

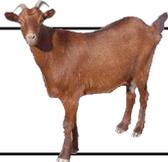
# BRUCELOSIS OVINA Y CAPRINA

**Pilar M. Muñoz Álvaro**  
***pmmunnoz@cita-aragon.es***

# Introducción

- Zoonosis de distribución mundial (Fiebres de Malta)
- Producida por bacterias del género *Brucella*
- Problemas reproductivos en el ganado y grandes pérdidas económica para el sector ganadero
- Enfermedad de declaración obligatoria sometida a campaña oficial de control y erradicación

# ESPECIES Y HOSPEDADORES

Especie de <i>Brucella</i>	Hospedador preferente	Fase colonial	Biovares
<i>B. melitensis</i>	Oveja/Cabra  	Lisa	3
<i>B. abortus</i>	Vaca 	Lisa	7
<i>B. suis</i>	Cerdo   	Lisa	5
<i>B. ovis</i>	Oveja 	Rugosa	1
<i>B. canis</i>	Perro 	Rugosa	1
<i>B. neotomae</i>	Rata del desierto 	Lisa	1
<i>B. pinnipedialis</i>	Focas 		
<i>B. ceti</i>	Cetaceos 		

Nuevas Brucellas...

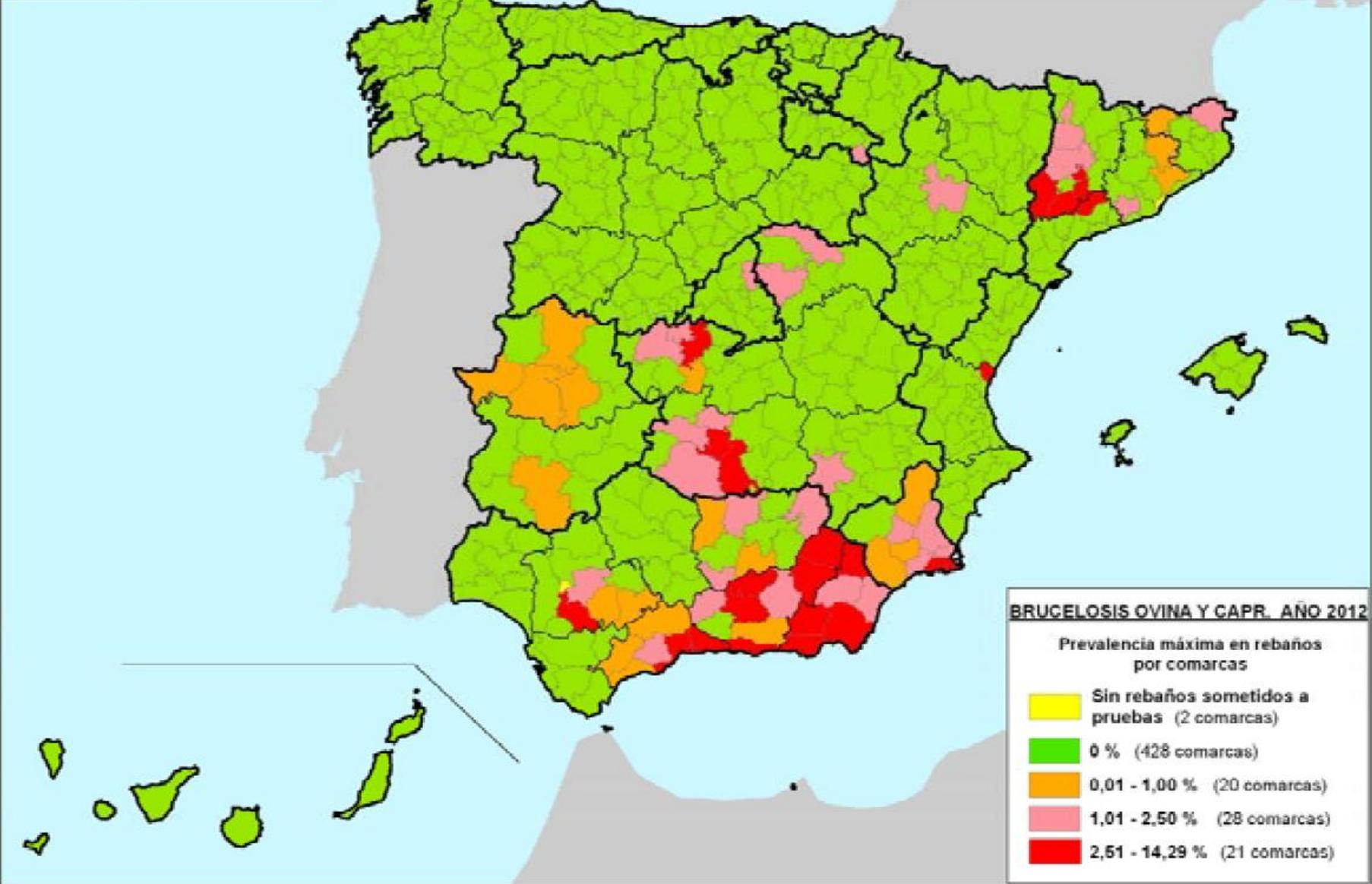
*B. microti* Topillo Lisa

*B. inopinata* Humana Lisa

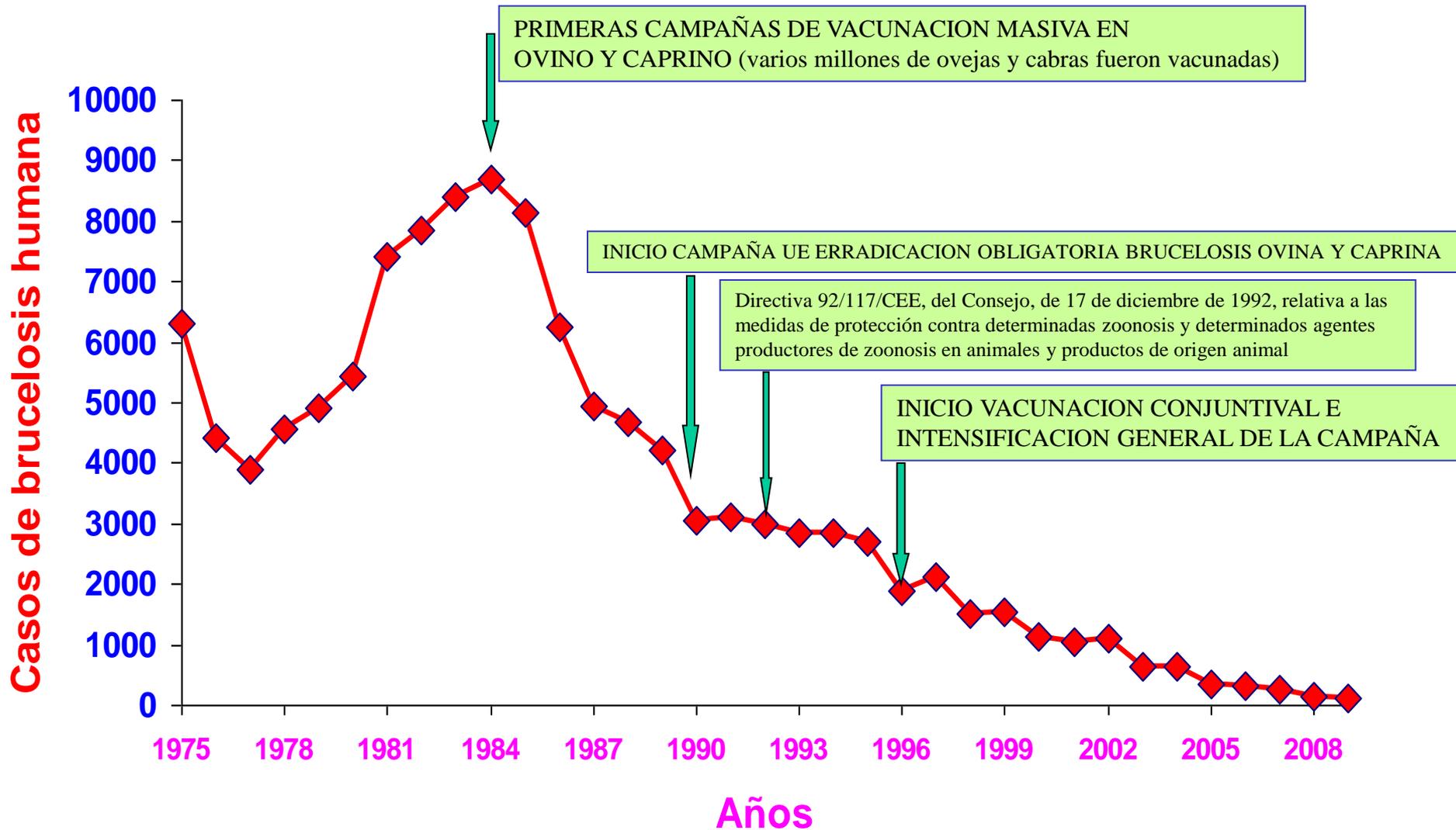
# PREVALENCIA COLECTIVA DE LA BRUCELOSIS OVINA/CAPRINA EN ESPAÑA

	1997	2000	2002	2004	2006	2008	2010	2011	2012	2013	2014
Andalucía	31,7	29,57	21,62	12,97	11,56	8,55	3,19	1,97	1,09	0,56	0,48
Murcia	55,3	26,99	0,14	6,15	3,96	7,00	3,46	1,56	0,96	0,62	0,27
Cataluña	45,9	44,58	19,09	17,51	9,53	3,14	1,68	1,65	0,68	0,49	0,17
CLM	17,4	13,12	7,96	7,52	3,55	2,11	2,52	1,27	0,61	0,39	0,25
La Rioja <sup>1</sup>	15,8	9,83	9,42	8,50	1,11	0,70	0,48	0,24	0,25	0,00	0,00
Madrid	39,2	14,98	5,10	5,60	6,44	4,01	1,33	0,62	0,15	0,30	0,15
Valencia <sup>1</sup>	55,7	39,20	26,44	15,42	8,10	5,72	4,42	3,63	0,08	0,00	0,00
Extremadura	12,5	8,71	4,34	3,68	2,22	0,95	0,39	0,27	0,07	0,04	0,02
Aragón <sup>1</sup>	64,6	42,60	15,14	5,97	1,59	0,70	0,11	0,05	0,05	0,03	0,00
C-León <sup>1</sup>	35,3	20,10	9,60	6,37	1,97	1,51	0,10	0,01	0,00	0,00	0,00
Cantabria <sup>1</sup>	3,1	2,50	2,63	1,05	0,49	0,78	0,09	0,02	0,00	0,00	0,00
Euskadi <sup>1</sup>	0,6	0,21	0,42	0,31	0,12	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Galicia <sup>1</sup>	1,4	0,52	0,18	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Baleares <sup>1</sup>	1	0,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Asturias <sup>1</sup>	0,8	0,21	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Navarra <sup>1</sup>	9,5	2,50	1,30	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Canarias <sup>1</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Total</b>		<b>15,61</b>	<b>7,18</b>	<b>5,12</b>	<b>3,20</b>	<b>2,11</b>	<b>0,89</b>	<b>0,54</b>	<b>0,26</b>	<b>0,17</b>	<b>0,15</b>

1 CCAA en las que la vacunación ha sido retirada



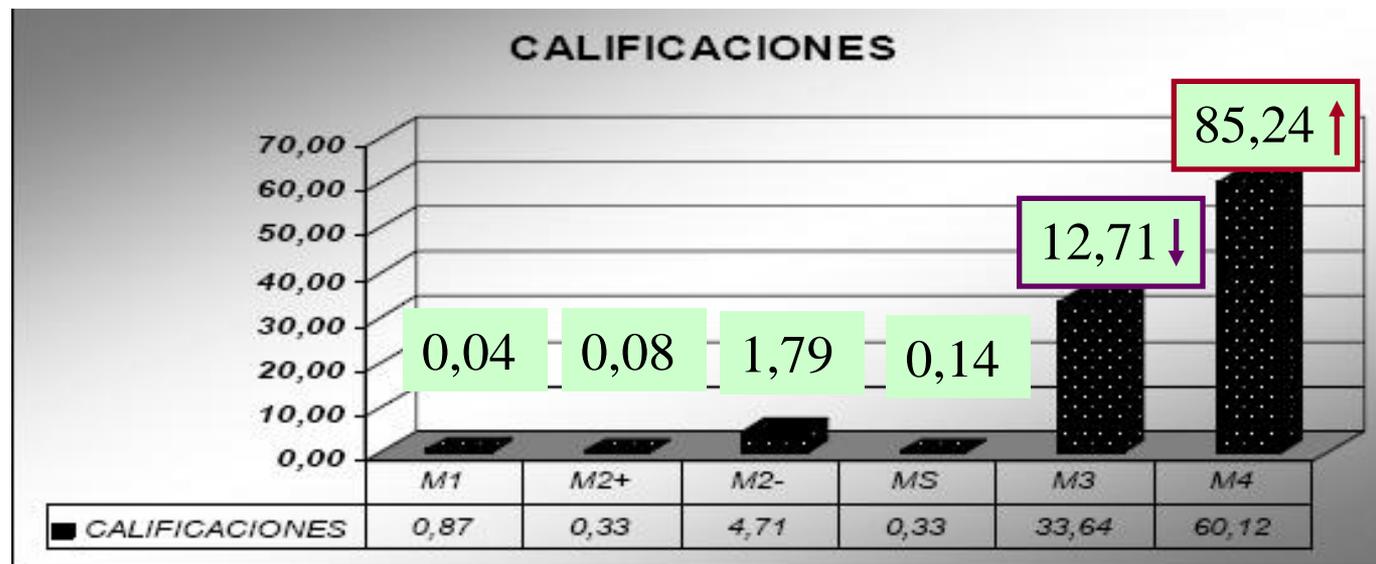
# EVOLUCIÓN DE LOS CASOS DE BRUCELOSIS HUMANA EN ESPAÑA



# Epidemiología

## Calificación sanitaria de las ganaderías

- M1 → No se conoce su estatus sanitario
- M2 → Infectada o en pruebas para conseguir M3
- M3 → Libres de infección (vacunación)
- M4 → Oficialmente libres de infección (no vacunación)



## ¿CÓMO APARECE EN EL REBAÑO?

**PRINCIPALMENTE** tras introducir animales de reposición de **origen desconocido** o con **carta sanitaria mal certificada**

Es fundamental el control de los movimientos pecuarios

**OTRAS CAUSAS:** Contacto **estrecho** con otros animales infectados o con productos o alimentos contaminados por ellos

## RIESGOS DE CONTRAER BRUCELOSIS

- Aumentan cuando no hay vacunación
- Aumenta en sistemas extensivos-trashumantes
- Disminuye en ciclo cerrado (no se compra reposición externa)
- Contacto con otras especies animales



## Vacas - Ovejas - Cabras

- Riesgo alto de transmisión de *B. melitensis* a las vacas (aprox. **30% de los casos**)
- Riesgo de transmisión de *B. abortus* a las ovejas-cabras

Perros ⇒ **VICTIMAS** ⇒ indicadores del estado del rebaño  
CONTROLAR por serología ⇒ Tratar o sacrificar

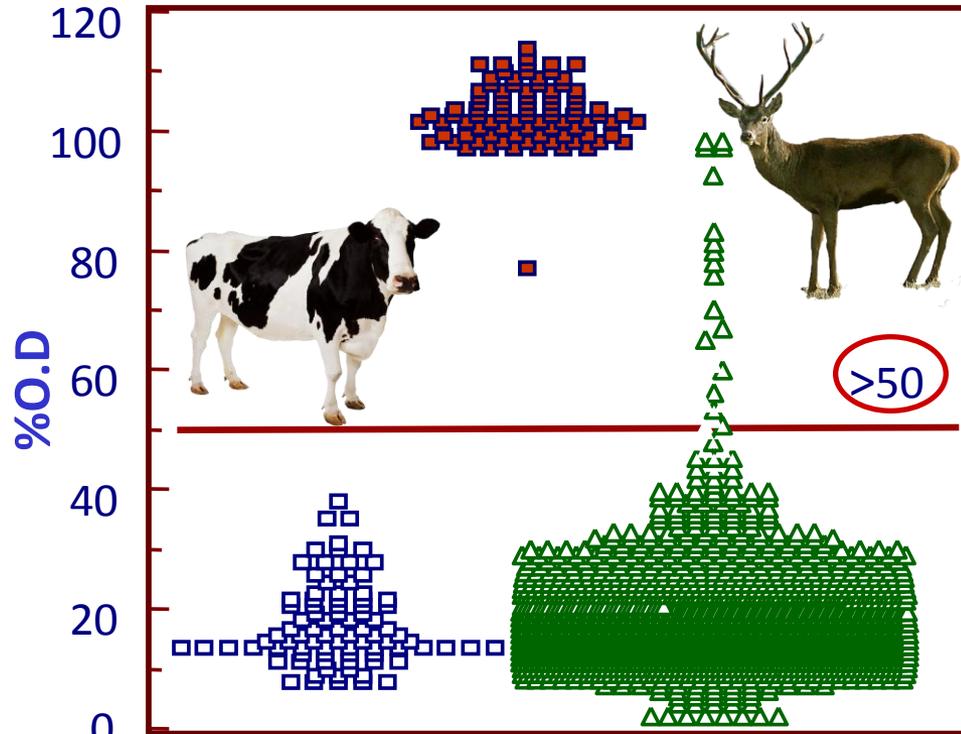
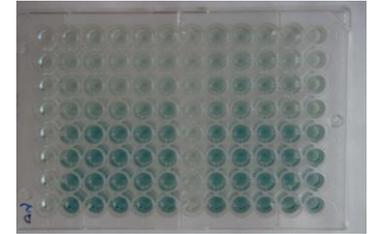


# Rumiantes silvestres



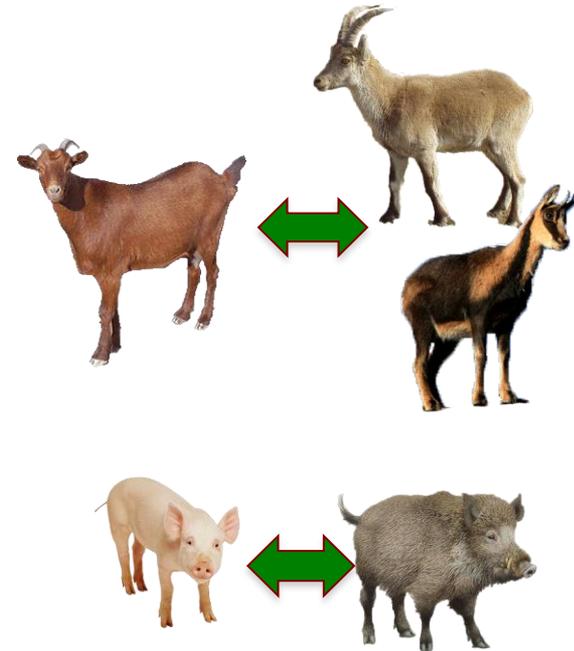
# Puesta a punto de un ELISA indirecto multiespecie

- Antígeno: extracto fenol-agua de *B. melitensis* 16M
- Conjugado: Proteína G-peroxidasa

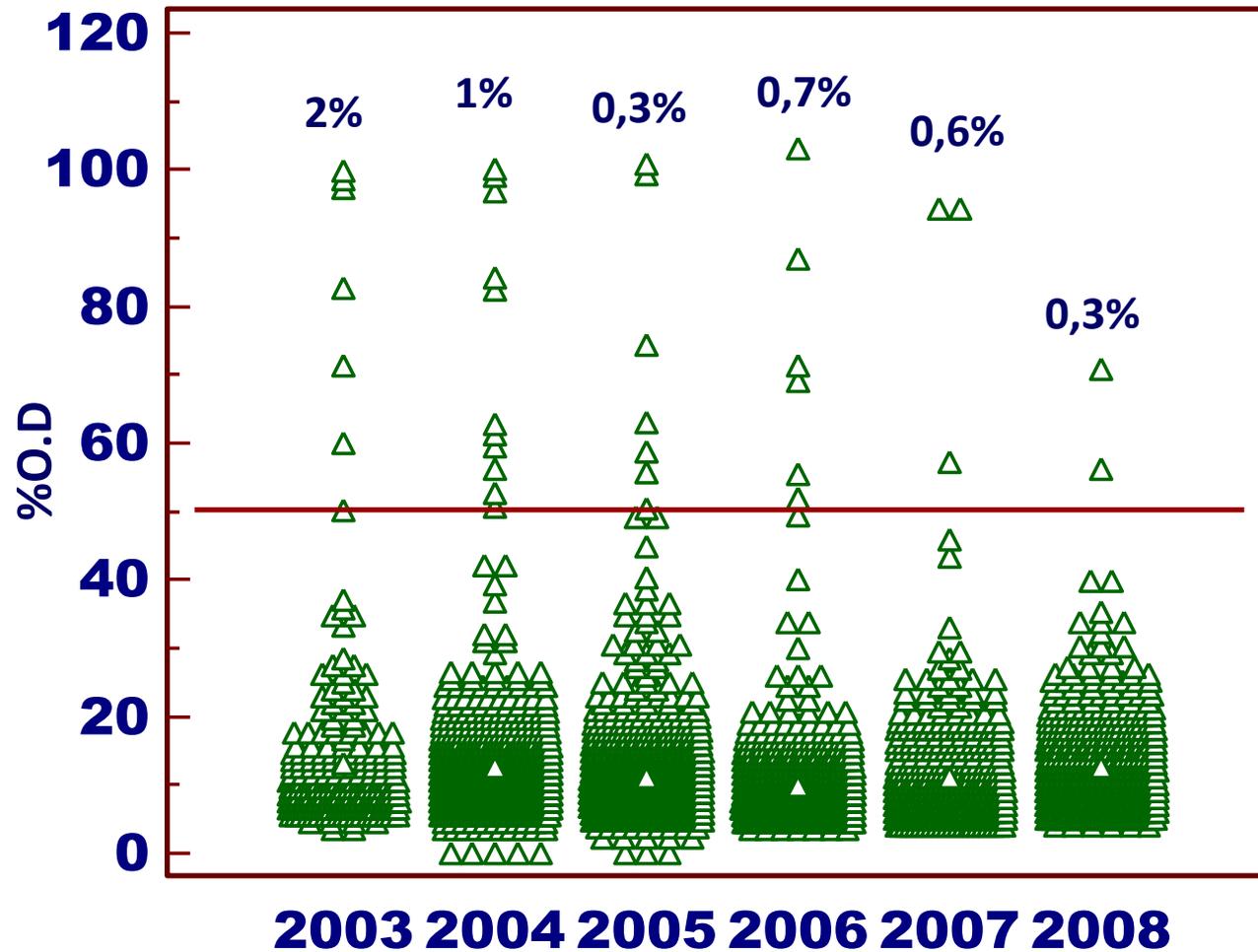


- Bovino Cultivo positivo
- Bovino libre de infección
- △ Ciervo

100% Sensibilidad diagnóstica  
100% Especificidad diagnóstica



# EVOLUCIÓN DE LA PREVALENCIA DE BRUCELOSIS EN CIERVO (*Cervus elaphus*)

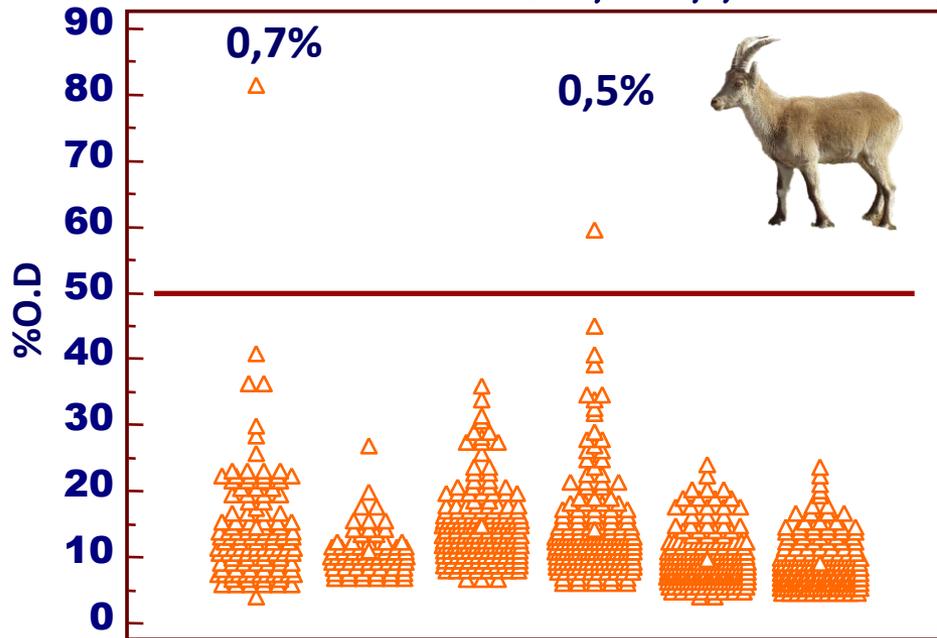


n: 306 1004 1685 1034 535 689

Y así...Hasta 2016

# EVOLUCIÓN DE LA PREVALENCIA DE BRUCELOSIS EN OTROS RUMIANTES

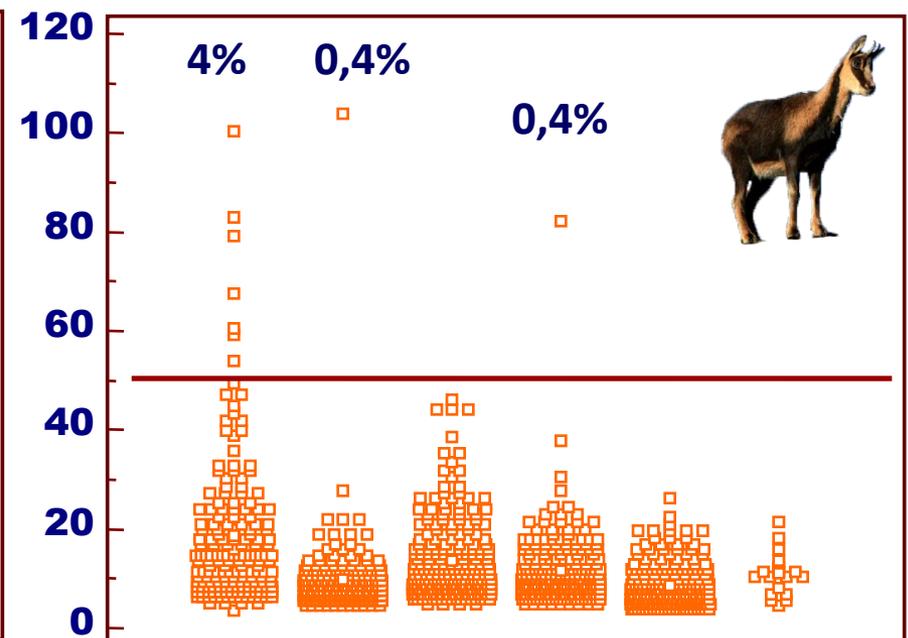
Cabra montesa (*Capra pyrenaica*)



2003 2004 2005 2006 2007 2008

n: 130 77 217 199 246 240

Sarrío (*Rupicapra pyrenaica*)



2003 2004 2005 2006 2007 2008

n: 178 229 252 273 253 18

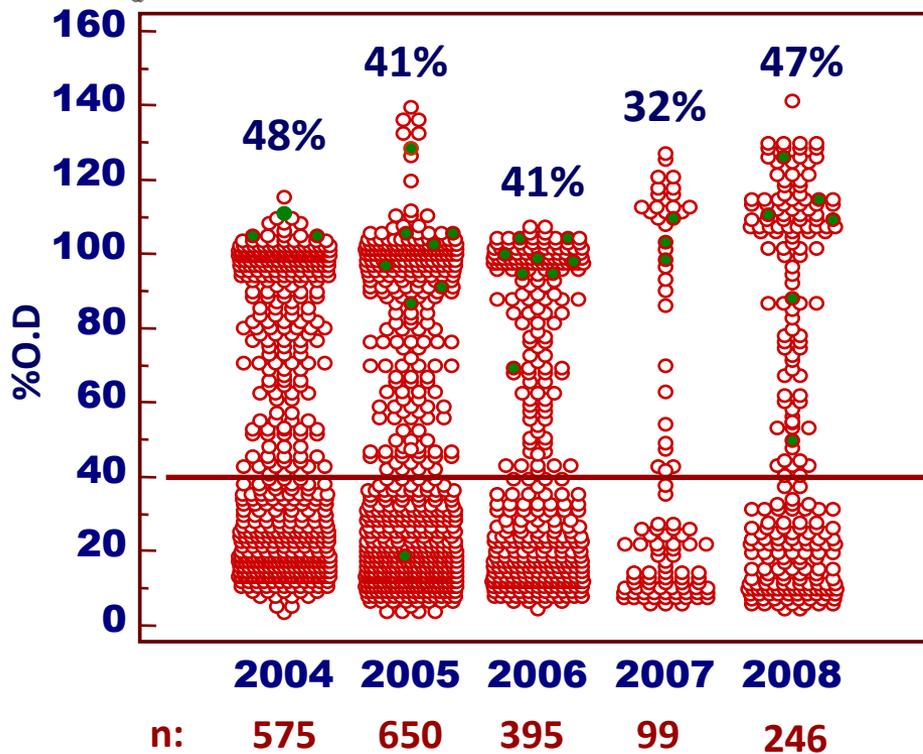
Y así...Hasta 2016



# EVOLUCIÓN DE LA PREVALENCIA DE BRUCELOSIS EN JABALÍ (*Sus scrofa*)



## Área centro-sur

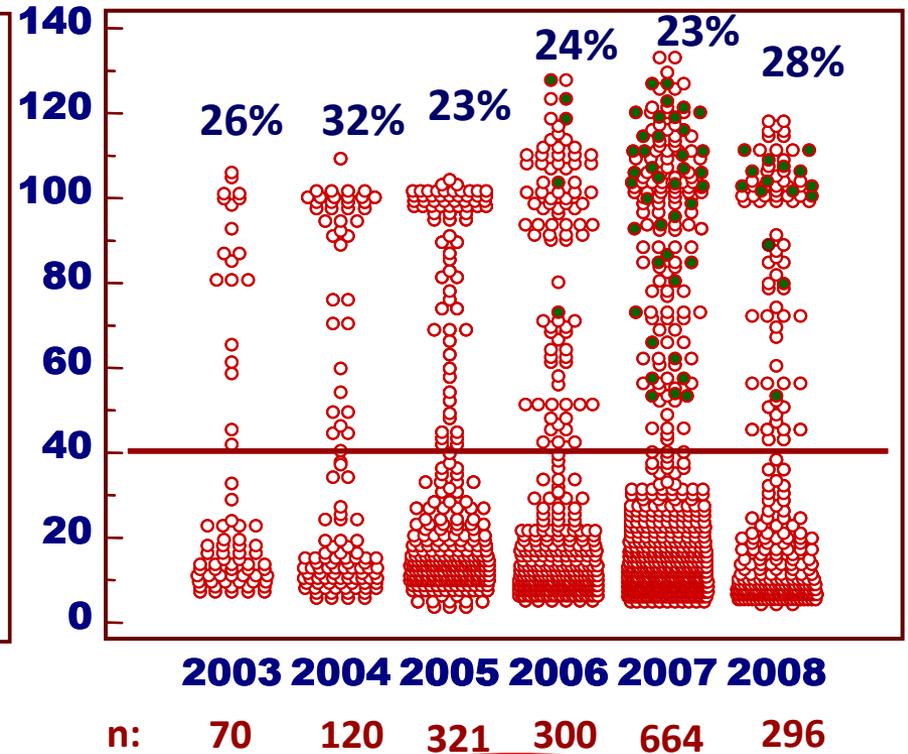


28 *B.suis* biovar.2

n:175

● *Brucella* cultivo positivo

## Área Noreste



59 *B.suis* biovar.2

n:546

Situación similar hasta hoy





# Distribución de la infección por *Brucella* en animales naturalmente infectados

	<b>57 Vacas</b> <i>Phillipon et al. 1970</i>	<b>142 Ovejas</b> <i>Marín et al. 1996</i>	<b>40 Cabras</b> <i>Marín et al. 1996</i>
<b>Cranial lymph nodes</b>	<b>75 %</b>	<b>33.8 %</b>	<b>80.0 %</b>
<b>Scapular lymph nodes</b>	<b>70 %</b>	<b>33.8 %</b>	<b>50.0 %</b>
<b>Prefemoral lymph nodes</b>	<b>70 %</b>	<b>36.6 %</b>	<b>47.5 %</b>
<b>Iliac lymph nodes</b>	<b>83 %</b>	<b>51.4 %</b>	<b>65.0 %</b>
<b>Mammary lymph nodes</b>	<b>89 %</b>	<b>81.7 %</b>	<b>82.5 %</b>
<b>Spleen</b>	<b>76 %</b>	<b>36.0 %</b>	<b>25.0 %</b>
<b>Uterus</b>	<b>51 %</b>	<b>19.7 %</b>	<b>25.0 %</b>
<b>Milk</b>	<b>60 %</b>	<b>62.5 %</b>	<b>74.3 %</b>

# VIAS DE EXCRECION

**VAGINAL** tras el aborto o parto normal

- Muy **importante** ( $10^{10}$  UFC/ml)
- Muy **duradera** (2 meses o más)

**LECHE** Fase crónica ⇒ **70-80 %** ganglios supramamarios



**facilita la transmisión** de la infección por ordeño y de madres a hijos.

**SEMEN**

**Solo cuando excretan son peligrosos para el resto de animales y para el hombre**

# VIAS DE TRANSMISION (*B. melitensis*)

Mucosa orofaringea

Sexual



Ordeño ⇒ muy importante en granjas lecheras

Congénita ("*in utero*") y/o perinatal (leche) ⇒ Infección Latente  
⇒ 10% de hijos de madres infectadas (no demostrada en *B. ovis*)

# VIAS DE TRANSMISION (*B. ovis*)

1- Venérea (macho-hembra-macho)

2- **Oral:**

- **Heterosexual durante monta**

- **Homosexual durante estabulación de machos**

3- **Congénita??** (no demostrada):

- “in utero”

- Perinatal por consumo de leche infectada



## Excreción de *B. ovis* en ovejas gestantes tras la infección por vía conjuntival a mitad o final de gestación

### Porcentaje de ovejas excretoras de *B. ovis*:

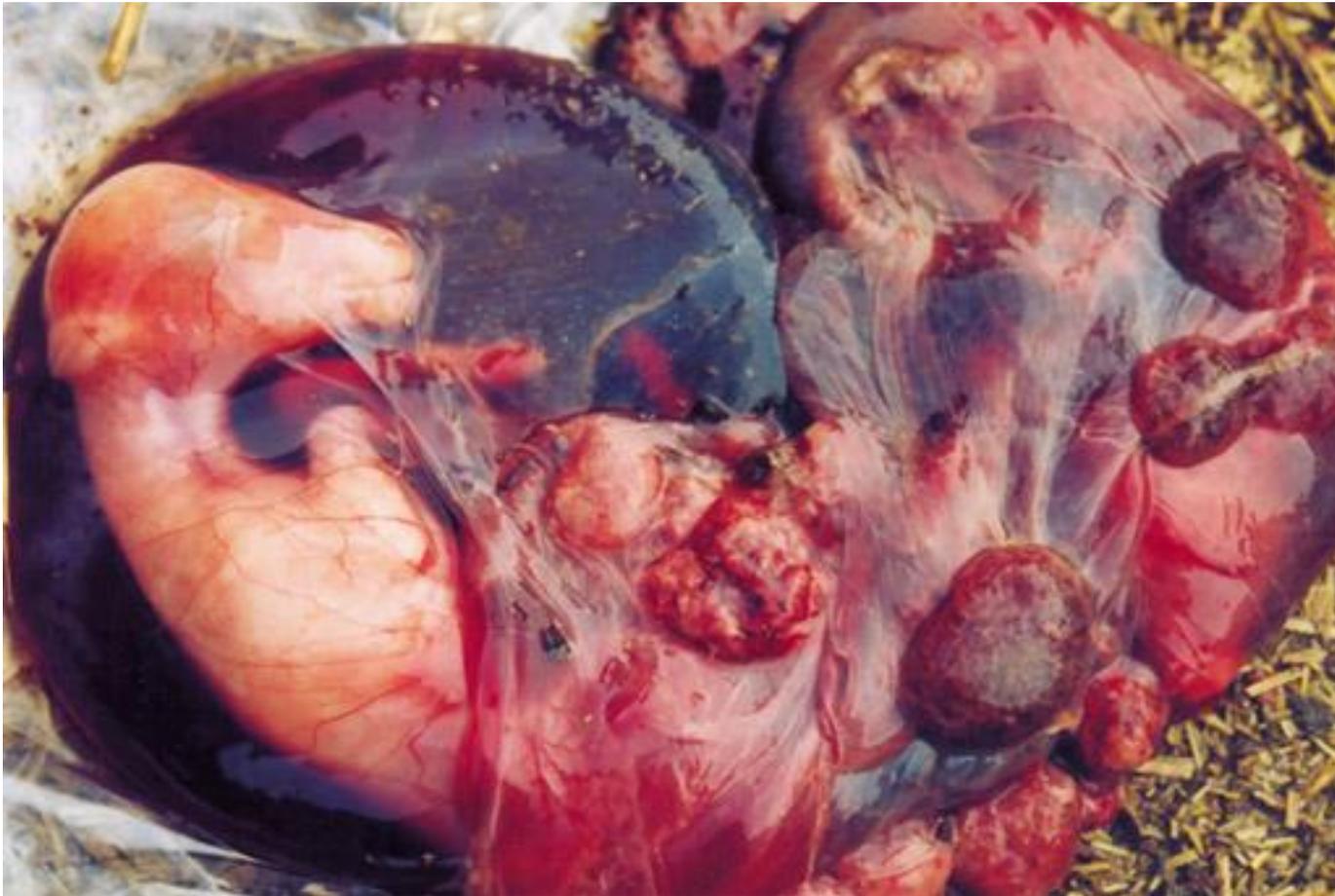
Momento de infección	Vía vaginal		Leche	
	Nacimiento	Destete*	Nacimiento	Destete*
Mitad de gestación (n=24)	24 (100%)	8 (33.3%)	15 (62.5%)	11 (45.8%) 2 Años!!
Final de gestación (n= 16)	6 (37.5%)	1 (6.3%)	10 (62.5%)	4 (25%)

(\* Destete a los dos meses del nacimiento)

# Diagnóstico Clínico de la infección por *B. melitensis*

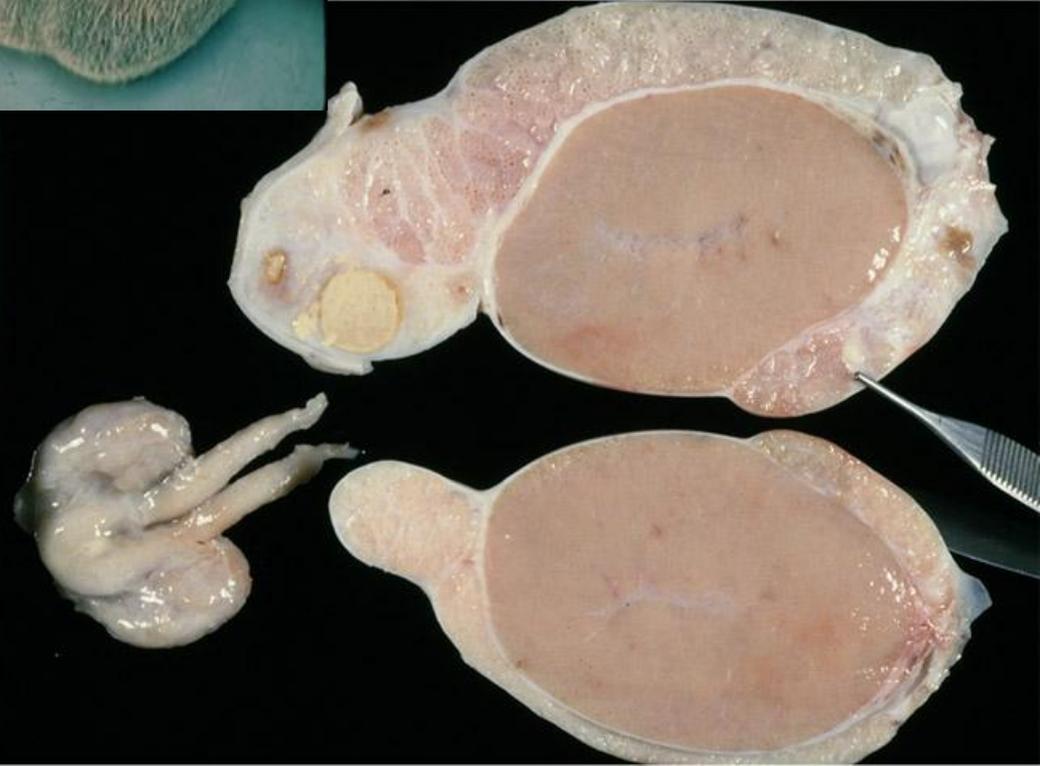
Examen de placenta ⇒ **imposible**

Aspecto aborto ⇒ Brucelosis no es sinónimo  
**de aborto**



# Diagnóstico clínico de la brucelosis ovina producida por *Brucella ovis*

Orquiepididimitis



# DIAGNOSTICO LABORATORIAL DE LA BRUCELOSIS OVINA

## □ DIRECTO: Bacteriológico

PCR

## □ INDIRECTO:

- Detección de anticuerpos (**Serológico**)
- Detección de la respuesta celular
  - *in vivo* (**test alérgico**) ⇒ **BRUCELLINA**
  - *in vitro*:
    - transformación linfocitaria
    - detección de IL / IFNg

# Diagnóstico bacteriológico: muestras de animales vivos

## Hembras

Descargas vaginales tras el aborto o parto

(1-2 semanas)

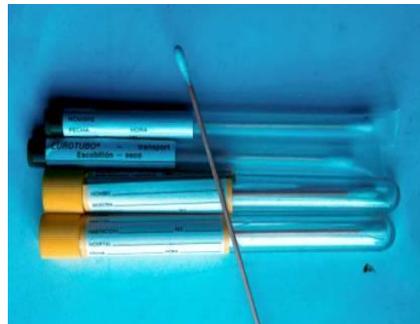
Leche (40-50 ml) de cada ubre

Recuerda!! **Cambiate los guantes entre animales** para evitar la contaminación cruzada



Escobillones con/sin medio

## Machos Semen



Electroejaculación



EN TODOS LOS CASOS!!

Sangre: minimo 10 ml!!

# Muestras de necropsia para diagnóstico bacteriológico

+



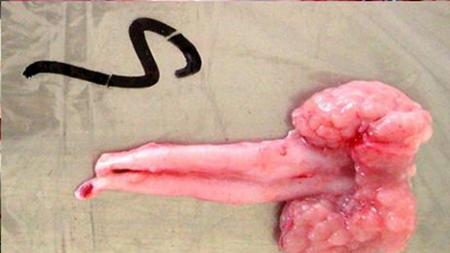
Supramamary LN



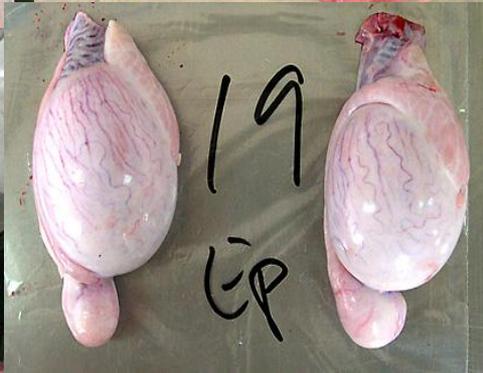
Cranial LN



Spleen



Escapular LN



**Ganglios linfáticos**

**Bazo**

**GInd. mamaria**

**Utero**

**Epidídimo**

**GInd. Sexuales accesorias**

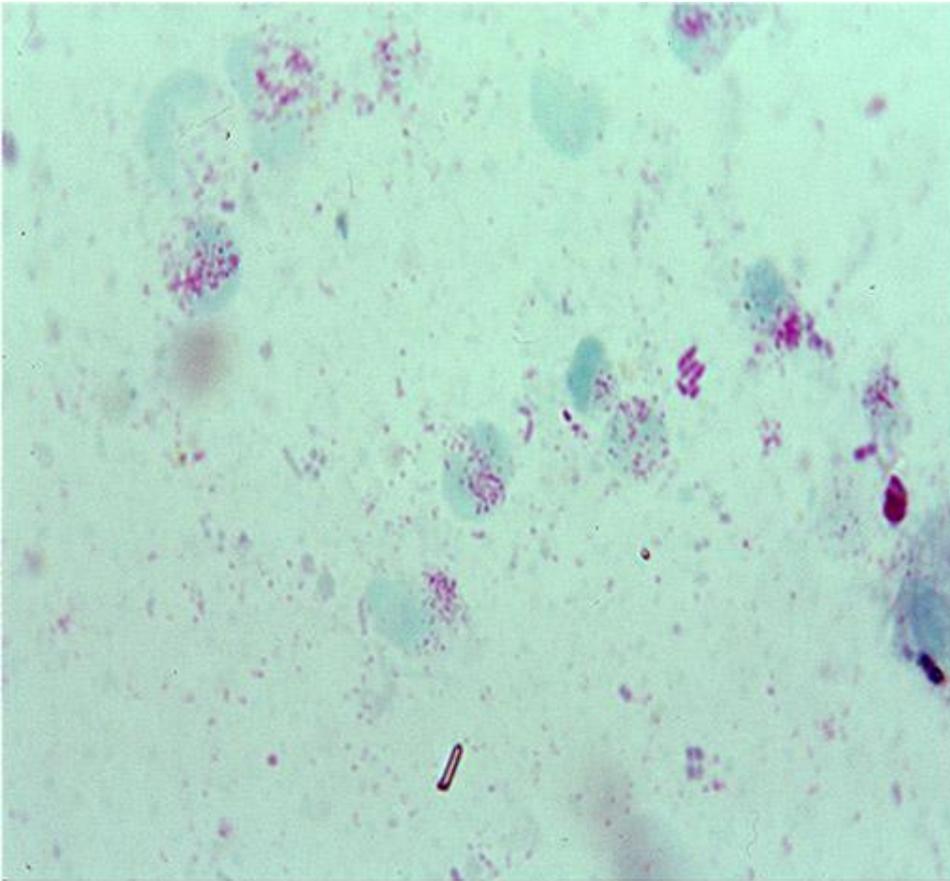


# DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

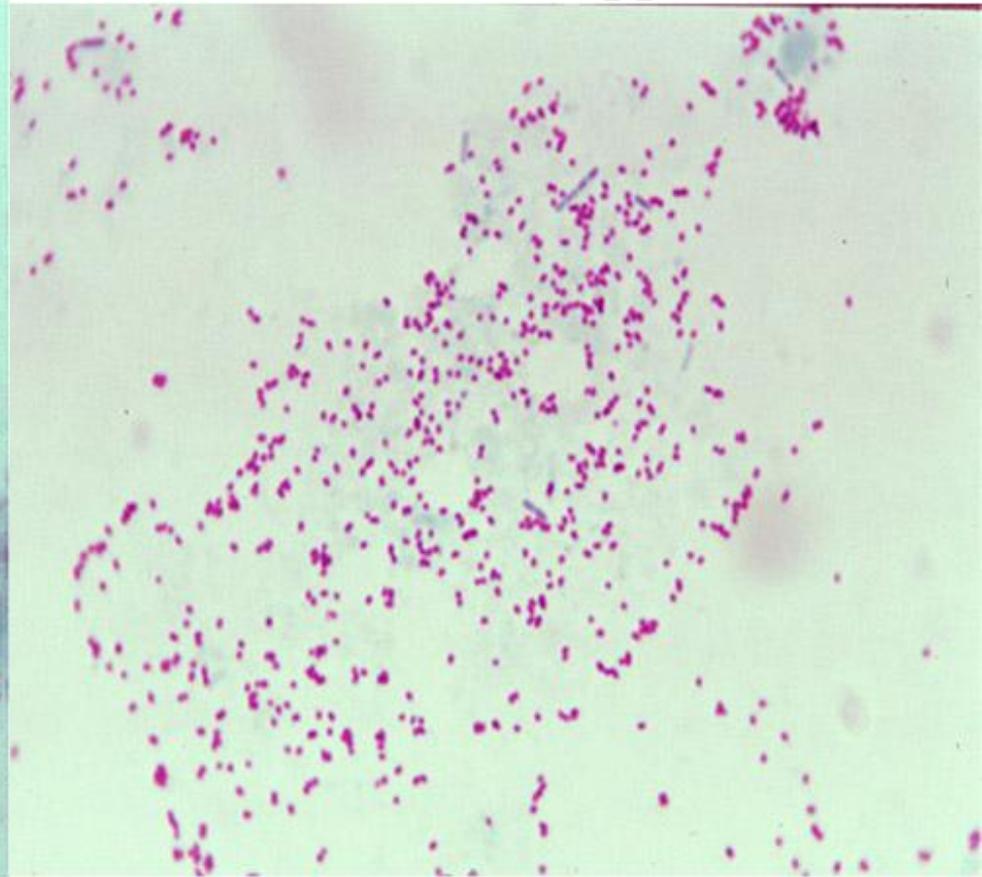
## METODOS

**Bacterioscópico:** frotis teñidos Stamp ⇒ Presuntivo

*Chlamydia abortus*



*Brucella spp*



# DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

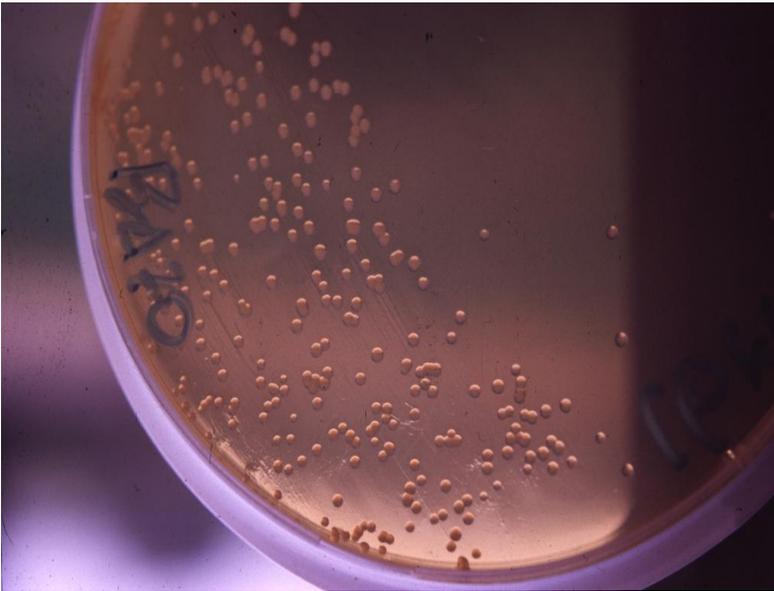
□ **Aislamiento en cultivo** ⇒ **Confirmatorio**

- medio no selectivo: **Agar Sangre**

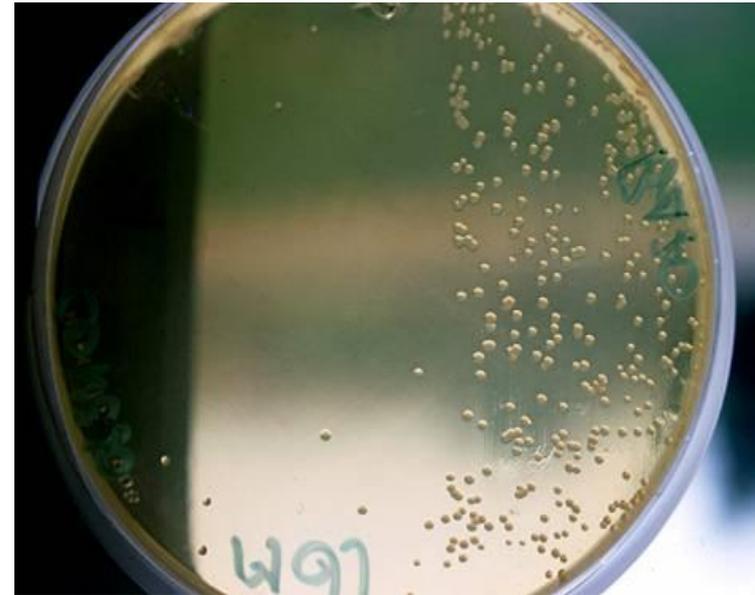


- medios selectivos con antibióticos:

**Medio selectivo de Farrell**



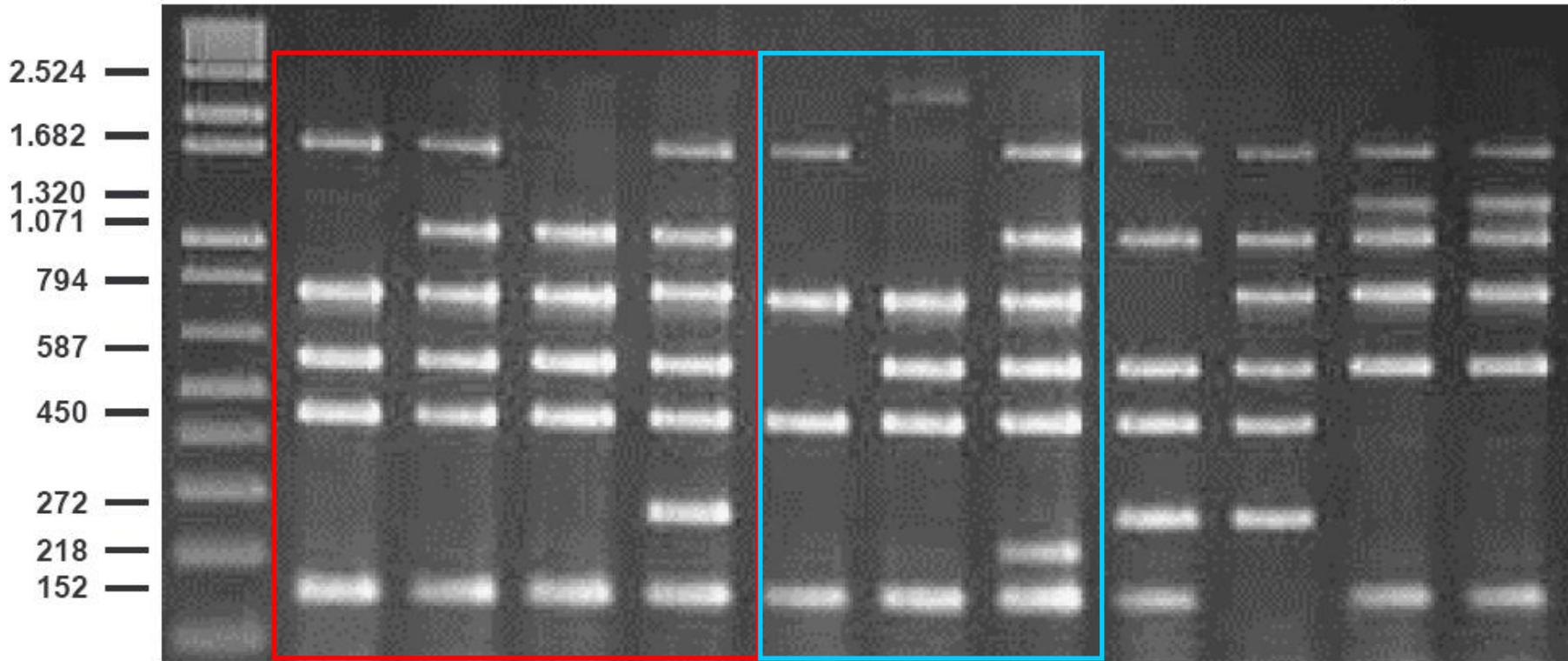
**Medio selectivo CITA**



Combinación mas efectiva (sembrar cada muestra en 2 placas).  
Ojo! Medio Farrell NO sirve para *B. ovis* (usar solo medio CITA)

# BRUCE-LADDER = PCR MULTIPLEX

A M O S S19 RB51 Rev1 C N Bp Bc



# □ PCR directa en leche / semen /muestras de necropsia

Menos sensible

Riesgo de falsos positivos



Mas de 50 referencias sobre PCR directa en muestras de campo...

- ✿ La mayoría no usa muestras Gold Standard (procedentes de animales cultivo positivo y libres de Brucella) para determinar adecuadamente la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) de la técnica
- ✿ A menudo el "Gold Standard" se basa en resultados serológicos obtenidos con tests de dudosa eficacia
- ✿ Muchos autores usan métodos de cultivo poco eficientes, con lo cual, la sensibilidad de la PCR se sobreestima.
- ✿ La eficacia diagnóstica (Se y Sp) y los límites de detección de una misma PCR varía entre autores

# DIAGNOSTICO SEROLOGICO

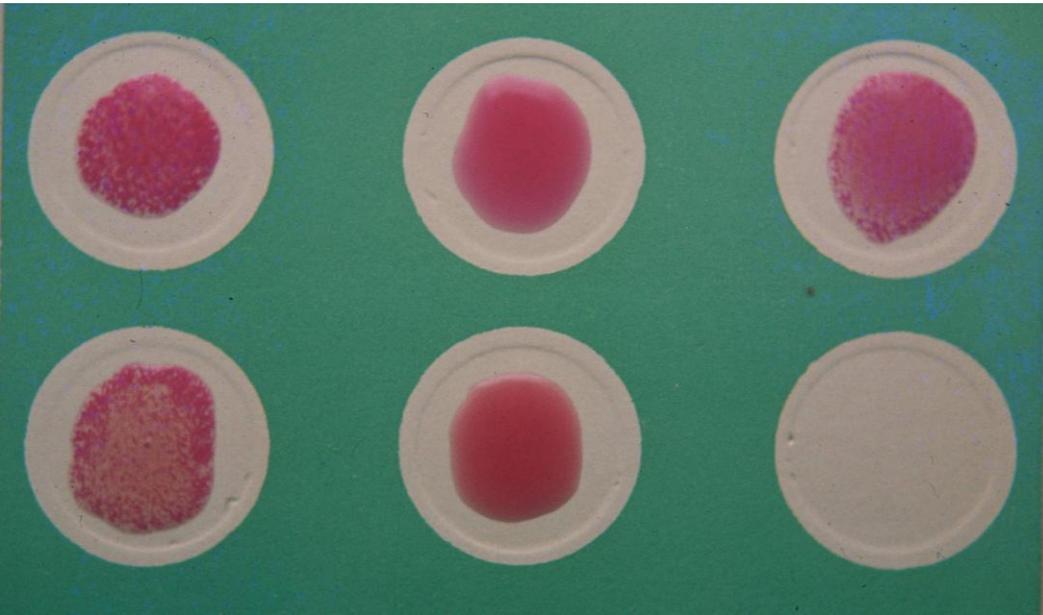


# DIAGNOSTICO SEROLOGICO

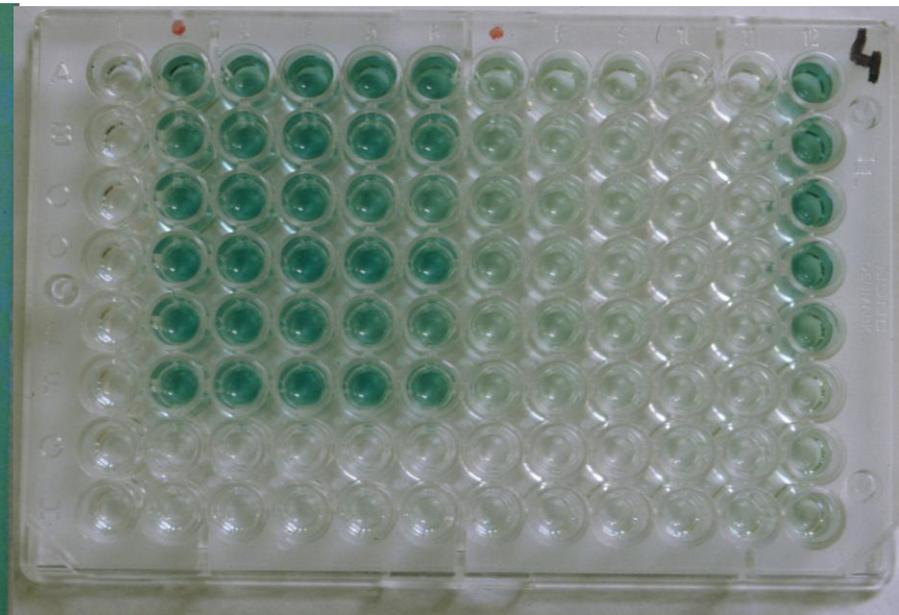
⇒ **SCREENING:**

- Rosa de Bengala (suero) OFICIAL para *B. melitensis*
- iELISA (suero / leche)

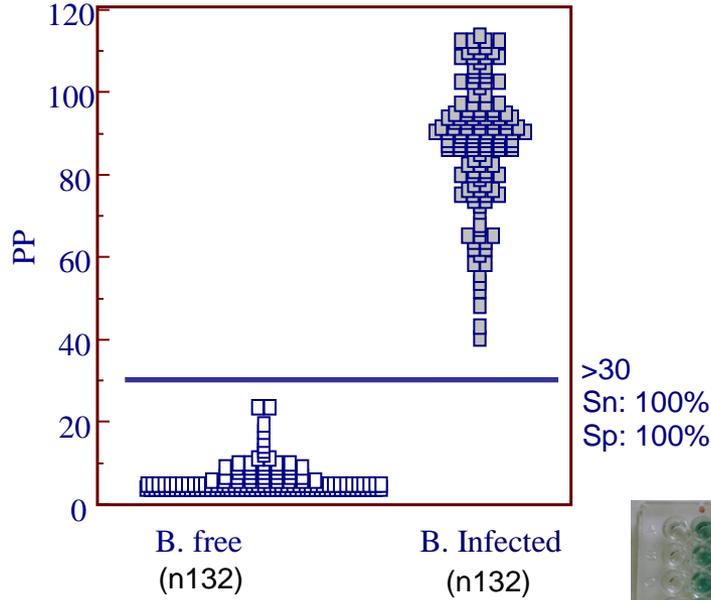
RB



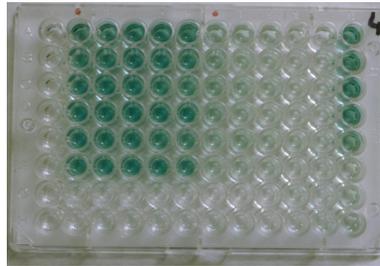
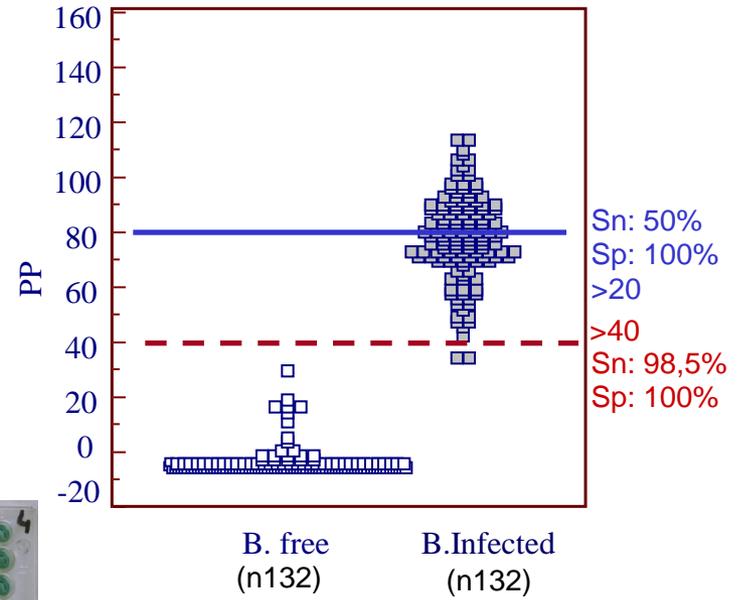
ELISA



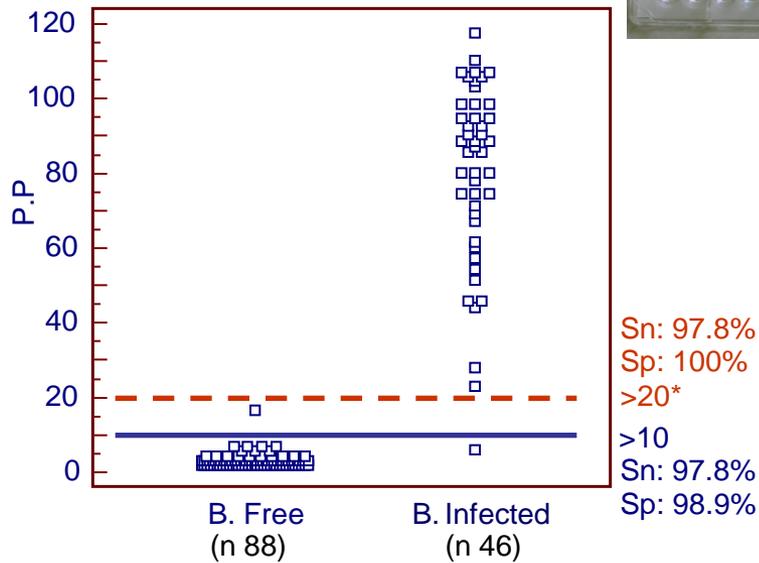
### Ingenasa i-ELISA **ovino**



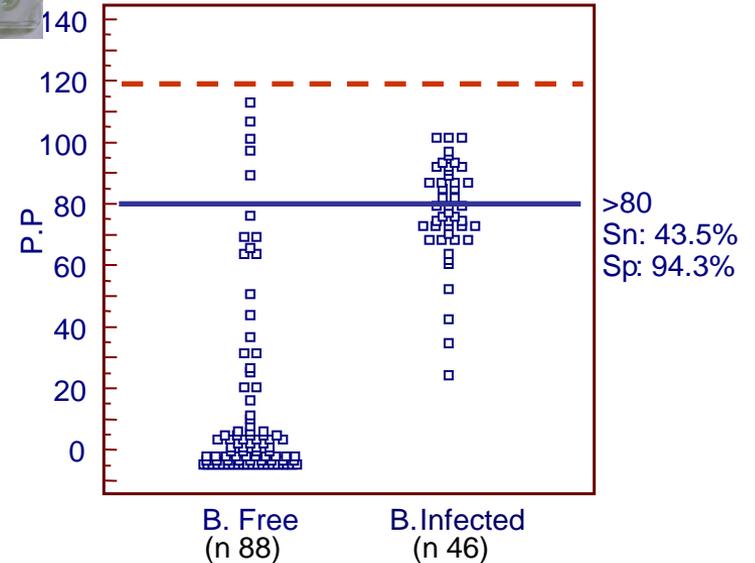
### IDEXX Checkit i-ELISA **ovino**



### BRUCELISA i-ELISA **caprino**



### IDEXX Checkit i-ELISA **caprino**



# DIAGNOSTICO SEROLOGICO

Pruebas "CONFIRMATORIAS" prescritas por la OIE:

□ **Fijación de Complemento (suero):** Técnica **OFICIAL**

- Técnicamente compleja
- Sensibilidad moderada

□ **cELISA** (suero / leche)



FC

□ **Técnica de Polarización de Fluorescencia (FPA)** (suero)

- Sensibilidad y especificidad similar al RB o iELISA
- Cara!!

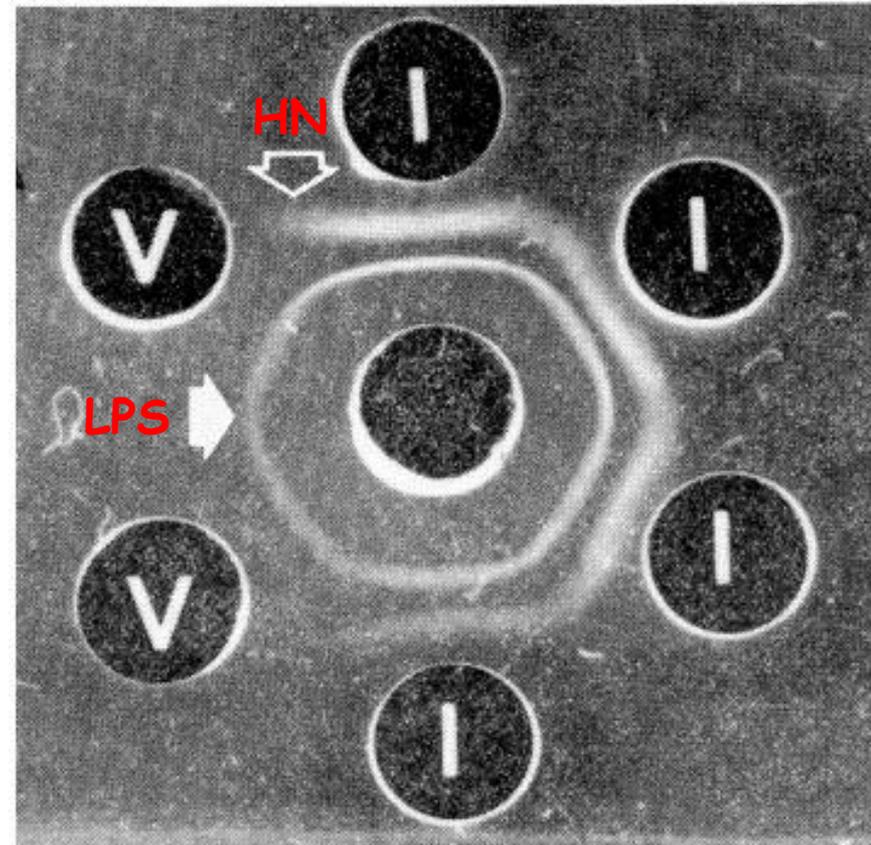
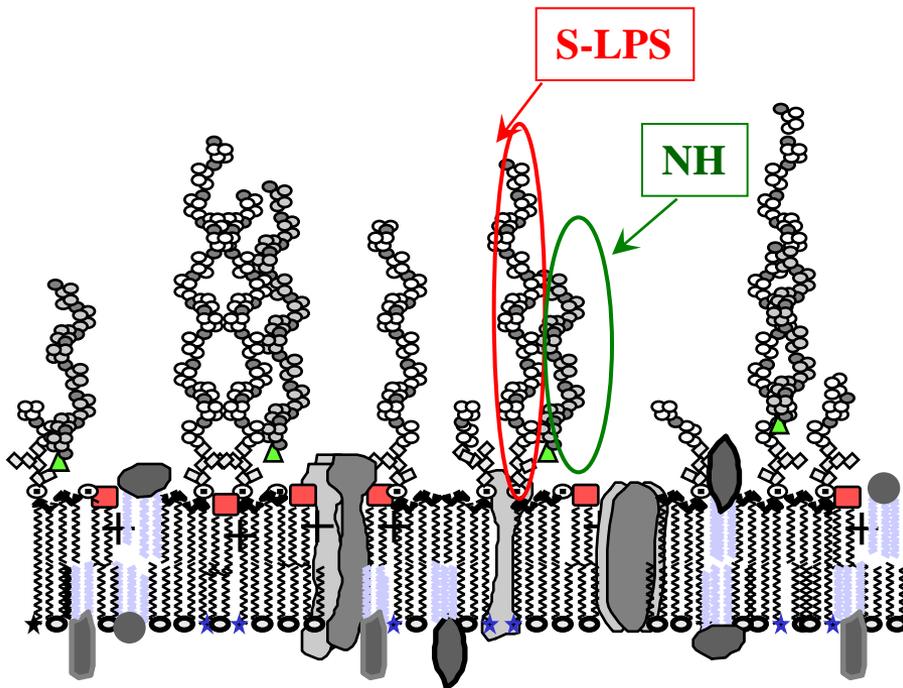
# DIAGNOSTICO SEROLOGICO

Otras pruebas complementarias:

**Difusión en Gel:**

Útil para diferenciar los animales realmente peligrosos.

➤ Barata y sencilla!!



# DIAGNOSTICO SEROLOGICO

Otras pruebas complementarias:

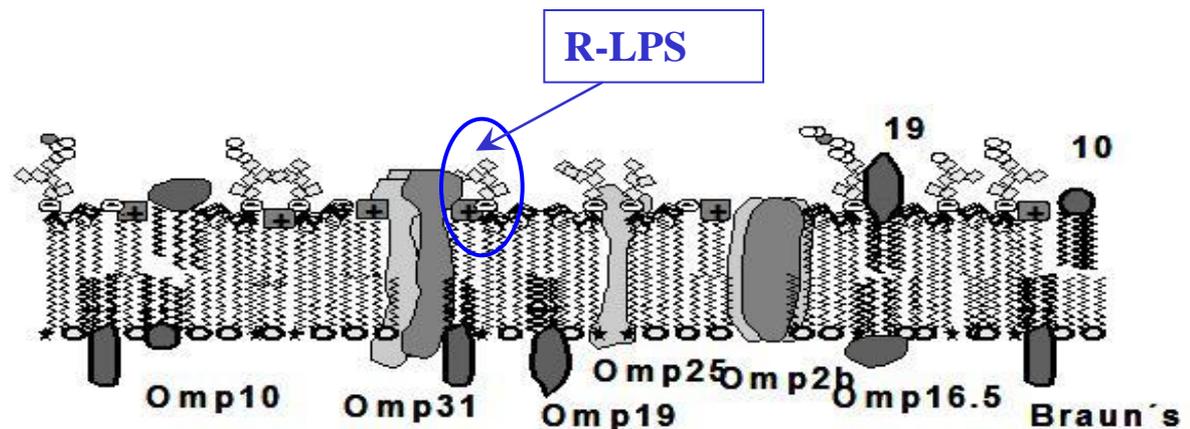
Difusión en Gel:

Útil para diferenciar los animales realmente peligrosos.

➤ Barata y sencilla!!

➤ Sirve también para *B. ovis* utilizando un antígeno rugoso

*B. ovis* (rugosa)



# "DOGMA ": La vacunación con Rev 1 afecta siempre a la especificidad del diagnóstico serológico

Depende de...

Vía de vacunación

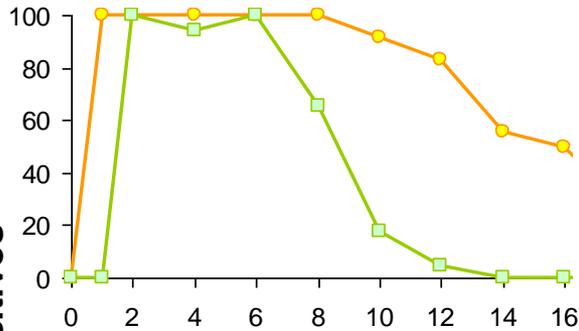
Edad del animal

Test diagnóstico

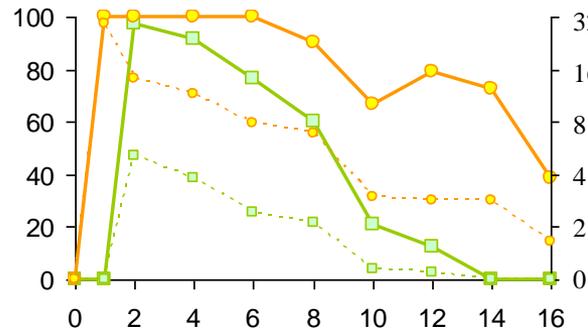
□ CJ ○ SC

Animales jóvenes

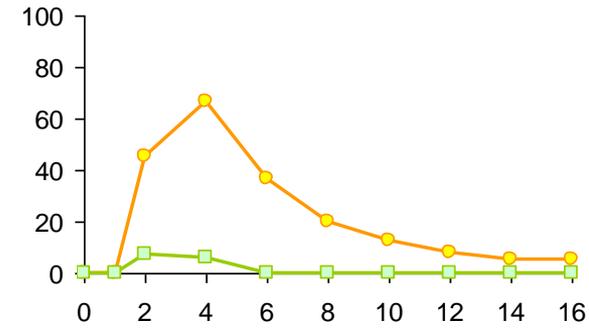
RB



FC

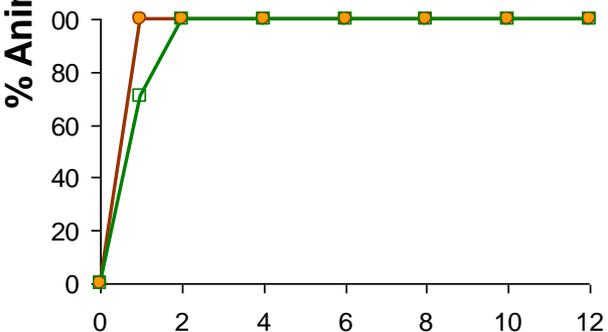


DG (HN)

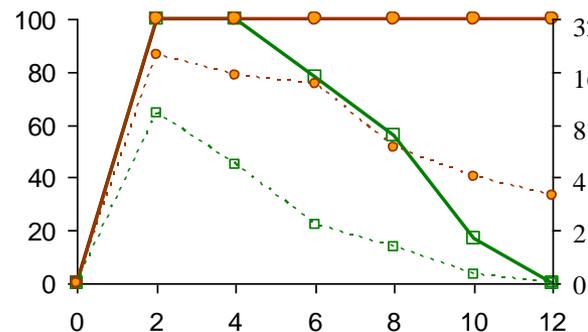


Animales adultos

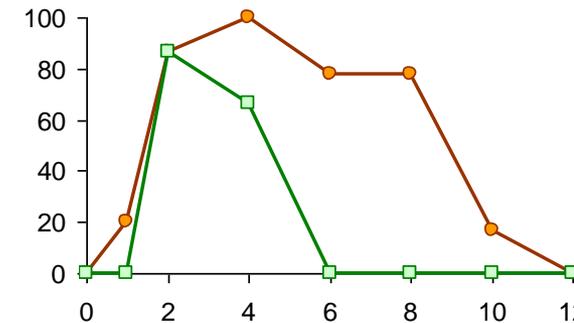
RB



FC



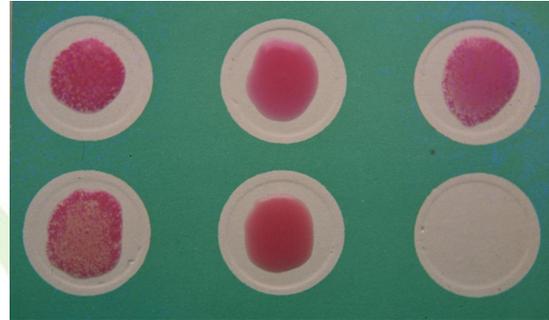
DG (HN)



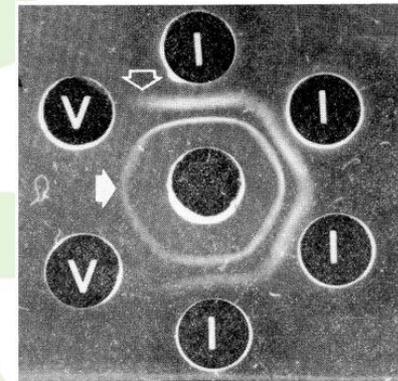
Semanas postvacunación

# Combinación de técnicas idónea (*B. melitensis*):

➤ RB para screening



➤ DG-HN como complementaria



➤ Sentido común!!!!

Acompañar los resultados serológicos de información clínica y epidemiológica

## Técnicas idóneas (*B. ovis*):

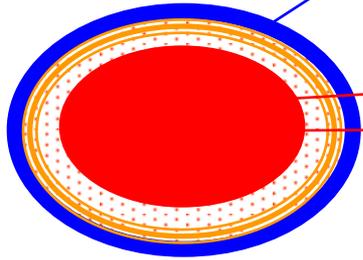
➤ DG / iELISA con antígeno rugoso

➤ Sentido común!!!!

Acompañar los resultados serológicos de información  
clínica y epidemiológica

# BRUCELINA

S-LPS/OPS epitopos comunes con otras bacterias  
(*Y. enterocolitica* O:9)



*B. suis*

**PROTEINAS CITOSOLICAS-PERIPLASMICAS  
(BRUCELLINA)**

compartidas por todas especies de *Brucella*  
a diferencia del S-LPS, **inducen hipersensibilidad (DTH)**

**Son totalmente (mayoritariamente) específicas de *Brucella*  
y no son compartidas por bacterias como *Y. enterocolitica* O:9**

**RESUELVEN el problema de las FPSR causadas  
por el S-LPS de otras bacterias**

**Test serológicos  
(CIE, RID)**

**CMI *in vivo*  
Prueba cutánea (DTH)**



Gran Especificidad en presencia de REACCIONES  
CRUZADAS (*Y. enterocolitica* O:9, sobre todo)

Útil para detectar rebaños realmente infectados  
Pocos estudios en *B. ovis*

**INCONVENIENTE:**

Los animales vacunados con Rev 1 dan positivo

Incompatible con programas de vacunación

## ¿Cual debería ser la vacuna ideal?

- ▶ Inmunidad sólida y duradera
- ▶ **Inocua** (uso en todas condiciones fisiológicas)
- ▶ No interfiera con las pruebas de diagnóstico serológico (**compatible con programas de erradicación**)

## Actualmente se administran las vacunas Vivas:

### ▶ Vacunas clásicas EN FASE LISA:

*B. abortus* B19 para Bovino



*B. melitensis* Rev 1 para Ovino /caprino



### ▶ Mutante EN FASE RUGOSA:

*B. abortus* RB51 (Bovino)



¿ovino/caprino?

# Vacunación con Rev 1 por vía CONJUNTIVAL:



Animales de reposición 3-4 meses

Protege frente a *B. melitensis* y *B. ovis*



NO produce lesión testicular en machos ovinos



ABORTOS cuando se vacunan ovejas gestantes  
(especialmente a mitad de gestación)



La INTERFERENCIA DIAGNÓSTICA es MÍNIMA cuando se vacunan ANIMALES JÓVENES (3-4 meses). Además, la prueba de DG con S-LPS/HN permite diferenciar los animales epidemiológicamente peligrosos

# Vacunas DIVA:

## Rugosas:

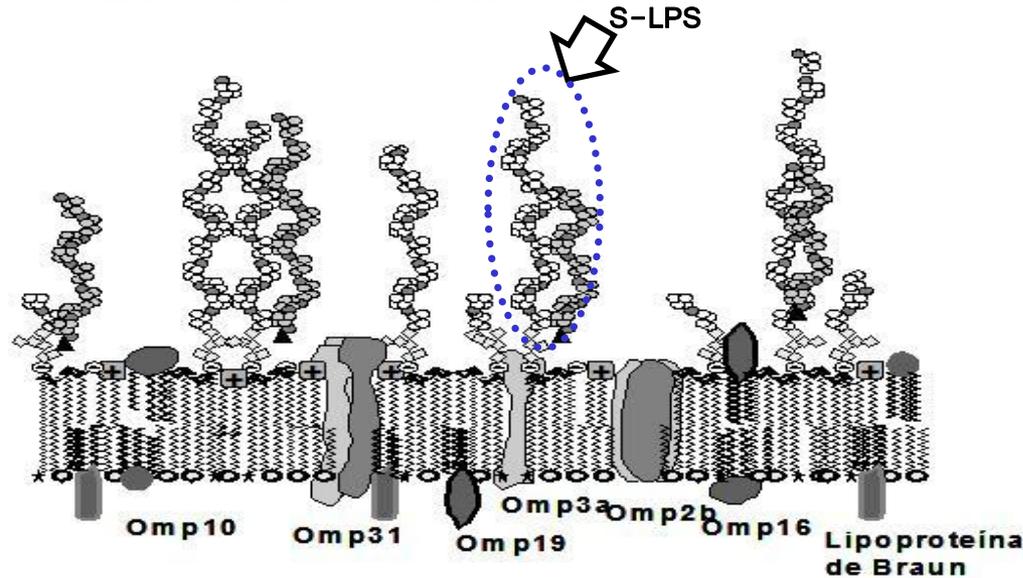
se elimina la cadena O del S-LPS mediante manipulación genética para que no interfieren en los tests diagnósticos oficiales (RB, FC, ELISA etc..)

# LAS VACUNAS RUGOSAS

UN GRAN PRODUCTO DE MARKETING CON "APARENTES" GRANDES CUALIDADES:

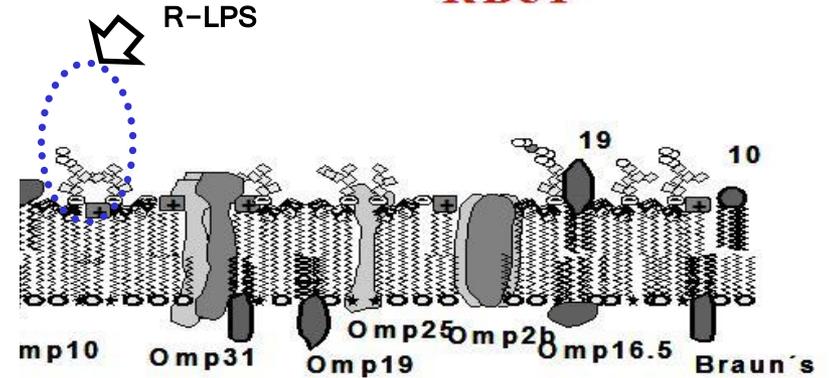
☺ **RUGOSAS** = Carecen de O/PS ⇒ No interferencias diagnósticas

*B. melitensis Rev1*



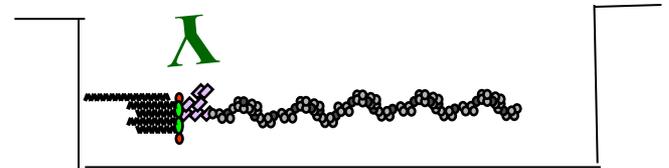
No reacción cruzada en tests que usan bacterias completas como Ag: **RB** y **FC**

**RB51**



Λ

Λ



Pero puede darla en otras como por ej. **ELISA**

# Clinical and bacteriological responses of ewes vaccinated with the R mutants or Rev1 to the challenge with *B. melitensis* 53H38 (H38)



**Table 2.**

Group	No. of ewes	Mean pregnancy (days)	No. of abortions (%)	No. of excretors <sup>a</sup> (%)	No. of infected carcasses at slaughter (%)	Mean carcass infection index <sup>b</sup>	No. Of protected animals <sup>c</sup> (%)
Control	15	110	15 (100)	15 (100)	15 (100)	17.83	0 (0)
Rev. 1	12	148*	0 (0)*	0 (0)*	0 (0)*	0*	12 (100)*
Bm H38wbkF	13	134*	5 (38)*	6 (46)*	5 (38)*	5.38*	7 (54)*
Bm H38per	11	124	7 (64)*	7 (64)*	6 (54)*	6.82	4 (36)*
Bm 16Mwa**	13	130	7 (54)*	8 (61)*	8 (61)*	15.96	4 (31)*

La vacunas rugosas NO protegen bien frente a *B. melitensis*  
 ¿Y frente a *B. ovis* (rugosa) ? Estamos en ello...

# Vacunas DIVA:

Rugosas:

se elimina la cadena O del S-LPS mediante manipulación genética para que no interfieren en los tests diagnósticos oficiales (RB, FC, ELISA etc..)

**Marcadas:** delección o adición de proteínas

+

**TEST DIAGNÓSTICO** asociado que detecte la proteína delecionada o añadida

# SOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

## ABANDONAR LA VACUNACION

Propuesta del Ministerio y aceptado por la UE y algunas CCAA  
incluyendo Aragón

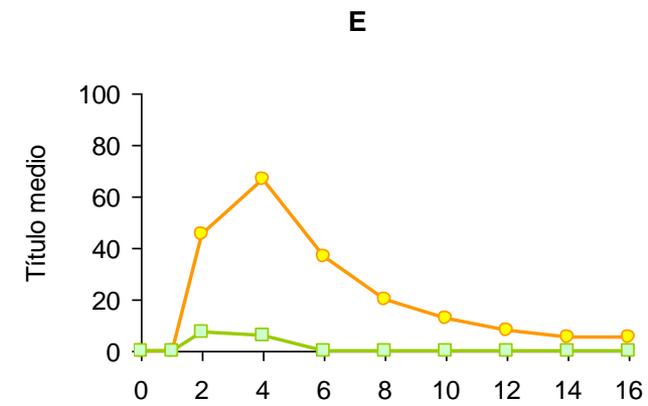
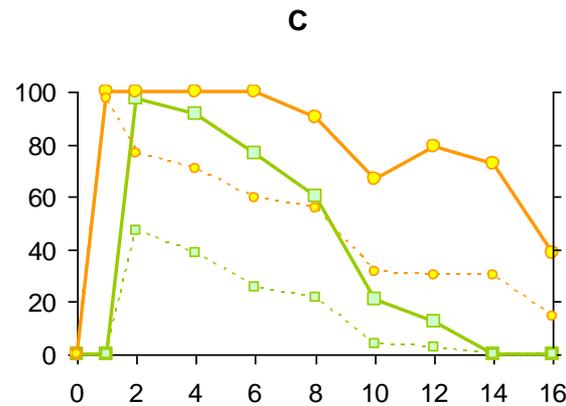
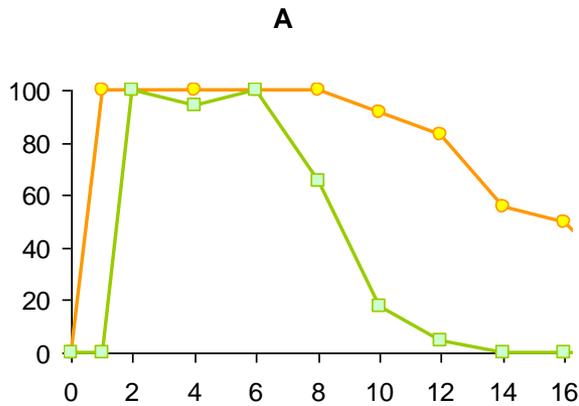
INNECESARIO Y UN GRAVE ERROR DE IMPREVISIBLES  
CONSECUENCIAS

APLICAR PAUTAS DE VACUNACION ADECUADAS

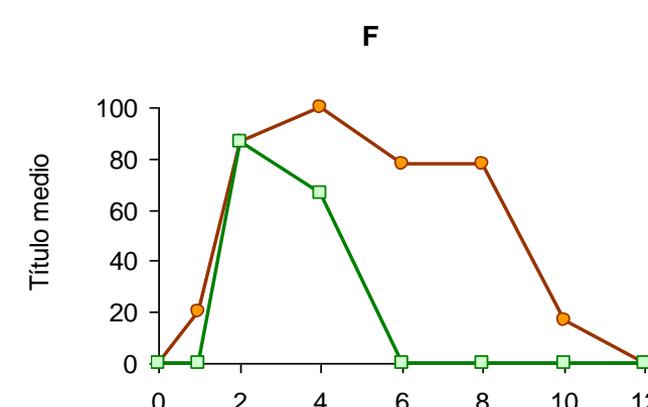
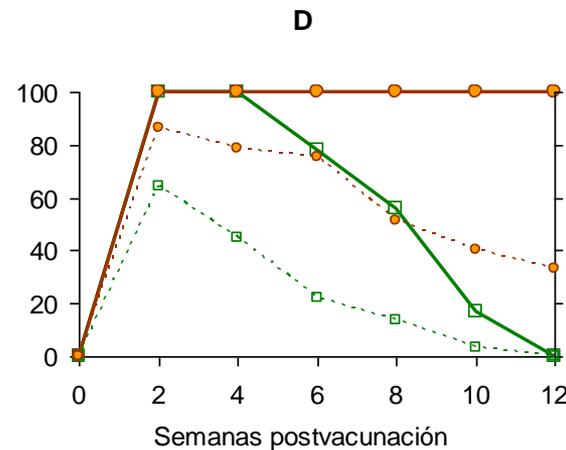
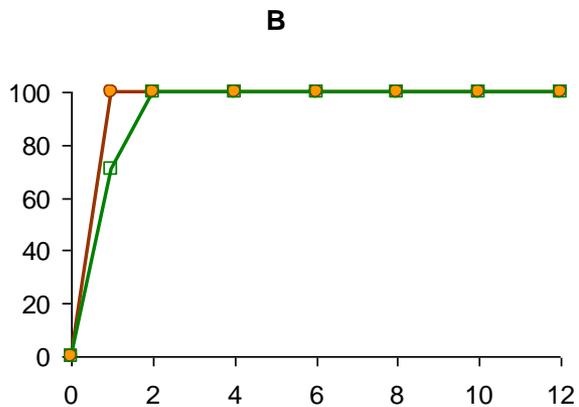
# PAUTAS DE VACUNACION ADECUADAS

\* Respetar escrupulosamente los 3-4 meses de edad

## Animales jóvenes



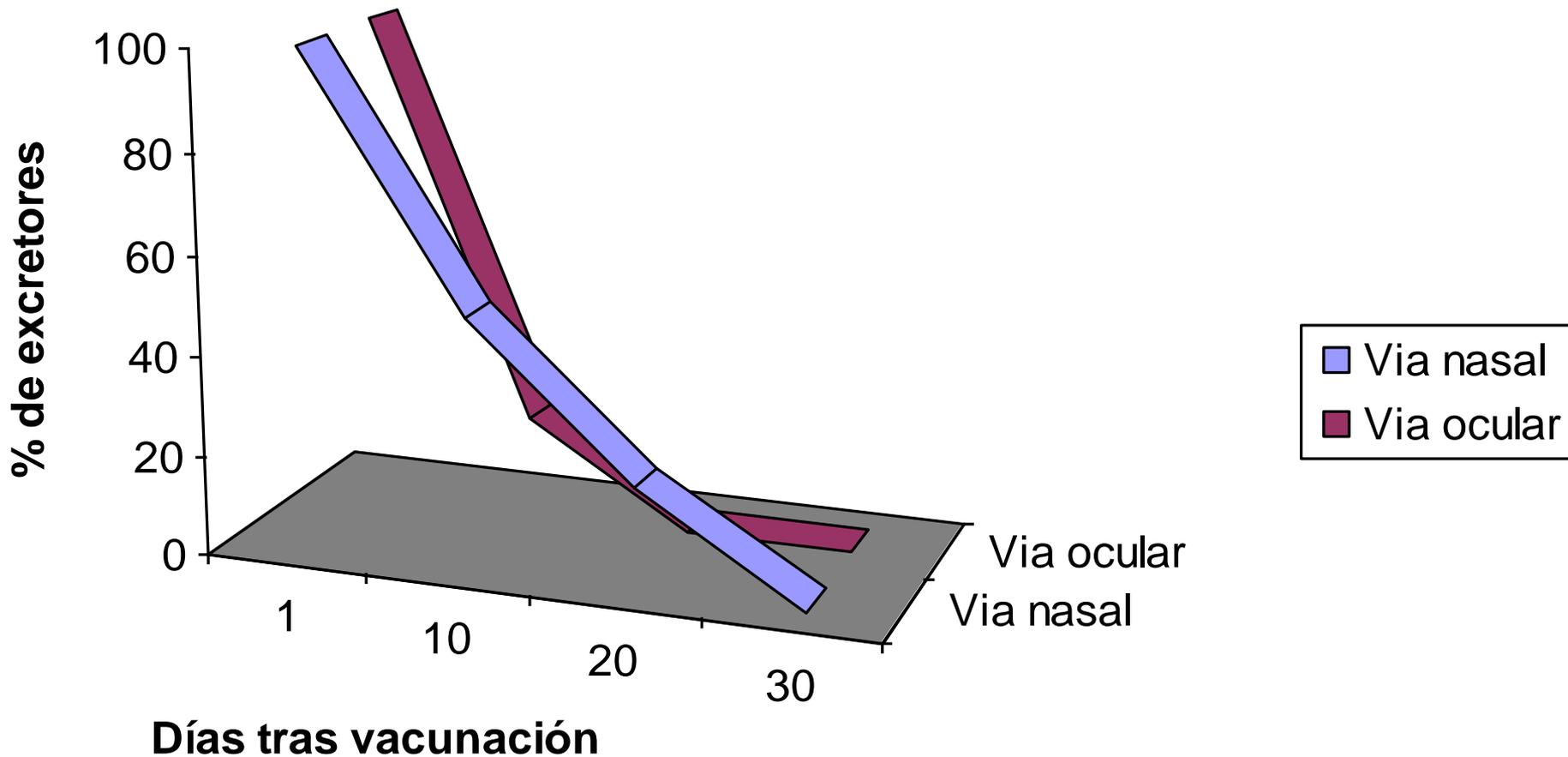
## Animales adultos



## PAUTAS DE VACUNACION ADECUADAS

\* Vacunar en **local separado** y **esperar 3-4 SEMANAS** para introducir corderos vacunados al rebaño general

EXCRECION NASAL Y OCULAR DE LA CEPA VACUNAL Rev 1 TRAS LA VACUNACION CONJUNTIVAL (*Guilloteau et al, 2006, Vaccine 24, 3461*)



# Definir UNIDADES EPIDEMIOLÓGICAS y PREVALENCIA COLECTIVA (%rebaños infectados)

↙  
**ALTA (>10%)**  
↓

**PROGRAMA DE CONTROL**

↓  
**VACUNACION MASIVA REV 1**

↓  
**MODERADA (2-10%)**  
↓

**PROGRAMA COMBINADO (Rev1+ D&S)**

**INDEMNE (M3)**

↘  
**BAJA (<2%)**  
↓

**PROGRAMA D&S**

**OFICIALMENTE INDEMNE (M4)**

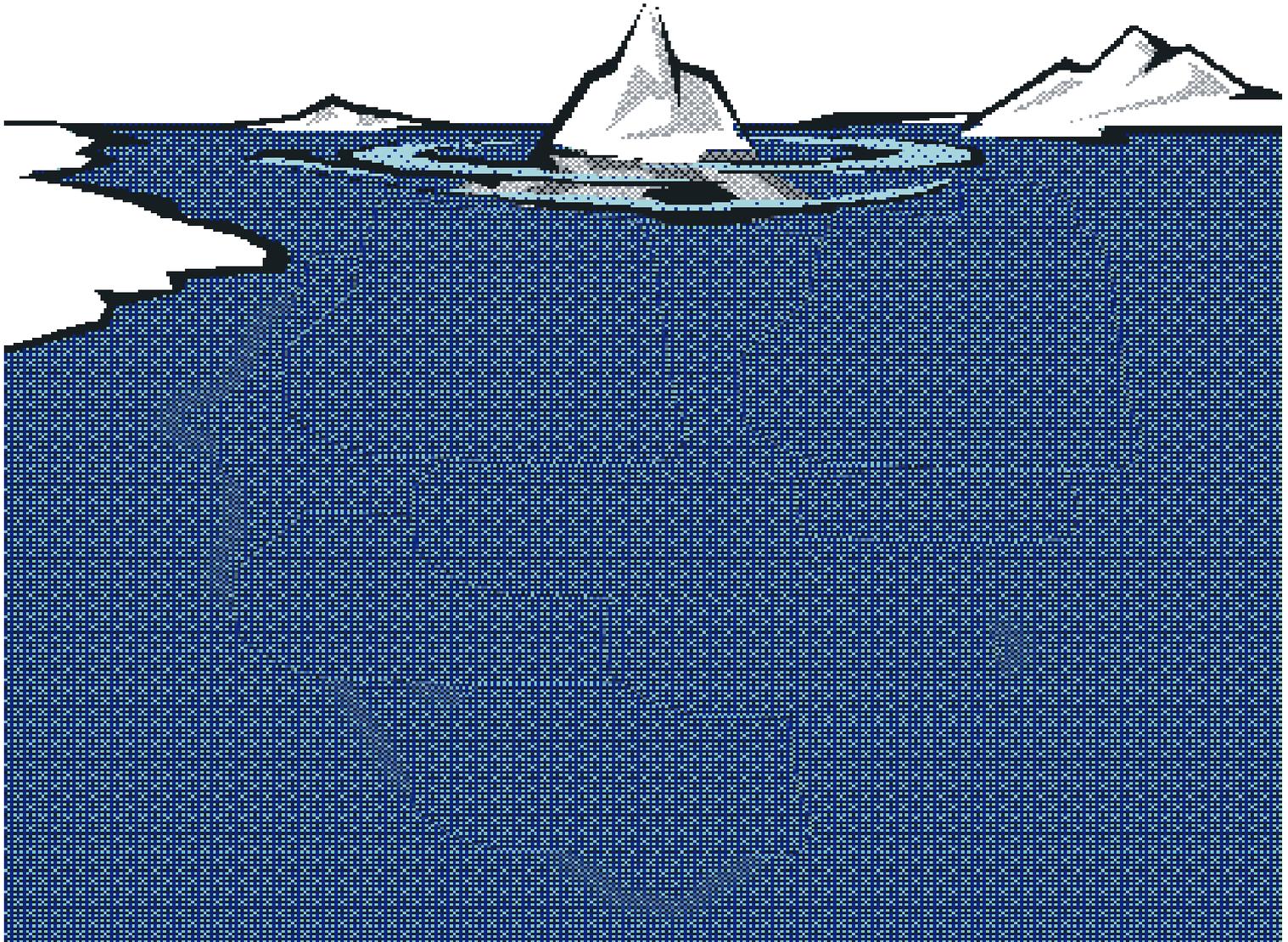
¿Eres capaz de?

- Identificar 100% de los animales y controlar movimientos
- Analizar gran números de sueros en poco tiempo
- Indemnizar a los ganaderos por sacrificar sus animales

# ERRADICACION DE LA BRUCELOSIS

- Pruebas diagnósticas

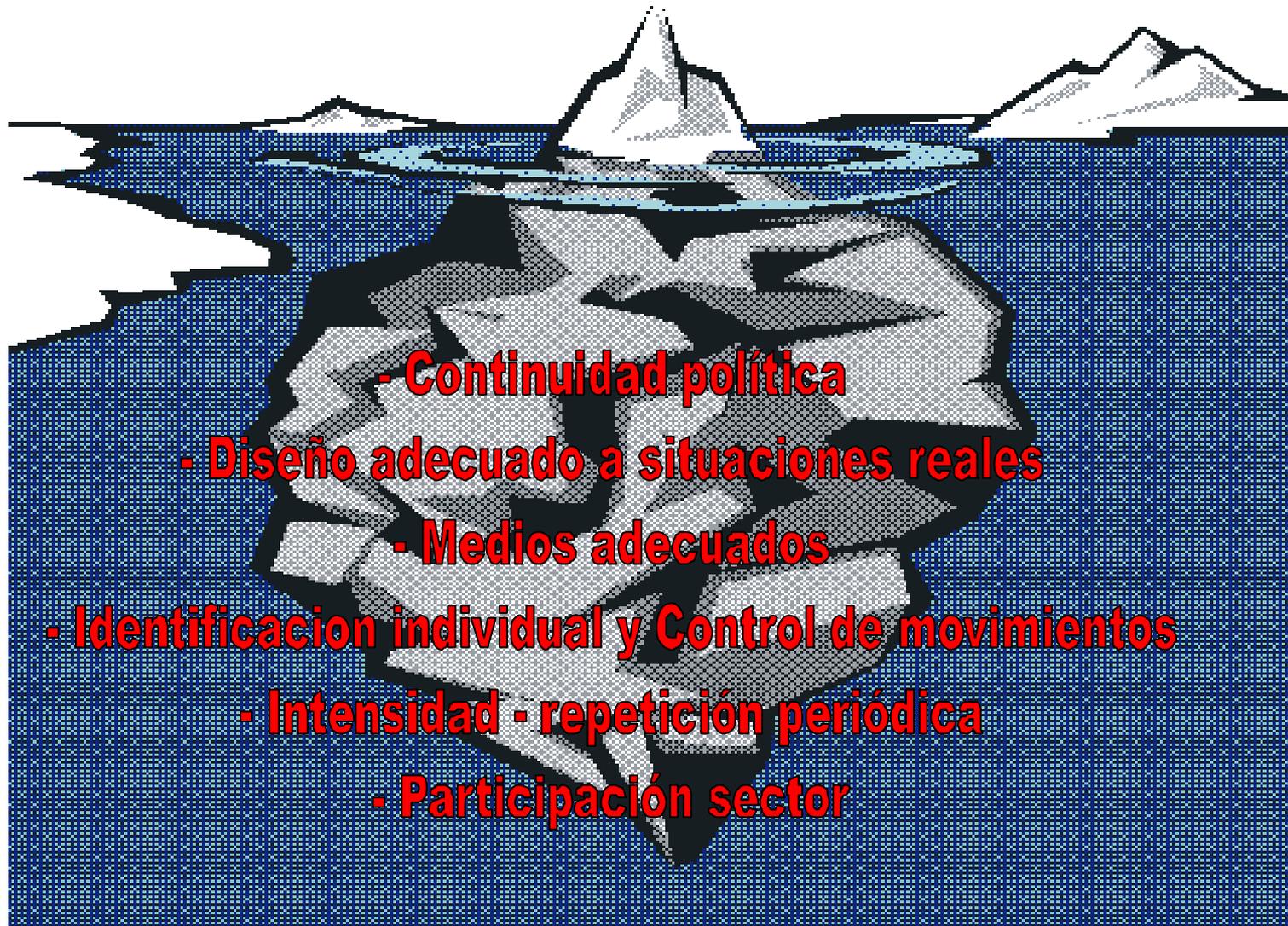
- Vacunas



# ERRADICACION DE LA BRUCELOSIS

- Pruebas diagnósticas

- Vacunas



- Continuidad política

- Diseño adecuado a situaciones reales

- Medios adecuados

- Identificación individual y Control de movimientos

- Intensidad - repetición periódica

- Participación sector