



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Evolución temporal de la epidemiología y erradicación de la brucelosis de los
rumiantes en España

Evolution over time of the epidemiology and eradication of brucellosis of
ruminants in Spain

Autor/es

Ana María Teberio Vélez

Director/es

Jesús García Sánchez

Facultad de Veterinaria

2020



ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	2
METODOLOGÍA	2
ETIOLOGÍA.....	3
EPIDEMIOLOGÍA	4
PATOGENIA	5
CUADRO CLÍNICO Y LESIONAL.....	5
DIAGNÓSTICO	6
Pruebas diagnósticas directas	6
Tinción.....	6
Cultivo, aislamiento e identificación.....	7
Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos	7
Pruebas diagnósticas indirectas de determinación de la inmunidad humoral.....	8
Pruebas con antígeno tamponado de <i>Brucella</i> (BBAT).....	8
Prueba de la fijación de complemento (CFT)	9
Enzimoimmunoanálisis (ELISA).....	9
Prueba de polarización de la fluorescencia (FPA)	10
Prueba de aglutinación en suero (SAT).....	11
Pruebas basadas en el hapteno nativo (HN) y en la proteína del citosol	11
Pruebas diagnósticas indirectas de determinación de la inmunidad celular.....	12
Prueba cutánea de la brucelina.....	12
Prueba de liberación de interferón gamma	13
PROFILAXIS.....	13
PROGRAMAS DE ERRADICACIÓN	15
Base legal y otra documentación oficial	15
Normativa Comunitaria	15
Normativa Nacional	16
Otra documentación oficial.....	17
Estrategias generales.....	18
Objetivos del programa nacional de erradicación	18



Población diana	18
Definición de caso positivo	19
Calificaciones sanitarias de brucelosis.....	19
Explotaciones de ganado bovino a controlar y frecuencia de chequeos.....	20
Explotaciones de ganado ovino y caprino a controlar y frecuencia de chequeos	21
Movimiento de animales	21
Pruebas diagnósticas	22
Actuaciones en caso de rebaños con animales con serología positiva	23
Notificación obligatoria de abortos e investigación de las explotaciones afectadas	23
Vacunación.....	24
Sacrificio de los animales positivos	24
Vaciado sanitario	25
Vigilancia de la fauna silvestre	25
Evolución y situación actual en España	25
CONCLUSIONES	32
CONCLUSIONS.....	32
VALORACIÓN PERSONAL	33
BIBLIOGRAFÍA.....	33

RESUMEN

La brucelosis es una de las enfermedades zoonóticas infecto-contagiosas más comunes con una elevada morbilidad. La gran difusión y repercusión epidemiológica en el mundo se debe a su potente capacidad de transmisión y propagación, derivando en cuantiosas pérdidas económicas tanto en producción ganadera como a nivel sanitario y empresarial, además de cursar con un riesgo significativo para la salud pública.

En el presente trabajo se realiza la descripción de la enfermedad, así como el estudio de la evolución epidemiológica en España a través del análisis de las prevalencias de rebaños de rumiantes y otros parámetros, evaluando de este modo la eficiencia de la aplicación de programas para el control y la erradicación de la brucelosis bovina, ovina y caprina.

ABSTRACT

Brucellosis is one of the most common infectious-contagious zoonotic diseases presenting a high morbidity. The high diffusion and epidemiological relevance in the world is due to its powerful transmission and propagation ability, leading to huge financial losses both in livestock production and at the health and business level, besides representing a significant risk to public health.

In this project the description of the disease as well as the study of the epidemiological evolution in Spain is made through the analysis of the prevalence of ruminant herds and other parameters, thus evaluating the efficiency of the application of programmes for the control and the eradication of bovine, ovine and caprine brucellosis.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infecciosa causada por especies del género *Brucella* spp. común a gran variedad de animales y al hombre con importantes consecuencias en la salud pública, grandes pérdidas económicas en las explotaciones pecuarias, y gran resistencia en el medio ambiente.

Las principales manifestaciones de la brucelosis son fallos reproductivos, y suelen dar lugar a abortos. La transmisión en el hombre se produce mediante el consumo de alimentos

contaminados fundamentalmente, y a través de la convivencia o exposición profesional con animales infectados (Fernández, 2011).

Las brucelosis del ganado bovino (*B. abortus*) y ovino y caprino (*B. melitensis*) figuran en la Lista de Enfermedades de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y son de obligada notificación (OIE, 2006).

Se trata de una enfermedad ampliamente distribuida por el mundo, siendo zonas endémicas los países mediterráneos, Oriente Medio, Latinoamérica y algunas regiones de Asia (Fernández, 2011). En la mayoría de los países afectados se han aplicado programas de medidas de control y erradicación de la enfermedad, que han supuesto un significativo retroceso de la brucelosis con amplias áreas libres en la actualidad. Algunos países del norte y centro de Europa, así como Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda han conseguido la erradicación total de *B. abortus* y *B. melitensis* en el ganado bovino. En cuanto al ganado ovino, América del Norte (excepto México), el norte y centro de Europa, el sudeste asiático, Australia y Nueva Zelanda se consideran libres del agente (OIE, 2020).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El trabajo tiene como objetivo principal el estudio de la evolución de la brucelosis en ganado bovino, ovino y caprino en España, analizando los parámetros epidemiológicos a lo largo del tiempo disponibles en la base de datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Junto con ello, justifica la repercusión positiva que ha tenido la implementación de los programas de control y erradicación puestos en práctica hasta la actualidad, responsables de un sostenido descenso de la incidencia de la enfermedad, estando cerca de lograr la erradicación.

METODOLOGÍA

El trabajo es una revisión bibliográfica, de modo que la metodología se ha basado en la búsqueda bibliográfica y documental en bases de datos como PubMed, perteneciente al National Center for Biotechnology Information, y Science Direct, entre otros. Las palabras clave utilizadas en la búsqueda han sido combinaciones booleanas “AND”, “OR” de “brucellosis”, “bovine/sheep/goat”, “eradication”, “epidemiology”, “diagnosis”... Se han revisado publicaciones de los últimos 15 años, aunque en algunos casos se han incluido trabajos anteriores por contener información relevante.

También se han empleado datos de organismos oficiales como el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

ETIOLOGÍA

Las especies del género *Brucella* spp. son cocobacilos intracelulares facultativos con baja variabilidad genética, inmóviles, no formadores de cápsulas, flagelos, ni esporas y Gram-negativos (Corbel y Morgan, 1982). Este género se clasifica dentro de la familia Brucellaceae, del orden Rhizobiales, de la clase α -proteobacteria y del filo Proteobacteria (Fitch, 2010).

Son bacterias catalasa positivas y generalmente oxidasa positivas con excepción de *B. ovis*, *B. neotomae* y algunas cepas de *B. abortus*, no producen fermentación de carbohidratos en medios convencionales salvo *B. neotomae*, no modifican la leche tornasolada ni la vuelven alcalina y no producen la licuefacción de la gelatina ni la lisis eritrocitaria (Beer, 1987).

Son bacterias aerobias estrictas, sin embargo *B. abortus* y *B. ovis* precisan de medios enriquecidos con CO₂ al 5-10% para su crecimiento (Corbel y Morgan, 1982).

Las especies de *Brucella* spp. poseen proteínas estructurales comunes solubles en ácido fenolacético y agua y producen patrones específicos del género en la electroforesis en disco. Las cepas lisas (LPS-S) y rugosas (LPS-R) poseen distintos antígenos de superficie, aunque algunos antígenos intracelulares son comunes a todas las cepas y específicos del género. *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae* se encuentran en la forma lisa mientras que *B. ovis* y *B. canis* en la rugosa (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis, 1986).

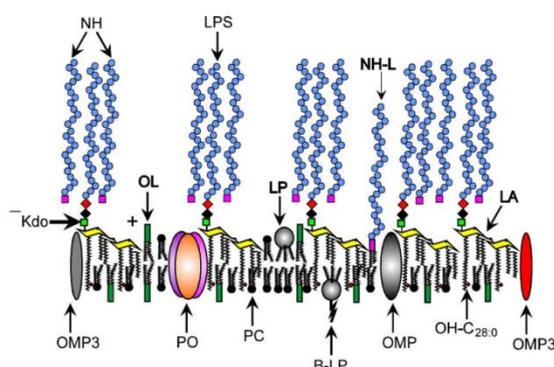


Figura 1: Membrana externa de *Brucella* spp. NH: Hapeno Nativo. OL: Lípido de Oritina. LPS: Lipopolisacárido. NH-L: Hapeno ligado. Kdo: Ácido 3, deoxi-D-mano-2 octulosónico. OMP 3: Proteínas de membrana externa tipo 3. PC: Fosfatidilcolina. LP: Lipoproteína. OH-C: Ácido graso saturado (Fernández, 2011).

Distinguimos las seis especies clásicas: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* y *B. neotomae*, que principalmente se diferencian por sus hospedadores preferentes y un conjunto de características antigénicas y fenotípicas. *B. melitensis* es una especie zoonótica con 3

biovariedades cuyo hospedador principal es el ganado ovino-caprino (raramente afecta a bovinos). *B. abortus* también es zoonótica, posee 7 biovariedades y su hospedador preferente es el ganado bovino (vaca, búfalo, bisonte). *B. suis* se encuentra en ganado porcino, liebre, reno y roedores, es zoonótica y tiene 4 biovariedades. *B. canis* causa zoonosis ocasionales, y el perro es su hospedador preferente. Por último, *B. ovis* y *B. neotomae* son especies no zoonóticas cuyos hospedadores son ovinos machos y roedores respectivamente. Aunque cada especie tiene un hospedador principal, la mayoría también son capaces de infectar a otras especies animales (OIE, 2018).

En la última década se han aislado cepas de *Brucella* spp. de mamíferos marinos que podrían clasificarse en dos nuevas especies: *B. cetaceae* y *B. pinnipediae*. También se han aislado *B. vulpis* y *B. papionis*, especies que pertenecen al grupo atípico de *Brucella* spp., y otras que se han aislado de ranas, peces y roedores, aumentando el tipo de hospedadores del género bacteriano (Vidal, Ortiz y Olivera, 2018).

La alta contagiosidad que caracteriza a este género bacteriano está relacionada con la gran resistencia en el medio ambiente, con unos tiempos de supervivencia de 2 a 3 meses en pastos y de 3 a 6 meses en purines. Las altas temperaturas de los tratamientos térmicos en la leche inactivan el microorganismo (Fernández, 2011).

EPIDEMIOLOGÍA

Los principales factores epidemiológicos condicionantes de la elevada prevalencia de la brucelosis son el amplio número de especies de hospedadores a los que afecta *Brucella* spp., las reacciones cruzadas en el ganado bovino con *B. melitensis* y *B. suis* y la actuación de animales salvajes como reservorio (el cerdo salvaje, el bisonte y la liebre europea), los cuales dificultan su control y erradicación (OIE, 2020).

Entre los factores de riesgo destacables se encuentran la mayor susceptibilidad de los individuos sexualmente maduros, las infecciones latentes que manifiestan los jóvenes cuando alcanzan la madurez sexual, el estado de gestación, debido a la gran diseminación de bacterias en los abortos, la alta carga ganadera y el uso común de pastos en sistemas extensivos (Fernández, 2011).

PATOGENIA

La brucelosis puede presentarse de forma latente, aguda o crónica, y es frecuente que las infecciones inaparentes causen una infección persistente con diseminación de gran cantidad de bacterias en secreciones reproductivas (resistentes varios meses en condiciones de frío y humedad) y mamarias, siendo la ingestión de estas la principal fuente de infección entre animales (Nielsen, 1990; OIE, 2004).

Las bacterias que ingresan en el organismo llegan por la vía linfática a los linfonodos de entrada. A continuación se diseminan por la linfa en el caso de los rumiantes y el torrente sanguíneo en otras especies hasta llegar al útero grávido, testículos, linfonodos, articulaciones, etc. Se localizan en los órganos reproductores tanto del macho como de la hembra, siendo la placenta el órgano diana predilecto debido a la afinidad de la bacteria por el eritritol, un compuesto natural del útero. La mayoría de animales son infectados persistentes con reactivación y eliminación bacteriana en la gestación, aunque en algunos casos se da la curación clínica y bacteriológica (Blasco, 2004).

CUADRO CLÍNICO Y LESIONAL

La brucelosis es una enfermedad que no presenta lesiones de carácter patognomónico. Las principales manifestaciones son fallos reproductivos caracterizados por placentitis necrótica y metritis purulenta con exudado hemorrágico en carúnculas y endometrio de hembras (Coelho et al., 2014). Estas lesiones generalmente dan lugar a abortos, sin embargo las siguientes gestaciones suelen llegar a término, aunque reaparece la infección uterina y mamaria (Nielsen, 1990). En los machos produce cambios testiculares palpables, epididimitis y orquitis necrosante, vesiculitis seminal necrótica y prostatitis con una frecuente esterilidad.

Los animales infectados pueden desarrollar lesiones inflamatorias granulomatosas, en gran parte localizadas en tejido linfático, nódulos linfáticos de la ubre, útero, articulaciones y membranas sinoviales.



Figura 2: Aborto producido por *B. melitensis* en oveja (Muñoz y Blasco, 2016).



Figura 3: Cotiledones hemorrágicos de placenta de vaca, producido por *B. abortus* (The Center for Food Security and Animal Health, 2006).



Figura 4: Epididimitis producida por *B. ovis* en morueco (SAG, 2016).

En cuanto al cuadro lesional de los fetos abortados, destacan las bronconeumonías catarral y fibrinopurulenta, con un infiltrado alveolar difuso, infiltración intersticial, edema interlobular y pleural, y congestión vascular. También se observa hiperplasia reticuloendotelial difusa y multifocal esplénica, y de forma ocasional, los abortos pueden tener una coloración amarillenta así como presentar hemorragias en las cavidades internas (Coelho, 2014). También puede originar artritis o poliartrosis aunque es menos frecuente.

DIAGNÓSTICO

Uno de los obstáculos para la completa erradicación de la brucelosis es el adecuado diagnóstico, de hecho, a día de hoy no hay una prueba específica para identificar *Brucella* spp. (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis, 1986). El diagnóstico definitivo se realiza mediante el aislamiento e identificación bacteriológica con pruebas de laboratorio directas o a través de las respuestas de inmunidad humoral y celular específicas con pruebas indirectas (OIE, 2018).

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DIRECTAS

Para la identificación del agente se combinan una serie de métodos basados en características bacteriológicas, moleculares, serológicas y de crecimiento (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis, 1986).

Tinción

Tras la realización de frotis de órganos o de líquidos biológicos se realizan técnicas de identificación de *Brucella* spp. como el método de Ziehl-Neelsen modificado por Stamp, la tinción Gram, o una técnica basada en anticuerpos marcados con peroxidasa o conjugados a un

fluorocromo (OIE, 2018). Estas técnicas tienen una baja sensibilidad y especificidad, por lo que se utilizan como diagnóstico presuntivo (Fernández, 2011).

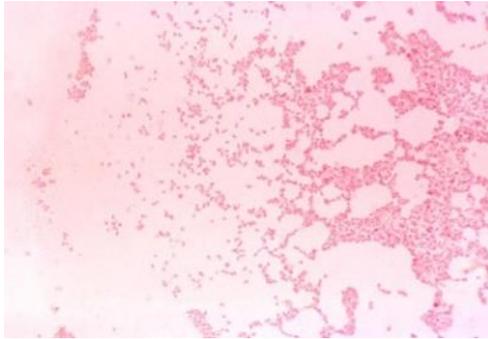


Figura 5: Tinción Gram de *B. melitensis* (Sabaleta, 2010).

Cultivo, aislamiento e identificación

El aislamiento bacteriológico sobre un medio de cultivo es la prueba de diagnóstico más específica, y permite determinar la especie o biovariedad de *Brucella* spp. utilizando medios selectivos adecuados y muestras correctas, sin embargo es un procedimiento lento (OIE, 2018).

Las muestras tomadas con hisopos más recomendables son de secreciones vaginales, fetos abortados, membranas fetales, leche, semen y líquidos de las artritis o de los higromas. En el caso de las canales animales, se toman muestras de ganglios linfáticos de la cabeza, mamarios y genitales, bazo, útero y ubres (OIE, 2018).

El cultivo en agar sangre se realiza en una atmósfera con un 10% de CO₂ en medios selectivos de Farrell modificado, Thayer Martin modificado y CITA (De Miguel et al., 2011).

Otras pruebas basadas en las propiedades de crecimiento, son las pruebas de oxidasa y ureasa y la prueba de la aglutinación en porta con un suero policlonal anti-*Brucella*, además de pruebas elaboradas como la lisis por fagos y la aglutinación con sueros monoespecíficos. En función de las características de crecimiento también pueden identificarse las cepas vacunales *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev.1 (OIE, 2018).

Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos

Las pruebas moleculares constituyen la identificación de especies y tipificación de cepas de *Brucella* spp. además de la diferenciación de las cepas vacunales, basada en secuencias específicas del genoma. A pesar de una alta sensibilidad y especificidad, siguen siendo menores que las de la bacteriología clásica, y se han validado poco para el diagnóstico primario (OIE, 2018).

Generalmente se utilizan ensayos diferenciales basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), diferenciando varias técnicas como PCR combinatoria, PCR en tiempo real o PCR múltiple. Son pruebas rápidas, simples, altamente reproducibles y se adaptan fácilmente a demandas de alto volumen, que utilizan muestras de tejidos fetales, secreciones nasales, semen y leche (Bricker, 2002).

Los resultados de estas técnicas pueden verse alterados a causa de una contaminación cruzada en la toma de muestras, debido a la alta sensibilidad de la técnica (Fernández, 2011).

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS INDIRECTAS DE DETERMINACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL

Para el diagnóstico de un gran colectivo de animales se utilizan pruebas indirectas basadas en la detección de una respuesta inmune humoral frente a antígenos específicos de *Brucella* spp., por su elevada sensibilidad y especificidad y la facilidad para procesar un gran número de muestras en un corto plazo de tiempo (Fernández, 2011).

Este género bacteriano tiene una compleja estructura antigénica, siendo los antígenos más significativos el lipopolisacárido (LPS), el hapteno nativo (HN) y las proteínas citoplasmáticas y de membrana externa (Blasco, 2004). La estimulación y evolución de la respuesta inmune depende de si la infección cursa hacia la curación o hacia la cronicidad, de la presencia o no de reinfecciones, de la existencia o no de la vacunación y de la inducción reacciones serológicas positivas falsas (FPSR) por varias bacterias Gram negativas como *Yersinia enterocolitica* O:9 (OIE, 2018).

La cepa Weybridge 99 (S99) o la cepa USDA 1119-3 (S1119-3) de *B. abortus* son las que se utilizan como productoras de antígeno para las pruebas de detección de infecciones por especies lisas de *Brucella* spp. Estas cepas junto con la cepa 16M de *B. melitensis*, también pueden utilizarse como fuente de extractos de antígeno soluble (LPS-S) o bien la cadena O del LPS-S (OIE, 2018).

Para el diagnóstico indirecto de la brucelosis se recomienda una primera técnica de cribado muy sensible que detecte la mayor proporción posible de animales con anticuerpos frente a *Brucella* spp., seguida de una segunda muy específica que confirme sólo los verdaderamente infectados (Blasco, 2004).

Pruebas con antígeno tamponado de *Brucella* (BBAT)

Dentro de las BBAT, está la prueba del rosa de Bengala (RBT) y la prueba de aglutinación en placa con antígeno tamponado (BPAT). La RBT utiliza un antígeno a partir células muertas de *B. abortus* S99 o S1119-3 coloreado con rosa de Bengala, mientras que la BPAT se prepara a partir de la cepa S1119-3 de *B. abortus* y se tiñe de color azul-verdoso. Ambos antígenos se preparan a un pH de

3,6-3,7. Este bajo pH permite la acidificación del antígeno, previniendo reacciones inespecíficas debido a las IgM, y obteniendo reacciones debidas en gran parte a las IgG1. Ambas pruebas son adecuadas para detectar rebaños infectados o para garantizar la ausencia de infección en rebaños o manadas libres de brucelosis, sin embargo, pueden producirse falsos negativos, generalmente por fenómenos de prozona. Además, son pruebas muy sensibles, pudiendo originar una reacción positiva frente a animales vacunados con la cepa S19 de *B. abortus* o por FPSR (Fernández, 2011; Nielsen, 2002; OIE, 2018).

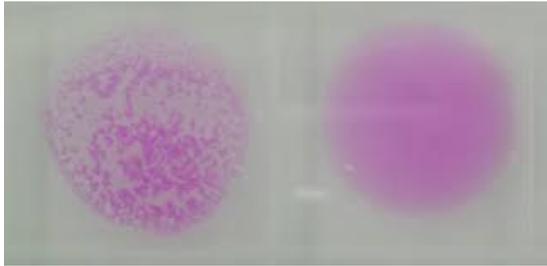


Figura 6: RBT positiva (izquierda) y negativa (derecha) en el diagnóstico de *Brucella* spp. (Ortiz y Acosta, 2013).

Prueba de la fijación de complemento (CFT)

La CFT se utiliza como prueba de confirmación debido a su elevada especificidad. Es una técnica larga, compleja y de difícil ejecución, siendo de especial importancia la adecuada conservación de los reactivos. Detecta isotipos IgM e IgG que al reaccionar con el antígeno preparado de la cepa S99 o S1119-3 de *B. abortus* activan el complemento. La reacción se evidencia mediante la participación de los eritrocitos de oveja incluidos en el complejo hemolítico. Esta prueba puede obtener falsos positivos fruto de la vacunación con *B. abortus* S19 o con *B. melitensis* Rev.1, y falsos negativos debidos a fenómenos de prozona (Fernández, 2011).

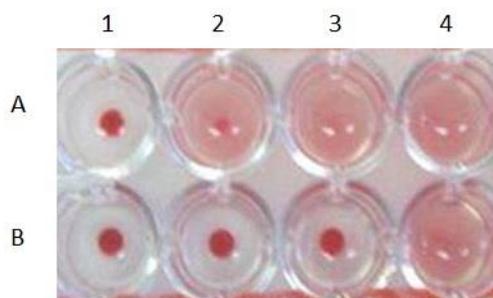


Figura 7: CFT positiva (B1) y negativa (B4) en el diagnóstico de *Brucella* spp. (Aldave, 2015).

Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Se utilizan dos tipos de ELISAs para el diagnóstico de la brucelosis, el indirecto (I-ELISA) y el de competición (C-ELISA), que se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a *Brucella* spp., teniendo una menor especificidad y mayor sensibilidad el primero respecto al segundo. Mientras que el I-ELISA detecta IgG, el C-ELISA detecta IgM, IgG e IgA (Fernández, 2011).

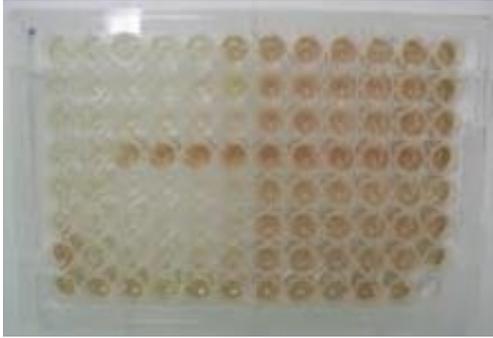


Figura 8: ELISA en el diagnóstico de *Brucella* spp. (Ortiz y Acosta, 2013).

La mayoría de I-ELISA utiliza células enteras, LPS-S o la cadena O del LPS preparadas a partir de las cepas S99 o S1119-3 de *B. abortus* o la M16 de *B. melitensis* (OIE, 2018). El I-ELISA es muy sensible para la detección de anticuerpos específicos, pero no diferencia los anticuerpos originados por la vacunación con S19 de *B. abortus* o con Rev.1 de *B. melitensis*. Además, la vacuna RB51 de *B. abortus* también podría interferir con los I-ELISA que usan LPS-S (OIE, 2018).

También hay un I-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Brucella* en leche, pudiendo utilizar también la prueba del anillo en leche (MRT) en bovinos. Si el análisis de la leche de los tanques da positivo, se continuaría con serologías de los animales (OIE, 2018).

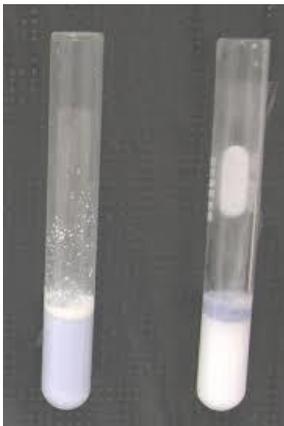


Figura 9: MRT negativo (izquierda) y positivo (derecha) para el diagnóstico de *Brucella* spp. (Ortiz y Acosta, 2013).

La principal diferencia del C-ELISA frente al I-ELISA consiste en que en el primero los anticuerpos presentes en el suero deben competir con un anticuerpo monoclonal (MAb) frente a un epítipo de la cadena O del LPS de *Brucella* spp. (OIE, 2018).

Prueba de polarización de la fluorescencia (FPA)

La FPA es una técnica homogénea, rápida y sencilla. El antígeno empleado es un fragmento de la cadena O del LPS-S de la cepa 1119-3 de *B. abortus* marcado con isotiocianato de fluoresceína (Nielsen et al., 1996).

La sensibilidad y la especificidad diagnóstica de esta prueba para la brucelosis bovina son casi idénticas a las del C-ELISA. Las reacciones positivas de la FPA deben comprobarse mediante sistemas que lo confirmen, aunque la prueba permite reducir las reacciones a anticuerpos residuales producidos tras la vacunación (OIE, 2018).

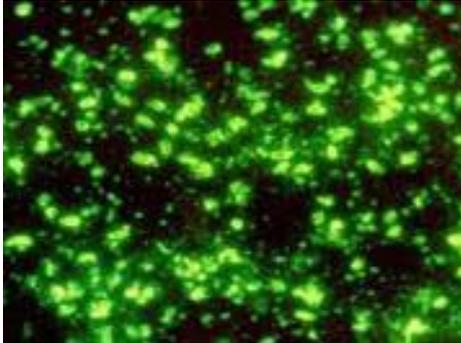


Figura 10: FPA positiva en el diagnóstico de *Brucella* spp. (Aldave, 2015).

Prueba de aglutinación en suero (SAT)

La SAT no está reconocida como prueba prescrita, pero se ha utilizado en programas de vigilancia de brucelosis bovina. El antígeno es una suspensión bacteriana de la cepa 99 o la cepa 1119-3 de *B. abortus* en solución salina fenolada pudiendo añadir EDTA para una mayor especificidad. El grado de aglutinación de *Brucella* spp. en el suero es positivo si tiene 30 UI/ml o más (OIE, 2018).



Figura 11: SAT para el diagnóstico de *Brucella* spp. (Cárdenas y Herrera, 2012).

Pruebas basadas en el hapteno nativo (HN) y en la proteína del citosol

Las pruebas basadas en el HN son pruebas de precipitación que tienen una gran especificidad en cuanto a la vacunación con la cepa S19 de *B. abortus* (Muñoz et al., 2005). La sensibilidad óptima se consigue en un sistema de inmunodifusión radial inversa (IDR), que utiliza como antígenos el HN y el polisacárido B. Por otro lado, la prueba de la doble difusión en gel (DDG) utiliza el HN y el LPS-S como antígenos, y es capaz de diferenciar sueros de animales con infección activa (Fernández, 2011). Las pruebas de precipitación en gel en las que se usa HN o proteínas del citosol de *Brucella* spp. suelen dar resultados negativos en los casos de reacciones FPSR causadas por *Yersinia enterocolitica* O:9 y las FPSR de origen desconocido en ganado bovino (Muñoz et al., 2005).



Figura 12: IDR, precipitación en gel con proteínas citosólicas (Blasco, 2011).

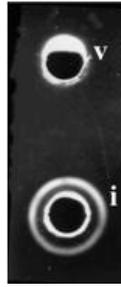


Figura 13: IDR, precipitación en gel con HN (Blasco, 2011).

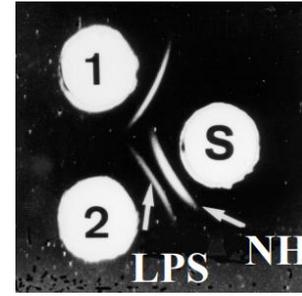


Figura 14: DDG, precipitación en gel con HN. Infectados (I) dan una doble banda de precipitación, vacunados (V) dan una banda de precipitación (Blasco, 2011).

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS INDIRECTAS DE DETERMINACIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR

Prueba cutánea de la brucelina

La prueba cutánea de la brucelina consiste en la inoculación intradérmica de una preparación de antígenos desprovistos de LPS-S estandarizada que pone de manifiesto reacciones de hipersensibilidad retardada *in vivo*, pudiendo utilizarse para el cribado en rebaños no vacunados (Fernández, 2011).

En ausencia de vacunación esta prueba tiene una especificidad muy alta, por lo que se considerarán infectados aquellos animales sin vacunar seronegativos que reaccionen positivamente. También cuenta con una alta sensibilidad para el diagnóstico de la infección por *B. melitensis* en ganado ovino y caprino. Se obtienen falsos positivos durante años en animales vacunados con la cepa Rev.1 de *B. melitensis* o con las cepas S19 o RB51 de *B. abortus* (De Massis et al., 2005; Pouillot et al., 1997).



Figura 15: Prueba cutánea con brucelina (Blasco, 2011).

Prueba de liberación de interferón gamma

La estimulación linfocitaria en sangre entera con el antígeno brucelina produce la liberación de interferón gamma (IFN- γ) cuya producción se detecta mediante un ELISA de captura. Aún no existe ningún protocolo validado para esta prueba, pero podría ser útil para discriminar entre infectados y falsos positivos serológicos (OIE, 2018).

PROFILAXIS

La profilaxis sanitaria se fundamenta en la aplicación de programas de erradicación basados en la detección de animales infectados y su sacrificio, además de la verificación de lesiones características y la toma de muestras para la identificación del agente. Para erradicar la enfermedad es imprescindible el registro de la explotación, la identificación animal individual, el control de movimientos animales, los métodos de diagnóstico, un sistema de almacenamiento de datos, los servicios laboratoriales, la clasificación sanitaria de los rebaños y la política de vacunación o sacrificio de animales positivos (Coelho et al., 2014; Minas, 2006).

Entre las medidas preventivas destacan el aislamiento de las hembras en la época de partos, la correcta limpieza y desinfección de las instalaciones y medios de transporte, y asegurar una adecuada higiene personal de los trabajadores de la explotación para evitar la diseminación de la bacteria (Coelho et al., 2014).

Una de las principales herramientas de la profilaxis de la brucelosis es la implementación de un programa vacunal junto con el diagnóstico serológico para controlar la difusión de la enfermedad, basado en la vacunación sistemática, indiscriminada y repetida en el tiempo de todos los animales de reposición de una determinada zona (Blasco, 2004). Se utilizan vacunas vivas atenuadas obtenidas a partir de cepas lisas, *B. abortus* B19 y *B. melitensis* Rev.1, en terneras de entre 3 y 6 meses y corderas y cabritas de entre 3 y 5 meses respectivamente, aunque también se pueden administrar a animales adultos en zonas de elevada prevalencia y escasos recursos para el control de la enfermedad (Blasco, 2004). La administración por vía subcutánea (SC) de estas vacunas ofrece una persistencia en los animales de entre 2 y 3 meses asegurando una buena capacidad inmunógena, y por contra, una intensa y duradera respuesta serológica en las pruebas diagnósticas impidiendo la diferenciación entre animales vacunados e infectados, por lo que no se recomienda su uso en programas de erradicación combinados (Blasco, 2004; Estein, 2006; OIE, 2018).

En cuanto a la administración, la *B. abortus* B19 se inocula a una dosis única por vía subcutánea (SC) de $5-8 \times 10^{10}$ microorganismos viables en terneras de reposición. En ganado adulto se administra una dosis reducida de entre 3×10^8 a 3×10^9 microorganismos, aunque algunos animales generan títulos persistentes de anticuerpos y pueden abortar y excretar la cepa vacunal por la leche. Como alternativa, el uso de la vía conjuntival a cualquier edad a una dosis de 5×10^9 microorganismos induce una buena inmunidad frente a *B. abortus* y *B. melitensis* y una respuesta serológica de corta duración, pudiendo revacunar a los animales (OIE, 2018).

En el caso de los pequeños rumiantes, independientemente de la vía de inoculación, la dosis estándar es de entre $0,5 \times 10^9$ y 2×10^9 microorganismos viables de *B. melitensis* Rev.1. La vacunación SC con Rev.1 puede causar aborto y excreción de la cepa en leche si los animales se vacunan durante la gestación. Sin embargo, la aplicación por vía conjuntival a la misma dosis en animales no gestantes o al final de la época de partos y antes de la siguiente monta reduce estos efectos secundarios, y confiere una protección similar con una respuesta de anticuerpos de corta duración, facilitando la aplicación de programas de erradicación combinados (OIE, 2018).

La vacuna RB51 de *B. abortus*, una alternativa a la B19 para la prevención de la brucelosis en ganado bovino, se trata de una cepa rugosa carente de LPS-S, por lo que no induce reacciones cruzadas con las pruebas de diagnóstico que se utilizan en las campañas de erradicación, aunque puede que lo haga con otras como I-ELISA. La protección de la RB51 en ganado bovino depende de la vía de administración, la dosis, la edad y la prevalencia de la enfermedad en la explotación (Estein, 2006). La administración de dosis completas de esta vacuna por vía intravenosa induce placentitis e infecciones placentarias en gran parte del ganado vacuno, además de excretarse con la leche en la mayoría de los animales. La administración en vacas gestantes produce abortos y mortinatos, aunque el uso de dosis reducidas (1×10^9 unidades formadoras de colonia) en vacas gestantes elimina los efectos secundarios, aunque se sigue excretando la cepa vacunal. Sin embargo, esta dosis no ofrece protección frente a la infección cuando se utiliza en terneros, y una protección moderada en el caso del ganado adulto (OIE, 2018).

PROGRAMAS DE ERRADICACIÓN

BASE LEGAL Y OTRA DOCUMENTACIÓN OFICIAL

El marco reglamentario de la lucha contra la brucelosis es amplio y debe tener en cuenta la normativa autonómica, nacional, comunitaria e internacional, siendo bastante extensa la aplicable en el seno de la Unión Europea.

Normativa Comunitaria

- Decisión 90/638/CEE, del Consejo, que establece los criterios comunitarios aplicables a las medidas de erradicación y vigilancia de determinadas enfermedades de los animales.
- Decisión 90/242/CEE, del Consejo, de 21 de mayo de 1990, por la que se establece una acción financiera comunitaria para la erradicación de la brucelosis en los ovinos y caprinos.
- Decisión de Ejecución (UE) 2016/969 de la Comisión, de 15 de junio de 2016, por la que se establecen los requisitos estándar que deben cumplir los informes sobre los programas nacionales de erradicación, control y vigilancia de determinadas enfermedades animales y zoonosis cofinanciados por la Unión y por la que se deroga la Decisión de Ejecución 2014/288/UE.
- Directiva del Consejo 64/432/CEE, de 26 de junio de 1964, y sus modificaciones, relativa a problemas de policía sanitaria en materia de intercambios intracomunitarios de animales de las especies bovina y porcina, la cual establece las pautas generales de actuación en los intercambios intracomunitarios de los animales de reproducción, producción o abasto de dichas especies. Asigna calificaciones sanitarias a las explotaciones y regula las pruebas oficiales autorizadas y el intervalo entre pruebas para obtener la calificación.
- Directiva del Consejo 391/77/CEE, de 17 de mayo de 1977, por la que se establece una acción de la Comunidad para la erradicación de la brucelosis, de la tuberculosis y de la leucosis de los bovinos.
- Directiva 78/52/CEE, de 13 de Diciembre de 1977, por la que se establecen los criterios comunitarios aplicables a los planes nacionales de erradicación acelerada de la brucelosis, de la tuberculosis y la leucosis enzoótica de los bovinos.
- Directiva 91/68/CEE, relativa a las normas de policía sanitaria que regulan los intercambios intracomunitarios de animales de las especies ovina y caprina, establece las condiciones sanitarias para el comercio intracomunitario y para la calificación sanitaria de las explotaciones o países miembros, en relación a la brucelosis ovina y caprina.

- Reglamento (CE) Nº 853/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.
- Reglamento (CE) 854/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de los controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano.
- Reglamento (UE) 2017/625, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios.
- Reglamento (CE) No 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano y por el que se deroga el Reglamento (CE) no 1774/2002 (Reglamento sobre subproductos animales).
- Reglamento (CE) nº 1099/2009 del Consejo de 24 de septiembre de 2009, relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza.

Normativa Nacional

- Ley 8/2003 de 24 de abril, de sanidad animal.
- Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, y sus modificaciones, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales.
- Real Decreto 1082/2009, de 3 de julio, por el que se establecen los requisitos de sanidad animal para el movimiento de animales de explotaciones cinegéticas, de acuicultura continental y de núcleos zoológicos, así como de animales de fauna silvestre.
- Real Decreto 685/2013, de 16 de septiembre, por el que se establece un sistema de identificación y registro de los animales de las especies ovina y caprina.
- Real Decreto 479/2004, de 26 de marzo, por el que se establece y regula el Registro general de explotaciones ganaderas.
- Real Decreto 728/2007, de 13 de junio, por el que se establece y regula el Registro general de movimientos de ganado y el Registro general de identificación individual de animales.
- Real Decreto 37/2014, de 24 de enero, por el que se regulan aspectos relativos a la protección de los animales en el momento de la matanza.
- Real Decreto 389/2011, de 18 de marzo, y modificaciones, por el que se establecen los baremos de indemnización por el sacrificio de animales en el marco de los programas

nacionales de lucha, control o erradicación de la tuberculosis bovina, brucelosis bovina, brucelosis ovina y caprina, lengua azul y encefalopatías espongiiformes transmisibles.

- Real Decreto 1440/2001, de 21 de diciembre, por el que se establece el sistema de alerta sanitaria veterinaria.
- Real Decreto 361/2009, de 20 de marzo, por el que se regula la información sobre la cadena alimentaria que debe acompañar a los animales destinados a sacrificio.
- Real Decreto 1716/2000, de 13 de octubre, y sus modificaciones, sobre normas sanitarias para el intercambio intracomunitario de animales de las especies bovina y porcina, que incorpora al ordenamiento jurídico nacional de la Directiva 64/432/CEE, recoge en su anexo I la obtención, mantenimiento, suspensión y recuperación de las calificaciones sanitarias B3 y B4, así como los requisitos para el reconocimiento de regiones y países oficialmente indemnes de la enfermedad.
- Real Decreto 1941/2004, de 27 de septiembre, por el que se establecen las normas de policía sanitaria que regulan los intercambios intracomunitarios y las importaciones de terceros países de animales de las especies ovina y caprina.
- Real Decreto 526/2014, de 20 de junio, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

Otra documentación oficial

- Programa Nacional de Erradicación de la Brucelosis bovina presentado por España para confinación 2020. MAPA.
- Programa Nacional de Erradicación de la Brucelosis ovina y caprina (*B. melitensis*) presentado para su confinación 2019-2020. Versión 2020. MAPA.
- Encuesta epidemiológica para investigación de sospecha o confirmación de brotes de tuberculosis bovina, brucelosis bovina y brucelosis ovina y caprina. MAPA.
- Manual de toma de muestras para el diagnóstico etiológico de brucelosis por métodos bacteriológicos. MAPA.
- Protocolo de seguimiento en casos de sueros sospechosos (SCSS) en áreas libres de enfermedad.
- Guías de prácticas correctas de higiene: Ovino de carne, Ovino de leche y Caprino de carne y leche. MAPA.

ESTRATEGIAS GENERALES

Los programas de erradicación de la brucelosis se basan en la realización de pruebas de detección de animales positivos y el sacrificio obligatorio de los mismos, estando prohibido el tratamiento y la vacunación de los animales, salvo en determinadas excepciones autorizadas y controladas oficialmente en el caso del ganado bovino. Si se confirma la infección en un rebaño bovino, las explotaciones contiguas y las epidemiológicamente relacionadas a la confirmada se someterán a una prueba de diagnóstico adicional, salvo que por sus medidas de seguridad se descarte la posibilidad de infección; si se descarta la infección, el rebaño recupera su calificación, y si se confirma, se realiza el vaciado sanitario. En los rebaños ovinos y caprinos se realiza el vaciado sanitario en los casos en los que no se confirme o no pueda descartarse la infección (OIE, 2018).

OBJETIVOS DEL PROGRAMA NACIONAL DE ERRADICACIÓN

El objetivo final del programa de control y erradicación de la brucelosis de España es la declaración de regiones o provincias oficialmente indemnes, con un 99,8% o más de rebaños calificados como oficialmente libres de brucelosis durante 5 años consecutivos y la ausencia de aislamientos y abortos por *B. abortus* y *B. melitensis* durante al menos 3 años, además de la prohibición de la vacunación durante 3 años en pequeños rumiantes (MAPA, 2020a; MAPA, 2020b).

POBLACIÓN DIANA

Conforme a la Directiva 64/432/CEE, el Programa Nacional de Erradicación (PNE) se aplica en todos los animales de la especie bovina mayores de 12 meses destinados a reproducción, producción de carne, leche u otras producciones, o a trabajo, certámenes o exposiciones; exceptuando las pruebas diagnósticas de rutina en los machos y hembras de engorde entre 12 y 17 meses procedentes de rebaños oficialmente indemnes de brucelosis, que no se utilicen para reproducción y que se enviarán directamente a sacrificio.

La población diana en los ovinos y caprinos, de acuerdo con la Directiva 91/68/CEE y modificaciones, son todos los machos enteros y no vacunados de más de 6 meses, los animales introducidos en la explotación después del control precedente y el 25 % de las hembras en edad fértil o nodrizas, siempre y cuando su número sea mayor de 50 por explotación, controlando todo el censo en caso contrario.

DEFINICIÓN DE CASO POSITIVO

De acuerdo con el R.D. 2611/1996 y modificaciones, un rebaño se considera positivo si al menos un animal susceptible de ser examinado por su edad no ha superado las pruebas de diagnóstico oficiales (de rutina y complementarias) con resultado favorable o no ha sido sometido a la totalidad de las pruebas (previstas en el R.D. 1716/2000 en el caso de los bovinos), además de los animales considerados por la autoridad competente como epidemiológicamente relacionados (MAPA, 2020a; MAPA, 2020b).

CALIFICACIONES SANITARIAS DE BRUCELOSIS

Según lo dispuesto en el R.D. 2611/1996 y modificaciones, el Real Decreto 1716/2000 y el Real Decreto 2121/1993 en lo que se refiere a brucelosis bovina por *B. bovis* (B) y a brucelosis ovina y caprina por *B. melitensis* (M):

Explotación B1/M1: Se desconocen los antecedentes clínicos, la situación en cuanto a la vacunación y a los controles serológicos, de los dos últimos años.

Explotación B2/M2: Se conocen los antecedentes clínicos, la situación en cuanto a la vacunación y a los controles serológicos, y se realizan chequeos para conseguir la calificación de indemne y oficialmente indemne.

Explotación B2+/M2+: No tiene asignada la calificación de oficialmente indemne o indemne, y en la última prueba de brucelosis realizada ha obtenido resultados positivos, o no se han examinado la totalidad de los animales con edad para ser chequeados.

Explotación B2-/M2- (no calificada): No ha alcanzado la calificación de indemne pero al menos la última prueba realizada ha obtenido un resultado negativo.

Explotación B3/M3 (indemne): Las dos últimas pruebas de detección de brucelosis separadas 6 meses como mínimo han sido negativas, y los animales se vacunan o han estado vacunándose hasta hace menos de 3 años en bovinos, y 2 años en ovinos y caprinos.

Explotación B4/M4 (oficialmente indemne): Las dos últimas pruebas de detección de brucelosis separadas 6 meses como mínimo han sido negativas, y los animales no han sido vacunados de brucelosis desde hace al menos 3 años en bovinos, y 2 años en ovinos y caprinos.

Explotación BS/MS (calificación sanitaria suspendida): Se trata de explotaciones oficialmente indemnes o indemnes que han introducido animales con un estatus sanitario inferior, tienen animales sospechosos o han incurrido en acciones contrarias a la legislación vigente.

EXPLOTACIONES DE GANADO BOVINO A CONTROLAR Y FRECUENCIA DE CHEQUEOS

La frecuencia de chequeos del PNE de brucelosis en animales de especie bovina en las comunidades autónomas (CCAA) con prevalencia de rebaño 0% y CCAA y provincias oficialmente indemnes, es de mínimo una vez al año en bovinos de aptitud cárnica, de acuerdo a la Directiva 64/432/CEE. En bovino de aptitud lechera, se realizan pruebas según lo dispuesto en el R.D. 1716/2000; dos pruebas anuales de I-ELISA en leche o una prueba serológica, con un intervalo de al menos 3 meses. En las provincias en las que el año anterior hubieran alcanzado la calificación de oficialmente libres de al menos el 99,8% de los rebaños totales durante 4 años consecutivos, las pruebas se les realiza a los animales mayores de 24 meses o el intervalo entre ellas aumenta a dos años si se les hacen a los mayores de 12 meses (MAPA, 2020a).

Aquellas CCAA que en el año anterior no hayan tenido ningún rebaño positivo, incluirán o mantendrán dentro del programa el 100% de los rebaños, con el objetivo de acceder a su calificación como B4. La calificación de las explotaciones de cebo de las provincias que hayan conseguido una prevalencia 0% mediante vacunación podrá realizarse en forma de B3 de manera transitoria. En el resto, únicamente se podrán dejar sin incluir en el programa un máximo de un 0,2% de cebaderos (MAPA, 2020a).

La frecuencia de pruebas diagnósticas de bovinos de carne en las provincias y CCAA con baja prevalencia (0-1%) es mínimo de dos chequeos anuales, con un intervalo de entre 3 y 12 meses. La autoridad competente puede reducir la frecuencia a una prueba anual en las comarcas o unidades veterinarias locales (UVLs) en las que la prevalencia del año anterior fuera 0%. Esta reducción a un chequeo anual también la pueden aplicar aquellas comarcas o UVLs con una prevalencia menor o igual a 1%, que tras el protocolo de SCSS no se haya confirmado la infección en ninguno de sus rebaños (MAPA, 2020a).

En las comarcas o UVLs de especial incidencia, cuya prevalencia de rebaño del año anterior es superior al 1%, se mantiene una frecuencia de pruebas diagnósticas de 2 chequeos al año como mínimo, con un intervalo de entre 3 y 12 meses en bovinos de aptitud cárnica. En los bovinos de aptitud lechera, se realizan 3 pruebas I-ELISA en leche con un intervalo superior a 3 meses, o 2 pruebas I-ELISA en leche con un intervalo de al menos 3 meses además de una prueba serológica al menos 6 semanas después; o dos pruebas serológicas con un intervalo de entre 3 y 12 meses (MAPA, 2020a).

Las frecuencias diagnósticas se incrementan en explotaciones positivas no confirmadas, con la realización de pruebas con un intervalo máximo de 2 meses hasta obtener resultados diagnósticos

negativos, y en explotaciones relacionadas epidemiológicamente con una explotación positiva confirmada, realizando como mínimo 3 pruebas serológicas con un intervalo menor a 3 meses hasta confirmar la ausencia de la enfermedad (MAPA, 2020a).

EXPLORACIONES DE GANADO OVINO Y CAPRINO A CONTROLAR Y FRECUENCIA DE CHEQUEOS

En los pequeños rumiantes, el objetivo de las CCAA y provincias oficialmente indemnes es el mantenimiento de ese estatuto mediante un programa de vigilancia epidemiológica de acuerdo con la Directiva 91/68/CEE y modificaciones.

La frecuencia de chequeos en explotaciones M3 y M4 es mínimo una prueba anual. La consecución de la calificación M4 a partir de M3 se realiza mediante el chequeo del 100% de los animales elegibles del rebaño por su edad (MAPA, 2020b).

En el caso de las explotaciones cuya totalidad del censo susceptible a ser chequeado no hayan tenido ningún resultado positivo el año anterior, el intervalo entre chequeos es de 6 a 8 meses hasta su calificación (MAPA, 2020b).

Las explotaciones MS se someten a una prueba antes de 30 días tras el aislamiento o sacrificio de los animales sospechosos o reaccionantes positivos, y posteriormente, cada 3 meses hasta la recuperación de la calificación (MAPA, 2020b).

Según lo establecido en la Directiva 91/68/CEE, la frecuencia de chequeos podrá reducirse en aquellas provincias que, aún no habiendo sido declaradas como oficialmente indemnes, mantengan la prevalencia 0%, hayan incluido el 100% de los rebaños de su ámbito territorial y más de un 99% de los mismos estén calificados como M4. Recientemente se ha dispuesto que todos los rebaños sean chequeados con una periodicidad de máximo 3 años (MAPA, 2020b).

MOVIMIENTO DE ANIMALES

En el ganado bovino se realizan pruebas previas o posteriores para mantener la calificación en los movimientos de animales mayores de 12 meses de una explotación B4 a otra B4. Sin embargo, en los animales de CCAA o provincias cuya prevalencia de rebaño haya sido 0% en los dos años anteriores no son necesarias, siempre y cuando durante el transporte no tengan contacto con animales con un estatuto inferior, de acuerdo con la Directiva 64/432/CEE.

Las explotaciones que realizan la trashumancia o aquellas que acceden a pastos de aprovechamiento en común, poseen la calificación de B4 o B3. Los animales mayores de 12 meses de estos rebaños deben chequearse en su totalidad durante los 30 días anteriores a la ida y

durante los 30 días anteriores o posteriores al retorno, cuando el destino sea una provincia o región declarada como oficialmente libre de brucelosis y la provincia o región de origen no. A cada pasto de aprovechamiento en común se le asignará una calificación sanitaria, no pudiendo acceder a ellos rebaños con calificación sanitaria inferior. Si se detectan reaccionantes positivos, los pastos no serán reutilizados en un periodo mínimo de 60 días, salvo excepciones previstas en la normativa (MAPA, 2020a).

En el caso del ganado ovino y caprino, las pruebas previas al movimiento son obligatorias en los rebaños trashumantes además de en todos los movimientos comerciales de animales, y se realizan dentro de los 30 días anteriores al traslado a todos los animales. Se podrán excusar de estas pruebas los animales cuyo origen sea un rebaño M4 procedente de una provincia de prevalencia 0% (MAPA, 2020b).

Los animales susceptibles de estar infectados por brucelosis, se aislarán dentro de la explotación y se prohibirá su movimiento, salvo si es con destino a matadero para ser sacrificados sin demora (MAPA, 2020a; MAPA, 2020b).

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Las pruebas diagnósticas están recogidas en el Real Decreto 1941/2004 y en el Real Decreto 2611/1996, y son realizadas por los laboratorios autorizados cuya aptitud es aprobada por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR). Las pruebas de diagnóstico oficial son RBT, CFT, I-ELISA y FPA; y la prueba cutánea de la brucelina y el C-ELISA se consideran como pruebas complementarias.

En rebaños libres, habitualmente la RBT se usa como prueba de cribado oficial, y los positivos son testados en serie mediante la CFT. En rebaños de aptitud lechera se puede aplicar el mismo protocolo o el I-ELISA en tanque de leche como prueba de cribado y en el caso de obtener resultados positivos, continuar con el I-ELISA u otra prueba en suero individual de los animales. En rebaños infectados se usan pruebas serológicas en paralelo, normalmente RBT y CFT (MAPA, 2020a; MAPA, 2020b).

En los rebaños con animales reaccionantes positivos se realizan las pruebas de confirmación de aislamiento microbiológico y tipificación de *Brucella* spp. Otras técnicas aplicables son la PCR y otra prueba de reconocimiento de ácidos nucleicos, el análisis de repeticiones en tándem de un número variable de locus múltiples (MLVA), la cual proporciona una gran información epidemiológica para un minucioso estudio de los focos (Bricker, 2002; MAPA, 2020a; MAPA, 2020b).

ACTUACIONES EN CASO DE REBAÑOS CON ANIMALES CON SEROLOGÍA POSITIVA

La brucelosis es una enfermedad de declaración obligatoria en España. La declaración oficial de la enfermedad se efectúa según lo dispuesto en la Ley 8/2003 de Sanidad Animal y en el Real Decreto 526/2014, en el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y da la normativa para su comunicación.

Ante la aparición de reaccionantes positivos en un rebaño B3 o B4, se procede a su sacrificio y suspensión de la calificación en espera de confirmación siguiendo las directrices que figuran en el Manual de Toma de Muestras y en el Protocolo de SCSS (MAPA, 2020a; MAPA, 2020b).

Si en una explotación calificada situada en una zona libre de brucelosis (CCAA de prevalencia cero y baja prevalencia), tras un chequeo de todo el censo se detecta un animal seropositivo con un título de anticuerpos bajo, un caso de FRSP, y si los datos epidemiológicos, clínicos y laboratoriales no sospechan la presencia de infección por *Brucella* spp., se suspende la calificación y se procede al sacrificio de los animales positivos y a la toma de muestras para el aislamiento bacteriológico. Los animales positivos a CFT serán sacrificados, y los negativos volverán a ser chequeados 2-4 semanas tras el último sacrificio, donde si todo el rebaño resulta negativo a CFT y no se aísla *Brucella* spp. se restituye la calificación y se descarta el foco (Laboratorio central de sanidad animal de Santa Fe). Las cepas aisladas en un brote serán remitidas al LNR de brucelosis, donde se realizará un estudio utilizando las técnicas oficiales, las recomendadas por la OIE y los nuevos avances en materia de epidemiología molecular para un minucioso estudio de los focos (MAPA, 2020a; MAPA, 2020b).

En los casos en los que se confirme la enfermedad, se procederá a comprobar los movimientos de animales que se hayan producido desde la explotación durante el último año. La autoridad competente podrá determinar que las explotaciones contiguas a la considerada infectada y las epidemiológicamente relacionadas se sometan a pruebas adicionales a las establecidas por este programa. En las explotaciones con animales positivos se restringe el movimiento de ganado, se realiza una encuesta epidemiológica para averiguar el origen de la infección y se realizan pruebas serológicas hasta obtener dos o más resultados negativos consecutivos (MAPA, 2020a; MAPA, 2020b).

NOTIFICACIÓN OBLIGATORIA DE ABORTOS E INVESTIGACIÓN DE LAS EXPLOTACIONES AFECTADAS

Es de obligada notificación la casuística de abortos en una explotación calificada con la sospecha de la posibilidad de que sean casos de brucelosis para que sean investigados oficialmente. Los

abortos sospechosos son aquellos procedentes de animales en el último tercio de gestación principalmente, provenientes de rebaños con menos de 100 animales con dos abortos o más en un mes o tres abortos durante el año; y en rebaños de más de 100 animales con más de un 4% de abortos en el año. Si se confirma la positividad se procede al sacrificio de los reaccionantes positivos para proceder a la toma de muestras de fetos y anejos fetales, leche y suero del animal que ha abortado, para efectuar pruebas de aislamiento de *Brucella* spp. y realizar una encuesta epidemiológica detallada. El aislamiento de *Brucella* spp. confirma el foco de infección; un resultado negativo sería contrastado con la CFT, que si resulta positiva, se procedería a un chequeo serológico (RBT y CFT) de toda la totalidad del censo de la explotación 2-4 semanas después del sacrificio del último animal abortado. Si resultan negativos a la CFT se descarta el foco, pero si algún animal es positivo se debe proseguir con las estrategias de erradicación del PNE (Laboratorio central de sanidad animal de Santa Fe).

VACUNACIÓN

Está prohibido tratar el ganado bovino infectado y vacunar frente a la enfermedad salvo en algunas excepciones, autorizadas por la comunidad autónoma afectada y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), en las que la cepa identificada no sea *B. abortus* y se aseguren determinadas garantías de bioseguridad y biocontención, evitando el vaciado sanitario (MAPA, 2020a). En el caso de los ovinos y caprinos, se prohíbe la vacunación en toda España con el objetivo de declararse oficialmente indemne próximamente (MAPA, 2020b).

SACRIFICIO DE LOS ANIMALES POSITIVOS

Una vez obtenidos los resultados laboratoriales, se procede al sacrificio de los animales positivos y los considerados como tal en un plazo máximo de 15 días, pudiendo haber alguna excepción en ganado bovino, para su posterior traslado a un centro de cadáveres autorizado. El ganadero afectado será indemnizado según los baremos establecidos, exceptuando los animales pertenecientes a un cebadero de bovino. En el caso de que la seropositividad del rebaño sea alta, se sacrifican en un matadero autorizado (MAPA, 2020a; MAPA, 2020b).

Tras el sacrificio, se continúa con la limpieza y desinfección de las explotaciones y utensilios, los mataderos y los medios de transporte, y se realiza una correcta gestión del estiércol. La reposición de animales en estas explotaciones se lleva a cabo tras la obtención de al menos un resultado favorable en un chequeo de los bovinos de más de 12 meses que continúen en la explotación (MAPA, 2020a; MAPA, 2020b).

VACIADO SANITARIO

En los rebaños confirmados, se realiza el vaciado sanitario de la explotación, aunque se trate de un sólo animal positivo implicado. En las explotaciones bovinas no confirmadas con antecedentes de la enfermedad o con relación epidemiológica con explotaciones confirmadas se procede al vaciado sanitario cuando la prevalencia es superior al 15%, o cuando se obtengan resultados diagnósticos positivos en dos chequeos serológicos realizados en un plazo superior a un mes entre pruebas. Si no puede descartarse la infección por *B. melitensis* en rebaños ovinos también se realiza el vaciado sanitario. Las autoridades competentes preservarán el bienestar de los animales y deberán informar a la Comisión Europea y a la población sobre las actuaciones realizadas siguiendo el Reglamento (CE) nº 1099/2009 (MAPA, 2020a; MAPA, 2020b).

VIGILANCIA DE LA FAUNA SILVESTRE

Con motivo de evaluar la el posible papel como reservorio de brucelosis de los animales silvestres, se toman muestras en todas las CCAA salvo en territorios en los que no existan especies silvestres reservorio. Sin embargo, la vigilancia será voluntaria en aquellas CCAA cuyos programas de vigilancia hayan demostrado la ausencia de implicación de estas especies en la epidemiología de la enfermedad (MAPA, 2020a; MAPA, 2020b).

EVOLUCIÓN Y SITUACIÓN ACTUAL EN ESPAÑA

La brucelosis fue una enfermedad de declaración obligatoria en España a partir de 1942. Desde principios del siglo XX hasta entonces se realizaron importantes estudios epidemiológicos en el país, recalando la importancia que estaba ganando esta enfermedad zoonótica, aunque las medidas de control fueron prácticamente nulas (Fernández, 2011).

La Ley de epizootias de 1952, el Reglamento de 1955 y sucesivas Órdenes Ministeriales constituyeron los pilares normativos para el establecimiento de un programa nacional de lucha, control y erradicación de la brucelosis, con escasos resultados y elevadas prevalencias inicialmente por la poca planificación y escasez de recursos (MAPA, 2007a).

Entre 1976 y 1978 se iniciaron los primeros programas oficiales basados en la vacunación obligatoria de las hembras de reposición. El ganado bovino respondió con cierta eficiencia a este programa, a contrario del ganado ovino y caprino, debido a un porcentaje bajo de vacunación con variabilidad entre CCAA, permitiendo el mantenimiento y difusión de la enfermedad (Blasco, 2004).

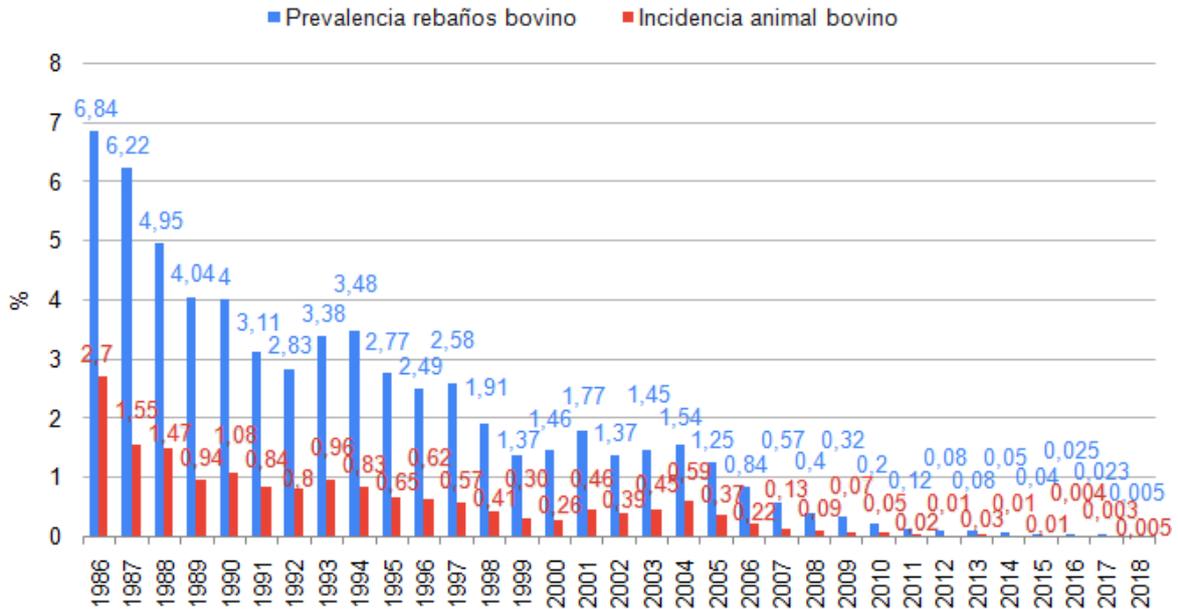
En la década de los 80 el Ministerio de Agricultura encomendó una serie de campañas de vacunación masiva de todo el censo ovino y caprino en las CCAA más afectadas para posteriormente pasar a planes de erradicación que incluían el diagnóstico y sacrificio de los seropositivos, consiguiendo la contención de la prevalencia de la infección en dichas regiones (Blasco, 2004).

Con la incorporación de España en la Comunidad Económica Europea (CEE) en 1986, se comenzaron a aplicar los planes de erradicación contra la brucelosis de las Directivas del Consejo 77/391/CEE y 78/52/CEE. El Real Decreto 2611/1996, y sus posteriores modificaciones con el Real Decreto 1047/2003 y el Real Decreto 51/2004, incluyeron medidas como la calificaciones sanitarias de las explotaciones, la prohibición de la vacunación en todo el país exceptuando explotaciones problemáticas y la creación del Comité Nacional de Cooperación y Seguimiento de los PNE de Enfermedades Animales (Fernández, 2011). Más tarde, junto con el Real Decreto 1716/2000, se introdujeron normas sanitarias para el intercambio intracomunitario de animales de la especie bovina y se incorporaron avances en los métodos de diagnóstico (MAPA, 2018c).

En el PNE de 2006 se establecieron tres grupos de actuación según la prevalencia de la enfermedad: CCAA con una prevalencia de rebaño cero, de baja prevalencia, o de alta prevalencia (MAPA, 2006a). El PNE 2006-2010 se constituyó como un programa de actuaciones plurianual de 5 años que sentó las bases de aplicación de medidas que alcanzaran niveles de erradicación, y en 2011-2016 se continuó con esta estrategia (MAPA, 2018c).

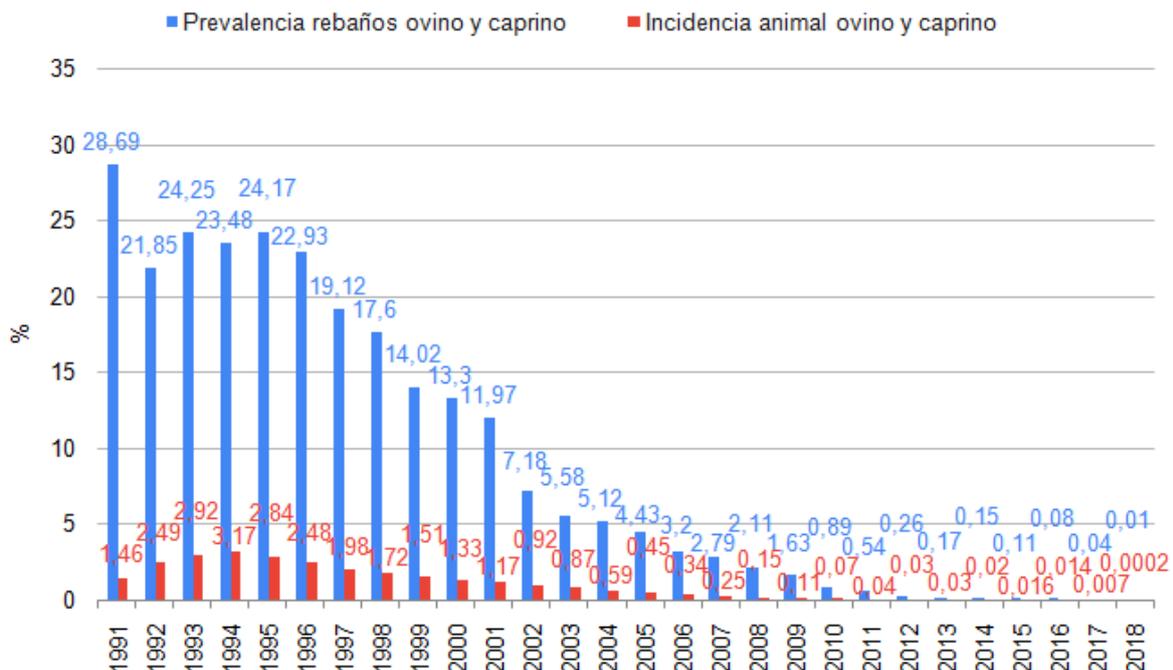
La aplicación de los planes nacionales desde la entrada de España en la CEE ha supuesto un discontinuo avance hacia la erradicación de la enfermedad en el ganado bovino, con aumentos de la prevalencia en los años 1993, 1994, 1997, 2000, 2001, 2003 y 2004. Desde el PNE del 2004 la tendencia anual de este indicador epidemiológico ha tenido un descenso sostenido significativo ($p < 0,001$), excepto en 2013 y 2017, llegando a bajar hasta un 0,005% en 2018 (MAPA, 2020a).

Figura 16: Prevalencia de rebaño e incidencia en animales en el período 1986-2018 de brucelosis bovina en España (MAPA, 2006a; MAPA, 2018a).



La evolución de la prevalencia mediante la ejecución del PNE en ovinos y caprinos ha manifestado un descenso sostenido de la tendencia de la brucelosis, exceptuando los aumentos en 1993 y 1995, teniendo unos significativos descensos anuales desde 1998 ($p < 0,001$) y llegando a disminuir hasta un 0,01% en 2018 (MAPA, 2020b).

Figura 17: Prevalencia de rebaño e incidencia en animales en el período 1991-2018 de brucelosis ovina y caprina en España (MAPA, 2018b).



La evolución de la enfermedad en ganado bovino en las distintas CCAA se refleja en la siguiente tabla. En el último Informe Final Técnico-Financiero de Brucelosis Bovina de 2018 tan sólo se ha contabilizado un caso de brucelosis por *B. abortus* en Extremadura, y dos de *B. melitensis* en Cataluña, región ya declarada como oficialmente indemne de brucelosis bovina. Ambos casos tienen una baja prevalencia (<1%), 0,04% y 0,01% respectivamente, y estaban relacionados con un rebaño de ovinos infectado (MAPA, 2018a).

Tabla 1: Evolución de la prevalencia de brucelosis bovina por establos en España en el período 2001-2018 (MAPA, 2018a).

EVOLUCIÓN DE LA PREVALENCIA DE REBAÑO (EN %)																		
CCAA	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Andalucía	3,06	2,7	2,7	2,66	1,91	0,95	1	0,36	0,27	0,11	0,02	0,02	0	0	0	0,13	0	0
Aragón	1,44	1,44	2,66	1,68	0,64	0,29	0,27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asturias	0,31	0,34	0,22	0,19	0,19	0,04	0	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Baleares	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Canarias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cantabria	4,81	3,27	5,49	3,84	1,54	0,66	1,04	0,98	0,6	0,55	0,53	0,41	0,33	0,18	0,08	0,2	0,17	0
Castilla la Mancha	2,46	2,52	3,45	5,23	2,71	1,91	1,09	0,72	0,48	0,25	0,08	0,18	0,33	0,23	0,18	0	0,03	0
Castilla León	3,8	3,59	3,52	3,4	3,35	2,78	1,44	0,99	1,27	0,76	0,34	0,04	0	0	0	0	0	0
Cataluña	3,62	0,54	1,34	1,18	0,91	0,34	0,21	0,16	0,44	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,04
Extremadura	3,03	3,71	4,71	6,15	5,76	3,98	2,17	1,39	0,67	0,52	0,41	0,27	0,22	0,15	0,16	0,04	0,05	0,01
Galicia	0,38	0,3	0,26	0,17	0,09	0,06	0,11	0,06	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La Rioja	0,81	0	0	1,23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Madrid	0,91	0,43	1,68	2,23	1,35	2,07	1,51	1,03	1,21	0,65	0,3	0	0	0	0	0	0	0
Murcia	3,28	0	0	0,89	0	0,26	0,72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Navarra	0,34	0,25	0,04	0	0	0	0	0,06	0,12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
País Vasco	0,2	0,57	0,13	0,11	0,25	0,04	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valencia	2,33	0,68	0,67	1,16	0,99	0	0,19	0	0	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0	0
Total	1,77	1,37	1,45	1,54	1,25	0,84	0,57	0,4	0,32	0,2	0,12	0,08	0,08	0,05	0,04	0,025	0,023	0,005

Los resultados de los programas nacionales tuvieron un gran avance en el ganado ovino y caprino en prácticamente todas las CCAA entre los años 2008 y 2009, manteniendo la misma tendencia favorable entre 2010-2018. En el Informe Final Técnico-Financiero de Brucelosis Ovina y Caprina de 2018 sólo se han contabilizado casos de brucelosis ovina y caprina con una prevalencia de

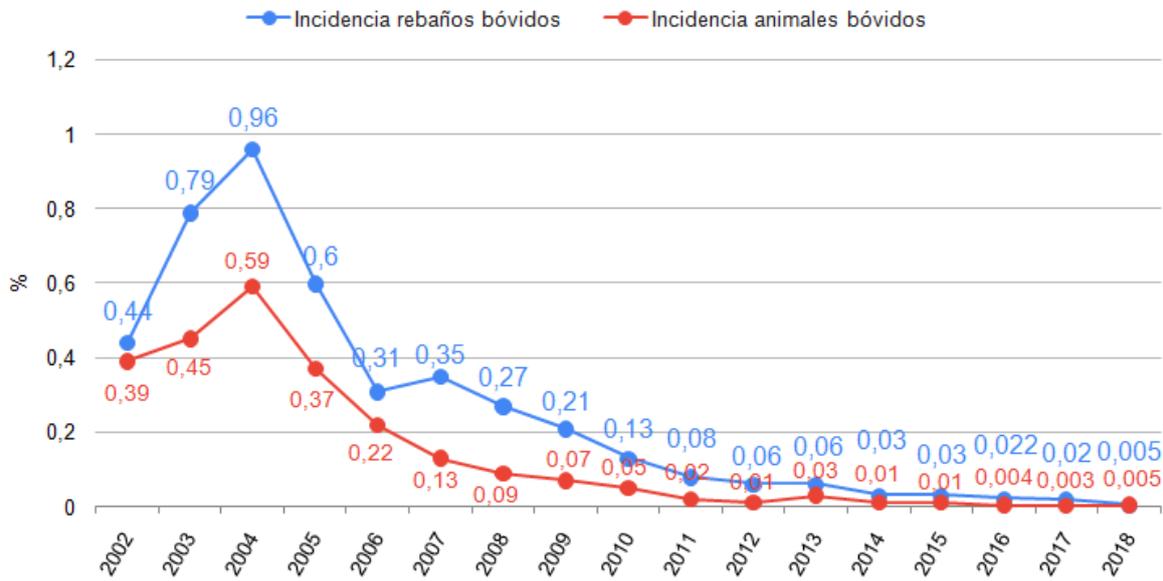
0,02% en 3 rebaños de Andalucía, uno en la provincia de Almería y dos en la provincia de Granada (MAPA, 2018b).

Tabla 2: Evolución de la prevalencia de brucelosis ovina y caprina por establos en España en el período 2001-2018 (MAPA, 2018b).

EVOLUCIÓN DE LA PREVALENCIA DE REBAÑO OVINO Y CAPRINO (EN %)																		
CCAA	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Andalucía	27,11	21,62	12,72	12,97	13,76	11,56	10,39	8,55	7,95	3,19	1,97	1,09	0,55	0,48	0,24	0,24	0,08	0,02
Aragón	32,3	15,14	11,83	5,97	4,18	1,59	11,52	0,7	0,38	0,11	0,05	0,05	0,03	0	0	0	0	0
Asturias	0,16	0,05	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Baleares	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Canarias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cantabria	3,71	2,63	1,9	1,05	0,55	0,49	1,39	0,78	0,18	0,09	0,02	0	0	0	0	0	0	0
Castilla la Mancha	8,93	7,96	6,58	7,52	6,09	3,55	2,1	2,11	1,97	2,52	1,27	0,61	0,39	0,25	0,47	0,1	0,06	0
Castilla León	15,28	9,6	6,95	6,37	3,72	1,97	1,8	1,51	0,35	0,1	0,01	0	0	0	0	0,04	0	0
Cataluña	27,15	19,09	20,69	17,51	14,06	9,53	5,44	3,14	1,55	1,68	1,65	0,68	0,49	0,17	0,03	0,03	0,03	0
Extremadura	5,6	4,34	3,07	3,68	3,18	2,22	1,84	0,95	0,66	0,39	0,27	0,07	0,04	0,02	0,01	0	0	0
Galicia	0,29	0,18	0,08	0,03	0,04	0,01	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0,02	0	0
La Rioja	6,73	9,42	10	8,5	2,54	1,11	1,61	0,7	0,7	0,48	0,24	0,25	0	0	0	0	0	0
Madrid	15,03	5,1	7,89	5,6	4,69	6,44	3,42	4,01	2,82	1,33	0,62	0,15	0,3	0,15	0	0	0,14	0
Murcia	18,22	0,14	8,02	6,15	4,71	3,96	8,7	7	4,99	3,46	1,56	0,96	0,62	0,27	0,16	0	0	0
Navarra	1,08	1,3	0,4	0,13	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
País Vasco	0,09	0,42	0,44	0,31	0,08	0,12	0	0,15	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valencia	39,48	26,44	22,35	15,42	15,13	8,1	3,74	5,72	2,6	4,42	3,63	0,08	0	0	0	0	0	0
Total	11,97	7,18	5,58	5,12	4,43	3,2	2,79	2,11	1,63	0,89	0,54	0,26	0,17	0,15	0,11	0,08	0,04	0,01

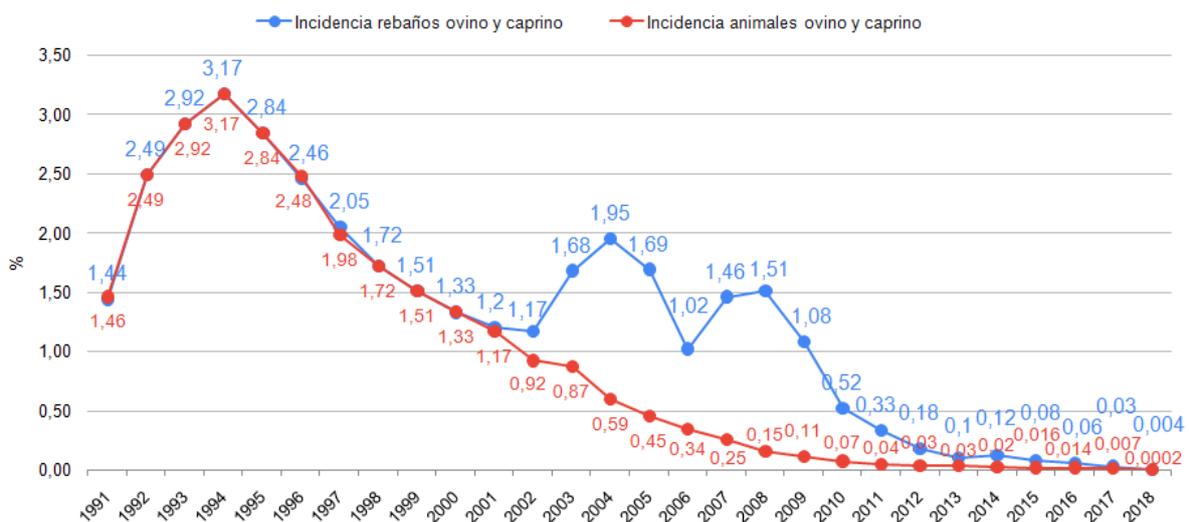
Los indicadores epidemiológicos de incidencia en rebaños y en animales manifiestan la misma tendencia significativa de descenso a partir del año 2004 en el ganado bovino, con una incidencia tanto animal como de rebaño de 0,005% en 2018 (MAPA, 2018a).

Figura 18: Incidencia de rebaño e incidencia en animales en el período 2002-2018 de brucelosis bovina en España (MAPA, 2018a).



La incidencia del ganado ovino y caprino muestra la misma tendencia significativa desde el año 2003 en animales y 2008 en rebaños, exceptuado una serie bimodal entre los años 2003 y 2009, con una incidencia animal de 0,0002% y de rebaño de 0,004% en 2018 (MAPA, 2006b; MAPA, 2018b).

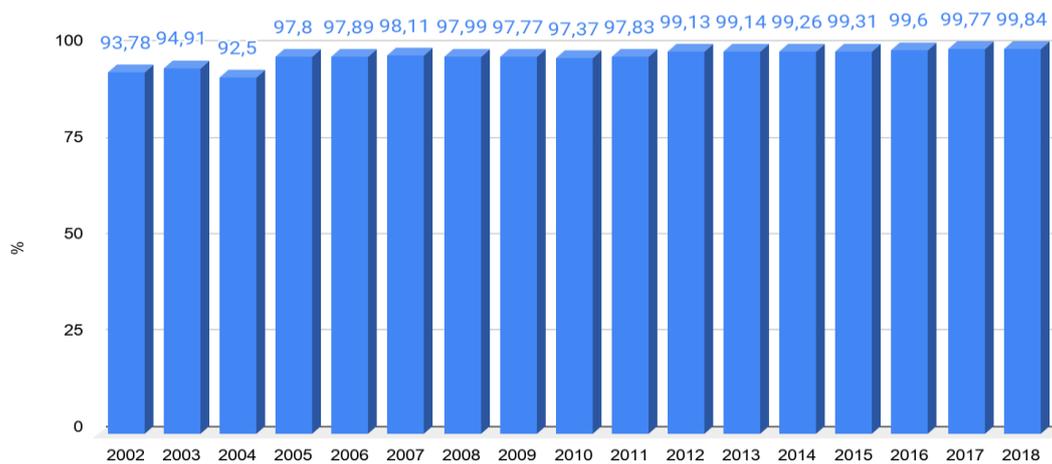
Figura 19: Incidencia de rebaño e incidencia en animales en el período 1991-2018 de brucelosis ovina y caprina en España (MAPA, 2006b; MAPA, 2018b).



Siendo el aumento de rebaños calificados como oficialmente libres uno de los principales objetivos del PNE, la evolución de las calificaciones de los rebaños indica un continuado avance hacia la

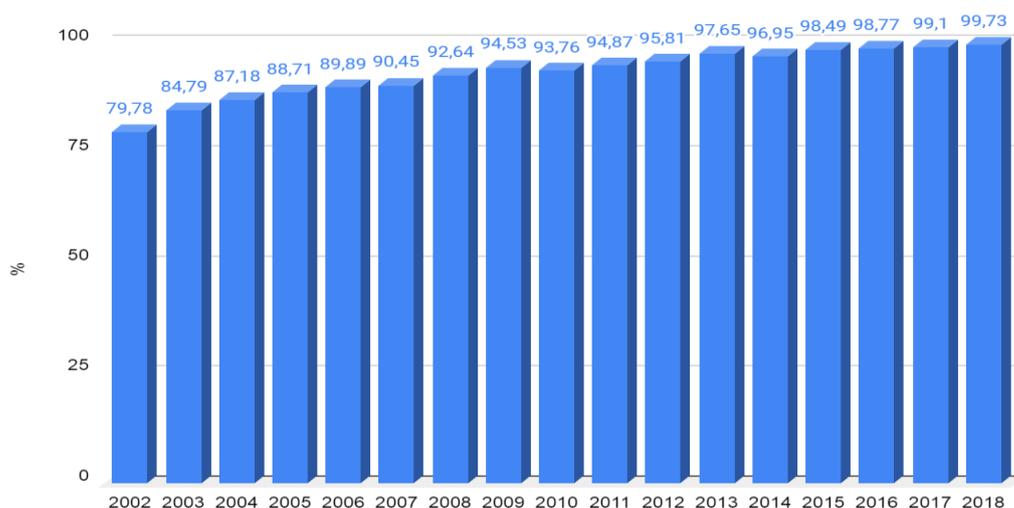
erradicación de la brucelosis en bovinos y pequeños rumiantes. En el Informe Final Técnico-Financiero de Brucelosis Bovina de 2018, B1 obtuvo un valor de 0,03%, B2+ de 0,01%, B2- de 0,08%, BS de 0,04%, B3 de 0,03%, B4 de 98,81% y B3+B4 de 98,84%, situando la brucelosis bovina al borde de la erradicación (MAPA, 2018a).

Figura 20: Sumatorio del porcentaje de rebaños calificados como indemnes (B3) y oficialmente indemnes (B4) de brucelosis bovina en el período 2002-2018 en España (MAPA, 2018a).



En cuanto a la brucelosis ovina y caprina producida por *B. melitensis*, en el 2018 se continuó con el importante avance en la lucha frente a la brucelosis situando la brucelosis ovina y caprina al borde de la erradicación con un porcentaje de rebaños calificados como M1 con un valor de 0,01%, M2+ de 0%, M2- de 0,06%, MS de 0,15%, M3 de 0,02%, M4 de 99,75% y M3+M4 de 99,77% (MAPA, 2018b).

Figura 21: Sumatorio del porcentaje de rebaños calificados como indemnes (M3) y oficialmente indemnes (M4) de brucelosis ovina y caprina en el período 2002-2018 en España (MAPA, 2011; MAPA, 2018b).



CONCLUSIONES

Como consecuencia de la implantación de programas de control y erradicación de brucelosis en rumiantes domésticos en España, la enfermedad ha tenido un retroceso sostenido situándola actualmente al borde de la erradicación.

El sacrificio de los animales positivos, la no vacunación de los rebaños, el adecuado diagnóstico y la implementación de medidas de bioseguridad han sido elementos clave para la favorable situación actual de la enfermedad.

Continuando con las estrategias del PNE de brucelosis en España, es probable que en 2020, o en su defecto, en un espacio corto de tiempo, se alcance la erradicación de la enfermedad.

La favorable evolución de la situación de la brucelosis traerá consigo la mejora en la productividad de las explotaciones y la eliminación de restricciones al comercio internacional de animales y productos, además de la reducción de los casos en humanos debido a su condición de enfermedad zoonótica.

CONCLUSIONS

As a consequence of the implementation of brucellosis control and eradication programmes in domestic ruminants in Spain, the disease has had a sustained decline, currently placing it on the brink of eradication.

The slaughter of positive animals, the non-vaccination of herds, the proper diagnosis and the implementation of biosafety measures have been key elements for the current situation of the disease.

Following with the PNE brucellosis strategies in Spain, it is likely that by 2020, or otherwise, in a short period of time, the eradication of the disease will be achieved.

The right evolution of the brucellosis situation brings with it the improvement in the farms productivity, the end of limitations to limitations to the international trade of animals and animal products, in addition to the reduction in human cases due to their zoonotic disease condition.

VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este trabajo ha sido de gran utilidad para conocer a fondo en qué consiste un programa de control y erradicación de una enfermedad infecciosa zoonótica y de declaración obligatoria, como lo es la brucelosis, y la repercusión de su implementación en la evolución de los indicadores epidemiológicos durante un periodo de tiempo.

A su vez ha sido útil en mi formación, ya que me ha permitido aprender a realizar una búsqueda eficaz en bases de datos científicas y webs de instituciones oficiales, a redactar de forma conveniente un trabajo académico, cómo estructurarlo, documentarlo y a cómo citarlo adecuadamente.

BIBLIOGRAFÍA

Aldave, J.C. (2015). *Pruebas diagnósticas basadas en la respuesta inmunitaria*. Disponible en: http://www.alergomed.org/uploads/1/0/0/2/10021998/lectura_prctica_-_inmunoensayos_2.pdf [Consultado 18-06-2020].

Alton, G.G., Jones, L.M., Pietz, D.E. (1975). *Laboratory techniques in brucellosis*, 2nd ed. Geneva: World Health Organization, pp. 34, 39. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/38676> [Consultado 10-04-2020].

Beer, J. (1987). *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos*. Zaragoza: Anagrama, pp. 142-165.

Blasco, J. M. (2011). *Resultados de las pruebas serológicas para el diagnóstico de brucelosis animal: bases para su interpretación, problemas y alternativas*. Disponible en: <http://chil.org/download-doc/232645> [Consultado 18-06-2020].

Blasco, J. M., Marin, C., De Bagues, M. J., Barberan, M., Hernandez, A., Molina, L., Díaz, R., Moriyón, I. (1994). "Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep". *Journal of clinical microbiology*, 32(8), pp. 1835-1840. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/jcm/32/8/1835.full.pdf> [Consultado 12-04-2020].

Blasco, J.M. (2004). "Estado actual de la brucelosis en España". *Profesión veterinaria*, 15(58), pp. 22-34. Disponible en: <http://www.colvema.org/PDF/BRUCELOSIS.pdf> [Consultado 5-03-2020].

Bricker, B. J. (2002). "PCR as a diagnostic tool for brucellosis". *Veterinary Microbiology* 90, pp. 435-446. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00228-6.

Bricker, B.J., Ewalt, D.R., Halling, S.M. (2003). "Brucella 'HOOF-Prints' strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs)". *BMC Microbiol.*, 3, 15. DOI: 10.1186/1471-2180-3-15.

Cárdenas, F. R. y Herrera, J. L. (2012). *Brucellosis*. Disponible en:
<https://es.slideshare.net/pacofranklin/brucelosisexpjun> [Consultado: 18-06-2020].

Coelho, A., Díez, J. G., y Coelho, A. C. (2014). "Brucellosis en pequeños rumiantes: etiología, epidemiología, sintomatología, diagnóstico, prevención y control". *REDVET Revista Electrónica de Veterinaria*, 15 (5), pp. 1-31. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63633881002.pdf> [Consultado: 28-04-2020].

Corbel, M. y Morgan, W. (1982). "Clasificación del género *Brucella*: situación presente". *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 1(1), pp. 301-310. Disponible en: <https://www.oie.int/doc/ged/D6737.PDF> [Consultado: 12-04-2020].

De Massis, F., Giovannini, A., Di Emidio, B., Ronchi, G. F., Tittarelli, M., Di Ventura, M., Nannini, D., Caporale, V. (2005). "Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51". *Veterinaria italiana*, 41(4), pp. 291-299. Disponible en: http://www.izs.it/vet_italiana/2005/summ4/de_massis_291_299.pdf [Consultado 16-04-2020].

De Miguel, M. J., Marín, C. M., Muñoz, P. M., Dieste, L., Grilló, M. J., y Blasco, J. M. (2011). "Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species". *Journal of clinical microbiology*, 49(4), pp. 1458–1463. DOI: 10.1128/JCM.02301-10

Estein, S.M. (2006). "Brucellosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica)". *REDVET Revista Electrónica de Veterinaria*, 7 (5), pp. 1-25. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/pdf/636/63612665001.pdf> [Consultado: 1-05-2020].

Fernández García, D. (2011). *Contribución al estudio epidemiológico de la brucelosis bovina en la Comunidad Autónoma de Galicia: investigación y aplicabilidad de nuevas técnicas diagnósticas*. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Disponible en:
https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/3076/9788498876154_content.pdf?sequence=1&isAllowed=y [Consultado: 1-04-2020].

Ficht, T. (2010). “*Brucella* taxonomy and evolution”. *Future microbiology*, 5(6), pp. 859–866. DOI: 10.2217/fmb.10.5

Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/World Health Organization (WHO) Expert Committee on Brucellosis (1986). *Technical Report Series*, 740, Sixth Report. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40202> [Consultado: 1/05/2020].

Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe. *Protocolo de seguimiento en casos de sueros sospechosos (SCSS) en áreas libres de enfermedad*. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/protocoloseguimientosuerosospechosobrucelosis_tcm30-111237.pdf [Consultado: 29/04/2020].

Minas, A. (2006). “Control and eradication of brucellosis in small ruminants”. *Small Ruminant Research*, 62(1-2), pp. 101-107. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2005.07.03.

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), (1996). “Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales”, *Boletín Oficial del Estado*, 21 de diciembre de 1996 (307), pp. 5-6. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/rd/1996/12/20/2611/con> [Consultado 13-04-2020].

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), (2006a). *Informe final técnico Brucelosis bovina año 2006*. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informefinal_bb_2006_tcm30-111249.pdf [Consultado 8-04-2020].

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), (2006b). *Informe final técnico Brucelosis ovina y caprina (B. melitensis) año 2006*. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informefinal_boc_2006_tcm30-111328.pdf [Consultado 12-04-2020].

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), (2006c). *Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis bovina presentado por España para el año 2006*. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pnebb_2006_tcm30-111265.pdf [Consultado 9-04-2020].

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), (2007a). *Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis bovina presentado por España para el año 2007*. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informefinal_bb_2007_tcm30-111265.pdf

[ganadera/pnebb_2007_tcm30-111264.pdf](#) [Consultado 9-04-2020].

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), (2007b). *Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis ovina y caprina presentado por España para el año 2007*. Disponible en:

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pneboc_2007_tcm30-111342.pdf)

[ganadera/pneboc_2007_tcm30-111342.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pneboc_2007_tcm30-111342.pdf) [Consultado 9-04-2020].

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), (2011). *Informe final técnico-financiero Programa Nacional de Erradicación de la Brucelosis ovina y caprina (B. melitensis) año 2011*.

Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informefinal_boc_2011_tcm30-111323.pdf)

[ganadera/informefinal_boc_2011_tcm30-111323.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informefinal_boc_2011_tcm30-111323.pdf) [Consultado 12-04-2020].

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), (2018a). *Informe final técnico-financiero Programa Nacional de Erradicación de la Brucelosis bovina año 2018*. Disponible en:

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informefinaltecnicobb2018_tcm30-522323.pdf)

[ganadera/informefinaltecnicobb2018_tcm30-522323.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informefinaltecnicobb2018_tcm30-522323.pdf) [Consultado 8-04-2020].

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), (2018b). *Informe final técnico-financiero Programa Nacional de Erradicación de la Brucelosis ovina y caprina (B. melitensis) año 2018*.

Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informefinaltecnicoboc2018_tcm30-522409.pdf)

[ganadera/informefinaltecnicoboc2018_tcm30-522409.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informefinaltecnicoboc2018_tcm30-522409.pdf) [Consultado 12-04-2020].

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), (2018c). *Programa Nacional de Erradicación de la Brucelosis bovina presentado por España para confinación 2018*. Disponible en:

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pnebb_2018_tcm30-437280.pdf)

[ganadera/pnebb_2018_tcm30-437280.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pnebb_2018_tcm30-437280.pdf) [Consultado 11-04-2020].

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), (2018d). *Programa Nacional de Erradicación de la Brucelosis ovina y caprina (B. melitensis) presentado para su confinación 2017-2018. Versión 2018*. Disponible en:

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pneboc_2018_tcm30-437282.pdf)

[animal-higiene-ganadera/pneboc_2018_tcm30-437282.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pneboc_2018_tcm30-437282.pdf) [Consultado 11-04-2020].

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), (2020a). *Programa Nacional de Erradicación de la Brucelosis bovina presentado por España para confinación 2020*. Disponible en:

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programabb2020final_tcm30-523302.PDF)

[ganadera/programabb2020final_tcm30-523302.PDF](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programabb2020final_tcm30-523302.PDF) [Consultado 10-04-2020].

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), (2020b). *Programa Nacional de Erradicación de la Brucelosis ovina y caprina (B. melitensis) presentado para su confinación 2019-*

2020. Versión 2020. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programaboc2020final_tcm30-523315.PDF [Consultado 11-04-2020].

Muñoz, P. M. y Blasco, J. M. (2016). *Situación actual de la brucelosis ovina y caprina*. Disponible en: <https://www.portalveterinaria.com/rumiantes/articulos/11748/situacion-actual-de-la-brucelosis-ovina-y-caprina.html> [Consultado: 18-06-2020].

Muñoz, P. M., Marín, C. M., Monreal, D., Gonzalez, D., Garin-Bastuji, B., Diaz, R., Mainar-Jaime, R.C., Moriyon, I., Blasco, J. M. (2005). "Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O: 9". *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12(1), pp. 141-151. DOI: 10.1128/CDLI.12.1.141-151.2005.

Nielsen, K. (1990). *Animal brucellosis*. Boca Raton (EEUU): CRC press, pp. 1-19.

Nielsen, K. (2002). "Diagnosis of brucellosis by serology". *Veterinary microbiology*, 90 (1-4), pp. 447-459. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00229-8.

Nielsen, K., Gall, D., Jolley, M., Leishman, G., Balsevicius, S., Smith, P., Nicoletti, P., Thomas, F. (1996). "A homogenous fluorescence polarisation assay for detection of antibody to *Brucella abortus*". *Journal of immunological methods*, 195(1-2), pp. 161-168. DOI: 10.1016/0022-1759(96)00116-0.

Oficina Internacional de Epizootias (OIE), (2006). *Código Sanitario para los animales terrestres*. Disponible en: <https://www.oie.int/doc/ged/D6435.PDF> [Consultado 3-03-2020].

Oficina Internacional de Epizootias (OIE), (2018). *Manual de Normas para las Pruebas de Diagnóstico y las Vacunas para Animales Terrestres*. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELL.pdf [Consultado 3-03-2020].

Oficina Internacional de Epizootias (OIE), (2020). *Información sobre las enfermedades de los animales acuáticos y terrestres*. Disponible en: <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/brucelosis/> [Consultado 2-03-2020].

Ortiz, M. y Acosta, M. (2013). *Prueba de Rosa de Bengala y/o Tarjeta en el Diagnóstico de Brucelosis Bovina*. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/12/Prueba-de-Rosa-de-Bengala.pdf> [Consultado: 18-06-2020].



Pouillot, R., Grilló, M. J., Alabart, J. L., Garin-Bastuji, B., & Blasco, J. M. (2003). "Statistical procedures for calculating the residual virulence of *Brucella abortus* strain 19 (S19) and *Brucella melitensis* strain Rev 1 vaccines in mice: theoretical basis and practical applications". *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties*, 22(3), 1051-1064. DOI: 10.20506/rst.22.3.1455.

Sabalette, T. (2010). *Brucella*. Disponible en:

<http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/brucella.html> [Consultado: 18-06-2020].

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) (2016). Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Disponible en:

https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/f_tecnica_bo_epidid_carnero_mz-2016.pdf

[Consultado: 18-06-2020].

The Center for Food Security and Animal Health (2006). The Center for Food Security and Animal Health. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/About/condiciones-de-uso.php?lang=es>

[Consultado: 18-06-2020].

Vidal, J., Ortiz, L. y Olivera, M. (2018). "Evolución en la clasificación filogenética de *Brucella*".

Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 21(1), pp. 109-118. DOI:

10.31910/rudca.v21.n1.2018.669

World Health Organisation Staff and World Health Organization (2004). *Laboratory Biosafety*

Manual. Disponible en: <https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>

[Consultado 5-03-2020].