacteriana Gram negativa dispone de una compleja pared celular compuesta por membrana interna y externa separadas por un espacio periplasmático. En dicha membrana externa hallamos como en otros Gram negativos: fosfolípidos, proteínas y

lipopolisacárido (LPS). El LPS es el antígeno inmunodominante en las pruebas de detección serológica, y fundamentalmente la fracción denominada cadena O. El LPS está formado por el Lípido A, insertado en la membrana externa pero sin quedar expuesto en su superficie y por ello con menor relevancia diagnóstica, y un polisacárido expuesto hacia el exterior compuesto a su vez de un núcleo interno y la cadena O.

Esta cadena O contiene los epítomos determinantes en las pruebas serológicas basadas en la detección del LPS de las especies lisas (S-LPS). Estructuralmente es un homopolímero lineal de N-formil-perosamina en enlaces a (1,2) y/o α (1,3). Se describen tres tipos de epítomos mediante sueros monoclonales: A (5 o más azúcares en α -1,2); M (contiene enlace α -1,3) y C o común (4 o menos enlaces con α -1,2) (Moriyón, 1994; Zygmunt y col, 1994a). Estas reacciones nos permiten el serotipado de las Brucelas lisas, pero tienen menor importancia en el diagnóstico serológico debido a que los anticuerpos circulantes producidos en la infección reconocen el epítomo común C, no siendo posible distinguir el serotipo (AC de *B. abortus*; MC de *B. melitensis*).

Por ello, según Moriyón (2001), es irrelevante el origen (*B. abortus* o *B. melitensis*) de los antígenos empleados en el diagnóstico, aunque Díaz-Aparicio y col. (1993) señalan una posible mayor sensibilidad en el diagnóstico de Brucelosis ovina utilizando antígenos obtenidos directamente de *B. melitensis*. En las pruebas serológicas habituales se emplean, por tanto, suspensiones celulares de *B. abortus*, en Europa la cepa S19, o sus extractos enriquecidos de LPS, según preconiza el Reglamento 535/2002 de la Comisión Europea y el Manual de la OIE (2004b).

La cadena O es también el principal componente antigénico implicado en la respuesta humoral frente a la vacunación con Rev.1 y así mismo en las reacciones cruzadas que se presentan con otras especies bacterianas cuya composición química de la cadena O es similar a la que exhibe *Brucella* tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Francisella tularensis*, *Pasteurella maltophilia*, *Salmonella* (serotipo grupo N), *Vibrio cholerae*, *Xanthomonas maltophilia*, y sobre todo *Yersinia enterocolitica* O:9 Crespo, 1994).

Otros determinantes antigénicos parecen menos eficaces en la inducción de la respuesta inmune detectable. Destacan: el Hapteno Nativo (HN), químicamente idéntico a la cadena O (Marín y col., 1999); proteínas de membrana externa (Zygmunt y col., 1994a; 1994b) y antígenos citosólicos (Debbbarh y col, 1996a; 1996b; Letesson y col., 1997; Cloeckert y col., 2001). La detección de la inmunidad celular mediante el diagnóstico alérgico utiliza el denominado «test de la brucelina» (Jones y col., 1973) y emplea antígenos citoplásmicos de *B. melitensis* cepa rugosa B-115 (Blasco y col., 1994b). Para la detección

de esta misma respuesta mediante la prueba *in vitro* del interferón gamma se han ensayado tanto antígenos de superficie como del citosol (Durán-Ferrer y col., 2004).

Patogenia y cuadro clínico de la Brucelosis ovina

Como señala Letesson y col. (2002) «aunque *Brucella* es responsable de una de las zoonosis más importantes, nuestro conocimiento de su patogénesis permanece en la infancia». En el género *Brucella* todas las especies, excepto *Brucella neotomae*, son consideradas patógenas. La especial relación que se establece entre el germen y el hospedador, de idéntica naturaleza para todas las especies, produce cuando se rompe el equilibrio un cuadro sintomático y lesional parecido, aunque con particularidades.

Este desequilibrio provoca la enfermedad cuyo principal síntoma es el aborto o el parto prematuro. Puede acontecer un parto normal, con excreción del patógeno (parto infeccioso), de especial relevancia epidemiológica (Alton, 1990). La variedad de respuestas es muy amplia, dependiendo de múltiples factores como la biovariedad, cepa, dosis y la vía de infección del patógeno, y el sexo, edad y estado reproductivo e inmunitario (vacunado o no vacunado) del animal. Desde la enfermedad aguda hasta situaciones crónicas de latencia. La colonización del germen se puede prolongar a lo largo de toda la vida del animal en estados de portador inaparente, pero también se han descrito situaciones de curación (Enright, 1990).

El período de incubación es variable y prolongado, pueden darse largos periodos de tiempo sin síntomas ni respuesta inmune del hospedador, en los que el germen se halla en estado de latencia (Crespo, 1994).

Las Brucelas son gérmenes parásitos intracelulares facultativos, adaptados a la vida en el interior de las células que colonizan induciendo infecciones de carácter crónico (Enright, 1990). Disponen de una variedad de mecanismos aún no totalmente esclarecidos que inactivan las defensas celulares produciendo una respuesta inflamatoria de carácter granulomatoso en los órganos linfoides del hospedador.

B. melitensis es la especie del género *Brucella* con mayor capacidad invasiva y de multiplicación (Corbel y Morgan, 1984) siendo con mucha diferencia la que produce los síntomas más acusados en la especie humana (Corbel, 1997). No se conocen manifestaciones clínicas, epidemiológicas o lesionales diferentes según las biovariedades de *B. melitensis* (1, 2 ó 3) aisladas en cada caso (Garín-Bastuji y col., 1998). El microorganismo no sólo se desarrolla en el animal adulto sino que, como señala Enright (1990), las lesiones en el feto indican que el

curso de la patogenia en éste sería idéntico a la del adulto, con la diferencia de su incapacidad inmunológica para contener la multiplicación, y esto le conduce a la muerte.

Penetran en el organismo atravesando la mucosa conjuntival, oral, faríngea, intestinal, vaginal y prepucial e incluso por la piel, sobre todo lesionada. Una vez traspasada la mucosa, el germen es transportado por vía linfática, tanto en el interior como en el exterior de los macrófagos y otras células, a los linfonódulos regionales donde perviven en las células del sistema mononuclear fagocitario por un largo período de tiempo. En los linfonódulos se observa hiperplasia e inflamación granulomatosa. Si estos mecanismos defensivos fracasan, entonces se produce (entre los días 10 y 22 post infección) la diseminación por el torrente sanguíneo hacia otras localizaciones. Estos periodos intermitentes de diseminación puede prolongarse durante un período variable, entre 30-45 días, aunque algunos autores (Barberán y Blasco, 2002) lo prolongan varios meses. Coincide con el estado febril del animal, y es el período adecuado para que la reacción inmunológica reduzca la carga bacteriana.

La diseminación sanguínea se continúa en la fase de colonización y estabilización de la infección en una localización aislada. Ésta dependerá del especial tropismo del germen por determinados órganos; la más destacada, según Alton (1985), es la mama donde al persistir a lo largo de varias gestaciones mantendrá la infección en el rebaño; también el útero grávido, desde donde podrá atravesar la barrera placentaria, colonizar distintos tejidos fetales y provocar en definitiva su principal manifestación clínica: el aborto. Numerosos animales presentan con el tiempo una infección crónica y se convierten en portadores asintomáticos potencialmente eliminadores de gérmenes en el caso de las cabras y raramente en ganado ovino donde la excreción tiende a remitir (Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal, 2001).

La virulencia parece depender de la existencia de LPS (Corbel, 1997) y son raras las infecciones persistentes por cepas rugosas. Los fenómenos que tienen lugar durante la penetración de la bacteria en las células del hospedador, así como los mecanismos de inhibición de su destrucción en el interior de la misma son objeto prioritario de la investigación actual (Kusumawati y col., 2000). Las células colonizadas son mayoritariamente macrófagos (Ko y Splitter, 2000) estando este fenómeno muy estimulado por la opsonización con inmunoglobulinas, aunque también son fagocitadas las Brucelas no opsonizadas. Una vez en el interior de la célula inmunitaria se inicia la lucha por destruir al germen. Las Brucelas deben resistir el ambiente hostil del fagosoma donde el bajo pH, la escasez de nutrientes y la baja tensión de oxígeno (Ko y Splitter, 2000) las destruirían si no contasen con una gran variedad de mecanismos de supervivencia que además deben inhibir la fusión del fagosoma con el lisosoma. Letesson y col. (2002) mencionan la paradoja de que las Brucelas se ocultan de las células del sistema inmune en el propio interior de las mismas, y con mucha eficacia.

Se desarrolla una respuesta inmunitaria de carácter humoral y celular que provoca síntesis de citoquinas inductoras de la proliferación y diferenciación en clones de linfocitos que se expanden posteriormente. La respuesta en síntesis de anticuerpos puede detectarse entre las 2 – 4 semanas post infección (Alton, 1990; Durán-Ferrer, 1998) aunque es transitoria y muy variable, incluso puede estar ausente, sobre todo en animales sexualmente inmaduros. El patrón de respuesta es similar al del ganado vacuno, con un predominio inicial de IgM seguido a la semana o quince días de un predominio de IgG. Ambas declinan al cronificarse el proceso, predominando en este caso la IgG (Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal, 2001).

La especial predilección del género *Brucella* por el útero de los mamíferos ha tratado de ser explicada por la existencia de una elevada concentración de eritritol en el útero grávido de rumiantes y suinos (Keppies y col., 1965). Sin embargo este hecho se contradice con la proliferación de *Brucella* en el útero de especies en la que la concentración de eritritol es baja (Bosserey, 1984). Otros autores (Enright, 1990) señalan como responsables de la especial predilección por el tejido uterino a la gran cantidad de hormonas y proteínas secretadas por el trofoblasto coriónico que actuarían como estimulantes del crecimiento bacteriano. Las lesiones más características del útero infectado son las propias de una placentitis de tipo necrótico con gran número de cotiledones afectados (Crespo, 1994; Durán-Ferrer, 1998). En el feto se observan gran número de lesiones en los órganos de ambas cavidades torácica y abdominal (Gorham y col., 1986).

La consecuencia de las lesiones es el aborto, principal y frecuentemente única manifestación clínica de la infección (Alton, 1990), normalmente en el último tercio de la gestación o bien mortinatos a término, aunque también pueden nacer animales vivos y morir a las 24 horas extremadamente débiles. La probabilidad de un aborto en las siguientes gestaciones es muy baja. En caso de infectar hembras no grávidas, éstas difícilmente abortarán en la siguiente paridera, lo que explica la mayor incidencia de abortos en rebaños recién infectados frente a aquellos en los que la infección es enzoótica (Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal, 2001). Si la infección se produce muy al final de la gestación raramente se observa el aborto, pero no puede descartarse la posibilidad de un parto «infeccioso».

Son mencionadas como causas más probables del aborto la dificultad en el desarrollo correcto de la nutrición fetal por el daño vascular y la isquemia que se produce, así como el impedimento de la retirada de productos tóxicos del metabolismo fetal (Moriyón y Ulevitch, 1978). La elevación del nivel de cortisol como respuesta al estrés produciría en último término la liberación de prostaglandina PGF 2 α , hormona fuertemente abortiva.

También hallamos lesiones focales granulomatosas con infiltrado de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos en mama, bazo, hígado, testículo, epidídimo y glándulas sexuales accesorias (Barberán y Blasco, 2002) y con menor frecuencia en médula ósea, huesos, corteza renal, y membranas sinoviales (Durán-Ferrer, 1998). La infección se perpetúa en la glándula mamaria, linfonódulos retromamarios y genitales (Fensterbank, 1987). La inflamación de la mama reduce la producción láctea aunque raramente conduce a una mamitis clínicamente detectable. Entre las lesiones producidas en el morueco destacan: orquitis, epididimitis, vesiculitis y prostatitis pudiendo derivar el proceso en una esterilidad temporal o permanente.

Epidemiología de la Brucelosis ovina

La epidemiología de la Brucelosis en ganado ovino es muy compleja. Los largos períodos de silencio serológico y las recidivas cíclicas en el rebaño, así como la transmisión vertical y el carácter de portador crónico de muchos animales han dificultado enormemente la comprensión de la evolución de la infección en el rebaño. La capacidad de evadir los sistemas defensivos orgánicos ha llevado a Letesson y col. (2002) a denominar al género *Brucella* como ese «horrible bicho furtivo» (*furtive nasty bug*).

El rango de especies sensibles a *Brucella* comprende un amplio rango de mamíferos (Crespo, 1985). En el caso de *B. melitensis* los hospedadores principales son la cabra y la oveja. El papel de las especies silvestres en el mantenimiento y difusión de la enfermedad en el ganado ovino es, dependiendo de los autores, poco importante (Alton, 1985), más o menos habitual (Comité Expertos FAO/OMS en Brucelosis, 1986) o con importancia creciente (Davis, 1990). Es frecuente la infección del ganado bovino con *B. melitensis* por contagio a partir de ganado ovino al compartir estos animales los caminos, los pastos o la estabulación (Verger y col., 1985). Aunque poco estudiado, también se han descrito casos de infección en ganado ovino por *B. abortus* (Nicoletti, 1980).

Sin lugar a duda, la infección en el rebaño tiene como origen la incorporación de animales enfermos o portadores inaparentes foráneos. En un rebaño no inmunizado el proceso se inicia con carácter «explosivo», con una frecuencia muy elevada de abortos, entre el 10% y el 16%, en la primera paridera (Crespo, 1994). En posteriores períodos reproductivos el fenómeno abortivo suele atenuarse dado que la oveja no suele abortar más que una vez (Alton, 1985; Durán-Ferrer, 1998), aunque Barberán y Blasco (2002) señalan la posibilidad de dos abortos consecutivos. Con intervalos de 3 a 4 parideras se suceden incrementos en el porcentaje de abortos en el rebaño hasta cifras similares a las de la primera vez, sobre todo en aquellos de estabulación nocturna y hacinamiento

(Blasco, 1990). Este hecho es debido a un mantenimiento constante del ciclo de infección entre los animales excretores del patógeno y las ovejas en periodo de susceptibilidad. No obstante este ciclo de infección se atenúa notablemente cuando los animales están vacunados con Rev.1 (Alton, 1990)

Los animales del rebaño ovino susceptibles a la infección (Alton, 1990) son las hembras gestantes a partir del segundo tercio de la gestación. Las hembras no gestantes no sufren la enfermedad clínica. Una proporción de animales no bien definida pueden quedar como portadores latentes del germen. Los corderos neonatos serían resistentes a la infección (Alton, 1985) por lo que la leche, a pesar de contener una elevada concentración de Brucelas durante dos meses tras el parto (Alton, 1985), no representaría un gran riesgo en la transmisión vertical. Sin embargo, la leche sí podría jugar un papel importante como fuente de infección en la transmisión horizontal entre hembras lactantes a partir de prácticas de ordeño no higiénicas, especialmente en el ordeño manual (Minas, comunicación personal, 2000). La transmisión vertical de la madre al cordero está documentada aunque se desconoce en qué medida este mecanismo participa en el mantenimiento de la infección en el rebaño. Los estudios realizados por Grilló y col. (1997), así como el conocimiento de que un 10 % de los terneros seronegativos nacidos de madres infectadas o consumidores de leche contaminada desarrollan la enfermedad una vez llegan a ser adultos (fenómeno de latencia citado por Nicoletti, 1986), podrían dar importancia epidemiológica a la población de animales jóvenes.

Se considera al morueco como simple transmisor mecánico de la infección durante la monta, aunque Barberán y Blasco (2002) le atribuyen un papel mucho más relevante, aislando *Brucella melitensis* en semen en más del 20% de machos serológicamente positivos, y por tanto debería reconsiderarse su importancia real. En cuanto a las razas se ha observado una marcada susceptibilidad de las estirpes lecheras debido al especial tropismo del género por el tejido mamario (Alton, 1985).

La fuente principal de gérmenes son los productos del aborto - feto, anejos fetales y líquido amniótico donde se detectan hasta 10^{11} ufc/g en los cotiledones (Crespo, 1994) y 10^{11} ufc/g en el fluido alantoideo (Alton, 1990). El exudado vaginal contiene una concentración elevada de gérmenes durante las semanas siguientes al aborto o parto infeccioso (Durán-Ferrer, 1998; Alton, 1990) pudiéndose prolongar hasta dos meses (Jiménez de Bagüés y col., 1989). Blasco (1990) considera ésta la vía principal para el mantenimiento de la infección en el rebaño. La leche presenta una notable concentración de Brucelas, aunque sería notablemente inferior a la descrita para el exudado vaginal y para los restos de aborto. La excreción puede continuar en partos posteriores, incluso

durante 140 - 180 días en ovejas tras abortar (Alton, 1985). Otras vías de excreción como son la orina, sudor, heces, secreciones nasales o semen serían de mucha menor importancia (Crespo, 1994).

Las Brucelas excretadas por las distintas vías, antes de contagiar a otros individuos, son capaces de resistir las condiciones medioambientales. La luz solar las inactiva rápidamente pero en ciertas condiciones de humedad y temperatura y en el sustrato adecuado presentan elevadas tasas de viabilidad durante meses (Blasco, 1990; 2002). Un estudio pormenorizado de la resistencia del germen en distintos sustratos y condiciones ambientales se encuentra en la revisión que realizó el Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal (2001) y es descrito además por otros autores (Nicoletti, 1986; Crespo, 1994). Se mantiene viable también en los pastos, por lo que las técnicas de nomadeo, transhumancia y pastos compartidos con especies silvestres o domésticas son consideradas factores importantes para la entrada y mantenimiento de la infección en el rebaño. Tras el despoblamiento de rebaños en proceso de erradicación, debe someterse los pastos de la explotación a una sistemática de desinfección y de reposo antes de introducir nuevos animales.

Las formas de transmisión principales son por ingestión y por inhalación. La penetración en los animales susceptibles se verá favorecida por condiciones ambientales de temperatura, baja luminosidad, humedad y falta de ventilación, elementos todos ellos que permiten la supervivencia en elevadas concentraciones del germen (Blasco, 1990). Por ello, es frecuente la inhalación de polvo altamente contaminante por vía aerógena (Alton, 1985) y con mayor profusión en los corrales y dehesas de nuestros climas secos (Crespo, 1994). La ingestión de material contaminado puede producirse por la contaminación del alimento, pero también por el lamido de fetos y material fetal. También influyen los hábitos de autolimpieza, así como el aprovechamiento de pastos o aguas contaminadas (Crespo, 1994). Otros mecanismos de transmisión a considerar son el contacto directo, penetrando el germen por las mucosas o la piel. La vía conjuntival de infección puede ser importante en condiciones de hacinamiento, que suele además discurrir paralela a la vía respiratoria.

El papel de los insectos y garrapatas como vectores es aceptado pero considerado de menor valor epidemiológico.

Es frecuente que los veterinarios implicados en las campañas de saneamiento precisen información sobre las medidas de bioprotección más adecuadas. Creemos importante señalar que el mayor riesgo se hallaría en la toma de muestras en locales oscuros y mal ventilados con hacinamiento y bajo nivel higiénico. Como equipos

de protección individual (EPI) necesarios citaremos una vestimenta y calzado apropiado, guantes, gafas de protección, gorros que cubran los oídos y mascarilla con filtro para partículas (son mucho más eficaces las máscaras de faciales de protección total con filtros para partículas). Sobre medidas de protección cuando se trabaja con Brucelas puede consultarse también los manuales de referencia (Manual de la OIE, 2004c).

Diagnóstico de la Brucelosis ovina

El diagnóstico es uno de los pilares fundamentales de los planes de lucha, y de su calidad podrá depender directamente la eficacia de éstos (Dubray, 1985). En los pequeños rumiantes, la única manifestación clínica que puede estar presente en un rebaño infectado es el aborto que también puede tener otros orígenes (Zarzuelo, 1978). Esto invalida el simple diagnóstico clínico de la enfermedad que deberá basarse por tanto en las pruebas de diagnóstico de laboratorio.

Existe un acuerdo general entre los diferentes autores en que el único diagnóstico inequívoco es el aislamiento y tipificación bacteriológica (Alton y col., 1988; Blasco, 2002; Crespo, 1994). El Manual de la OIE (2004b) señala que, si bien esto es cierto, son métodos poco prácticos para aplicar de forma masiva en campañas de lucha contra la enfermedad en condiciones de campo. Por ello es necesario acudir a técnicas indirectas de diagnóstico, fundamentalmente serológicas, que deben interpretarse siempre a la luz de los datos clínicos, bacteriológicos y epidemiológicos (Blasco y Gamazo, 1994).

La especial epidemiología de la infección brucelar, con períodos variables de latencia y un número significativo de animales portadores inaparentes, así como la patogenia marcada por el carácter de germen de vida intracelular facultativa, y la evolución temporal que sufre la respuesta inmune en hospedador complican enormemente la elección de una técnica concreta para el diagnóstico indirecto. En esta decisión no sólo se debe considerar la especificidad y sensibilidad de la técnica, sino también la rapidez, simplicidad y economía que haga factible su uso sobre amplios censos de ganado. Ello es aún más relevante en aquellos países de recursos limitados en que posiblemente la única opción real son las técnicas sencillas y de bajo coste.

Ninguna técnica presenta un 100 % de sensibilidad y especificidad en todas las situaciones epidemiológicas, por lo que idealmente deberían combinarse varias pruebas serológicas y recurrir al diagnóstico bacteriológico para confirmar o descartar la infección cuando esta información serológica no es concluyente (Manual de la OIE, 2004b).

Por su parte, los métodos de detección del germen basados en técnicas de biología molecular necesitan del adecuado refinamiento para poder ser aplicados en la detección de Brucelas sobre muestras de tejido.

Diagnóstico directo

El objetivo de la investigación bacteriológica es demostrar la presencia del patógeno en los órganos del animal, y es generalmente aceptado que es el único diagnóstico inequívoco de la infección. Debe ser por tanto la técnica de referencia para validar cualquier método de diagnóstico inmunológico. El enorme número de muestras a procesar en una campaña de saneamiento, la complejidad técnica, su elevado coste, la necesidad de personal muy especializado, la laboriosidad de su ejecución, y el riesgo sanitario para los analistas hacen que su aplicación sea limitada (Blasco y Gamazo, 1994). Sin embargo, estas técnicas deben incorporarse de manera paulatina en las fases finales de los programas de erradicación como apoyo en aquellos casos en que la serología no sea concluyente (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2003).

En el diagnóstico de la Brucelosis en la especie humana se considera la sangre en hemocultivo como el tejido de elección para el aislamiento, ya que el diagnóstico normalmente se realizará en estados febriles y septicémicos (Elberg, 1984). En ganado ovino la sangre es poco útil como sustrato diagnóstico (Crespo, 1994) debido al reducido período de bacteriemia y a la imposibilidad práctica de evaluar el estado febril de los animales. Corbel y Morgan (1984) señalan que se puede aislar Brucelas prácticamente de cualquier órgano aunque la mayor recuperación de la bacteria se obtiene en los productos del aborto.

En el caso de intentar determinar la etiología del aborto, los tejidos de elección son claramente los productos de éste. Feto y placenta contienen gran cantidad de gérmenes viables (Alton, 1990; Marín, 1998; Crespo, 1994; Manual de la OIE, 2004b) siendo posible su aislamiento a partir de cotiledones placentarios y membranas fetales así como a partir de diversos órganos del feto (contenido estomacal, pulmón, hígado, bazo). De los exudados que siguen al aborto también es posible aislar fácilmente Brucelas.

Tras el aborto o parto se produce un largo período de excreción de Brucelas en el exudado vaginal. El flujo vaginal, recogido con escobillón estéril y medio de transporte, es la muestra más recomendada por los distintos autores (Crespo, 1994; Marín y col., 1996b; Marín, 1998) que señalan como ventajas: su seguridad higiénica, la flexibilidad al diagnosticar otras causas de aborto como los producidos por Salmonelas y Clamidas, la sensibilidad, al existir la posibilidad de excreción sin infección fetal (Marín, 1998), la

persistencia y continuidad de la excreción desde los 15 días hasta los 2 meses posteriores al aborto (Jiménez de Bagüés y col., 1989; Alton, 1985; Alton, 1990; Barberán y Blasco, 2002) y por último, la posibilidad de identificarse claramente a los animales más peligrosos epidemiológicamente (Crespo, 1994). Los estudios de Durán-Ferrer (1998) mostraron que en animales vacunados e infectados posteriormente la excreción es menos intensa y duradera.

La posibilidad de detectar Brucelas en la leche y calostro de las hembras abortadas o paridas está ampliamente documentada (Corbel y Morgan, 1984; Marín y col., 1996b; Alton 1990; Manual de la OIE, 2004b). Se ha señalado que el período de excreción por leche es de 15 a 60 días, pero a veces es nulo o intermitente y menos abundante en animales vacunados lo que puede reducir su sensibilidad (Crespo, 1994). A pesar de ello, Garín-Bastuji y col. (1998) concluyen que el muestreo de ambos fluidos, leche y secreción vaginal, es la técnica más adecuada para el diagnóstico etiológico «*in vivo*». Otros tejidos menos importantes serían, en el macho, el semen y su muestreo con escobillón prepucial (Corbel y Morgan, 1984; Manual de la OIE, 2004b).

El escaso número de estudios al respecto hacen difícil determinar en qué órganos del animal adulto sacrificado, independientemente del hecho clínico del aborto, será más probable aislar el germen. Alton y col., (1988) señalan dos condicionantes: el bajo número de gérmenes por muestra y la elevada contaminación de las mismas que inhibe las Brucelas al ser éste un género de crecimiento lento. Marín y col. (1996a) señalan la relación entre fase patocrónica y órgano seleccionado para el aislamiento. Así en fases crónicas se acantona en células del sistema mononuclear fagocitario como los linfonódulos o bazo donde será más probable su aislamiento.

Por ello en la necropsia la toma de muestras debe abarcar principalmente a los órganos del SMF (bazo y linfonódulos), al útero de la hembra gestante o abortada y a la mama (Corbel, 1985a; Verger, 1985; Marín y col. 1996b; Marín, 1998; Manual de la OIE, 2004b). A pesar de este acuerdo general entre autores, existen discrepancias en cuanto a la frecuencia relativa de aislamientos en cada localización.

En cualquier caso los órganos citados mayoritariamente en la bibliografía son bazo, linfonódulos (ilíaco, supramamario, crural, parotídeo, submaxilar, retrofaríngeo, cervical superficial y mesentérico), mama, útero, médula ósea, testículo, epidídimo y glándulas accesorias. Para algunos, el útero no resulta interesante debido al mayor grado de contaminación y a la reducida persistencia del germen en este órgano, aunque en animales recién abortados su investigación posee indudable interés. Marín y col. (1996b) señala el

mayor porcentaje de aislamientos en la mama y los linfonódulos retromamarios. Nosotros hemos detectado en distintas situaciones epidemiológicas que serían la mama y su linfonódulo los tejidos más recomendables para el diagnóstico microbiológico de la Brucelosis en el rebaño, si se muestrea animales en número suficiente (Álvarez, 2004).

Brucella crece en medios ordinarios como agar sangre, agar triptosa, agar tripticasa soja y suero dextrosa agar. En el primer aislamiento, ante la posibilidad de una elevada contaminación de las muestras con gérmenes de crecimiento más rápido, deben utilizarse medios selectivos (Alton y col., 1988; Blasco y Gamazo, 1994; Barberán y Blasco, 2002) que contengan antibióticos inhibidores o colorantes bacteriostáticos. Los dos medios sólidos considerados en la actualidad como más adecuados son: el medio de Farrell y el medio de Thayer Martín modificado (Corbel y Morgan, 1984; Crespo, 1994; Marín y col., 1996a; 1996b; Marín, 1998). La máxima sensibilidad se obtiene sembrando la muestra por duplicado en cada uno de los medios sólidos citados, debido a que la presencia de ácido nalidíxico y bacitracina en el medio de Farrell pueden inhibir el crecimiento de algunas cepas de *B. melitensis* (Marín y col., 1996 a, 1996b; Manual de la OIE, 2004b, Álvarez, 2004).

Diagnóstico indirecto

La puesta en evidencia de la respuesta humoral se realiza mediante técnicas serológicas de detección de anticuerpos. La respuesta celular puede detectarse mediante pruebas de hipersensibilidad retardada y detección de gamma interferón.

La producción de anticuerpos como respuesta a la infección natural se inicia a las 2-4 semanas (Alton, 1990) aunque existe gran variabilidad según el desarrollo de la enfermedad en cada individuo. Cuando se limita la infección a los linfonódulos, puede incluso no detectarse una respuesta inmune apreciable con el consiguiente riesgo epidemiológico de estos animales portadores inaparentes (Alton, 1990; Álvarez, 2004).

Según un estudio sobre infección natural realizado por nosotros (Álvarez, 2004) las técnicas serológicas se muestran en general más sensibles en los rebaños con Brucelosis activa (abortos y excreción masiva del patógeno) que en aquellos donde el proceso es crónico, con diferencias significativas entre ambos tipos. También es más fiable la detección de anticuerpos en los rebaños no inmunizados previamente.

A pesar del enorme bagaje de conocimientos disponibles, y que la gran mayoría de las técnicas serológicas han sido probadas, en mayor o menor medida (Alton, 1990; Blasco, 2002), no ha sido posible determinar una técnica idónea para el serodiagnóstico

de Brucelosis en pequeños rumiantes, de manera que deben siempre interpretarse los resultados serológicos en función de los síntomas clínicos, epidemiológicos y bacteriológicos (Manual de OIE, 2004b), y asumir que el rebaño es la unidad mínima de actuación sanitaria y por tanto el diagnóstico debe ser colectivo (Crespo, 1994).

Según Moriyón (1994) no es relevante la especie de *Brucella* de procedencia del antígeno mientras se encuentre en fase lisa, aunque otros autores como Alton (1990), consideran la posibilidad de mejorar el diagnóstico empleando antígenos elaborados a partir de *Brucella melitensis*. En todo caso, no existen trabajos amplios sobre la materia que den por cerrada la controversia (Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal, 2001).

En el contexto de los programas de erradicación por diagnóstico y sacrificio, las discrepancias entre el resultado de los diferentes técnicas cuando se aplican a un mismo colectivo da a lugar a problemas de índole práctico, y surgen dudas sobre qué animales deben ser retirados del rebaño por considerarse infectados. Se ha señalado que la combinación en paralelo de dos o más técnicas mejora la confianza en el diagnóstico (MacMillan, 1990). Sin embargo, en la mayoría de la ocasiones las limitaciones económicas hacen recomendable utilizar dos técnicas que puedan ser usadas secuencialmente como técnicas de criba o *screening* la primera y como técnica de confirmación la segunda. Se ha descrito que la discrepancia entre las técnicas diagnósticas puede ser notablemente mayor en situaciones de infección natural (Blasco y col., 1994b; Álvarez, 2004) que en modelos de infección experimental sincronizada (Durán y col., 2004). En todo caso las discrepancias entre técnicas de diagnóstico serían más probables en los estados iniciales y finales de la infección, cuando el animal recibe dosis subinfectivas del agente etiológico o en los estados de infección inaparente (MacMillan, 1990; Alton, 1990; Sutherland y Searson, 1990).

En los últimos años se han realizado notorios esfuerzos para desarrollar técnicas de diagnóstico, tanto para la detección de la infección en la oveja como para la serovigilancia de zonas libres de enfermedad. En este sentido, la mayoría de las técnicas que han resultado útiles en el diagnóstico de la Brucelosis bovina (Nielsen y col., 1996a; 1996b; Pouillot y col., 1997; Saegerman y col., 1999; Nielsen y Gall, 2001; Godfroid y col., 2002; Nielsen, 2002; Mc Given y col., 2003) se han evaluado también en mayor o menor medida para el diagnóstico de la Brucelosis de la oveja (Blasco, 1985; Blasco y col., 1994 a y b; Jiménez de Bagüés y col., 1992; Nannini y col., 1992; Jacques y col., 1998; Marín y col., 1999; Biancifiori y col., 2000; Durán-Ferrer y col., 2002; 2004; Álvarez, 2004).

Sin embargo, la información disponible sobre el rendimiento diagnóstico de las diferentes técnicas todavía es limitada, en ocasiones contradictoria, y persiste la necesidad

de profundizar en su validación (Garin-Bastuji y col., 1998, Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal, 2001; Manual de la OIE, 2004b). Las aparentes contradicciones entre los distintos estudios puede ser lógica si se tiene presente que en ocasiones el único punto en común de los estudios es el de basarse en animales con infección brucelar demostrada (cultivo positivo). Este requisito es completamente necesario pero puede no ser suficiente. Los sueros de referencia utilizados en los trabajos realizados hasta ahora para la estimación de la sensibilidad diagnóstica son diversos, y en ocasiones no se aclara por los autores el perfil epidemiológico de la infección en los rebaños o colectivos de donde proceden los animales donantes. Si tenemos presente que este perfil de infección condiciona notablemente la respuesta inmune, como hemos tenido ocasión de comentar, es lógico pensar que el hecho de evaluar las diferentes técnicas en animales con perfil de infección diferentes puede dar lugar necesariamente a discrepancias en los resultados. En consecuencia, puede decirse que se trataría de un problema estadístico de representatividad de la muestra utilizada para la estimación. Esta limitación debería ser superada en futuros estudios, mediante el uso de los protocolos de trabajo que están ampliamente consensuados por la comunidad científica (Manual de la OIE 2004a).

En este sentido, para una valoración precisa de los instrumentos de diagnóstico debe considerarse que la respuesta inmune frente a la infección evoluciona temporalmente con ella, tanto en el individuo y como en el rebaño al que pertenece. En Brucelosis, la metodología necesariamente debe tener presente todos los factores que puedan condicionar esta respuesta inmune como son, el tipo de infección (natural o artificial), el estado reproductivo del animal, el estado inmunitario previo (vacunados y no vacunados), y los estados de excretor y portador latente (Durán-Ferrer y col., 2004; Álvarez, 2004).

Entre las técnicas de *screening* encontramos la aglutinación con Rosa de Bengala y el ELISA indirecto (ELISAI). La primera, tiene la ventaja de su facilidad de realización y bajo coste, pero su interpretación es subjetiva. La segunda es fácilmente automatizable y por tanto aplicable al análisis de gran número de muestras tal y como sucede en las campañas de control y erradicación, y además su interpretación es objetiva ya que se realiza mediante espectrofotómetro. Su principal desventaja es la necesidad de disponer de equipos más sofisticados y personal cualificado. La técnica de Fluorescencia Polarizada podría incorporarse también al elenco de técnicas con esta finalidad de criba (Durán-Ferrer y col., 2004; Álvarez 2004).

Entre las técnicas de confirmación, más específicas, la mejor evaluada es la Fijación del Complemento aunque se han obteniendo resultados muy interesantes con la técnica ELISA de competición (Marín y col., 1999; Durán-Ferrer y col., 2004; Álvarez,

2004) y de inmunocaptura (Durán-Ferrer y col., 2002; 2004, Álvarez, 2004). Blasco (2002) señala que la prueba de Doble Difusión en Gel con Hapteno Nativo es más específica para detectar en una población vacunada los animales peligrosos epidemiológicamente (eliminadores de Brucelas al medio). Sin embargo, los animales negativos a esta técnica podrían ser portadores y por tanto sólo sería aplicable en caso de querer eliminar progresivamente la infección comenzando por los animales más peligrosos, pero asumiendo también que el resto pueden ser portadores, e incluso excretores en un porcentaje no determinado.

La combinación diagnóstica más empleada es el *screening* con Rosa de Bengala (RB) y la confirmación con la Fijación del Complemento (FC) (Manual de la OIE, 2004b). No obstante, si se detecta en el rebaño una proporción notable de individuos positivos a RB (5%) el colectivo completo debe chequearse con la técnica de FC. Este es el procedimiento oficial en la Unión Europea (Directiva del Consejo 91/68/CE). Ambos métodos que detectan anticuerpos frente al S-LPS, utilizan como antígeno suspensiones celulares de *Brucella abortus* (cepa S-99 en Europa) en fase lisa.

La técnica de aglutinación Rosa de Bengala se encuadra dentro de los procedimientos que utilizan un antígeno brucelar amortiguado a pH ácido (3,6). Se realiza a partir de una suspensión celular de *Brucella abortus* cepa S-99 en fase lisa inactivada, teñida con colorante Rosa de Bengala. El antígeno que interviene mayoritariamente es el S-LPS (Alton y col., 1988).

Es una técnica que rinde excelente resultados para la detección de rebaños infectados por brotes de infección (Alton, 1990, Garin-Bastuji y col., 1998; Manual de la OIE, 2004b), pero tiene como principal limitación para el diagnóstico individual en la oveja la falta de repetibilidad en sueros de animales con un bajo nivel de anticuerpos (MacMillan, 1990; Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal, 2001). Esta baja sensibilidad para el diagnóstico individual puede acrecentarse sobre todo en rebaños ovinos de zonas endémicas en los que puede observarse una notoria proporción de sueros RB negativos y sin embargo FC positivos (Blasco y col., 1994a), incluso microbiológicamente positivos (Álvarez, 2004). En este sentido, otros trabajos (Durán-Ferrer, 1998; Durán-Ferrer y col., 2002) ponen de manifiesto reacciones del tipo RB negativo-FC positivo, en sueros de ovejas infectadas experimentalmente cuando transcurre un largo período de tiempo entre el impacto antigénico brucelar (vacunación o infección) y el momento en que se analiza el suero. También Fensterbank y col. (1982) observaron que tras la vacunación, si los animales son posteriormente infectados, un porcentaje de los mismos es incapaz de producir anticuerpos aglutinantes pero sí los fijadores del complemento.

Las limitaciones prácticas del método clásico de Rosa de Bengala en placa de vidrio o porcelana ha sido señalada repetidas veces (MacMillan 1990, Garin-Bastuji y col., 1998; Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal, 2001) pues se ve afectada notablemente por una temperatura de incubación difícilmente controlable y tiene falta de repetibilidad en sueros de animales con un bajo nivel de anticuerpos. Además es un método completamente inviable para analizar sueros hemolisados.

Para mejorar el rendimiento de la técnica se han propuesto distintas alternativas, como la de aumentar la proporción de suero en relación al antígeno de la reacción (Blasco y col., 1994a), o la adaptación del método a un soporte en microplaca, incubación de la reacción en estufa y mejoras en la lectura de la prueba (Durán y col., 2002; 2004).

Este último procedimiento en microplaca supera en parte las limitaciones de la metodología clásica (Durán y col., 2002) pues permite un eficaz control en estufa de la temperatura de incubación, favorece la automatización del procedimiento, reduce la subjetividad en la interpretación de los resultados, y posibilita además el incremento de muestras analizadas por técnico de laboratorio. En el trabajo de Durán y col. (2004) en todas las situaciones consideradas el método en microplaca resultó ser más favorable en la detección de la infección que el método clásico en placa.

La técnica de FC ha sido tradicionalmente considerada como de referencia serológica de la infección brucelar ovina, y como tal utilizada como técnica de confirmación diagnóstica especialmente en rebaños vacunados con Rev.1 (Alton, 1990; Garin-Bastuji y col., 1998; Manual de la OIE, 2004b). Sin embargo, son varios los inconvenientes de orden práctico que suponen su ejecución en el laboratorio (Alton, 1990; Alton y col., 1988; MacMillan, 1990). Ello hace conveniente la búsqueda de nuevas técnicas que permitan agilizar los procesos de diagnóstico en el contexto de los programas de control mediante vacunación y erradicación por diagnóstico y sacrificio.

Sus principales problemas metodológicos son: la complejidad de su ejecución y estandarización, la variabilidad de los reactivos, los fenómenos de prozona, los sueros con actividad anticomplementaria, y la dificultad de interpretar los resultados de sueros hemolisados con título bajo (Durán-Ferrer, 1998, Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal, 2001, Manual de la OIE, 2004b).

Los anticuerpos fijadores del complemento en animales vacunados con Rev.1 desaparecen entre los 6 meses y el año tras la vacunación, dependiendo de la dosis y vía de administración. No obstante, para algunos autores la persistencia podría prolongarse (Fensterbank y col., 1985, Nannini y col., 1991).

La sensibilidad de la FC varía según los diferentes autores, y como en la mayoría de las técnicas serológicas esta disminuye a medida que los episodios agudos de la enfermedad en el rebaño desaparecen (Durán-Ferrer y col., 2002). Este hecho ha sido confirmado por Álvarez (2004) en situaciones de infección natural, en las que la carga bacteriana del individuo cuantificada por métodos bacteriológicos estaría directamente relacionada con la respuesta inmune detectada por esta técnica.

El ELISA indirecto en suero (ELISAI) se basa en la detección de anticuerpos anti S-LPS y evidencia una muy buena sensibilidad (Jiménez de Bagüés y col., 1992; Blasco y col., 1994b; Delgado, 1993; Delgado y col., 1995a; 1995b; Marín y col., 1999; Álvarez, 2004; Durán-Ferrer, 2004), que haría de ella una técnica ideal para la detección de brotes de infección en efectivos no vacunados con Rev. 1, pues es un hecho reconocido que el ELISA indirecto podría adolecer de la suficiente especificidad en los efectivos previamente inmunizados (Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal, 2001).

La información disponible sobre el ELISA de competición (ELISAc), también para la detección de anticuerpos anti S-LPS, es menor (Marín y col., 1999; Biancifiori y col., 2000; Durán-Ferrer y col., 2004). Se desarrolló con el fin de superar las limitaciones propias de otras pruebas, como la menor especificidad del ELISA indirecto o los inconvenientes metodológicos de la FC antes comentados. Álvarez (2004) en muestras procedentes de infección natural constata que la mejora de especificidad respecto a la técnica indirecta es manifiesta y Durán-Ferrer y col. (2004) observaron un similar comportamiento de la FC y del ELISAc en ovejas infectadas experimentalmente. En los estudios de Álvarez (2004) el ELISA de competición presentó la misma sensibilidad que la FC, con el mismo patrón general de respuesta.

Las pruebas de diagnóstico basadas en la inmunidad celular pueden ser de utilidad cuando la serología no lo es, en especial al inicio de infección o en fase de infección crónica (Fensterbank y col., 1985; Alton, 1990; Sutherland y Searson, 1990; Nicoletti y Winter, 1990), pero sobre todo en casos de sospecha de reacciones cruzadas con anticuerpos anti S-LPS de otras bacterias gram-negativas, especialmente *Yersinia enterocolitica* O:9 (Corbel, 1985b; Pouillot y col., 1997; Godfroid y col., 2002).

En el ganado ovino, se ha señalado la utilidad de la prueba de la intradermorreacción (*skin test*) para el diagnóstico de la Brucelosis, aunque la prueba da reacciones cruzadas en animales infectados por *Brucella ovis* (Alton, 1990) y tampoco puede ser aplicada en animales vacunados con Rev. 1 por causa de los frecuentes errores de especificidad (Fensterbank, 1985; Bercovich, 1985; Blasco y col., 1994b). Tiene además los inconvenientes

derivados de una prueba *in vivo*, pues los animales tienen que ser manipulados dos veces y los resultados no están disponibles hasta pasados 2-3 días (Blasco y col., 1994b; Weynants y col., 1995). Más aún, la inoculación del alérgeno induce un estado de alergia en el animal durante el cual la prueba no puede repetirse (Blasco y col. 1994b).

Estos inconvenientes podrían ser superados en parte mediante una prueba *in vitro* como la técnica de interferón gamma, basada de igual forma en la inmunidad celular y que ha demostrado una buena correlación con la prueba del *skin test* (Rothel y col., 1990; Weynants y col., 1995). Potencialmente, esta prueba permitiría además una evaluación simultánea de la respuesta inmune frente diversos gérmenes en circunstancias concretas pueden plantear problemas de especificidad en el diagnóstico (Weynants y col., 1995; Kittelberger y col., 1997). El trabajo de Durán-Ferrer y col. (2004) puso de manifiesto una buena sensibilidad de la técnica del interferón gamma para detectar la infección activa en un modelos de infección experimental de ovejas, aunque son necesarios estudios adicionales para evaluar la eficacia práctica de esta prueba en condiciones de campo.

La vacuna Rev.1

La administración de la vacuna Rev.1 se considera el medio de protección de mayor eficacia para el control de la infección brucelar en pequeños rumiantes. Entre otras ventajas destacamos su bajo coste, su facilidad de aplicación, la baja proporción de reacciones locales que induce y, además, su eficacia frente a la Épididimitis Contagiosa del Morueco causada por *B. ovis* (Blasco, 1997). La vacuna actúa atenuando al mínimo los ciclos de infección y disminuyendo los períodos de excreción y aborto. Previene de la infección parcialmente, y por tanto controla su difusión dentro del rebaño y a otras ganaderías. El contagio humano también se reduce drásticamente. Por consiguiente disminuyen las pérdidas económicas y sociales de la Brucelosis (Kolar, 1984; Comité de Expertos FAO/OMS en Brucelosis, 1986; Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal, 2001).

Además de proteger a un elevado porcentaje de animales de la explotación, reduce el tiempo durante el cual los animales infectados excretan gérmenes (Elberg, 1996). Crespo (1994) señala también la reducción de la duración e intensidad de la bacteriemia, el aumento de la fagocitosis en los linfonódulos, hígado y placenta y la producción de IgG que atravesando la barrera placentaria confieren inmunidad al feto.

Se trata de un preparado liofilizado de la cepa Rev.1 de *B. melitensis*, biovariedad 1 lisa: mutación viva, estable y no reversible (Alton, 1990), ajustada a una dosis de 1-2 x

10⁹ ufc/mililitro. Clásicamente, la vacuna se ha administrado a animales impúberes por vía subcutánea entre los 3 y 6 meses de edad (Comité de Expertos FAO/OMS en Brucelosis, 1986). La producción y distribución de la vacuna deben ser objeto de controles rutinarios para garantizar su pureza, identidad, viabilidad, tasa de disociación, virulencia residual, inmunogenicidad y eficacia en animales de experimentación (Alton y col., 1988; Garrido, 1992; Manual de la OIE, 2004b).

La vacuna presenta virulencia residual, y por tanto capacidad de permanencia y multiplicación en el hospedador, aunque en menor grado que la que exhiben las cepas de campo (Alton y Elberg, 1967). Esta misma diseminación limitada es la que confiere a la vacuna su eficacia, al inducir una intensa respuesta inmune en el hospedador y la formación de la «memoria inmunitaria» lo que permite reaccionar ante posteriores infecciones inducidas por el germen natural.

Pero a pesar de su indudable utilidad, la vacuna Rev.1 no cumple estrictamente los criterios clásicos de idoneidad de una vacuna ideal (Dubray, 1985) y sus efectos adversos han llevado a restringir su uso rutinario sólo en animales impúberes. Los efectos adversos más notorios son la inducción en el animal vacunado de anticuerpos indistinguibles - con las técnicas actuales - de los inducidos por la infección natural por cepas de campo (Crespo, 1994), en una intensidad mayor en los animales adultos, y que en ocasiones pueden persistir durante periodos más o menos largos de tiempo (Jones y col., 1964; Alton y Elberg, 1967; Fensterbank y col., 1982; 1985; Blasco y col., 1985; Nannini y col., 1991). Puede existir también patogenicidad residual. En el animal impúber puede aparecer fiebre e inapetencia a los diez días con una reacción local muy limitada sin ocasionar alteraciones testiculares (Barberán y Blasco, 2002). Dependiendo de la vía, la dosis y el momento de la gestación, la vacunación de hembras puede conducir a aborto (Jiménez de Bagüés y col., 1989; Zundel y col., 1992; Blasco, 1997).

El empleo de la vía alternativa de administración conjuntival ha demostrado un significativo descenso en la duración de la respuesta detectable por técnicas serológicas sin reducir la eficacia protectora (Fensterbank y col., 1985; Alton y col., 1984, Garín-Bastuji y col., 1998). Durán-Ferrer (1998) realizó un amplio estudio de la respuesta de ovejas adultas libres de infección a la vacunación con Rev.1 por vía conjuntival (dosis de 4,5 x 10⁸ u.f.c.), demostrando la intensidad de la respuesta inmunitaria a los 30 días y el descenso general de esta respuesta a los 90 días excepto para algunas técnicas serológicas como la ELISA indirecto.

El empleo de dosis reducidas confiere una inmunidad adecuada según Elberg (1981; 1996), aunque Zundel y col. (1992) y Blasco (1997) no hallan tal efectividad. Kolar (1987) considera un mínimo de 10^6 - 10^7 ufc para que la vacuna sea efectiva. El informe del Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal de la UE (2001) se detiene en esta cuestión.

Estrategias de control y erradicación

Encuesta epidemiológica previa

Blasco (1990) señala que el primer paso en el control de la enfermedad es conocer la extensión real del proceso. La unidad básica en la lucha debe ser una zona geográfica amplia cuyas características orográficas, climáticas e incluso socioeconómicas sean homogéneas. El estudio epidemiológico previo debe ir encaminado tanto a una estimación de la prevalencia como a determinar los factores y prácticas de riesgo para la propagación de la infección entre explotaciones y el mantenimiento en las ya infectadas. El grupo de expertos en Brucelosis de la *Task Force de la Unión Europea para el Seguimiento de los Programas Nacionales de Erradicación* (http://europa.eu.int/comm/food/animal/diseases/eradication/taskforce_en.htm) ha propuesto un modelo de encuesta epidemiológica que podría utilizarse como punto de partida.

Control y erradicación

La singular patogenia de la brucelosis y su complicado perfil epidemiológico hacen técnicamente imposible la erradicación sin que se haya alcanzado previamente un nivel eficaz de control de la infección en los rebaños.

Fase de control en situación de alta prevalencia. Si como resultado del estudio epidemiológico hallamos una prevalencia muy elevada en la zona, superior al 10 % de rebaños infectados, se debe optar por la vacunación masiva de todos los animales (con las correspondientes precauciones) como la medida más eficaz para controlar la infección, aún asumiendo la posible interferencia con las pruebas diagnósticas, incapaces de discriminar los anticuerpos vacunales de los propios de la infección y el riesgo de aborto en animales gestantes (Comité de Expertos FAO/OMS en Brucelosis, 1986; Garín-Bastuji y col., 1998). La vacunación masiva de todos los efectivos también está indicada en zonas con elevada incidencia en las personas o en áreas donde sea muy difícil el control de las explotaciones y el movimiento pecuario. Obviamente estas estrategias son incompatibles con la erradicación de la enfermedad.

Fase de control y erradicación en situación de prevalencia media. Las medidas expuestas anteriormente conducen a una disminución de casos tanto en los rebaños como en las personas (Elberg, 1981; 1996). Cuando la prevalencia en la zona es media, es decir entre el 5% y el 10% de los rebaños según Blasco (1990), se debe iniciar un programa de vacunación exclusivamente de la reposición, esto es: corderos entre tres y seis meses de edad incluidos los machos, para interferir lo menos posible con el posterior diagnóstico serológico. En estos casos, la muestra de suero debe obtenerse pasados 12 meses de la vacunación. Este esquema se aplica en nuestro país, en zonas donde la prevalencia en rebaños es superior al 2 %. Se analiza todo el ganado adulto anualmente (animales mayores de 18 meses), segregando mediante sacrificio obligatorio aquellos animales que resulten positivos. Las pruebas serológicas se repiten sobre los efectivos seronegativos todavía considerados como infectados hasta conseguir la total erradicación.

Fase de erradicación en situaciones de baja prevalencia. Según Crespo (1994) al cabo de 5 a 10 años tras una aplicación rigurosa de este esquema de trabajo, se podrá pasar a una última fase de erradicación en la que se podría dejar de vacunar. Aunque la posición técnicamente más conservadora sería desarrollar en la zona experiencias «piloto» para demostrar la viabilidad de la retirada de la vacuna en cada situación epidemiológica concreta (Garrido, 1992, Durán-Ferrer, 2001). La estrategia de diagnóstico y sacrificio es similar a la de la situación anterior. En España se aplica esta pauta en áreas cuya prevalencia en rebaños es inferior al 2 %.

La erradicación no implica relajar el control, sino que se establecerá un programa de vigilancia seroepidemiológica basado en el control de explotaciones y del movimientos pecuarios (Directiva 91/68/CEE). En caso de brotes aislados en zonas indemnes se puede optar por el sacrificio de toda la explotación y posterior período de desinfección y vaciado sanitario. Un país necesita el establecimiento de zonas indemnes que garanticen el suministro de animales de reposición a las zonas afectadas (Blasco, 1990).

Epílogo: Brucelosis, retos futuros

Aunque los avances en la lucha contra la enfermedad causada por *Brucella melitensis* han sido notorios en los países desarrollados, quedan aún grandes lagunas en el conocimiento de esta patología entre las que destacaríamos algunas.

El especial modo en que las Brucelas penetran y parasitan el interior celular es objeto de numerosos proyectos de investigación en todo el mundo. Son trabajos desligados del mundo estrictamente veterinario puesto que consideran esta infección como modelo

para dilucidar la dinámica parásito-hospedador de las infecciones intracelulares en general, estudiando los mecanismos de virulencia y patogenicidad desarrollados por el germen, y los de defensa por el hospedador. El conocimiento de las estrategias de supervivencia de *Brucella* permitirá por tanto combatir otras enfermedades humanas y animales.

El desarrollo de nuevas vacunas para el ganado ovino y caprino es premisa indispensable para poder extender los programas de control y erradicación a extensas áreas del planeta, que aún estando muy afectadas no disponen de los recursos necesarios para aplicar el esquema clásico en Europa de diagnóstico y sacrificio. Sería necesario además lograr una clara discriminación entre anticuerpos vacunales y los propios de la infección, que permitiera una certera clasificación de rebaños que aún estando libres de la enfermedad manifiestan ocaionalmente serología positiva. Estos rebaños de muy baja seroprevalencia son motivo de desánimo en los ganaderos y un peligro potencial evidente al inducir conductas de relajación en la vigilancia epidemiológica.

Desde el punto de vista estrictamente veterinario es inaplazable la amplia validación de las técnicas diagnósticas disponibles y las de nuevo desarrollo. En este sentido debemos señalar la necesidad de contrastar la información obtenida a partir de los diseños experimentales con los resultados obtenidos a partir de la infección natural. La compleja patogenia y epidemiología de esta enfermedad hacen que los estrictos controles propios de una infección de laboratorio limiten el amplísimo margen de posibilidades expresadas en la infección natural.

Por último, en el contexto de las campañas de saneamiento nos parece imprescindible mencionar la necesidad de incorporar de manera decidida herramientas que puedan complementar a la serología: la investigación epidemiológica y el diagnóstico directo, basado en los métodos bacteriológicos, y esperemos que pronto basado también en aquellos métodos emergentes de la genómica.

Referencias bibliográficas

- Acha, P.N., Szyfres, B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Volumen I. Bacteriosis y Micosis. Organización Panamericana de Salud - Organización Mundial de la Salud, Washington, DC. Pp: 28-56.
- Alton, G.G., 1985. The epidemiology of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. En: «*Brucella melitensis*» (Verger, J.M. y Plommet, M. Eds). Martinus Nijhoff publishers. Dordrecht. Pp : 187-196.
- Alton, G.G., 1990. *Brucella melitensis*. En: «Animal Brucellosis» (Nielsen, K., Duncan, R., eds.) CRC Press. Boston. Pp: 383-409.

- Alton, G.G., Elberg, S.S. 1967. Rev-1 *Brucella melitensis* vaccine. A review of ten years of study. The Veterinary Bulletin. 37:793-800.
- Alton, G.G., Fensterbank, R., Plommet, M., Verger, J.M. 1984. La brucelose de la chèvre. En: «Les maladies de la chèvre» (Ivoré, P. Y Perrin, P., eds). Institut National de la Recherche Agronomique. Paris.Pp : 69-92.
- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M., 1988. Techniques for the Brucellosis laboratory. INRA, París.
- Álvarez, L. 2004. Perfiles Inmunológicos de *Brucella melitensis*. Técnicas laboratoriales para el diagnóstico de la Brucelosis ovina. Universidad de Zaragoza. Tesis Doctoral.
- Barberan, M., Blasco, J.M.. 2002. Epidemiología, Patogenia y cuadro clínico. En: «Brucelosis ovina». Ovis. 82: 39-53.
- Bercovich, Z. 1985. Allergic test in goats experimentally infected with *B. melitensis*. In: Verger, J.M., Plommet, M. (Eds), *Brucella melitensis*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. Pp: 173-179.
- Biancifiore, F., Garrido, F., Nielsen, K., Mosca, T.I., Duran, M., Gall, D. 2000 Assessment of a monoclonal antibody-based competitive-enzyme linked immunosorbent assay (ELISAc) for diagnosis of Brucellosis in infected and Rev.1 vaccinated sheep and goats. Microbiologica. 23: 399-406 .
- Blasco, J.M. 1990. Control y Profilaxis. En: «Brucelosis ovina». Ovis. 8: 65-69.
- Blasco, J.M. 1997. A review of the use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine in adult sheep and goats. Preventive Veterinary Medicine. 31: 275-281.
- Blasco, J.M. 2002. Brucelosis ovina y caprina: diagnóstico inmunológico. Ovis. 82: 73-85.
- Blasco, J.M., Gamazo, C. 1994. Brucelosis animal. Investigación y Ciencia. Noviembre. Pp: 56-62.
- Blasco, J.M., Moriñón, I., Marín, C., Díaz, R., 1985. Evaluation of a Radial Immunodiffusion test for differentiating infected from Rev.1 vaccinated sheep. En: «*Brucella melitensis*» (Verger, J.M., Plommet, M., eds.) Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. Pp : 147-154.
- Blasco, J.M., Marín, C.M., Barberán, M., Moriñón, I., Ríaz, R. 1987. Immunization with *Brucella melitensis* Rev.1 against *Brucella ovis* infection of rams. Veterinary Microbiology. 14: 381-392.
- Blasco J.M., Garin-Bastuji B., Marin C.M., Gerbier G., Fanlo J., Jimenez De Bagues M.P. & Cau C. 1994a. Efficacy of different rose bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. The Veterinary Record. 134: 415-420.
- Blasco, J.M., Marín, C.M., Jiménez de Bagües, M.P., Barberán, M., Hernández, A., Molina, L., Velasco, J., Díaz, R., Moriñón I. 1994b. Evaluation of allergic and serological tests for the diagnosis of *Brucella melitensis* in sheep. Journal of Clinical Microbiology. 32: 1835-1840.
- Bosseray, N. 1984. Infection du placenta de la souris par *Brucella*. Pathogénie et immunité. Development of Biological Standards. 56: 283-292.
- Cloeckeaerta., Baucheron, S., Vizcaino, N., Zygmunt, M.S. 2001. Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 8: 772-775.
- Comité Expertos FAO/OMS en Brucelosis.1986. Serie de informes técnicos. 6º informe. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.

- Comité Científico de Sanidad y Bienestar Animal. 2001. Brucellosis in sheep and Goats (*Brucella melitensis*). Sanco.C.2/AH/R23/2001. European Commission. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scah/out59_en.pdf
- Corbel, M.J. 1997. Brucellosis: An overview. Emerging Infectious Diseases. 2: 213-221.
- Corbel, M.J. 1985a. Bacteriological procedures on diagnostics of *Brucella melitensis*. En: «*Brucella melitensis*» (Verger, J.M., Plommet, M. Eds.) Martinus Nijhoff Publishers. The Hague. Pp: 105-122.
- Corbel, M.J. 1985b. Recent advance in the study of *Brucella* antigens and their serological cross reactivity. Veterinary Bulletin. 55: 927-942.
- Corbel, M.J. 1989. Brucellosis: Epidemiology and Prevalence Worldwide. In: Young, E.J., Corbel, M.J. (Eds.), Brucellosis: clinical and laboratory aspects, CRC Press, Boca Raton. Pp: 25-40.
- Corbel, M.J., Morgan, W.J.B. 1984. Genus *Brucella*. En: «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology». Williams and Wilking Eds. Baltimore. London. IX Edit. 377-388.
- Crespo, F. 1985. Contribución al estudio de la etiología y la epidemiología de la Brucelosis en España. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. Madrid.
- Crespo, F. 1989. Brucelosis ovina y caprina: interés prioritario para la CEE. Medicina Veterinaria. 6: 307-312.
- Crespo, F. 1994. Brucelosis ovina y caprina. Oficina Internacional de Epizootias. París.
- Crespo, F., Rodríguez-Ferri, F., Cifuentes, D., Marsilla, B. 1986. Contribución al estudio de la Brucelosis en las regiones del Centro y Sur de España. Medicina Veterinaria. 3: 623-628.
- Davis, D.S., 1990. Role of wildlife in transmitting Brucellosis. En: «Advances in Brucellosis Research». Garry Adams. Ed. Texas A&M University Press. College Station. Pp: 373-385.
- Debbarh, H.S., Cloeckaert, A., Bezard, G., Dubray, G., Zygmunt, M.S. 1996a. Enzyme-linked immunosorbent assay with partially purified cytosoluble 28-kilodalton protein for serological differentiation between *Brucella melitensis*-infected and *B. melitensis* Rev.1-vaccinated sheep. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 3: 305-308.
- Debbarh, H.S., Zygmunt, M.S., Dubray, G., Cloeckaert, A., 1996b. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to the *Brucella melitensis* BP26 protein to evaluate antibody responses in infected and *B. melitensis* Rev.1 vaccinated sheep. Veterinary Microbiology. 53: 325-337.
- Delgado, S. 1993. Estudio seroepidemiológico de la infección brucelar en el ganado ovino. Evolución de los anticuerpos post-vacunación. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Delgado, S., Cármenes, P., Fernández, M. 1995a. Seroprevalence and lack of abortions after vaccination of Churra sheep with reduced dose of Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine by subcutaneous or conjunctival routes. Preventive Veterinary Medicine. 23: 153-161.
- Delgado, S., Fernández, M., Cármenes, P. 1995b. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of sheep infected and vaccinated with *Brucella melitensis*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 7: 206-209.
- Díaz-Aparicio, E., Aragón, V., Marín, C.M., Alonso, B., Font M., Moreno, E., Pérez, S., Blasco, J.M., Díaz, R., Moriyón, I. 1993. Comparative analysis of *Brucella* serotype A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides for serological diagnosis of Brucellosis in cattle, sheep and goats. Journal of Clinical Microbiology. 31: 3136-3141.

- Directiva del Consejo de la Unión Europea. 91/68/CEE sobre las condiciones de policía sanitaria aplicables al comercio intracomunitario de animales de la especie ovina y caprina (DOCE L 46, 19.2.1991).
- Dubray, G. 1985. Antigens of diagnosis significance in *Brucella*. En: «*Brucella melitensis*». (Verger, J.M., Plommet, M. Ed: Martinus Nijhoff. The Hague). Pp: 123-138.
- Durán Ferrer, M. 1998. Comparación entre métodos inmunológicos de diagnóstico de la Brucelosis ovina por *Brucella melitensis* y eficacia de la inmunización de ovejas adultas con la vacuna Rev-1 por vía conjuntival. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Durán Ferrer, M. 2001. La Brucelosis: itinerario científico y personal. Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinaria de Andalucía Oriental. 14: 201-220.
- Durán Ferrer, M., Mendoza, J., Osuna, A., Caporale, V., Lucas, A., León, L., Garrido, F. 2002. Evaluation of a new immunocapture test for the diagnosis of ovine brucellosis caused by *Brucella melitensis*. The Veterinary Record. 151: 629-635.
- Durán Ferrer, M., León, L., Nielsen, K., Caporale, V., Mendoza, J., Osuna, A., Perales, A., Smith, P., De-Frutos, C., Gómez-Martín, B., Lucas, A., Chico, R., Delgado, O.D., Escabias, J.C., Arrogante, L., Díaz-Parra, R., Garrido, F. 2004 Antibody response and antigen-specific gamma-interferon profiles of vaccinated and unvaccinated pregnant sheep experimentally infected with *Brucella melitensis*. 2004. Veterinary Microbiology. 100: 219-31.
- Elberg, S.S. 1981. Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. Part II. 1968-1980. Veterinary Bulletin. 51: 67-73.
- Elberg, S.S. 1984. Guide pour le diagnostique, le traitement et la prophylaxie de la brucellose humaine. WHO. 81-83.
- Elberg, S.S. 1996. Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. Part III.1981-1995. Veterinary Bulletin. 66: 1193-1200.
- Enright, F.M. 1990. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. En: «Animal Brucellosis» (Nielsen, K. Y Duncan, J.R. Eds). CRC Press. Boston. Pp: 301-320.
- Farina, R. 1985. Current serological methods in *B. melitensis* diagnosis. In: «*Brucella melitensis*». (Plommet, M., Verger, J.M., eds.), Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht. Pp: 139-146.
- Fensterbank, R. 1985. Allergic diagnosis of Brucellosis. In: Verger, J.M., Plommet, M. (Eds), *Brucella melitensis*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. Pp:167-171.
- Fensterbank, R. Pardon, P., Marly, J. 1982. Comparision between subcutaneous and conjuntival route of vaccination with Rev-1 strain against *Brucella melitensis* infection in ewes. Annales de Recherches Vétérinaires. 13: 295-301
- Fensterbank, R. Pardon, P., Marly, J. 1985. Vaccination of ewes by a single conjuntival administration of *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine. Annales de Recherches Vétérinaires. 16: 351-356.
- Fensterbank, R., 1987. Some aspects of experimental Bovine Brucellosis. Annales de Recherches Vétérinaires. 18: 421-428.
- Garin-Bastuji, B., Blasco, J.M., Grayon, M., Verger, J.M. 1998. *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. Veterinary Research. 29: 255-274.
- GARRIDO, F. 1992 Rev.1 and B-19 vaccine control in Spain. Observations on the handling and effectiveness of Rev.1 vaccine and the immune response. En: «Prevention of brucellosis in the Mediterranean countries». (Plommet, M. ed.). Pudoc Scientific Publishers. Wageningen. Pp: 223-231.

- Godfroid, J., Saegerman, C., Wellemans, V., Walravens, K., Letesson, J.J., Tibor, A., Macmillan, A., Spencer, S., Sanna, M., Bakker, D., Pouillot, R., Garin-Bastuji, B. 2002. How to substantiate eradication of Bovine Brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of Brucellosis testing. *Veterinary Microbiology*. 90: 461-477.
- Gorham, S.L., Enright, F.M., Snider, T.G., Roberts, E.D. 1986. Morphologic lesions in *Brucella abortus* infected ovine fetuses. *Veterinary Pathology*. 23: 331.
- Grilló, M.J., Barberán, M., Blasco, J.M., 1997. Transmission of *Brucella melitensis* from sheep to lambs. *The Veterinary Record*. 140: 602-605.
- Jacques, Y., Oliver-Bernardin, V., Dubray, G. 1998. Efficacy of ELISA compared to conventional tests (RBPT and CFT) for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Veterinary Microbiology*. 64, 61-73.
- Jizménez de Bagües, M.P., Marín, C.M., Barberán, M., Blasco, J.M., 1989. Responses of ewes to *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. *Annales de la Recherche Veterinaire*. 20: 205-212.
- Jizménez de Bagües, M.P., Marín, C.M., Blasco, J.M., Moriyón, I., Gamazo, C. 1992. An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival *B. melitensis* Rev.1 vaccination. *Veterinary Microbiology*. 30: 233-241.
- Jones, L.M., Entessar, F., Ardalan, A. 1964. Comparison of living vaccines in producing immunity against natural *Brucella melitensis* infection. *Journal of Comparative Pathology*. 74: 17-30.
- Jones, L.M., Díaz, R., Taylor, A.G. 1973. Characterization of allergens prepared from smooth and rough strains of *Brucella melitensis*. *British Journal of Experimental Pathology*. 54: 492-508.
- Kittelberger, R., Reichel, M.P., Joyce, M.A., Staak, C. 1997. Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9. III. Specificity of the in vitro antigen-specific gamma interferon test for bovine brucellosis in experimentally *Yersinia enterocolitica* O:9-infected cattle. *Veterinary Microbiology*. 57: 361-371.
- Keppies, J., Williams, A.E., Witt, K., Smith, H. 1965. The role of erythritol in the tissue localization of Brucellae. *British Journal of Experimental Pathology*. 46:104-108.
- Ko, J., Splitter, G.A. 2000. Residual virulence of *Brucella abortus* in the absence of the cytochrome bc₁ complex in a murine model in vitro and in vivo. *Microbial pathogenesis*. 29:191-200.
- Kolar, J. 1984. Diagnosis and control of Brucellosis in small ruminant. *Preventive Veterinary Medicine*. 2:215-225.
- Kolar, J. 1987. Control of *Brucella melitensis* Brucellosis in developing countries. II Forum de Microbiologie. *Brucella and Brucellosis: ácido nucleico update*. *Annales Institut Pasteur. Microbiologie*. 138: 122-126.
- Kusumawati, A., Cazevielle, CH., Porte, F., Bettache, S., Liautard, J-P., Widada, J.S. 2000. Early events and implication of F-actin and annexin I associated structures in the phagocytic uptake of *Brucella suis* by the J-774^a.1 murine cell line and human monocytes. *Microbial pathogenesis*. 28: 343-352.

- Letesson J.J., Tibor, A., Van Eynde, G., Wansard, V., Weynants, V., Denoel, P., Saman, E. 1997. Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 4: 556-564.
- Letesson, J.J., Lestrade, P., Delrue, R.M., Danase, I., Bellefontaine, F., Fretin, D., Taminiau, B., Tibor, A., Dricot, A., Deschamps, C., Haine, V., Leonard, S., Laurent, T., Mertens, P., Vandenhoute, J., de Bolle, X. 2002. Fun stories about *Brucella*: the «furtive nasty bug». *Veterinary Microbiology*. 90: 317-328.
- Mac Millan, A.P., 1990. Conventional serological tests. En: *Animal Brucellosis*. (Nielsen, K., Duncan, J.R., eds.) CRC Press Inc., Boca Raton. Pp: 153-198.
- Manual de la OIE. 2004a. Capítulo I.1.3. Principios de validación para las pruebas de diagnóstico en enfermedades infecciosas. En: «Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres» . París.
- Manual de la OIE. 2004b. Capítulo 2.4.2. Brucelosis caprina y ovina (no debida a *Brucella ovis*). En: «Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres». París.
- Manual de la OIE. 2004c. Capítulo I.1.6. Seguridad humana en los laboratorio veterinarios de microbiología. En «Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres» . París.
- Marín, C.M., 1998. Diagnóstico bacteriológico de la Brucelosis animal. Jornadas Internacionales de Brucelosis en Sanidad Humana y Animal. Santander.
- Marín, C.M., Alabart, J.L., Blasco, J.M. 1996a. Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *Brucella ovis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 426-428.
- Marín, C.M., Jiménez de Bagües, M.P., Barberán, M., Blasco, J.M. 1996b. Comparison of two selective media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. *Veterinary Record*. 138: 409-411.
- Marín, C.M., Moreno, E., Moriyón, I., Díaz, R., Blasco, J.M. 1999. Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assay, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis of Sheep Brucellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* . 6, 269-272.
- McGiven, J.A., Tucker, J.D., Perret, L.L., Stack, J.A., Brew, S.D., Mac Millan, A.P. 2003. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *Journal of Immunological Methods*. 278: 171-178.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2003. Plan de Control y Erradicación de la Brucelosis Ovina y Caprina presentado por el Reino de España.
- Moriyón, I. 1994. Características estructurales y antigénicas de *Brucella*. Jornadas Internacionales sobre Brucelosis. Actas. Madrid.

- Moriyón, I. 2001. Immunological diagnosis of Bovine Brucellosis. Seminario Avanzado de Brucellosis. Pamplona.
- Moriyón, I., Ulevitch, R. 1978. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. American Journal of Pathology. 93: 527:532.
- Nannini, D., Cerri, D., Giovannini, A., Morelli, D., Scacchia, M., Titarelli, M., Andreani, E., Caporale, V., Farina, R. 1991. Risposta anticorporale in ovini vaccinati per via sottocutanea con Rev.1. Veterinaria Italiana. 27: 4-12.
- Nannini, D., Giovannini, A., Titarelli, M., Giannatele, E., Semprini, P., Caporale, V., Cerri, D., Andreani, E., Farina, R. 1992. Valutazione della risposta anticorpale in pecore sperimentalmente infettate con *B. melitensis* biovariante 2. Veterinaria Italiana. 28: 4-10.
- Nicoletti, P. 1980. The epidemiology of Bovine Brucellosis. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. 24: 69-98.
- Nicoletti, P. 1986. Epidemiología, patogenia y cuadro clínico. En: «Brucellosis». Bovis. Marzo-Abril. Pp: 19-25.
- Nicoletti, P. 1989. Relationship between animal and human disease. En: «Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects» (Young, E.J y Corbel, M.J. Eds.) Boca Raton, CRC Press. Pp: 41-51
- Nicoletti, P. 2002. A short history of Brucellosis. Veterinary Microbiology. 90: 5-9.
- Nicoletti, P., Winter, A.J. 1990. The Immune Response to *B. abortus*. The Cell Mediated Response to Infections. In: Nielsen, K., Duncan, J.R. (Eds.), Animal Brucellosis, CRC Press, Boca Raton, pp. 83-95.
- Nielsen, K. 2002. Diagnosis of Brucellosis by serology. Vet. Microbiol. 90, 447-459.
- Nielsen K., Kelly L., Gall D., Nicoletti P. & Kelly W. 1995. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine Brucellosis. Veterinary Immunology and Immunopathology. 46: 285-291.
- Nielsen, K., Gall, D., Jolley, M., Leishman, G., Balsevicius, S., Smith, P., Nicoletti, P., Thomas. F. 1996a. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. Journal of Immunological Methods. 195: 161-168.
- Nielsen, K., Kelly, L., Gall, D., Balsevicius, S., Bosse, J., Nicoletti, P., Kelly, W. 1996b. Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of Bovine Brucellosis. Preventive Veterinary Medicine. 26: 17-32.
- Nielsen, K., Gall, D. 2001. Fluorescence Polarization Assay for the diagnosis of Brucellosis: a review. Journal of Immunoassay and Immunochemistry. 22: 183-201.
- Orduña-Domingo, A., Bratos-Pérez, M.A., Aabad-Fernández, R., Ruiz-García, L., De-Frutos-Serna, M., Rodríguez-Torres, A. 2001. La Brucellosis. Etiología y origen de la infección humana. In: Rodríguez-Torres, A., Orduña-Domingo, A. (Eds.), Manual de Brucellosis, Junta de Castilla y León, Zamora. Pp.: 13-20.
- Poulliot, R., Garin-Bastuji, B., Gerbier, G., Coche, Y., Cau, C., Dufour, B., Moutou, F. 1997. The brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine Brucellosis. Veterinary Research. 28: 365-374.

- Real Decreto 2611/1996, de 20 de Diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales (BOE de 21.12.1996). Véase modificaciones posteriores.
- Reglamento CE 535/2002 de la Comisión por el que se modifica el anexo C de la Directiva 64/432/CEE del Consejo y la Decisión 2000/330/CE (DOCE L80, 23.03.2002).
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox J.C., Wood. P.R., 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*. 67: 134-137.
- Saegerman, C., VO, T.-K.O., De Waele, L., Gilson, D., Bastin, A., Dubray, G., Flanagan, P., Limet, J.N., Letesson, J.-J., Godfroid, J. 1999. Diagnosis of Bovine Brucellosis by skin test: conditions for test and evaluation of its performance. *The Veterinary Record*. 145: 214-218.
- Sutherland, S.S., Searson, J. 1990. The Immune Response to *B. abortus*. The Humoral Response. In: Nielsen, K., Duncan, J.R. (Eds.), *Animal Brucellosis*, CRC Press, Boca Raton. Pp: 65-81.
- Tizard, I. 1998. *Inmunología Veterinaria*. 5ª edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México.
- Verger, J.M. 1985. *B. melitensis* infection in cattle. En: «*Brucella melitensis*» (Verger, J.M., Plommet, M. Eds.) Martinus Nijhoff Publishers. The Hague. Pp: 197-203.
- Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Grayon, M. 1985. *Brucella* a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 35: 292-295.
- Verger, J.M., Grayon, M., Zundel, E., Lechopier, P., Oliver-Bernardin, V. 1995. Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev.1 vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine*. 2: 191-196.
- Weynants, V., Godfroid, J., Limbourg, B., Saegerman, C., Letesson, J.J. 1995. Specific Bovine Brucellosis diagnosis based on in vitro antigen-specific gamma interferon production. *J.Clin.Microbiol*. 33: 706-712.
- Zarzuelo, E. 1978. Diagnóstico diferencial de los abortos animales con especial atención a los brucelares. En: «Recientes aportaciones veterinarias sobre Brucelosis». Ministerio de Agricultura. Madrid. Pp: 165-173.
- Zundel, E. Verger, J.M., Grayon, M., Michel, R. 1992. Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: safety and serological responses. *Annales de Recherches Vétérinaires*. 23: 177-188.
- Zygmunt, M.S., Cloeckaert, A., Dubray, G. 1994a. *Brucella melitensis* cell envelope protein and lipopolysaccharide epitopes involved in humoral responses of naturally and experimentally infected sheep. *Journal of Clinical Microbiology*. 32: 2514-2522.
- Zygmunt, M.S., Debarh, H.S.A.Cloeckaert, A., Dubray, G. 1994b. Antibody response to *Brucella melitensis* outer membrane antigens in naturally infected and Rev.1 vaccinated sheep. *Veterinary Microbiology*. 39: 33-46.